

**Univerzita Karlova v Praze**

**1. lékařská fakulta**

Postgraduální studium biomedicíny

Obor: buněčná a molekulární biologie, genetika a virologie



**DIZERTAČNÍ PRÁCE**

**Rekombinantní vakcíny proti solidním a hematologickým  
nádorům: vývoj a stanovení jejich účinnosti**

*Recombinant vaccines against solid and hematological cancer:  
development and monitoring of vaccines-induced immunity*

**RNDr. Katarína BABIAROVÁ**

Vedoucí závěrečné práce: RNDr. Šárka NĚMEČKOVÁ, DrSc.

Pracoviště: Oddělení experimentální virologie  
Ústav hematologie a krevní transfuze

Praha, 2013

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 20.6.2013

RNDr. Katarína BABIAROVÁ

.....

## **Poděkování**

Děkuji RNDr. Šárce Němečkové, DrSc. za odborné vedení, cenné rady, neustálé nápady a za její optimistický přístup během celého doktorandského studia.

Vděčnost náleží také RNDr. Janě Mackové, PhD. za osvojení metody ELISPOT, díky které se mi otevřely dveře do tajů imunologie.

Velké díky patří všem mým kolegům za obětavý přístup, přípravu různých materiálů, pomoc s metodami, konzultace, poznámky, ale hlavně za vytvoření příjemné pracovní atmosféry.

Zvláště chci vyjádřit obrovskou vděčnost mojí mamince a nejlepší kamarádce paní Borčin, které mi pomáhaly v těžkých chvílích (nejen) vědeckého života. V neposlední řadě děkuji mému příteli Michalovi za korekci mé češtiny, jeho trpělivost, podporu a lásku.

Identifikační záznam:

BABIAROVÁ, Katarína. *Rekombinantní vakcíny proti solidním a hematologickým nádorům: vývoj a stanovení jejich účinnosti. [Recombinant vaccines against solid and hematological cancer: development and monitoring of vaccines-induced immunity]*. Praha, 2013. 163 stran, 3 přílohy. Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav hematologie a krevní transfuze. Vedoucí závěrečné práce Němečková, Šárka.

## Abstrakt

Nádorová buňka je charakteristická produkcí nádorových antigenů, čímž se odlišuje od normální somatické buňky a stává se cílem efektorových mechanismů protinádorové imunity. Předložená práce byla zaměřena na vývoj a především studium buněčné imunitní odpovědi rekombinantních vakcín namířených proti několika nádorovým antigenům, specifickým pro hematologické a solidní nádory. Stanovení účinnosti těchto vakcín probíhalo na myším modelu, především pomocí testu ELISPOT-IFN $\gamma$ .

V první části jsem se soustředila na vývoj a stanovení účinnosti genetických a peptidových vakcín proti WT1+ nádorům. Jako nejefektivnější se ukázaly peptidové vakcíny aplikované intradermálně (i.d.) tetováním, podávané společně s nemetylovanými CpG motivy a protilátkou neutralizující TGF $\beta$  v nádoru.

Dále jsem sledovala protinádorovou imunitní odpověď na vakcíny nesoucí sekvenci ze spojové oblasti fúzního proteinu BCR-ABL, charakteristického pro chronickou myeloidní leukemii. V laboratoři Doc. Forstové byly připraveny vakcíny na bázi partikulí podobných myšimu polyomaviru (MPyV-VLP), v naší laboratoři jiné typy vakcín (rekombinantní virus vakcinie (rVACV), DNA). Vakcíny nebyly účinné, jelikož protein BCR-ABL není vhodný imunogen, jak se ukázalo později nejen z této studie.

V poslední části dizertační práce se podařilo zvýšit účinnost rVACV vakcín proti nádorům asociovaným s lidským papilomavirem 16 (HPV 16) pomocí ko-exprese různých imunomodulátorů (receptor II. typu pro TGF $\beta$ , Flt3 ligand).

Klíčové slova: WT1 protein, BCR-ABL protein, MPyV-VLP, rVACV, protinádorové vakcíny

## Abstract

Cancer immunotherapy is concerned generally with the activation of cancer immunity specific for tumor antigens (TA) produced by cancer cells. My PhD thesis focused on the development of different types of cancer vaccines expressing various TA and predominantly on the determination of the efficacy of these vaccines. For studying TA-specific cancer cellular immunity in mice immunized with these vaccines, I used mainly the ELISPOT-IFN $\gamma$  assay.

First, DNA, recombinant vaccinia virus (rVACV) and peptide vaccines against WT1 positive tumors were prepared. They consist of a fragment of WT1 protein with motifs predicted to bind to D<sup>b</sup> murine MHC class I. The administration of peptide vaccines by tattoo delivery in combination with unmethylated CpG motifs and anti-TGF $\beta$  monoclonal antibody was the most effective.

Next, I was interested in the immunotherapy of chronic myeloid leukemia (CML). Hruskova et al. prepared the mouse polyomavirus-like particles (MPyV-VLP) carrying the junction region of BCR-ABL fusion protein (136). In our laboratory, there were constructed the other types of CML vaccines with the expression of the junction region of BCR-ABL fusion protein, such as DNA or rVACV, too. Prepared vaccines failed to induce effective cancer immune response. It seems that BCR-ABL epitopes appeared to be a weakly immunogenic.

Finally, we were able to enhance the effectiveness of the rVACV vaccines against tumors expressing HPV16-E7 oncoprotein by co-expression of either soluble TGF $\beta$  receptor II or Flt3 ligand.

Key words: WT1 protein, BCR-ABL protein, MPyV-VLP, rVACV, cancer vaccines

## Seznam použitých zkratek

(k)bp	1000 base pairs
(r)CyaA	(recombinant) adenylate cyclase produced by <i>Bordetella pertusis</i>
(r)VACV	(rekombinant) vaccinia virus
12B1	BCR-ABL transformed mouse (Balb/c mice) leukemic cells
1D11	anti-TGF $\beta$ monoclonal antibody
5-azaC	5-azacytidine
A	adenine
AAV	Adeno-associated virus
ABL	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog
ACI	Academy of Cancer Immunology
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
AML	Acute Myeloid Leukemia
APC	antigen-presenting cells
ATP	adenosine-5'-triphosphate
BAK	Bcl-2 homologous antagonist/killer
Balb/c	type of inbreeding mice
Bam	Barrel assembly machinery
Bax	BCL-2-associated X
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
BCR	Breakpoint Cluster Region
BCR-ABL	fusion protein encoded by Philadelphia chromosome in CML
C	cytosine
C1498	murine (C57Bl/6 mice) leukemia cell line
C57Bl/6	type of inbreeding mice
CAF	carcinoma-associated fibroblasts
CD	Cluster of Differentiation
CD40L	CD40 ligand
CDK	cyclin-dependent kinase
cDNA	complementary DNA
c-fms	colony-stimulating factor-1 receptor
CID	Cancer Immunome Database
c-kit = SCFR = CD117	mast/stem cell growth factor receptor
CML	Chronic Myeloid Leukemia
CMV	cytomegalovirus
CP	coat protein of Potato virus A
CpG ODN	CpG oligodeoxynucleotides
Crk	CT10 regulator of kinase
CRT	calreticulin
CSC	cancer stem cells

---

CSF	colony-stimulating factor
CTL	cytotoxic T-lymphocyte
CTLA	cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen
CXCL	chemokine (C-C motif) ligand
DAMP	damage-associated molecular pattern
Dbl	Diffuse B-Cell Lymphoma
DC	dendritic cells
DNA	deoxyribonucleic acid
DNAM-1	DNAX accessory molecule-1
E/L	poxvirus early/late synthetic promotor
E2F	eukaryotic transcription factor 2
E6AP	E6 associated protein
EEV	extracellular enveloped virion of poxvirus
EGFP	enhanced green fluorescence protein
EGFR	epidermal growth factor receptor
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ELISPOT	Enzyme-Linked Immunosorbent Spot Assay
ER	endoplasmic reticulum
Fas	Fatty Acid Synthase (Death Receptor)
FasL	Fas ligand
FBL3	Friend virus-induced leukemia cell line in C57BL/6 mice
Fc	immunoglobulin fragment
FGF	fibroblast growth factor
Flt3	Fms-like tyrosinkinase 3
Flt3L	Fms related tyrosine kinase 3 Ligand
FoxP3	transcription factor Forkhead box P3
G	guanine
Gab-1, 2	GRB2-associated-binding protein 1, 2
GEF	guanine nucleotide exchange factor
GITR	glucocorticoid-induced TNF receptor-related antigen 4
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
Gr-1	granulocyte differentiation antigen 1
Grb-2	growth factor receptor-bound protein 2
GTP	guanosine-5'-triphosphate
GUS-WT1	fusion protein consisting of gene for $\beta$ -glucuronidase and a part of gene for murine WT1
H5	promoter of poxvirus gene H5R
HBV	Hepatitis B virus
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HLA	Human Leukocyte Antigen
HMGB1	high-mobility group box 1
HPV (16)	Human Papillomavirus (16)
HPV16-E6	oncoprotein E6 encoded by HPV16
HPV16-E7	oncoprotein E7 encoded by HPV16



---

H-ras	GTPase, transforming protein p21
HSP	Heat Shock Protein
i.c.	intracellular (y)
i.d.	intradermal(ly)
i.m.	intramuscular(y)
i.n.	intranasal(ly)
i.p.	intraperitoneal(ly)
ICD	imunogenic cell death
IDO	indoleamine-2,3-dioxygenase
IFA	incomplete Freund's adjuvant
IFN	interferon
Ig	immunoglobulin
IGF	insulin-like growth factor 1
IGF-R	insulin-like growth factor 1 receptor
IL	interleukin
IL-2R	interleukin 2 receptor
IMV	intracellular mature virion of poxvirus
iNOS	inducible nitric oxide synthase
IR	insulin receptor
IS	immune system
Jun	transcription factor (= AP-1)
K562	human acute myelocytic leukemia cell line
kDa	1000 Daltons
KIR	killer inhibitory receptor
KLH	Keyhole limpet hemocyanin
L1, L2	capsid proteins of HPV16
LAA	leukemia associated antigens
LAG-3	lymphocyte-activation gene 3
LAMP	lysosomal-associated membrane protein
LICR	Ludwig Institute for Cancer Research
mAb	monoclonal antibody(s)
MAP(K)	mitogen-activated protein kinase
MART-1	melanoma antigen recognized by T-cells
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
MDA-MB-231	human breast adenocarcinoma cell line
MDM2	mediator of DNA damage 2
MDS	myelodysplastic syndromes
MDSC	myeloid-derived suppressor cells
MHC	major histocompatibility complex
MIC	MHC class I polypeptide-related sequence
MIE	major immediate-early promoter of CMV
MMP	matrix metalloproteinase
MPyV	Mouse Polyomavirus

MRD	Minimal Residual Disease
mRNA	messenger ribonucleic acid
MVA	Modified Vaccinia virus Ankara
MYC	myelocytomatosis oncogene
MyD88	myeloid differentiation primary response gene 88
NF- $\kappa$ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK	Natural Killer
NKT	Natural Killer T
NLS	nuclear localization signal
NYVAC	New York Vaccinia Virus
ORI	origin of replication
P13	virus vaccinia strain Praha 13
P2RX7	ionotropic purinergic receptors
p53	tumor-suppressor protein (53 kDa)
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PBS	phosphate buffered saline
PD-1	programmed cell death protein 1
PDGF	platelet-derived growth factor
PGE	prostaglandin E
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
poly I:C	polyinosinic-polycytidylic acid
poly(A)	polyadenylation signal sequence
pR	poly-L-arginine
PR	proteinase
PRAME	preferentially expressed antigen in melanoma
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
RAF	serine/threonine-specific protein kinases that are related to retroviral oncogene
RAS	Rat sarcoma
Rb	retinoblastoma protein
Rho	Ras homolog gene
RNA	ribonucleic acid
ROS	reactive oxygen species
s.c.	subcutaneous(ly)
SCF	stem cell factor
SEREX	SERological EXpression of cDNA expression libraries
SH	Src Homology
SigE7LAMP	fusion protein consisting of HPV16-E7 and signal sequence of LAMP1
Smad	transcription factor
SS	signal sequence of E3 adenovirus protein

ss (ds) DNA /RNA	single-stranded (double-stranded) DNA/RNA
SV40	Simian vacuolating virus 40/Simian virus 40
T	thymine
TA	tumor antigen(s)
TAA	tumor-associated antigen
TA-DC	tumor-associated dendritic cells
TAM	tumor-associated macrophages
TAP-1	transporter associated with antigen processing
TC-1	HPV16-E6, HPV16-E7 and H-ras transformed murine (C57Bl/6 mice) cell line
TCR	T-cell receptor
Tetox	Tetanus Toxoid
TGF $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$
TGF $\beta$ II-Fc	Transforming Growth Factor $\beta$ Receptor II fused with immunoglobulin fragment
TGF $\beta$ RI, II, III	Transforming Growth Factor $\beta$ Receptor I, II, III
Th-lymfocyty	helper T lymphocytes
TIL	tumor infiltrating lymphocytes
TLR	toll-like receptor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRAMP-C2	WT1+ cell line of prostate cancer in C57Bl/6 mice
Treg	Regulatory T cells
TSA	tumor specific antigen
TSP-1	thrombospondin-1
ULBP2	UL16 binding protein 2
UTR	untranslated region
VACV-E3	vaccinia virus protein E3
VEGF	vascular endothelial growth factor
VLP	virus-like particles
VP1, 2, 3	polyomavirus major capsid protein 1, 2, 3
Wnt-4	protein implicated in embryogenesis
WT1	Wilms' tumor 1
$\alpha$ -SMA	$\alpha$ -smooth muscle actin

## OBSAH

1. ÚVOD.....	14
2. CÍLE PRÁCE.....	15
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	16
3.1 Charakteristika nádoru a nádorové buňky .....	16
3.1.1 Nádorové mikroprostředí .....	17
3.2.1 Protinádorová imunitní odpověď .....	21
3.2.2 Způsoby úniku nádoru před imunitní odpovědí.....	23
3.3 Nádorové antigeny.....	24
3.3.1 WT1, antigen asociovaný s nádorem.....	24
3.3.1.1 WT1 v normálních tkáních .....	24
3.3.1.2 WT1 a karcinogeneze .....	27
3.3.1.3 WT1 jako imunogen .....	28
3.3.2 BCR-ABL, fúzní onkoprotein chronické myeloidní leukémie (CML).....	29
3.3.3 Virové onkoproteiny E6 a E7 lidského papilomaviru HPV 16 .....	31
3.4 Terapie nádorů .....	33
3.4.1 Imunoterapie nádorů .....	34
3.5 Protinádorové vakcíny .....	35
3.5.1 Typy protinádorových vakcín.....	36
3.5.1.1 Virové vakcíny na bázi viru vakcinie .....	40
3.5.1.2 DNA vakcíny .....	44
3.5.1.3 Peptidové vakcíny.....	46
3.5.1.4 Vakcíny na bázi partikulí podobných virům (VLP vakcíny).....	49
3.5.2 Imunomodulátory účinnosti protinádorových vakcín na bázi viru vakcinie .....	50
3.5.2.1 TGFβ a jeho receptory v normální buňce a v karcinogenezi.....	51
3.5.2.2 Flt3 ligand a jeho tyrozinkinázový receptor Flt3 .....	53
3.6 Hodnocení imunitní odpovědi protinádorových vakcín .....	54
4. VÝSLEDKY .....	58
Publikace 1.....	59
Immunization with WT1-derived peptides by tattooing inhibits the growth of TRAMP-C2 prostate tumor in mice.....	59
Publikace 2.....	60

BCR-ABL fusion sequences do not induce immune responses in mice when administered in mouse polyomavirus based virus-like particules .....	60
Publikace 3.....	61
Expression of the soluble TGF- $\beta$ receptor II by recombinant vaccinia virus enhances E7 specific immunotherapy of HPV16 tumors.....	61
Publikace 4.....	62
The expression of the soluble isoform of hFlt3 ligand by recombinant vaccinia virus enhances immunogenicity of the vector .....	62
5. DISKUZE .....	63
5.1. Vývoj vakcíny proti nádorům exprimujícím WT1 a studium efektorových mechanismů protinádorové imunitní odpovědi. ....	65
5.2. Studium imunitní odpovědi proti nádorovému antigenu BCR-ABL po imunizaci vakcínami na bázi partikulí podobných myšimu polyomaviru (MPyV-VLP) .....	70
5.3. Studium buněčné imunitní odpovědi vyvolané imunizací vakcínami rekombinantního viru vakcinie (rVACV) proti nádorům asociovaným s lidským papilomavirem 16 (HPV 16), u kterých byla jejich protinádorová účinnost zvýšena ko-expresí imunomodulátorů (receptoru II. typu pro TGF $\beta$ , tj. TGF $\beta$ RII; Flt3 ligand, tj. Flt3L) .....	72
6. ZÁVĚR .....	78
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	79
8. PŘÍLOHY .....	112

## 1. ÚVOD

Imunoterapie nádorů je založena na rozdílech nádorové buňky a jejího mikroprostředí oproti normálním buňkám zbytku těla, např. přítomnosti nádorových antigenů (TA; tumor antigens). Jedním z jejích úkolů je aktivace TA-specifických efektorových mechanismů. Cílem této práce byl vývoj rekombinantních vakcín proti nádorům pozitivním na TA a především studium jimi indukované imunitní odpovědi. Účinnost vakcín byla sledována na myším modelu.

V první části jsem se soustředila na vývoj a stanovení účinnosti genetických a peptidových vakcín proti WT1+ hematologickým a solidním nádorům. Genetické vakcíny exprimovaly fragment mezi 94. a 249. aminokyselinou myšího proteinu WT1, který sestával z několika známých epitopů specifických pro cytotoxické T-lymfocyty (CTL; cytotoxic T-lymphocytes). Jako nejefektivnější se ukázaly peptidové vakcíny aplikované i.d. tetováním a podávané společně s protilátkou neutralizující TGF $\beta$  v nádoru (10).

Dalším úkolem mé doktorandské práce bylo studium chronické myeloidní leukémie (CML) a možnosti její terapie. Expresí fúzního proteinu BCR-ABL je charakteristická pro více než 90% pacientů s CML. Různé studie naznačovaly, že tento protein (především jeho unikátní zlomová oblast) je imunogen vhodný pro indukci protinádorové odpovědi. V našich laboratořích bylo vytvořeno několik typů vakcín exprimujících sekvenci dlouhou 25 aminokyselin ze zlomové oblasti uvedené části proteinu: plasmidové DNA vakcíny (199) vakcíny na bázi rekombinantního viru vakcinie (rVACV) a vakcíny z dendritických buněk (Němečková, nepublikovaná data), či nádorové buněčné vakcíny (268-270). V laboratoři Doc. Forstové byly zkonstruovány také vakcíny MPyV-VLP, ve kterých jsem nedetekovala žádnou BCR-ABL-specifickou T-buněčnou protinádorovou odpověď. Ukázalo se, že nejsou účinné ani v terapii myších nádorů (136). Později se zjistilo, že protein BCR-ABL není vhodný imunogen.

Už několik let se v naší laboratoři věnuje pozornost přípravě rVACV vakcín proti nádorům asociovaným s lidským papilomavirem 16 (HPV 16), v poslední době především zvýšení jejich protinádorové účinnosti ko-expresí různých imunomodulátorů (receptoru II. typu pro TGF $\beta$ , Flt3 ligand) (375,376). Náplní mojí části práce bylo studium protinádorové imunity indukované těmito rVACV.

## 2. CÍLE PRÁCE

Vývoj rekombinatních vakcín proti nádorovým antigenům specifickým pro hematologické a solidní nádory:

1. Vývoj vakcíny proti nádorům exprimujícím WT1 a studium efektorových mechanismů protinádorové imunitní odpovědi.
2. Studium imunitní odpovědi proti nádorovému antigenu BCR-ABL po imunizaci vakcínami na bázi partikul podobných myšimu polyomaviru.
3. Studium buněčné imunitní odpovědi vyvolané imunizací vakcínami rekombinantního viru vakcinie proti nádorům asociovaným s lidským papilomavirem 16, u kterých byla jejich protinádorová účinnost zvýšená ko-expressí imunomodulátorů (receptoru II. typu pro TGF $\beta$ ; Flt3 ligand).

Předkládaná dizertační práce byla vypracována za podpory následujících grantů:

- NS 10660-3/2009 IGA MZ ČR
- NR 9238-3/2007 IGA MZ ČR
- ERDF OPPK CZ.2.16/3.1.00/24001
- MZO UHKT 2005 MZ ČR
- 78608 GAUK
- 310/05/H5333 GA ČR

### 3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

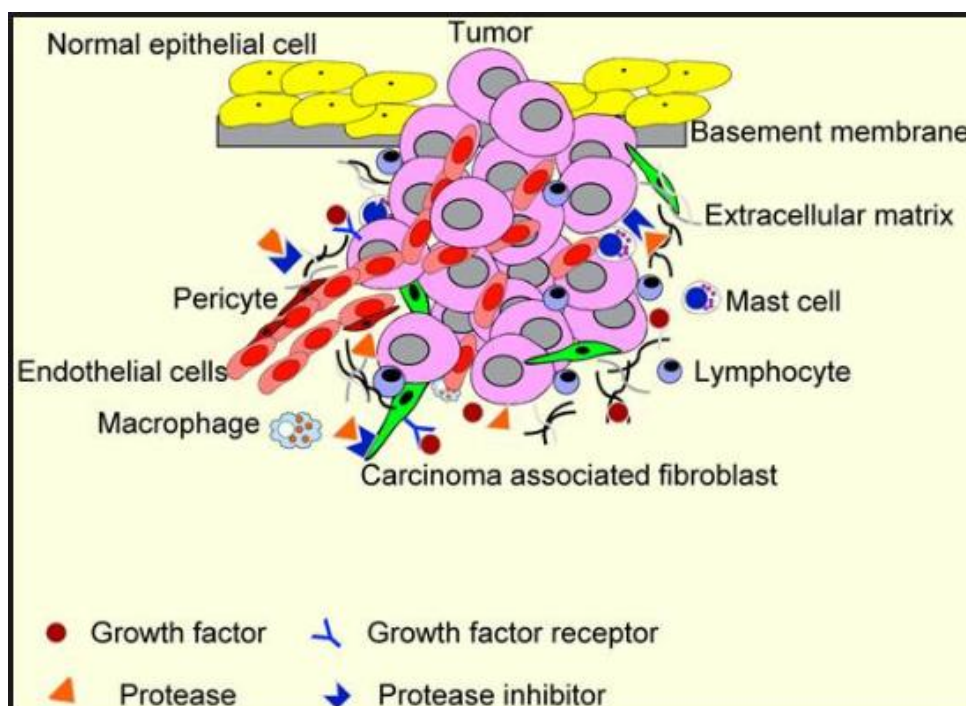
#### 3.1 Charakteristika nádoru a nádorové buňky

Vznik nádorového onemocnění je proces postupný, nikoliv jednorázový. Buňky normální tkáně kontrolují produkci a uvolňování signálů podporujících růst, tj. zabezpečují homeostazi v počtu buněk, udržují normální architekturu a funkce tkáně. Rozdílný charakter mají buňky tvořící nádor. Nádorová buňka je charakteristická nadměrnou podporou proliferačních signálů vedoucích k nekontrolované proliferaci. Ta je způsobena nezávislostí na regulátorech růstu, sníženými nároky na růstové faktory, nesmrtelností resp. rezistencí k buněčné smrti (zvýšením exprese antiapoptických regulátorů jako Bcl-2, Bcl-xL, snížením exprese proapoptických molekul jako Bax, Bam, PUMA, apod.), ztrátou kontaktní inhibice, indukci angiogenezy (permanentní podpora produkce angiogenních faktorů jako VEGF-A nebo TSP-1 apod.), schopností invaze a tvorbou metastáz (118,352,373).

Uvedené vlastnosti nádorové buňky jsou vyvolány nestabilitou jejího genomu vzniklého hromaděním somatických mutací v některých genech, např. v genech aktivujících receptory pro růstové faktory (RAF-MAP kinázové signální dráhy). Charakteristické jsou také různé epigenetické změny, zvýšená exprese onkogenů (RAS, MYC, RAF), či ztráta funkčnosti tumor-supresorových genů (p53 protein, RB protein).

Nádor je víc než jen izolovaná masa proliferujících nádorových buněk. Jedná se o komplexní tkáň tvořenou různými typy navzájem interagujících buněk (118). Kromě základních nádorových buněk zodpovědných za vznik tumoru, jej tvoří podtřída neoplastických buněk, tzv. nádorové kmenové buňky (CSC; cancer stem cells). Prvně byly identifikovány v hematologických malignitách (27,285), až o deset let později i v solidních nádorech (2,105). Další součástí nádoru jsou endoteliální buňky (odpovědné za vaskularizaci tumoru), okolo krevních cév jsou ovinuty pericyty (specializovaný mezenchymální typ buněk regulující angiogenezi), fibroblasty asociované s nádory (CAF; carcinoma-associated fibroblasts) a buňky imunitního systému (IS). V důsledku interakcí s nádorovými buňkami získávají všechny tyto buňky abnormální fenotyp a pozměněné funkce. Tvoří tzv. nádorové mikroprostředí (118) (Obrázek 3.1.1).



Obrázek 3.1.1 **Buňky nádoru a nádorového mikroprostředí** (172)

### 3.1.1 Nádorové mikroprostředí

Nádorové mikroprostředí neboli stroma, zabezpečuje výživu, růst a expanzi nádorových buněk. Pripomíná prostředí hojící se rány. Na úzkou spojitost mezi zánětem a karcinogenezí poukázal už v roce 1883 Rudolf Virchow, který jako první objevil přítomnost leukocytů ve vzorcích maligních nádorů. Mnohé pozdější experimentální, klinické a epidemiologické studie potvrdily, že chronický zánět je rizikový faktor pro vývoj nádoru (277). V nádorovém stromatu se střetávají složky protinádorové imunity se složkami IS podporujícími růst nádoru (53,110,277).

Největší zastoupení z buněk IS mají v nádorovém mikroprostředí lymfocyty, které infiltrují nádory (TIL; tumor infiltrating lymphocytes). Patří sem původně CTL a/nebo paměťové CD45RO<sup>+</sup> T-buňky pocházející z aktivovaných CD4<sup>+</sup> a/nebo CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů. Součástí je také nepatrné množství NK-buněk (69,352). TIL produkují růstové faktory a cytokiny nezbytné pro růst nádoru. Sekretují převážně cytokiny podporující Th2 buněčnou imunitní odpověď (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 a IL-21), GM-CSF a nepatrné množství, resp. žádné Th1 cytokiny (IL-2, IFN $\gamma$  a IL-12). Vzniká cytokinová nerovnováha, která vede k úniku nádorů před imunitním dozorem a k tvorbě

prostředí vhodného pro vývoj regulačních T-lymfocytů (Treg), které se stávají součástí TIL (28,352,353).

Treg jsou většinou tvořeny CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty exprimujícími molekuly CD25 (α-řetězec IL-2R), CTLA-4, GITR a transkripční faktor FoxP3. Ve zdravém jedinci zabraňují autoimunitním onemocněním tím, že likvidují efektorové buňky reagující s vlastními antigeny. Obdobným mechanismem blokuje protinádorovou odpověď. Jelikož nádorovou buňku berou jako tělu vlastní, inhibují nádor-specifické CTL a produkují cytokiny IL-10 a TGFβ, které tlumí funkci efektorových buněk (21,352). Zvyšování hladiny Treg v místě nádoru i v periferní krvi koreluje se špatnou prognózou u mnoha solidních nádorů (267).

Podstatnou část nádorového mikroprostředí tvoří makrofágy asociované s nádory (TAM; tumor-associated macrophages), odvozené od makrofágů typu M2 (121). Normální makrofágy absorbují antigeny a hrají důležitou roli v kontrole infekce, naproti tomu TAM jsou reprogramovány na imunosupresi. Sekretují „pronádorové“ cytokiny TGFβ a IL-10, produkují arginázu1, která metabolizuje L-arginin na polyamin a prolin. Zabrání tím funkčnosti T-buněčného receptoru (TCR; T-cell receptor) a vedou k inhibici CTL (12,212). TAM exprimují široké spektrum cytokinů (IL-23, IL-10), růstových faktorů (např. VEGF, PDGF, TGFβ, FGF, CSF-1), proteáz (např. metaloproteázy MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 a MMP12; plasmin) a chemokinů (např. CXCL8, CXCL12), které zodpovídají za iniciaci angiogeneze (121).

Součástí nádorového stromatu jsou dále tzv. myeloidní supresorové buňky (MDSC; myeloid-derived suppressor cells). U myši je možné identifikovat tyto buňky znaky Gr-1<sup>+</sup> a CD11b<sup>+</sup>, u lidí znaky CD33<sup>+</sup> a CD11b<sup>+</sup>. Rozdělují se na monocytární MDSC, tj. CD14<sup>+</sup> HLA-DR<sup>-low</sup> CD66b<sup>+</sup>, a granulocytární MDSC, tj. CD14<sup>-</sup> CD15<sup>+</sup> HLA-DR<sup>-</sup> (324). MDSC snižují imunitní odpověď CTL a NK-buněk produkcí arginázy 1, TGFβ, syntetázy oxidu dusnatého (iNOS), reaktivních forem kyslíku (ROS) a idoleamin-2,3-dioxygenázy (IDO). ROS a reaktivní intermediáty dusíku jsou schopny indukovat poškození DNA a genetickou nestabilitu (110). Vzniklá hypoxie v nádorovém stromatu vede k produkci molekuly CCL28, která přitahuje Treg do místa nádoru (86). MDSC blokuje funkci T-lymfocytů také tím, že jim zabraňuje v příjmu cysteinu a snižuje L-selektin na jejich povrchu (95,110,118,353).

Dendritické buňky (DC; dendritic cells), které jsou v přirozeném prostředí nejlepšími profesionálními antigen-prezentujícími buňkami (APC; antigen-presenting cells), také infiltrují do nádoru. Tady jsou ovlivňovány pronádorovými cytokiny, jako

VEGF, IL-10, prostaglandin E2 (PGE2) (193). Vznikají DC asociované s nádorem (TA-DC; tumor-associated dendritic cells) s imunosupresivními vlastnostmi, které přestávají být schopny indukovat odpověď CTL, přičemž expanze Treg zůstává neporušená. TA-DC v nádorovém mikroprostředí podporují angiogenezi produkcí různých angiogenních faktorů (20). Přítomnost těchto buněk u onkologického pacienta je u některých nádorů spojena s lepší prognózou (280), u jiných naopak (244).

V nádorovém stromatu jsou slabě zastoupeny B-lymfocyty. Výjimkou jsou nádory prsu a melanomu (353). Regulační B-lymfocyty, NKT-buňky typu II, NK-buňky a  $\gamma\delta$  T-lymfocyty také napomáhají imunosupresivním účinkům nádorového mikroprostředí (225).

Kromě buněk IS hrají v nádorovém stromatu důležitou roli CAF. Tvoří je dva typy buněk: (a) buňky podobné fibroblastům, které vytvářejí strukturní základ pro většinu normálních epiteliálních tkání; (b) myofibroblasty, biologickými vlastnostmi a funkcemi odlišné od klasických fibroblastů. Myofibroblasty exprimují  $\alpha$ -SMA ( $\alpha$ -smooth muscle actin). Jejich výskyt v normálních tkáních je omezen na období hojení poranění nebo při chronickém zánětu. V prostředí nádoru CAF přetrvávají a modifikují ho (118). Produkují cytokiny a růstové faktory, resp. jejich receptory (VEGF, TGF $\beta$ , PDGF a PDGF-R, MMP apod.), kterými zvyšují invazivitu nádorových buněk (317).

### 3.2. Nádorová imunologie

Mezi nádorem a IS organismu dochází k interakci nazvané protinádorový dozor („cancer immunosurveillance“). Původní koncept podle F. M. Burnetta byl založen na hypotéze, podle které je IS schopný rozeznat a zlikvidovat nádorové buňky. Moderní verze této teorie zahrnuje i druhou stranu procesu, tj. selekce nádorových buněk rezistentních na protinádorovou imunitní odpověď (353). Z hlediska protinádorového dozoru rozlišujeme tři fáze tumorogeneze: eliminace, ekvilibrium a únik (53,79) (Obrázek 3.2.1).

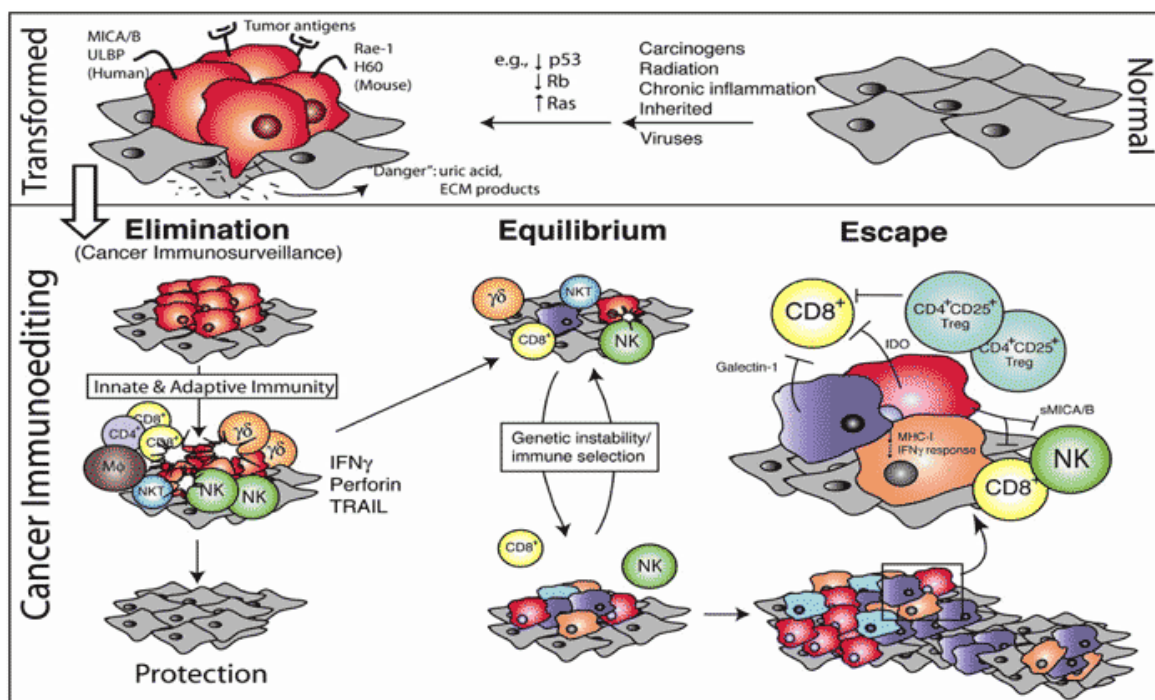
V první fázi, eliminaci, dochází k rozpoznání a následnému zničení vznikajících nádorových buněk, do něhož se zapojují složky nativní (cirkulující NK-buňky, neutrofilů a makrofágy) a především adaptivní imunity (T-lymfocyty a protilátky sekretované B-lymfocyty) (21) (kapitola 3.2.1.).

Během fáze ekvilibria perzistují nádorové buňky, které přežily fázi eliminace. Ekvilibrium se jeví jako nejdelší proces ze všech tří, protože v jeho průběhu pokračuje jak eradikace, tak vznik a proliferace nádorových buněk resistantních vůči protinádorovému dozoru IS (53). V této fázi je likvidace a počet přeživších nádorových buněk v rovnováze.

Do třetí fáze, úniku, se dostávají nádorové buňky unikající většině mechanismů namířených proti nádoru. V této fázi dochází k růstu a rozvoji nádoru. Nádorové buňky se nekontrolovatelně množí a přizpůsobují „k obrazu svému“ bezprostřední okolí. Hledají způsoby, jak co neúčinněji uniknout protinádorové imunitní odpovědi (kapitola 3.1.1). Obrana IS proti vyvíjejícímu se tumoru pokračuje, nicméně neustále slábne.

### Obrázek 3.2.1 Imunitní dozor a imunoeditace nádoru, protinádorová versus pronádorová imunita (80)

Vlivem různých mutagenů (chronický zánět, radiace, chemické a fyzikální mutageny apod.) se hromadí mutace v buňce, které vedou k její transformaci na buňku nádorovou. Její proliferaci a selháním nádor-supresorových mechanismů se vyvíjí nádor, který je detekován a likvidován buňkami imunitního systému (eliminace). Udržení rovnovážného stavu mezi vznikajícími a eliminovanými buňkami nádoru je fáze druhá, ekvilibrium. V konečné fázi nádor uniká imunitnímu dozoru působení různých imunosupresivních mechanismů (escape = únik).



### 3.2.1 Protinádorová imunitní odpověď

Základ protinádorové imunity tvoří T-lymfocyty (především CTL), APC (hlavně DC) a NK-buňky (Obrázek 3.2.2).

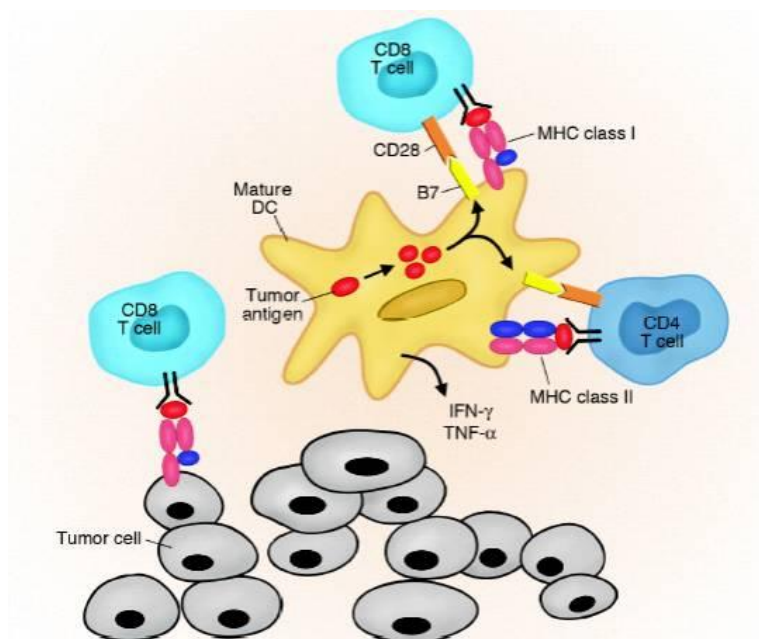
APC nesou tzv. toll-like receptory (TLR), které rozeznávají molekulární struktury patogenních mikroorganismů i nádorů (PAMP; pathogen-associated molecular pattern) nebo molekulární signály asociované s poškozením organismu (DAMP; damage-associated molecular pattern) (53). Nádor produkuje množství cytokinů/chemokinů, které přitahují buňky IS, včetně APC, do těchto míst a nedalekých lymfatických uzlin. Tady APC pohlcují a zpracovávají PAMP a antigeny produkované nádorem. Tato interakce, doprovázená ko-stimulačními signály prostřednictvím receptoru CD40 a různými cytokiny, vede k aktivaci a maturaci APC, které vystavují na svém povrchu peptidy odvozené z antigenů různých patogenů, ale i nádorů. Tyto peptidy, odvozené z molekul TA, jsou prezentovány prostřednictvím molekul hlavního histokompatibilního komplexu (MHC; major histocompatibility complex) I. (endogenní antigeny) a II. třídy (exogenní antigeny). Komplexy peptid/MHC molekula I. třídy (epitopy o velikosti 8-10 aminokyselin) jsou rozeznávány  $\alpha/\beta$  TCR na povrchu T-lymfocytů, které se následně vyvíjejí jako CD8<sup>+</sup> T-lymfocyty, tj. CTL, specifické pro daný antigenní peptid. Peptidy (epitopy o velikosti 13-18 aminokyselin) vázané na MHC molekuly II. třídy stimulují CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty, tj. Th-buňky. Rozdělují se do třech skupin podle cytokinů, které produkují: Th1 buňky (sekretují cytokiny typu I, tj. prozáněťové cytokiny IFN $\gamma$  a IL-2), Th2 buňky (sekretují cytokiny typu II, tj. cytokiny asociované s protilátkovou odpovědí IL-4, IL-5 a IL-13) a Th17 (sekretují cytokiny jako IL-17 a IL-22 v kůži a mukozálních oblastech a způsobují zánět a autoimunitní odpověď). Th1 buňky napomáhají expanzi TA-specifických CTL, schopných eliminovat nádorové buňky. Aktivace T-lymfocytů probíhá až poté, co interakce mezi DC a T-lymfocytem je doplněna signálem mezi ko-stimulačními molekulami CD80 (B7.1) a CD86 (B7.2) uvolňovanými z DC a receptorem CD28 na povrchu T-lymfocytu (28,353). Typ T-lymfocytů, který se vyvine, závisí od signálů dodaných DC. Tyto signály mohou být ovlivňovány množstvím a typem TA, působením kostimulačních molekul a cytokinů produkovaných DC při interakci s T-lymfocytem apod. (353). Kontakt mezi APC a T-lymfocyty bývá označován jako imunologická synapse.

Vzniklé CTL se krevním oběhem dostanou do tkání, kde probíhá zánět. Díky TCR a pomocným adhezivním molekulám rozeznávají na povrchu nádorové buňky nebo buňky

infikované patogenem komplex epitop/MHC molekula I. třídy. Následně dochází k aktivaci cytotoxických mechanismů a usmrcení identifikovaných buněk pomocí dvou způsobů. První vede ke tvorbě pórů v membráně, přes které jsou z CTL do nádorové buňky sekretovány perforiny i granzymy. Vedou k indukci proapoptických drah prostřednictvím aktivace kaspáz, včetně kaspázy 3 a 8 (65,125,149,264). Apoptóza nádorové buňky je také cílem druhého mechanismu. V tomto případě CTL uvolňují Fas ligandy (FasL), které po navázání na receptory Fas na povrchu cílové buňky opět aktivují kaspázy 3 a 8 (367). Aktivita CTL je doprovázena expresí prozánětlivých cytokinů, především  $\text{IFN}\gamma$ .

### Obrázek 3.2.2 Aktivace protinádorové imunitní odpovědi (151)

Nádorový antigen (TA), prezentovaný na povrchu nádorových buněk, je pohlcen a zpracován dendritickými buňkami (DC). Následuje prezentace TA epitopů na povrchu DC prostřednictvím MHC molekul I. a II. třídy, která vede k aktivaci  $\text{CD8}^+$  a  $\text{CD4}^+$  T-lymfocytů.



DC mohou také spouštět protilátkovou, NK-buněčnou a NKT-buněčnou protinádorovou imunitní odpověď, která je hodně tlumená imunosupresivními účinky nádorového mikroprostředí (225). NK-buňky obsahují 2 typy povrchových receptorů: aktivační a inhibiční. Mezi aktivační receptory, zodpovědné za cytotoxickou aktivitu NK-buněk, patří NKp30, NKp44, NKp46, NKG2D, 2B4, NKp80 a DNAM-1. Hlavní kontrolu nad aktivací NK-buněk mají jejich inhibiční receptory (hlavně KIR;

killer inhibitory receptors) specifické pro molekuly MHC I. třídy. Některé nádory a/nebo buňky infikované virem výrazně snižují expresi molekul MHC I. třídy na svém povrchu. Na jedné straně takto uniknou CTL, ale stávají se terčem pro NK-buňky. Normální, organizmu vlastní buňky jsou tolerovány NK-buňkami díky vysoké expresi molekul MHC I. třídy na svém povrchu (28).

Jedním z problémů protinádorové imunity jsou vyčerpané T-lymfocyty, které vznikají při chronickém vystavování TA. Stávají se součástí TIL. Vyčerpané CTL je možné obnovit blokadou inhibičních receptorů, kterými jsou PD-1, CTLA-4, LAG-3 apod. (350,352).

### **3.2.2 Způsoby úniku nádoru před imunitní odpovědí**

Nádorové buňky používají různé způsoby zneviditelnění před složkami IS. U mnohých typů primárních i metastazujících tumorů dochází k výraznému snížení nebo ztrátě exprese MHC molekul I. třídy a tím jejich úniku před CTL odpovědí (281). K tomuto jevu dochází různými mechanismy. Mohou být ireverzibilní, tedy na úrovni genu, např. mutace v genech kódujících těžký řetězec MHC molekul,  $\beta$ 2-mikroglobulin nebo proteiny zapojené do mechanismů prezentace antigenů. Další možností výše popsaného úniku buněk nádoru před IS jsou reverzibilní nebo epigenetické mechanismy převážně na úrovni regulace transkripce jednotlivých genů. Příkladem je hypermetylace výše popsaných genů nebo acetylace regulátorů histonů TAP-1 (8,281). Z analýzy TIL se zjistilo, že ztráta exprese MHC I. třídy není asociována s infiltrací NK-buněk, ale s akumulací CTL do tumoru (281,297).

Jiným způsobem maskování nádorových buněk před protinádorovým dozorem je snížení exprese ligandů jako ULBP2, MICA a MICB, které jsou rozpoznávány NKG2D aktivačním receptorem NK-buněk (43). Naproti tomu mohou vykazovat zvýšenou koncentraci molekul FasL na svém povrchu nebo jako součást exozómu, který obsahuje také molekulu TRAIL. Díky tomu jsou nádorové buňky chráněny před apoptózou. Zároveň indukují apoptózu CTL specifických pro TA (352). Nádorové buňky jsou též schopny uniknout protinádorové odpovědi přesměrováním vývoje monocytů na MDSC pomocí uvolňovaných nádorových exozómů, které obsahují imunosupresivní molekuly jako TGF $\beta$  (335).

Důležitou roli při úniku nádoru před protinádorovou imunitní odpovědí sehrává nádorové mikroprostředí (kapitola 3.3.1).

### 3.3 Nádorové antigeny

Nádorové buňky exprimují TA, které je možné rozdělit na antigeny specifické pro nádor (TSA; tumor specific antigen) a antigeny asociované s nádory (TAA; tumor-associated antigen). Název TSA je odvozen od toho, že se vyskytují výlučně na nádorových buňkách. Naneštěstí jsou většinou málo imunogenní. Naproti tomu TAA jsou vylučovány i normálními buňkami, jenže v nádorových buňkách dochází ke změně síly nebo časového období jejich exprese. Mezi TAA patří proteiny, které jsou za normálních okolností exprimovány jenom během embryonálního vývoje, např. protein WT1 kódovaný genem Wilmsova tumoru (kapitola 3.3.1). Příkladem TSA je fúzní protein BCR-ABL vznikající při CML (kapitola 3.3.2) nebo virové onkoproteiny jako proteiny E6 (HPV16-E6) a E7 (HPV16-E7) kódované lidským papilomavirem HPV 16 (kapitola 3.3.3). Jelikož jedním z cílů této práce bylo stanovení účinnosti vakcín namířených proti těmto TA, následující podkapitoly věnují základním informacím o nich.

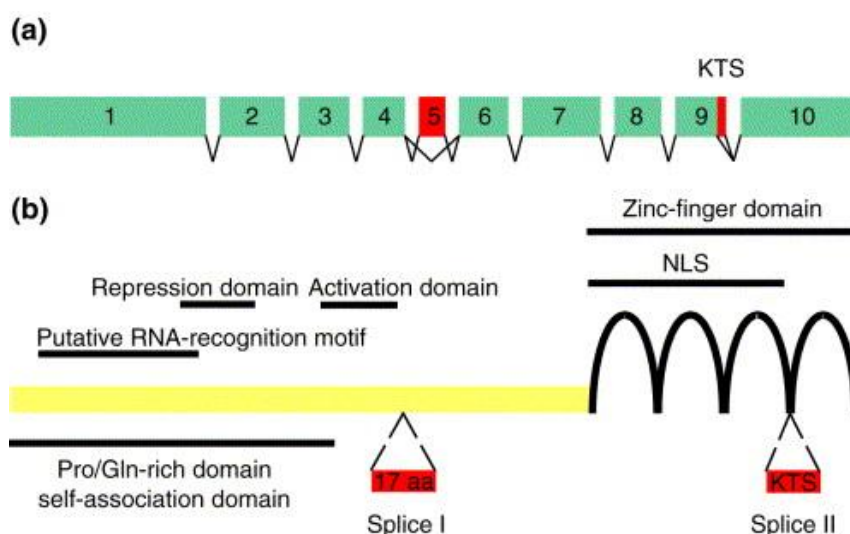
#### 3.3.1 WT1, antigen asociovaný s nádorem

Gen WT1, kódující tumor-supresorový protein, byl prvně identifikován v souvislosti s Wilmsovým tumorem ledvin u dětí (363). Zvýšená exprese jeho genu je charakteristická pro mnohé hematologické malignity (akutní myeloidní leukémie (AML), pokročilá fáze chronické myeloidní leukémie (CML), myeloidní dysplastický syndrom (MDS)) i solidní nádory (karcinom prsu, plic, štítné žlázy, střeva). V současnosti se detekce jeho mRNA využívá jako diagnostický marker při AML a CML, při sledování minimální reziduální nemoci (MRD; Minimal Residual Disease)(kapitola 3.4) a kvantifikaci myeloidní leukemie a MDS (74).

##### 3.3.1.1 WT1 v normálních tkáních

Protein WT1 je kódován genem o 10 exonech, který je lokalizován na chromosomu 11p13 (39). Struktura proteinu WT1 je ukázána na [Obrázku 3.3.1](#). N-koncová oblast mu umožňuje plnit funkci regulátoru transkripce různých genů. Napomáhá interakci s RNA a proteiny a je bohatá na prolin a glutamin. Obsahuje aktivační a represivní domény. C-koncovou oblast tvoří 4 zinkové prsty typu Cystein2-Histidin2. Tato část umožňuje vazbu na DNA a je též zahrnuta do interakcí s RNA a proteiny (228,363).



Obrázek 3.3.1 **Struktura mRNA WT1 (a) a proteinu WT1 (b)** (84)

WT1 je transkripční faktor, který hraje důležitou roli v průběhu nefrogenese při vývoji a maturaci podocytů. Za normálních fyziologických podmínek se gen exprimuje specificky v tkáních mezodermálního původu. V embryonálním stádiu se objevuje v buňkách, které procházejí epiteliálně-mezenchymálním přechodem anebo naopak (236). Má nepostradatelný úkol při regulaci diferenciaci různých orgánů. Přítomnost proteinu WT1 je esenciální pro vývoji urogenitálního traktu a epikardu. U dospělých byla jeho exprese prokázána v buňkách, které produkují epiteliální i mezenchymální markery, jako jsou podocyty (231). V nízkých koncentracích se exprimuje v urogenitálním a centrálním nervovém systému, a také v lymfatických uzlinách a slezině (228). Velmi malé množství tohoto proteinu bylo zjištěno také v CD34+ populaci kmenových buněk kostní dřeně (134).

WT1 ovlivňuje transkripci různých genů, jejichž produkty jsou zapojeny do proliferace a metabolismu buněk. Uplatňuje se také při regulaci syntézy různých transkripčních a růstových faktorů a komponent extracelulární matrix (363) (138). Zdá se, že protein WT1 zasahuje i do regulace apoptózy. Na jedné straně stimuluje transkripci pro-apoptického genu BAK (238), na straně druhé snižuje množství receptorů různých růstových faktorů (např. EGFR), čímž napomáhá nasměrování k buněčné smrti (227,363). Výběr nejznámějších, účinkem WT1 regulovaných proteinů je uveden v Tabulce 3.3.1.

Tabulka 3.3.1 **Výběr proteinů, jejichž transkripce je regulována proteinem WT1**  
(převzato a upraveno z (363))

<i>Cílové proteiny</i>		<i>Vliv WT1</i>	<i>Reference</i>
Růstové faktory	Amfiregulin	aktivace	(187)
	CSF1	represe	(124)
	IGF II	aktivace/ represe	(78,252,345)
	PDGF	represe/ aktivace	(102,343,344)
	TGFbeta	represe	(72)
Receptory	Androgenní receptor	represe	(370)
	EPGF-R	represe	(85,227)
	IR	represe	(11,227)
	IGF1-R	represe	(348,349)
Transkripční faktory	c-Myb	represe	(222)
	c-Myc	aktivace/ represe	(117,129,333)
	Cyklin E	represe	(196)
	Cyklin G1, IGFBP-4	aktivace	(340)
	Pax-2	represe	(292)
Enzymy	Lidská telomeráza	represe	(255)
	Dekarboxyláza ornitinu	represe	(189,240)
Extracelulární matrix	Kadherin E	nárůst	(135)
	Trombospondin-1	represe	(71)
Další	Wnt-4	aktivace	(307)
	Bcl-2	aktivace/ represe	(127,129,221)
	Erythropoetin	aktivace	(67)

CSF - colonie stimulující faktor; IGF - inzulinový růstový faktor; PDGF - růstový faktor z destiček; TGF - transformující růstový faktor; EGF-R - receptor pro epidermální růstový faktor; IR - inzulinový receptor; IGF-R - receptor pro IGF; Wnt-4 - protein nezbytný v embryogenezi pro vývoj urogenitálního traktu u žen; Bcl-2 - anti-apoptická signální molekula

Uvedené funkce proteinu WT1 jsou ovlivňovány odlišnými faktory. Patří mezi ně rozmanité alternativní sestřihy jeho mRNA. Kombinací alternativních exonů (např. exon 5 a alternativní exon 1a s jeho vlastním promotorem), alternativních START kodonů, alternativních sestřihových míst a RNA editingu může teoreticky vzniknout kolem 36 různých proteinů (133). U obratlovců je evolučně konzervován alternativní sestřih probíhající na 9. exonu. Vede k vyštěpení 9 nukleotidů, kódujících aminokyseliny lysin, treonin a serin (KTS) (231). Za normálních podmínek je poměr exprese KTS+/KTS- 2:1 (116). Izoformy proteinu WT1 bez KTS inzertu se mohou vázat na DNA v místech bohatých na GC nebo TCC a působit jako aktivátory nebo represory transkripce (186). Naopak, pokud nedojde k vyštěpení této oblasti, poruší se požadovaný rozestup mezi 3. a 4. zinkovým prstem a schopnost vazby proteinu WT1 na DNA se snižuje (278). Zjistilo se, že protein WT1 je navázán na cytoskelet buňky přes interakci s  $\beta$ -aktinem, což umožňuje oběma izoformám (KTS+ a KTS-) přecházet z jádra do cytoplazmy a zde se vázat na polyzomy (231).

Další, hojně se vyskytující alternativní sestřih pre-mRNA WT1 se soustřeďuje do 5. exonu, kde se může vyštěpit fragment o velikosti 17 aminokyselin. Dle přítomnosti, resp. nepřítomnosti obou uvedených vyštěpených míst nejčastěji vznikají 4 izoformy WT1 označené A, B, C, D nebo (-,-); (+,-); (-,+); (+,+) (138,363).

Protein WT1 podléhá posttranslačním modifikacím jako fosforylace, ubikvitinace a sumoylace (138). Jejich působení na odlišné funkce tohoto proteinu nejsou úplně známé. Ví se, že pokud dojde k fosforylaci (proteinkinázou A nebo C) serinu na druhém (365. aminokyselina) a třetím (393. aminokyselina) zinkovém prstu proteinu WT1 (Obrázek 3.3.1), tento se nemůže vázat na DNA. Jelikož se tímto snižuje translokace proteinu do jádra, zůstává zadržován v cytoplazmě buněk (295).

### 3.3.1.2 WT1 a karcinogeneze

Ve většině solidních nádorů byla detekována výrazná exprese proteinu WT1, i když v původních normálních buňkách není tento protein vůbec přítomen. Jedná se například o nádor plic, prsu, hlavy a krku, dále kolorektální adenokarcinom, nádor pankreatu, apod. (256).

WT1 je ambivalentní protein. V závislosti na kontextu nádorových buněk jednou vystupuje jako onkoprotein, jindy jako tumor-supresorový protein (138).

Jelikož se výrazně zvýší jeho exprese uvnitř leukemických buněk v porovnání s normálními buňkami kostní dřeně, hraje zde roli onkoproteinu. Množství proteinu WT1 je odlišné v různých typech leukemií. Pro CML v chronické fázi je charakteristická nízká koncentrace tohoto proteinu. Přechodem do fáze akcelerace a v blastické krizi nemoci se hladina proteinu zvyšuje (229,232). Výrazná exprese proteinu WT1 se zjistila také při akutních lymfoblastických i myeloblastických leukemiích a u některých forem MDS (325). Nadměrné množství onkoproteinu WT1 při výše uvedených nemocech znamená špatnou prognózu a je spojeno s nízkou odpovědí na standardní chemoterapii i imunoterapii (15,50,363).

V jiných typech karcinomů se objevují nefunkční nebo funkčně modifikované formy proteinu WT1, které vznikají v důsledku různých genetických mutací. V těchto případech se WT1 chová jako nádorem pozměněný tumor-supresorový protein (138). Mutované formy tohoto proteinu byly nalezeny v leukemických buňkách přibližně 10-15% pacientů s AML. Nejčastěji se jednalo o bodové mutace, a to inserce nukleotidů do exonu 1 a 7 a nonsense mutace v exonu 9 (159). Jiným příkladem je Wilmsův tumor ledvin, ve kterém byl protein WT1 objeven a pojmenován. Delece a intragenové mutace WT1 genu byly objeveny u cca 15% nemocných. Nicméně většina pacientů s Wilmsovým tumorem exprimuje divoký typ tohoto proteinu, někdy ve zvýšené míře (363).

### 3.3.1.3 WT1 jako imunogen

I když je WT1 autologní protein, jedná se o výborný imunogen. Ukázalo se, že transfekce WT1 antisense oligonukleotidy způsobí inhibici růstu leukemických buněk i buněk solidních nádorů. Ztráta exprese tohoto proteinu vede k přerušení proliferace nebo k smrti nádorových buněk. Naopak vysoká hladina proteinu WT1 v kmenových buňkách kostní dřeně má silnou afinitu k vývoji leukemií (338). V důsledku důležitosti pro udržení transformovaného fenotypu a stability exprese v různých nádorových buňkách je tento autologní protein považován za slibný terčový antigen pro imunoterapii nádorů (74,363). U některých zdravých osob spontánně vzniká protilátková i buněčná imunita, která je signifikantně zvýšená u pacientů s WT1+ nádory. Byla prokázána indukce anti-WT1 protilátek typu IgG i IgM a především navození WT1-specifické T-buněčné imunitní odpovědi u onkologických pacientů (256,338). Zjistilo se, že WT1-specifické CTL mohou likvidovat nádorové buňky, přičemž tolerují normální WT1+ buňky (76,99).

Existuje několik teorií, proč je tomu tak. Dle první hypotézy je množství proteinu WT1 ve zdravých buňkách příliš nízké na rozpoznání těmito imunitními buňkami. Tedy jen buňky s nadměrnou expresí proteinu WT1 se mohou stát cílem slabě afinních WT1-specifických CTL. Druhé vysvětlení souvisí s prezentací a zpracováním TA. V porovnání s nádorovými buňkami mají normální WT1+ buňky minimální, téměř žádné zpracování proteinu WT1, což má za následek omezenou prezentaci epitopů WT1 proteinu přes MHC molekuly I. třídy (338).

V proteinu WT1 byly detekovány CTL epitopy prezentované MHC molekulami I. třídy i epitopy specifické pro MHC molekuly II. třídy, které stimulují neméně podstatné CD4+ Th-lymfocyty. Objevené epitopy (Tabulka 3.5.4) se začaly hojně využívat k terapii WT1+ nádorů, převážně ve formě peptidových vakcín (kapitola 3.5.1.3).

### **3.2.2 BCR-ABL, fúzní onkoprotein chronické myeloidní leukémie (CML)**

CML je zhoubné onemocnění hematopoetického systému. Pro většinu nemocných je charakteristická přítomnost tzv. Filadelfského chromozomu. Vzniká reciproční translokací mezi dvěma chromozomy. Z 9. chromozomu je přenesen gen Abl (Abelson murine leukemia viral oncogene homolog), který se spojí s genem Bcr (Breakpoint cluster region) lokalizovaným na 22. chromozomu (290). Výsledkem je fúzní gen bcr-abl a jeho produkt, protein BCR-ABL, který hraje klíčovou roli v patogenezi nemoci (253).

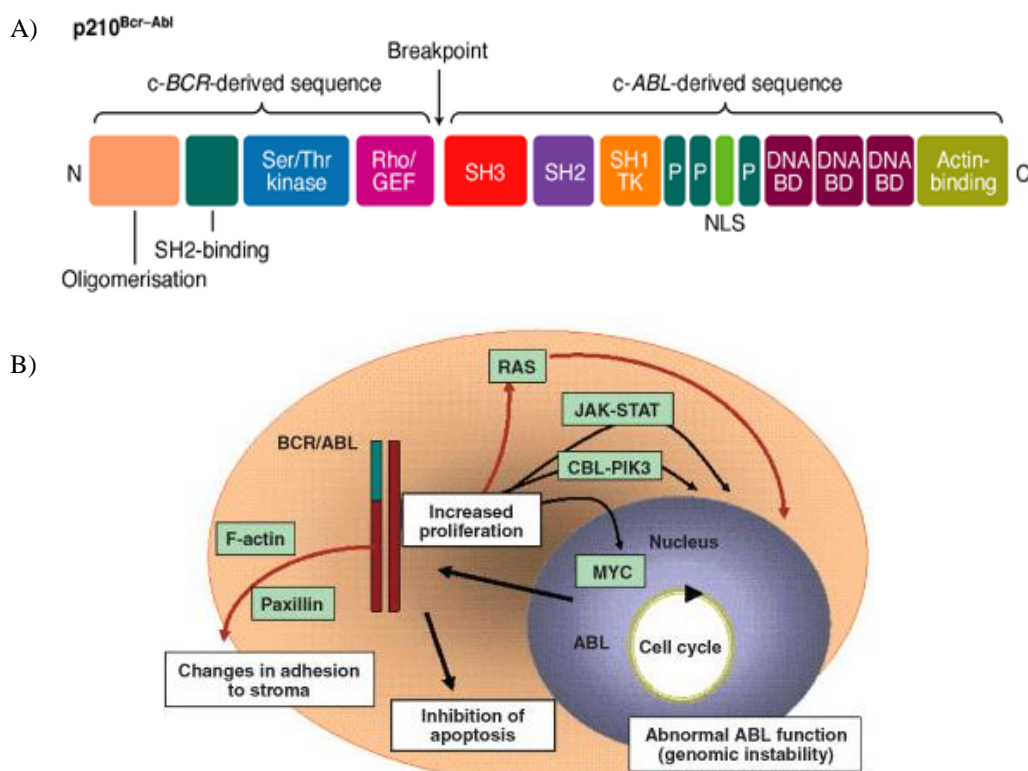
Jelikož je translokace t(9;22)(q34;q11) reciproční, na 9. chromozomu se vytvoří gen pro fúzní protein ABL-BCR. Jeho úloha v rozvoji CML není známa. Není exprimován u 1/3 pacientů. Zdá se, že nemá podstatný význam v progresi tohoto onemocnění (226).

Podle místa zlomu v genu pro Bcr se generuje fúzní protein BCR-ABL o různé molekulové hmotnosti: 190, 210 a 230 kDa. Nejčastějšími formami tohoto genu jsou b3a2 (e14a2) a b2a2 (a13a2). Vedou k tvorbě fúzního proteinu BCR-ABL o hmotnosti 210 kDa (p210<sup>BCR-ABL</sup>), se kterým jsme pracovali i my.

Fúzní protein BCR-ABL sestává z několika domén (Obrázek 3.3.2.A). Oligomerizační doména na N-konci BCR částí fúzního proteinu BCR-ABL umožňuje tvorbu homotetramerů, a tím aktivaci SH1 domény (301). Za ní je důležitá oblast vážící SH2 doménu adaptorového proteinu Grb-2, který aktivuje signální dráhu RAS (284,301). Pro jeho funkci je zásadní tyrozin na pozici 177. Pokud BCR-ABL chybí tato oblast,

dochází k výraznému zmírnění projevů nádorového onemocnění u myši (64). Posledním úsekem BCR části fúzního proteinu je doména, která je podobná GEF (Guanine nucleotide exchange factor) doméně onkoproteinů Dbl. Prostřednictvím interakce s proteiny Rho se pravděpodobně podílí na přestavbě cytoskeletu (54). Ve fúzním proteinu pak následuje SH3 doména. Z různých studií se ukázalo, že se jedná o negativní regulátor kinázové aktivity SH1 domény (284,339). Další je SH2 doména, potřebná při navození nezávislosti na růstových faktorech (301). V rámci BCR-ABL interaguje s SH2 vazebnou doménou na N-konci BCR (216). Po těchto dvou doménách následuje nejdůležitější část, zodpovědná za onkogenní potenciál tohoto proteinu. Jedná se o SH1 doménu s funkcí tyrozinové kinázy. Oproti normální ABL je její aktivita abnormálně vysoká (170,284). Pak je na fúzním proteinu vazebné místo pro adaptorové proteiny Crk a Crk-like, které jsou součástí různých signálních drah. Jedná se o oblast důležitou pro nádorovou transformaci (305). C-konec BCR-ABL sestává ze 3 jaderných lokalizačních signálů (NLS; nuclear localization signal), exportního signálu z jádra, DNA vazebné domény a aktin vazebné domény (276). Poslední jmenovaná umožňuje interakci fúzního proteinu s cytoskeletem přes F-aktinová vlákna. Delece tohoto místa snižuje onkogenní potenciál BCR-ABL (216).

Obrázek 3.3.2 **Struktura BCR-ABL (A) (313) a dopad vlivu BCR-ABL na signální dráhy (B) (146)**



Aktivita fúzního proteinu BCR-ABL zasahuje do různých signálních drah a způsobuje jejich deregulaci (Obrázek 3.3.2.B). Jde o dráhy ovlivňující adhezi a proliferaci buněk, jejich závislost na růstových faktorech nebo přežívání a buněčný cyklus (73,230). Působení tohoto proteinu je tedy nezbytné pro navození a udržení transformovaného fenotypu nádorové buňky.

V místě spoje fuzního proteinu BCR-ABL b3a2 se objevuje nová aminokyselina lyzin, čímž vzniká unikátní sekvence, která se nevyskytuje v žádném jiném proteinu. Zjistilo se, že degradace BCR-ABL probíhá v proteazomech, což umožní prezentaci jejích epitopů v komplexu s MHC molekulami I. a II. třídy na povrchu nádorových buněk (25,48,372). Ze studií na myších se ukázalo, že imunizace pomocí peptidů odvozených ze spojové oblasti BCR-ABL nebo DC stimulovaných těmito peptidy může navodit protekci a následně zabránit růstu BCR-ABL+ nádorových buněk *in vitro* (70,126,163). Specifická imunitní odpověď proti BCR-ABL byla detekována u pacientů s CML po imunizaci obdobnými vakcínami (98,112,368). To vedlo k předpokladu, že imunizace s vakcínami exprimujícími různé peptidy ze spojové oblasti BCR-ABL nebo těmito peptidy samotnými může vyvolat silnou odpověď CTL. Analýza však ukázala, že protein BCR-ABL je nedostatečně imunogenní, neboť jím vyvolaná imunitní odpověď nestačí k potlačení projevu nemoci (111).

Nejúčinnějšími terapeutiky pro CML jsou inhibitory tyrozin-kinázové aktivity proteinu BCR-ABL (imatinib, nilotinib, dasatinib). Zamezují správné konformaci enzymu tím, že blokují vazebné místo pro ATP. Nevedou k vyléčení, ale zabraňují manifestaci onemocnění. Pacienti musí tento lék brát pravidelně a bez přestávky, proto se hledají další možnosti v imunoterapii CML. Pozornost se upíná hlavně na antigeny asociované s leukémií (LAA; leukemia associated antigens) jako WT1, PRAME, proteináza 3 (PR3), survivin a další. U pacientů byly identifikovány aktivované LAA-specifické T-lymfocyty. Tato imunoterapie by měla být doplňkem klasické, výše popsané léčby.

### **3.2.3 Virové onkoproteiny E6 a E7 lidského papilomaviru HPV 16**

Cervikální karcinom je onemocnění spojené hlavně s infekcí lidským papilomavirem typu HPV16 a HPV18. V současnosti existují dvě profylaktické vakcíny na bázi VLP vhodné jako prevence (kapitola 3.5.1.4). Zájem je proto soustředěn na léčbu již infikovaných osob především pomocí různých terapeutických vakcín. Zaměřují se na

vyvolání TA-specifických CTL (55). Za vznik transformovaného fenotypu buněk infikovaných HPV16 jsou zodpovědné virové onkoproteiny HPV16-E6 a HPV16-E7, které zasahují do regulace buněčného cyklu a imunitní odpovědi proti viru.

HPV16-E6 se váže na tumor-supresorový protein p53 a způsobuje jeho proteazomální degradaci a inaktivaci (97). V zdravých buňkách je hladina p53 hodně nízká. Aktivuje se při stresových situacích buňky. V závislosti na míře poškození DNA rozhoduje mezi její opravou, zablokováním buňky v G0 fázi a apoptózou (245). V přítomnosti virového proteinu HPV16-E6 se hromaděním mediátoru poškození DNA (MDM2; mediator of DNA damage 2) zvýší koncentrace p53. V normálních buňkách zprostředkuje MDM2 proteazomální degradaci p53 (82). Pokles množství p53 prostřednictvím virového HPV16-E6 probíhá skrze trimerický komplex: HPV16-E6, protein asociovaný s E6 (E6AP) a p53. E6AP má funkci jako ubikvitin-ligáza. Označení p53 ubikvitinem znamená jeho nasměrování do proteazomu (97).

HPV16-E7 se váže na retinoblastomový protein (Rb) a moduluje transkripční faktor E2F. Za normálních podmínek je buněčný protein Rb aktivován fosforylací pomocí cyklin D1/cyklin-dependentní kinázy (CDK) 4. Tím se uvolní z komplexu s transkripčním faktorem E2F, který umožní vstup buňky z G1 do S-fáze buněčného cyklu (97,242). Vazba HPV16-E7 na hypofosforylovaný Rb zabrání jeho interakci s E2F. Tím se uvolní kontrolní bod G1/S a buňka podléhá nekontrolované proliferaci (97). Podobně jako HPV16-E6 i HPV16-E7 může vést k degradaci Rb prostřednictvím ubikvitin-proteazomového mechanismu (32). HPV16-E6 i HPV16-E7 interagují také s různými proteiny v apoptických drahách nebo regulujících transkripci různých genů. Důsledkem vlivu HPV16-E6 a HPV16-E7 dochází k poškození DNA, nestabilitě chromozomů a jiným abnormalitám, které vedou k nekontrolované proliferaci a vzniku tumoru. Mnohé studie ukázaly, že každý z těchto proteinů je sám o sobě schopný způsobit transformaci buněk *in vitro*, ale v podmínkách *in vivo* je na vznik nádoru potřebný účinek obou (97). Jelikož HPV16-E6 a HPV16-E7 jsou nezbytné pro navození i udržení transformovaného fenotypu, jsou považovány za TA, které mohou být využity v terapii cervikálního karcinomu. Byly uskutečněny studie s DNA, buněčnými (DC), peptidovými/proteinovými i virovými vakcínami, které vedly ke slibným výsledkům (156,166,190,239,298,347).

HPV16-E7 je příkladem TA, který je sám o sobě slabě imunogenní. V této práci byl použit rekombinantní protein SigE7LAMP. Sestává ze sekvence proteinu HPV16-E7 a z membránového proteinu typu 1 asociovaného s lysozomy (LAMP-1; lysosomal-associated membrane protein). Součástí fúzního genu jsou signální sekvence (Sig) a



cytoplazmatická C-koncová doména LAMP-1, která je zodpovědná za nasměrování do lysozomů (45,355). V lysozomech a endozomech APC jsou zpracovávány různé antigeny na peptidy, které vytvoří komplex s MHC molekulami I. anebo II. třídy a mohou být prezentovány na povrchu APC. Tento proces umožní stimulaci HPV16-E7-specifických CTL i pomocných CD4<sup>+</sup> Th-lymfocytů (131). Z různých studií se ukázalo, že fúze TA HPV16-E7 s transmembránovou/cytoplazmatickou částí LAMP-1 opravdu vedla k intenzivnější prezentaci daného peptidu přes MHC molekuly obou tříd na povrchu APC, a tím k zlepšení imunogenního potenciálu daného TA (150,361).

### 3.4 Terapie nádorů

V onkologii se při léčbě nádorů používá především kombinace 3 hlavních přístupů: chemoterapie, radioterapie a chirurgie. Chemoterapie a radioterapie představují léčbu cytotoxickou. Dochází k redukci velikosti nádoru, kdy nádorové buňky jsou likvidovány v důsledku apoptózy.

Některá chemoterapeutika (antracyklin, oxaliplatin) navozují tzv. imunogenní apoptózu nádorových buněk (ICD; immunogenic cell death). ICD se od klasické, neimunogenní apoptózy odlišuje 3 základními mechanismy: (a) prezentací kalretikulinu (CRT; calreticulin) a jiných proteinů endoplazmatického retikula (ER) na povrchu nádorové buňky; (b) sekrecí ATP; (c) uvolňováním nehistonového chromatinového proteinu HMGB1 (high-mobility group box 1) (177). CRT, HGMB1 a ATP interagují s receptory CD91, TLR4 a P2RX7 (ionotropic purinergic receptors), které jsou exprimovány DC. Díky tomu jsou zbytky nádorových buněk po apoptóze pohlceny DC, ve kterých dochází k procesování a prezentaci TA a k produkci IL-1 $\beta$ . Produkce IL-1 $\beta$  DC vede k stimulaci protinádorových CTL produkujících IFN $\gamma$  (104).

Radioterapie částečně zvyšuje citlivost nádorových buněk k CTL. Zjistilo se, že ozáření v závislosti na velikosti dávky indukuje zvýšení exprese MHC molekul I. třídy v nádorových buněčných liniích melanomu (283).

U značného procenta pacientů vedou klasické přístupy k úplnému vyléčení. Jsou však doprovázeny celou řadou problémů, jako nízká účinnost při léčbě nádoru v pokročilém stádiu. Častou komplikací klasické terapie bývá výskyt rezistentních nádorových buněk, které mnohou později vyvolat nové „nastartování“ tumorogeneze (minimální reziduální

nemoc neboli MRD; minimal residual disease). V posledních dvou dekádách neustále přibývají poznatky z oblasti molekulárních a buněčných mechanismů imunitní odpovědi. Otevřely dveře k doplnění klasických přístupů o inovativní a velice slibný typ protinádorové léčby tzv. imunoterapii (28,225).

### 3.4.1 Imunoterapie nádorů

Imunoterapie využívá imunitní procesy k cílenému zaměření léčiva do místa nádoru a tím částečně zmírňuje nežádoucí vedlejší účinky na zdravé tkáně, které bývají častým doprovodným jevem klasické protinádorové terapie. Zdá se být velkou nadějí i pro pacienty s MRD.

Podle mechanismu účinku se rozlišují dva typy imunoterapie na pasivní a aktivní. Pasivní imunoterapie se zaměřuje na posílení imunitního systému pacienta. V klinické praxi se používají zejména monoklonální protilátky (mAb; monoclonal antibody). Přípravují se *ex vivo*. Jiným příkladem je adoptivní imunoterapie používaná při léčbě melanomu (139). Z pacienta jsou izolovány lymfocyty, následně stimulovány imunogenem (především TA) *in vitro* a pak podány zpět pacientovi (69).

Cílem aktivní imunoterapie je buď povzbuzení celkové protinádorové imunity, která je u onkologických pacientů suprimována (nespecifická imunoterapie) nebo stimulace složek imunitního systému pacienta specificky proti TA (specifická imunoterapie).

Nespecifická imunoterapie je založená na podávání extraktů, resp. částí patogenních mikroorganismů nebo různých rekombinantních cytokinů. Už v roce 1891 chirurg William Coley úspěšně léčil sarkomy pacientů intratumorálním podáním extraktu z inaktivovaných bakterií *Streptococcus pyogenes* a *Serratia marcescens* (19,60,225). O mnoho později se ukázaly jako vhodné pro léčbu nádoru i extrakty z jiných bakterií, především *Mycobacterium bovis*, *Listeria monocytogenes* a *Corynebacterium parvum* (19,28,225). Používají se také různé produkty bakterií, např. rekombinantně upravený adenylátcyklázový toxin, resp. toxoid (rCyaA), produkovaný bakterií *Bordetella pertusis*, který byl úspěšně použit i v naší laboratoři (207).

Z klinických studií z posledních let se ukazuje jako nejúčinnější pro terapii nádorů kombinace imunoterapie s klasickými přístupy. Pro posílení buněčných mechanismů imunity se v klinické praxi v posledních letech prosazují rekombinantní cytokiny

v kombinaci s chemoterapií nebo radioterapií. Vedou k nespecifické aktivaci celé řady efektorových buněk. Při terapii adenokarcinomu ledvin a u maligních melanomů našel uplatnění IL-2 (83), při léčbě hematologických malignit nebo solidních nádorů (např. nádorů prostaty) zase GM-CSF (5,100,261). Jelikož je při vysokých dávkách cytokinů jejich protinádorový účinek provázen závažnými nežádoucími účinky (symptomy nachlazení, celková vyčerpanost, horečky apod.), pacient musí být pod stálou kontrolou (web 1).

Při specifické imunoterapii se využívají různé typy protinádorových vakcín (kapitola 3.5). Často jsou kombinovány s tzv. adjuvants, tj. s jinými substancemi nebo buňkami, které nespecificky stimulují IS.

V současnosti se jako adjuvants osvědčilo používání agonistů TLR. Tyto látky indukují maturaci nezralých DC na zralé a stimulují je pro expresi kostimulačních molekul, jako CD40, CD80 a CD86, nezbytných pro aktivaci protinádorových CTL. Další výhodou je jejich schopnost navodit sekreci cytokinů IL-12, IFN $\alpha$  a IFN $\gamma$ , napomáhajících při diferenciaci na CTL nebo CD4+ pomocné T-lymfocyty (144,367).

Nejnámější TLR, užívané jako adjuvants, jsou oligodeoxynukleotidy obsahující jeden nebo více nemetylovaných CpG dinukleotidů (CpG ODN; CpG oligodeoxynucleotides), které byly v nemalé míře využity i pro tuto práci. Jejich adjuvantní aktivita je založená na jejich schopnosti přímo aktivovat lidské B-lymfocyty a plasmacytoidní DC pomocí TLR9 (21). CpG ODN nepřímo podporují maturaci a proliferaci NK-buněk, T-lymfocytů a monocytů/makrofágů. Usnadňují také indukci paměťové imunity (26). Z experimentálních a klinických studií vyplynulo, že užívání CpG ODN jako adjuvants zvyšuje účinnost vakcín namířených proti infekčním onemocněním nebo nádorům. I když byla jejich bezpečnost v prvním typu vakcín jednoznačně prokázána, v případě vakcín v protinádorové terapii je potřeba ještě dalších testů (26).

### **3.5 Protinádorové vakcíny**

Protinádorové vakcíny můžeme rozdělit na dva základní typy, profylaktické a terapeutické. Cílem profylaktických vakcín, nazývaných také preventivní, je indukce paměťových T-buněk, které zabezpečí dlouhodobou protekci jedince při opakovaném střetu s patogenem. V současnosti se úspěšně používají na prevenci karcinomů vyvolaných

známými typy etiologických agens. Jedná se o dvě vakcíny. První je namířená na indukci protektivní imunity proti různým typům HPV, který je příčinou cervikálních, análních a jiných nádorů. Druhá navozuje imunitu proti viru hepatitidy B (HBV). Ten může vést k chronické infekci a vyústit v hepatocelulární karcinom. Obě vakcíny jsou zkonstruovány jako VLP vakcíny (kapitola 3.5.1.4).

Značně problematický vývoj terapeutických vakcín se zaměřuje na léčbu již existujícího nádorového onemocnění. Jsou založené na prezentaci odlišných molekul na povrchu nádorové buňky v porovnání s normální buňkou. Naráží na dvě základní potíže – nízká imunogennost TA plynoucí z autologního původu nádorové buňky a funkci mechanismů úniku nádoru před imunitním dozorem. Hlavním úkolem terapeutických vakcín je zabezpečení aktivace a dlouhodobého trvání nejvýznamnější složky protinádorové imunity, CTL, jejichž účinkem dochází k redukci masы nádorových buněk (367).

### **3.5.1 Typy protinádorových vakcín**

V experimentální a klinické imunoterapii nádorů se v současnosti používají různé typy vakcín, jejichž přehled je uveden v Tabulce 3.5.1. Jsou založeny na použití vektorů (Tabulka 3.5.2), které zabezpečí transfer požadovaného genu do cílových buněk organismu (29,113). Při výběru vhodného vektoru je nutné vzít v úvahu několik důležitých parametrů. V první řadě stabilitu vektoru, co nejjednodušší a nejlevnější manipulace s vektorem, jeho imunogennost, bezpečnost a způsob uskladnění, vliv aplikace, schopnost replikace pouze v cílových buňkách a jejich dostupnost. V praxi je třeba si vybrat vektor nejvhodnější pro daný typ imunizace (29).

V následujících podkapitolách literárního přehledu jsem se zaměřila na popis virových vakcín na bázi viru vakcinie (VACV vakcíny), DNA vakcín, peptidových vakcín a vakcín na bázi partikulí podobných myšímu polyomaviru (MPyV-VLP), jejichž účinnost jsem v této práci studovala.

Tabulka 3.5.1 Typy protinádorových terapeutických vakcín (17,36,141,268,358,362,366)

Typ vakcíny	Podskupiny	Základní charakteristika	Výhody	Nevýhody	Způsob aplikace
<b>Peptidové vakcíny</b>	-	→ peptidy odvozené z TAA nebo TSA nesoucí epitopy pro CTL	→ jednodušší příprava → bezpečnost, stabilita → efektivní indukce T-buněčné imunitní odpovědi	→ omezený okruh pacientů dle subtypu HLA molekuly prezentující daný epitop → možnost navození tolerance prezentací přes MHC na jiných buňkách než APC → rychlá degradace peptidázami v tkáních a sérech → nutnost aplikace společně s adjuvants (TLR, KLH, IFA)	→ i.p., i.d. tetováním
<b>Proteinové vakcíny</b>	-	→ proteiny tvořící TAA nebo TSA → soubor vícero epitopů rozpoznávaných CD4+ a/nebo CD8+ T-lymfocyty	→ pro neomezený okruh pacientů (bez limitace HLA subtypů) → aktivaci buněčné a/nebo humorální imunitní odpovědi	→ rychlá degradace proteázami v tkáních a sérech	→ i.p., i.d
	<b>VLP</b>	→ antigenní proteinové struktury, které napodobňují strukturu virové partikuly → zachovávají téměř nativní konformační epitopy	→ zacílené přímo do APC → vysoká imunogennost při nízkých dávkách → relativně levné	→ omezená velikost vložených peptidů, resp. epitopů	→ i.m.
<b>Buněčné vakcíny</b>	<b>Nádorové buňky</b>	→ příprava <i>ex vivo</i> z autologních (z vlastních nádorových buněk pacienta) nebo alogenních (z nádorových buněk z jiného pacienta se stejným typem nádoru) linií nádorových buněk → aplikace inaktivovaných (cytostatiky, ozáření aj.) anebo lyzovaných buněk	→ komplex antigenů	→ složitost přípravy → cena	→ s.c., i.d.
	<b>APC prezentující TAA nebo TSA (hlavně DC)</b>	→ příprava → <i>in vitro</i> nebo <i>ex vivo</i> → DC aktivované lyzáty nádorových buněk nebo TAA či TSA nebo transfekované mRNA z nádorových buněk → po cytokíny ovlivněné maturaci a kultivaci APC aplikovány do pacienta	→ přímá aktivace T- i B-buněčné imunity prostřednictvím: a) TA epitopů prezentovaných molekulami MHC I. a II. třídy na povrchu těchto APC b) kostimulačních molekul CD80, CD86, CD83	→ potřeba velkého množství APC → relativně krátká životnost APC, resp. DC (24-48 hod) → relativně nízké množství APC schopné dosáhnout lymfatické uzliny pro aktivace T-buněčné imunitní odpovědi	→ s.c., i.d.
	<b>Buněčné hybridy</b>	→ vznik fúzí DC s nádorovými buňkami	→ vyšší účinnost při nižších dávkách porovnání se samotnými DC → vede k regresí tumoru	→ nedostatečné oslabení klinického projevu	→ s.c., i.d., i.p.

Typ vakcíny	Podskupiny	Základní charakteristika	Výhody	Nevýhody	Způsob aplikace
<b>DNA vakcíny</b>	-	→ vnesen gen pro celý TAA, TSA nebo jeho epitop(y) specifické pro T- a B-buňky, běžně společně s genem pro imunostimulační faktor	→ relativně jednoduchá konstrukce → relativně rychle absorbovány a procesovány APC	→ relativně vysoká cena	→ i.m., i.d. genovou pistolí nebo tetováním
<b>RNA vakcíny</b>	-	→ mRNA kódující TA připravená <i>in vitro</i> → obsahuje čepičku, na 5' konci ORF, UTR, START a STOP kodon, na 3' konci UTR a poly(A)	→ bezpečné, bez integrace do genomu hostitelské buňky → schopnost stimulace buněčné i humorální imunitní odpovědi	→ lehká degradace a těžší manipulace než s DNA	→ i.d. genovou pistolí → může se použít na stimulaci APC <i>in vitro</i>
<b>Rekombinantní vakcíny</b>	<b>Bakteriální vakcíny</b> ( <i>Sallmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Listia</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Mycobacterium</i> )	→ vznik → gen pro TAA, TSA nebo imunostimulační faktor vnesen do bakteriálního, kvasinkového nebo rostlinného genomu	→ stimulace především slizniční imunitní odpovědi → jednoduchá aplikace	→ možnost obnovení virulence → nízká stabilita rekombinantního fenotypu → nízká imunogennost v důsledku nesprávné konformace exprimovaného TA → nedostatek enzymů potřebných pro post-translační modifikace vloženého TA → imunitní faktory hostitele (HLA subtyp)	→ i.p., perorálně
	<b>Kvasinkové vakcíny, používány jako expresní systém</b> ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )		→ jednoduchá manipulace → nenáročnost na složení růstového média → možnost post-translačních úprav vyžadovaných pro mnohé lidské proteiny → efektivní indukce humorální i buněčné imunitní odpovědi (CD4+ Th-lymfocyty i CTL)	→ přítomnost aktivních proteaz, které mohou degradovat exprimovaný protein	→ s.c.
	<b>Rostlinné vakcíny</b>		→ biologická bezpečnost → jednoduchá kultivace → nízká cena produkce → relativně rychlé namnožení → jednoduchá genetická manipulace → efektivní indukce imunitní odpovědi → bezpečnější a levnější alternativa produkce Abs	→ drahá a problematická purifikace (vliv polyfenolů, alkaloidů a jiných sekundárních metabolitů) → vyšší dávka vede k imunotoleranci	→ s.c., i.d., i.m., perorálně, intranasální sprej
<b>Virové vakcíny (vektory)</b>	<b>RNA a DNA viry</b>	→ vložení cílových genů do míst neesenčních virových genů → delece genů zodpovědných za patogenitu	→ přímý transport vloženého genu do cílové buňky a jeho následná realizace	→ možnost obnovení patogenity, tj. dokončení replikačního cyklu do fáze tvorby a uvolnění infekčních virionu → tropizmus	→ i.p., i.d.

TA = nádorové antigeny; TAA = antigen asociovaný s nádorem; TSA = antigen specifický pro nádor; CTL = cytotoxické T-lymfocyty; Th = pomocné T-buňky (lymfocyty); HLA = Human Leukocyte Antigen; MHC = hlavní histokompatibilní komplex; APC = antigen prezentující buňky; DC = dendritické buňky; TLR = toll-like receptor; KLH = Keyhole limpet hemocyanin; IFA = nekompletní Freundovo adjuvans; VLP = částice (partikule) podobné virům; ORF = otevřený čtecí rámeček; UTR = netranslatovaný region; poly(A) = poly-adenylační signál; Ab = protilátka(y); i.p. = intraperitoneálně; i.d. = intradermálně; i.m. = intramuskulárně; s.c. = subkutánně

Tabulka 3.5.2 Vektory používané při genové terapii (29,161)

a) virové vektory:

podskupiny	vektor	Základní charakteristika							
		rychlost replikace	tropismus	vstup do cílové buňky	integrace do genomu cílové buňky	exprese transgenů	immuogenost	bezpečnost	účinnost
RNA viry	Retroviry	10 <sup>10</sup> (střední)	dělicí se	fúze membrán po interakci ligand-receptor	ano	dlouhodobá	nižší	střední	vysoká
	Lentiviry	10 <sup>12</sup> (vysoké)	nedělicí se, široké spektrum	fúze membrán po interakci ligand-receptor	ano	dlouhodobá	nižší	střední	lepší než ostatní retroviry
DNA viry	Adenoviry	10 <sup>12</sup> (vysoké)	nedělicí se, široké spektrum	endocytóza po interakci ligand-receptor	ne	velmi krátká	vysoká, limitace indukce neutralizačních protilátek	vysoká	vysoká
	AAV	10 <sup>12</sup> (vysoké)	nedělicí se, široké spektrum APC	endocytóza po interakci ligand-receptor	možná	střední (týdny)	nízká	vysoká	vysoká
	Herpetické viry	10 <sup>12</sup> (vysoké)	nedělicí se, široké spektrum	fúze membrán po interakci ligand-receptor	ne	přechodná	vysoká	střední	vysoká
	Poxviry (VACV)	10 <sup>10</sup> (střední)	nedělicí se, široké spektrum	fúze membrán	ne	přechodná	vysoká	střední	vysoká

AAV = adenoasociovaný virus; VACV = virus vakcinie; APC = antigen prezentující buňky

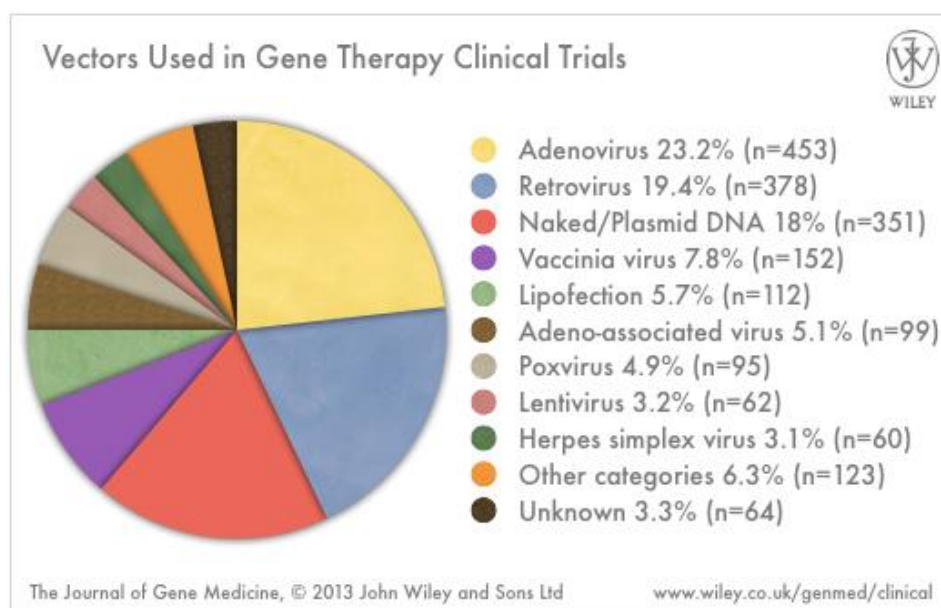
b) neviróvé vektory:

<i>Podskupiny</i>
DNA
RNA

### 3.5.1.1 Virové vakcíny na bázi viru vakcinie

V experimentálních a klinických studiích jsou v nádorové imunoterapii hojně využívány rekombinantní virové vakcíny (Obrázek 3.5.1). Jejich výhody spočívají ve schopnosti přirozeně stimulovat imunitní systém hostitele a účinně přenášet gen do cílových buněk, kde zabezpečí jeho expresi (29).

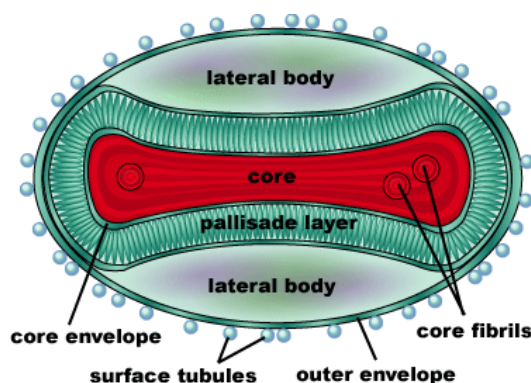
Obrázek 3.5.1 Virové vektory v současnosti používané v genové terapii v klinických studiích (web 2)



Mezi hojně užívané virové vakcíny patří VACV vakcíny. Díky poznatkům získaným při jejich rozsáhlém využití na imunizaci proti pravým neštovicím se jedná o nejlépe charakterizované virové vakcíny.

VACV se řadí do čeledě *Poxviridae*. Jedná se o poměrně velké viry (300x240x120 nm), rozeznatelné i ve světelném mikroskopu (114). Součástí virionu je komplex vnitřních struktur, který se skládá z bikonkávní dřeně („core“) a dvou laterálních tělísek obalených membránou (Obrázek 3.5.2). Dřeň chrání genom viru, tvořený lineární kovalentně uzavřenou dvouvláknovou (ds) DNA o velikosti 186 kbp. Obsahuje obrácené terminální repetice, bohaté na A/T páry a tvořící vlásenkové smyčky (123).



Obrázek 3.5.2 **Struktura virové partikule poxviru, resp. viru vakcinie** (web 3)

Existují dvě formy infekčního virionu VACV: základní, tj. intracelulární zralý virion (IMV; intracellular mature virion) a obalený virion (EEV; external enveloped virion), tj. IMV obalený membránou. Jelikož se EEV liší od IMV další membránovou vrstvou, která obsahuje několik nových virových glykoproteinů, mají odlišné mechanismy vstupu do buňky a způsob šíření uvnitř i mezi hostiteli (113). Pro každou z těchto forem virionu jsou specifické jiné neutralizační protilátky (331).

Obrovským přínosem využití VACV jako vakcíny, resp. vektoru, je relativně rychlé namnožení VACV do vysokých titrů a stabilita virových partikulí. Dají se uchovávat zamražené v tekutém nebo lyofilizovaném stavu poměrně dlouhou dobu bez ztráty infekčnosti (306). Mnohé výhody spočívají i ve výše popsané struktuře virionu a ve velikosti a uspořádání virového genomu. Podobně jako u ostatních poxvirů i u VACV jsou geny kódující esenciální proteiny lokalizovány ve vysoko konzervované centrální části genomu a geny kódující proteiny nepotřebné pro replikační cyklus viru jsou umístěny v koncových částech. Díky tomu jsou VACV geneticky stabilní (123).

Neesenciální geny a geny zodpovědné za virulenci se dají standardními molekulárními technikami vyštěpit a nahradit poměrně velkými polynukleotidovými inzerty (>25 kbp) (314). Výsledkem takové genové manipulace je méně patogenní, avšak pořád imunogenní virus schopný replikace a exprese přenášené genetické informace (123,341).

Syntéza virových mRNA probíhá v kaskádě pod kontrolou VACV specifických promotorů (241). Načasování a délku exprese transgenů je možné relativně jednoduše ovlivnit vložením tohoto genu za vhodný VACV promotor. V této práci byla exprese cílového proteinu regulována přirozeným časným H5 nebo syntetickým časně/pozdním E/L vakciniovým promotorem.

Dlouho se předpokládalo, že proteiny exprimované v pozdějších fázích replikačního cyklu VACV postrádají epitopy specifické pro CTL. Ze studií z posledních let se ukázalo, že rozsah CD8<sup>+</sup> T-buněčné imunitní odpovědi na VACV u lidí i myši není časově ani funkčně ohraničen (329).

Dalším prvkem zaručujícím bezpečnost užití VACV jako vakcín je skutečnost, že poxviry jsou jediné DNA viry, jejichž replikace neprobíhá v jádře, ale v cytoplazmě hostitelské buňky. Hrozba integrace virového genomu do genomu hostitelské buňky je tímto vyloučena (241). Všechny enzymy potřebné pro iniciaci virového replikačního cyklu (RNA polymeraza, polyA polymeraza, "capping" enzym, enzym pro metylaci apod.) jsou součástí virové partikule. Umožňují transkripci virových mRNA nezávisle na syntetickém aparátu hostitelské buňky (123).

Důležitou vlastností VACV je jejich vysoká imunogennost. Mohou aktivovat silnou imunitní odpověď, která navozuje celoživotní protektivní imunitu.

Poxviry mohou být rozeznávány jak různými TLR (převážně TLR-2 a TLR-8), tak TLR-nezávislou cestou, prostřednictvím infekce APC. Obě vedou k sekreci IFN I. typu. TLR-2 přes MyD88, TLR8 přes aktivaci transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B a infikované APC sekrecí IFN $\beta$  vedou k maturaci DC, které jsou vyžadovány pro aktivaci T-buněčné imunitní odpovědi (podrobnosti v kapitole 3.2.1) (197).

Během infekce u lidí jsou cílovými buňkami poxvirů převážně APC. VACV má nejsilnější tropizmus k monocytům (296). Cílem mohou být též B-lymfocyty a NK-buňky, ale ne T-lymfocyty (296,369). Ačkoli VACV infikují i DC, tato infekce je abortivní. Vede k inhibici maturace, fagocytózy a migrační aktivity DC (197).

VACV infekce vede k aktivaci VACV-specifických CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů i neutralizačních protilátek. Výsledný typ imunity ovlivňuje celá řada faktorů, jako varianta VACV, velikost dávky, způsob podání, imunizační schéma, apod. (331).

Poxviry se brání aktivaci imunitního systému hostitele expresí inhibitorů nebo analogů různých složek imunity. Jejich přehled je uveden v tabulce (Tabulka 3.5.3).

Limitujícím faktorem aplikace VACV u lidí jsou možné komplikace zejména u imunosuprimovaných pacientů (197). Imunizace s VACV může být prováděna závažnými vedlejšími účinky jako encefalitida, generalizované infekce, horečka, nauzea, lymfadenopatie a kožní léze (224). Z tohoto důvodu byly připraveny varianty VACV vakcín deficientních v replikačním cyklu v savčích buňkách. Mezi nejznámější z nich patří MVA (Modified Vaccinia Ankara) a NYVAC (New York Vaccinia Virus) (197).

Tabulka 3.5.3 **Geny viru vakcinie, které kódují proteiny zodpovědné za interferenci viru se složkami imunitního systému**

<i>Virový gen</i>	<i>Základní charakteristika působení</i>	<i>Reference</i>
B29R/ C23L	inhibice C-C chemokínů jejich navázáním	(4)
C3L	inaktivace komplementu navázáním některé z jeho složek	(173,174,315)
B5R		
B16R	homolog receptoru pro zánětlivý IL-1 $\beta$	(3)
B8R	homolog receptoru pro IFN $\gamma$	(265)
B19R	homolog receptoru pro IFN $\alpha/\beta$	(18)
E3L	proteiny vážící se na virovou dsRNA, čímž zabrání aktivaci enzymů inhibujících proteosyntézu a aktivujících apoptózu infikované buňky; vliv na hostitelské spektrum	(44,185)
K3L		
C7L	vliv na hostitelské spektrum; antiapoptická funkce	(254,266)
K1L	vliv na hostitelské spektrum; inhibuje aktivaci NF $\kappa$ B (antiapoptická funkce)	(266,322)
VH1	inhibuje signalizaci přes Jak-STAT dráhu, která za normálních okolností vede k expresi IFN $\gamma$	(191,247)
N1L	neurovirulenční faktor; homolog BH3 domény anti-apoptických proteinů Bcl-2 rodiny	(7,233)
A52R	homolog receptoru pro TLR/IL, tj. inhibice aktivace NF $\kappa$ B	(31)
A46R		
C12L	inhibitor serinových proteáz, tj. inhibice apoptózy přes granzym B nebo Fas ligandy CTL	(205)
B28R	analog receptoru pro TNF $\alpha$ ; tj. inhibice apoptózy	(205)
B1R	serin/treonin kináza, způsobuje hyperfosforylaci a destabilizaci proapoptického p53	(299,300)

MVA je vysoce atenuovaná varianta VACV připravená v 50. letech minulého století četnými pasážemi v kuřecích embryonálních fibroblastech (6,24). Pro tento typ VACV je charakteristická delece v genomu o velikosti cca 14kbp (6) a s tím spojená ztráta schopnosti replikace v savčích buňkách (147). Na rozdíl od jiných variant VACV, infekce lidských DC variantou MVA vede k jejich rychlé maturaci. Zdá se, že v důsledku delece části genomu ztratila varianta MVA schopnost blokovat tento proces (77,192). NYVAC je odvozen z VACV Copenhagen a vznikl delecí 18 čtecích rámců (327).

Obě varianty VACV jsou hojně využívány v experimentálních studiích jako vakcíny proti různým infekčním agens, především proti HIV (16,75,122). MVA vakcíny jsou také testovány ve studiích s imunizací proti pravým neštovicím v případném boji proti bioterorizmu (155). Slibné výsledky ukazuje uplatnění rekombinantních MVA pro terapii nádorů, např. při experimentální léčbě cervikálního karcinomu způsobeného chronickou papilomavirovou infekcí, především viry HPV16 a 18 (250).

MVA byl úspěšně použit i v naší laboratoři v protinádorové terapii *in vivo* (207,250). Součástí této doktorandské práce byla i konstrukce rekombinantních vakcín MVA, které exprimují zlomovou část leukemického proteinu BCR-ABL společně

s dalšími adjuvantními faktory (HSP 70 apod.). Jelikož se později ukázalo, že protein BCR-ABL není vhodný imunogen, byly tyto vakcíny neúčinné (nepublikovaná data).

V posledních letech narůstá počet experimentálních a klinických studií, kde se používají geneticky upravené onkolytické viry, které se replikují a lyzují přednostně nádorové buňky (81,263,334). Jedním ze slibných kandidátů pro onkolytickou terapii je právě VACV. Imunitní odpověď vrozené imunity, počátečně stimulována virem samotným nebo jím infikovanými buňkami, je namířená proti infikovaným nádorovým buňkám, což vede k destrukci nádorové tkáně (19).

### 3.5.1.2 DNA vakcíny

Už od počátku 90. let 20. století se DNA vakcíny jeví být slibným adeptem pro profylaxi nebo terapii jak proti různým patogenům, způsobujícím závažné infekční onemocnění (AIDS, tuberkulózu, malárii, chřipku), tak proti alergiím nebo nádorům (58). Mnohé experimentální studie na zvířatech i klinické studie na lidech ukázaly, že i když jsou DNA vakcíny bezpečné a dobře tolerovány, jsou u člověka jen málo imunogenní. V současnosti se proto používají jenom ve veterinární praxi proti infekčním agens.

DNA vakcíny sestávají z bakteriálního plasmidu, do něhož jsou vloženy sekvence cDNA kódujících antigen. Při protinádorové terapii se v experimentálních studiích používají plasmidy nesoucí vybrané sekvence daného antigenu s jedním nebo vícero epitopů specifických pro CD4<sup>+</sup> anebo CD8<sup>+</sup> T-lymfocyty nebo DNA vakcíny kódující celý protein. Druhý popsaný způsob má výhodu, že cDNA kóduje všechny potenciální epitopy, které stimulují CTL i humorální imunitní odpověď. Plasmid může zahrnovat i sekvenci s adjuvantním účinkem (např. CpG ODN) (316).

Plasmid též obsahuje tzv. multiple cloning site, tj. syntetickou sekvenci DNA, ve které jsou soustředěna místa rozpoznávaná větším počtem restričních endonukleáz. Přítomnost ORI (origin of replication, tj. počátek replikace) a selekční marker (nejčastěji rezistence na antibiotika) umožňuje namnožení plasmidu v bakteriích a jeho selekci (141). Součástí plasmidů je také polyadenylační sekvence (poly(A)), nezbytná pro terminaci transkripce přenášeného antigenu a export jeho mRNA z jádra do cytoplazmy (293).

Pro optimální expresi vloženého antigenu v savčích buňkách slouží silný promotor. Nejčastěji se využívá bezprostředně časný promotor MIE kódovaný lidským cytomegalovirem (CMV) (22,210) nebo chimerický SV40-CMV (354). Alternativou je

tkáňově-specifický promotor, který zabrání konstitutivní expresi vloženého antigenu v nevhodných tkáních. Jeho nechtěným doprovodným jevem bývá snížení imunogenosti zkonstruované DNA vakcíny (41). Sílu exprese vloženého antigenu je možné ovlivnit např. přítomností intronu v blízkosti promotoru (zlepší i stabilitu mRNA), vložením sekvence Kozakové před START kodon ATG (175) nebo použitím druhově-specifického kódu (zvýší i imunogenost DNA vakcíny) (93). DNA vakcína je tedy zkonstruována tak, aby byla maximálně imunogenní. Kombinuje bakteriální a eukaryotické elementy DNA vložené do plasmidu takovým způsobem, který umožňuje vysokou expresi přenášeného genu, a zároveň minimalizuje možnost integrace plasmidu do chromozomu cílových savčích buněk (141,293).

Pro imunogenost připravené DNA vakcíny je důležitý způsob její aplikace. V této práci byly myši imunizovány pomocí genové pistole zlatými partikulami obalenými v plasmidové DNA. Používá se také intramuskulární podání. Výhodou prvního způsobu je přímé doručení DNA do cytoplazmy buněk kůže, svalů nebo samotných APC, čímž se sníží i množství vyžadované DNA (293). Do místa aplikace se do poškozené tkáně infiltrují APC, jako granulocyty a následně makrofágy, DC a v pozdějších fázích také B-buňky a T-lymfocyty.

Existují dva mechanismy pohlcování a zpracování antigenu kódovaného DNA vakcínou. Prvním je přímá transfekce APC plasmidovou DNA. Druhým mechanismem je tzv. cross-priming (316). V tomto případě DNA transfekuje keratinocyty anebo myocyty, kde dochází k expresi vloženého genu. Antigeny jsou pak dostupné pro APC jako zbytky transfekovaných apoptických buněk. V APC je pak antigen procesován a prezentován dalším buňkám IS prostřednictvím MHC molekul I. a II. třídy. DNA vakcinace vede k aktivaci přirozené imunity prostřednictvím dvouvláknové struktury plasmidové DNA (aktivací různých signálních drah) a k stimulaci adaptivní buněčné a humorální složky IS (58,141,293,316).

Mezi nejběžněji používané strategie na zvýšení imunogenosti DNA vakcín patří heterologní prime/boost imunizace, která byla zkoušena i v této práci s vakcínami exprimujícími BCR-ABL (nepublikovaná data). Z různých studií se ukázalo, že vede ke zvýšení imunitní odpovědi proti různým patogenům, jako HIV nebo malárie (122,130,342). „Priming“ navozuje imunitní odpovědi pomocí antigenu exprimovaného prvním vektorem, nejčastěji DNA vakcínou. „Boost“ je zabezpečen podáním téhož antigenu exprimovaného jiným typem vektoru, např. virem (adenovirus, VACV) (161,293).

### 3.5.1.3 Peptidové vakcíny

V posledních letech se rozšířila aplikace peptidových vakcín v protinádorové imunoterapii, která má řadu výhod. Patří mezi ně poměrně jednoduchá syntéza, bezpečnost prokázaná v mnohých studiích, stabilita při uskladnění a efektivní indukce T-buněčné i humorální imunitní odpovědi (308). Představují jeden nebo více krátkých či dlouhých aminokyselinových sekvencí odvozených z TA (308), které jsou schopny stimulovat buněčnou imunitní odpověď u onkologických pacientů (294). Převážně se jedná o epitopy nebo fragmenty dlouhé 8-10 aminokyselin, prezentované APC v kontextu s MHC molekulami I. třídy. Vedou k stimulaci protinádorových CTL. Může se také jednat o epitopy o velikosti 13-18 aminokyselin, které jsou po zpracování APC prezentované MHC molekulami II. třídy a následně aktivují CD4+ T-lymfocyty (161). Nedávno se objevily studie, ve kterých jsou HPV16+ onkologičtí pacienti imunizovaný mixem 13 navzájem se překrývajících syntetických peptidů o velikosti 25 -35 aminokyselin, které jsou odvozeny z onkoproteinů HPV16-E6 a HPV16-E7 (v kombinaci s adjuvants Montanide ISA-51; maximálně 4 dávky ve 3-týdenních intervalech). Vedli k aktivaci HPV16-E6 a HPV16-E7-specifické T-buněčné imunitní odpovědi u všech imunizovaných pacientů, ovšem s různým klinickým dopadem (68,157,336).

Na rozdíl od proteinové vakcíny, zahrnující všechny potenciální epitopy specifické pro všechny typy MHC molekul, aplikace peptidové vakcíny je omezena na pacienty s definovaným typem MHC molekuly, na kterou se tento peptid váže (161). Mezi další nevýhody imunizace peptidy spadá jejich rychlá degradace peptidázami po aplikaci do organismu nebo vyvolání krátkodobé imunitní odpovědi. Problémem může být jejich prezentace pomocí MHC molekul na povrchu jiných buněk než APC, což může vést k imunologické toleranci. Při výběru vhodného peptidu na vakcinaci je potřeba se vyhnout peptidům se sníženou afinitou k MHC (308).

Pro zefektivnění imunitní odpovědi je aplikace peptidových vakcín doprovázená použitím různých typů adjuvants. Zabezpečují pomalé uvolňování epitopů a jejich následné zpracování a prezentaci APC (kapitola 3.4.1) (161). Aplikace peptidových vakcín bez použití adjuvants může vést k setrvání APC v nematurovaném stavu a k následné toleranci užitého peptidu (367).

V posledních letech zaznamenala velký rozvoj a klinický úspěch imunoterapie WT1 peptidy pro léčbu leukémií a solidních nádorů (74,257,258,319). První klinické

studie byly započaty v roce 2002 současně třemi skupinami: U. Keilholz, Německo (154,208,246), H. Sugiyama, Japonsko (259) a J. Barret, USA (286,287). Všechny studie vedly k zjištění, že vakcinace WT1 peptidy vede k indukci WT1-specifické T-buněčné odpovědi a k snížení klinických projevů nádorového onemocnění u většiny pacientů. Do konce roku 2012 bylo uskutečněno více než 20 studií.

#### Tabulka 3.5.4 Epitopy identifikované v proteinu WT1, specifické pro MHC molekuly u myši (A), resp. pro různé HLA subtypy u lidí (B)

Nonapeptidy jsou prezentovány skrze MHC molekuly I. třídy pro aktivaci CTL. Delší peptidy mohou obsahovat CTL epitopy, nebo jsou prezentovány MHC molekulami II. třídy pro aktivaci CD4<sup>+</sup> Th-lymfocytů (9,42,96,167,168,258)

A)

<i>MHC molekula</i>		<i>Epitop</i>	<i>Aminokyselinová sekvence</i>
<i>třída</i>	<i>typ u C57Bl/6 myši</i>		
I.	H-2D <sup>b</sup>	WT1 <sub>126-134</sub>	RMFPNAPYL
I.	H-2D <sup>b</sup>	WT1 <sub>235-243</sub>	CMTWNQMNL, CYTWNQMNL
I.	H-2D <sup>b</sup>	WT1 <sub>136-144</sub>	SCLESQPTI
I.; II.	-	WT1 <sub>122-140</sub>	SGQARMFPNAPYLSCLCS
I.; II.	-	WT1 <sub>122-144</sub>	SGQARMFPNAPYLSCLCSQPTI

B)

<i>HLA subtypy</i>	<i>Epitopy</i>	<i>Aminokyselinová sekvence</i>
HLA-A1	WT1 <sub>317-327</sub>	TSEKRPFMCAY
HLA-02	WT1 <sub>37-45</sub>	VLDFAPPGA
HLA-A0201	WT1 <sub>126-134</sub>	RMFPNAPYL
	WT1 <sub>187-195</sub>	SLGEQQYSV
	WT1 <sub>235-243</sub>	CMTWNQMNL
HLA-A2402	WT1 <sub>235-243</sub>	CMTWNQMNL
	WT1 <sub>417-425</sub>	RWPSCQKKF
HLA-DR0401	WT1 <sub>124-138</sub>	PQQMGSDVRDLNALL
HLA-DR53	WT1 <sub>124-138</sub>	PQQMGSDVRDLNALL
	WT1 <sub>247-261</sub>	EDPMGQQGSLGEQQ

Dodnes se v proteinu WT1 podařilo identifikovat jen několik imunodominantních epitopů (Tabulka 3.5.4). Peptidové vakcíny většinou tvoří CTL epitopy specifické pro různé MHC molekuly u lidí. Byly to především peptidy prezentované haplotypy HLA-A\*2402 a HLA-A\*0201, jelikož se nejčastěji vyskytují v japonské a kavkazské populaci. Účinná byla imunizace nativní formou HLA-A\*0201-specifického peptidu WT1<sub>126-134</sub> (154), také nativní i modifikovanou formou peptidu WT1<sub>235-243</sub>

(CMTW $\bar{N}$ QMNL; CYTW $\bar{N}$ QMNL) prezentovaného přes HLA-A\*2402. Modifikovaná forma tohoto epitopu vyvolávala účinnější WT1-specifickou CTL odpověď než nativní (142,145,237,259). Tři studie se zaměřili na kombinaci dvou HLA-A\*0201 vázících peptidů, PR1<sub>169-177</sub> odvozeného z proteinázy 1 a WT1<sub>126-134</sub> (179,286,287). Osvědčila se také imunizace peptidem WT1<sub>126-134</sub> spojená s vakcinací s peptidy WT1 o velikosti 19 a 22 aminokyselin. Cílem bylo rozšířit imunogenicitu na další HLA subtypy (178,217). Ve 4 studiích byly aplikovány DC prezentující WT1 peptidy. Příprava těchto DC vakcín byla dvojitá. Buď byly DC kultivovány v přítomnosti modifikované formy peptidu WT1<sub>235-243</sub> (164,165) anebo elektroporovány mRNA kompletního proteinu WT1 (62,337).

Účinnost peptidových vakcín v mnoha z těchto studiích byla podpořena různými adjuvants. Nejčastěji se používal bezpečný a vysoce efektivní Montanide ISA-51 (emulze „water in oil“). Hodně rozšířená byla aplikace GM-CSF nebo ligandů TLR receptorů jako CpG ODN (338).

Efektivnost těchto vakcín může ovlivnit i způsob aplikace. V uvedených studiích byly peptidy podány převážně subkutánně (s.c.) a i.d. v týdenním nebo měsíčním intervalu. V této dizertační práci se jako nejúčinnější prokázalo i.d. podání tetováním (Obrázek 3.5.3). Tento způsob aplikace byl již účinně použit při imunizaci HPV16-E6 a HPV16-E7 peptidů v naší laboratoři (272).

Převážná část imunizací v popsanych studiích vedla u většiny pacientů k redukci tumoru anebo k částečné či úplné remisi AML. U mnohých z nich se zjistila indukce WT1-specifické T-buněčné imunity. Bohužel různé imunologické markery byly detekovány jen sporadicky (338).

Obr. 3.5.3 **Přístroj na i.d. aplikaci tetováním DNA vakcín a peptidových vakcín** (firma Bortech Tattoogrosshandel)





### 3.5.1.4 Vakcíny na bázi partikulí podobných virům (VLP vakcíny)

VLP se zařazují do specifické třídy podjednotkových vakcín. Jedná se o multiproteinové struktury, většinou bez DNA nebo RNA, které napodobují celkovou organizaci i strukturu virionů a nativní antigenní konformaci imunogenního proteinu. To přináší výhodu oproti vakcínám založeným na expresi a purifikaci jednotlivých proteinů při absenci jiných virových komponentů, což může vést k nesprávné konformaci těchto proteinů. Výsledkem je snížená imunogennost těchto vakcín. Naproti tomu VLP podávané v relativně nízkých dávkách jsou výrazně imunogennější, jelikož prezentují konformační epitopy téměř stejné jako ve virionu (288,291).

VLP se připravují v různých expresních systémech, tj. bakteriálních, kvasinkových nebo savčích buněčných liniích, nebo v systému pozůstávajícího z bakulovirového vektoru a hmyzí buněčné linie. Jednoduché VLP, tvořené jedním rekombinantním proteinem, je možné efektivně připravit pomocí transgenních rostlin (288).

VLP se používají též jako vektor pro transport cizorodých antigenů. Chimerické VLP vznikají integrací heterologních antigenů do VLP. Těmito antigeny mohou být i úseky proteinů obsahující CTL epitopy TA (109). Chimerické VLP se mohou skládat z homologní VLP platformy, která je fúzována s daným epitopem, např. fúze nestrukturních proteinů HPV16-E6/HPV16-E7 s kapsidovým proteinem HPV16-L1 (92). Nevýhodou některých VLP platforem je omezená velikost vložených peptidů, resp. proteinů, která určuje velikost prezentovaných antigenních epitopů a tím účinnost těchto vakcín (109).

V současnosti se v klinické praxi používá 5 profylaktických VLP vakcín, 3 proti hepatitidě B způsobené virem HBV (Recombimax HB, Engerix-B a Hepavax-Gene) a 2 proti cervikálnímu karcinomu způsobenému různými typy HPV (Gardasil a Cervarix).

Při aplikaci VLP je snaha neomezit je jen na profylaktické, ale i terapeutické vakcíny. Velkou výhodou VLP je jejich přímé zacílení do APC, resp. DC, které vedou k aktivaci vrozené i adaptivní imunity. VLP mají vhodnou velikost pro absorpci DC, kde jsou následně procesovány na fragmenty a prezentovány přes MHC molekuly II. třídy. Výsledkem je aktivace B-buněk a humorální imunitní odpovědi. Exogenní VLP mohou být v DC zpracovány jinou cestou, která vede k prezentaci epitopů přes MHC molekuly I. třídy. Tím dochází k stimulaci CTL esenciálních pro odstranění intracelulárních patogenů (virů apod.) a pro likvidaci infikovaných anebo nádorových buněk (109). Účinnost VLP jako terapeutických vakcín může být zvýšená podáním adjuvants,

např. CpG ODN. Jiná možnost je použití prime-boost imunizačního protokolu, kde DNA vakcína je aplikovaná jako prime a VLP jako boost (304).

V této práci byly použity MPyV-VLP, které nesou fúzní protein BCR-ABL (136). MPyV-VLP tvoří 3 kapsidové proteiny myšího polyomaviru (MPyV), tj. VP1, VP2 a VP3 (328). Virová kapsida MPyV sestává z 360 kopií hlavního kapsidového proteinu VP1 uspořádaných do 72 pentamerů se symetrií ikozaedru (279). Každý pentamer je asociován s kopií jednoho ze zbylých proteinů, tj. VP2 či VP3 (14). Nicméně, proteiny VP2 a VP3 nejsou nezbytné pro sestavení VLP v hmyzích nebo kvasinkových buněčných liniích (235). MPyV-VLP se používají jako vektor v genové terapii. Vyvolávají humorální i T-buněčnou imunitní odpověď. Pomocí MPyV-VLP byla do různých typů buněk *in vivo* úspěšně přenesená DNA. Zůstala zde zachována několik měsíců a vedla k stimulaci převážně humorální imunity (56,128,176).

### **3.5.2 Imunomodulátory účinnosti protinádorových vakcín na bázi viru vakcinie**

Několikrát jsem se v této práci zmínila, že účinnost protinádorových VACV vakcín se může zvýšit, když jsou různé imunomodulátory exprimovány tímtéž VACV vektorem jako TA. Tímto způsobem může VACV ko-exprimovat různé růstové faktory, jako cytokiny, chemokiny nebo kostimulační molekuly, které přímo aktivují APC a tím stimulují VACV indukovanou imunitní odpověď. Příkladem těchto látek jsou kolonie stimulující faktor pro granulocyty/ makrofágy (GM-CSF), Flt3 ligand (Flt3L), oba nezbytné pro vývoj a maturaci DC (143,160,223) nebo solubilní receptory vychytávající v nádoru imunosupresivní cytokin TGF $\beta$  (např. TGF $\beta$ RII). TGF $\beta$ RII a Flt3L byly použity i v této práci.

### 3.5.2.1 TGF $\beta$ a jeho receptory v normální buňce a v karcinogenezi

Transformující růstový faktor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) je cytokin nezbytný pro udržení homeostázy epiteliálních, endoteliálních a hematopoetických buněk. Ovlivňuje též buňky imunitního systému (61).

Tento ligand se váže na serin/treonin kinázové receptory typu I (TGF $\beta$ RI) a typu II (TGF $\beta$ RII), lokalizované na buněčné membráně. Vytvoření tetrameru mezi TGF $\beta$ RI a TGF $\beta$ RII je nezbytné pro signální transdukcii (359). Oba receptory mohou existovat jako dimery, nebo jako monomery. Po vazbě TGF $\beta$  dochází buď přímo nebo přes dimerizaci k formování heterotetrameru (137). TGF $\beta$  se může vázat také na receptory III. typu bez kinázové aktivity (např. betaglykan). Tyto receptory mají pouze regulační vlastnosti (23,61).

Konformační změny receptorů vedou k autofosforylaci serinových a/nebo treoninových zbytků na těchto receptorech. Následuje spouštění různých signálních drah, nejčastěji přes proteiny Smad2/3 dráhy (137). Smad komplexy se lokalizují do jádra, kde v kooperaci s jinými faktory vedou k transkripci cílového genu (49,88,219). TGF $\beta$  může ovlivňovat expresi genu i přes aktivaci jiných signálních drah, jako mitogenem aktivovaná protein kinázová (MAPK), fosfatidylinositol 3 kinázová (PI3K) anebo GTPázová dráha (137).

U lidí se rozlišují 3 izomery TGF $\beta$  (TGF $\beta$ -1, TGF $\beta$ -2 a TGF $\beta$ -3), které mají 75% homologii v aminokyselinových sekvencích. Zjistilo se, že jejich signální aktivita *in vitro* je podobná, ale expresní struktura se liší dle typu buněk a tkání (218,360).

TGF $\beta$  je produkován mnoha typy buněk a zastává mnoho funkcí. Za normálních fyziologických podmínek reguluje proliferaci buněk inhibicí růstu a aktivací apoptózy, zasahuje do migrace buněk a ovlivňuje reakce imunitního systému (152). V patologických situacích se jeho úkol mění. Typickým příkladem je účinek TGF $\beta$  v prostředí nádoru.

Při tumorogenezi hraje TGF $\beta$  dvojí roli. V časných fázích funguje jako nádorový supresor. Postupem času se stávají nádorové buňky proti jeho inhibičním účinkům rezistentní. V nádorovém mikroprostředí dochází ke zvýšené sekreci samotného TGF $\beta$  (především MDSC) a k deregulaci signalizace spuštěné přes tento ligand. V pozdějších fázích vývoje nádoru dochází k přesmyku účinku a TGF $\beta$  se změní ze supresora na podpůrce tumoru. Stimuluje angiogenezi a tvorbu extracelulární matrix. Inhibuje protinádorové imunitní reakce vrozené a adaptivní imunity (243).

Působením TGF $\beta$  jsou do nádorového mikroprostředí přitahovány makrofágy a neutrofilů. Díky tomuto cytokinu zůstávají v nematurovaném stádiu a získávají pronádorové účinky (61). TGF $\beta$  brzdí maturaci DC, nezbytných pro iniciaci protinádorové imunitní odpovědi. Inhibuje expresi MHC molekul II. třídy na povrchu DC (364). Účinkem TGF $\beta$  dochází také k blokaci základních funkcí CTL. Zabraňuje uvolnění granzymů a perforinů zodpovědných za cytotoxickou aktivitu těchto buněk. Redukuje expresi Fas ligandu a IFN $\gamma$ , nezbytných pro vyvolání buněčné smrti pomocí CTL. Snižuje také uvolňování IL-2, který je potřebný pro vývoj T-lymfocytů (330). Naopak CTL začnou produkovat nadměrné množství IL-17, který napomáhá tumorogenezi a podporuje odolnost nádorových buněk vůči apoptóze (249). CD4<sup>+</sup> prekurzorové buňky jsou vlivem TGF $\beta$  a IL-4 diferencované na Th17 buňky, které jsou součástí TIL (214). TGF $\beta$  také zvyšuje množství další populace CD4<sup>+</sup> buněk, Treg, které inhibují cytotoxický účinek protinádorových CTL a NK-buněk (318). Také B-lymfocyty nejsou ušetřeny supresivnímu působení TGF $\beta$ . Jejich vývoj je zastaven tak, že nedochází k sekreci imunoglobulinů (153).

Receptory pro TGF $\beta$  se vyskytují na krevních buňkách lymfoidní a myeloidní linie (152). Jejich degradace probíhá prostřednictvím proteazomů i lysozomů (137).

V nádorech střev, prsu, plic, krku a hlavy byly detekovány nefunkční receptory pro TGF $\beta$  (101,321). Převážně se jedná o mutace v sekvencích kódujících část extracelulární domény TGF $\beta$ RII (198). Inhibice signální dráhy může být způsobena i mutacemi jednotlivých signálních molekul.

Pro odvrácení negativního pronádorového vlivu TGF $\beta$  se v experimentálních studiích používají různí antagonisté nebo inhibitory této signalizační dráhy. Jedna z možností je konstrukce Fc-fúzního proteinu, který obsahuje solubilní ektodoménu TGF $\beta$ RII (TGF $\beta$ RII-Fc) nebo TGF $\beta$ RIII, tj. betaglykanu. Exprese TGF $\beta$ RII-Fc *in vivo* v transgenních myších vedla k redukci výskytu metastáz nádoru prsu (365). Při jiném modelu docházelo k nárůstu apoptózy buněk primárního tumoru a redukci počtu metastáz (243). Jiná skupina léčila myši nesoucí štěp z lidské buněčné linie odvozené z nádoru prsu (MDA-MB-231) Fc-fúzním proteinem z betaglykanu. Tato terapie vedla k blokaci angiogeneze a inhibici metastáz (13).

### 3.5.2.2 Flt3 ligand a jeho tyrozinkinázový receptor Flt3

Flt3L má skrze interakci s tyrozinkinázovým receptorem Flt3 silný pleiotropný účinek na vývoj hematopoetických kmenových buněk a na imunitní systém (356). Patří mezi transmembránové proteiny typu 1. Sestává z N-terminálního signálního peptidu, cytoplazmatické, transmembránové a extracelulární domény (120,202,203). Tato doména vykazuje u lidí velkou homologii s myší molekulou Flt3L, a proto je schopna aktivace myšího receptoru Flt3 (201). V důsledku proteolytického štěpení může být Flt3L uvolňován i jako solubilní faktor. Obě formy, transmembránová i solubilní, jsou biologicky aktivní a stimulují tyrozinkinázovou aktivitu Flt3 (356).

Za normálních fyziologických podmínek probíhá konstitutivní produkce intracelulárního Flt3L. Podání IL-2, IL-4, IL-7 nebo IL-15 k buněčné linii T-buněk *in vitro* indukuje přesun tohoto ligandu na povrch buněk (51,52).

Produkce mRNA Flt3L je rozšířená po celém organismu, v hematopoetických i jiných tkáních. Navzdory rozsáhlému výskytu mRNA, protein Flt3L je exprimován jen buňkami stromatu kostní dřeně, endotelu a T-lymfocyty. Jeho přítomnost byla potvrzena v orgánech jako slezina, ovaria, testes, střeva a ledviny (356).

Flt3, neboli Flt3 receptor, patří do III. třídy tyrozinkinázové rodiny. Strukturně je Flt3 podobný receptorům c-fms a c-kit specifickým pro M-CSF a SCF (220,289). Jelikož jsou Flt3 a c-kit exprimovány převážně na primitivních hematopoetických progenitorech, signály pocházející z těchto receptorů jsou důležité v časných fázích hematopoézy. Produkce Flt3 je omezena na určité lidské tkáně, jako kostní dřeň, thymus, slezina, játra a lymfatické uzliny (377).

Navázání Flt3L na receptor vede k jeho autofosforylaci. Následně dochází k fosforylaci dalších molekul (Gab1 a Gab2), což má za následek spuštění MAP kinázové signalizační dráhy. Tyto molekuly mohou signalizovat i v kaskádě PI3K (374). Působí tedy jako adaptorové proteiny signalizace přes Flt3.

Flt3 je vysoce exprimován u pacientů s různými typy akutních leukémií, ne však u pacientů s CML. Na rozdíl od Flt3L byly mutace receptoru Flt3 detekovány u cca 30% pacientů s AML a malého počtu pacientů s MDS. Nejčastějším typem v případě AML jsou interní tandemové duplikace v juxtamembránové doméně (autoinhibiční element kinázové aktivity Flt3) (248). Pak se objevují bodové mutace této domény a/nebo intracelulární domény Flt3. Důsledkem těchto onkogenních mutací je na ligandu nezávislá konstitutivní

aktivace receptoru a deregulované spuštění různých signálních drah. Mutace Flt3 svědčí o negativní prognóze především u mladších pacientů (356).

Imunizace v kombinaci s Flt3L u myši aktivuje protinádorovou imunitní odpověď. Vede k expanzi DC (275) a tím k aktivaci CTL a NK-buněk (89,204), a taky k mobilizaci hematopoetických kmenových buněk a progenitorů v kostní dřeni a slezině a následně jejich expanzi do periferní krve (346). Samotný Flt3L indukuje diferenciaci makrofágů v CD34+ buněčné linií a stimuluje nárůst počtu DC. Vede k proliferaci, diferenciaci a udržování myeloidních i lymfoidních progenitorů a k jejich reorganizaci. Flt3L působí v synergii s jinými cytokiny, jako jsou SCF, GM-CSF a interleukiny IL-3, IL-6, IL-7, IL-11 a IL-15. Dramaticky zvyšuje produkci protilátek specifických pro solubilní antigeny *in vivo*. Systémové podání Flt3L zvyšuje produkci IFN $\gamma$ , IL-12, GM-CSF a IL-5. Jejich společným působením dochází ke zvýšení počtu CTL, NK-buněk a DC v periferní krvi (346,356).

Objevili se studie, ve kterých se sledoval vliv aplikace Flt3L na protekci proti nádorovým buněčným liniím u myši. Pokud bylo zvíře imunizováno nádorovými buňkami transfekovanými Flt3L, byla pozorována dlouhotrvající imunitní odpověď proti rodičovským nádorovým liniím. Avšak systémové podávání Flt3L vedlo k vyvolání jenom krátkodobé imunity (34,46).

Zdá se, že inhibice Flt3 signalizace by mohla být efektivním přístupem v léčbě proti leukemiím.

### **3.6 Hodnocení imunitní odpovědi protinádorových vakcín**

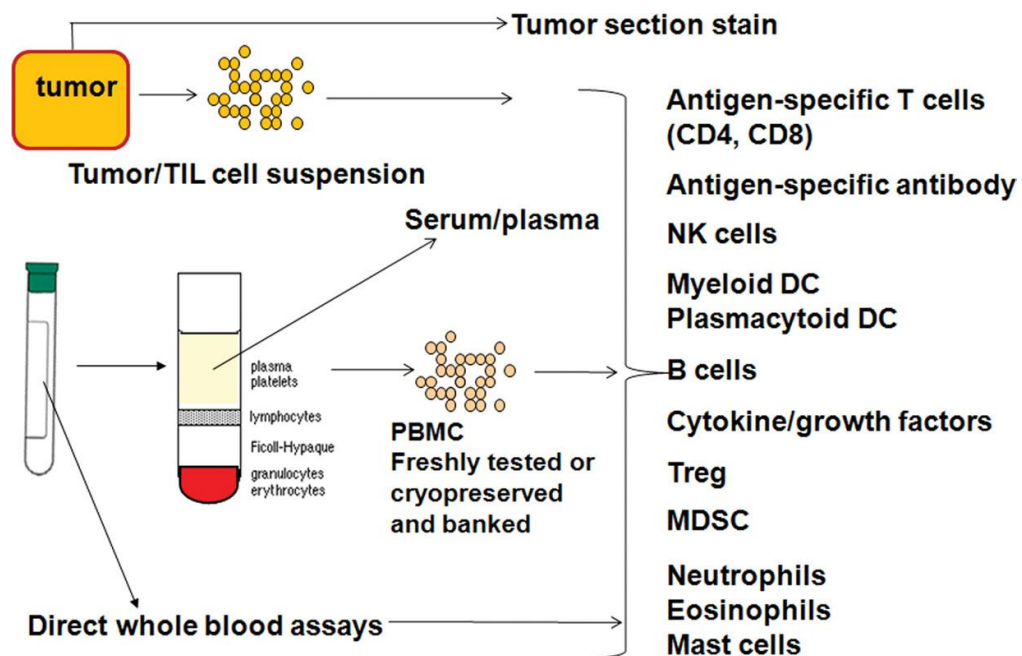
Efektivita terapeutických protinádorových vakcín se v první řadě hodnotí sledováním remise nádorů. Důležitou součástí stanovení účinnosti terapeutických i profylaktických vakcín je monitorování indukované protinádorové imunitní odpovědi. Za její nejvýznamnější složku jsou v současnosti považovány především TA-specifické CTL. Pozornost se zaměřuje také na detekci nádor-specifických CD4+ Th-lymfocytů a protilátek, TA-nespecifické imunitní odpovědi NK-buněk, supresorových Treg nebo MDSC. Pro stav imunity jsou důležité modulace signálních kaskád, změny v hladině cytokinů, chemokinů a růstových faktorů. Tyto hodnoty je možné zjišťovat lokálně v místě nádorů i systematicky v celém organismu (161).

Detekce buněčné imunitní odpovědi *in vitro* u lidí a experimentálních modelů se liší zdrojem lymfoidních buněk. V případě experimentálních studií, jako i v této práci, se vyizolují splenocyty centrifugací přes vrstvu roztoku Ficoll-Histopaque. U pacientů se stejnou metodou vyizolují z periferní krve mononukleární buňky (PBMC; peripheral blood mononuclear cell)(Obrázek 3.6.1). Dalšími zdroji jsou mízní uzliny a nádory. V získaném materiálu je možné stanovit přítomnost a účinnost TA-specifických CTL a CD4+ T-lymfocytů pomocí testů ELISPOT (na základě produkovaných cytokinů). V současné době se ELISPOT, společně s průtokovou cytometrií (např. stanovení různých populací imunitních buněk, intracelulární barvení cytokinů či použití multimerů) staly nejběžněji používanými metodami pro sledování buněčné imunity indukované různými vakcínami a jinými formami imunoterapie (161).

### Obr. 3.6.1 Izolace lymfoidních buněk z periferní krve pacienta (hPBMC) (161)

Nesrážlivá krev se navrství na roztok Ficoll-Histopaque. Po centrifugaci se odebere střední vrstva (lymfocyty), které se několikrát promyjí v roztoku PBS. Obdobným mechanismem se izolují splenocyty z myších slezin. Získané lymfoidní buňky se použijí na stanovení vakcínou indukované imunitní odpovědi.

(TIL - lymfocyty infiltrující nádor; DC – dendritické buňky; Treg – T regulační buňky; MDSC - myeloidní supresorové buňky)



Detekce protinádorové T-buněčné imunitní odpovědi testem ELISPOT (enzyme-linked immunosorbent spot) byla hojně využívána i v této práci. První zmínka o této metodě pochází z 80. let 20. století, kdy byl původně vyvinut pro detekci buněk produkujících protilátky (66). ELISPOT má mnoho výhod. Jedná se o platformu dobře adaptovatelnou na stanovení mnohých typů imunitních buněk (T-lymfocyty, B-lymfocyty) přes odlišné typy jimi produkovaných cytokinů a chemokinů. ELISPOT je kvantitativní metoda, která vypovídá o funkčním stavu imunitní odpovědi indukované danou terapií (310).

Nejčastěji používanou technikou, nejen v této práci, je ELISPOT-IFN $\gamma$ . Tento cytokin je produkován buňkami Th1 imunity, převážně CTL. Použití testu ELISPOT-IFN $\gamma$  má svoje limitace. Podobně jako mnoho dalších cytokinů je i IFN $\gamma$  vylučován v nepatrných koncentracích i odlišnými cytotoxickými buňkami (např. NK-buňky) (310). Z různých studií se zjistilo, že když je tímto testem detekována imunitní odpověď na antigen nějakého infekčního agens, tato není vždy v korelaci s protekcí nebo s přítomností patogen neutralizačních protilátek (108,184). Naproti tomu, vakcínou indukovaná protinádorová IFN $\gamma$ + T-buněčná imunitní odpověď převážně koreluje s klinickými projevy. Příkladem je klinická studie, ve které byla prokázána signifikantní korelace mezi TA-specifickou IFN $\gamma$ + T-buněčnou imunitní odpovědí a přežíváním pacientů s melanomem po aplikaci peptidové vakcíny, odvozené z TA melanomu MART-1 (162). Metodu ELISPOT je možné použít i pro detekci jiných cytokinů (např. IL-2, IL-4, TGF $\beta$ -1) nebo granzymu B.

Frekvenci CTL specifických pro daný TA lze stanovit pomocí průtokové cytometrie užitím multimerů. Jedná se o struktury tvořené komplexy MHC-peptid. V této dizertační práci byl při detekci vakcínami indukované HPV16-E7-specifické T-buněčné imunitní odpovědi použit fluorescenčně značený (R-phycoerythrin) tetramer H-2D<sup>b</sup>/E7<sub>49-57</sub> (Pelimer, Sanquin, NL), kterého struktura je popsána na Obrázku 3.6.2. Používají se i další typy multimerů: dimery, pentamery, streptamery, dextramery a oktamery (40).

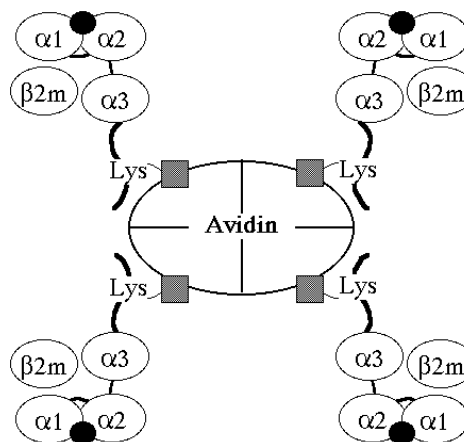
Ze sér imunizovaných zvířat, resp. pacientů je možné zjistit typ a množství protilátek specifických pro různé proteiny sekretované nádorem. Nepostrádatelným pomocníkem se v tomto směru stala databáze SEREX (serological expression of cDNA expression libraries). Tvoří ji cDNA expresní knihovna kódující protilátky, připravena ze sér onkologických pacientů. Byla založena v roce 1997 v ústavu LICR (Ludwig Institute for Cancer Research) v New Yorku, USA. V roce 2002 byla tato databáze nahrazena



databázi CID (Cancer Immunome Database), na které se podílí také ACI (Academy of Cancer Immunology). Tento program je podporován i Evropskou Unií. Cílem CID, přístupné on-line, je popsání všech produktů genů u onkologických pacientů, vůči kterým se vytvořila protinádorová imunitní odpověď.

Obr. 3.6.2 **Struktura tetrameru značeného avidinem** (web 4)

Základ tetrameru tvoří čtyři MHC molekuly I. třídy sestávající z extracelulární části  $\alpha$ -řetězce (3 domény  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ) a z neglykozylovaného  $\beta 2$ -mikroglobulínu. Domény  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  tvoří peptidový žlábek, do kterého je vložený daný peptid (černý kroužek; v našem případě peptid H-2D<sup>b</sup>/E7<sub>49-57</sub> kódovaný virem HPV16). Tyto 4 konstrukty jsou spojeny prostřednictvím lyzinu (Lys) s biotinem (šedé čtverce) a vázane s fluorescenčně značeným avidinem.



Pro detekci protilátek specifických pro různé proteiny sekretované nádorem se používá metoda ELISA nebo proteinové arraye (161).

## **4. VÝSLEDKY**

Publikace 1:**Immunization with WT1-derived peptides by tattooing inhibits the growth of TRAMP-C2 prostate tumor in mice**

**Autoři:** Katarína Babiarová, Luďa Kutinová, Kamila Žůrková, Jitka Kryštofová, Eva Brabcová, Petr Hainz, Jan Musil, Šárka Němečková

**Vydáno v časopise:** J Immunother 2012; 35(6):478-487; IF 3,267

**Cíl práce:** Vývoj nové vakcíny pro terapii WT1+ nádoru.

**Výsledky práce:**

1. Konstrukce několika typů vakcín exprimujících část myšního WT1 proteinu o velikosti 155 aminokyselin (DNA, rVACV a peptidové vakcíny).

2. Peptidy WT<sub>122-140</sub> a WT<sub>126-134</sub> podávané i.d. tetováním společně s CpG ODN vyvolávají signifikantně vyšší IFN $\gamma$ + WT1-specifickou T-buněčnou imunitní odpověď než ty samé vakcíny podávané s.c. společně s CpG ODN + IFA nebo než imunizace jinými typy vakcín.

3. V terapii myších TRAMP-C2 nádoru jsou vakcíny WT<sub>122-140</sub> a WT<sub>126-134</sub> nejúčinnější ze všech připravených vakcín pouze tehdy, když byl pomocí monoklonální protilátky neutralizován TGF $\beta$ , jež buňky TRAMP-C2 produkují v hojné míře. Jiné ovlivnění, jako odstranění Treg, deregulace exprese pomocí 5-azacytidinu nebo zvýšení MHC molekul I. třídy pomocí poly I:C protinádorový efekt imunizace proti WT1 nezvýšilo.

4. Při srovnání s genetickými vakcínami (plasmidová DNA, rVACV) mělo tetování peptidovými vakcínami největší inhibiční účinek na růst nádorů TRAMP-C2.

**Podíl na práci:** charakterizace připravených vakcín testováním jejich účinnosti na zvířatech i v pokusech *in vitro*; imunizace myší a zavedení imunizace myší tetováním; hodnocení vakcínami indukované buněčné imunitní odpovědi; zavedení a standardizace testu ELISPOT-IFN $\gamma$  pro stanovení WT1-specifické T-buněčné imunitní odpovědi; stanovení různých populací buněk (Treg) ve splenocytech a/nebo lymfatických uzlinách imunizovaných myší pomocí fluorescenčně značených povrchových a intracelulárních markerů s použitím průtokové cytometrie; podíl na zavedení nádorového modelu na myších; podíl na sepisování publikace

# Immunization With WT1-derived Peptides by Tattooing Inhibits the Growth of TRAMP-C2 Prostate Tumor in Mice

Katarina Babiarova, Luda Kutinova, Kamila Zurkova, Jitka Krystofova,  
Eva Brabcova, Petr Hainz, Jan Musil, and Sarka Nemeckova

**Summary:** The expression of the transcription factor encoded by the Wilms tumor gene 1 (*WT1*) is associated with a variety of human cancers. WT1 protein has been reported to serve as a target antigen for tumor-specific immune responses. We observed that the immunization of mice with peptide vaccines derived from WT1 in a mixture with the CpG adjuvant (ODN 1826) by tattoo administration was superior to subcutaneous delivery of the peptides in combination with CpG formulated with the mineral oil adjuvant or a DNA vaccine or a recombinant vaccinia virus vaccine expressing the truncated WT1 protein. Tattooing with the WT1<sub>122-140</sub> and WT1<sub>126-134</sub> peptide elicited the response of WT1-specific interferon- $\gamma$ -producing T cells. Peptide vaccine administered with a tattoo device had an antitumor effect on the growth of the prostate tumor cell line TRAMP-C2, provided that the transforming growth factor- $\beta$  produced by tumor cells was neutralized by anti-TGF $\beta$  monoclonal antibody. The treatment of the tumor-bearing mice with 5-azadeoxycytidine or poly IC did not work in synergy with the peptide vaccine.

**Key Words:** WT1, peptide, CpG adjuvant, tattooing, immunization, ELISPOT, IFN $\gamma$ , TRAMP-C2, prostate tumor, anti-TGF $\beta$   
(*J Immunother* 2012;35:478–487)

The Wilms tumor gene 1 (WT1) encodes a multifunctional protein of the zinc-finger family that is involved in the development of the embryo.<sup>1</sup> In healthy adults, the *WT1* gene is expressed in Sertoli cells, in kidney podocytes, and in 1% of CD34<sup>+</sup> bone marrow cells.<sup>2</sup> In contrast to the majority of normal cells, the *WT1* gene is highly expressed in several malignancies including lung, breast, thyroid gland, and colon carcinoma and leukemias<sup>3</sup> where it participates in the process of cell transformation and oncogenesis. The considerable frequency of malignancies with increased *WT1* expression combined with a negligible *WT1* expression level in adult healthy tissues make the *WT1* gene and its products an attractive potential tumor-specific markers and targets for therapeutic intervention. Even though WT1 is an autologous protein, it is immunogenic in humans. The WT1-specific antibodies and cell-mediated immune response that sometimes can be found in

healthy humans are significantly increased in patients with WT1-expressing tumors.<sup>4</sup> The WT1-specific T cells found in patients comprise both the central and effector memory subpopulations.<sup>5</sup> Antitumor effect of immunization with WT1 peptides or with WT1-expressing DNA vaccine has been demonstrated in the mouse model.<sup>6-8</sup> Clinical studies suggest that vaccination of patients with natural or modified HLA-A\*2402 presented peptide<sub>235-241</sub>,<sup>9</sup> the HLA-A\*02 presented peptide WT1<sub>126-134</sub>,<sup>4</sup> or a mixture of short and long peptides containing multiple epitopes activates CD8 and CD4 T cells.<sup>10</sup> Repeated vaccination with peptide vaccines against WT1 in patients with hematologic and solid tumors is safe and does not cause severe side effects. However, therapeutic vaccination usually improved survival only in a portion of the patients. Recently, it has been shown that repeated vaccination with CD8 epitopes mixed with oil in water adjuvant such as Montanide and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor leads to preferential expansion of low-avidity CD8<sup>+</sup> T cells<sup>11</sup> and increase in Treg cells.<sup>12</sup> It has been shown that the high amount of peptide available after repeated vaccination similarly as during chronic viral infection can lead to functional deletion of high-avidity CD8<sup>+</sup> T-cell clones.<sup>13,14</sup> These findings suggest that the current strategy of peptide vaccination against the self-antigen should be modified to result in optimal clinical responses in therapy of cancer. The reduction of the total dose of administered peptide without loss of efficacy is feasible when the intradermal (ID) route is used. Although the skin is a highly immunocompetent organ, ID vaccination has been rare in clinical use. Recently, only 2 reliable methods of ID delivery have been reported. It is ID delivery of influenza vaccines using a microneedle device<sup>15</sup> and tattooing that can be used for ID delivery of DNA vaccines,<sup>16</sup> adenovirus vector-based vaccine,<sup>17</sup> and peptide vaccines.<sup>18</sup> The comparison of the immunogenicity of peptides derived from human papillomavirus type 16 (HPV16) administered with a tattoo device with subcutaneous (SC) injection has shown that higher peptide-specific humoral and cell-mediated immune responses were elicited after vaccination with a tattoo device. The highest efficacy of tattooing was observed in combination with oligonucleotides containing CpG motifs (ODN1826) as adjuvant.

The tumorigenic mouse prostate carcinoma cell line TRAMP-C2 is a suitable animal model for the study of the role of the mechanisms of tumor escape from immune surveillance. TRAMP-C2 cells have low level of MHC I, which can be upregulated by incubation with interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ )<sup>19</sup> or activation of toll-like receptor 3 (TLR3) with poly IC.<sup>20</sup> TRAMP-C2 cells produce large amount of the highly immunosuppressive transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) that makes them insensitive to CD8<sup>+</sup> T cells specific for tumor-associated antigens<sup>21</sup> including WT1.<sup>22</sup> It has been shown that blocking the TGF $\beta$  signaling in T cells

Received for publication January 21, 2012; accepted May 25, 2012.  
From the Department of Experimental Virology, Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague 2, Czech Republic.  
Reprints: Sarka Nemeckova, Department of Experimental Virology, Institute of Hematology and Blood Transfusion, U Nemocnice 1, CZ-128 20 Prague 2, Czech Republic (e-mail: nemeckova@uhkt.cz).

Supplemental Digital Content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's Website, [www.immunotherapy-journal.com](http://www.immunotherapy-journal.com).

Copyright © 2012 by Lippincott Williams & Wilkins

activates the antitumor response against TRAMP-C2 cells.<sup>23,24</sup> Similarly, it has been observed in the HPV16 tumor model that TGF $\beta$  neutralization by monoclonal antibody (mAb) augmented the effect of CD8<sup>+</sup> T cells elicited by the HPV16 E7<sub>49–57</sub> peptide vaccine against the growth of TC-1 tumors.<sup>25</sup>

In this study, we examined whether peptide vaccines against WT1 protein administered by tattooing can have an antitumor effect and whether neutralization of TGF $\beta$  produced by tumor cells can potentiate the immune response to vaccination. The results demonstrated that vaccination with a tattoo device is more efficient than SC injection of WT1-derived peptides mixed with IFA and that tattoo vaccination can further enhance the antitumor effect of anti-TGF $\beta$  therapy targeting tumor cells producing high amounts of TGF $\beta$ .

## MATERIALS AND METHODS

### Synthetic Peptides

The WT1-derived peptides were WT1<sub>126–134</sub> (RMFP NAPYL), WT1<sub>122–140</sub> (SGQARMFPNAPYLPSCLES), and WT1<sub>122–144</sub> (SGQARMFPNAPYLPSCLESQPTI). Control peptides were E7<sub>49–57</sub> (RAHYNIVTF) derived from HPV16-E7 oncoprotein and bcr/abl (GFKQSSKAL) peptide derived from the junction region of the bcr/abl p210 protein from human leukemia. The peptides were purchased from Clonestar Peptide Services (Brno, Czech Republic) and Peptide2.0 Inc. (Chantilly, VA).

### Plasmids

To construct the pBSC.SS.GUS-WT1 plasmid, the sequence coding for amino acids (aa) 94–249 of WT1 protein was substituted for the E7GGG coding sequence in the pBSC.SS.GUS.E7GGG mammalian expression plasmid described earlier.<sup>26</sup> The coding region was prepared by polymerase chain reaction with primer WT1-GUS—F: 5'-GC TAA GCT TTG CAC TTT TCC GGC CAG TTC-3'—and primer WT1-GUS—R: 5'-CTG AAG CTT TTA TCC CTT TAA GGT GGC TCC-3', using the plasmid LMV-mWT1, containing mouse WT1 cDNA as the template. The fragment digested with *Hind*III was ligated with the pBSC.SS.GUS plasmid cut with the same restriction enzyme and inserted downstream of the adenovirus E3 protein signal sequence. The nucleotide sequence of the insert was verified by sequencing. To construct the pSC59 E/L-GUS-WT1 plasmid, the pBSC.GUS-WT1 plasmid was digested with *Eco*RI and the isolated GUS-WT1 fragment was inserted in the recombination plasmid pSC59H5<sup>27</sup> cut with the same enzyme.

### Animal Experiments

Six-week-old male C57BL/6 mice (H-2<sup>b</sup>) were obtained from Charles River, Sulzfeld, Germany and maintained at the animal facility of the National Institute of Public Health, Prague. Animal care was in accordance with the guidelines for the proper use and care of laboratory animals.

### Immunization

#### Peptide Tattooing

Mice were immunized 3 times at a 1- or 2-week interval. The immunization dose contained 100  $\mu$ g of peptide and 50  $\mu$ g of oligonucleotides containing CpG motifs (CpG ODN) adjuvant (phosphorothioate-modified oligonucleo-

tide ODN 1826: TCCATGACGTTCTGACGTT; Geneti Biotech, Hradec Kralove, Czech Republic) in 20  $\mu$ L phosphate-buffered saline (PBS) using a tattoo device as described previously.<sup>18</sup>

### SC Peptide Injection

The immunization dose contained 100  $\mu$ g of peptide, 30  $\mu$ g of CpG adjuvant in 100  $\mu$ L PBS with 100  $\mu$ L of incomplete Freund adjuvant (Sigma-Aldrich). Peptides were SC injected into the back of mice in a final volume of 200  $\mu$ L.

### DNA Vaccine

The preparation of cartridges for DNA vaccination and gene gun immunization were performed as described previously.<sup>28</sup> Briefly, 1  $\mu$ g of the pBSC.SS.GUS-WT1 plasmid was coated onto 0.5 mg of 1- $\mu$ m gold particles and was delivered by the gene gun at a discharge pressure of 400 psi into the shaven skin of the abdomen during a single immunization.

### Recombinant Vaccinia Virus

The P13-E/L GUS-WT1 virus was prepared from the vaccinia virus strain Praha, clone 13<sup>29</sup> as described previously<sup>30</sup> using the plasmid pSC59 E/L-GUS-WT1. The virus was grown in BSC40 cells, purified by sucrose gradient centrifugation,<sup>31</sup> and titrated in CV-1 cells.

### Cell Culture

The TRAMP-C2 prostate cancer cell line derived from TRAMP mice (C57BL/6)<sup>19</sup> was purchased from the American Tissue Culture Collection. The cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (PAA Laboratories, Linz, Austria) supplemented with 0.005 mg/mL bovine insulin, 10 nM dehydroisoandrosterone, 5% fetal calf serum (PAA Laboratories), 5% Nu-Serum IV (Sigma-Aldrich), 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, and 100  $\mu$ g/mL streptomycin. To determine the effect of 5-aza-cytidine (5-azaC) and poly IC on the expression of MHC class I molecules, TRAMP-C2 cells were grown in their culture medium supplemented with 5-azaC (Sigma-Aldrich) or poly IC (Amersham) or 50 U/mL IFN $\gamma$  (Peptrotech). Cells were harvested after 48 hours and stained with rat anti-mouse H-2K/D<sup>b</sup> (Serotec, Oxford, UK) and fluorescein isothiocyanate-labeled anti-mouse IgG (Serotec). The flow cytometry was performed on a Coulter Epics XL flow cytometer (Coulter, Miami, FL) and analyzed by FlowJo 7.1.2. software (TreeStar, Ashland, OR).

### Tumor Model

A total of  $3 \times 10^5$  TRAMP-C2 tumor cells in a volume of 100  $\mu$ L RPMI were injected SC into the back of syngeneic mice. Immunization of mice started on the next day after tumor cells injection. Tumor growth was monitored weekly by palpation. Some mice were treated with intraperitoneal (IP) injection of 1 mg anti-TGF $\beta$  in 500  $\mu$ L PBS (clone 1D11) or with the same amount of control antibody (clone MOPC21) twice a week as indicated. In some experiments, the mice were treated with 1 IP injection of 300  $\mu$ g anti-CD25 (clone PC615.3) in 200  $\mu$ L PBS 1 day before tumor challenge. All mAbs were purchased from BioXCell (W. Lebanon, NH). Some mice were treated with 100  $\mu$ g 5-azaC in 100  $\mu$ L PBS injected SC near the tumor starting from day 3 after TRAMP-C2 cells injection twice a week in a total of 8 doses. In some experiments, mice were treated with 250  $\mu$ g poly IC in 500  $\mu$ L PBS injected IP

weekly starting from day 15 after TRAMP-C2 cells injection as indicated. Differences between tumor growth curves were analyzed by the 2-way analysis of variance, the Bonferroni test, at the 95% confidence interval using the GraphPad PRISM 5.0. Statistically significant differences were marked by asterisks at the symbol of the group in the given time point.

### Assay of WT1-specific T-cell Responses

Spleens were removed from mice 12 days after the immunization, and the response of IFN $\gamma$ -producing cells was determined by enzyme-linked immunosorbent spot (ELISPOT)-IFN $\gamma$  assay upon stimulation with peptide for 20 hours in vitro, as described previously.<sup>32</sup> The baseline-corrected data were obtained by subtraction of the mean spot numbers obtained in the presence and absence of peptide for each mouse. The differences between all pairs of columns in graph were analyzed by the unpaired *t* test at the 95% confidence interval using the GraphPad PRISM 5.0.

The amount of Treg cells after in vivo depletion using anti-CD25 was determined by staining with the FoxP3 Staining Buffer Set (eBioscience) and anti-CD4-FITC (eBioscience), anti-CD25-PE-Cy5 (eBioscience), and anti-FoxP3-PE (eBioscience) antibodies according to the manufacturer's protocol. The stained cells were analyzed using the flow cytometer.

## RESULTS

### Tattooing the WT1<sub>126–134</sub>, WT1<sub>122–140</sub>, and WT1<sub>122–144</sub> Peptides Induced the Antigen-specific Cellular Immune Response

To evaluate the usage of peptide tattooing for vaccination against self-antigen WT1, we immunized mice with WT1-derived and control peptides by tattooing in a mixture with CpG adjuvant. The response was measured by ELISPOT-IFN $\gamma$ . When administered by tattooing, all 3 peptides derived from the WT1 protein sequence elicited an antigen-specific response. Immunization with the WT1<sub>126–134</sub> peptide elicited response of only 62.5% of animals in the experiment shown in Figure 1A, and the difference against any other group was not statistically significant. However, the same immunization protocol induced response of 100% of mice in the repeated experiment shown in Figure 1C. The 19 aa WT1<sub>122–140</sub> elicited the highest response that was detected in all animals of the group. The mean spot number was significantly different from splenocytes of mice immunized with WT1<sub>126–134</sub> and in vitro stimulated with WT1<sub>122–140</sub> ( $P = 0.0233$ ) or from mice immunized with WT1<sub>122–140</sub> and in vitro stimulated with WT1<sub>126–134</sub> ( $P = 0.0222$ ) (Fig. 1A). The response was specific for the immunogen WT1<sub>126–134</sub> or WT1<sub>122–140</sub> and was not detected using the longer WT1<sub>122–140</sub> or WT1<sub>122–144</sub> peptide, respectively. Immunization with the WT1<sub>122–140</sub> peptide did not elicit any CD8<sup>+</sup> T-cell response, because in vivo stimulation with the nonapeptide WT1<sub>126–134</sub> that is presented by MHC I K<sup>b</sup> and D<sup>b</sup> molecules did not induce response of IFN $\gamma$ -producing cells. Therefore, the nonapeptide WT1<sub>126–134</sub> was the only immunogen that induced a CD8<sup>+</sup> T-cell response (Fig. 1A). Immunization with the 23 aa WT1<sub>122–144</sub> peptide elicited a lower response shown in Figure 1B (statistically nonsignificant differences) than the 19 aa peptide ( $P = 0.001$ ). However, the mice immunized with WT1<sub>122–144</sub> recognized both the 19 and 23 aa oligopeptides (Fig. 1B). The HPV16 E7 and bcr/abl peptides were used as positive ( $P = 0.033$ ) and negative controls,

respectively. To check whether the adjuvant activity of CpG ODN is dose dependent and whether a higher dose does not suppress the specific T-cell response, we compared the immune responses to the immunogenic peptide E7<sub>49–57</sub> administered together with 50 or 20  $\mu$ g of CpG ODN. The mean spot number in mice receiving 50  $\mu$ g was twice higher than that after 20  $\mu$ g of CpG ODN (not shown). Therefore, 50  $\mu$ g was henceforth used in all experiments.

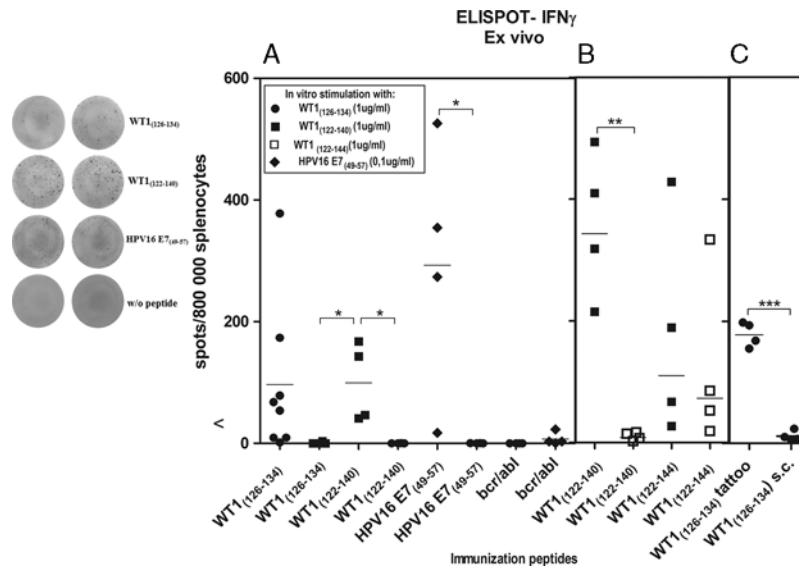
### Tattooing the WT1<sub>126–134</sub> Peptide Induced Higher Immune Responses Than Its SC Injection

Groups of mice were immunized with the WT1<sub>126–134</sub> peptide either by tattooing with CpG ODN or by SC injection in a mixture with incomplete Freund adjuvant and CpG ODN. The WT1-specific response of lymphocytes isolated from the spleens against the WT1<sub>126–134</sub> peptide was tested by ELISPOT-IFN $\gamma$ . The immunogenicity of the WT1<sub>126–134</sub> peptide was superior when administered with a tattoo device in comparison with its SC injection ( $P < 0.001$ ) (Fig. 1C). Similar results were observed in repeated experiments.

### The Immunization With the WT1<sub>126–134</sub> and WT1<sub>122–140</sub> Peptide Vaccines Inhibited the Growth of WT1-expressing Tumor TRAMP-C2 Only If the TGF $\beta$ Was Neutralized by Antibodies

The ability of the immune response elicited by the peptide vaccine to inhibit the growth of a WT1-producing tumor was determined in mice injected SC with TRAMP-C2 tumor cells. We observed repeatedly no effect of immunization when preceded by a challenge of tumor cells (not shown) and the growth of tumors was not inhibited when vaccine administration started on the next day after TRAMP-C2 cells injection (Fig. 2A). Therefore, we attempted to break down the resistance of the TRAMP-C2 tumors to the effect of WT1-specific T cells. First, Treg cells were depleted by anti-CD25 antibody injected IP on day 1 before challenge. The amount of Treg cells was determined in freshly isolated lymphocytes from pooled lymph nodes of 4 mice or in splenocytes. Tregs were absent in splenocytes on day 13 after anti-CD25 administration, whereas 6% of Tregs were found in untreated mice. The depletion has been observed still on day 50 when lymph nodes contained 30% less Treg in comparison with control mice. This treatment did not increase sensitivity of tumors to the effect of immunization with WT1<sub>122–140</sub> (Fig. 2A). The differences between the growth curves were not significant.

Next, we tried to increase the sensitivity of TRAMP-C2 cells to immune effectors by upregulation of MHC I molecules. In vitro treatment with poly IC and 5-azaC increased the amount of MHC class I molecules on the cell surface of the TRAMP-C2 cells, but the distribution differed from that on IFN $\gamma$ -treated cells. There were found 2 populations of cells with upregulated MHC I after the treatment with either poly IC or 5-azaC, whereas only 1 population of MHC I<sup>+</sup> cells was observed in the IFN $\gamma$ -treated cells. The effect of 5-azaC was weaker than that of poly IC (Fig. 2B). In vitro treatment with 5-azaC did not affect the expression of the *WT1* gene in TRAMP-C2 cells (Supplementary Figs. 1A–C, <http://links.lww.com/JIT/A240>). We have also observed that neither poly IC nor 5-azaC changed the amount of TGF $\beta$  secreted by cultured TRAMP-C2 cells (Supplementary Fig. 1D, <http://links.lww.com/JIT/A240>). We examined whether 5-azaC or poly IC could work in synergy with the peptide vaccine in vivo



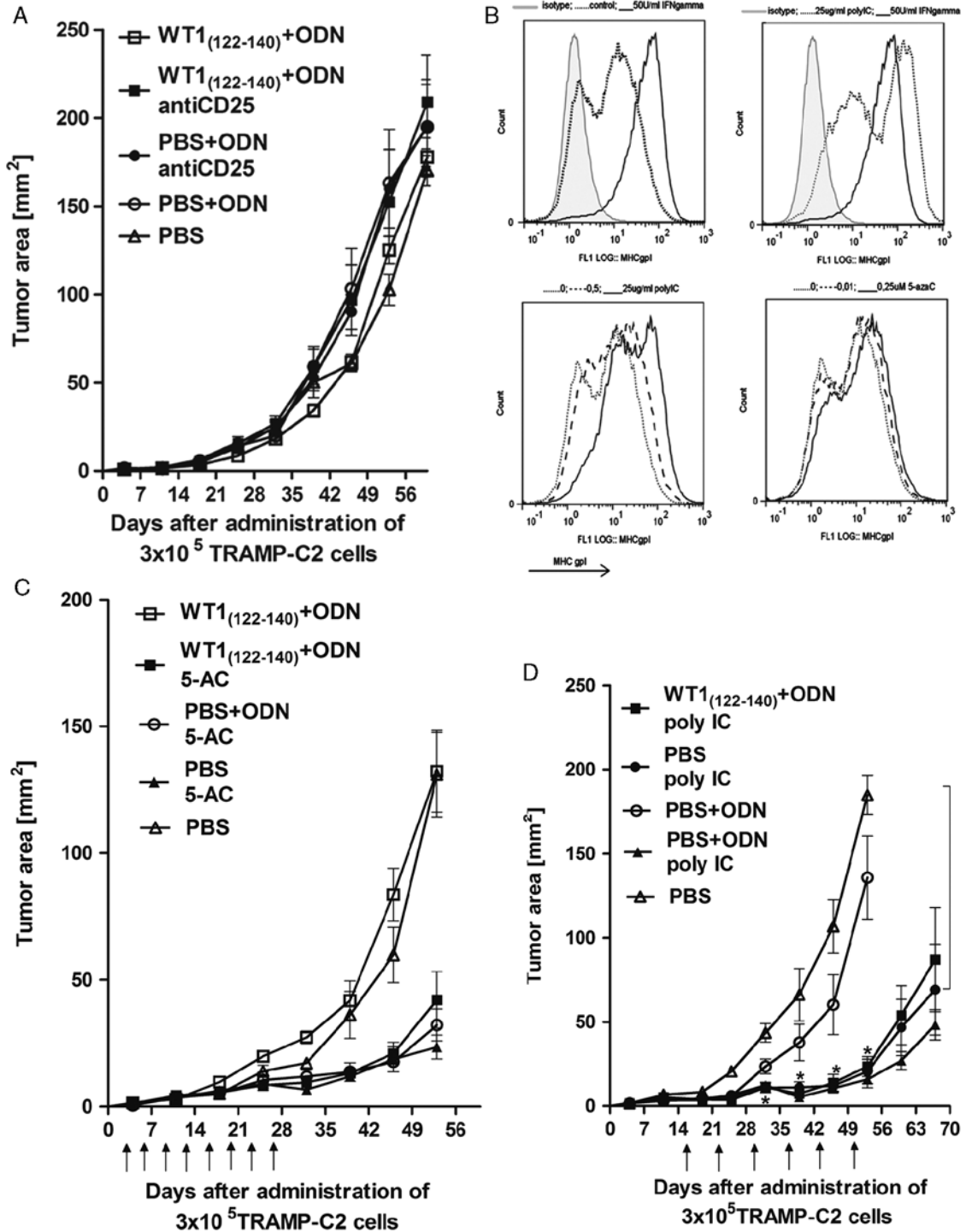
**FIGURE 1.** Antigen-specific T-cell response elicited by WT1 peptides of various lengths administered by tattooing or SC injection. Mice were immunized 3 times at a 2-week (A) or 1-week (B, C) interval with 100  $\mu$ g of the peptide by tattooing (A–C) and SC injection (C). Splenocytes were isolated 12 days after the last immunization. The response of antigen-specific T cells was determined in freshly isolated splenocytes of individual mice by IFN $\gamma$ -ELISPOT in 2 replicates. The background mean values obtained in the absence of the peptide were subtracted from the mean values obtained in the presence of the peptide for each animal. Responses specific for WT1<sub>126-134</sub>, WT1<sub>122-140</sub>, WT1<sub>122-144</sub>, bcr/abl (GFKQSSKAL), and HPV16-E7<sub>49-57</sub> were compared and analyzed by the unpaired *t* test. The line in each column represents the arithmetic mean. The cellular immune response was determined in 3 independent experiments (A–C). ELISPOT indicates enzyme-linked immunosorbent spot; IFN $\gamma$ , interferon- $\gamma$ ; SC, subcutaneous; WT1, Wilms tumor gene 1.

(Fig. 2C). The treatment of tumors in situ with multiple doses of 5-azaC inhibited the growth of tumors. The difference between group injected with PBS or with PBS + 5-azaC was significant starting from day 32 ( $P = 0.0001$ ). However, the inhibitor did not significantly enhance the antitumor effect of the anti-WT1 immunity. The treatment of mice carrying TRAMP-C2 tumors with a TLR3 ligand and IFN inducer poly IC also had an antitumor effect (Fig. 2D) that was significant for all 3 groups receiving poly IC starting from day 32 ( $P < 0.05$ ) in comparison with the PBS group. However, the immunization did not enhance the effect on tumor mass reduction. We found that the only effective way how the TRAMP-C2 tumors were rendered sensitive to WT1-specific T cells was the neutralization of TGF $\beta$  produced by tumors by mAbs. IP injections of 1 mg of anti-TGF $\beta$  mAb 1D11 or the isotype control MOPC21 were given twice a week starting from day 3 after injection of tumor cells (Fig. 3A). The control antibody MOPC21 did not affect significantly the growth of tumors. TGF $\beta$  neutralization retarded the growth of tumors even in nonimmunized mice, but the difference between group PBS + ODN + MOPC21 and PBS + ODN + 1D11 was statistically significant only on day 53 ( $P < 0.001$ ) and not in earlier intervals. Antitumor effect of the treatment with anti-TGF $\beta$  monoclonal was more pronounced in immunized mice where the difference between WT1<sub>122-140</sub> + ODN + 1D11 group and WT1<sub>122-140</sub> + ODN + MOPC21 group was significant starting from day 46 ( $P < 0.05$ ), which implies that immunization worked in synergy with anti-TGF $\beta$ . The difference in growth of tumors between immunized (WT1<sub>122-140</sub> + ODN + 1D11) group and non-immunized (PBS) group without TGF $\beta$  neutralization was also significant starting from day 46 ( $P < 0.05$ ). Further, we explored whether TGF $\beta$  neutralization can enhance the antitumor effect of immunization with recombinant vaccines

expressing truncated WT1 such as DNA vaccine or recombinant vaccinia virus. Mice were injected SC with TRAMP-C2 tumor cells; immunization with pBSC.SS. GUS-WT1 DNA vaccine or P13-GUS-WT1 vaccinia virus started on the next day after the challenge. One group was immunized by tattooing with WT1<sub>122-140</sub> peptide. IP injections of 1 mg of anti-TGF $\beta$  were given twice a week starting from day 3 after injection of tumor cells. Tumor growth inhibition was only observed in the mice treated with peptide vaccine (Fig. 3B), but the difference in comparison with nonimmunized control was insignificant similarly as in experiment in Figure 3A. Moreover, vaccinia virus administration accelerated the tumor growth. The difference was statistically significant only against the group immunized with peptide vaccine starting from the day 32 ( $P < 0.05$ ). Further, we examined whether the treatment of mice with poly IC or anti-TGF $\beta$  had an effect on the immune response against WT1 induced by tattooing. The differences in the amount of IFN $\gamma$ -producing T cells were only small and insignificant (Fig. 4).

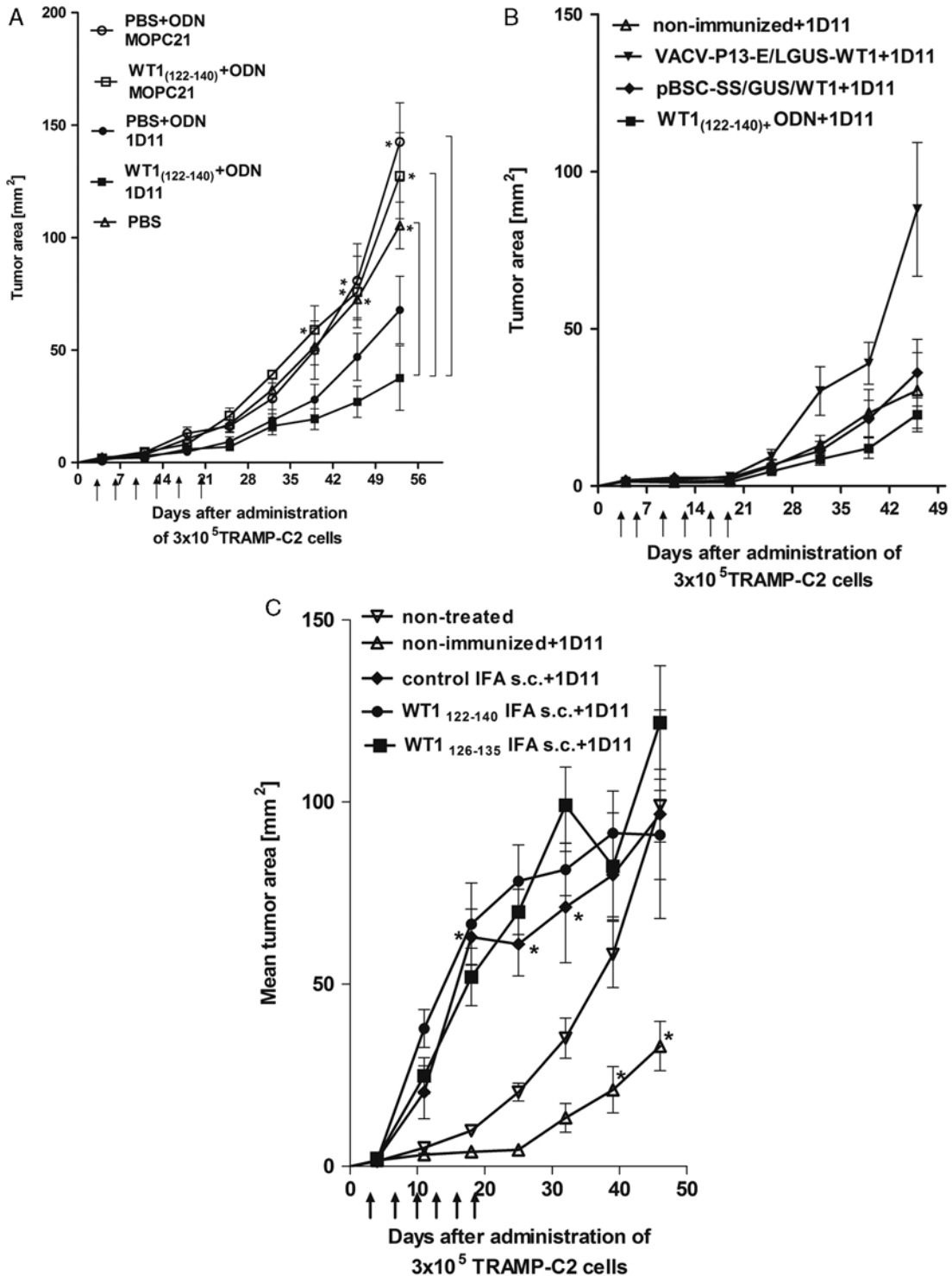
**SC Injection of the WT1<sub>126-134</sub> or WT1<sub>122-140</sub> Peptide Does Not Inhibit the Formation and Growth of TRAMP-C2 Tumors**

To determine the influence of the route of vaccine administration on the therapeutic efficiency of peptide vaccines, tumors were induced and treated by anti-TGF $\beta$  in the same way as in the experiment shown in Figure 3A. Three doses of peptide vaccines were administered by SC injection. Immunization by the SC injection of peptides in IFA with CpG ODN did not slow down tumor growth in comparison with the control (Fig. 3C). Moreover, we observed repeatedly that injection of IFA + CpG ODN adjuvant accelerated the formation of TRAMP-C2 tumors in

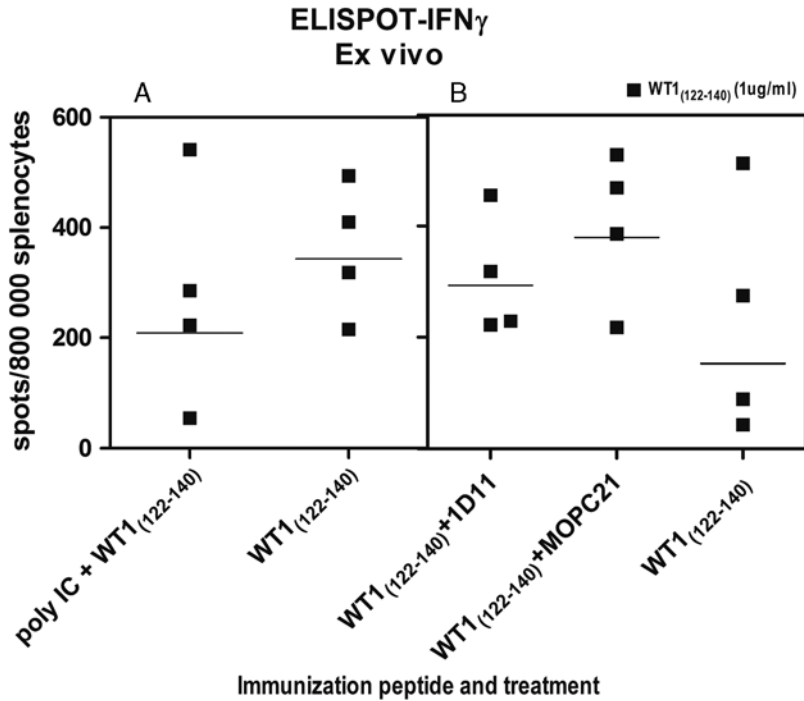


**FIGURE 2.** Immunization with the Wilms tumor gene 1 (WT1)<sub>122-140</sub> peptide has not synergistic antitumor effect with the treatment with anti-CD25 or 5-azacytidine (5-azaC) or poly IC. Mice (n = 6) were subcutaneous (SC) injected with  $3 \times 10^5$  TRAMP-C2 cells on day 0 and immunized with 100  $\mu$ g of the WT1<sub>122-140</sub> peptide by tattooing on days 1, 8, and 15 (A, C). Antibody against CD25 [300  $\mu$ g/0.2 mL phosphate-buffered saline (PBS)] was administered on day 1 (A). Starting on day 3, 5-azaC was injected SC in the proximity of the tumor at a dose of 100  $\mu$ g twice a week to complete a total of 8 doses (C). Mice (n = 6) were SC injected with  $3 \times 10^5$  TRAMP-C2 cells pretreated in vitro with 50 U/mL interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) for 48 hours before harvesting. The immunization was performed as described in (A) and (C). Starting on day 15, poly IC was injected intraperitoneally at a dose of 250  $\mu$ g once a week for a total of 6 doses (D). The growth of tumors is shown as the mean tumor size for each group. The tumor growth curves were compared and statistically analyzed at individual days using 2-way analysis of variance. The TRAMP-C2 cells were cultured with IFN $\gamma$  (50 U/mL), 5-azaC (0.05  $\mu$ mol/L), or poly IC (0.5  $\mu$ g/mL) harvested after 48 hours and stained with rat anti-MHC I IgG and secondary fluorescein isothiocyanate-labeled antibody. The samples were analyzed by flow cytometry (B).





**FIGURE 3.** Antitumor effect of therapeutic immunization with WT1 peptides of various lengths administered by tattooing. Comparison with peptide vaccine administration by SC injection or with recombinant vaccinia virus or DNA vaccine. Mice (n=6) were SC injected with 3 × 10<sup>5</sup> TRAMP-C2 cells on day 0. The animals were immunized with 100 μg of the peptide by tattooing (A–C) and SC injection (C) on days 1, 8, and 15 or with 3 × 10<sup>6</sup> plaque-forming unit of recombinant vaccinia virus P13-E/L-GUS-WT1 administered IP on day 1 (B) or with the pBSC-SS/GUS/WT1 plasmid (1 μg) administered by a gene gun on days 1, 8, and 15 (B). Starting on day 3, anti-TGFβ antibody (1D11) (A–C) or control antibody (MOPC21) (A) was administered IP at a dose of 1000 μg twice per week for a total of 6 doses. The growth of tumors was measured as in Figure 2. The asterisks denote the time point when the mean size of tumors was significantly different from mean size of tumors in the nontreated control group. IP indicates intraperitoneal; PBS, phosphate-buffered saline; SC, subcutaneous; WT1, Wilms tumor gene 1.



**FIGURE 4.** Administration of poly IC or antibodies against TGF $\beta$  do not affect the antigen-specific T-cell response elicited by the WT1<sub>122-140</sub> peptide administered by tattooing. Mice (n=4) were immunized 3 times with 100  $\mu$ g of the WT1<sub>122-140</sub> peptide by tattooing at a 1-week interval. Poly IC was injected intraperitoneal at a dose of 250  $\mu$ g on days 1, 8, and 15 (A). Starting from day 4, antibodies against TGF $\beta$  or control antibodies were administered twice a week for a total of 6 doses or once a week for a total of 6 doses (B). Splenocytes were isolated 12 days after the last immunization. The response of antigen-specific T cells was determined as in Figure 1. ELISPOT indicates enzyme-linked immunosorbent spot; TGF, transforming growth factor; WT1, Wilms tumor gene 1.

comparison with that in nonimmunized mice. The difference from the nontreated mice was significant between days 18 and 25 ( $P < 0.001$ ).

## DISCUSSION

In this study, we evaluated the immunogenicity of 3 different vaccines against the tumor-associated antigen WT1 protein. These were a peptide vaccine administered with a tattoo device or by SC injection, a DNA vaccine, and a recombinant vaccinia virus expressing the truncated WT1 protein fused with the glucuronidase from *Escherichia coli*. The usefulness of these types of vaccines in cancer treatment has been demonstrated previously for the vaccines against the HPV16 E7 oncoprotein.<sup>16,26,27</sup> The immunization with the GUS-WT1 or SS.GUS-WT1 fusion gene in the form of the DNA vaccine or recombinant vaccinia virus had no therapeutic effect against TRAMP-C2-induced tumors and nor was it able to elicit WT1-specific T-cell response. It was shown previously that DNA vaccine containing the complete WT1 sequence<sup>8</sup> was immunogenic and had antitumor effect and that the truncated WT1 can be used as an immunogen if delivered by adenovirus-transduced dendritic cells.<sup>33</sup> The reason for the low immunogenicity of our genetic vaccines containing the truncated WT1 gene could be the fusion gene design that seems crucial. The fusion with GUS could be more suitable for immunization against viral than autologous antigens. In contrast, all 3 WT1-derived peptides administered by tattooing with CpG ODN adjuvant induced a specific

response of IFN $\gamma$ -producing T cells. The highest response was elicited by the 19 aa WT1<sub>122-140</sub> peptide. This peptide contains several dominant CTL epitopes (aa 126–134, 130–138) predicted to bind to the mouse K<sup>b</sup> and D<sup>b</sup> class I molecules<sup>22</sup> and also epitopes predicted to bind to mouse class II molecules. It contains epitopes with affinity to human class I and class II molecules and has already been included in a clinically tested peptide vaccine.<sup>10</sup> The vaccines containing long synthetic peptides in IFA were recently shown to be much more potent than short major histocompatibility complex class I-binding peptide epitopes that have been extensively clinically tested. A vaccine consisting of long peptides from E6 and E7 proteins of high-risk HPV16 was effective in the treatment of women suffering from high-grade vulvar intraepithelial neoplasia.<sup>34</sup> We also examined whether tattooing with the 19 aa WT1<sub>122-140</sub> peptide containing the MHC I-restricted epitope could induce the response against the CTL epitope WT1<sub>126-134</sub>. The splenocytes only responded to the peptide used for immunization when examined by the ex vivo ELISPOT-IFN $\gamma$ . The results showed that the immunization with the 19 aa WT1<sub>122-140</sub> peptide using a tattoo device induced a prevailing Th1 response and was not able to induce a CD8<sup>+</sup> CTL response. Results of our study resemble findings of Gaiger et al<sup>22</sup> who observed that the mouse WT1-specific T-cell clones restimulated in vitro with the WT1<sub>126-134</sub> peptide had no cytotoxic activity against WT1-expressing cells. This could mean that the CTL epitope WT1<sub>126-134</sub> is not efficiently cleaved from the WT1 antigen. Inability of splenocytes from mice immunized with long

WT1<sub>122-140</sub> peptide to recognize the CTL epitope WT1<sub>126-134</sub> could be the result of inefficient processing the WT1 peptide to yield the WT1<sub>126-134</sub> epitope.

It has been shown previously that in IFA-based vaccines, synthetic CpG ODN acted as an adjuvant for the CTL response against class I-restricted peptides.<sup>35</sup> CpG ODN also enhanced the efficacy of tattoo vaccination with the peptides derived from the HPV16 E7 protein.<sup>18</sup> We confirmed that this effect is dose dependent, as the addition of 50 µg of CpG ODN to the peptide induced higher numbers of IFN $\gamma$ -producing cells in comparison with 20 µg of CpG ODN (not shown).

Unlike administration of the WT1 peptide by tattooing, the SC injection of the peptides in a mixture with CpG ODN and mineral oil adjuvants elicited no peptide-specific T-cell immune response and was not able to retard the growth of TRAMP-C2 tumors.

This finding should be further analyzed to see whether repetitive injections of high doses of the peptide induce energy of reactive T cells or whether poor release of the CpG ODN leads to a suboptimal stimulation of the antigen-presenting cells. Mineral oil adjuvant is frequently used in peptide vaccination trials where some combine it with CpG ODN; however, it has recently been shown that immunization of patients with the peptide vaccine including the WT1 formulated with the Montanide (mineral oil) adjuvant and with CpG ODN 7909 has a negative effect on their CD8<sup>+</sup> T-cell responses.<sup>36</sup>

Antitumor effect of immunization was determined using the prostate tumor cell line TRAMP-C2 that produced high amounts of WT1 similar as the human leukemic cell line K562.<sup>22</sup> The previous attempts failed to inhibit the growth of TRAMP-C2 by immunization against WT1.<sup>22</sup> It has been shown that TRAMP-C2 tumors have available multiple tolerogenic mechanisms that exert suppressive effects on T cells, inhibit their priming, and induce their functional tolerance when they encounter tumor antigen.<sup>37</sup> TRAMP-C2 cells secrete large amounts of the immunosuppressive TGF $\beta$  that can subvert the effect of the immunization. An improved antitumor effect of peptide immunization targeted at a tumor antigen has been achieved using neutralization of TGF $\beta$  by mAb 1D11 similar to our system in the therapy of mouse glioma<sup>38</sup> and against HPV16-induced tumor TC-1.<sup>25</sup> TRAMP-C2 model differed from the glioma and TC-1 models in 2 aspects: therapeutic immunization with the peptide vaccine had no any effect on the growth of TRAMP-C2 tumors and the administration of 11D1 mAb slowed down tumor development. The differences could depend on the level of TGF $\beta$  production by a particular tumor cell line. As it was shown that TGF $\beta$  plays a principal role in the differentiation and induction of Tregs, we investigated whether Tregs do mediate immunosuppression in our immunotherapeutic model. Depletion of Tregs using anti-CD25 antibody did not increase the antitumor efficacy of immunization with the peptide vaccine. It seems that TGF $\beta$  produced by TRAMP-C2 works through other tolerizing mechanisms. As shown in another immunotherapeutic study,<sup>25</sup> the depletion of Treg cells using anti-CD25 did not enhance the antitumor effect of immunization with the peptide vaccine against HPV16-induced tumors. Moreover, it was shown that the enhancing effect of anti-TGF $\beta$  antibody on the immunization was not due to the suppression of either Treg cells or Th17 cells.

In vitro cultured TRAMP-C2 cells have low levels of surface MHC class I molecules. It has been shown that

epigenetic mechanisms can be involved in the deficient MHC class I expression in the tumor cells and that the treatment of the cells with the DNA-demethylating agent 5-azaC induced surface reexpression of MHC class I molecules in tumor cells.<sup>39,40</sup> Consequently, the treatment of MHC class I-negative HPV16-induced tumors with 5-azaC increased the effectiveness of the antitumor immune response.<sup>41,42</sup> The IFN $\gamma$ -mediated upregulation of MHC class I expression in TRAMP-C2 cells was able to activate a tumor-specific immune response and resulted in the protection against TRAMP-C2-induced tumors.<sup>43</sup> As we found that the treatment of TRAMP-C2 cells in vitro with 5-azaC somewhat upregulated the MHC class I expression, we speculated that in situ injection of 5-azaC might enhance the effect of WT1-specific T cells against the tumor growth. The treatment of nonimmunized mice with the TRAMP-C2 tumors with 5-azadeoxycytidine resulted in tumor growth inhibition. The possible epigenetic mechanisms known to play a role in the prostate cancerogenesis include methylation of the promoter of the transcription factor Nrf2 described in the TRAMP model<sup>44</sup> or methylation of the promoter of TGF $\beta$  receptor, which renders the cells insensitive to cell growth regulation by TGF $\beta$ .<sup>45,46</sup> We observed a dominant immunosuppressive effect of TGF $\beta$  and no synergy of WT1-specific immunity with 5-azaC treatment. We have not found synergy of immunization with the treatment with poly IC. Culture of TRAMP-C2 cells in the presence of poly IC induced upregulation of MHC class I molecules (Fig. 2B) and inhibition of the growth of the cultured cells (not shown). It has been described also in other studies where the induction of apoptosis in prostate cancer cells by poly IC in vitro was attributed to IFN-independent activation of intrinsic pathways.<sup>47,48</sup> Moreover, it has been shown recently that poly IC significantly retarded the growth of TRAMP-C2 tumors in vivo where the direct inhibitory effect was enhanced by the innate immunity activated through the TLR-3. The mechanisms include the effect of inflammatory cytokines, type I IFNs, and activity of natural killer cells.<sup>20</sup> However, the treatment with poly IC did not modulate the TGF $\beta$  serum levels in tumor-bearing mice. It is corroborated by our results where the immunosuppressive effect of TGF $\beta$  was dominant.

Our study showed that peptide immunization administered by tattooing has an antitumor effect against prostate tumors producing high levels of TGF $\beta$  as a negative regulator of the immune system provided that the TGF is blocked by the anti-TGF $\beta$  mAb.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank M. Murakami (Osaka) for the plasmid LMV-mWT1. They also thank M. Šmahel for help and for providing the pBSC.SS.GUS.E7GGG plasmid.

#### CONFLICTS OF INTEREST/ FINANCIAL DISCLOSURES

This work was supported by grants NS 10660-3/2009 IGA MZ CZ and ERDF OPPK CZ.2.16/3.1.00/24001.

All authors have declared there are no financial conflicts of interest in regard to this work.

#### REFERENCES

- Hohenstein P, Hastie ND. The many facets of the Wilms' tumour gene, WT1. *Hum Mol Genet.* 2006;15(Spec. No. 2): R196–R201.

2. Hosen N, Sonoda Y, Oji Y, et al. Very low frequencies of human normal CD34<sup>+</sup> haematopoietic progenitor cells express the Wilms' tumour gene WT1 at levels similar to those in leukaemia cells. *Br J Haematol*. 2002;116:409–420.
3. Dallosso AR, Hancock AL, Malik S, et al. Alternately spliced WT1 antisense transcripts interact with WT1 sense RNA and show epigenetic and splicing defects in cancer. *RNA*. 2007;13:2287–2299.
4. Rezvani K, Yong AS, Mielke S, et al. Leukemia-associated antigen-specific T-cell responses following combined PR1 and WT1 peptide vaccination in patients with myeloid malignancies. *Blood*. 2008;111:236–242.
5. Rezvani K, Brenchley JM, Price DA, et al. T-cell responses directed against multiple HLA-A\*0201-restricted epitopes derived from Wilms' tumor 1 protein in patients with leukemia and healthy donors: identification, quantification, and characterization. *Clin Cancer Res*. 2005;11:8799–8807.
6. Nakajima H, Kawasaki K, Oka Y, et al. WT1 peptide vaccination combined with BCG-CWS is more efficient for tumor eradication than WT1 peptide vaccination alone. *Cancer Immunol Immunother*. 2004;53:617–624.
7. Oka Y, Udaka K, Tsuboi A, et al. Cancer immunotherapy targeting Wilms' tumor gene WT1 product. *J Immunol*. 2000;164:1873–1880.
8. Tsuboi A, Oka Y, Ogawa H, et al. Cytotoxic T-lymphocyte responses elicited to Wilms' tumor gene WT1 product by DNA vaccination. *J Clin Immunol*. 2000;20:195–202.
9. Oka Y, Tsuboi A, Taguchi T, et al. Induction of WT1 (Wilms' tumor gene)-specific cytotoxic T lymphocytes by WT1 peptide vaccine and the resultant cancer regression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:13885–13890.
10. Maslak PG, Dao T, Krug LM, et al. Vaccination with synthetic analog peptides derived from WT1 oncoprotein induces T-cell responses in patients with complete remission from acute myeloid leukemia. *Blood*. 2010;116:171–179.
11. Rezvani K, Yong AS, Mielke S, et al. Repeated PR1 and WT1 peptide vaccination in Montanide-adjuvant fails to induce sustained high-avidity, epitope-specific CD8<sup>+</sup> T cells in myeloid malignancies. *Haematologica*. 2011;96:432–440.
12. Saitoh A, Narita M, Watanabe N, et al. WT1 peptide vaccination in a CML patient: induction of effective cytotoxic T lymphocytes and significance of peptide administration interval. *Med Oncol*. 2011;28:219–230.
13. Gallimore A, Glithero A, Godkin A, et al. Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complexes. *J Exp Med*. 1998;187:1383–1393.
14. Mollndrem JJ, Lee PP, Kant S, et al. Chronic myelogenous leukemia shapes host immunity by selective deletion of high-avidity leukemia-specific T cells. *J Clin Invest*. 2003;111:639–647.
15. Van DP, Oosterhuis-Kafeja F, Van der Wielen M, et al. Safety and efficacy of a novel microneedle device for dose sparing intradermal influenza vaccination in healthy adults. *Vaccine*. 2009;27:454–459.
16. Pokorna D, Rubio I, Muller M. DNA-vaccination via tattooing induces stronger humoral and cellular immune responses than intramuscular delivery supported by molecular adjuvants. *Genet Vaccines Ther*. 2008;6:4–12.
17. Potthoff A, Schwannecke S, Nabi G, et al. Immunogenicity and efficacy of intradermal tattoo immunization with adenoviral vector vaccines. *Vaccine*. 2009;27:2768–2774.
18. Pokorna D, Polakova I, Kindlova M, et al. Vaccination with human papillomavirus type 16-derived peptides using a tattoo device. *Vaccine*. 2009;27:3519–3529.
19. Foster BA, Gingrich JR, Kwon ED, et al. Characterization of prostatic epithelial cell lines derived from transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate (TRAMP) model. *Cancer Res*. 1997;57:3325–3330.
20. Chin AI, Miyahira AK, Covarrubias A, et al. Toll-like receptor 3-mediated suppression of TRAMP prostate cancer shows the critical role of type I interferons in tumor immune surveillance. *Cancer Res*. 2010;70:2595–2603.
21. Zhang Q, Yang X, Pins M, et al. Adoptive transfer of tumor-reactive transforming growth factor-beta-insensitive CD8<sup>+</sup> T cells: eradication of autologous mouse prostate cancer. *Cancer Res*. 2005;65:1761–1769.
22. Gaiger A, Reese V, Disis ML, et al. Immunity to WT1 in the animal model and in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2000;96:1480–1489.
23. Liu VC, Wong LY, Jang T, et al. Tumor evasion of the immune system by converting CD4<sup>+</sup>. *J Immunol*. 2007;178:2883–2892.
24. Zhang Q, Yang XJ, Kundu SD, et al. Blockade of transforming growth factor- $\beta$  signaling in tumor-reactive CD8(+) T cells activates the antitumor immune response cycle. *Mol Cancer Ther*. 2006;5:1733–1743.
25. Terabe M, Ambrosino E, Takaku S, et al. Synergistic enhancement of CD8<sup>+</sup> T cell-mediated tumor vaccine efficacy by an anti-transforming growth factor-beta monoclonal antibody. *Clin Cancer Res*. 2009;15:6560–6569.
26. Smahel M, Polakova I, Pokorna D, et al. Enhancement of T cell-mediated and humoral immunity of beta-glucuronidase-based DNA vaccines against HPV16 E7 oncoprotein. *Int J Oncol*. 2008;33:93–101.
27. Nemeckova S, Stranska R, Subrtova J, et al. Immune response to E7 protein of human papillomavirus type 16 anchored on the cell surface. *Cancer Immunol Immunother*. 2002;51:111–119.
28. Smahel M, Pokorna D, Mackova J, et al. Enhancement of immunogenicity of HPV16 E7 oncogene by fusion with *E. coli* beta-glucuronidase. *J Gene Med*. 2004;6:1092–1101.
29. Kutinova L, Nemeckova S, Hamsikova E, et al. Hepatitis B virus proteins expressed by recombinant vaccinia viruses: influence of preS2 sequence on expression surface and nucleocapsid proteins in human diploid cells. *Arch Virol*. 1994;134:1–15.
30. Perkus ME, Panicali D, Mercer S, et al. Insertion and deletion mutants of vaccinia virus. *Virology*. 1986;152:285–297.
31. Joklik WK. The purification of four strains of poxvirus. *Virology*. 1962;18:9–18.
32. Mackova J, Kutinova L, Hainz P, et al. Adjuvant effect of dendritic cells transduced with recombinant vaccinia virus expressing HPV16-E7 is inhibited by co-expression of IL12. *Int J Oncol*. 2004;24:1581–1588.
33. Osada T, Woo CY, McKinney M, et al. Induction of Wilms' tumor protein (WT1)-specific antitumor immunity using a truncated WT1-expressing adenovirus vaccine. *Clin Cancer Res*. 2009;15:2789–2796.
34. Kenter GG, Welters MJ, Valentijn AR, et al. Vaccination against HPV-16 oncoproteins for vulvar intraepithelial neoplasia. *N Engl J Med*. 2009;361:1838–1847.
35. Lipford GB, Bauer M, Blank C, et al. CpG-containing synthetic oligonucleotides promote B and cytotoxic T cell responses to protein antigen: a new class of vaccine adjuvants. *Eur J Immunol*. 1997;27:2340–2344.
36. Kuball J, de BK, Wagner E, et al. Pitfalls of vaccinations with WT1-, Proteinase3- and MUC1-derived peptides in combination with MontanideISA51 and CpG7909. *Cancer Immunol Immunother*. 2011;60:161–171.
37. Anderson MJ, Shafer-Weaver K, Greenberg NM, et al. Tolerization of tumor-specific T cells despite efficient initial priming in a primary murine model of prostate cancer. *J Immunol*. 2007;178:1268–1276.
38. Ueda R, Fujita M, Zhu X, et al. Systemic inhibition of transforming growth factor-beta in glioma-bearing mice improves the therapeutic efficacy of glioma-associated antigen peptide vaccines. *Clin Cancer Res*. 2009;15:6551–6559.
39. Coral S, Sigalotti L, Gasparollo A, et al. Prolonged upregulation of the expression of HLA class I antigens and costimulatory molecules on melanoma cells treated with 5-aza-2'-deoxycytidine (5-AZA-CdR). *J Immunother*. 1999;22:16–24.
40. Manning J, Indrova M, Lubyova B, et al. Induction of MHC class I molecule cell surface expression and epigenetic

- activation of antigen-processing machinery components in a murine model for human papilloma virus 16-associated tumours. *Immunology*. 2008;123:218–227.
41. Goodyear O, Agathangelou A, Novitzky-Basso I, et al. Induction of a CD8<sup>+</sup> T-cell response to the MAGE cancer testis antigen by combined treatment with azacitidine and sodium valproate in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplasia. *Blood*. 2010;116:1908–1918.
  42. Simova J, Pollakova V, Indrova M, et al. Immunotherapy augments the effect of 5-azacytidine on HPV16-associated tumours with different MHC class I-expression status. *Br J Cancer*. 2011;105:1533–1541.
  43. Martini M, Testi MG, Pasetto M, et al. IFN-gamma-mediated upmodulation of MHC class I expression activates tumor-specific immune response in a mouse model of prostate cancer. *Vaccine*. 2010;28:3548–3557.
  44. Yu S, Khor TO, Cheung KL, et al. Nrf2 expression is regulated by epigenetic mechanisms in prostate cancer of TRAMP mice. *PLoS One*. 2010;5:e8579.
  45. Yamashita S, Takahashi S, McDonnell N, et al. Methylation silencing of transforming growth factor-beta receptor type II in rat prostate cancers. *Cancer Res*. 2008;68:2112–2121.
  46. Zhao H, Shiina H, Greene KL, et al. CpG methylation at promoter site-140 inactivates TGFbeta2 receptor gene in prostate cancer. *Cancer*. 2005;104:44–52.
  47. Friboulet L, Gourzones C, Tsao SW, et al. Poly(I:C) induces intense expression of c-IAP2 and cooperates with an IAP inhibitor in induction of apoptosis in cancer cells. *BMC Cancer*. 2010;10:327–341.
  48. Paone A, Starace D, Galli R, et al. Toll-like receptor 3 triggers apoptosis of human prostate cancer cells through a PKC-alpha-dependent mechanism. *Carcinogenesis*. 2008;29:1334–1342.

Publikace 2:**BCR-ABL fusion sequences do not induce immune responses in mice when administered in mouse polyomavirus based virus-like particules**

**Autoři:** Veronika Hrušková, Alena Morávková, Katarína Babiarová, Viera Ludvíková, Jan Fric, Vladimír Vonka, Jitka Forstová

**Vydáno v časopise:** International Journal of Oncology 2009; 35(3):1247-1256; IF 2,447

**Cíl práce:** Vývoj vakcíny na bázi partikulí podobných myššímu polyomaviru (MPyV-VLP) pro terapii CML, která exprimuje fragment ze zlomové oblasti fúzního proteinu BCR-ABL.

**Výsledky práce:**

1. Konstrukce chimerických partikulí BCR-ABL VLP. Sekvence o velikosti 171 aminokyselin ze zlomové oblasti BCR-ABL, vložena do MPyV-VLP.
2. Nezjištěna přítomnost IgG, ani IgM protilátek specifických proti BCR-ABL, taktéž žádná aktivita BCR-ABL-specifických CTL, ani přítomnost IFN $\gamma$ + BCR-ABL specifické T-buněčné imunitní odpovědi.
3. Pozorování potvrzují, že zlomová oblast fúzního proteinu BCR-ABL je hodně slabým imunogenem.

**Podíl na práci:** charakterizace připravených vakcín testováním jejich účinnosti na myších; hodnocení vakcínami indukované buněčné imunitní odpovědi; stanovení a vyhodnocení IFN $\gamma$  pozitivní BCR-ABL-specifické T-buněčné imunitní odpovědi testem ELISPOT-IFN $\gamma$ ; podíl na sepisování publikace

# Bcr-Abl fusion sequences do not induce immune responses in mice when administered in mouse polyomavirus based virus-like particles

VERONIKA HRUSKOVÁ<sup>1</sup>, ALENA MORÁVKOVÁ<sup>1</sup>, KATARINA BABIAROVÁ<sup>2</sup>,  
VIERA LUDVÍKOVÁ<sup>2</sup>, JAN FRIC<sup>1</sup>, VLADIMÍR VONKA<sup>2</sup> and JITKA FORSTOVÁ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Science, Charles University in Prague, Vinicná 5, 128 44 Prague 2; <sup>2</sup>Department of Experimental Virology, Institute of Hematology and Blood Transfusion, U Nemocnice 1, 128 20 Prague 2, Czech Republic

Received June 15, 2009; Accepted August 18, 2009

DOI: 10.3892/ijo\_00000441

**Abstract.** Mouse polyomavirus-like particles (MPyV-VLPs) carrying inside a fragment of the Bcr-Abl hybrid protein containing the epitope of chronic myeloid leukemia fusion region were prepared. A sequence encoding 171 amino acids covering Bcr-Abl breakpoint was fused to the C-terminal part of VP3 minor protein connecting it to the VP1 capsomeres. Chimeric particles, the Bcr-Abl VLPs, were tested for their ability to induce Bcr-Abl specific immune response in mice after their intranasal (i.n.) or intraperitoneal (i.p.) administration without any other adjuvants. Bcr-Abl VLPs induced strong anti-VP1 immune response in both i.n. and i.p. immunized mice. As expected, neither IgG nor IgM anti-Bcr-Abl specific antibodies were detected in the sera of immunized animals. Surprisingly, no specific CTL (cytotoxic T-lymphocyte) activity was proved using two different methods (*in vitro* cytotoxicity assay with CFSE-labeled target cells and highly sensitive cytotoxicity assay using MHC class I Bcr-Abl specific pentamers). In addition, no proliferative response of T-cells of i.n. immunized mice after *in vitro* restimulation with antigen-pulsed bone marrow-derived dendritic cells was observed. Taken together, Bcr-Abl breakpoint epitopes appeared to be weak immunogens and even MPyV-VLPs did not provide sufficient adjuvant ability to support induction of immune responses specific to Bcr-Abl fusion zone epitope.

## Introduction

Chronic myeloid leukemia (CML) is characterized by a reciprocal translocation between chromosomes 9 and 22.

As a consequence of translocation, parts of the *abl* gene become fused with breakpoints of the *bcr* gene. Resulting gene products, Bcr-Abl fusion proteins, contain a new sequence of amino acids in the breakpoint region which is not present in any other known proteins. The most frequent mRNAs contain junctions b2a2 or b3a2 (in the second or third *bcr* exons and in the second *abl* exon) resulting in the expression of fusion protein p210<sup>Bcr-Abl</sup>. The newly produced fusion protein is characterized by abnormally high activity of tyrosine kinase mediated by the SH1 domain of the Abl protein (1). As the junctional sequences of Bcr-Abl are only expressed in leukemic cells, they might be promising tumor specific targets for the immunotherapy. Both human studies *in vitro* or *in vivo* and *in vivo* mouse model studies have demonstrated that leukemia associated antigens such as the peptides derived from breakpoint region of fused Bcr-Abl protein may serve for immunotherapy. Rojas *et al* (2) reported that the administration of peptide vaccines derived from b3a2 gene breakpoint generated T-cell responses in the majority of patients. In a mouse model, chaperon-rich liver cell lysate embedded with MHC restricted Bcr-Abl peptide generated potent immunity against pre-established murine leukemia, in contrast to administration of the Bcr-Abl peptide alone or chaperon-rich liver cell lysate without the peptide (3).

VLPs derived from viruses of different viral families are being intensively studied as inducers of immune responses not only against viral capsid proteins themselves but also as stimulators of immune responses against foreign epitopes carried by chimeric VLPs (4-6). Previously, we developed VLPs derived from mouse polyomavirus (7-9). Polyomaviruses are small non-enveloped viruses with 5.3 kbp circular genome DNA. The icosahedral capsid is formed by 72 pentamers of the major structural protein VP1. The minor capsid proteins, VP2 and VP3, are not exposed on the surface of polyomavirus capsids. Their common C-termini interact with the central cavity of VP1 pentamers, while their N-termini are oriented towards the nucleocore. Neither VP2 nor VP3 is required for VLP formation. VP1 produced in insect or yeast cells is able to self-assemble into VLPs in the cell nuclei. VLPs can be formed *in vitro* from VP1 pentameres produced in *E. coli* (7,10,11). MPyV-VLPs, like native virions, enter

---

Correspondence to: Dr Jitka Forstová, Faculty of Science, Charles University in Prague, Vinicná 5, 128 44 Prague 2, Czech Republic  
E-mail: jitkaf@natur.cuni.cz

**Key words:** mouse polyomavirus VLPs, Bcr-Abl epitope, chronic myeloid leukemia

cells by receptor-mediated endocytosis via VP1 interaction with the ganglioside receptors GD1a or GT1b (12).

MPyV-VLPs are highly immunogenic, enter different types of cells including mouse and human dendritic cells and are able to reach a broad range of mouse tissues after different types of administration (8,13,14). Several studies followed the immune responses evoked by MPyV-VLPs. It was shown that MPyV-VLPs induced both humoral and cellular immune responses and their application protected mice against polyomavirus infection (15,16). Furthermore, exploitation of MPyV-VLPs as carriers of foreign epitopes has been examined. Several types of chimeric VLPs were prepared and used in different immunization protocols (17-19). In some studies, the short epitopes were exposed on the surface of the particle by insertion into the surface loops of the major structural protein VP1.

Previously (13), we studied the model of chimeric MPyV-VLPs containing enhanced green fluorescence protein (EGFP) fused with the C-terminal part of the VP3 minor capsid protein inside the particles (EGFP-VLPs). We showed that the particles entered mouse and human dendritic cells efficiently and were processed by both lysosomes and proteasomes. They induced secretion of interleukin 12 (IL-12) by mouse and human dendritic cells *in vitro*. In the following study (20), we used EGFP-VLPs for immunization of mice. Splenocytes of immunized mice (restimulated *in vitro* with EGFP pulsed bone marrow derived dendritic cells) exhibited remarkable T-cell proliferative response specific for EGFP and secreted IL-2 and interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ). We observed that splenocytes from mice immunized by EGFP-VLPs exhibited stronger T-cell proliferation response than splenocytes from mice immunized by EGFP administered with Freund's adjuvant.

In this study, we were interested whether virus-like particles derived from mouse polyomavirus carrying Bcr-Abl fusion sequences would be able to promote induction of Bcr-Abl specific immune response in mice after their intranasal or intraperitoneal administration.

## Materials and methods

**Plasmid construction and generation of recombinant baculoviruses.** Sequences of human fusion protein p210<sup>bcr-abl</sup> were obtained from pGD210 plasmid (21). Recombinant baculovirus was prepared for production of chimeric MPyV-based VLPs, carrying epitope covering b3a2 breakpoint of Bcr-Abl fusion protein. For preparation of Bcr-Abl VLPs, the plasmid (pFastBacDual-VP1/tVP3), carrying the MPyV genes for the major structural protein, VP1, and the truncated minor structural protein VP3 (tVP3) under the polyhedrin promoter and p10 promoter respectively was kindly provided by M. Marek (unpublished data). Sequence of p210<sup>bcr-abl</sup>, 171 amino acids long (aa810-aa981), covering newly created lysine 928 of b3a2 breakpoint was amplified by PCR. PCR primers were designed to introduce sequences of FLAG epitope upstream of Bcr-Abl sequences for easy detection of inserted amino acids. The PCR fragment was inserted into pFastBacDual-VP1/tVP3 to generate the plasmid pFastBacDual-VP1/Bcr-Abl<sub>171</sub>-tVP3, where FLAG-Bcr-Abl sequences were connected in frame with 5-end of tVP3 sequences. The donor

plasmid pFastBacDual-VP1/Bcr-Abl<sub>171</sub>-tVP3 was then used for preparation of recombinant baculovirus, according to Invitrogen instructions (22) and O'Reilly *et al.* (23).

**Cell cultures.** *Spodoptera frugiperda* (Sf9) cells were grown as monolayer cultures at 27°C in TNM-FH medium (Sigma) containing 10% fetal calf serum (FCS, Gibco) as described by Hink (24). Swiss albino mouse fibroblasts 3T6 were grown at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma) supplemented with 4 mM L-glutamine (Gibco) and 10% FCS.

**Antibodies.** The following antibodies were used for immunostaining and as a positive control for detection of antibodies by ELISA: anti-MPyV VP1 mouse monoclonal antibody (7), rabbit polyclonal antibody against the epitope created by the fusion of Bcr and Abl proteins (25), mouse monoclonal anti-Flag antibody (Sigma), mouse monoclonal anti-MPyV VP2/3 antibody (7). Secondary antibodies: Alexa Fluor-488 (green) goat anti-mouse antibody (Molecular Probes) for immunofluorescence staining, goat anti-rabbit IgG antibody conjugated with 10 nm gold particles for immunoelectron microscopy (British Biocell Int.), goat anti-mouse IgG horseradish peroxidase-conjugated antibody (Bio-Rad) or goat anti-mouse IgM horseradish peroxidase-conjugated antibody (Sigma) for detection of specific antibodies in the sera of mice by ELISA and for Western blot analysis. Rat anti-mouse CD19 antibody conjugated with PE-Cy5 (ProImmune, Oxford, UK), rat anti-mouse CD8 antibody conjugated with FITC (ProImmune, Oxford, UK), mouse anti-mouse MHCII antibody conjugated with FITC (Serotec, Kidlington, UK) and rat anti-mouse CD86 antibody conjugated with R-PE (Molecular Probes) were used for flow cytometric analysis.

**Synthetic peptides and MHC class I pentamers.** The peptide covering Bcr-Abl fusion region GFKQSSKAL (9-mer Bcr-Abl peptide), the control HYLSTQSAL peptide (referred as irrelevant peptide), both used for pulsing of dendritic cells, and longer Bcr-Abl peptide (18-mer Bcr-Abl peptide) HSAT GFKQSSKALQRPVA used for control mice immunization were synthesized by Clonstar Peptide Services (Prague, Czech Republic). R-PE labeled murine H2-Kd/GFKQSSKAL MHC class I pentamers were synthesized by ProImmune (Oxford, UK).

**Preparation of virus-like particles.** Insect cells Sf9 were infected (10 PFU per cell) with recombinant baculovirus carrying the genes for production of VP1 and Bcr-Abl<sub>171</sub>-tVP3 or with baculovirus for production of VP1 only. Cells were harvested 72 h post infection, lysed and virus-like particles were purified by CsCl and sucrose gradients as described previously (7). The quality of preparation was examined by SDS-PAGE, Western blotting and by electron microscopy. The amounts of VP1 were determined by Bradford method.

**SDS-PAGE and Western blot analysis.** Purified chimeric VLPs boiled for 5 min in Laemmli loading buffer were separated on 10% SDS-polyacrylamide gels. Proteins were stained with Coomassie brilliant blue to estimate an average number of



Bcr-Abl<sub>171</sub>-tVP3 molecules incorporated into each VLP and densities of VP1 and Bcr-Abl<sub>171</sub>-tVP3 bands were measured. For Western blot analysis, proteins were electro-transferred onto a nitrocellulose membrane (Sigma). The membranes were incubated in 5% fat-free milk in PBS for 1 h. Subsequent immunostaining with primary and secondary antibodies was carried out by incubation for 1 h and 30 min respectively, with intensive washing with PBS after both incubations. Proteins were exposed to X-ray film using chemiluminescence detection system (ECL, Amersham).

**Electron and immunoelectron microscopy.** For morphology analysis, VLPs were adsorbed on carbon-coated parlodion membrane of electron microscopy (EM) grids and activated with glow discharge. Grids were then washed in redistilled H<sub>2</sub>O and contrasted on a drop of phosphowolframic acid. For immunoelectron microscopy analysis, grids with adsorbed VLPs were incubated with a drop of primary antibody, washed in PBS and exposed to colloidal gold-conjugated secondary antibody. Grids were washed in redistilled H<sub>2</sub>O and finally contrasted by phosphowolframic acid. For detection of Bcr-Abl epitopes, the VLPs were disassembled into pentamers by treatment with 10 mM DTT (Roche) prior to adsorption to uncover epitopes for anti-Bcr-Abl antibody.

**Immunofluorescence staining.** Cells growing in a 24-well dish on cover slips were transferred on ice and pseudo-infected with VLPs (10<sup>4</sup> VLPs per cell). After 30-min adsorption of VLPs on the cell surface (at 0°C), cells were either fixed immediately or supplied with 0.5 ml of warmed (37°C) DMEM with 10% FCS, incubated for 1 h at 37°C and then fixed. Fixing (after rinsing cells with PBS) was performed with 3% paraformaldehyde in PBS for 15 min. Cells were further permeabilized using 0.5% Triton X-100 (Sigma) in PBS for 5 min. Fixed cells were saturated by 0.25% bovine serum albumin (BSA; Sigma) and 0.25% gelatin (Sigma) in PBS. Immunostaining with primary and secondary antibodies was carried out by incubation for 1 h and 30 min respectively, followed by washing with PBS after each incubations.

**Mice.** Female mice (BALB/c) at the age of 7-10 weeks were used in the experiments. The experiments were approved by the local Animal Ethics Committee.

**Immunizations.** Mice were divided into groups and immunized intranasally with two doses or intraperitoneally with four doses of chimeric (or wild-type, composed of VP1 only) VLPs in two week intervals. Some groups of animals were immunized with Bcr-Abl peptide (18-mer) twice, first in CFA (complete Freund's adjuvant) second in incomplete Freund's adjuvant. The amount of protein used for immunization was 50 µg/dose/mouse. Twelve to 14 days after the last immunization, animals were bled by tail snipping under total anesthesia with Narcotan and then sacrificed. Spleens were removed and analyzed.

**Bone marrow-derived dendritic cell generation.** To generate mouse bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs), bone marrow was flushed from femurs and tibias of BALB/c mice.

Cells (1x10<sup>6</sup> cells/ml) were plated for 5 days in RPMI-1640 medium (Sigma) containing 10% fetal calf serum (Sigma), antibiotics (100 U/ml of penicillin, 100 mg/ml of streptomycin), 10 mM HEPES buffer and 5x10<sup>-5</sup> M 2-β mercaptoethanol (CM, complete medium), and 5% culture supernatant from a cell line transfected with the murine GM-CSF gene (26) was used as a source of GM-CSF equal to 100 U/ml rmGM-CSF. Every second day, the cultures were fed by half volume of the medium with addition of fresh CM with GM-CSF.

**Pulsing of BMDCs with VLPs or Bcr-Abl peptides.** Five days old BMDCs were seeded in 24-well plate at the concentration of 1x10<sup>6</sup> cells/well in RPMI medium without FCS. VLPs composed of VP1 only (5 µg/well) or 18-mer or 9-mer Bcr-Abl peptide or irrelevant peptide (10 µg/well) were added to the cultures and incubated at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator. After 1 h, CM was added to the cells and incubation continued for another 4-20 h. Control (unpulsed) DCs and pulsed dendritic cells (pDCs) were used as stimulatory cells. To control the BMDC activation state, the presence of surface markers CD86 and MHC II was analyzed by flow cytometry. BMDCs pulsed by lipopolysaccharide (LPS) and untreated BMDCs served as controls.

**Cell proliferation analysis.** Single-cell suspensions from the spleens of BALB/c mice were prepared in CM. Effector cells (1.5x10<sup>6</sup>) were labeled with 2 µM carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE, Molecular Probes) and cultivated with pulsed or unpulsed DCs (3x10<sup>5</sup>) in 48-well plate for 4 days. Proliferation of T cells was evaluated by gradual CFSE dilution in dividing T cells by flow cytometry.

**ELISPOT assay.** Spleens from mice immunized with Bcr-Abl VLPs or VLPs composed of VP1 only (wt VLPs) or with PBS were homogenized 12 days after the last immunization and lymphocytes were separated as described (27). Pooled splenocytes were cultivated *in vitro* in the presence of 0.01 µg of 9-mer Bcr-Abl peptide or 18-mer Bcr-Abl peptide. After 5 days, the response of IFNγ-producing cells was detected by ELISPOT as described previously (27). The spots were evaluated by the Eli.Scan ELISPOT Scanner (A.EL.VIS, Hannover, Germany).

**Cytotoxicity assay using target cells labeled with two different CFSE intensities.** Spleen cells from immunized mice were restimulated *in vitro* by 4-day incubation with DCs pulsed with VLPs or Bcr-Abl peptide and used as effector cells for *in vitro* cytotoxicity assay. VLP and Bcr-Abl peptide pulsed DCs were labeled with 0.6 µM CFSE for 5 min (high intensity) and DCs pulsed with irrelevant peptide were labeled with 0.04 µM CFSE for 3 min (low intensity). Both fractions were adjusted to a similar concentration, mixed at ratios 1:1 and used as target cells. Effector cells were mixed with target cells at ratios 100:1, 50:1, 25:1 and incubated in CM in 96-U-well plate at 37°C in a CO<sub>2</sub> incubator overnight. The decrease of high CFSE labeled target cells was determined by flow cytometry analysis.

**Cytotoxicity assay using MHC class I Bcr-Abl specific pentamers.** The assay was performed according to Handbook

of Proimmune company. Single spleen cell suspensions from immunized and control mice were prepared. Splenocytes were depleted from red blood cells by 15-min incubation with fresh ammonium chloride lysing solution (0.15 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1 mM  $\text{KHCO}_3$ , 0.1 mM EDTA in distilled water) in the dark, at room temperature, washed with PBS and resuspended in wash buffer (0.1% BSA in PBS). Splenocytes ( $2 \times 10^6$ ) were washed with ice-cold wash buffer and resuspended in the residual volume ( $\sim 50 \mu\text{l}$ ). Samples were incubated with 10  $\mu\text{l}$  of labeled pentamers for 10 min at room temperature shielded from light. Splenocytes were washed with 2 ml of ice-cold wash buffer and resuspended in the residual volume. Anti-CD8 and anti-CD19 antibodies were added and the samples were incubated on ice for 20 min in dark. Cells were washed twice with ice cold wash buffer, resuspended in residual volume and analyzed by flow cytometry.

*Detection of specific VP1 and Bcr-Abl antibodies.* Maxisorp 96-well plates were coated overnight at 4°C with either 5  $\mu\text{g}$  VLPs or 18-mer Bcr-Abl synthetic peptide in 100  $\mu\text{l}$  of PBS per well. Wells were washed with PBS/Tween-20 (0.1%) and saturated with 200  $\mu\text{l}$  of 2% milk powder in PBS. After 2-h incubation at room temperature, the blocking solution was removed and wells were overlaid with 100  $\mu\text{l}$  of decreasing dilutions of sera from control or immunized mice and incubated for 1 h at room temperature. Anti-PyV-VP1 mouse monoclonal antibody or anti-Bcr-Abl rabbit polyclonal serum was used as positive control. Wells were washed 4-times with PBS/Tween-20 (0.1%) and secondary antibodies conjugated with horseradish peroxidase were added. After 1-h incubation at room temperature, wells were washed with PBS/Tween-20 (0.1%) and overlaid with 100  $\mu\text{l}$  of substrate solution (ABTS, Sigma). The absorbance of each well was determined at 415 nm.

## Results

*Preparation and characterisation of chimeric MPyV VLPs carrying epitope of Bcr-Abl fusion protein.* Bcr-Abl VLPs carrying 171 amino acids covering the breakpoint region of the human Bcr-Abl protein (together with FLAG sequence) were prepared. FLAG-Bcr-Abl sequences were fused to the C-terminal part of MPyV minor capsid protein, VP3, which is responsible for its interaction with the central cavity of the pentamers formed by the major structural protein, VP1. The particles were produced in insect cells by expression of the fused FLAG-Bcr-Abl-tVP3 sequences and wild-type VP1 gene from a recombinant baculovirus. Schema of the particle structure is shown in Fig. 1A. The ability of the proteins to assemble into VLPs was determined by electron microscopy. The incorporation of the fused polypeptide into the capsids influenced their morphology as shown by negative staining of isolated particles (Fig. 1C). Chimeric VLPs were larger and more irregular in comparison with the wtVLPs composed of VP1 only, but their stability was not substantially affected. The presence of foreign epitopes fused with tVP3 in purified particles was proved by SDS-PAGE (Fig. 1Ba), Western blotting using anti-FLAG antibody, anti-VP2/3 antibody (Fig. 1Bb, c) and immunoelectron microscopy using anti-Bcr-Abl polyclonal serum (Fig. 1D). As the epitopes were

hidden inside the particles, they could be stained by immunoelectron microscopy only after their disassembly under the reducing conditions.

To estimate an average number of Bcr-Abl<sub>171</sub>-tVP3 molecules incorporated into each VLP, we measured densities of VP1 and Bcr-Abl<sub>171</sub>-tVP3 bands of purified VLPs separated on SDS-PAGE and stained with Coomassie brilliant blue. Theoretically, maximum 72 pentameres of VP1 are available for t-VP3 interactions in one virus particle. The number of Bcr-Abl<sub>171</sub>-tVP3 per particle estimated from densities and molecular weights of both proteins was 11.4.

The ability of isolated VLPs to adsorb on the cell surface and to be internalized by cells was proved by confocal microscopy of cells fixed and stained with anti-VP1 antibody after adsorption of VLPs on their surface at 0°C or after adsorption and 1-h incubation at 37°C. Morphological changes caused by incorporation of epitopes had no effect on the Bcr-Abl VLP assembly and stability and VLPs adsorbed to and entered cells efficiently as shown in Fig. 2.

*Both intranasal and intraperitoneal immunization by chimeric VLPs induced high titres of anti-VP1 antibodies but no anti-Bcr-Abl antibodies.* Mice immunized as described in Materials and methods were bled on day 14 after the last immunization and the presence of specific anti-VP1 and anti-Bcr-Abl antibodies was determined by ELISA. In agreement with our previous results (20), high titers of specific IgG anti-VP1 antibodies were detected in all immunized mice (Fig. 3A). In addition, when mice were immunized intraperitoneally with four doses of VLPs, the titers of specific anti-VP1 antibodies were much higher than those of mice after twice intranasal administration (Fig. 3A, black triangles). However, no specific anti-Bcr-Abl IgG antibodies were developed in the sera of either intranasally or intraperitoneally immunized mice (Fig. 3B). Moreover, no specific anti-Bcr-Abl IgM antibodies were detected by ELISA as shown in Fig. 3C. Finally, synthetic Bcr-Abl peptide (18-mer) was administered intraperitoneally in CFA into mice. Neither specific anti-Bcr-Abl IgG nor IgM antibodies in the sera of immunized mice were detected (data not shown).

*No activation of BMDCs by 18-mer and 9-mer Bcr-Abl peptides was detected.* To investigate the ability of Bcr-Abl VLPs or 18-mer or 9-mer Bcr-Abl peptides to activate dendritic cells, the expression of CD86 and MHC II on pulsed DCs was analyzed. After 20 h, cells were harvested and stained for CD86 and MHC class II and analyzed by flow cytometry. Increased expression of CD86 and MHC class II was observed when BMDCs were stimulated with Bcr-Abl VLPs. The level of expression of MHC II was higher than that induced by LPS (Fig. 4B). This result was expected and corresponds to our previous observation of high immunogenicity of MPyV wtVLPs (20). However, no increased expression of either CD86 or MHC II was observed on DCs pulsed with 18-mer or 9-mer Bcr-Abl peptides (Fig. 4).

*VLP-pulsed DCs, but not Bcr-Abl peptide-pulsed DCs stimulated antigen specific proliferation of splenocytes derived from mice immunized by Bcr-Abl-VLPs.* In the first experiments, mice were immunized intranasally by chimeric

### Mouse polyomavirus Bcr-Abl-VLPs

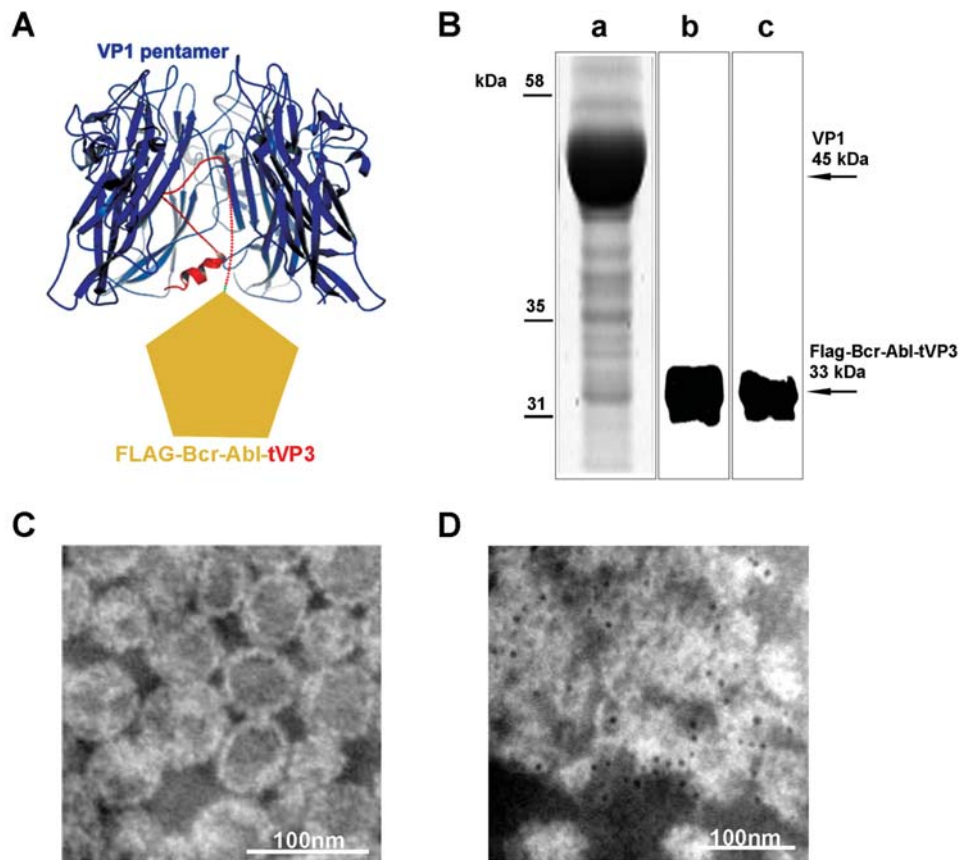


Figure 1. Structure and architecture of the analysed MPy VLPs carrying epitope of Bcr-Abl fusion protein. (A) View-through the pentamer composed of 5 molecules of VP1 protein (blue). C-terminal part of minor structural protein VP3 (red) interacts with central cavity of VP1 pentamer and is fused with Flag-Bcr-Abl epitope (illustrated as yellow pentagon). (Ba) Purified Bcr-Abl-VLPs separated on SDS-PAGE gel stained with Coomassie brilliant blue and (Bb and c) Western blotting of Bcr-Abl-VLPs using (b) mouse monoclonal anti-Flag antibody and (c) mouse monoclonal anti-VP2/3 antibody followed by goat anti-mouse IgG antibody conjugated with horse-radish peroxidase. (C) Electron microscopy and (D) immunoelectron microscopy with anti-Bcr-Abl rabbit polyclonal serum followed by goat anti-rabbit IgG antibody conjugated with 10 nm colloidal gold.

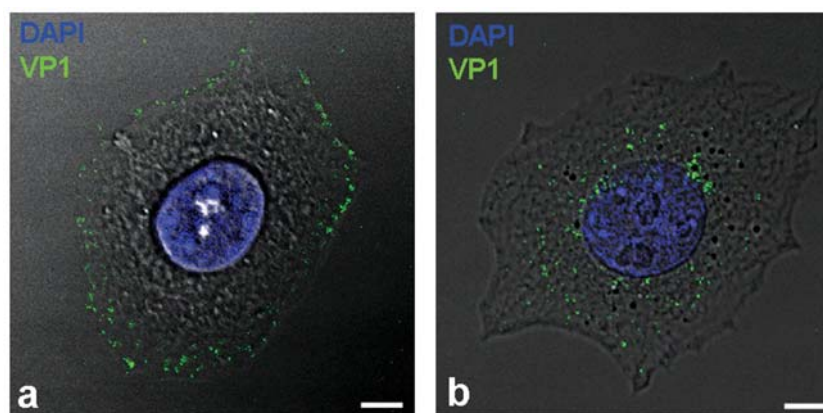


Figure 2. Adsorption (a) and following internalization (b) of Bcr-Abl-VLPs to the cells, sections from confocal microscope. Bcr-Abl-VLPs were adsorbed on the membrane of mouse fibroblasts 3T6 and fixed 0 min or 1 h post-adsorption. The signal of VP1 protein (green) was visualised using anti-PyV VP1 mouse monoclonal antibody followed by Alexa Fluor-488 goat anti-mouse secondary antibody and examined by confocal microscope.

VLPs. Fourteen days after the second immunization, spleens from immunized and control mice were removed and single cell suspensions were used to study T cell-specific proliferative response. CFSE labeled spleen cells were stimulated for 4 days

with three different types of BMDCs (unpulsed or pulsed with VLPs or pulsed with 9-mer Bcr-Abl peptide). The proliferative response (corresponded to CFSE diminution) was determined by flow cytometry. Fig. 5 shows VP1 specific proliferation of



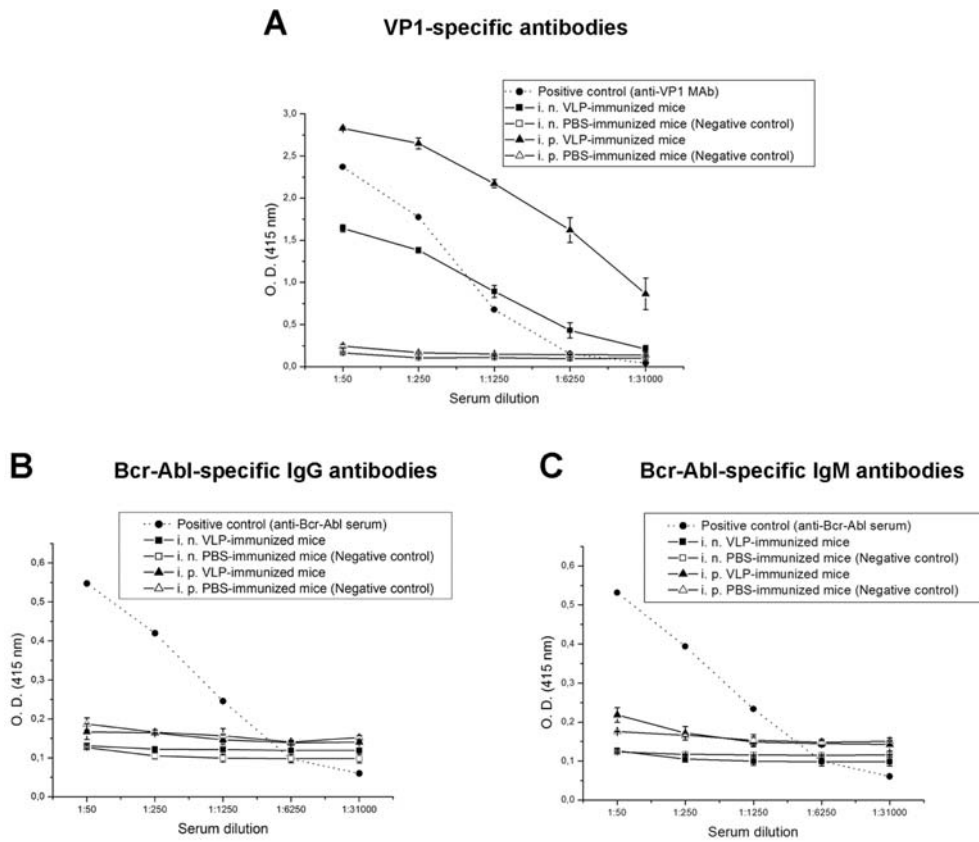


Figure 3. Specific anti-VP1 and anti-Bcr-Abl antibodies detected in the sera of control and immunized mice. (A) Anti-VP1 IgG antibodies in sera from intranasally (i.n.) and intraperitoneally (i.p.) PBS- (negative control) or Bcr-Abl-VLP-immunized mice. Anti-VP1 mouse monoclonal antibody served as positive control. (B) IgG and (C) IgM anti-Bcr-Abl antibodies in sera from intranasally (i.n.) and intraperitoneally (i.p.) PBS- (negative control) or Bcr-Abl-VLP-immunized mice. Anti-Bcr-Abl rabbit polyclonal serum was used as positive control.

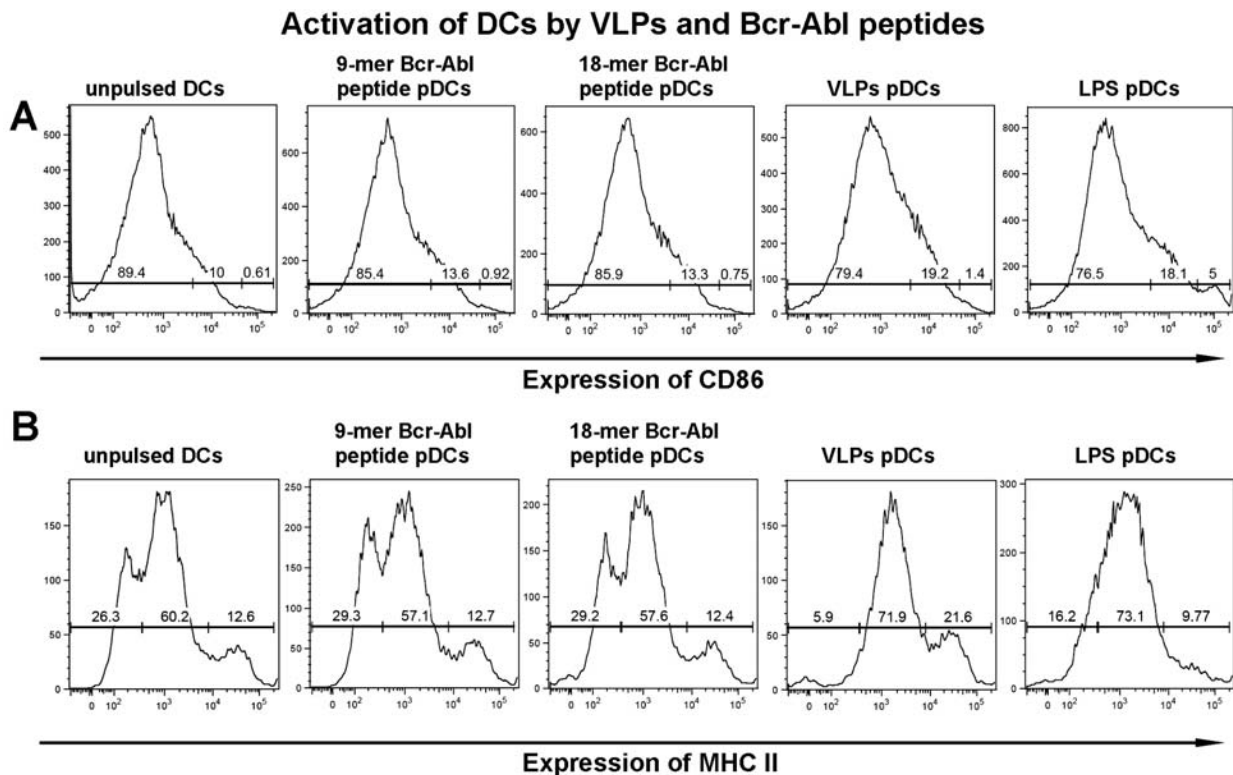


Figure 4. Activation of dendritic cells by Bcr-Abl-VLPs and 18-mer and 9-mer Bcr-Abl peptides. Expression of CD86 (A) and MHC II (B) surface molecules by dendritic cells after pulsing by Bcr-Abl-VLPs, 18-mer or 9-mer Bcr-Abl peptides. Untreated DCs served as negative control and DCs pulsed with LPS was used as positive control.

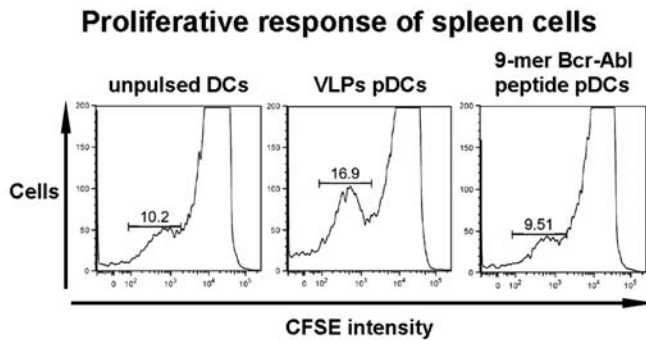


Figure 5. Proliferation of T cells from mice immunized intranasally by Bcr-Abl-VLPs. Spleen cell suspensions from immunized mice were restimulated with untreated DCs or DCs pulsed with Bcr-Abl-VLPs or Bcr-Abl peptide. Specific proliferative response corresponds to CFSE diminution. One representative experiment is shown.

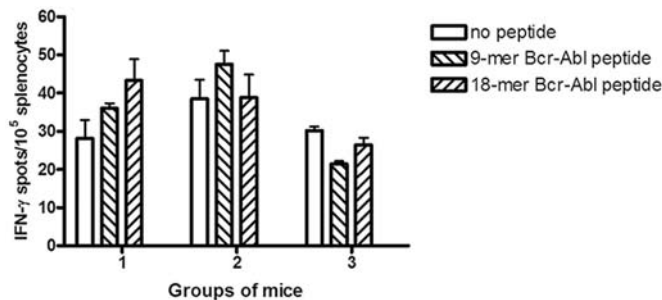


Figure 6. Secretion of  $\text{IFN}\gamma$  by splenocytes restimulated with Bcr-Abl peptides. Three groups of mice (3 animals of each group) were immunized with Bcr-Abl-VLPs (1) or wtVLPs (2) or with PBS (3).  $\text{IFN}\gamma$  production by splenocytes prepared 12 days after the last immunization was measured by ELISPOT.

T cells of mice immunized by Bcr-Abl-VLPs after stimulation of splenocytes with Bcr-Abl-VLP-pulsed DCs. However, no Bcr-Abl specific proliferative response of T cells was observed when spleen cells from immunized mice were incubated with Bcr-Abl peptide pDCs (Fig. 5).

*Bcr-Abl peptides do not induce  $\text{IFN}\gamma$  production in splenocytes derived from mice immunized by Bcr-Abl-VLPs.* While MPyV-VLPs were shown to induce  $\text{IFN}\gamma$  secretion in splenocytes of mice immunized by VLPs (after their restimulation by VLPs) (20), no significant increase of  $\text{IFN}\gamma$  production was detected in splenocytes of mice immunized by Bcr-Abl VLPs restimulated by 18-mer or 9-mer Bcr-Abl peptides (Fig. 6).

*VLPs carrying Bcr-Abl epitope do not induce specific Bcr-Abl cytotoxic activity of T cells.* Simultaneously with the proliferation experiment, the specific cytotoxic activity of T cells using target cells labeled with two different CFSE intensities (described in Materials and methods) was determined. Splenocytes were restimulated with Bcr-Abl peptide pulsed DCs for 4 days prior to cytotoxic assay. No Bcr-Abl specific cytotoxicity of T cells, measured by flow cytometry (as disappearance of DC pulsed with Bcr-Abl peptide) was observed (Fig. 7). For comparison VP1 specific cytotoxic activity was performed with two populations of target dendritic cells (pulsed with irrelevant peptide - low CFSE and pulsed with VP1-VLPs - high CFSE). The decrease of high CFSE labeled target cells was 5% for ratio effectors: targets - 100:1.

In addition, another cytotoxic assay using MHC class I pentamers conjugated with Bcr-Abl restricted peptide was performed. Mice were immunized intranasally or intraperi-

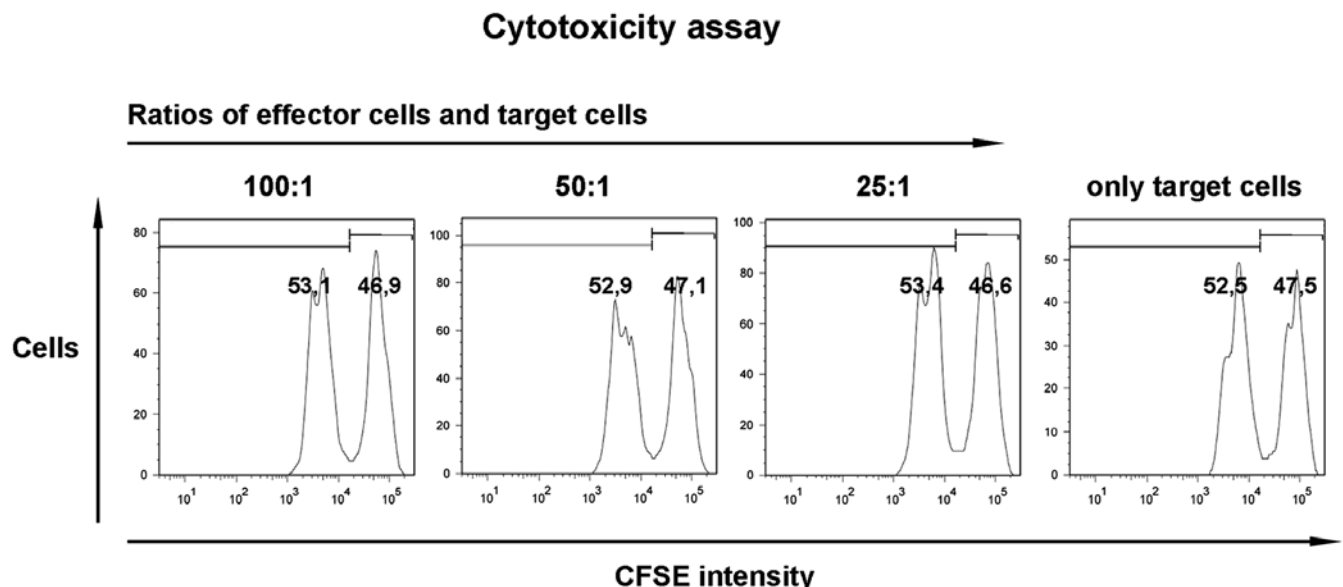


Figure 7. Cytotoxic response of spleen cells from control and intranasally immunized mice. Spleen cells from mice immunized by Bcr-Abl-VLPs were used as effector cells after their previous restimulation *in vitro* by dendritic cells pulsed with Bcr-Abl peptide. DCs pulsed with Bcr-Abl peptide (high CFSE intensity) and irrelevant peptide (low CFSE intensity) were mixed 1:1 and used as target cells with decreasing ratios of effector cells:target cells (100:1, 50:1, 25:1).

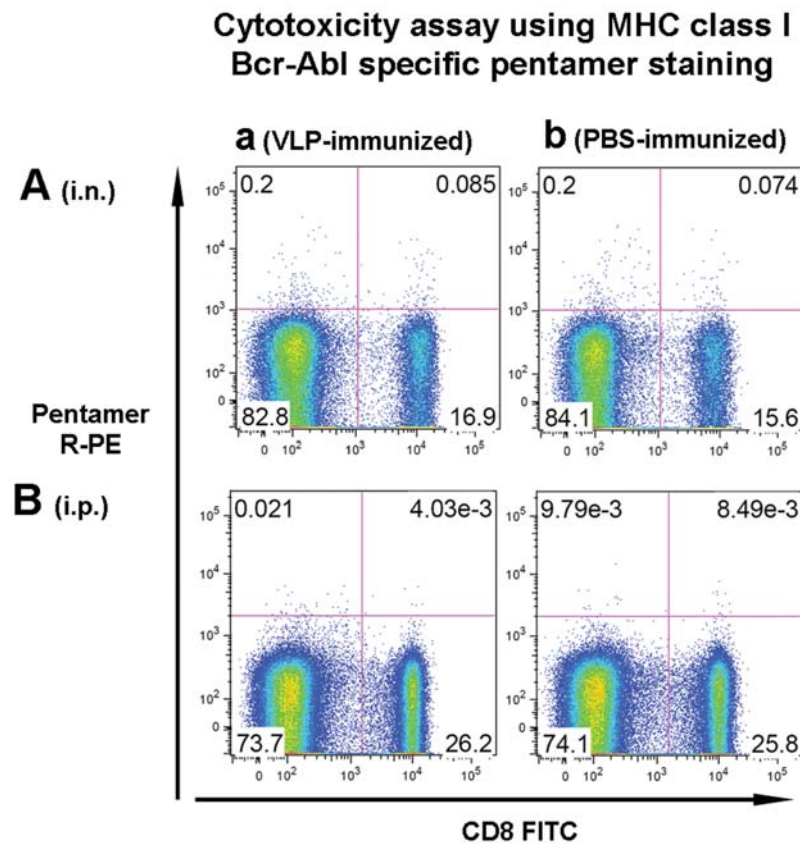


Figure 8. Detection of Bcr-Abl specific cytotoxic T lymphocytes in splenocytes of immunized mice. Mice were immunized intranasally (i.n., A) or intraperitoneally (i.p., B) with Bcr-Abl- VLPs (a). The presence of Bcr-Abl specific T lymphocytes (upper right quadrant of each graph) was determined using MHC class I Bcr-Abl specific pentamer staining. To exclude the background of unspecific binding of labeled pentamer, mice immunized intranasally (Ab) or intraperitoneally (Bb) with PBS were involved in the experiment.

toneally as described in Materials and methods. Two weeks after the last immunization, spleens from immunized and control mice were removed and single-cell suspensions were prepared. Splenocytes were incubated with labeled MHC class I pentamers to determine specific Bcr-Abl cytotoxic T lymphocytes. Simultaneously, cells were stained for CD8 and CD19. Fig. 8 shows that mice immunized by Bcr-Abl VLPs did not develop any specific cytotoxic response after both intranasal (Fig. 8A) and intraperitoneal (Fig. 8B) antigen application.

## Discussion

In this study, we have constructed chimeric VLPs derived from the mouse polyomavirus (MPyV) carrying an epitope of human fusion protein p210<sup>Bcr-Abl</sup> of chronic myeloid leukemia, Bcr-Abl-VLPs. Bcr-Abl fusion protein is intimately associated with malignant transformation as well as maintenance of the malignant phenotype in patients with CML and therefore it might be a potential T cell target. CD4 T cell response against epitopes derived directly from Bcr-Abl joining region was reported in a mouse model. In that study, immunization of mice with 12 amino acid peptides spanning the junction region of b3a2 together with Freund's adjuvant elicited T cell responses (28). Some results of peptide vaccinations of CML patients have demonstrated that b3a2 or b2a2 breakpoint epitopes can activate CD4 T cells (29-31). Inspired

by promising results of these groups, we were interested whether immune responses to the Bcr-Abl joining region can be stimulated when the epitope will be carried inside MPy VLPs. Feasibility of transfer of foreign peptides or proteins by MPy VLPs (anchored inside the particles with common C-terminus sequence of the minor capsid proteins) was proved in our previous studies with model EGFP protein (13,20). Surprisingly, all our present effort to detect a cellular immune response after different types of administrations into mice failed. We have confirmed the incorporation of the Bcr-Abl derived polypeptide carrying the newly formed epitope inside the purified particles by several methods (Fig. 1B and D). Similar to EGFP, 171 amino acid long Bcr-Abl peptide inside the particles changed their morphology. VLPs lost their regular shape (Fig. 1), however, their stability was not substantially influenced and irregular chimeric VLPs were efficiently adsorbed to and internalized by host cells. In our previous report, MPy VLPs carrying entire EGFP instead of Bcr-Abl sequences were shown to be efficiently internalized and processed by dendritic cells (13).

Immuno-electron microscopy of disassembled VLPs proved the presence of Bcr-Abl breakpoint epitope inside VLPs. Theoretically, a possible number of epitope molecules carried by one VLP is 72 (one molecule for one VP1 pentamer). The ratio of intensities of VP1 and Bcr-Abl<sub>171</sub>-tVP3 bands on SDS PAGE suggests that average number of the epitope molecules in one particle is 11-12. Tegerstedt *et al* (17) found

morphology of MPy VLPs carrying 683 amino acid long Her2/neu connected with the entire VP2, the longer one of two minor capsid proteins, not affected. However, the estimated number of Her2/neu molecules per 1 particle was very low (3 molecules per VLP). Surprisingly, these chimeric particles were able to efficiently protect Balb/c mice from outgrowth of the Her2 expressing tumor (17).

As expected, both intranasally and intraperitoneally immunized mice developed high titers of anti-VP1 specific but not anti-Bcr-Abl specific antibodies. Similar findings were obtained with MPy VLPs carrying EGFP in our previous study (20) or the Her2/neu epitope (17). We detected very low presence of neutralizing antibodies against VP1 protein in the sera of intranasally immunized mice (20) suggesting the possibility of repeating administration of chimeric VLPs containing 'hidden' antigen without being neutralized.

We were not able to detect any anti-Bcr-Abl specific antibodies (neither IgG nor IgM) in the sera of mice immunized with Bcr-Abl breakpoint peptide (18-mer) in CFA. However, the same peptide conjugated with blue carrier immunogenic protein (Pierce, Rockford IL, USA) induced specific antibody response in rabbits (25). The rabbit anti-Bcr-Abl polyclonal serum was used for detection of epitope in immunoelectron microscopy and as positive control for ELISA. However, the titer of specific anti-Bcr-Abl antibodies was low (Fig. 3B and C) suggesting low immunogenicity of the applied peptide.

The most important component of immune response in development of anti-cancer vaccine is induction of specific cytotoxic T-cell immunity against a cancer antigen. To ascertain whether Bcr-Abl epitope delivered by MPy VLPs evokes any specific cytotoxic response, we applied two methods: *in vitro* cytotoxicity assay with CFSE-labeled target cells and highly sensitive cytotoxicity assay using MHC class I Bcr-Abl specific pentamers. Both techniques revealed that neither intranasal nor intraperitoneal administration induced cytotoxic activity of T cells. Moreover, in contrast to VLP-pulsed DCs, Bcr-Abl peptide-pulsed DCs did not stimulate antigen specific proliferation of splenocytes derived from mice immunized by Bcr-Abl-VLPs. In contrast, Tegerstedt *et al*, who immunized mice with MPy VLPs carrying Her2/neu antigen inside the particles, proved the presence of anti-Her2/neu specific cytotoxic T-cells in mice after a single vaccination with VLPs (17). Moreover, the induced specific immunity was so high that mice were protected against a lethal dose of Her2-positive D2F2/E2 tumor cell challenge. They did not observe anti-Her2/neu positive cytotoxic activity after immunization of mice with Her2/neu protein (17). Also in our previous study (20), intranasal delivery of EGFP by MPy VLPs induced a stronger CD4<sup>+</sup> T-cell response than administration of rEGFP alone.

Surprisingly, in therapeutically successful experiment of Tegerstedt *et al* (17), *in vitro* upregulation of DC maturation markers was not observed. However, we did observe upregulation of DC co-stimulatory molecules or other maturation markers (CD 86, MHCII) by Bcr-Abl VLPs *in vitro*. Also, in our previous experiments (13,20), EGFP-VLPs induced production of IL-12 by DCs *in vitro* and spleen cells from EGFP-VLP immunized mice produced IL-2 and IFN $\gamma$  after treatment with DCs pulsed by EGFP-VLPs. Nevertheless, neither 18-mer nor restricted 9-mer Bcr-Abl breakpoint peptide

activated DCs *in vitro*. They did not stimulate production of IFN $\gamma$  in splenocytes from Bcr-Abl VLP-immunized mice. All these data suggest that Bcr-Abl breakpoint peptides, as well as longer portion of Bcr-Abl sequences carried by VLPs, are weak immunogens.

Recently, several groups have been working on the development of vaccine against chronic myeloid leukemia. In approximately 75% of cases the investigators failed to elicit *in vitro* sizable CTL responses to Bcr-Abl epitopes in healthy donors as well as in patients with CML and found that Bcr-Abl protein is apparently not an immunodominant antigen in CML (32,33). Study of Abu-Eisha *et al* (34) showed that most normal subjects and CML patients developed no proliferative responses to the 23-mer b3a2 fusion peptide. Moreover, no improvement was obtained by using mature autologous dendritic cells to present the peptide. Intracellular IFN $\gamma$  production by CD4<sup>+</sup> T-cells was also not induced by the 23-mer b3a2 peptide (34).

On the other hand, with mouse model, the research group of Katsanis (3,35,36) were able to induce Bcr-Abl specific cytotoxic activity *in vivo* by vaccination of mice with 12B1 tumor-derived chaperone-rich cell lysate (CRCL) (35) or by dendritic cells loaded with CRCL (36), or by liver CRCL (not leukemia derived) embedded with exogenous MHC class I restricted Bcr-Abl peptide. In contrast to the CRCL vaccine, when MHC class I restricted Bcr-Abl peptide was administered to mice alone, survival was similar to those of negative control (PBS-immunized or liver CRCL Bcr-Abl peptide-free-immunized) (3). In our hands, no protection of mice immunized with Bcr-Abl-VLPs was detected when mice were challenged, each with 3x10<sup>3</sup> 12B1 murine leukemia cells (37), 12 days after immunization (not shown).

In conclusion, although MPy VLPs proved to be strong inducers of immune responses in several experiments (17,20) their unique adjuvant ability failed to support immune response against carried unique Bcr-Abl epitope. Recently, hypothesis appeared that not Bcr-Abl itself but genes that are up-regulated by the Bcr-Abl kinase activity may represent the crucial antigens for the induction of a cytotoxic T-cell response against CML cells (33,38). Scheich *et al* (38) demonstrated that the constitutively active kinase domain of Bcr-Abl has a key role in enhancing the immunogenicity of Bcr-Abl cells as the HLA class I-restricted T-cell responses were dominated by Bcr-Abl-regulated antigens, and not by Bcr-Abl itself. This hypothesis and results indicate new approaches in development of therapeutic vaccines in CML therapy.

#### Acknowledgements

We are grateful to Martin Marek for plasmid pFastBacDual-VP1/tVP3 construction and to Michal Smahel for providing the pGD210 plasmid. We also thank Vincent Lucansky for selection of highly immunogenic epitopes within the amino acid sequence of Bcr-Abl fusion protein and Vojtech Zila and Jitka Stokrova for electron microscopy. This work was supported by projects MSM0021620858, LC545 and 1M0508 from the Ministry of Education, Youth, and Sport of the Czech Republic and by MZ0 UHKT 2005 and by IGA, NC 6957-3 of Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic.



## References

- Pendergast AM, Muller AJ, Havlik MH, Maru Y and Witte ON: BCR sequences essential for transformation by the BCR-ABL oncogene bind to the ABL SH2 regulatory domain in a non-phosphotyrosine-dependent manner. *Cell* 66: 161-171, 1991.
- Rojas JM, Knight K, Wang L and Clark RE: Clinical evaluation of BCR-ABL peptide immunisation in chronic myeloid leukaemia: results of the EPIC study. *Leukemia* 21: 2287-2295, 2007.
- Kislin KL, Marron MT, Li G, Graner MW and Katsanis E: Chaperone-rich cell lysate embedded with BCR-ABL peptide demonstrates enhanced anti-tumor activity against a murine BCR-ABL positive leukemia. *FASEB J* 21: 2173-2184, 2008.
- Bertolotti-Ciarlet A, Ciarlet M, Crawford SE, Conner ME and Estes MK: Immunogenicity and protective efficacy of rotavirus 2/6-virus-like particles produced by a dual baculovirus expression vector and administered intramuscularly, intranasally, or orally to mice. *Vaccine* 21: 3885-3900, 2003.
- Casal JI: Use of parvovirus-like particles for vaccination and induction of multiple immune responses. *Biotechnol Appl Biochem* 29: 141-150, 1999.
- Pan Q, He K and Huang K: Development of recombinant porcine parvovirus-like particles as an antigen carrier formed by the hybrid VP2 protein carrying immunoreactive epitope of porcine circovirus type 2. *Vaccine* 26: 2119-2126, 2008.
- Forstová J, Krauzewicz N, Wallace S, Street AJ, Dilworth SM, Beard S and Griffin BE: Cooperation of structural proteins during late events in the life cycle of polyomavirus. *J Virol* 67: 1405-1413, 1993.
- Forstová J, Krauzewicz N, Sandig V, Elliott J, Palková Z, Strauss M and Griffin BE: Polyoma virus pseudocapsids as efficient carriers of heterologous DNA into mammalian cells. *Hum Gene Ther* 6: 297-306, 1995.
- Soeda E, Krauzewicz N, Cox C, Stokrová J, Forstová J and Griffin BE: Enhancement by polylysine of transient, but not stable, expression of genes carried into cells by polyoma VP1 pseudocapsids. *Gene Ther* 5: 1410-1419, 1998.
- Montross L, Watkins S, Moreland RB, Mamon H, Caspar DL and Garcea RL: Nuclear assembly of polyomavirus capsids in insect cells expressing the major capsid protein VP1. *J Virol* 65: 4991-4998, 1991.
- Salunke DM, Caspar DL and Garcea RL: Self-assembly of purified polyomavirus capsid protein VP1. *Cell* 46: 895-904, 1986.
- Tsai B, Gilbert JM, Stehle T, Lencer W, Benjamin TL and Rapoport TA: Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40. *EMBO J* 22: 4346-4355, 2003.
- Boura E, Liebl D, Spísek R, Fric J, Marek M, Stokrová J, Holán V and Forstová J: Polyomavirus EGFP-pseudocapsids: analysis of model particles for introduction of proteins and peptides into mammalian cells. *FEBS Lett* 579: 6549-6558, 2004.
- Krauzewicz N, Cox C, Soeda E, Clark B, Rayner S and Griffin BE: Sustained *ex vivo* and *in vivo* transfer of a reporter gene using polyoma virus pseudocapsids. *Gene Ther* 7: 1094-1102, 2000.
- Heidari S, Vlastos A, Ramqvist T, Clark B, Griffin BE, Garcia MI, Perez M, Amati P and Dalianis T: Immunization of T-cell deficient mice against polyomavirus infection using viral pseudocapsids or temperature sensitive mutants. *Vaccine* 20: 1571-1578, 2002.
- Caparrós-Wanderley W, Clark B and Griffin BE: Effect of dose and long-term storage on the immunogenicity of murine polyomavirus VP1 virus-like particles. *Vaccine* 22: 352-361, 2004.
- Tegerstedt K, Lindencrona JA, Curcio C, Andreasson K, Tullus C, Forni G, Dalianis T, Kiessling R and Ramqvist T: A single vaccination with polyomavirus VP1/VP2Her2 virus-like particles prevents outgrowth of HER-2/neu-expressing tumors. *Cancer Res* 65: 5953-5957, 2005.
- Neugebauer M, Walders B, Brinkman M, Ruehland C, Schumacher T, Bertling WM, Geuther E, Reiser CO, Reichel C, Strich S and Hess J: Development of a vaccine marker technology: display of B cell epitopes on the surface of recombinant polyomavirus-like pentamers and capsoids induces peptide-specific antibodies in piglets after vaccination. *Biotechnol J* 1: 1435-1446, 2006.
- Skrastina D, Bulavaite A, Sominskaya I, Kovalevska L, Ose V, Priede D, Pumpens P and Sasnauskas K: High immunogenicity of a hydrophilic component of the hepatitis B virus preS1 sequence exposed on the surface of three virus-like particle carriers. *Vaccine* 26: 1972-1981, 2008.
- Fric J, Marek M, Hrusková V, Holán V and Forstová J: Cellular and humoral immune responses to chimeric EGFP-pseudocapsids derived from the mouse polyomavirus after their intranasal administration. *Vaccine* 26: 3242-3251, 2008.
- Daley GQ, van Etten RA and Baltimore D: Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science* 247: 824-830, 1990.
- Invitrogen: Bac/to/Bac Baculovirus Expression System, 2004.
- O'Reilly DR, Miller LK and Luckow VA: *Baculovirus Expression Vectors. A Laboratory Manual*, W.H. Freeman and Co., New York, NY, 1992.
- Hink WF: Established insect cell line from the cabbage looper, *trichoplusia ni*. *Nature* 226: 466-467, 1970.
- Ludvíková V, Hamsíková E, Sobotková E, Lucansky V, Smahel M and Vonka V: Use of polyclonal rabbit antibodies for detection of the bcr-abl fusion zone in cells transfected with experimental bcr-abl DNA vaccines. *Int J Oncol* 27: 265-274, 2005.
- Zal T, Volkmann A and Stockinger B: Mechanisms of tolerance induction in major histocompatibility complex class II-restricted T cells specific for a blood-borne self-antigen. *J Exp Med* 180: 2089-2099, 1994.
- Mackova J, Kutinova L, Hainz P, Krystofova J, Sroller V, Otahal P, Gabriel P and Nemeckova S: Adjuvant effect of dendritic cells transduced with recombinant vaccinia virus expressing HPV16-E7 is inhibited by co-expression of IL12. *Int J Oncol* 24: 1581-1588, 2004.
- Chen W, Peace DJ, Rovira DK, You SG and Cheever MA: T-cell immunity to the joining region of p210BCR-ABL protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 1468-1472, 1992.
- Pinilla-Ibarz J, Cathcart K, Korontsvit T, Soignet S, Bocchia M, Caggiano J, Lai L, Jimenez J, Koltitz J and Scheinberg DA: Vaccination of patients with chronic myelogenous leukemia with bcr-abl oncogene breakpoint fusion peptides generates specific immune responses. *Blood* 95: 1781-1787, 2000.
- Cathcart K, Pinilla-Ibarz J, Korontsvit T, Schwartz J, Zakhaleva V, Papadopoulos EB and Scheinberg DA: A multi-valent bcr-abl fusion peptide vaccination trial in patients with chronic myeloid leukemia. *Blood* 103: 1037-1042, 2004.
- Maslak PG, Dao T, Gomez M, Chanel S, Packin J, Korontsvit T, Zakhaleva V, Pinilla-Ibarz J, Berman E and Scheinberg DA: A pilot vaccination trial of synthetic analog peptides derived from the BCR-ABL breakpoints in CML patients with minimal disease. *Leukemia* 22: 1613-1616, 2008.
- Yotnda P, Firat H, Garcia-Pons F, Garcia Z, Gourru G, Vernant JP, Lemonnier FA, Leblond V and Langlade-Demoyen PJ: Cytotoxic T cell response against the chimeric p210 BCR-ABL protein in patients with chronic myelogenous leukemia. *Clin Invest* 101: 2290-2296, 1998.
- Grünebach F, Mirakaj V, Mirakaj V, Müller MR, Brümmendorf T and Brossart P: BCR-ABL is not an immunodominant antigen in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Res* 66: 5892-5900, 2006.
- Abu-Eisha HM, Butt NM, Clark RE and Christmas SE: Evidence that a BCR-ABL fusion peptide does not induce lymphocyte proliferation or cytokine production *in vitro*. *Leuk Res* 31: 1675-1681, 2007.
- Zeng Y, Feng H, Graner MW and Katsanis E: Tumor-derived, chaperone-rich cell lysate activates dendritic cells and elicits potent antitumor immunity. *Blood* 101: 4485-4491, 2003.
- Zeng Y, Graner MW, Thompson S, Marron M and Katsanis E: Induction of BCR-ABL-specific immunity following vaccination with chaperone-rich cell lysates derived from BCR-ABL<sup>+</sup> tumor cells. *Blood* 105: 2016-2022, 2004.
- McLaughlin J, Chianese E and Witte ON: *In vitro* transformation of immature hematopoietic cells by the P210 BCR/ABL oncogene product of the Philadelphia chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 6558-6562, 1987.
- Scheich F, Duyster J, Peschel C and Bernhard H: The immunogenicity of Bcr-Abl expressing dendritic cells is dependent on the Bcr-Abl kinase activity and dominated by Bcr-Abl regulated antigens. *Blood* 110: 2556-2560, 2007.



Publikace 3:**Expression of the soluble TGF- $\beta$  receptor II by recombinant vaccinia virus enhances E7 specific immunotherapy of HPV16 tumors**

**Autoři:** Kamila Žůrková, Petr Chlanda, Zuzana Samková, Katarína Babiarová, Lud'a Kutinová, Jitka Kryštofová, Petr Hainz, Šárka Němečková

**Vydáno v časopise:** Neoplasma 2011; 58(3):181-188; IF 1,44

**Cíl práce:** Zvýšení imunogennosti a protinádorové účinnosti rVACV vakcín, namířených proti HPV16-E7+ nádorům, pomocí ko-exprese solubilní formy receptoru typu II pro TGF $\beta$  (TGF $\beta$ RII) resp. jeho upravené varianty fúzované s Fc fragmentem IgG (TGF $\beta$ RII-Fc).

**Výsledky práce:**

1. Konstrukce rVACV vakcín exprimujících SigE7LAMP (imunogennější forma onkoproteinu HPV16-E7) s ko-expresí solubilní formy TGF $\beta$ RII nebo TGF $\beta$ RII-Fc, regulovanou pod časným H5 nebo syntetickým časně/pozdním E/L promotorem rVACV.
2. Exprese TGF $\beta$ RII a TGF $\beta$ RII-Fc neovlivnila množení rVACV *in vitro*, ani *in vivo*.
3. Rozdíly ve vyvolání HPV16-E7 specifické IFN $\gamma$  pozitivní T-buněčné imunitní odpovědi mezi dvojitými rVACV a rVACV exprimujícími jenom SigE7LAMP byly minimální. Byla zjištěna zvýšená buněčná imunita specifická pro VACV-E3 po imunizaci dvojitými rekombinantami rVACV.
4. Produkce TGF $\beta$ RII pod kontrolou H5 promotoru VACV signifikantně zvýšila účinnost rVACV vakcíny při terapii TC-1 nádorů u myši.

**Podíl na práci:** charakterizace připravených vakcín testováním jejich účinnosti na myších; hodnocení vakcínami indukované buněčné imunitní odpovědi; stanovení a vyhodnocení HPV16-E7 specifické odpovědi pomocí testu ELISPOT-IFN $\gamma$  a populace CD8<sup>+</sup>, tetramer H-2D<sup>b</sup>/E7<sub>49-57</sub>+ T-lymfocytů; zavedení, standardizace a vyhodnocení testu ELISPOT-IFN $\gamma$  pro detekci VACV-E3 specifické IFN $\gamma$  pozitivní T-buněčné imunitní odpovědi;

## Expression of soluble TGF- $\beta$ receptor II by recombinant Vaccinia virus enhances E7 specific immunotherapy of HPV16 tumors

K. ZURKOVA<sup>1</sup>, P. CHLANDA<sup>2</sup>, Z. SAMKOVA<sup>1</sup>, K. BABIAROVA<sup>1</sup>, L. KUTINOVA<sup>1</sup>, J. KRYS TOFOVA<sup>1</sup>, P. HAINZ<sup>1</sup>, S. NEMECKOVA<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, U nemocnice 1, 128 20 Prague 2 Czech Republic, e-mail: nemeckova@uhkt.cz

<sup>2</sup>Present address: MPI, Am Klopferspitz 18, D-82152 Martinsried, Germany

Received October 18, 2010

Therapeutic immunization with double recombinants of vaccinia virus (VACV) co-expressing sT $\beta$ R<sub>II</sub> increased rejection of established TC-1 tumors in C57BL/6 mice in comparison with single recombinant expressing SigE7LAMP. Recombinant VACV derived from vaccination strain Praha expressed either the sT $\beta$ R<sub>II</sub> (ectodomain) or chimeric protein fused to immunoglobulin Fc fragment (sT $\beta$ R<sub>II</sub>-Fc-Jun) under control of two different promoters together with the immunogenic tumor associated antigen HPV16 E7 oncoprotein in a form of SigE7LAMP fusion molecule. The ability of soluble receptors to bind TGF- $\beta$  *in vitro* was proved. Immunization of mice with double recombinant viruses and virus expressing SigE7LAMP only led to eliciting similar response of E7 specific CD8<sup>+</sup> T cells as detected by IFN- $\gamma$  ELISPOT.

*Key words:* HPV16, E7; vaccinia virus; TGF beta; TGF beta receptor II; tumor; immunity

High risk human papilloma viruses (HPV) have been identified as the etiological agents of carcinomas of anogenital tract and they are suspected to be also involved in induction of other tumors [1,2]. In 95% of healthy individuals, the immune system can eliminate HPV infections of anogenital tract within 12 to 36 months [3,4,5]. The crucial role of Th1 and CD8<sup>+</sup> T cells directed against early proteins E2, E6 and E7 and E5 [6] was recognized. Since the expression of E6 and E7 proteins in high-grade precancerous lesions and invasive cancers is essential for the induction and maintenance of oncogenic transformation of HPV infected cells [7], the E6 and E7 proteins appear, hence, the most suitable antigenic targets for the therapy of HPV-induced lesions and tumors. The feasibility of therapeutic vaccination approach including synthetic peptides, recombinant proteins, virus like particles, DNA vaccines, viral and bacterial vectors was examined using HPV16-E6 and E7 expressing tumor cell lines in mice model [8,9,10].

Transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) is a pleiotropic cytokine with regulatory roles in processes such as tissue growth and morphogenesis or the development of immune responses. In the immune system, the TGF- $\beta$  controls the inhibition of immunopathological reactions to self-antigens without compromising immune responses to pathogens. Three TGF- $\beta$  isoforms are produced by all cells of leukocyte lineages. Most of the hematopoietic cells have TGF- $\beta$  receptors, thus the TGF- $\beta$  cytokines are potent regulators of functions of T cells, NK cells, dendritic cells and macrophages which are the most important effector cells of anti-tumor immunity. TGF- $\beta$  inhibits the proliferation of T cells by inhibition of IL2 gene expression and through interference with cell cycle engine [11,12]. The blockade of Th1 differentiation is mediated through downregulation of IL12 receptor  $\beta$ 2 and synthesis of IFN- $\gamma$ . Cytotoxic activity of CD8<sup>+</sup> T cells is inhibited by downregulation of perforin, granzyme A/B, Fas ligand and IFN- $\gamma$  expression [12]. TGF- $\beta$  can convert CD4<sup>+</sup>T cells to regulatory FOXP3<sup>+</sup>T cells with immuno-suppressive activity [13] which can decrease T cell response against tumors [14]. TGF- $\beta$  abrogates the function of NK cells by inhibition of activating receptors and by downmodulation of IFN- $\gamma$  and TNF $\alpha$  [15]. The interference of TGF- $\beta$  with induction of adaptive immune response occurs also through an inhibition of maturation of dendritic cells which serve as professional antigen presenting cells [16]. During tumor progression, cancer cells can become resistant to growth-inhibitory activity

**Abbreviations:** ELISPOT – Enzyme-linked immunosorbent spot assay; Fc – constant fragment containing constant region of immunoglobulin; HPV16 E2,E5, E6, E7- early genes of human papilloma virus 16; IFN- $\gamma$  – interferon gamma; IgM, IgG – immunoglobulin M, G; IL2, IL12 – interleukine 2, 12; LAMP1 – lysosome associated membrane protein 1; NK – natural killer; Q-PCR – quantitative polymerase chain reaction; rVACV – recombinant vaccinia virus; sT $\beta$ R<sub>II</sub>- soluble TGF $\beta$  receptor type II; TGF- $\beta$  – transforming growth factor  $\beta$ ; TK – thymidine kinase

of TGF- $\beta$ ; they produce increased amount of TGF- $\beta$  or promote its production by surrounding cells [17]. Consequently, TGF- $\beta$  produced by tumor cells downregulates immune responses to tumor antigens and allows the tumor to evade the immune surveillance [18]. There are three possible ways how to avoid the deleterious effect of TGF- $\beta$  in the therapy- to use antisense oligonucleotides, molecular traps or pharmacological molecules. The enhanced protection against tumor formation and growth as well as a shift to Th1 and CTL responses were achieved by neutralization of TGF- $\beta$  with specific antibodies during immunization against tumor antigen [19,20,21]. It has been shown that systemic neutralization of TGF- $\beta$  by soluble T $\beta$ R2 (sT $\beta$ R2) expressed by EL4 tumor cells was able to prevent suppression of tumor specific CD8+ T cell cytotoxicity *in vivo* [12,22] However, a soluble T $\beta$ R2 has approximately 10-times decreased affinity to TGF- $\beta$  [23] probably due to its monomeric form; this has been overcome with utilization of chimeric sT $\beta$ R2-Fc [24].

The Fc region of human IgG contains several cystein residues ensuring chimeric molecule dimerization. This facilitates efficient production and secretion of many different categories of proteins. The Fc chimeras retain full biological activity, ligand-receptor binding affinity and appear to be more uniformly glycosylated. The Fc region helps also to fix the complement, to increase the half-life, to cross the blood-brain barrier or to easily isolate the molecule through protein A/G binding [25,26]. Soluble Fc-receptor molecules have been successfully used to treat the tumors of different origin. The treatment of mammary tumor cells and primary tumors with T $\beta$ R2-Fc abrogated the TGF- $\beta$  autocrine signalization loop and increased the apoptosis [27,28]. Its expression by MCF-7 human breast cancer cells reduced their metastatic potential [29]. The combination of chemotherapeutic treatment with T $\beta$ R2-Fc increased the inhibition of KAT-4 thyroid carcinoma cells [30].

In this study, we enhanced the therapeutic effect of recombinant vaccinia virus vector expressing an immunizing HPV16-E7 tumor antigen – the fusion protein SigE7LAMP – with the co-expression of a soluble TGF- $\beta$  receptor II in the same vector. We found out, that the production of sT $\beta$ R2 significantly enhanced the inhibition of growth of TC-1 tumors in laboratory mouse.

## Material and methods

**Plasmids.** To prepare secreted form of T $\beta$ R2, the coding sequence of the extracellular domain of T $\beta$ R2 was amplified by semi-nested PCR with primer #1: (5'-CATGGG TCG CGG ACTTCT CAG AGG CCTGT-3') and primer #2: (5'-ATG AAT TCC ATGGGT CGCGGA CTT CTC AGAGGC-3') in the first reaction, and subsequently with primer #3: (5'-TAAGGC CTG CAA CTAGTC AGG ATTGCTGGT-3') and primer #2 using plasmid pcDNA1/Neo-hT $\beta$ R2 containing the complete coding sequence of human T $\beta$ R2 as a template (plasmid pcDNA1/Neo-hT $\beta$ R2 was obtained through the courtesy of H.F. Lodish and H.Y. Lin, Cambridge, USA). The amplified fragment was inserted into plasmid pCR4-TOPO (Invitrogen) and the

cloning correctness was verified by sequencing. The resulting plasmid pCR4-TOPO-T $\beta$ R2 was cleaved with EcoRI and a 478 bp fragment encoding ectodomain of T $\beta$ R2 was inserted into a plasmid pSC59H5 [31] cut with the same restriction enzyme, yielding the plasmid pSC59H5-sT $\beta$ R2. Alternatively, the EcoRI fragment was subcloned into pBluescript II SK+ cleaved with the same enzyme. Consecutively, the BamHI/HindIII fragment was inserted in pSC59H5 cleaved with the same enzymes, yielding the plasmid pSC59H5-E/L-sT $\beta$ R2.

To prepare plasmids carrying the chimeric gene encoding the sT $\beta$ R2 fused with immunoglobulin Fc fragment (T $\beta$ R2-Fc-Jun), the pFastbac-T $\beta$ R2-Fc-Jun plasmid was cleaved with EcoRI, HindIII restriction endonucleases (pFastbac-T $\beta$ R2-Fc-Jun plasmid was obtained through the courtesy of D. Kowalczyk, Poznan, Poland). The isolated 1.4 kbp fragment was ligated with pBluescript II SK+ cut with the same enzymes. The pBluescript-T $\beta$ R2-Fc-Jun plasmid was subsequently cleaved with EcoRI and XhoI and the isolated 1.4 kbp fragment was ligated with pSC59H5 cut with the same enzymes, yielding a plasmid pSC59H5-T $\beta$ R2-Fc-Jun. To prepare pSC59-E/L-T $\beta$ R2-Fc-Jun, the H5 promoter was excised from plasmid pSC59H5-T $\beta$ R2-Fc-Jun by SalI and XhoI restriction endonucleases and the isolated fragment was ligated.

**Recombinant vaccinia viruses.** Vaccinia virus strain Praha, clone 13 (32) was used as parental virus. The coding sequence of sT $\beta$ R2 or T $\beta$ R2-Fc-Jun was inserted in thymidine kinase gene behind an early/late H5 promoter or a strong synthetic E/L promoter by the method described previously (33). Plasmids pSC59H5-sT $\beta$ R2, pSC59 E/L-sT $\beta$ R2, pSC59H5-T $\beta$ R2-Fc-Jun or pSC59-E/L-T $\beta$ R2-Fc-Jun were used for generation of recombinant viruses which were denoted as P13-H5-sT $\beta$ R2 and P13-E/L-sT $\beta$ R2, P13-H5-T $\beta$ R2-Fc-Jun or P13-E/L-T $\beta$ R2-Fc-Jun. In double recombinants, the sT $\beta$ R2 or T $\beta$ R2-Fc-Jun coding sequence was inserted into vaccinia virus P13-SigE7LAMP expressing the fusion gene SigE7LAMP (Sig-signal sequence of the lysosome-associated membrane protein1 (LAMP1), E7-early protein of HPV16, LAMP-transmembrane and intracellular domain of LAMP1) (34). The control virus P13-SigE7LAMP TK- contains the TK gene disrupted by insertion of 11k promoter sequence. Viruses were grown in BSC40 cells, purified by sucrose-gradient centrifugation (35) and titrated in CV-1 cells.

**Antibodies.** Biotin-labeled purified Rat- $\alpha$ -TGF $\beta$ -1 (clone A75-3) immunoglobulin (BD Pharmingen, USA), Avidin-HRP (BD Pharmingen, USA), Goat- $\alpha$ -hT $\beta$ R2 IgG (RD Systems, USA), Rabbit- $\alpha$ -Goat-HRP IgG (Jackson ImmunoResearch, USA) were used for immunoblotting. Protein-G immobilized on fast-flow agarose was used for immunoprecipitation (Sigma-Aldrich, USA).

**Cells.** TC-1 cells [36], were kindly provided by T.C. Wu (Baltimore). BSC40, CV-1 and TC-1 cell lines were cultivated in modified E-MEM (EPL) medium containing bovine serum growth-active proteins but no complete serum [37]. HeLa cells were grown in D-MEM supplemented with 10% fetal bovine serum.

**Immunoblot.** The procedure was described earlier (38). Antibodies used for detections were goat- $\alpha$ -hT $\beta$ R $\text{II}$  IgG (diluted 1:2000) with secondary antibody Rabbit- $\alpha$ -Goat-HRP IgG (diluted 1:4000); or Biotin-labeled purified Rat- $\alpha$ -TGF $\beta$ -1 (diluted 1:500) followed by Avidin-HRP-complex (diluted 1:1000). Proteins were visualized with the ECL Plus system (Amersham).

**TGF $\beta$  binding in vitro.** CV-1 cells ( $6 \cdot 10^6$ ) infected at a MOI of 2 with P13-E/L-sT $\beta$ R $\text{II}$  or P13-E/L-T $\beta$ R $\text{II}$ -Fc-Jun were 24 h.p.i. washed twice with PBS, the suspension was three times frozen/thawed in 4 ml of PBS and the cell debris was removed by centrifugation. The virus was removed by filtration through 0.2  $\mu\text{m}$  filter (Sarstedt, Germany) and the lysate was concentrated to 0.5 ml using 10kDa cut-off Amicon ultra centrifugation device (Millipore, USA). 10  $\mu\text{l}$  of the lysate was mixed with 5 ng of TGF $\beta$  (Peprotech, USA) and 1  $\mu\text{l}$  (250 ng) of Goat- $\alpha$ -hT $\beta$ R $\text{II}$  IgG and incubated on ice each for 1 hour followed by immunoprecipitation using 10  $\mu\text{l}$  of 50% suspension of Protein-G agarose beads. The immunocomplexes were examined by immunoblot for the presence of TGF $\beta$  protein.

**Animal experiments.** Six-week-old C57BL/6 ( $H2^b$ ) female mice obtained from Charles River, Germany were maintained under standard conditions at the National Institute of Public Health (Prague). The experiments were performed in compliance with Act No. 246/92, on animal protection against cruelty and Decree No. 311/97 of the Ministry of Health of the Czech Republic, on the care and use of experimental animals. For immunization mice were injected intraperitoneally (i.p.) with 0.5 ml PBS containing sonicated suspension of rVV. To induce the tumors, the TC-1 cells were injected subcutaneously (s.c.) in the back of mice. Tumor growth was measured weekly. Differences between growth curves were statistically analyzed by the two-way ANOVA. All statistical analyses were performed using the Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc, San Diego).

**Assay of E7 specific T-cell responses.** Spleens were removed from mice twelve days after the immunization and the response of IFN- $\gamma$ -producing cells was determined by ELISPOT-IFN $\gamma$  assay upon restimulation with H-2D $^b$  restricted HPV16 E7<sub>(49-57)</sub> (RAHYNIVTF) or VACV E3<sub>(140-148)</sub> (VGVSNSPTF) peptide for 20 hours *in vitro*, as described previously [34]. The mean spot numbers obtained for peptide-restimulated and control cells were analyzed by the unpaired t-test.

**Detection of VACV multiplication in vivo using quantitative PCR (Q-PCR).** Mice were anaesthetized with halothane (Narcotan, Léčiva, Prague) and sacrificed. The ovaries were dissected, washed in PBS and homogenized. DNA was extracted using DNeasy Tissue Kit (Qiagen). Real-time quantitative PCR was performed as described previously [39]

## Results

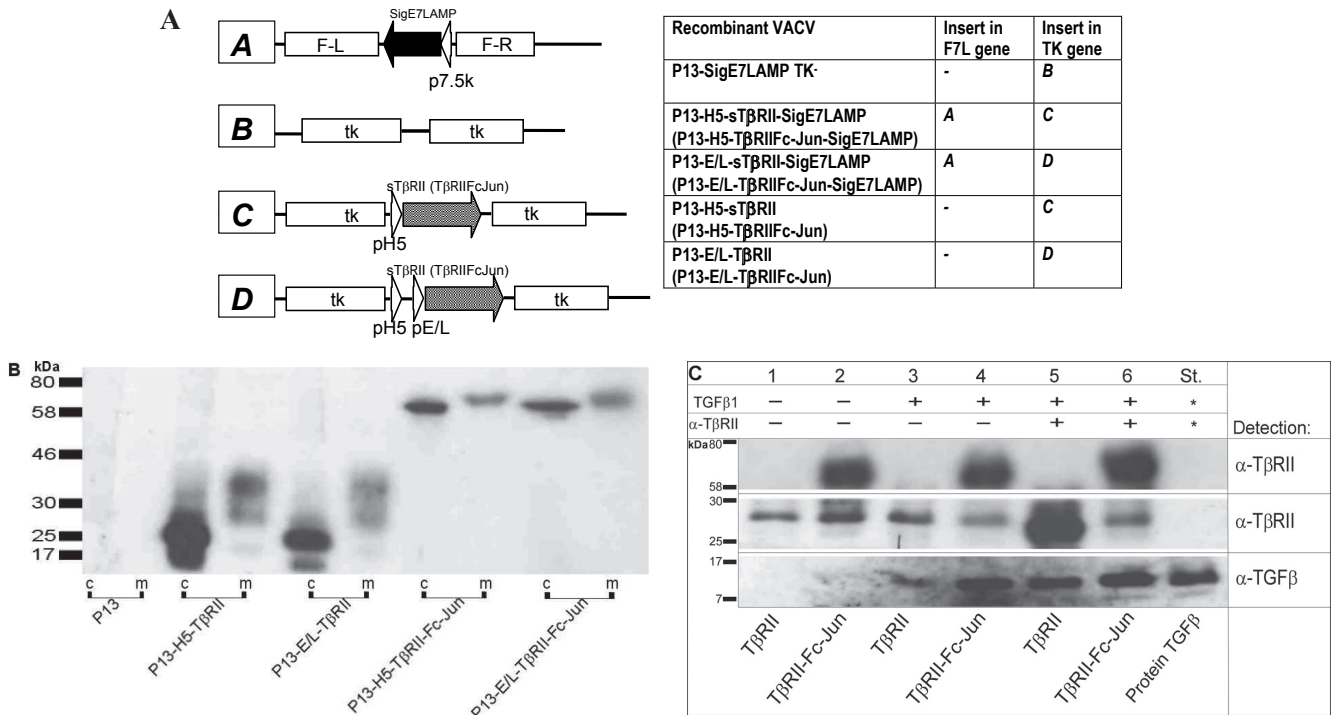
**Characterization of vaccinia viruses expressing sT $\beta$ R $\text{II}$ .** To evaluate the effect of TGF- $\beta$  neutralization on the immunogenicity and immunotherapeutic potential of vaccinia virus vectors against the growth of tumors, we constructed recombinant vaccinia viruses expressing extracellular domain of T $\beta$ R $\text{II}$  (Fig.

1A). Viruses denoted P13-H5-sT $\beta$ R $\text{II}$  or P13-E/L-sT $\beta$ R $\text{II}$ , carried the coding sequence of sT $\beta$ R $\text{II}$ . To enhance the TGF- $\beta$ 1 binding, we constructed viruses P13-H5-T $\beta$ R $\text{II}$ -Fc-Jun and P13-E/L-T $\beta$ R $\text{II}$ -Fc-Jun expressing the chimeric sT $\beta$ R $\text{II}$  fused to the Fc region of human IgG and C-terminal Jun fragment (T $\beta$ R $\text{II}$ -Fc-Jun) which provides dimerisation and efficient secretion of T $\beta$ R $\text{II}$  (40). The expression was regulated either by promoter H5 or by E/L. First, we determined the synthesis of T $\beta$ R $\text{II}$  *in vitro* in cells infected with VACV recombinants. HeLa cells were infected at a MOI of 1.0 with the parental virus P13 or with recombinant viruses P13-H5-sT $\beta$ R $\text{II}$ , P13-E/L-sT $\beta$ R $\text{II}$ , P13-H5-T $\beta$ R $\text{II}$ -Fc-Jun and P13-E/L-T $\beta$ R $\text{II}$ -Fc-Jun, and receptor production in medium and cell lysate was determined 20 hours post infection by immunoblot (Fig. 1B). Cell associated sT $\beta$ R $\text{II}$  molecules migrated under reducing conditions at m.w. 19 and 25 kDa. Secreted glycosylated forms of sT $\beta$ R $\text{II}$  of m.w. about 25 and 32 kDa were found in cell medium. The N-glycosylation patterns were studied by infection in the presence of tunicamycin (2 mg/ml) where the unglycosylated sT $\beta$ R $\text{II}$  of m.w. 19 kDa was found. As we expected, tunicamycin inhibited secretion of sT $\beta$ R $\text{II}$  into the supernatants (not shown). Similarly to sT $\beta$ R $\text{II}$ , the chimeric soluble sT $\beta$ R $\text{II}$ -Fc-Jun was present both in infected cells and in medium (Fig. 1B). The sT $\beta$ R $\text{II}$ -Fc-Jun molecules migrated around the molecular mass of 65 kDa showing an increased glycosylation of the receptor present in medium in comparison to the cell associated receptor.

**Binding activity of sT $\beta$ R $\text{II}$ .** To determine the capability of sT $\beta$ R $\text{II}$  and sT $\beta$ R $\text{II}$ -Fc-Jun to bind native TGF- $\beta$ 1 protein *in vitro*, the lysates of cells infected with P13-E/L-sT $\beta$ R $\text{II}$  or P13-E/L-T $\beta$ R $\text{II}$ -Fc-Jun were incubated with or without TGF- $\beta$ 1 protein. The receptor-ligand complexes were immunoprecipitated with antibody against the T $\beta$ R $\text{II}$  and isolated using immobilized protein G. The presence of both the TGF- $\beta$ 1 and the receptor in samples was determined by immunoblot using specific antibodies (Fig. 1C). We observed that T $\beta$ R $\text{II}$  specific antibody was able to pull down TGF- $\beta$ 1 which was associated either with sT $\beta$ R $\text{II}$  (line 5) or with sT $\beta$ R $\text{II}$ -Fc-Jun (line 6), so we confirmed the ability of both the sT $\beta$ R $\text{II}$  and sT $\beta$ R $\text{II}$ -Fc-Jun to bind TGF- $\beta$ 1. The complex TGF- $\beta$ 1/sT $\beta$ R $\text{II}$ -Fc-Jun was detected also when the receptor was incubated with TGF- $\beta$ 1 in the absence of specific antibody against T $\beta$ R $\text{II}$  (line 4) which is in accord with the presumption that the chimeric receptor binds to protein G and that the Jun portion does not interfere with protein G-binding domain of Fc fragment. Direct binding to protein G was not observed in case of sT $\beta$ R $\text{II}$  (line 3). These results were important for the intention to prepare improved rVACVs useful for vaccination against cancer.

**The influence of soluble TGF- $\beta$  receptor II expressed by rVACV on E7 specific T cell response.** First, we examined whether the co-expression of receptors influences the T cell response to E7 antigen expressed by rVACV. The groups of mice ( $n=4$ ) were immunized i.p. with one dose of rVACV ( $3 \times 10^6$  PFU) and the E7 specific cellular immune response to H-2D $^b$  restricted E7 peptide RAHYNIVTF was determined by ELISPOT 12 days later. The E7-specific CD8 $^+$  T cells among freshly isolated splenocytes were detected in all animals immu-





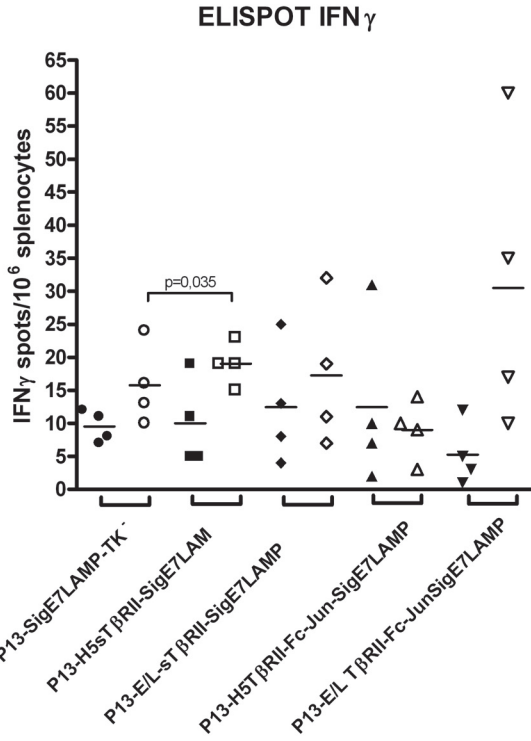
**Fig. 1** Recombinant vaccinia viruses expressing soluble TβRII. (A) Structure of the constructs inserted in the genome of rVACVs. (A) SigE7LAMP fusion gene inserted in the nonessential F7L locus behind the 7.5k early/late promoter (p7.5k). (B) TK gene disrupted by insertion of a non-coding DNA sequence. (C) Soluble TβRII or (TβRII Fc-Jun), resp. inserted into thymidine kinase locus (TK) under the control of the early/late H5 promoter (pH5) (D) Soluble TβRII or (TβRII Fc-Jun) resp. inserted into thymidine kinase locus (TK) under the control of the strong synthetic early/late promoter (pEL). The structure of recombinants is shown in the table on the right side of figure. (B) Immunoblot analysis of soluble TβRII produced by rVACV *in vitro*. HeLa cells were infected at a MOI of 1.0 for 1 h, washed with PBS and cultured in serum-free D-MEM. Media (m) and cells (c) were harvested 20 hours p.i. The samples were analyzed by immunoblot using goat-α-hTβRII IgG and rabbit-α-goat-HRP IgG. The scale in the figure 1 B and C shows kilodaltons (kDa). (C) *In vitro* binding of soluble sTβRII or chimeric sTβRII-Fc-Jun to TGFβ. The concentrated lysate of cells infected with recombinant virus was incubated with 5 ng of human TGF beta, α-hTβRII IgG (250 ng) and 10 μl of protein G immobilized on agarose beads, each for 1 hour on ice. The immunocomplexes bound to protein G-agarose were analyzed by immunoblot using α-hTGFβ and α-hTβRII antibodies combined with appropriate secondary antibodies.

nized with SigE7LAMP (Fig. 2). There was found no significant enhancing effect of sTβRII co-expression on the E7 specific immune response in comparison with P13-SigE7LAMP-TK<sup>-</sup> vector. In contrast to E7 a specific response against the VACV E3 protein was elevated in groups of animals immunized with P13-H5-sTβRII-SigE7LAMP and P13-E/L-sTβRII-Fc-Jun-SigE7LAMP; though the difference of the mean was statistically significant only for the former virus ( $p=0.035$ ).

**The effect of co-expression of soluble TGF-β receptor II by rVACV on therapeutic immunization against TC-1 tumors.** The therapeutic effect of immunization was examined in animals carrying the tumors of mean area 4.3-6.4 mm<sup>2</sup>. The groups of mice ( $n=6$ ) were s.c. injected with  $6 \times 10^4$  TC-1 cells in the back. On day 9, they were immunized i.p. with  $1 \times 10^6$  PFU of rVACV and the growth of tumors was measured up to 60 days (Fig.3). The experiment was repeated twice with the same result. In general, the treatment with all SigE7LAMP expressing viruses resulted in delayed growth of tumors in comparison to the control group injected with PBS. The immunization with a double recombinant P13-H5-sTβRII-SigE7LAMP induced the

regression of TC-1 tumors in all the animals on days 25-50; the difference was statistically significant in comparison with control group injected with PBS ( $p=0.0062$ ) and with the group immunized with P13- SigE7LAMP-TK<sup>-</sup> ( $p=0.0327$ ). Surprisingly, the expression of chimeric sTβRII-Fc-Jun did not improve the therapeutic potential of the vaccine in this arrangement. Furthermore, the positive effect of soluble TGF-β receptors presence on a tumor growth inhibition was statistically significant only if co-expressed with SigE7LAMP. The treatment with single recombinant viruses lacking the expression of a tumor specific E7 antigen did not exert any effect on the tumor growth.

**The effect of sTβRII expression by double recombinants P13-sTβRII-SigE7LAMP on the multiplication *in vivo*.** As we found a significant difference in the immunogenicity and antitumor effect of an immunization with P13-H5-sTβRII-SigE7LAMP in comparison with the single recombinant P13-SigE7LAMP-TK<sup>-</sup>, we investigated the possibility that the sTβRII expression might have affected virus multiplication *in vivo*. Mice were injected i.p. with  $1 \times 10^6$  PFU of rVACVs and the ovaries were collected on days 0, 3 and 4. The replication of viruses was quantified by Q-PCR



assay in the DNA isolated from the mouse ovaries. Virus multiplication on days 0, 3, 4 is shown in Fig. 4. The coexpression of the sT $\beta$ RII gene under H5 promoter along with the SigE7LAMP fusion construct did not significantly affect the multiplication of rVACV. We can conclude that the enhancement of antigen specific T cell immunity and the antitumor effect of P13-H5-sT $\beta$ RII-SigE7LAMP were not associated with higher growth rate of the recombinant virus *in vivo*.

**Discussion**

This is the first report where it was described, how it is possible to enhance the immunotherapy of HPV induced tumors using live recombinant vaccinia virus vector expressing simul-

Fig. 2 T cell responses elicited by inoculation of sT $\beta$ RII expressing viruses. C57BL/6 mice (n=4) were injected i.p. with 3x10<sup>6</sup> PFU rVV. Splenocytes were isolated twelve days after immunization. Induction of specific CD8<sup>+</sup> T cells was determined in freshly isolated splenocytes of individual mice by IFN- $\gamma$  ELISPOT. The background mean values obtained in the absence of the peptide were subtracted from mean values obtained in the presence of peptide for each animal. Responses specific for HPV16-E7 protein (full symbols) and VACV E3 protein (empty symbols) in each group were compared and analyzed by the unpaired t-test. The cellular immune response was determined in three independent experiments.

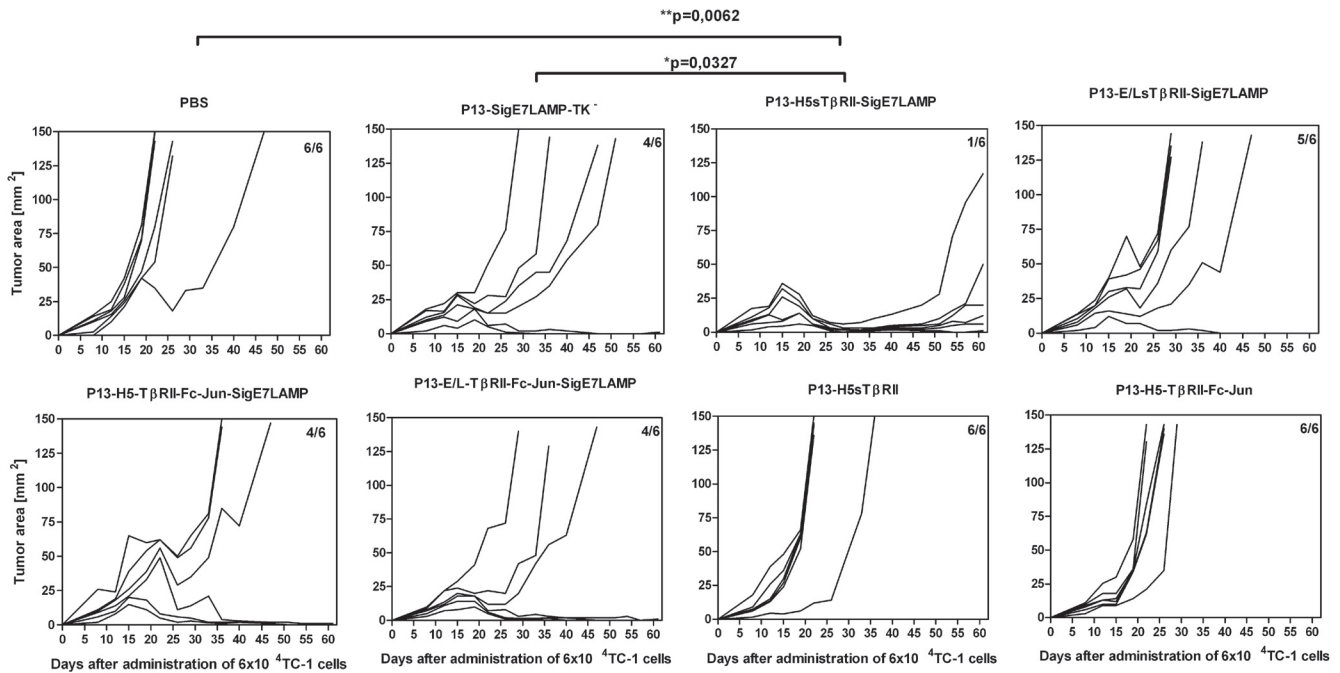
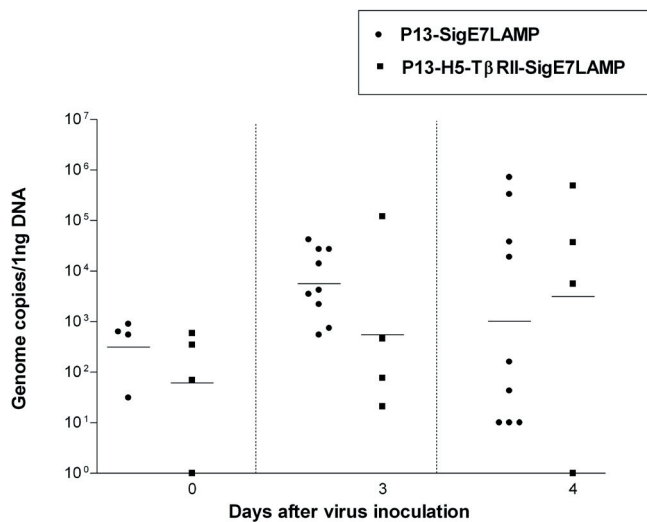


Fig. 3 Effect of sT $\beta$ RII co-expression by P13-SigE7LAMP-TK on anti-tumor effect of therapeutic immunization. For evaluation of therapeutic efficacy of recombinant viruses expressing sT $\beta$ RII and SigE7LAMP, mice (n=6) were s.c. injected with 6x10<sup>4</sup> TC-1 cells. Nine days later, the animals were i.p. injected with 1x10<sup>6</sup> PFU of the P13-SigE7LAMP-TK, P13-H5-sT $\beta$ RII-SigE7LAMP, P13-E/L-sT $\beta$ RII-SigE7LAMP, P13-H5-sT $\beta$ RII-Fc-Jun-SigE7LAMP, P13-E/L-T $\beta$ RII-Fc-Jun-SigE7LAMP, P13-H5-sT $\beta$ RII or P13-H5-sT $\beta$ RII-Fc-Jun virus. The growth of tumors is shown on separate graphs for each of the tested groups with the fraction of mice developing tumors after 30 days indicated in the upper right corner. The tumor growth curves were statistically analyzed by comparison with the group treated with P13-SigE7LAMP-TK using two-way ANOVA. The experiment was repeated twice with similar results. Here are shown results of one therapeutic experiment.



**Fig. 4** In vivo multiplication of viruses expressing SigE7LAMP and sTβRII. Groups (n=4) of C57BL/6 female mice were inoculated i.p. with  $1 \times 10^6$  pfu of P13-SigE7LAMP-TK or P13-H5-sTβRII-SigE7LAMP. The ovaries were collected at various time intervals after infection. Replication of rVACV in the ovaries was determined by Q-PCR. Geometric means are shown. The data were analyzed by the two-way ANOVA.

taneously the modified HPV specific E7 antigen and a soluble form of transforming growth factor-beta type II receptor.

One of the mechanisms involved in tumorigenicity of high risk HPVs is based on the ability of E7 protein to upregulate the TGF-β expression in transformed cells. There was found a direct proportion between severity of high risk HPV induced cervical lesions and the amount of TGF-β signaling pathway proteins in patients' tissue and serum. These results corroborate with findings that TGF-β1 expression was higher in the high risk HPV genome containing cervical cell lines SiHa, HeLa and CasKi than in cultured HPV negative cell lines. Moreover, it has been shown that knocking down the E7 expression by specific antisense ODN downregulated also TGF-β expression in CasKi and SiHa cells [41]. These facts hinted TGF-β as a prospective target for therapy of HPV associated malignancies. The expression analysis revealed the presence of TGF-β1 transcripts in HPV16-E6/E7 transformed TC-1 cell line which was used in this study (M. Smahel, personal communication). We speculated that blocking of TGF-β might enhance the efficacy of immunotherapy of tumors originating from TC-1 cells and for this purpose we developed recombinant vaccinia viruses (rVACV) expressing soluble TGF-β receptors. We chose the strain Prague, clone 13, of vaccinia virus for its high immunogenicity and low virulence when compared to well known WR strain (42). VACV expressing SigE7LAMP fusion protein had been used before for the treatment of E6/E7 expressing tumors (31). In our experimental model, we used two forms of soluble TGFβ receptor II – the first one in a previously described form of an extracellular sTβRII domain [23] and the second one as a chimeric extracellular domain of sTβRII fused to immunoglobulin Fc portion tagged with Jun fragment. It has been

shown previously that chimeric sTβRII-Fc has higher biological activity than sTβRII [24]. The C-terminal Jun fragment in our construct should further increase the TGFβ binding by chimeric receptor (D. Kowalczyk, personal communication). Soluble receptors were expressed by vaccinia virus either under control of H5 promoter, which is active mainly in the early phase of VV replication cycle, or under control of a synthetic E/L promoter that is a potent inducer of strong late phase expression.

Both types of TβRII produced in rVACVs infected cells were partially secreted in properly glycosylated form and partially remained associated with infected cells as underglycosylated precursor. Despite of the presumptive weaker expression directed from H5 than from E/L promoter, we found surprisingly higher levels of sTβRII/sTβRII-Fc-Jun present in cytoplasm of cells infected by P13-H5-sTβRII or P13-H5-sTβRII-Fc-Jun at 20 h.p.i. However, the amount of soluble receptors released into the medium of all rVACVs infected cells was nearly the same in later intervals what was the important result for therapeutic experiments.

In our experimental model, we tried to eradicate tumors induced by inoculation TC-1 cells expressing HPV16 E6/E7 antigens and growing subcutaneously at mice back. We treated mice with one dose of recombinant virus; however, the simple expression of sTβRII by rVACV failed to affect growth of TC-1 tumors in mice and induced no E7 specific response. It is in contrast to results of Kontani [43] where administration of DNA encoding sTβRII was able to elicit potent immunity against ovalbumin in the role of extrinsic tumor antigen [43]. The E7 protein present in TC-1 cells is a poor immunogen in comparison with highly immunogenic ovalbumin and TC-1 cells are not able to stimulate efficient antitumor response even if the TGFβ is neutralized by the soluble receptor. Therefore, we constructed double recombinant viruses carrying both the sTβRII and E7 antigen in a highly immunogenic form of SigE7LAMP fusion protein. The regression of tumors occurred only in animals which were simultaneously immunized with SigE7LAMP and treated with soluble TβRII mainly with the P13-H5-sTβRII-SigE7LAMP recombinant, whereas none of the chimeric sTβRII-Fc-Jun expressing viruses increased the therapeutic potential of rVACV. We found, that P13-H5-sTβRII-SigE7LAMP induced highest amount of the less glycosylated sTβRII which remained associated with cells. We suppose that anti-tumor activity is not enhanced only by secreted receptors, but also by the large amount of intracellular underglycosylated sTβRII, which can get away from cells by different mechanisms. One possibility is that the cell associated receptor can be released later due to the cell destruction. The rationale for the second way is based on finding, that cells infected with VACV release plenty of extracellular vesicles containing virus encoded products [44] similar to exosomes. Exosomes are formed by invagination of the limiting membrane of late endosomes and once released, exosomes can fuse with membranes of neighboring cells, delivering membrane and cytoplasmic proteins from one cell to another. Membrane bound TGF-β might also be delivered by exosomes to CD8+ cytotoxic T lymphocytes or to NK cells thus causing their

poor functional response [45]. We speculate that intracellular sT $\beta$ RII which could be released from infected cells via exosomes, could neutralize this exosome-bound TGF- $\beta$  just in the blood thus providing enough space for the activation of anti-cancer immune response.

In contrast to the enhancement of anti-tumor activity in tumor bearing mice, the co-expression of either sT $\beta$ RII or sT $\beta$ RII-Fc-Jun by rVACVs did not significantly enhance the response of HPV16-E7 specific CD8<sup>+</sup> T cells either detected by ELISPOT-IFN- $\gamma$  or by tetramer assay (not shown) as we determined 12 or 26 days after virus inoculation in immunized mice without tumors. It would be interesting to measure the response of INF $\gamma$  producing T cells to immunization in the tumor bearing mice. Moreover, we found that the reduction of tumor growth by P13-H5-sT $\beta$ RII-SigE7LAMP was not caused even by changed multiplication of the virus. In this respect, we can only deduce what was the real mechanism of its anti-cancer activity. The P13-H5-sT $\beta$ RII-SigE7LAMP could exert the positive effects on tumor growth inhibition by changes in tumor microenvironment and by the influence on several immune cell populations. Cellular interactions in the tumor stroma play a major role in cancer progression or tumor rejection and taking away their stimuli is the step towards faster tumor rejection. The successful treatment of TC-1 derived solid tumors using P13-H5-sT $\beta$ RII-SigE7LAMP could mean that the main target of sT $\beta$ RII molecule is soluble TGF- $\beta$  produced in tumors. We can conclude that the neutralization of TGF- $\beta$  in combination with eliciting E7 specific T cell immunity may increase the therapeutic effect of vaccines directed against HPV associated cancer.

Acknowledgements. We thank T.C. Wu, H.Y. Lin and D. Kowalczyk for providing of essential reagents. This work was supported by grants No 78608 GAUK, NS-10660-3/2009 IGA and MZOUHK2005 of the Ministry of Health of the Czech Republic.

## References

- [1] ZUR, HAUSEN H. Papillomaviruses in the causation of human cancers – a brief historical account. *Virology* 2009;384:260-265. [doi:10.1016/j.virol.2008.11.046](https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.11.046)
- [2] SYRJANEN, S. Human papillomaviruses in head and neck carcinomas. *N Engl J Med* 2007;356:1993-1995. [doi:10.1056/NEJMe078004](https://doi.org/10.1056/NEJMe078004)
- [3] MOSCICKI, A. B., PALEFSKY, J., SMITH, G., SIBOSHSKI, S., SCHOOLNIK, G. Variability of human papillomavirus DNA testing in a longitudinal cohort of young women. *Obstet Gynecol* 1993;82:578-585. [doi:10.1097/00006250-199310000-00021](https://doi.org/10.1097/00006250-199310000-00021)
- [4] CHUA, K. L. and HJERPE, A. Persistence of human papillomavirus (HPV) infections preceding cervical carcinoma. *Cancer* 1996;77:121-127. [doi:10.1002/\(SICI\)1097-0142\(19960101\)77:1<121::AID-CNCR20>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0142(19960101)77:1<121::AID-CNCR20>3.0.CO;2-6)
- [5] HO, G. Y., BIERMAN, R., BEARDSLEY, L., CHANG, C. J., BURK, R. D. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998;338:423-428. [doi:10.1056/NEJM199802123380703](https://doi.org/10.1056/NEJM199802123380703)
- [6] NAKAGAWA, M., VISCIDI, R., DESHMUKH, I., COSTA, M. D., PALEFSKY, J. M. et al. Time course of humoral and cell-mediated immune responses to human papillomavirus type 16 in infected women. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9:877-882.
- [7] VON KNEBEL, DOEBERITZ M., OLTERSDORF, T., SCHWARZ, E., GISSMANN, L. Correlation of modified human papilloma virus early gene expression with altered growth properties in C4-1 cervical carcinoma cells. *Cancer Res* 1988;48:3780-3786.
- [8] STANLEY, M. A. Progress in prophylactic and therapeutic vaccines for human papillomavirus infection. *Expert Rev Vaccines* 2003;2:381-389. [doi:10.1586/14760584.2.3.381](https://doi.org/10.1586/14760584.2.3.381)
- [9] BUTZ, K., DENK, C., ULLMANN, A., SCHEFFNER, M., HOPPE-SEYLER, F. Induction of apoptosis in human papillomavirus-positive cancer cells by peptide aptamers targeting the viral E6 oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:6693-6697. [doi:10.1073/pnas.110538897](https://doi.org/10.1073/pnas.110538897)
- [10] STEELE, C., COWSERT, L. M., SHILLITOE, E. J. Effects of human papillomavirus type 18-specific antisense oligonucleotides on the transformed phenotype of human carcinoma cell lines. *Cancer Res* 1993;53:2330-2337.
- [11] MCKARNS, S. C., SCHWARTZ, R. H., KAMINSKI, N. E. Smad3 is essential for TGF-beta 1 to suppress IL-2 production and TCR-induced proliferation, but not IL-2-induced proliferation. *J Immunol* 2004;172:4275-4284. PMID:15034041
- [12] THOMAS, D. A. AND MASSAGUE, J. TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell* 2005;8:369-380. [doi:10.1016/j.ccr.2005.10.012](https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.10.012)
- [13] OSTROUKHOVA, M., SEGUIN-DEVAUX, C., ORISS, T. B., DIXON-MCCARTHY, B., YANG, L. et al. Tolerance induced by inhaled antigen involves CD4(+) T cells expressing membrane-bound TGF-beta and FOXP3. *J Clin Invest* 2004;114:28-38.
- [14] LIU, V. C., WONG, L. Y., JANG, T., SHAH, A. H., PARK, I. et al. Tumor evasion of the immune system by converting CD4+CD25- T cells into CD4+CD25+ T regulatory cells: role of tumor-derived TGF-beta. *J Immunol* 2007;178:2883-2892.
- [15] GHIO, M., CONTINI, P., NEGRINI, S., BOERO, S., MUSSO, A. et al. Soluble HLA-I-mediated secretion of TGF-beta1 by human NK cells and consequent down-regulation of anti-tumor cytolytic activity. *Eur J Immunol* 2009;39:3459-3468. [doi:10.1002/eji.200939728](https://doi.org/10.1002/eji.200939728)
- [16] GEISSMANN, F., REVY, P., REGNAULT, A., LEPELLETIER, Y., DY, M. et al. TGF-beta 1 prevents the noncognate maturation of human dendritic Langerhans cells. *J Immunol* 1999;162:4567-4575.
- [17] CHANG, H. L., GILLET, N., FIGARI, I., LOPEZ, A. R., PAL-LADINO, M. A. et al. Increased transforming growth factor beta expression inhibits cell proliferation in vitro, yet increases tumorigenicity and tumor growth of Meth A sarcoma cells. *Cancer Res* 1993;53:4391-4398.
- [18] TORRE-AMIONE, G., BEAUCHAMP, R. D., KOEPPEN, H., PARK, B. H., SCHREIBER, H. et al. A highly immunogenic tumor transfected with a murine transforming growth factor type beta 1 cDNA escapes immune surveillance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:1486-1490. [doi:10.1073/pnas.87.4.1486](https://doi.org/10.1073/pnas.87.4.1486)
- [19] DASCH, J. R., PACE, D. R., WAEGELL, W., INENAGA, D., ELLINGSWORTH, L. Monoclonal antibodies recognizing



- transforming growth factor-beta. Bioactivity neutralization and transforming growth factor beta 2 affinity purification. *J Immunol* 1989;142:1536-1541.
- [20] MAEDA, H. AND SHIRAIISHI, A. TGF-beta contributes to the shift toward Th2-type responses through direct and IL-10-mediated pathways in tumor-bearing mice. *J Immunol* 1996;156:73-78.
- [21] JIA, Z. C., ZOU, L. Y., NI, B., WAN, Y., ZHOU, W. et al. Effective induction of antitumor immunity by immunization with plasmid DNA encoding TRP-2 plus neutralization of TGF-beta. *Cancer Immunol Immunother* 2005;54:446-452. [doi:10.1007/s00262-004-0619-4](https://doi.org/10.1007/s00262-004-0619-4)
- [22] WON, J., KIM, H., PARK, E. J., HONG, Y., KIM, S. J. et al. Tumorigenicity of mouse thymoma is suppressed by soluble type II transforming growth factor beta receptor therapy. *Cancer Res* 1999;59:1273-1277.
- [23] LIN, H. Y., MOUSTAKAS, A., KNAUS, P., WELLS, R. G., HENIS, Y. I. et al. The soluble exoplasmic domain of the type II transforming growth factor (TGF)-beta receptor. A heterogeneously glycosylated protein with high affinity and selectivity for TGF-beta ligands. *J Biol Chem* 1995;270:2747-2754.
- [24] KOMESLI, S., VIVIEN, D., DUTARTRE, P. Chimeric extracellular domain type II transforming growth factor (TGF)-beta receptor fused to the Fc region of human immunoglobulin as a TGF-beta antagonist. *Eur J Biochem* 1998;254:505-513. [doi:10.1046/j.1432-1327.1998.2540505.x](https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2540505.x)
- [25] LO, K. M., SUDO, Y., CHEN, J., LI, Y., LAN, Y. et al. High level expression and secretion of Fc-X fusion proteins in mammalian cells. *Protein Eng* 1998;11:495-500. [doi:10.1093/protein/11.6.495](https://doi.org/10.1093/protein/11.6.495)
- [26] DALL'ACQUA, W. F., KIENER, P. A., WU, H. Properties of human IgG1s engineered for enhanced binding to the neonatal Fc receptor (FcRn). *J Biol Chem* 2006;281:23514-23524. [doi:10.1074/jbc.M604292200](https://doi.org/10.1074/jbc.M604292200) PMID:16793771
- [27] MURAOKA, R. S., DUMONT, N., RITTER, C. A., DUGGER, T. C., BRANTLEY, D. M. et al. Blockade of TGF-beta inhibits mammary tumor cell viability, migration, and metastases. *J Clin Invest* 2002;109:1551-1559.
- [28] MURAOKA, R. S., KOH, Y., ROEBUCK, L. R., SANDERS, M. E., BRANTLEY-SIEDERS, D. et al. Increased malignancy of Neu-induced mammary tumors overexpressing active transforming growth factor beta1. *Mol Cell Biol* 2003;23:8691-8703. [doi:10.1128/MCB.23.23.8691-8703.2003](https://doi.org/10.1128/MCB.23.23.8691-8703.2003)
- [29] ZHAO, X. P., HUANG, Y. Y., HUANG, Y., LEI, P., PENG, J. L. et al. Transforming growth factor-beta1 upregulates the expression of CXCR4 chemokine receptor 4 (CXCR4) in human breast cancer MCF-7 cells. *Acta Pharmacol Sin* 2010;31:347-354. [doi:10.1038/aps.2009.204](https://doi.org/10.1038/aps.2009.204)
- [30] SALNIKOV, A. V., ROSWALL, P., SUNDBERG, C., GARDNER, H., HELDIN, N. E. et al. Inhibition of TGF-beta modulates macrophages and vessel maturation in parallel to a lowering of interstitial fluid pressure in experimental carcinoma. *Lab Invest* 2005;85:512-521. [doi:10.1038/labinvest.3700252](https://doi.org/10.1038/labinvest.3700252)
- [31] NEMECKOVA, S., STRANSKA, R., SUBRTOVA, J., KUTINOVA, L., OTAHAL, P. et al. Immune response to E7 protein of human papillomavirus type 16 anchored on the cell surface. *Cancer Immunol Immunother* 2002;51:111-119. [doi:10.1007/s00262-001-0261-3](https://doi.org/10.1007/s00262-001-0261-3)
- [32] KUTINOVA, L., NEMECKOVA, S., LUDVIKOVA, V., KUNKE, D., OTAVOVA, M. et al. Nektere problemy vyvoje vakcin zalozenych na rekombinantnim viru vakcinie. [Problems associated with the development of vaccines based on recombinant vaccinia virus]. *Cas Lek Cesk* 1992;131:770-773.
- [33] PERKUS, M. E., PANICALI, D., MERCER, S., PAOLETTI, E. Insertion and deletion mutants of vaccinia virus. *Virology* 1986;152:285-297. [doi:10.1016/0042-6822\(86\)90132-7](https://doi.org/10.1016/0042-6822(86)90132-7)
- [34] MACKOVA, J., KUTINOVA, L., HAINZ, P., KRYSOFOVA, J., SROLLER, V. et al. Adjuvant effect of dendritic cells transduced with recombinant vaccinia virus expressing HPV16-E7 is inhibited by co-expression of IL12. *Int J Oncol* 2004;24:1581-1588.
- [35] JOKLIK, W. K. The purification of four strains of poxvirus. *Virology* 1962;18:9-18. [doi:10.1016/0042-6822\(62\)90172-1](https://doi.org/10.1016/0042-6822(62)90172-1)
- [36] LIN, K. Y., GUARNIERI, F. G., STAVELEY-O'CARROLL, K. F., LEVITSKY, H. I., AUGUST, J. T. et al. Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. *Cancer Res* 1996;56:21-26.
- [37] MICHL, J. Metabolism of cells in tissue culture in vitro. I. The influence of serum protein fractions on the growth of normal and neoplastic cells. *Exp Cell Res* 1961;23:324-330. [doi:10.1016/0014-4827\(61\)90042-8](https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90042-8)
- [38] ZURKOVA, K., HAINZ, P., KRYSOFOVA, J., KUTINOVA, L., SANDA, M. et al. Attenuation of vaccinia virus by the expression of human Flt3 ligand. *Virology* 2010;7:109-119. [doi:10.1186/1743-422X-7-109](https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-109)
- [39] ZURKOVA, K., BABIAROVA, K., HAINZ, P., KRYSOFOVA, J., KUTINOVA, L. et al. The expression of the soluble isoform of hFlt3 ligand by recombinant vaccinia virus enhances immunogenicity of the vector. *Oncol Rep* 2009;21:1335-1343.
- [40] LIN, H. Y. AND WANG, X. F. Expression cloning of TGF-beta receptors. *Mol Reprod Dev* 1992;32:105-110. [doi:10.1002/mrd.1080320205](https://doi.org/10.1002/mrd.1080320205)
- [41] XU, Q., WANG, S., XI, L., WU, S., CHEN, G. et al. Effects of human papillomavirus type 16 E7 protein on the growth of cervical carcinoma cells and immuno-escape through the TGF-beta1 signaling pathway. *Gynecol Oncol* 2006;101:132-139. [doi:10.1016/j.ygyno.2005.09.051](https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2005.09.051)
- [42] KUTINOVA, L., LUDVIKOVA, V., SIMONOVA, V., OTAVOVA, M., KRYSOFOVA, J. et al. Search for optimal parent for recombinant vaccinia virus vaccines. Study of three vaccinia virus vaccinal strains and several virus lines derived from them. *Vaccine* 1995;13:487-493. [doi:10.1016/0264-410X\(94\)00019-J](https://doi.org/10.1016/0264-410X(94)00019-J)
- [43] KONTANI, K., KAJINO, K., HUANGI, C. L., FUJINO, S., TAGUCHI, O. et al. Spontaneous elicitation of potent antitumor immunity and eradication of established tumors by administration of DNA encoding soluble transforming growth factor-beta II receptor without active antigen-sensitization. *Cancer Immunol Immunother* 2006;55:579-587. [doi:10.1007/s00262-005-0044-3](https://doi.org/10.1007/s00262-005-0044-3)
- [44] SPEHNER, D. AND DRILLIEN, R. Extracellular vesicles containing virus-encoded membrane proteins are a byproduct of infection with modified vaccinia virus Ankara. *Virus Res* 2008;137:129-136. [doi:10.1016/j.virusres.2008.07.003](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.07.003)
- [45] CLAYTON, A., MITCHELL, J. P., COURT, J., MASON, M. D., TABI, Z. Human tumor-derived exosomes selectively impair lymphocyte responses to interleukin-2. *Cancer Res* 2007;67:7458-7466. [doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3456](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3456)

Publikace 4:**The expression of the soluble isoform of hFlt3 ligand by recombinant vaccinia virus enhances immunogenicity of the vector**

**Autoři:** Kamila Žůrková, Katarína Babiarová, Petr Hainz, Jitka Kryštofová, Luďa Kutinová, Pavel Otáhal, Šárka Němečková

**Vydáno v časopise:** *Oncology Reports* 2009; 21:1335-1343; IF 1,588

**Cíl práce:** Zvýšení imunogenosti a účinnosti rVACV vakcín, namířených proti HPV16-E7+ nádorům, ko-expresí Flt3L. Stanovení protinádorového účinku Flt3L v tomto modelu.

**Výsledky práce:**

1. Konstrukce rVACV s Flt3L expresí regulovanou pod časným H5 nebo syntetickým časně/pozdním E/L promotorem rVACV. Připravené vakcíny ko-exprimovaly Flt3L společně s expresí fúzního proteinu SigE7LAMP.

2. Testování produkce Flt3L *in vitro* ukázalo vyšší produkci Flt3L pod kontrolou promotoru E/L než pod H5, *in vivo* naopak vyšší expresi Flt3L pod kontrolou H5 než pod E/L. Množení těchto virů *in vitro* a *in vivo* nebylo ovlivněné produkcí Flt3L.

3. V některých intervalech po imunizaci jsme detekovali zvýšené množství IFN $\gamma$ + T-lymfocytů specifických pro HPV16-E7 u dvojité rekombinanty rVACV s expresí Flt3L pod H5 promotorem rVACV.

4. Pozitivní efekt protinádorové imunity vyvolané touto rekombinantou rVACV se projevil jak v terapii, tak v protekci myši proti HPV16-E6 a HPV16-E7 pozitivních nádorových buněk TC-1.

5. Zvýšená exprese Flt3L pod H5 vedla k inhibici expanze CD11b+Gr-1+ MDSC a k nárůstu CD11b+CD11c+ DC ve slezinách imunizovaných myší.

**Podíl na práci:** charakterizace připravených vakcín testováním jejich účinnosti na myších; hodnocení vakcínami indukované buněčné imunitní odpovědi; stanovení a vyhodnocení HPV16-E7 specifické odpovědi pomocí testu ELISPOT-IFN $\gamma$  a populace CD8+, tetramer H-2D<sup>b</sup>/E7<sub>49-57</sub>+ T-lymfocytů; stanovení a vyhodnocení testu ELISPOT-IFN $\gamma$  pro detekci VACV-E3 specifické IFN $\gamma$  pozitivní T-buněčné imunitní odpovědi;

# The expression of the soluble isoform of hFlt3 ligand by recombinant vaccinia virus enhances immunogenicity of the vector

K. ZURKOVA<sup>1</sup>, K. BABIAROVA<sup>1</sup>, P. HAINZ<sup>1</sup>, J. KRSTOFOVA<sup>1</sup>,  
L. KUTINOVA<sup>1</sup>, P. OTAHAL<sup>2</sup> and S. NEMECKOVA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Hematology and Blood Transfusion, Department of Experimental Virology, U Nemocnice 1, CZ-128 20 Prague 2;

<sup>2</sup>Institute of Molecular Genetics, Czech Academy of Sciences, Vídenská 1083, CZ-14220 Prague 4, Czech Republic

Received December 9, 2008; Accepted February 19, 2009

DOI: 10.3892/or\_00000359

**Abstract.** Recombinant vaccinia viruses (rVACV) expressing various tumor-associated antigens have been shown to elicit anti-tumor effect in numerous experimental models and clinical trials. We tested the hypotheses that rVACV expressing biologically active fms-like tyrosine kinase 3 ligand (Flt3L) would show higher immunogenicity than control viruses expressing only model antigen and that coexpression of Flt3L would influence anti-tumor activity of rVACV in the preventive and therapeutic arrangements of the *in vivo* experiment. To answer these questions, we took advantage of the well-described model of transplanted tumor cells expressing HPV16 E6 and E7 oncoproteins. To determine the effects of hFlt3L on the induction of anti-tumor immunity, we generated live vaccinia viruses that express human Flt3L regulated by the early H5 or strong synthetic E/L promoter together with fusion protein SigE7LAMP, which is a highly immunogenic form of HPV E7 oncoprotein. We tested Flt3L production *in vitro* and *in vivo*. Despite higher expression of Flt3L from the synthetic E/L promoter *in vitro*, the P13-E/L-FL-SigE7LAMP induced lower levels of Flt3L in the serum of mice than P13-H5-FL-SigE7LAMP. The Flt3L expression under the strong early VACV H5 promoter is able to inhibit expansion of CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> myeloid suppressor cells

(MSC) and increase the amount of CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> dendritic cells in the spleen of mice immunized with vaccinia virus. Determination of viral DNA isolated from the ovaries of infected animals did not reveal differences in replication between rVACVs in this organ. Coexpression of Flt3L by replication-competent virus P13-FL-SigE7LAMP induced enhancement of the cellular immune response against HPV16 E7 and VACV E3 proteins as well as increased anti-tumor efficacy in both the protective and therapeutic immunization schemes. On the other hand, the short-time Flt3L co-expression by MVA-H5-FL-SigE7LAMP was not sufficient to enhance anti-tumor effect of immunization.

## Introduction

Vaccinia virus (VACV) infection induces the release of pro-inflammatory cytokines and chemokines resulting in stimulation of innate immunity and Th1 biased antigen specific T cell responses effective in the elimination of virus infected cells or tumor cells. Therefore, recombinant vaccinia virus vectors encoding defined viral or tumor-associated antigens are widely studied as therapeutic anti-viral and anti-cancer vaccines. It is well established that the immunotherapeutic capacity of the vaccinia vector could be enhanced if biological adjuvants such as cytokines, chemokines or costimulatory molecules were expressed by the same rVACV vector as the antigen. These effects on immunotherapy of tumors were observed with macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) (1), CD40L (2), chemokine MIP3 $\alpha$ /CCL20 (3) or secondary lymphoid organ chemokine CCL21 (4).

One of the possible mechanisms that leads to enhanced immunogenicity of such rVACV is that soluble factors produced by rVACV directly activate professional APCs, which then better stimulate rVACV-induced immune responses. This is a well established mechanism observed following immunization with rVACV expressing GM-CSF which is a key cytokine for DC development in mice. Another cytokine which is similarly important for DC development and maturation in mice, is Fms-like tyrosine kinase 3 ligand (Flt3L) (5). Flt3L is a growth factor that stimulates in synergy with other cytokines (SCF, IL-3, GM-CSF) the proliferation

---

*Correspondence to:* Dr Sarka Nemeckova, Institute of Hematology and Blood Transfusion, U Nemocnice 1, CZ-128 20 Prague 2, Czech Republic  
E-mail: sarkan@uhkt.cz

*Abbreviations:* CTL, cytotoxic T lymphocyte; DC, dendritic cell; Flt3L, Fms like tyrosine kinase 3 ligand; HPV, human papilloma virus; LAMP, lysosome associated membrane protein; NK, natural killer; pS2S, preS2 + surface antigen of hepatitis B virus, PCR, polymerase chain reaction; VACV, vaccinia virus

*Key words:* vaccinia virus, soluble Flt3 ligand, immune response, CTL, antibodies, HPV16 E7

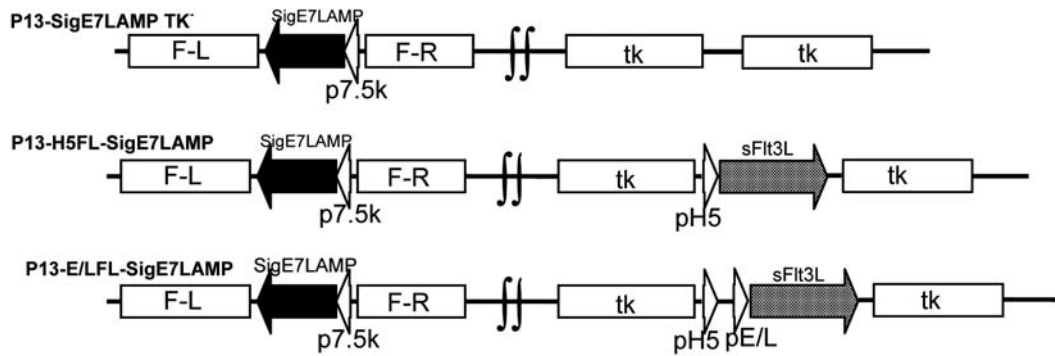


Figure 1. Genome structure of rVACV expressing SigE7LAMP and Flt3L. SigE7LAMP fusion gene was inserted in the non-essential F7L locus behind the 7.5k early/late promoter (p7.5k). The Flt3L coding sequence was inserted into thymidine kinase locus (TK) and its expression was controlled either by the early/late H5 promoter (pH5) or a strong synthetic early/late promoter (pEL). In the P13-SigE7LAMP virus the TK gene was inactivated by insertion of a non-coding DNA sequence.

and differentiation of primitive hematopoietic cells. The soluble and biologically active form of Flt3L is generated by cleavage of the primary membrane-associated translation product. The human and mouse Flt3L extracellular domains are very similar and therefore administration of hFlt3L to mice results in the expansion of dendritic cells and increased frequencies of natural killer cells and B and T lymphocytes. hFlt3L also enhances DC-mediated immunogenicity in mice (6) and augments antitumor immunity via activation of CD8<sup>+</sup> T cells or NK cells (7,8).

Persistent infection with high-risk human papilloma viruses (HPVs) can result in intraepithelial neoplasia and malignant lesions of the lower genital tract. HPVs are also suspected to be involved in the induction of other tumors (9) such as head and neck cancer and skin tumors in immunosuppressed persons. Papilloma viruses encode several early proteins such as E2, E5, E6 and E7 which appear as potential target antigens for therapeutic vaccines. So far, immunization with live recombinant vaccinia virus encoding HPV-16,18 E6 and E7 has been shown to induce immune responses and have clinical effects in patients with HPV-associated neoplasia (10,11).

Based on these facts, we decided to test the hypothesis that rVACV expressing biologically active Flt3L would show higher immunogenicity than control viruses expressing only a model antigen. Second, we wanted to assess how co-expression of Flt3L would influence anti-tumor activity of rVACV in the preventive and therapeutic arrangements of the *in vivo* experiment. To answer these questions, we took advantage of the well-described model of transplanted tumor cells expressing HPV16 E6 and E7 oncoproteins. Immunization with rVACV expressing HPV E7 leads to sufficient immunity to render mice resistant to subsequent challenge with E7-expressing tumor cells under optimal conditions. Thus, to determine the effects of hFLT3 on the induction of anti-tumor immunity, we generated live vaccinia viruses that express human Flt3L together with HPV E7 oncoprotein and determined their immunogenicity in mice. Our results might help in the development of new vaccinia virus-based vaccines and provide new information on Flt3L as an immune adjuvant.

## Material and methods

*Recombinant vaccinia viruses (rVACVs).* The coding sequence of a soluble isoform of Flt3 ligand (ID number - U29874) was expressed under the control of the early H5 promoter or strong synthetic E/L promoter by the recombinant vaccinia virus strain Praha, clone 13 (Fig. 1) (12). The plasmid pHUFLT3L obtained from Immunex (now a wholly owned subsidiary of Amgen) was digested with *EcoRI* and *StuI* and the fragment containing the cDNA of Flt3 ligand was ligated with pSC59-H5 (13) cleaved with the same enzymes yielding the pSC59-E/L-FL plasmid. Removal of the E/L promoter from this plasmid by subsequent digestion with *BamHI* and *EcoRI*, Klenow fragment treatment, and joining the molecule with T4 DNA ligase resulted in the second plasmid named pSC59-H5-FL. The plasmids were used for transfer of Flt3-L into the VACV genome in the thymidine kinase locus (TK) by the method described previously (14). For evaluation of the effect of Flt3-L on immunogenicity and immunotherapeutic potential of viral vectors against the growth of tumors, we prepared double recombinants where the E7 oncoprotein of human papillomavirus 16 in a highly immunogenic form of SigE7LAMP fusion protein is also coexpressed. In double recombinants, the Flt3-L coding sequence was inserted into vaccinia virus P13-SigE7LAMP expressing the fusion gene SigE7LAMP (Sig-signal sequence of the lysosome-associated membrane protein1 (LAMP1), E7-early protein of HPV16, LAMP-transmembrane and intracellular domain of LAMP1) (15). The viruses were denoted as P13-H5-FL-SigE7LAMP and P13-E/L-FL-SigE7LAMP. The control virus P13-SigE7LAMP TK- was prepared by recombination with plasmid p11K which contains the TK gene disrupted by the 11k promoter and the multiple cloning site. The virus P13-pS2S with expression of hepatitis B virus envelope antigen was described previously (16). Recombinant P13 viruses were grown in BSC40 cells. Viruses were purified by sucrose-gradient centrifugation (17) and titrated in CV-1 cells.

*Detection of Flt3L.* Human Flt3L in culture media and mouse sera was detected by ELISA (R&D Systems Inc.). To detect intracellular Flt3L, Hela cells infected with virus were



resuspended in 1 ml of fresh medium and lysed by freezing and thawing. Released Flt3L was determined in the supernatant separated by centrifugation.

**Cells.** HPV16 E6E7-expressing TC-1 cells, derived from C57BL/6 mouse (18), were kindly provided by T.C. Wu (Baltimore). BSC40, CV-1 and TC-1 cell lines were cultured in modified E-MEM (EPL) medium containing bovine serum growth-active proteins but no complete serum (19).

**Virus infection of mice.** Six-week-old C57Bl/6 (H-2<sup>b</sup>) female mice were obtained from Charles River, Germany. Animals were maintained under standard conditions at the National Institute of Public Health (Prague). The experiments were performed in compliance with Acts Nos. 246/92 and 77/2004 on animal protection against cruelty and Decree No. 311/97 of the Ministry of Health of the Czech Republic, on the care and use of experimental animals. Mice were injected intraperitoneally (i.p.) with 0.5 ml or intramuscularly (i.m.) with 0.1 ml PBS containing sonicated suspension of rVACV.

**Quantitative PCR (Q-PCR).** Mice were anesthetized with halothane (Narcotane, Léčiva, Praha) and sacrificed. The ovaries were dissected, washed in PBS and homogenized in 0.4 ml PBS using an Omni tissue homogenizer TH-220 (Cole-Parmer) with disposable probe tips, 65 mm. DNA was extracted from 50  $\mu$ l of homogenate by using the tissue protocol of the DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany). To produce RNA-free DNA the samples were treated for 2 min with 4  $\mu$ l of RNase A (100 mg/ml) added prior to the addition of buffer AL. Real-time quantitative PCR was performed on 2  $\mu$ l of total DNA in a 20- $\mu$ l reaction volume, 0.2 mM dNTPs, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, forward primer 5'-TTG GCA ATA GTC CGT GTA ATC-3' (300 nM), reverse primer 5'-ATA CTT AAT CAT GTC GCC GAC-3' (300 nM), and a Taqman probe 5'-CCA GTA ACA CGA GCT GGT GCT TGC TAG-3' BHQ1-FAM (250 nM). The reaction was analyzed by using the real-time quantitative PCR apparatus Rotorgene 3000, Corbett Research (Cambridge, UK). Plasmid DNA containing the amplified fragment was used to construct the standard curve and to quantitate the amount of viral DNA. The amount of viral DNA was normalized to the total amount of DNA in each sample. The detection limit was 7 genome copies per 100 ng of total DNA. Correlation analysis of VACV DNA and Flt3L in mouse samples was calculated by the non-parametric Spearman test.

**Assays of immune response.** T cell responses were detected as described previously (15). In brief, the spleens were removed from mice 12 days after the immunization. The response of IFN- $\gamma$ -producing cells was determined by ELISPOT-IFN $\gamma$  assay upon restimulation with H-2D<sup>b</sup> restricted peptides derived from HPV16 E7<sub>(49-57)</sub> (RAHYNIVTF) and VACV E3<sub>(140-148)</sub> proteins for 6 days *in vitro*. The values obtained for individual mice were analyzed by the unpaired t-test. E7-specific CD8<sup>+</sup> CTLs were detected by tetramer-staining assay using the R-phycoerythrin labeled H-2D<sup>b</sup>/E7<sub>(49-57)</sub> tetramer reagent (PeliMer, Sanquin, NL). The stained cells were analyzed on a Coulter-Epics XL flow cytometer (Beckman Instruments). The mean fluorescence values

obtained for peptide-restimulated and control cells were analyzed by the unpaired t-test. Detection of VACV specific antibodies was described earlier (20).

**Flow cytometry detection of surface molecules on splenocytes.** The spleens were mechanically disrupted and a single-cell suspension was acquired after red blood cell lysis using ACK buffer (0.15 M NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub> and 0.1 mM EDTA). Cells were stained with fluorescently conjugated mAbs CD3-FITC, CD4-FITC, CD8-FITC, CD11b-PE, CD11b-FITC, CD11c-PE, F4/80-PE and Gr-1(Ly6G-FITC). F4/80-PE mAb was purchased from ABD-Serotec and the other mAbs were supplied by BD Pharmingen (San Diego, USA). Expression of surface molecules was determined by flow cytometry using a Coulter-Epics XL flow cytometer (Beckman Instruments) and FlowJo (Tree Star, Inc., Ashland, USA) software.

**Tumor induction.** To induce the tumors, the TC-1 cells were injected subcutaneously (s.c.) into the back of C57Bl/6 mice. Tumor growth was measured weekly. Differences between survival curves were statistically analyzed by two-way ANOVA. All statistical analyses were performed using Prism 4.0 software (GraphPad Software, Inc, San Diego, USA).

## Results

**Expression of hFlt3-L from recombinant VACV.** To enhance immunogenicity of recombinant VACV, we constructed recombinant VACVs that express the Flt3L coding sequence. As the murine and human Flt3L cross-react, we decided to use the human Flt3L soluble isoform. The expression was controlled either by the early VACV H5 promoter or strong synthetic E/L promoter. We initially examined hFlt3L production *in vitro* using human FL-ELISA. HeLa cells (1.5x10<sup>5</sup>) were infected with P13-H5-FL-SigE7LAMP or P13-E/L-FL-SigE7LAMP at MOI 1 and cultured in 1 ml D-MEM. The production of intracellular and secreted Flt3L was followed up to 30 h post infection (p.i.) (Fig. 2A). The total amounts of hFlt3L produced were 143 pg/10<sup>3</sup> cells and 540 pg/10<sup>3</sup> cells for P13-H5-FL-SigE7LAMP and P13-E/L-FL-SigE7LAMP viruses, respectively. At a late stage, infection with P13-E/L-FL-SigE7LAMP resulted in a higher proportion of intracellular Flt3L compared to P13-H5-FL-SigE7LAMP with no observed accumulation of Flt3L inside cells.

In the next step, we determined the concentration of hFlt3-L in sera of mice infected intraperitoneally with 1x10<sup>6</sup> PFU (Fig. 2B). The mean concentrations of hFlt3-L on day 4 following virus administration were 92.3 $\pm$ 31.3 pg/ml and 49.3 $\pm$ 16.3 pg/ml for P13-H5-FL-SigE7LAMP and P13-E/L-FL-SigE7LAMP, respectively. On the following day, the hFlt3-L levels decreased and on day 6 all sera were negative. In repeated experiments we observed increase of hFlt3L levels in serum following infection with the peak on day 4. Control viruses without hFlt3L gene elicited no increase of hFlt3L concentration in serum at any interval after infection.

**VACV multiplication *in vivo*.** As we found a great difference in hFlt3-L production by P13-E/L-FL-SigE7LAMP after infection *in vitro* and *in vivo*, in the next step, we tested

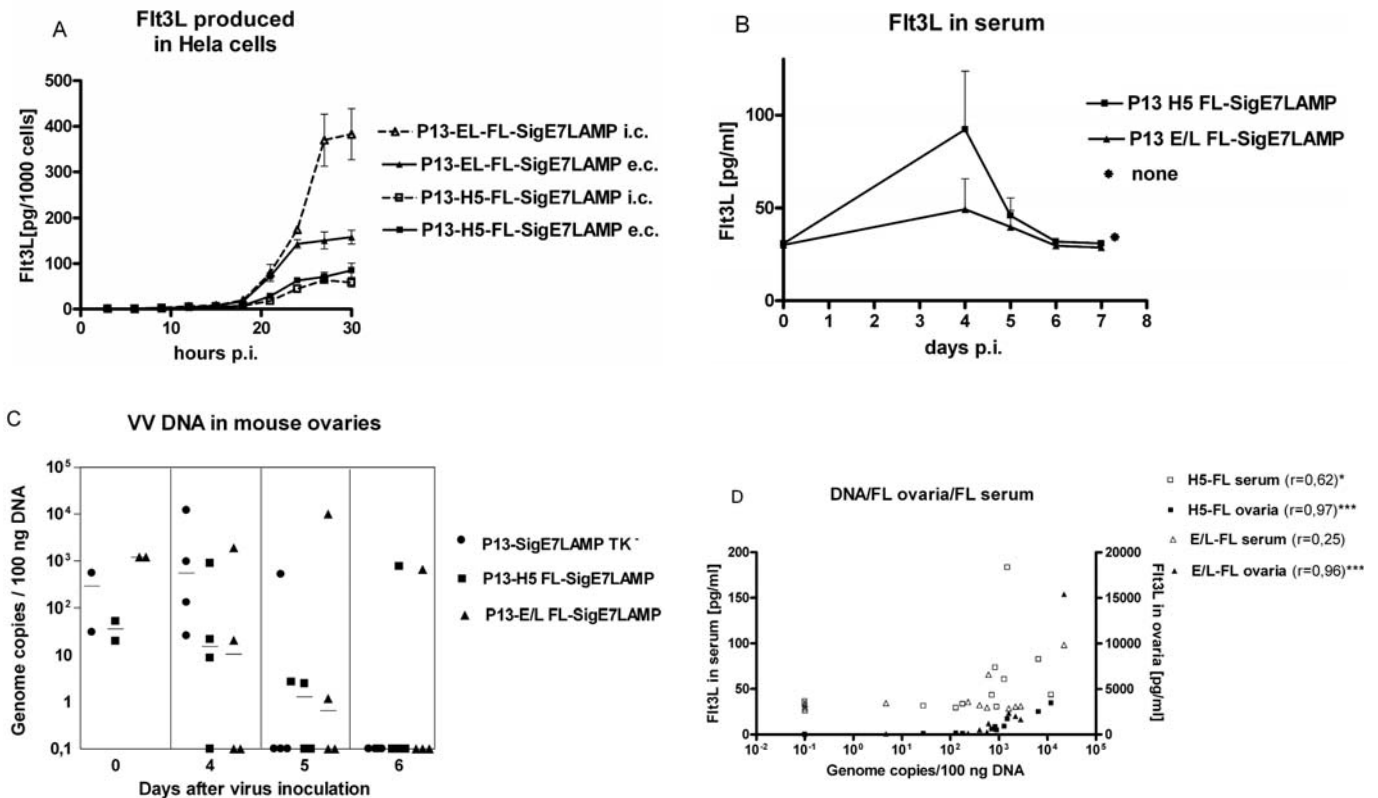


Figure 2. Characterisation of VACV expressing hFlt3L. (A) Production of hFlt3L *in vitro* was determined in HeLa cells infected at MOI 1 with either P13-E/L-FL-SigE7LAMP or P13-H5-FL-SigE7LAMP Flt3L. Concentration of hFlt3L was determined by ELISA in cell lysate and in medium at various intervals after infection. (B) Production of hFlt3L *in vivo* was determined by ELISA in sera of 6-week-old C57Bl/6 (H-2<sup>b</sup>) female mice inoculated i.p. with  $1 \times 10^6$  PFU of either P13-E/L-FL-SigE7LAMP or P13-H5-FL-SigE7LAMP on days 0, 4, 5, 6 and 7 p.i. (C) Replication of rVACV in the ovaries was determined in mice inoculated with P13-SigE7LAMP TK<sup>-</sup>, P13-H5-FL-SigE7LAMP or P13-E/L-FL-SigE7LAMP as in (B). DNA was determined in the ovaries by Q-PCR on days 0, 4, 5 and 6. (D) The animals from experiment (B) were also examined for VACV DNA and Flt3L in ovarian extracts. The graph shows correlation analysis between Flt3L in the serum and ovaries and multiplication of VACV in the ovaries in samples from days 4, 5 and 6.

whether hFlt3-L expression affected multiplication of recombinant viruses *in vivo*. The replication of viruses was quantified by Q-PCR assay in DNA isolated from the mouse ovaries. Mice were injected i.p. with  $1 \times 10^6$  PFU and the ovaries were collected on subsequent days. The results of repeated experiments were similar. The amount of viral DNA in ovaries increased gradually from inoculation to day 4 and then dropped. Comparison of multiplication of different viruses on days 0, 4, 5 and 6 is shown in Fig. 2C. The co-expression of the hFlt3L gene did not affect significantly multiplication of rVACV which expressed the SigE7LAMP fusion construct as the second insert. Distinct amounts of DNA detected repeatedly on day 0 were due to an increased amount of defective virus particles present in the inoculum. Multiplication of both Flt3L-expressing viruses correlated well (Fig. 2D) with the Flt3L produced in the ovaries on days 4, 5 and 6 ( $r=0.96-0.97$ ;  $p<0.0001$ ). Multiplication of P13-H5-FL-SigE7LAMP also positively correlated with Flt3L found in mouse serum ( $r=0.62$ ;  $p=0.03$ ) whereas release of Flt3L expressed by P13-E/L-FL-SigE7LAMP seemed to be suppressed because concentration of Flt3L in serum did not correlate with the amount of virus DNA in ovaries ( $r=0.25$ ,  $p=0.4$ ).

*Coexpression of hFlt3-L increased the immune response induced by rVACVs in mice.* We assessed whether hFlt3L

had any effect on specific CD8<sup>+</sup> T cell responses against antigens expressed by the same virus. Mice were injected i.p. with a single dose of  $3 \times 10^6$  PFU of P13-SigE7LAMP TK<sup>-</sup>, P13-H5-FL-SigE7LAMP or P13-E/L-FL-SigE7LAMP. The splenocytes were collected at two intervals: 12 days or 5 weeks after infection. The cells were cultured for 6 days with immunodominant nona-peptides derived from papilloma virus 16 early protein E7<sub>(49-57)</sub> and from vaccinia virus early protein E3<sub>(140-148)</sub>. The T cell response was determined by ELISPOT-IFN $\gamma$  and E7-tetramer assays. As shown in Fig. 3, coexpression of hFlt3L increased the frequency of antigen-specific T cells detected by ELISPOT-IFN $\gamma$  (A) and tetramer (B) assays when collected 12 days after immunization. However, the enhancing effect of hFlt3-L coexpression on cellular immunity was only observed at the early interval. Five weeks after immunization, similar HPV16-E7-specific response to restimulation with peptide was induced by all three recombinants (C and D). To find out whether hFlt3L coexpression also affected the humoral immune response against vaccinia virus proteins, the mouse sera were tested by ELISA for the presence of anti-VACV antibodies (Fig. 3E). The mean absorbance values were  $0.30 \pm 0.09$  SE,  $0.27 \pm 0.04$  SE and  $0.32 \pm 0.06$  SE for P13-SigE7LAMP TK<sup>-</sup>, P13-H5-FL-SigE7LAMP and P13-E/L-FL-SigE7LAMP, respectively. Though no significant differences in total anti-VACV immunoglobulin were observed, antibody responses elicited by P13-

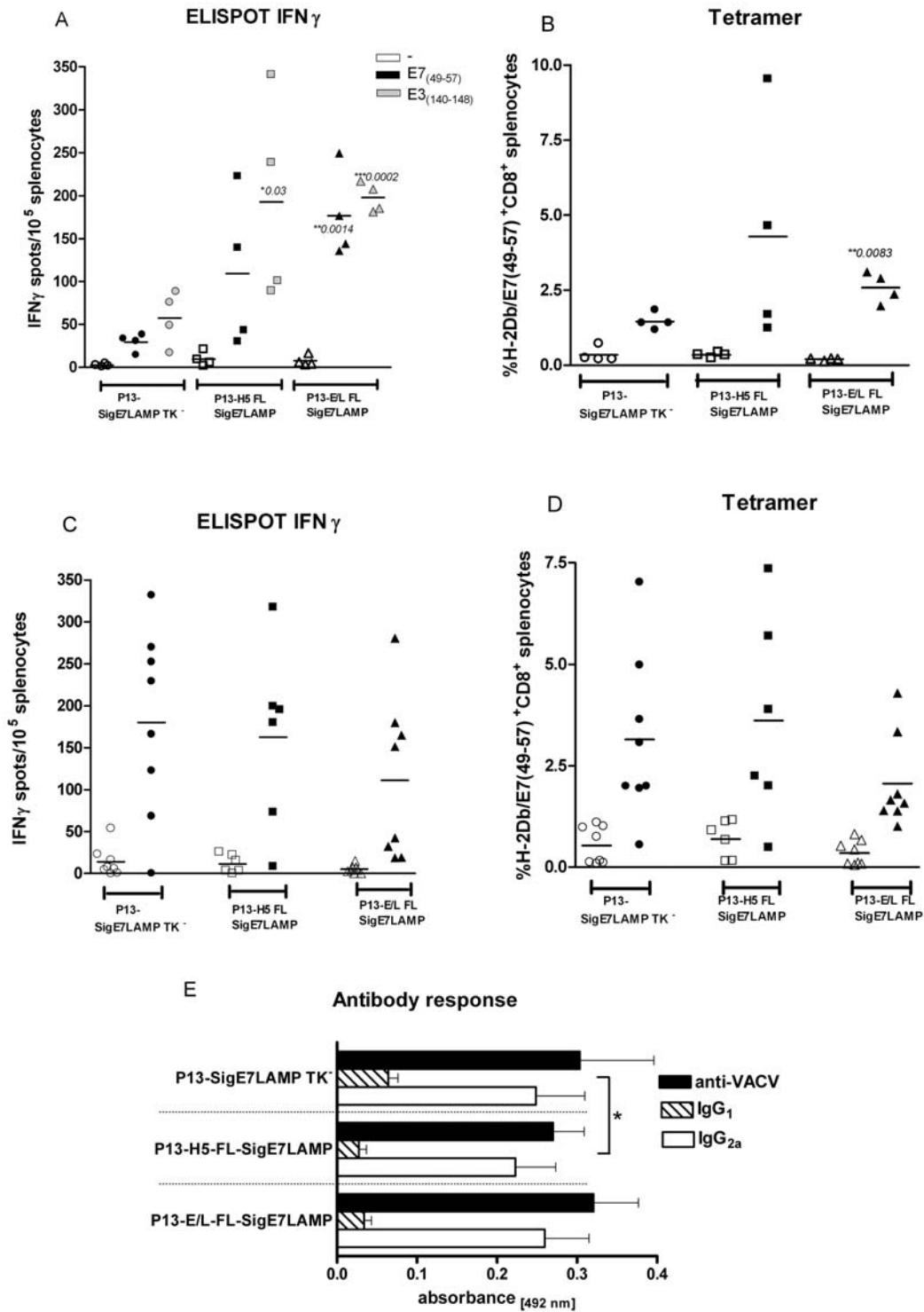


Figure 3. T cell response induced in mice by immunization with rVACVs expressing hFlt3L. Six-week-old C57Bl/6 (H-2<sup>b</sup>) female mice were injected i.p. with one dose  $3 \times 10^6$  PFU of P13-SigE7LAMP TK<sup>-</sup>, P13-H5-FL-SigE7LAMP or P13-E/L-FL-SigE7LAMP. The response of CD8<sup>+</sup> T cell lymphocytes specific for HPV16-E7 (full symbols) and VACV-E3 protein (shaded symbols) in individual mice was determined either 12 days (A and B) or 5 weeks (C and D) later by IFN- $\gamma$  ELISPOT (A and C) and tetramer (B and D) assays. The antibody response against VACV was measured in sera collected 5 weeks after virus administration (E). The columns represent mean  $\pm$  SEM. The data were analyzed by two-way ANOVA. P-values stand for significance of the difference from the P13-SigE7LAMP TK<sup>-</sup> virus.

H5-FL-SigE7LAMP virus were the lowest. When we analysed IgG isotypes in the anti-VACV humoral immune response, we found again that P13-H5-FL-SigE7LAMP elicited a significantly lower IgG1 response than P13-SigE7LAMP TK<sup>-</sup> control virus.

*Coexpression of hFlt3L improved preventive and therapeutic immunization against the growth of TC-1 tumors.* Given the significant enhancement that we found in the T cell response, we examined whether hFlt3L coexpression during immunization could also affect protection against the subsequent

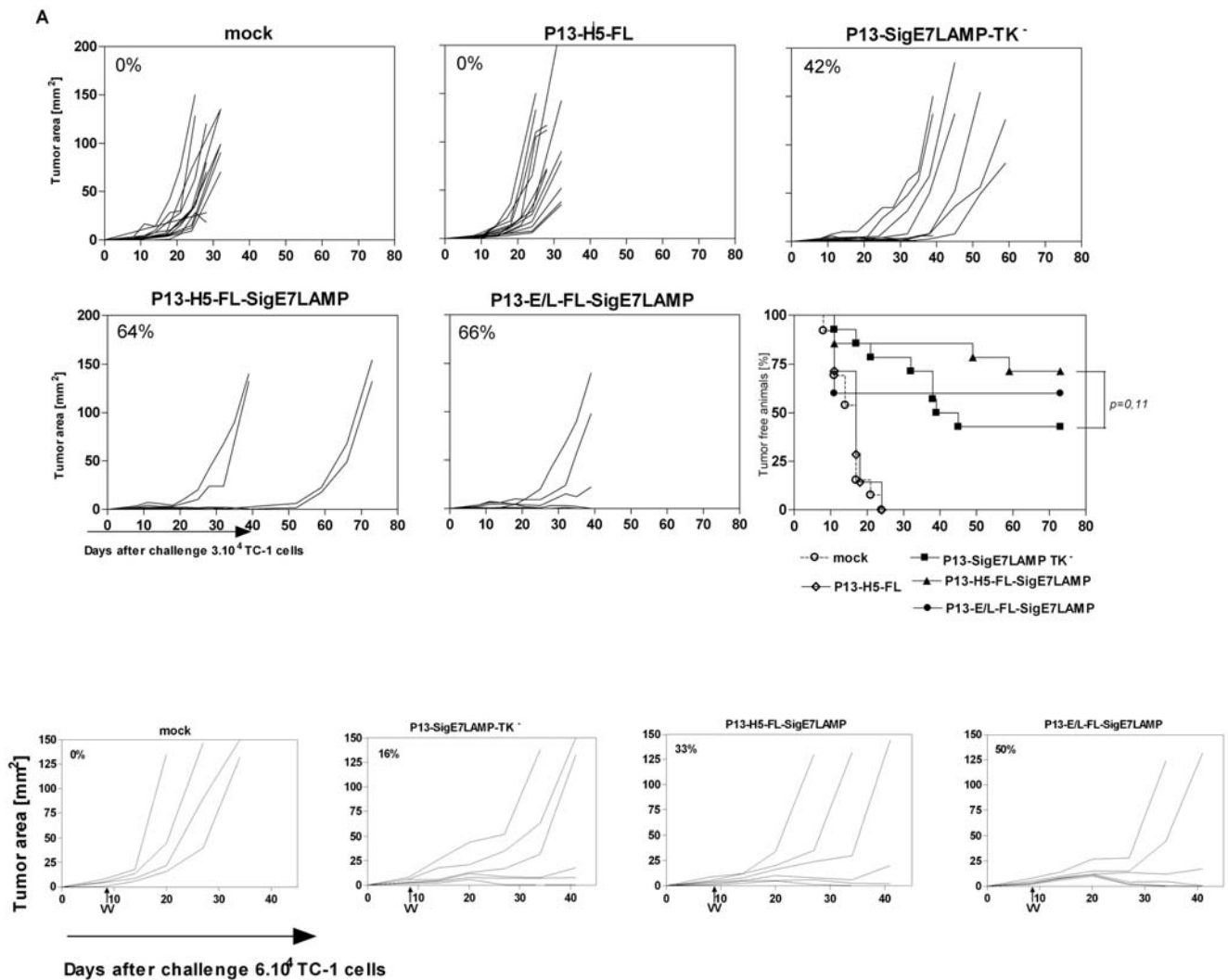


Figure 4. The effect of hFlt3L coexpression on the protective and therapeutic anti-tumor effects of immunization with rVACV. (A) Six-week-old C57Bl/6 (H-2<sup>b</sup>) female mice (n=14) were injected i.m. with one dose of 1x10<sup>6</sup> PFU of either P13-SigE7LAMP TK<sup>-</sup>, P13-H5-FL-SigE7LAMP, P13-E/L-FL-SigE7LAMP, P13-H5-FL or mock infected. Two weeks after immunization, the animals were challenged s.c. with 3x10<sup>4</sup> TC-1 tumor cells and the growth of tumors was monitored up to 73 days. (B) For evaluation of the therapeutic efficacy of double recombinants, mice (n=6) were injected s.c. with 6x10<sup>4</sup> TC-1 cells. Nine days later, the animals were once immunized i.p. with 1.10<sup>6</sup> PFU P13-SigE7LAMP TK<sup>-</sup>, P13-H5-FL-SigE7LAMP or P13-E/L-FL-SigE7LAMP or mock infected. The growth of tumors in individual animals is shown in separate graphs for each group and the fraction of tumor-free mice at the end of the experiment is indicated in the upper left corner of each graph. The data were statistically analyzed by comparison of survival curves of tumor-free animals (A) using the log-rank test. Representative results from two out of four independent challenge experiments are shown.

formation of TC-1 tumors expressing the E7 oncoprotein and whether treatment with the double recombinants could induce regression of already formed tumors. In the preventive immunization scheme, mice were immunized with a single i.m. dose of 1x10<sup>6</sup> PFU rVACV and they were challenged with 3x10<sup>4</sup> TC-1 cells s.c. two weeks later. Immunization with P13-H5-FL-SigE7LAMP significantly inhibited tumor formation and slowed tumor growth compared with the P13-SigE7LAMP TK<sup>-</sup> virus (survival curve, *p*=0.11) (Fig. 4A). Inoculation of P13-H5-FL virus, which does not express E7 antigen, had no effect on the growth of tumors in comparison with mock-infected mice. Next, we determined the effect of hFlt3L coexpression on therapeutic immunization with rVACV. Mice were injected s.c. with 6x10<sup>4</sup> TC-1 cells 9 days later. When every mouse had a tumor, a single i.p. dose of 1x10<sup>6</sup> PFU rVACV was given. Immunization with all three recombinants inhibited tumor growth; nevertheless,

the highest tumor regression (3/6) was induced by P13-E/L-FL-SigE7LAMP even though the differences were not statistically significant. Also P13-H5-FL-SigE7LAMP increased the proportion of tumor-free mice (2/6) in comparison with the P13-SigE7LAMP TK<sup>-</sup> virus (1/6) (Fig. 4B).

*Coexpression of hFlt3L under H5 promoter protected mice from expansion of myeloid CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> cells.* To determine the effect of hFlt3L expressed by P13-SigE7LAMP on the immune cells, we quantified the major subpopulations of cells and assessed their maturation status in the spleens of infected mice by flow cytometry using surface markers CD3, CD4, CD8, CD11b, CD11c, F4/80 and Gr-1 (Ly6G) on days 4, 8, 12, 20 and 35 after administration of 1x10<sup>6</sup> PFU rVACV. Injection of each of the viruses induced an increase in spleen cellularity on days 4 (193%) and 8 (174%) comparatively to non-injected mice (100%). The spleens



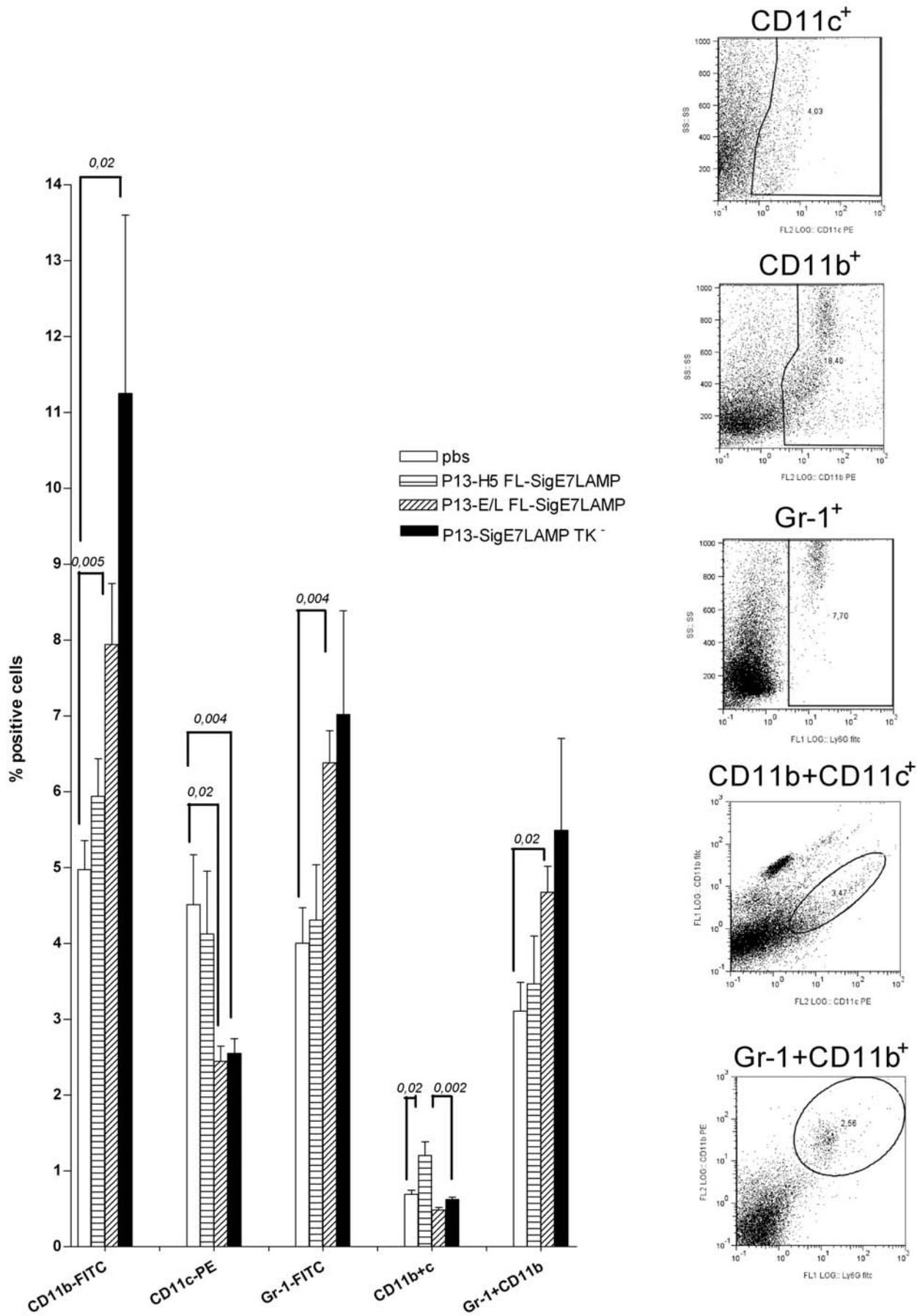


Figure 5. The effect of Flt3L coexpression on surface molecules of splenocytes of infected mice. Six-week-old C57Bl/6 (H-2<sup>b</sup>) female mice (n=6) were inoculated i.p. with 1x10<sup>6</sup> PFU of P13-H5-FL-SigE7LAMP, P13-E/L-FL-SigE7LAMP, P13-SigE7LAMP TK<sup>-</sup> or mock infected. Splenocytes were collected and analyzed by flow cytometry 5 weeks after infection using Gr-1(Ly6G), CD11b and CD11c specific MAb. The p-values represent significant differences. Insets on the right side show examples of detection of specific markers on the surface of cells.

normalized by day 12. All three viruses induced temporary depletion of CD4<sup>+</sup> cells during the phase of intensive virus multiplication between days 4 and 8, which was followed by an increase in CD4<sup>+</sup> counts on day 20 that exceeded non-significantly those in naïve mice found on day 0. The population of Gr-1<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup> and double positive cells in the 3 groups did not significantly change in comparison with naïve mice until day 20. However, an increase in Gr-1<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup> and double positive cells was observed 5 weeks after infection with P13-E/L-FL-SigE7LAMP which induced low levels of Flt3L in serum only and with P13-SigE7LAMP TK<sup>-</sup> control virus. On the other hand, the production of Flt3L by P13-H5-FL-SigE7LAMP protected animals from expansion of Gr-1<sup>+</sup> and CD11b<sup>+</sup> cells (Fig. 5). Moreover, P13-H5-FL-SigE7LAMP virus also induced an increase in the CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> cell population which is referred to as spleen dendritic cells. The other surface molecules CD3, CD8, and F4/80 were not influenced by virus infection at any interval.

## Discussion

In this study, we examined the immunomodulating effect of Flt3L expression and its impact on therapeutic anti-cancer activity of immunization with vaccinia virus recombinants expressing E7 antigen of human papilloma virus 16.

Recombinant vaccinia viruses expressing GM-CSF, a growth factor of myeloid dendritic cells, have already been tested with success in clinical immunotherapy of tumors. For the same purpose, we have constructed vaccinia virus recombinants expressing Flt3L which is known to induce expansion of plasmacytoid dendritic cells *in vitro* and to have adjuvant and anti-tumor activity *in vivo*. The gene encoding the secretory form of Flt3L was regulated by two promoters of different strengths during the early and late periods of infection. We observed that despite very high expression of Flt3L from the synthetic E/L promoter *in vitro*, the P13-E/L-FL-SigE7LAMP induced low levels of Flt3L in serum of inoculated mice. The peak of virus DNA in the ovaries coincided with the maximum serum Flt3L levels and appeared 4-5 days after infection of mice. It has been shown earlier that high levels of IL12 produced by recombinant vaccinia virus suppressed substantially virus multiplication, which resulted in lower cytokine production *in vivo* than *in vitro* (21,22). To decide whether low Flt3L production by P13-E/L-FL-SigE7LAMP could be explained by this mechanism, we quantitated viral DNA isolated from the ovaries of infected animals and found the replication levels of all three viruses to be similar. We have not observed significantly different levels of VACV-specific antibodies in mice infected either with P13-E/L-FL-SigE7LAMP or P13-SigE7LAMP which can be regarded as a second indirect evidence of unrestricted multiplication *in vivo*. We have demonstrated that co-expression of the hFlt3L coding sequence has not significant effect on multiplication of recombinant vaccinia virus expressing SigE7LAMP.

Next, we characterized the adjuvant activity of Flt3L when coexpressed by a replication-competent vaccination vector. We found that the response of antigen specific CD8<sup>+</sup> T cells expressed by the double recombinant was enhanced

by coexpression of Flt3L and that the enhancing effect depended on the amount of Flt3L released from infected cells *in vivo*. P13-H5-FL-SigE7LAMP, which produced the highest amount of Flt3L *in vivo*, was the most immunogenic of all three viruses. An enhanced CD8<sup>+</sup> response was found to the peptide derived from SigE7LAMP protein which was expressed under the 7.5k early/late promoter, and also to VACV E3 protein that is controlled by the early promoter of the E3L gene. It was noted, that enhancing effect of Flt3L was higher in population of functional IFN $\gamma$  secreting cells, detected by ELISPOT, than in population positive for phenotypic markers in tetramer assay, which could include exhausted and anergic CD8<sup>+</sup> T cells. The enhanced response of CD8<sup>+</sup> T cells was accompanied by a lower antibody response particularly of IgG1 isotype. Such findings indicate that Flt3L coexpression shifted the immune response elicited by VACV towards Th1 type. In the present study, the enhancing effect of Flt3L was observed with replicating virus where the cytokine expression spanned several days. We also prepared double recombinant MVA-H5-FL-SigE7LAMP (not shown) that only insignificantly enhanced the cellular response. Similar results for Flt3L-expressing MVA were recently reported by Chavan *et al* (3). We have shown previously that *in vivo* expression of another cytokine (IL12) directed by non-replicating MVA-IL12 virus usually ceases several hours after infection, whereas cytokine expression driven from replicating P13-IL12 can be sustained for several days (21). It is known that the major expansion of DC1 and stimulation of Th1 subset require repeated administration of Flt3L, preferably for 10 days, since a single dose of Flt3L has no effect (23). Analogously, our results indicate that enhancing effects of Flt3L coexpression cannot be expected after administration of a single dose of non-replicating pox-virus but only when replicating virus is used for expression, with Flt3L concentration still increased five days after infection as reported here.

The enhancement that we found in the CD8<sup>+</sup> T cell response against E7 oncoprotein of HPV16, correlated with the anti-tumor effect against the growth of TC-1 tumors in mice. From previous experiments, we knew that immunization with 10<sup>6</sup> PFU of P13-SigE7LAMP virus *i.p.* completely inhibited the growth of TC-1 tumors if administered either two weeks before the challenge or one day after immunization. Therefore, we utilized the less effective intramuscular route for preventive immunization, more suitable for use in larger animals and humans. In the therapeutic experiments, the treatment by *i.p.* injection started nine days after the challenge when all animals had already developed tumors with a mean area of 4.19 mm<sup>2</sup> (SEM=0.4). Treatment with Flt3L-expressing recombinants induced regression of tumors smaller than 4.0 mm<sup>2</sup> whereas larger tumors of 4-10 mm<sup>2</sup> escaped the therapy.

Intraperitoneal injection of any of the three recombinants caused a temporary increase in spleen cellularity comparatively to non-injected mice. Differences in expression of several lineage markers on splenocytes were not significant except for Gr-1, CD11b and CD11c molecules. At a late interval, we observed increased CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> populations in the spleen of animals infected with control P13-SigE7LAMP virus. The CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> population was less abundant after P13-E/L-

FL-SigE7LAMP and was the smallest after immunization with P13-H5-FL-SigE7LAMP which was the best Flt3L producer. Recombinant vaccinia virus is known to induce immunosuppression of adaptive responses mediated by a specialized population of myeloid suppressor cells (MSC) that express Gr-1 and CD11b markers (24). The decrease or absence of MSCs in the secondary lymphoid organ could contribute to the enhancement of immunogenicity and anti-tumor effects of rVACV expressing the Flt3L genes. The second significant difference was the increase in CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> dendritic cells, induced only by immunization with P13-H5-FL-SigE7LAMP virus.

In summary, our results suggest that immunogenicity and anti-tumor activity of VACV expressing tumor antigen HPV16 E7 could be enhanced by coexpression of the soluble form of Flt3L. The Flt3L expression under the strong early VACV H5 promoter is able to inhibit expansion of MCS in the immunized mice and to increase the amount of dendritic cells, which could contribute to anti-tumor effect of immunization.

### Acknowledgements

This work was supported by grants NR 9238-3/2007 and MZ0UHKT2005 of the Ministry of Health of the Czech Republic and grant 310/05/H5333 of the Grant Agency of the Czech Republic.

### References

- Kim JH, Oh JY, Park BH, Lee DE, Kim JS, Park HE, Roh MS, Je JE, Yoon JH, Thorne SH, Kim D and Hwang TH: Systemic armed oncolytic and immunologic therapy for cancer with JX-594, a targeted poxvirus expressing GM-CSF. *Mol Ther* 14: 361-370, 2006.
- Feder-Mengus C, Schultz-Thater E, Oertli D, Marti WR, Heberer M, Spagnoli GC and Zajac P: Non-replicating recombinant vaccinia virus expressing CD40 ligand enhances APC capacity to stimulate specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell responses. *Hum Gene Ther* 16: 348-360, 2005.
- Chavan R, Marfatia KA, An IC, Garber DA and Feinberg MB: Expression of CCL20 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, but not Flt3-L, from modified vaccinia virus ankara enhances antiviral cellular and humoral immune responses. *J Virol* 80: 7676-7687, 2006.
- Flanagan K, Glover RT, Horig H, Yang W and Kaufman HL: Local delivery of recombinant vaccinia virus expressing secondary lymphoid chemokine (SLC) results in a CD4 T cell dependent antitumor response. *Vaccine* 22: 2894-2903, 2004.
- Suss G and Shortman K: A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis. *J Exp Med* 183: 1789-1796, 1996.
- Pulendran B, Smith JL, Jenkins M, Schoenborn M, Maraskovsky E and Maliszewski CR: Prevention of peripheral tolerance by a dendritic cell growth factor: flt3 ligand as an adjuvant. *J Exp Med* 188: 2075-2082, 1998.
- Lynch DH, Andreasen A, Maraskovsky E, Whitmore J, Miller RE and Schuh JC: Flt3 ligand induces tumor regression and anti-tumor immune responses *in vivo*. *Nat Med* 3: 625-631, 1997.
- Fernandez NC, Lozier A, Flament C, Ricciardi-Castagnoli P, Bellet D, Suter M, Perricaudet M, Tursz T, Maraskovsky E and Zitvogel L: Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses *in vivo*. *Nat Med* 5: 405-411, 1999.
- zurHausen H: Papillomaviruses in human cancers. *Proc Assoc Am Physicians* 111: 581-587, 1999.
- Davidson EJ, Boswell CM, Sehr P, Pawlita M, Tomlinson AE, McVey RJ, Dobson J, Roberts JS, Hickling J, Kitchener HC and Stern PL: Immunological and clinical responses in women with vulvar intraepithelial neoplasia vaccinated with a vaccinia virus encoding human papillomavirus 16/18 oncoproteins. *Cancer Res* 63: 6032-6041, 2003.
- Baldwin PJ, van der Burg SH, Boswell CM, Offringa R, Hickling JK, Dobson J, Roberts JS, Latimer JA, Moseley RP, Coleman N, Stanley MA and Sterling JC: Vaccinia-expressed human papillomavirus 16 and 18 e6 and e7 as a therapeutic vaccination for vulvar and vaginal intraepithelial neoplasia. *Clin Cancer Res* 9: 5205-5213, 2003.
- Kutinova L, Ludvikova V, Simonova V, Otavova M, Krystofova J, Hainz P, Press M, Kunke D and Vonka V: Search for optimal parent for recombinant vaccinia virus vaccines. Study of three vaccinia virus vaccinal strains and several virus lines derived from them. *Vaccine* 13: 487-493, 1995.
- Nemeckova S, Stranska R, Subrtova J, Kutinova L, Otahal P, Hainz P, Maresova L, Sroller V, Hamsikova E and Vonka V: Immune response to E7 protein of human papillomavirus type 16 anchored on the cell surface. *Cancer Immunol Immunother* 51: 111-119, 2002.
- Perkus ME, Panicali D, Mercer S and Paoletti E: Insertion and deletion mutants of vaccinia virus. *Virology* 152: 285-297, 1986.
- Mackova J, Kutinova L, Hainz P, Krystofova J, Sroller V, Otahal P, Gabriel P and Nemeckova S: Adjuvant effect of dendritic cells transduced with recombinant vaccinia virus expressing HPV16-E7 is inhibited by co-expression of IL12. *Int J Oncol* 24: 1581-1588, 2004.
- Kutinova L, Nemeckova S, Hamsikova E, Zavadova H, Ludvikova V, Broucek J, Kunke D, Konig J, Zakharova LG and Pashvykina GV: Hepatitis B virus proteins expressed by recombinant vaccinia viruses: influence of preS2 sequence on expression surface and nucleocapsid proteins in human diploid cells. *Arch Virol* 134: 1-15, 1994.
- Joklik WK: The purification of four strains of poxvirus. *Virology* 18: 9-18, 1962.
- Lin KY, Guarneri FG, Staveley-O'Carroll KF, Levitsky HI, August JT, Pardoll DM and Wu TC: Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. *Cancer Res* 56: 21-26, 1996.
- Michl J: Metabolism of cells in tissue culture *in vitro*. I. The influence of serum protein fractions on the growth of normal and neoplastic cells. *Exp Cell Res* 23: 324-330, 1961.
- Hamsikova E, Zavadova H, Kutinova L, Ludvikova V, Krchnak V, Nemeckova S and Vonka V: Priming effect of recombinant vaccinia virus coding for the middle hepatitis B surface antigen. *Arch Virol* 113: 283-289, 1990.
- Nemeckova S, Sroller V, Hainz P, Krystofova J, Smahel M and Kutinova L: Experimental therapy of HPV16 induced tumors with IL12 expressed by recombinant vaccinia virus in mice. *Int J Mol Med* 12: 789-796, 2003.
- Gherardi MM, Ramirez JC, Rodriguez D, Rodriguez JR, Sano G, Zavala F and Esteban M: IL-12 delivery from recombinant vaccinia virus attenuates the vector and enhances the cellular immune response against HIV-1 Env in a dose-dependent manner. *J Immunol* 162: 6724-6733, 1999.
- Parajuli P, Mosley RL, Pisarev V, Chavez J, Ulrich A, Varney M, Singh RK and Talmadge JE: Flt3 ligand and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor preferentially expand and stimulate different dendritic and T-cell subsets. *Exp Hematol* 29: 1185-1193, 2001.
- Bronte V, Wang M, Overwijk WW, Surman DR, Pericle F, Rosenberg SA and Restifo NP: Apoptotic death of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes after immunization: induction of a suppressive population of Mac-1<sup>+</sup>/Gr-1<sup>+</sup> cells. *J Immunol* 161: 5313-5320, 1998.

## 5. DISKUZE

Předkládaná dizertační práce byla zaměřena na vývoj a především stanovení účinnosti rekombinantních vakcín proti následujícím nádorovým antigenům: (a) WT1, autologní protein, jehož zvýšená exprese anebo mutovaná forma je typická pro různé solidní a hematologické nádory; (b) fuzní protein BCR-ABL, charakteristický pro hematologické onkologické onemocnění CML; (c) virový onkoprotein HPV16-E7, jehož působení (ve spolupráci s HPV16-E6) vede k vzniku cervikálního karcinomu po perzistentní infekci rizikovým typem papilomaviru. Byly připraveny různé typy vakcín: genetické (DNA, rVACV), VLP a peptidové. Jejich účinnost se sledovala *in vivo* na myším modelu na základě dvou hlavních kritérií. Prvním bylo pozorování zpomalení růstu, resp. ústupu nádorů. Druhým, a zároveň mým hlavním úkolem, byla detekce protinádorové imunity, kterou tyto vakcíny vyvolávají.

Za nejdůležitější složku imunity v boji organismu proti nádoru jsou považovány vakcínami indukované efektorové buňky, především CD8<sup>+</sup> CTL, a jejich aktivita. Na sledování funkčnosti T-lymfocytů indukovaných některou z připravených vakcín jsem využívala převážně test ELISPOT-IFN $\gamma$ . Princip této metody, její výhody a nevýhody jsem popsala v kapitole 3.6. Přítomnost IFN $\gamma$  vede ke zvýšení exprese komplexů antigenní peptid/MHC molekula I. třídy na povrchu nádorových buněk, a tím k aktivaci efektorových a paměťových T-lymfocytů. I když je sekrece tohoto cytokinu typická i pro jiné složky imunity (např. NK-buňky), jeho nejvyšší hladiny jsou produkovány aktivovanými T-lymfocyty (281).

Stanovení buněčné imunity jsem obvykle prováděla *in vitro* ve splenocytech. I když jsem zkoušela i jiné časové intervaly pro izolaci těchto buněk (4, 8, 12, 14 dní po imunizaci), jako nejvhodnější se potvrdila doba 12 dní po imunizaci myši poslední dávkou vakcíny. V tomto intervalu byly naměřené hodnoty nejvyšší, pak už začaly klesat.

Jelikož nestimulované T-lymfocyty produkují nepatrné množství cytokinů, je potřebná jejich stimulace *in vitro* s vybranými peptidy (274). Dalšími důležitými faktory jsou příliš nízké množství CTL v čerstvě vyizolovaných splenocytech (J. Macková, osobní sdělení) a různě silné imunogeny, které jsou součástí zkonstruovaných vakcín. Na základě těchto poznatků jsem v každém experimentu srovnávala buněčnou imunitu naměřenou po 20 hod. (*ex vivo*) a po několika denní kultivaci splenocytů s daným peptidem. ELISPOT *ex vivo* nejlépe vypovídá o stavu vakcínou indukované protinádorové imunity

v době usmrcení imunizované myši. Avšak pokud byla zvířeti aplikována vakcína obsahující slabší imunogen, nebo pokud jsem na stimulaci splenocytů použila peptidy s nižší afinitou pro H2-D<sup>b</sup>, bylo potřebné inkubaci s peptidem prodloužit. Jako nejvhodnější se ukázala inkubace 6 dní. I když jsou lymfoidní linie buněk známé svojí krátkodobou životností *in vivo* i *in vitro*, zdá se, že více denní inkubace s daným peptidem vede k selekci a proliferaci hlavně těch klonů CTL a paměťových T-lymfocytů, které jsou specifické pro daný epitop. Pokud jsou klony s daným peptidem kultivovány příliš dlouho, nebo ve vysokých koncentracích tohoto peptidu, může se výrazně zvýšit úmrtnost těchto buněk. Pozorování se pak ve výsledku jeví jako falešně negativní.

Jako stimulační peptidy jsem používala převážně CTL epitopy, specifické pro MHC molekuly I. třídy. S ohledem na výše popsanou extrémní citlivost množících se CTL na koncentraci peptidu v kultivačním mediu a na jejich různou afinitu k H2-D<sup>b</sup>, jsem nejdříve musela vybrat vhodný peptid-epitop a stanovit jeho optimální koncentraci pro experimenty *in vitro*. CTL epitopy byly vybrány na základě literatury a predikce použitím algoritmů RANKPEP a SYFPEITHI. Detekce HPV16-E7-specifické T-buněčné imunitní odpovědi byla v naší laboratoři už zavedená (H-2D<sup>b</sup> peptid HPV16-E7<sub>49-57</sub>, tj. RAHYNIVTF) (206). Optimalizaci pro stanovení WT1-specifické T-buněčné imunity popisují v podkapitole 5.1 a VACV-specifické imunity v podkapitole 5.3.

Při sledování imunologického účinku vakcín namířených proti HPV16-E7 byl test ELISPOT-IFN $\gamma$  doprovázen detekcí HPV16-E7-specifických CTL pomocí průtokové cytometrie, kde jsem měřila buňky pozitivní na marker CD8 a na fluorescenčně značený (R-phycoerythrin) tetramer H-2D<sup>b</sup>/E7<sub>49-57</sub> (Pelimer, Sanquin, NL). Jelikož ELISPOT-IFN $\gamma$  dokáže rozlišit jedinou IFN $\gamma$ + buňku z 500 000, je tato metoda citlivější než stanovení pomocí průtokové cytometrie. Ovšem výhodou měření na průtokovém cytometru je zase rozlišení CD4+ a CD8+ T-lymfocytů produkujících daný cytokin v populaci testovaných buněk, což neumožňuje test ELISPOT. V některých experimentech jsem sledovala také imunosupresivní faktory, které mohly negativně ovlivňovat efektivitu připravených protinádorových vakcín. Jednalo se především o detekci populace Treg prostřednictvím fluorescenčně značených protilátek proti markerům CD4, CD25, FoxP3, a to hlavně v buňkách lymfatických uzlin.



### 5.1. Vývoj vakcíny proti nádorům exprimujícím WT1 a studium efektorových mechanismů protinádorové imunitní odpovědi.

Původním záměrem první části této dizertační práce byla konstrukce vakcíny pro terapii WT1+ nádoru, která by byla použitelná na léčbu u všech pacientů, bez ohledu na typ HLA. Dnes úspěšně aplikované peptidové vakcíny jsou totiž omezeny na terapii pacientů s konkrétními HLA molekulami, kterými jsou tyto epitopy prezentovány. Proto byly v naší laboratoři připraveny DNA a rVACV vakcíny, jejichž účinnost už byla u nás prokázána v terapii nádorů pozitivních na onkoproteiny HPV16-E6 a HPV16-E7 (251,273,312). Zkonstruované genetické vakcíny exprimovaly fúzní gen GUS-WT1. Sestává z pomocného genu pro  $\beta$ -glukuronidázu z bakterie *E. coli* (GUS), jenž udílí fúzovaným antigenům větší imunogennost (311) a z fragmentu dlouhého 155 aminokyselin, mezi 94. a 249. aminokyselinou myšího proteinu WT1. Tento úsek byl vybrán hlavně proto, že obsahuje vícero CTL epitopů specifických pro H-2D<sup>b</sup> myší molekuly: WT1<sub>126-135</sub> (RMFPNAPYL), WT1<sub>136-144</sub> (SCLESQPTI) a WT1<sub>235-243</sub>(CMTWNQMNL) (96,260). Dalšími podstatnými vlastnostmi vybrané sekvence je vysoká homologie (96% aminokyselinové sekvence) myšího proteinu s molekulou lidského proteinu WT1 a podobná tkáňová distribuce a funkce (38,91).

Byly zkonstruovány 2 typy DNA vakcín: pBSC-GUS-WT1 a pBSC-SS/GUS-WT1. Druhá jmenovaná kromě fuzního proteinu GUS-WT1 obsahovala signální sekvenci SS odvozenou z adenovirového proteinu E3, jež měla zabezpečit zacílení peptidů (vzniklých degradací exprimovaného proteinu GUS-WT1 v cytoplazmě) do ER a ulehčit jejich prezentaci prostřednictvím MHC molekul I. třídy.

Pro konstrukci protinádorových vakcín se v naší laboratoři používá VACV kmen Praha 13 (P13). Vznikl klonováním ze směsné vakcíny proti pravým neštovicím, která byla používána v Československé republice. Jedná se o virus, schopný replikace v celé škále buněčných linií, s vysokou imunogenností a nízkou virulencí pro myši C57Bl/6 (181,200). Jeho virulenci je možné ještě více snížit inzercí rekombinantního genu do genomu viru (180). Inzerty jsme vkládali pod dva typy VACV promotorů: H5 (indukuje expresi v časných fázích replikačního cyklu viru) nebo syntetický E/L (indukuje expresi v pozdějších fázích replikačního cyklu viru). Ukázalo se totiž, že různé inzerty pod těmito promotory jsou exprimovány rVACV v odlišných koncentracích. Podobně byly zkonstruovány dva typy rVACV vakcín s expresí GUS-WT1 řízené těmito promotory.

Nebyly zjištěny výrazné rozdíly v produkci tohoto fúzního proteinu rVACV *in vitro*, ani *in vivo* (nepublikovaná data).

DNA a rVACV vakcíny nebyly dostatečně imunogenní, proto byly do studie zahrnuty i peptidové vakcíny odvozené od myšího proteinu WT1, u kterých byla předpovězena nebo popsána funkce epitopu specifického pro MHC molekuly I. a/nebo II. třídy (WT1<sub>126-135</sub>, WT1<sub>122-140</sub>, WT1<sub>122-144</sub>; tj. Tabulka 3.5.4).

Nejdříve byly na myších C57Bl/6 srovnány schopnosti různých adjuvantních látek napomáhat vzniku specifické odpovědi na peptidy, a to: nekompletní Freundým adjuvans (IFA) ve směsi s CpG ODN, poly-L-arginin (pR) ve směsi s CpG ODN a pro zvýšení aktivace pomocných Th-lymfocytů byla vakcína doplněna pomocným epitopem z tetanického toxínu (Tetox). Jako nejúčinnější se podle testování buněčné imunity osvědčila kombinace IFA+CpG ODN, zatímco pR a Tetox jen nespecificky zvyšovaly produkci IFN $\gamma$  (nepublikovaná data).

Zavedla jsem metodu ELISPOT-IFN $\gamma$  pro detekci vakcínami indukované WT1-specifické T-buněčné protinádorové imunitní odpovědi ve splenocytech imunizovaných myší. Pro tento účel jsem nejdřív otestovala odpověď proti CTL epitopům z proteinu WT1, predikovaným z literatury a dle výše popsaného algoritmu. Myši byly imunizovány s.c. syntetickými peptidy v kombinaci s IFA ve směsi s CpG ODN pro nespecifickou stimulaci imunity. Jednalo se o nonapeptidy, odvozené od té části myšího proteinu WT1, kterou exprimují zkonstruované genetické vakcíny (WT1<sub>126-135</sub>, WT1<sub>136-144</sub>, WT1<sub>130-138</sub>, WT1<sub>225-233</sub>, WT1<sub>235-243</sub>). Zjistila jsem, že nejimunogennější je peptid

WT1<sub>126-135</sub>, který jsem pak používala (v koncentraci 1 $\mu$ g/ml pro *ex vivo* a 0,01 $\mu$ g/ml pro 6-denní restimulaci) ve všech experimentech pro testování WT1-specifické imunitní odpovědi imunizovaných myší (nepublikovaná data).

Velkým problémem se ukázalo hledání buněčné linie myších nádorových buněk, vhodné jako biologický model pro stanovení efektu vakcínami vyvolané WT1 specifické imunity na růst nádorů. Pomocí metody western blot byla identifikována myší buněčná linie FBL3 (nádorová buněčná linie z myší C57Bl/6, indukovaná virem Friendové) s pozitivní produkcí WT1 proteinu, která byla jen o něco slabší než v kontrolní lidské leukemické buněčné linii K562 (260). Bohužel se ukázalo, že buňky FBL3 nejsou vhodným modelem. Samy o sobě jsou značně imunogenní, což mělo za následek rychlou regresi nádorů (která následovala po počáteční fázi růstu nádorů) a nevýznamné rozdíly ve velikosti nádorů mezi imunizovanými myšmi a kontrolními skupinami. Jelikož protein

WT1 je TA přítomný i v hematologických nádorech, další zvolená nádorová buněčná linie byla C1498, odvozena z lymfomu myši C57Bl/6. V našich experimentech se používal klon C1498-WT1, který byl transfekován plasmidem pro produkci WT1 proteinu. Exprese tohoto proteinu byla transientní a po čase se ztratila úplně, což je jev typický pro buněčné linie s vneseným genem WT1. Molekulární podstata tohoto jevu není úplně známa. Předpokládá se, že utlumení exprese transgenů v nádorové buněčné linii je asociováno s jejich hypermetylací (183).

Nakonec se jako nejvhodnější ukázala buněčná linie TRAMP-C2, odvozená z nádoru prostaty myši C57Bl/6 (90), v dávce  $2 \times 10^5$  buněk/myš. Tyto buňky jsou charakteristické vysokou produkcí proteinu WT1 v stejné míře jako K562 (96) .

Zjistila jsem, že imunizace myši DNA anebo rVACV vakcínou a následující booster peptidovou vakcínou WT1<sub>126-135</sub> vyvolává slabou IFN $\gamma$ + WT1-specifickou T-buněčnou imunitní odpověď u cca 50% myši. Podobné výsledky jsem získala po kombinaci všech tří vakcín (nepublikovaná data). Žádná z genetických vakcín nezpomalovala růst TRAMP-C2 nádorů u myši, ani nevedla k navození protektivní imunity (nepublikovaná data). Obdobné pozorování bylo popsáno ve studii s DNA vakcínou, která obsahovala 3 CTL epitopy WT1 proteinu (WT1<sub>126-134</sub>, WT1<sub>235-243</sub>, WT1<sub>37-45</sub>) a sekvenci tetanového toxinu. Tato vakcína vedla k indukci WT1-specifických CTL, ale ne k lyze hematopoetických kmenových buněk (42).

Jedním z možných vysvětlení nízké imunogennosti připravených genetických vakcín je struktura fúzního genu. Zdá se, že GUS je vhodnější pro imunizaci proti virovým proteinům, ale ne proti autolognímu proteinu WT1. Zajímalo nás, zda připravené vakcíny vedou i k dostatečné tvorbě CD4+ Th-lymfocytů, které jsou potřebné k aktivaci CTL a indukci paměťových T-lymfocytů. Ze stanovení populací T-buněk ve splenocytech imunizovaných myši jsem zjistila, že zkonstruované vakcíny indukují převážně CD4+ T-lymfocyty než CD8+ T-lymfocyty (nepublikovaná data). Otázkou ovšem zůstává, zda se jednalo o tzv. cytotoxické CD4+ nebo klasické pomocné Th-lymfocyty, což se nepodařilo prověřit.

V další etapě této studie jsem porovnávala účinnosti peptidových vakcín, jednak peptidem odpovídajícím CTL epitopu (WT1<sub>126-135</sub>), jednak peptidy specifickými pro MHC molekuly II. třídy (WT1<sub>122-140</sub>, WT1<sub>122-144</sub>).

Dodnes bylo uskutečněno několik experimentálních a klinických studií, které prokázaly účinnost peptidových vakcín odvozených od proteinu WT1. Většinou jsou tyto vakcíny aplikovány s.c. anebo i.d. ( kapitola 3.5.1.3). V této dizertační práci jsme zavedli



nový způsob i.d. podání WT1 peptidů, tetování. V naší laboratoři bylo úspěšně použito už jednou, pro imunizaci onkoproteiny HPV16-E6 a HPV16-E7. Zde se ukázalo, že efektivnost peptidových vakcín výrazně ovlivňuje způsob aplikace (272). Toto pozorování jsem potvrdila i v této dizertační práci. Zjistila jsem, že i.d. podání peptidů tetováním v kombinaci s CpG ODN vyvolává signifikantně vyšší WT1-specifickou IFN $\gamma$ + T-buněčnou imunitní odpověď než s.c. podání těch samých peptidů v kombinaci s IFA+CpG ODN (Publikace 1, Figure 1).

Studie porovnávající i.m. a i.d. podání tetováním DNA vakcín vedla k poznání, že tetování výrazně zvyšuje buněčnou a humorální imunitu indukovanou DNA vakcínou (273). Při tetování dochází k mechanickému poškození epidermy, k dermální hemoragii a nekróze, což vede k lokálnímu zánětu a nespecifické stimulaci vrozené imunity (107). Způsob aplikace peptidu může mít vliv i na jeho precipitaci, jenž ovlivňuje prezentaci peptidu v APC. Ve vodě rozpustný peptid po přidání PBS precipituje slabě, ale po dodání CpG motivů se jeho agregace může zvýšit. Tetování může vést k mechanickému poškození těchto agregátů a tím ke zvýšené indukcii imunity. Naopak, s.c. podání může vést k poklesu imunogenosti peptidové vakcíny kvůli přítomnosti precipitátů (103).

Po i.d. podání peptidových vakcín tetováním jsem stanovením počtů lymfocytů produkujících IFN $\gamma$  testem ELISPOT–IFN $\gamma$  dále zjistila, že delší peptidy WT1<sub>122-140</sub> a WT1<sub>122-144</sub> jsou imunogennější než nonapeptid WT1<sub>126-135</sub>. Tento výsledek je v souladu s pozorováním v laboratoři RNDr. Reiniše, kde zkoušeli účinnost peptidových vakcín proti tumoru exprimujícímu onkoproteiny HPV16-E6 a HPV16-E7 s deficiencí MHC molekul I. třídy. Porovnávali účinnost krátkých peptidů představujících CTL epitopy vs. peptidy obsahující epitopy jak pro CTL, tak pro CD4+ Th-lymfocyty. Peptidové vakcíny byly podávány s CpG ODN nebo prezentovány DC, které byly následně použity jako buněčné vakcíny na terapii syngenních myší s výše popsanými tumory. Ukázalo se, že kratší peptidy vyvolávají slabší protinádorovou imunitu než delší peptidy, bez ohledu na podání (282).

Peptidy WT1<sub>122-140</sub> a WT1<sub>122-144</sub> zahrnují peptid WT1<sub>126-135</sub>, tj. epitop specifický pro MHC molekuly I. třídy, který vede k stimulaci CTL. Zjistila jsem, že delší peptid WT1<sub>122-140</sub> indukuje WT1-specifickou IFN $\gamma$ + T-buněčnou imunitní odpověď jenom proti peptidu, kterým byla myš imunizována, avšak ne proti CTL specifickým pro epitop WT1<sub>126-135</sub> (Publikace 1, Figure 1). Příčinou může být nedostatečné zpracování WT1 proteinu v APC.

Z výše popsaných pozorování se ukázalo, že při konstrukci peptidových protinádorových vakcín je třeba brát do úvahy i imunitní odpověď zprostředkovanou CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty. Tyto buňky IS hrají podstatní úlohu při indukci paměťových CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů specifických pro nádorové buňky (303,320). CD4 epitopy odvozené z TA mohou napomáhat APC při prezentaci TA pro indukci CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů. Na základě těchto zjištění se v poslední době objevují studie s peptidy tvořenými kromě známých CTL epitopů i CD4 epitopy odvozenými z TA. Příkladem je imunizace dlouhými peptidy zahrnujícími kompletní sekvenci onkoproteinu HPV16-E6 a HPV16-E7, která vedla k indukci funkčních HPV16-specifických CD8<sup>+</sup> a CD4<sup>+</sup> T-lymfocytů u HPV16<sup>+</sup> žen s vulvální intraepiteliální neoplázií. Nevýhodou této strategie je, že epitopy pro CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty mohou stimulovat jak Th-lymfocyty, tak Treg, které snižují expanzi CTL (157,161).

Z různých studií vyplývá, že vakcinace peptidy samotnými jen velmi zřídka vede k regresi tumoru (309). Peptidové vakcíny sice indukují tvorbu TA-specifických CTL, jež nemusí mít cytotoxickou funkci. Kaech et al., (148,351) na transgenním myším modelu studovali transkripční profil CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů po vystavení TA. První týden se objevovaly efektorové CD8<sup>+</sup> T-lymfocyty, které jsou cytotoxicky aktivní, tj. pozitivní na granzym A, B, perforin a Fas ligand. Vznikaly také paměťové T-lymfocyty, které postupem času dávaly vznik CD8<sup>+</sup>T-lymfocytům, schopným odpovědět na daný TA produkcí IFN $\gamma$ , ale s nedostatkem lytické aktivity a ztrátou exprese genů asociovaných s efektorovou funkcí T-lymfocytů. Podobná pozorování byla potvrzena i u onkologických pacientů (234).

Bylo ukázáno, že peptidové a buněčné vakcíny efektivní proti nádorům s pozitivní expresí MHC molekul I. třídy nemusí být efektivní proti nádorům s deficiencí těchto molekul (281). Buněčná linie TRAMP-C2 je typická sníženou expresí MHC molekul I. třídy na svém povrchu (182). Tento jev může být způsoben epigenetickými mechanismy. Bylo prokázáno, že inkubace nádorových buněk s inhibitory deacetyláz histonů (jako 5-azacytidin (5-azaC) nebo poly I:C) vede ke zvýšené expresi MHC molekul I. třídy na povrchu těchto nádorových buněk, především prostřednictvím stimulace produkce IFN $\gamma$  (63,94,209,215). Potvrdili jsme, že inkubace TRAMP-C2 s IFN $\gamma$ ,5-aza-C nebo poly I:C zvyšuje expresi těchto molekul na povrchu TRAMP-C2 (Publikace 1, Figure 2B). Avšak vliv těchto látek na imunizační efekt zkonstruovaných vakcín nebyl prokázán (nepublikovaná data).

Přítomnost Treg v nádorovém mikroprostředí podporuje růst nádoru tím, že blokuje protinádorovou imunitu (195,213,357). V několika studiích vedla deplece Treg *in vivo* ke zvýšení protinádorové imunity a k regresi nádoru (1,106,326). Bylo třeba ověřit, zda přítomnost Treg jako takových může potlačit imunogenost zkonstruovaných vakcín. Tato hypotéza se nepotvrdila. Aplikace mAb anti-CD25 myším sice vedla k polovičnímu snížení Treg i 50. den po jejím podání (nepublikovaná data), avšak kýžený efekt na vakcínami vyvolanou imunitu i na růst TRAMP-C2 nádoru nebyl pozorován (Publikace 1, Figure 2A).

Důležitou roli v diferenciaci a indukci Treg v nádoru sehraává TGF $\beta$ , jehož efekt je možné blokovat pomocí protilátek (47,59,188,211). Byla pozorována signifikantní redukce metastáz v plicích myší léčených neutralizační protilátkou anti-TGF $\beta$ , 1D11 (194). Nádorová linie buněk TRAMP-C2 produkuje TGF $\beta$  v hojné míře. I v naší práci se protinádorový efekt imunity, vyvolané peptidovými vakcínami po i.d. aplikaci tetováním, uplatnil pouze tehdy, když byl pomocí mAb neutralizován TGF $\beta$  (Publikace 1, Figure 3A, C). Zajímavé bylo zjištění, že neutralizace TGF $\beta$  nijak neovlivnila imunitní odpověď indukovanou peptidovými vakcínami (Publikace 1, Figure 4). Vzhledem k výše popsanému pozorování se zdá, že hlavním cílem imunosupresivního působení TGF $\beta$  v TRAMP-C2 nádorech nejsou Treg. TGF $\beta$  tady působí jiným, zatím neznámým tolerančním mechanismem, který vede k inhibici efektu protinádorové imunity indukované peptidovými vakcínami.

Tato část mé dizertační práce ukázala, že při srovnání s genetickými vakcínami (rVACV, DNA) jsou nejúčinnější peptidy (odvozené z WT1 proteinu) aplikované i.d. tetováním v přítomnosti protilátky proti TGF $\beta$ , a to jak v terapii WT1+ myších nádorů TRAMP-C2, tak v indukci IFN $\gamma$ + T-buněčné imunitní odpovědi.

## **5.2. Studium imunitní odpovědi proti nádorovému antigenu BCR-ABL po imunizaci vakcínami na bázi partikulí podobných myšímu polyomaviru (MPyV-VLP)**

Fúzní protein BCR-ABL je produkt tzv. Filadelfského chromozomu, který je typický pro hematologické onemocnění CML. Tento protein je zodpovědný za indukci a udržení transformovaného fenotypu leukemických buněk. Mnohé studie poukázaly na to, že unikátní zlomová oblast BCR-ABL může být vhodným imunogenem pro indukci protinádorové imunity (25,48,372).

V laboratoři Doc. Forstové (Publikace 2) byly připraveny chimerické BCR-ABL VLP, tj. MPyV-VLP vakcíny, které nesou fragment o velikosti 177 aminokyselin, ze spojové oblasti tohoto fúzního proteinu. Tato sekvence byla navázána na C-konec proteinu VP3. Vzniklý fúzní protein BCR-ABL<sub>171</sub>-VP3 byl vložen do VP1 kapsomery VLP. Uvedená inkorporace peptidu BCR-ABL do VLP vedla k morfologickým změnám VLP částic bez vlivu na stabilitu (Publikace 2, Figure 1). Podobně se chovaly i kontrolní VLP s inkorporovaným proteinem EGFP, přičemž jejich imunogenost zůstala zachována (30). Nejistila jsem žádnou IFN $\gamma$ + BCR-ABL specifickou imunitní odpověď ve splenocytech imunizovaných myší (Publikace 2, Figure 6). Nebyly detekovány ani žádné BCR-ABL specifické protilátky typu IgG a IgM v sérech těchto myší (Publikace 2, Figure 3B, C), jenom vysoký titr anti-VLP protilátek (Publikace 2, Figure 3A). Ani DC pulsované BCR-ABL VLP nestimulovaly proliferaci splenocytů, které byly izolovány z myší po imunizaci BCR-ABL VLP.

S touto částí dizertační práce souvisí také konstrukce jiných typů vakcín, zahrnujících 25-aminokyselinovou sekvenci zlomové oblasti fúzního proteinu BCR-ABL, připravených v naší laboratoři. Příkladem jsou DNA vakcíny (199) a vakcíny založené na adenylát-cyklázovém toxoidu bakterie *Bordetella pertusis* (CyaA)(Š. Němečková, J. Macková, nepublikovaná data). Já jsem se podílela na konstrukci různých rVACV exprimujících výše popsanou část BCR-ABL (nepublikováno). Pro zvýšení imunogenního potenciálu vybraného fragmentu byly vytvořeny 3 typy fúzních molekul: (a) bcr-abl<sub>25aa</sub>-HSP70 (obsahující také sekvenci myšího HSP70); (b) CP-bcr-abl<sub>25aa</sub>; (c) L2CP-bcr-abl<sub>25aa</sub> (obsahující CP, tj. povrchový protein potyvirusu *Potato virus A a*/nebo L2<sub>108-120</sub>, tj. minoritní kapsidový protein HPV16) (271,311). Tyto konstrukty byly vloženy do DNA vakcíny, VACV nebo CyaA.

Jako vhodná imunizační strategie, prověřená několika studiemi, se zdála být heterologní prime/boost imunizace (119,132,207). Ačkoli byly vyzkoušeny různé kombinace (DNA+rVACV; DNA+CyaA+rVACV apod.), ani jedno ze schémat nebylo úspěšné (nepublikováno).

Všechny zkonstruované vakcíny selhaly v protekci Balb/c myší nebo v terapii jejich nádorů způsobených podáním nádorové buněčné linie 12B1 (Publikace 2 + nepublikovaná data). Nedetekovala jsem žádnou IFN $\gamma$ +, ani IL-2+ BCR-ABL specifickou protinádorovou imunitní odpověď ve splenocytech myší imunizovaných jednotlivými vakcínami (Publikace 2 + nepublikovaná data).

Ze všech uvedených pozorování (199)(Publikace 2; nepublikovaná data) je možné usoudit, že zlomová oblast BCR-ABL není vhodný imunogen, jelikož nevyvolává indukci BCR-ABL specifických CTL, ani B-buněk zodpovědných za tvorbu anti-BCR-ABL protilátek. Tyto výsledky jsou v souladu i s pozorováním jiných skupin (368). Objevila se studie, která vedla k indukci CTL prostřednictvím DC transfekovaných BCR-ABL mRNA (z buněk K562 nebo CML blastů). Vzniklé CTL však nebyly schopny rozeznávat epitopy odvozené z fúzního proteinu BCR-ABL (111). Výjimkou jsou studie, kdy jsou myši imunizovány lyzáty nebo fyzikálně, či ozářením atenuovanými leukemickými buňkami 12B1 (163,269,270,371,372) nebo DNA vakcínou zahrnující celý lidský protein BCR-ABL (199). Jenom tyto imunizace vedly k vzniku cytotoxicky aktivních BCR-ABL-specifických CTL *in vivo*, resp. k protekci (alespoň částečné) imunizovaných myši. Pokud se imunizuje jenom CTL epitopem (nonapeptidem) specifickým pro MHC molekuly I. třídy (GFKQSSKAL), tato imunizace je neúčinná (163). V jiné studii se zjistilo, že imatinibem navozená inhibice tyrozin-kinázové aktivity BCR-ABL proteinu způsobuje úbytek exprese TA (včetně WT1, Bcl-2), což vede k poklesu CML-specifických CTL (33).

Dle nové hypotézy, nikoli protein BCR-ABL jako takový, ale právě jeho biologická aktivita může mít vliv na expresi jiných genů kódujících potenciální TA, a tím na indukci CTL namířených proti leukemickým buňkám CML (111,302).

### **5.3. Studium buněčné imunitní odpovědi vyvolané imunizací vakcínami rekombinantního viru vakcinie (rVACV) proti nádorům asociovaným s lidským papilomavirem 16 (HPV 16), u kterých byla jejich protinádorová účinnost zvýšena ko-expresí imunomodulátorů (receptoru II. typu pro TGF $\beta$ , tj. TGF $\beta$ RII; Flt3 ligand, tj. Flt3L)**

Účinnost protinádorové rVACV vakcíny lze zvýšit, když jsou různé imunomodulátory (cytokiny, chemokiny, růstové faktory, kostimulační molekuly) exprimovány tím samým rVACV vektorem jako TA. Pozitivní efekt těchto rVACV byl zjištěn při experimentální imunoterapii nádorů s GM-CSF (158), CD40L (87) apod. Obdobným způsobem byly v této práci zkonstruovány rVACV vakcíny výše popsaného kmene P13, namířené proti nádorům asociovaným s lidským HPV16. Všechny rVACV vakcíny exprimovaly účinný, vysoce imunogenní nádorový onkoprotein HPV16-E7

v rekombinantní formě SigE7LAMP, která zvyšuje jeho imunogenost hlavně pro CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty (Sig = signální sekvence membránového proteinu asociovaného s lyzozomem 1 (LAMP1); E7 = virový onkoprotein HPV16-E7; LAMP = transmembránová a intracelulární doména) (45,206). Použili jsme extracelulární část TGFβRII, resp. jeho upravenou variantu fúzanou s Fc fragmentem IgG nebo Flt3L (zkráceně dvojité rekombinanty rVACV) jako modulátory. Exprese těchto modulátorů byla opět časována do různých fází replikačního cyklu viru, tj. řízena pod časným H5 nebo časně/pozdním E/L promotorem rVACV. Geny pro tyto cytokiny byly vloženy do genu pro virovou thymidinkinázu, což zajišťuje zvýšenou selektivnost připraveného viru pro nádorovou tkáň. Zkonstruovaná vakcína tímto plnila několik úloh, jako stimulace imunity zvýšenou produkcí cytokinů a nárůst onkolytické funkce rVACV (kapitola 3.5.1.1).

Vakcínami indukovanou VACV-specifickou a HPV16-E7-specifickou protinádorovou imunitu jsem detekovala dvěma základními metodami, ELISPOT-IFN $\gamma$  a tetramerem H-2D<sup>b</sup>/E7<sub>49-57</sub> ve splenocytech myši C57Bl/6 imunizovaných jednou z dvojitých rekombinant rVACV nebo kontrolním virem rVACV exprimujícím jenom SigE7LAMP.

Nejdříve jsem musela metodu ELISPOT-IFN $\gamma$  optimalizovat na stanovení VACV-specifické T-buněčné imunitní odpovědi. Použitím výše popsaného algoritmu byl vybrán peptid VACV-E3<sub>140-148</sub> (VGPSNSPTF), který byl popsán jako H2-D<sup>d</sup> afinitní, mezi poxviry vysoce konzervovaný epitop, vhodný pro detekci VACV-specifických CTL u Balb/c myši (332). V naší laboratoři byla nalezena vhodnost tohoto peptidu pro detekci odpovědi C57Bl/6 myši, kde se peptid váže na molekulu H-2D<sup>b</sup> (Příloha, Suppl. Fig. 2). Myši C57Bl/6 byly imunizovány virem rVACV P13 a MVA s expresí GUS (10). Zjistila jsem, že splenocyty z těchto myši vykazovaly vysoké množství VACV-E3<sub>140-144</sub> specifických IFN $\gamma$  + spotů, zatímco kontrolní skupina myši (po aplikaci PBS) byla negativní. Podobně negativní výsledky jsem získala po stimulaci splenocytů z těchto myši s kontrolním, irelevantním peptidem HPV16-E7<sub>49-57</sub> (Příloha, Suppl.Fig.1A). Toto pozorování bylo potvrzeno detekcí i.c.IFN $\gamma$  na průtokovém cytometru (Příloha, Suppl.Fig. 1B).

O TGF $\beta$  a jeho pleiotropních účincích v nádorovém mikroprostředí jsem se již zmínila v kapitole 3.5.2.1. V případě peptidových vakcín proti WT1+ nádorům se nám podařilo inhibovat imunosupresivní efekt tohoto cytokinu v myších TRAMP-C2 nádorech podáním mAb anti-TGF $\beta$  (podkapitola 5.1). Odstraněním negativního efektu TGF $\beta$  v nádorech se zabírala i další část této dizertační práce. Záměrem bylo zvýšení terapeutického potenciálu rVACV vakcíny s expresí SigE7LAMP simultánní ko-expresí inhibitorů TGF $\beta$ . Díky blokaci tohoto cytokinu může dojít k aktivaci dostatečně silné protinádorové HPV16-E7 specifické imunitní odpovědi a k efektivnější terapii nádorů TC-1.

Nádorová buněčná linie TC-1 je odvozena z plicního epitelu myši kmene C57Bl/6 a transformována onkogeny HPV16-E6, HPV16-E7 a H-ras. Expresní analýzou byla v TC-1 buňkách potvrzena přítomnost TGF- $\beta$ 1 transkriptů (M. Šmahel, nepublikovaná data). V sérech a ve vzorcích tkání onkologických HPV+ pacientů se také zjistila vysoká hladina TGF $\beta$ , vyvolaná onkoproteiny HPV-E6 a HPV-E7, jejichž působení vede ke snížení exprese receptorů pro tento cytokin (140).

Dřívější studie ukázala, že TA-specifickou imunitní odpověď je možné zvýšit aplikací DNA vakcíny s inkorporovaným genem pro solubilní formu TGF $\beta$ RII (171). Inhibice TGF $\beta$  pomocí tohoto receptoru vedla ke zvýšení CD8+ CTL ve slezinách myší a jejich nádorech, účinných proti malignímu mesoteliomu (323). Z těchto důvodů byl do námi zkonstruovaných rVACV vložen gen pro solubilní receptor TGF $\beta$ RII nebo jeho upravená varianta fúzovaná s Fc fragmentem IgG1 a C-koncovou částí Jun (TGF $\beta$ RII-Fc-Jun). Dimerizační doména Fc fragmentu, jako i za ní připojený fragment Jun dodávají receptoru zvýšenou afinitu k TGF $\beta$  (169)(Kowalczyk, nepublikovaná data). Blokáda TGF $\beta$  signalizace s TGF $\beta$ RII-Fc vedla ke zvýšení apoptózy v nádorech prsu myší transgenních na střední T antigen polyomaviru (115,243). Účinnost receptorů TGF $\beta$ RII a TGF $\beta$ RII-Fc byla prokázána při imunoterapii hepatocelulárního karcinomu a cirhózy jater. Neutralizace TGF $\beta$  těmito receptory vedla k redukci fibrogenyze *in vitro* a *in vivo* (35).

Ze splenocytů vyizolovaných z imunizovaných myší jsem zjistila, že námi zkonstruované dvojité rekombinanty rVACV nevykazovaly rozdíly v HPV16-E7-specifické T-buněčné imunitní odpovědi v porovnání s rVACV exprimujícími pouze SigE7LAMP. Tyto ovšem vykazovaly signifikantně nižší IFN $\gamma$ + imunitní odpověď specifickou pro VACV-E3 oproti dvojitým rekombinantům rVACV (Publikace 3, Figure 2). Zajímavé bylo zjištění, že růst nádoru TC-1 byl výrazněji



zpomalen u myši imunizovaných dvojitou rekombinantou rVACV exprimující solubilní TGF $\beta$ RII (pod H5 promotorem) než TGF $\beta$ RII-Fc (Publikace 3, Figure 3). Nebyly zjištěné rozdíly množení *in vivo* mezi jednotlivými rVACV (Publikace 3, Figure 4).

Jelikož jsem u dvojitě rekombinanty rVACV, exprimující solubilní TGF $\beta$ RII pod H5 promotorem, nezjistila zvýšené množství T-lymfocytů specifických pro TA HPV16-E7 a růst nádorů TC-1 byl zpomalen, hledali jsme jiné vysvětlení.

Naše hypotéza vychází ze zjištění, že tato rekombinanta produkuje kromě solubilní formy TGF $\beta$ RII i větší množství méně glykozylované formy TGF $\beta$ RII. Ta může být vylučována z buňky odlišnými mechanizmy než klasický TGF $\beta$ RII, např. exozomy. Protože mohou fúzovat s membránami sousedících buněk, napomáhají transportu různých proteinů mezi buňkami. Tímto způsobem by mohl být do CTL anebo NK-buněk doručen TGF $\beta$  navázaný na membránový receptor a snižovat jejich aktivitu (57).

Další možností pro zvýšení imunogenicity rVACV vakcíny je vložení genu pro solubilní faktor, který přímo aktivuje APC, což vede k lepší stimulaci rVACV vakcínou indukované protinádorové imunity. Flt3L je růstový faktor, který se podílí na stimulaci proliferace a diferenciaci hematopoetických buněk. Tento cytokin je znám svými adjuvantními vlastnostmi a protinádorovou aktivitou *in vivo* a indukuje expanzi plasmacytoidních DC *in vitro*. Extracelulární doména Flt3L a účinky tohoto cytokinu jsou u člověka a myši zaměnitelné. Z těchto důvodů byly v naší laboratoři zkonstruovány rVACV, které exprimovaly kromě SigE7LAMP i lidský Flt3L.

Zjistila jsem, že ko-exprese Flt3L vede ke zvýšenému výskytu HPV16-E7-specifické i VACV-E3 specifické imunitní odpovědi v porovnání s rVACV exprimující pouze SigE7LAMP. Nejvyšší počet těchto IFN $\gamma$ + T-lymfocytů jsem detekovala ve splenocytech myši 12 dní po jejich imunizaci dvojitou rekombinantou rVACV s expresí Flt3L řízenou H5 promotorem rVACV, která produkovala největší množství Flt3L *in vivo* (Publikace 4, Figures 3A,B, Figure 2C,D). Tento efekt byl pouze krátkodobý, protože pět týdnů po imunizaci bylo množství IFN $\gamma$ + T-lymfocytů u všech použitých rekombinant rVACV stejné. Zaznamenala jsem zvýšený účinek Flt3L v populaci funkčních IFN $\gamma$  produkujících splenocytů metodou ELISPOT-IFN $\gamma$  než v populaci CD8+, na H-2D<sup>b</sup>/E7<sub>49-57</sub> tetramer + buněk měřených na průtokovém cytometru (Publikace 4, Figure 3A,B). Tento rozdíl může souviset s tím, že druhá použitá metoda zahrnuje nejen funkční, ale také vyčerpané a anergické HPV16-E7-specifické CTL. Zvýšená hladina CTL byla doprovázena nižší protilátkovou odpovědí, převážně izotypu

IgG1. Z uvedených pozorování je možné usoudit, že ko-exprese Flt3L přepíná rVACV vakcínou indukovanou imunitní odpověď na typ Th1.

Pozitivní efekt protinádorové imunity vyvolané dvojitou rekombinantou rVACV s expresí Flt3L řízenou H5 promotorem rVACV se projevil jak v terapii, tak protekci myši proti HPV16-E6 a HPV16-E7 pozitivním nádorovým buňkám TC-1 (Publikace 4, Figure 4). Léčba vedla k regresi nádorů menších než 4 mm<sup>2</sup>, ale neovlivnila růst větších nádorů.

Následná část práce se zaměřila na vysvětlení zvýšené imunogenicity a protinádorového efektu této vakcíny. Z různých studií se ukázalo, že aplikace Flt3L myším vede k expanzi DC, a tím k zvýšené frekvenci NK-buněk a B- a T- lymfocytů (89,204,275). Na druhou stranu, rVACV jsou známé indukcí imunosuprese adaptivní imunitní odpovědi, která je zprostředkována MDSC v nádoru (37). Funkce MDSC v nádorovém mikroprostředí, napomáhající úniku nádoru před imunitou, jsem popsala v kapitole 3.1.1. Ukázalo se, že nejúčinnější vakcína v našem modelu inhibuje expanzi CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>+</sup> MDSC a zvyšuje hladinu CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> DC ve slezině myši imunizovaných touto vakcínou (Publikace 4, Figure 5). Taktéž se ví, že na výše popsanou expanzi DC a přepnutí na Th1 typ imunitní odpovědi je třeba opakovaně podávat Flt3L, nejlépe v průběhu 10 dnů (262). Stejného efektu, jak se ukázalo v této práci, je schopna jedna dávka rVACV ko-exprimujícího tento cytokin. Ovšem pod jednou podmínkou. Kmen VACV, který se použije na konstrukci takového typu vakcíny, musí být schopný replikace uvnitř savčích buněk. Pokud byly myši imunizovány dvojitou rekombinantou rVACV kmene MVA, který se v savčích buňkách nereplikuje ( kapitola 3.5.1.1), exprese Flt3L byla krátkodobá. Ačkoli jsem detekovala vyšší imunitní odpověď, omezená koncentrace uvedeného cytokinu nevedla k dostatečnému protinádorovému efektu (nepublikovaná data).

Oba dva typy zkonstruovaných dvojitých rekombinant rVACV (exprimujících SigE7LAMP v kombinaci s TGFβRII anebo Flt3L) vedly k eliminaci nádorů TC-1. V případě rVACV ko-exprimující Flt3L se podařilo prokázat pozitivní efekt tohoto cytokinu na indukci funkční HPV16-E7-specifické protinádorové imunity. Vakcína rVACV, která produkovala solubilní formu TGFβRII, tento typ buněčné imunity nezvýšila. Navzdory tomu vedla ke zvýšení protinádorové imunity jako takové, jelikož z ní produkovaný cytokin neutralizoval imunosupresivní vliv TGFβ v nádorovém mikroprostředí.

Při tvorbě vakcín je zapotřebí brát do úvahy několik aspektů, které se snažily splnit i vakcíny použité v této dizertační práci. Dodání genu pro TA do cílových buněk a produkce dostatečného množství TA, časově přiměřená exprese tohoto genu (splňují rVACV), zpracování a prezentace TA prostřednictvím APC (splňují DNA vakcíny a rVACV) a kostimulace DC (ko-exprese Flt3L), aby mohla nastat aktivace efektorových a paměťových CTL, také přepnutí na Th1 imunitní odpověď ve formě CTL (analogy TLR, např. dsRNA vznikající při virové infekci VACV nebo adjuvantní efekt CpG ODN) a v neposlední řadě schopnost CTL překonat únikové mechanismy nádorového mikroprostředí (neutralizace TGF $\beta$  pomocí mAb anebo dvojité rekombinanty rVACV exprimující SigE7LAMP společně s TGF $\beta$ R2) (367). Jak se ukázalo z našich pozorování, jako i z výsledků jiných skupin, nejvhodnější způsob pro zabezpečení všech těchto mechanismů je kombinovaná protinádorová imunoterapie.

Klinické studie z posledních let zase potvrzují, že použití jednoho z klasických přístupů (chemoterapie, radioterapie) a imunoterapie (především mAb) vede ke kýženým výsledkům (367). Působení jejich účinků se navzájem doplňuje a propojuje a vede ke zmenšování solidního nádoru, resp. ústupu blastů a leukemických buněk.

## 6. ZÁVĚR

V této práci jsme zkonstruovali a především na myším modelu stanovili účinnost rekombinantních vakcín proti několika nádorovým antigenům, specifickým pro hematologické a solidní nádory.

Proti nádorům pozitivním na autologní protein WT1 byly zkonstruovány DNA vakcíny a vakcíny na bázi rVACV, které exprimovaly sekvenci myšího proteinu WT1 (mezi 94. a 249. aminokyselinou). Peptidové vakcíny byly odvozeny z té samé části uvedeného proteinu. Našli jsme vhodný biologický model pro stanovení vlivu připravených vakcín na růst nádorů, tj. WT1+ buněčnou linii TRAMP-C2, charakteristickou vysokou produkcí imunosupresivního TGF $\beta$ . Zavedli jsme a optimalizovali test ELISPOT-IFN $\gamma$  pro detekci vakcínami vyvolané WT1-specifické, jako i rVACV vakcínami vyvolané VACV-E3 specifické T-buněčné imunitní odpovědi. Protinádorový efekt připravených vakcín se podařilo zvýšit jenom neutralizací TGF $\beta$ . Jiné ovlivnění nebylo účinné (zvýšení molekul MHC I. třídy pomocí poly I:C nebo demetylace těchto genů pomocí 5-azacytidinu, či odstranění Treg). V přítomnosti protilátky proti TGF $\beta$  se jako nejúčinnější ukázaly peptidy aplikované i.d. tetováním, jak v terapii nádorů TRAMP-C2, tak v indukci IFN $\gamma$ + protinádorové odpovědi namířené proti WT1.

V laboratoři Doc. Forstové byly připraveny vakcíny na bázi partikulí podobných myšimu polyomaviru, které nesly fragment o velikosti 177 aminokyselin ze spojové oblasti fúzního proteinu BCR-ABL. V naší laboratoři byly zkonstruovány i jiné typy vakcín (rVACV, DNA) s expresí peptidu dlouhého 25 aminokyselin z té samé oblasti proteinu charakteristického pro CML. Ani jedna z těchto vakcín neindukovala BCR-ABL-specifickou T-buněčnou imunitní odpověď, ani nebyla účinná v terapii myších leukemických nádorů. Ukázalo se, že protein BCR-ABL není vhodný imunogen.

Proti nádorům asociovaným s HPV16 byly zkonstruovány rVACV vakcíny s expresí SigE7LAMP, tj. imunogenní formy onkoproteinu HPV16-E7, jejichž činnost se podařilo zvýšit ko-expresí TGF $\beta$ RII či Flt3L. Všechny dvojité rekombinanty vyvolaly imunitu, která vedla k redukci myších nádorů TC-1, pozitivních na HPV16-E6 a HPV16-E7. Ko-exprese Flt3L snižovala expanzi imunosupresivních MDSC, zvyšovala množství DC a měla pozitivní vliv na indukci funkční HPV16-E7-specifické protinádorové imunity. Ačkoli produkce TGF $\beta$ RII nezvýšila buněčnou imunitu namířenou proti HPV16-E7, vedla ke zvýšení protinádorové imunity jako takové, v důsledku neutralizace imunosupresivního vlivu TGF $\beta$  v nádorovém mikroprostředí.

## 7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. **Akbar, A. N., L. S. Taams, M. Salmon, and M. Vukmanovic-Stejić.** 2003. The peripheral generation of CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Immunology* **109**:319-325.
2. **Al-Hajj, M., M. S. Wicha, A. Ito-Hernandez, S. J. Morrison, and M. F. Clarke.** 2003. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **100**:3983-3988.
3. **Alcami, A. and G. L. Smith.** 1992. A soluble receptor for interleukin-1 beta encoded by vaccinia virus: a novel mechanism of virus modulation of the host response to infection. *Cell* **71**:153-167.
4. **Alcami, A., J. A. Symons, P. D. Collins, T. J. Williams, and G. L. Smith.** 1998. Blockade of chemokine activity by a soluble chemokine binding protein from vaccinia virus. *J.Immunol.* **160**:624-633.
5. **Amato, R. J., S. Saxena, and M. Stepankiw.** 2013. Phase II trial assessing granulocyte-macrophage-colony stimulating factor, ketoconazole plus mitoxantrone in metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatments. *Cancer Invest.* **31**:177-182.
6. **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**:365-396.
7. **Aoyagi, M., D. Zhai, C. Jin, A. E. Aleshin, B. Stec, J. C. Reed, and R. C. Liddington.** 2007. Vaccinia virus N1L protein resembles a B cell lymphoma-2 (Bcl-2) family protein. *Protein Sci.* **16**:118-124.
8. **Aptsiauri, N., R. Carretero, A. Garcia-Lora, L. M. Real, T. Cabrera, and F. Garrido.** 2008. Regressing and progressing metastatic lesions: resistance to immunotherapy is predetermined by irreversible HLA class I antigen alterations. *Cancer Immunol.Immunother.* **57**:1727-1733.
9. **Asemissen, A. M., U. Keilholz, S. Tenzer, M. Muller, S. Walter, S. Stevanovic, H. Schild, A. Letsch, E. Thiel, H. G. Rammensee, and C. Scheibenbogen.** 2006. Identification of a highly immunogenic HLA-A\*01-binding T cell epitope of WT1. *Clin.Cancer Res.* **12**:7476-7482.
10. **Babiarova, K., L. Kutinova, K. Zurkova, J. Krystofova, E. Brabcova, P. Hainz, J. Musil, and S. Nemeckova.** 2012. Immunization with WT1-derived peptides by tattooing inhibits the growth of TRAMP-C2 prostate tumor in mice. *J.Immunother.* **35**:478-487.
11. **Baird, P. N. and P. J. Simmons.** 1997. Expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in normal hemopoiesis. *Exp.Hematol.* **25**:312-320.

12. **Bak, S. P., A. Alonso, M. J. Turk, and B. Berwin.** 2008. Murine ovarian cancer vascular leukocytes require arginase-1 activity for T cell suppression. *Mol.Immunol.* **46**:258-268.
13. **Bandyopadhyay, A., F. Lopez-Casillas, S. N. Malik, J. L. Montiel, V. Mendoza, J. Yang, and L. Z. Sun.** 2002. Antitumor activity of a recombinant soluble betaglycan in human breast cancer xenograft. *Cancer Res.* **62**:4690-4695.
14. **Barouch, D. H. and S. C. Harrison.** 1994. Interactions among the major and minor coat proteins of polyomavirus. *J.Virol.* **68**:3982-3989.
15. **Barragan, E., J. Cervera, P. Bolufer, S. Ballester, G. Martin, P. Fernandez, R. Collado, M. J. Sayas, and M. A. Sanz.** 2004. Prognostic implications of Wilms' tumor gene (WT1) expression in patients with de novo acute myeloid leukemia. *Haematologica.* **89**:926-933.
16. **Bart, P. A., R. Goodall, T. Barber, A. Harari, A. Guimaraes-Walker, M. Khonkarly, N. C. Sheppard, Y. Bangala, M. J. Frchette, R. Wagner, P. Liljestrom, J. P. Kraehenbuhl, M. Girard, J. Goudsmit, M. Esteban, J. Heeney, Q. Sattentau, S. McCormack, A. Babiker, G. Pantaleo, and J. Weber.** 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**:3153-3161.
17. **Bear, A. S., C. R. Cruz, and A. E. Foster.** 2011. T cells as vehicles for cancer vaccination. *J.Biomed.Biotechnol.* **2011**:417403.
18. **Beattie, E., J. Tartaglia, and E. Paoletti.** 1991. Vaccinia virus-encoded eIF-2 alpha homolog abrogates the antiviral effect of interferon. *Virology* **183**:419-422.
19. **Bedognetti, D., E. Wang, M. R. Sertoli, and F. M. Marincola.** 2010. Gene-expression profiling in vaccine therapy and immunotherapy for cancer. *Expert.Rev.Vaccines.* **9**:555-565.
20. **Benencia, F., L. Sprague, J. McGinty, M. Pate, and M. Muccioli.** 2012. Dendritic cells the tumor microenvironment and the challenges for an effective antitumor vaccination. *J.Biomed.Biotechnol.* **2012**:425476. doi: **10.1155/2012/425476**. Epub;2012 Mar 15.:425476.
21. **Bhardwaj, N.** 2007. Harnessing the immune system to treat cancer. *J.Clin.Invest.* **117**:1130-1136.
22. **Bigley, T. M., J. M. Reitsma, S. P. Mirza, and S. S. Terhune.** 2013. Human cytomegalovirus pUL97 regulates the viral MIE promoter by phosphorylation-mediated disruption of HDAC1 binding. *J.Virol.* **87**:7393-7408.
23. **Bilandzic, M. and K. L. Stenvers.** 2011. Betaglycan: a multifunctional accessory. *Mol.Cell Endocrinol.* **339**:180-189.

24. **Blanchard, T. J., A. Alcami, P. Andrea, and G. L. Smith.** 1998. Modified vaccinia virus Ankara undergoes limited replication in human cells and lacks several immunomodulatory proteins: implications for use as a human vaccine. *J.Gen.Virol.* **79**:1159-1167.
25. **Bocchia, M., T. Korontsvit, Q. Xu, S. Mackinnon, S. Y. Yang, A. Sette, and D. A. Scheinberg.** 1996. Specific human cellular immunity to bcr-abl oncogene-derived peptides. *Blood.* **87**:3587-3592.
26. **Bode, C., G. Zhao, F. Steinhagen, T. Kinjo, and D. M. Klinman.** 2011. CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert.Rev.Vaccines.* **10**:499-511.
27. **Bonnet, D. and J. E. Dick.** 1997. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat.Med.* **3**:730-737.
28. **Borghaei, H., M. R. Smith, and K. S. Campbell.** 2009. Immunotherapy of cancer. *Eur.J.Pharmacol.* **625**:41-54.
29. **Bouard, D., D. azard-Dany, and F. L. Cosset.** 2009. Viral vectors: from virology to transgene expression. *Br.J.Pharmacol.* **157**:153-165.
30. **Boura, E., D. Liebl, R. Spisek, J. Fric, M. Marek, J. Stokrova, V. Holan, and J. Forstova.** 2005. Polyomavirus EGFP-pseudocapsids: analysis of model particles for introduction of proteins and peptides into mammalian cells. *FEBS Lett.* **579**:6549-6558.].
31. **Bowie, A., E. Kiss-Toth, J. A. Symons, G. L. Smith, S. K. Dower, and L. A. O'Neill.** 2000. A46R and A52R from vaccinia virus are antagonists of host IL-1 and toll-like receptor signaling. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**:10162-10167.
32. **Boyer, S. N., D. E. Wazer, and V. Band.** 1996. E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res.* **56**:4620-4624.
33. **Brauer, K. M., D. Werth, S. K. von, A. Bringmann, L. Kanz, F. Grunebach, and P. Brossart.** 2007. BCR-ABL activity is critical for the immunogenicity of chronic myelogenous leukemia cells. *Cancer Res.* **67**:5489-5497.
34. **Braun, S. E., K. Chen, B. R. Blazar, P. J. Orchard, G. Sledge, M. J. Robertson, H. E. Broxmeyer, and K. Cornetta.** 1999. Flt3 ligand antitumor activity in a murine breast cancer model: a comparison with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and a potential mechanism of action. *Hum.Gene Ther.* **10**:2141-2151.
35. **Breitkopf, K., S. Haas, E. Wiercinska, M. V. Singer, and S. Dooley.** 2005. Anti-TGF-beta strategies for the treatment of chronic liver disease. *Alcohol Clin.Exp.Res.* **29**:121S-131S.
36. **Bringmann, A., S. A. Held, A. Heine, and P. Brossart.** 2010. RNA vaccines in cancer treatment. *J.Biomed.Biotechnol.* **2010**:623687.



37. **Bronte, V., M. Wang, W. W. Overwijk, D. R. Surman, F. Pericle, S. A. Rosenberg, and N. P. Restifo.** 1998. Apoptotic death of CD8+ T lymphocytes after immunization: induction of a suppressive population of Mac-1+/Gr-1+ cells. *J.Immunol.* **161**:5313-5320.
38. **Buckler, A. J., J. Pelletier, D. A. Haber, T. Glaser, and D. E. Housman.** 1991. Isolation, characterization, and expression of the murine Wilms' tumor gene (WT1) during kidney development. *Mol.Cell Biol.* **11**:1707-1712.
39. **Call, K. M., T. Glaser, C. Y. Ito, A. J. Buckler, J. Pelletier, D. A. Haber, E. A. Rose, A. Kral, H. Yeger, W. H. Lewis, and .** 1990. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell.* **60**:509-520.
40. **Casalegno-Garduno, R., A. Schmitt, J. Yao, X. Wang, X. Xu, M. Freund, and M. Schmitt.** 2010. Multimer technologies for detection and adoptive transfer of antigen-specific T cells. *Cancer Immunol.Immunother.* **59**:195-202.
41. **Cazeaux, N., Y. Bennasser, P. L. Vidal, Z. Li, D. Paulin, and E. Bahraoui.** 2002. Comparative study of immune responses induced after immunization with plasmids encoding the HIV-1 Nef protein under the control of the CMV-IE or the muscle-specific desmin promoter. *Vaccine* **20**:3322-3331.
42. **Chaise, C., S. L. Buchan, J. Rice, J. Marquet, H. Rouard, M. Kuentz, G. E. Vittes, V. Molinier-Frenkel, J. P. Farcet, H. J. Stauss, M. H. Delfau-Larue, and F. K. Stevenson.** 2008. DNA vaccination induces WT1-specific T-cell responses with potential clinical relevance. *Blood* **112**:2956-2964.
43. **Chang, C. C., M. Campoli, and S. Ferrone.** 2005. Classical and nonclassical HLA class I antigen and NK Cell-activating ligand changes in malignant cells: current challenges and future directions. *Adv.Cancer Res.* **93:189-234**.:189-234.
44. **Chang, H. W. and B. L. Jacobs.** 1993. Identification of a conserved motif that is necessary for binding of the vaccinia virus E3L gene products to double-stranded RNA. *Virology* **194**:537-547.
45. **Chen, J. W., T. L. Murphy, M. C. Willingham, I. Pastan, and J. T. August.** 1985. Identification of two lysosomal membrane glycoproteins. *J.Cell Biol.* **101**:85-95.
46. **Chen, K., S. Braun, S. Lyman, Y. Fan, C. M. Traycoff, E. A. Wiebke, J. Gaddy, G. Sledge, H. E. Broxmeyer, and K. Cornetta.** 1997. Antitumor activity and immunotherapeutic properties of Flt3-ligand in a murine breast cancer model. *Cancer Res.* **57**:3511-3516.
47. **Chen, W., W. Jin, N. Hardegen, K. J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady, and S. M. Wahl.** 2003. Conversion of peripheral CD4+ CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J.Exp.Med.* **198**:1875-1886.

48. **Chen, W., D. J. Peace, D. K. Rovira, S. G. You, and M. A. Cheever.** 1992. T-cell immunity to the joining region of p210BCR-ABL protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **89**:1468-1472.
49. **Chen, X. and L. Xu.** 2011. Mechanism and regulation of nucleocytoplasmic trafficking of smad. *Cell Biosci.* **1**:40.
50. **Chiusa, L., C. P. Francia di, P. Campisi, C. Ceretto, F. Marmont, and A. Pich.** 2006. Prognostic value of quantitative analysis of WT1 gene transcripts in adult acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* **91**:270-271.
51. **Chklovskaja, E., W. Jansen, C. Nissen, S. D. Lyman, C. Rahner, L. Landmann, and A. Wodnar-Filipowicz.** 1999. Mechanism of flt3 ligand expression in bone marrow failure: translocation from intracellular stores to the surface of T lymphocytes after chemotherapy-induced suppression of hematopoiesis. *Blood* **93**:2595-2604.
52. **Chklovskaja, E., C. Nissen, L. Landmann, C. Rahner, O. Pfister, and A. Wodnar-Filipowicz.** 2001. Cell-surface trafficking and release of flt3 ligand from T lymphocytes is induced by common cytokine receptor gamma-chain signaling and inhibited by cyclosporin A. *Blood* **97**:1027-1034.
53. **Chow, M. T., A. Moller, and M. J. Smyth.** 2012. Inflammation and immune surveillance in cancer. *Semin.Cancer Biol.* **22**:23-32.
54. **Chuang, T. H., X. Xu, V. Kaartinen, N. Heisterkamp, J. Groffen, and G. M. Bokoch.** 1995. Abr and Bcr are multifunctional regulators of the Rho GTP-binding protein family. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **92**:10282-10286.
55. **Cid-Arregui, A.** 2009. Therapeutic vaccines against human papillomavirus and cervical cancer. *Open.Virol.J.* **3**:67-83.
56. **Clark, B., W. Caparros-Wanderley, G. Musselwhite, M. Kotecha, and B. E. Griffin.** 2001. Immunity against both polyomavirus VP1 and a transgene product induced following intranasal delivery of VP1 pseudocapsid-DNA complexes. *J.Gen.Virol.* **82**:2791-2797.
57. **Clayton, A., J. P. Mitchell, J. Court, M. D. Mason, and Z. Tabi.** 2007. Human tumor-derived exosomes selectively impair lymphocyte responses to interleukin-2. *Cancer Res.* **67**:7458-7466.
58. **Coban, C., S. Koyama, F. Takeshita, S. Akira, and K. J. Ishii.** 2008. Molecular and cellular mechanisms of DNA vaccines. *Hum.Vaccin.* **4**:453-456.
59. **Cobbold, S. P., R. Castejon, E. Adams, D. Zelenika, L. Graca, S. Humm, and H. Waldmann.** 2004. Induction of foxP3+ regulatory T cells in the periphery of T cell receptor transgenic mice tolerized to transplants. *J.Immunol.* **172**:6003-6010.
60. **Coley, W. B. II.** Contribution to the Knowledge of Sarcoma. *Ann.Surg.*1891.Sep. **14**:199-220.

61. **Connolly, E. C., J. Freimuth, and R. J. Akhurst.** 2012. Complexities of TGF-beta targeted cancer therapy. *Int.J.Biol.Sci.* **8**:964-978.
62. **Coosemans, A., M. Wolf, Z. N. Berneman, T. Van, V, I. Vergote, F. Amant, and S. W. Van Gool.** 2010. Immunological response after therapeutic vaccination with WT1 mRNA-loaded dendritic cells in end-stage endometrial carcinoma. *Anticancer Res.* **30**:3709-3714.
63. **Coral, S., L. Sigalotti, A. Gasparollo, I. Cattarossi, A. Visintin, A. Cattelan, M. Altomonte, and M. Maio.** 1999. Prolonged upregulation of the expression of HLA class I antigens and costimulatory molecules on melanoma cells treated with 5-aza-2'-deoxycytidine (5-AZA-CdR). *J.Immunother.* **22**:16-24.
64. **Cortez, D., L. Kadlec, and A. M. Pendergast.** 1995. Structural and signaling requirements for BCR-ABL-mediated transformation and inhibition of apoptosis. *Mol.Cell Biol.* **15**:5531-5541.
65. **Cullen, S. P. and S. J. Martin.** 2008. Mechanisms of granule-dependent killing. *Cell Death.Differ.* **15**:251-262.
66. **Czerkinsky, C. C., L. A. Nilsson, H. Nygren, O. Ouchterlony, and A. Tarkowski.** 1983. A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J.Immunol.Methods* **65**:109-121.
67. **Dame, C., K. M. Kirschner, K. V. Bartz, T. Wallach, C. S. Hussels, and H. Scholz.** 2006. Wilms tumor suppressor, Wt1, is a transcriptional activator of the erythropoietin gene. *Blood* **107**:4282-4290.
68. **de Vos van Steenwijk PJ, T. H. Ramwadhoebe, M. J. Lowik, C. E. van der Minne, Berends-van der Meer DM, L. M. Fathers, A. R. Valentijn, J. Oostendorp, G. J. Fleuren, B. W. Hellebrekers, M. J. Welters, M. I. van Poelgeest, C. J. Melief, G. G. Kenter, and S. H. van der Burg.** 2012. A placebo-controlled randomized HPV16 synthetic long-peptide vaccination study in women with high-grade cervical squamous intraepithelial lesions. *Cancer Immunol.Immunother.* **61**:1485-1492.
69. **de, I. C.-M., E. Grande-Pulido, A. bero-Tamarit, and Codes-Manuel de Villena ME.** 2008. Cancer and immune response: old and new evidence for future challenges. *Oncologist.* **13**:1246-1254.
70. **Deeb, D., X. Gao, H. Jiang, G. Divine, S. A. Dulchavsky, and S. C. Gautam.** 2006. Vaccination with leukemia-loaded dendritic cells eradicates residual disease and prevent relapse. *J.Exp.Ther.Oncol.* **5**:183-193.
71. **Dejong, V., A. Degeorges, S. Filleur, S. Ait-Si-Ali, A. Mettouchi, P. Bornstein, B. Binetruy, and F. Cabon.** 1999. The Wilms' tumor gene product represses the transcription of thrombospondin 1 in response to overexpression of c-Jun. *Oncogene* **18**:3143-3151.
72. **Dey, B. R., V. P. Sukhatme, A. B. Roberts, M. B. Sporn, F. J. Rauscher, III, and S. J. Kim.** 1994. Repression of the transforming growth factor-beta 1 gene by the Wilms' tumor suppressor WT1 gene product. *Mol.Endocrinol.* **8**:595-602.

73. **Di, B. A., K. Keeshan, S. L. McKenna, and T. G. Cotter.** 2000. Molecular abnormalities in chronic myeloid leukemia: deregulation of cell growth and apoptosis. *Oncologist*. **5**:405-415.
74. **Dormoy, V., D. Jacqmin, H. Lang, and T. Massfelder.** 2012. From development to cancer: lessons from the kidney to uncover new therapeutic targets. *Anticancer Res.* **32**:3609-3617.
75. **Dorrell, L., P. Williams, A. Suttill, D. Brown, J. Roberts, C. Conlon, T. Hanke, and A. McMichael.** 2007. Safety and tolerability of recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing an HIV-1 gag/multiepitope immunogen (MVA.HIVA) in HIV-1-infected persons receiving combination antiretroviral therapy. *Vaccine*. **25**:3277-3283.
76. **Dobrovina, E. S., M. M. Dobrovin, S. Lee, J. H. Shieh, G. Heller, E. Pamer, and R. J. O'Reilly.** 2004. In vitro stimulation with WT1 peptide-loaded Epstein-Barr virus-positive B cells elicits high frequencies of WT1 peptide-specific T cells with in vitro and in vivo tumoricidal activity. *Clin.Cancer Res.* **10**:7207-7219.
77. **Drillien, R., D. Spehner, and D. Hanau.** 2004. Modified vaccinia virus Ankara induces moderate activation of human dendritic cells. *J.Gen.Virol.* **85**:2167-2175.
78. **Drummond, I. A., S. L. Madden, P. Rohwer-Nutter, G. I. Bell, V. P. Sukhatme, and F. J. Rauscher, III.** 1992. Repression of the insulin-like growth factor II gene by the Wilms tumor suppressor WT1. *Science* **257**:674-678.
79. **Dunn, G. P., A. T. Bruce, H. Ikeda, L. J. Old, and R. D. Schreiber.** 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat.Immunol.* **3**:991-998.
80. **Dunn, G. P., L. J. Old, and R. D. Schreiber.** 2004. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*. **21**:137-148.
81. **Eager, R. M. and J. Nemunaitis.** 2011. Clinical development directions in oncolytic viral therapy. *Cancer Gene Ther.* **18**:305-317.
82. **Eichten, A., M. Westfall, J. A. Pietenpol, and K. Munger.** 2002. Stabilization and functional impairment of the tumor suppressor p53 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Virology*. **295**:74-85.
83. **Eklund, J. W. and T. M. Kuzel.** 2004. A review of recent findings involving interleukin-2-based cancer therapy. *Curr.Opin.Oncol.* **16**:542-546.
84. **Englert, C.** 1998. WT1--more than a transcription factor? *Trends Biochem.Sci.* **23**:389-393.
85. **Englert, C., X. Hou, S. Maheswaran, P. Bennett, C. Ngwu, G. G. Re, A. J. Garvin, M. R. Rosner, and D. A. Haber.** 1995. WT1 suppresses synthesis of the epidermal growth factor receptor and induces apoptosis. *EMBO J.* **14**:4662-4675.

86. **Facciabene, A., X. Peng, I. S. Hagemann, K. Balint, A. Barchetti, L. P. Wang, P. A. Gimotty, C. B. Gilks, P. Lal, L. Zhang, and G. Coukos.** 2011. Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells. *Nature*. **475**:226-230.
87. **Feder-Mengus, C., E. Schultz-Thater, D. Oertli, W. R. Marti, M. Heberer, G. C. Spagnoli, and P. Zajac.** 2005. Nonreplicating recombinant vaccinia virus expressing CD40 ligand enhances APC capacity to stimulate specific CD4+ and CD8+ T cell responses. *Hum.Gene Ther.* **16**:348-360.
88. **Feng, X. H. and R. Derynck.** 2005. Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* **21**:659-693.
89. **Fernandez, N. C., A. Lozier, C. Flament, P. Ricciardi-Castagnoli, D. Bellet, M. Suter, M. Perricaudet, T. Tursz, E. Maraskovsky, and L. Zitvogel.** 1999. Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat.Med.* **5**:405-411.
90. **Foster, B. A., J. R. Gingrich, E. D. Kwon, C. Madias, and N. M. Greenberg.** 1997. Characterization of prostatic epithelial cell lines derived from transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate (TRAMP) model. *Cancer Res.* **57**:3325-3330.
91. **Fraizer, G. C., P. Patmasirawat, X. Zhang, and G. F. Saunders.** 1995. Expression of the tumor suppressor gene WT1 in both human and mouse bone marrow. *Blood* **86**:4704-4706.
92. **Frazer, I. H., M. Quinn, J. L. Nicklin, J. Tan, L. C. Perrin, P. Ng, V. M. O'Connor, O. White, N. Wendt, J. Martin, J. M. Crowley, S. J. Edwards, A. W. McKenzie, S. V. Mitchell, D. W. Maher, M. J. Pearse, and R. L. Bassar.** 2004. Phase 1 study of HPV16-specific immunotherapy with E6E7 fusion protein and ISCOMATRIX adjuvant in women with cervical intraepithelial neoplasia. *Vaccine* **23**:172-181.
93. **Frelin, L., G. Ahlen, M. Alheim, O. Weiland, C. Barnfield, P. Liljestrom, and M. Sallberg.** 2004. Codon optimization and mRNA amplification effectively enhances the immunogenicity of the hepatitis C virus nonstructural 3/4A gene. *Gene Ther.* **11**:522-533.
94. **Friboulet, L., C. Gourzones, S. W. Tsao, Y. Morel, C. Paturel, S. Temam, C. Uzan, and P. Busson.** 2010. Poly(I:C) induces intense expression of c-IAP2 and cooperates with an IAP inhibitor in induction of apoptosis in cancer cells. *BMC.Cancer* **10**:327.
95. **Gabrilovich, D. I. and S. Nagaraj.** 2009. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat.Rev.Immunol.* **9**:162-174.
96. **Gaiger, A., V. Reese, M. L. Disis, and M. A. Cheever.** 2000. Immunity to WT1 in the animal model and in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* **96**:1480-1489.

97. **Ganguly, N. and S. P. Parihar.** 2009. Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis. *J.Biosci.* **34**:113-123.
98. **Gannage, M., M. Abel, A. S. Michallet, S. Delluc, M. Lambert, S. Giraudier, R. Kratzer, G. Niedermann, L. Saveanu, F. Guilhot, L. Camoin, B. Varet, A. Buzyn, and S. Caillat-Zucman.** 2005. Ex vivo characterization of multiepitopic tumor-specific CD8 T cells in patients with chronic myeloid leukemia: implications for vaccine development and adoptive cellular immunotherapy. *J.Immunol.* **174**:8210-8218.
99. **Gao, L., I. Bellantuono, A. Elsasser, S. B. Marley, M. Y. Gordon, J. M. Goldman, and H. J. Stauss.** 2000. Selective elimination of leukemic CD34(+) progenitor cells by cytotoxic T lymphocytes specific for WT1. *Blood.* **95**:2198-2203.
100. **Garcia, J. A., P. Elson, A. Tyler, P. Triozzi, and R. Dreicer.** 2013. Sargramostim (GM-CSF) and lenalidomide in castration-resistant prostate cancer (CRPC): Results from a phase I-II clinical trial. *Urol.Oncol.*10. [Epub ahead of print]
101. **Garrigue-Antar, L., T. Munoz-Antonia, S. J. Antonia, J. Gesmonde, V. F. Vellucci, and M. Reiss.** 1995. Missense mutations of the transforming growth factor beta type II receptor in human head and neck squamous carcinoma cells. *Cancer Res.* **55**:3982-3987.
102. **Gashler, A. L., D. T. Bonthron, S. L. Madden, F. J. Rauscher, III, T. Collins, and V. P. Sukhatme.** 1992. Human platelet-derived growth factor A chain is transcriptionally repressed by the Wilms tumor suppressor WT1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89**:10984-10988.
103. **Gendron, K. B., A. Rodriguez, and D. A. Sewell.** 2006. Vaccination with human papillomavirus type 16 E7 peptide with CpG oligonucleotides for prevention of tumor growth in mice. *Arch.Otolaryngol.Head Neck Surg.* **132**:327-332.
104. **Ghiringhelli, F., L. Apetoh, A. Tesniere, L. Aymeric, Y. Ma, C. Ortiz, K. Vermaelen, T. Panaretakis, G. Mignot, E. Ullrich, J. L. Perfettini, F. Schlemmer, E. Tadmimir, M. Uhl, P. Genin, A. Civas, B. Ryffel, J. Kanellopoulos, J. Tschopp, F. Andre, R. Lidereau, N. M. McLaughlin, N. M. Haynes, M. J. Smyth, G. Kroemer, and L. Zitvogel.** 2009. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. *Nat.Med.* **15**:1170-1178.
105. **Gilbertson, R. J. and J. N. Rich.** 2007. Making a tumour's bed: glioblastoma stem cells and the vascular niche. *Nat.Rev.Cancer.* **7**:733-736.
106. **Golgher, D., E. Jones, F. Powrie, T. Elliott, and A. Gallimore.** 2002. Depletion of CD25+ regulatory cells uncovers immune responses to shared murine tumor rejection antigens. *Eur.J.Immunol.* **32**:3267-3275.

107. **Gopee, N. V., Y. Cui, G. Olson, A. R. Warbritton, B. J. Miller, L. H. Couch, W. G. Wamer, and P. C. Howard.** 2005. Response of mouse skin to tattooing: use of SKH-1 mice as a surrogate model for human tattooing. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **209**:145-158.
108. **Gray, C. M., M. Mlotshwa, C. Riou, T. Mathebula, R. D. de Assis, T. Mashishi, C. Seoighe, N. Ngandu, L. F. van, L. Morris, K. Mlisana, C. Williamson, and S. A. Karim.** 2009. Human immunodeficiency virus-specific gamma interferon enzyme-linked immunospot assay responses targeting specific regions of the proteome during primary subtype C infection are poor predictors of the course of viremia and set point. *J.Virol.* **83**:470-478.
109. **Grgacic, E. V. and D. A. Anderson.** 2006. Virus-like particles: passport to immune recognition. *Methods* **40**:60-65.
110. **Grivennikov, S. I., F. R. Greten, and M. Karin.** 2010. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell.* **140**:883-899.
111. **Grunebach, F., V. Mirakaj, V. Mirakaj, M. R. Muller, T. Brummendorf, and P. Brossart.** 2006. BCR-ABL is not an immunodominant antigen in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Res.* **66**:5892-5900.
112. **Guilhot, F., L. Roy, G. Martineua, J. Guilhot, and F. Millot.** 2007. Immunotherapy in chronic myelogenous leukemia. *Clin.Lymphoma Myeloma.* **7 Suppl 2**:S64-70.:S64-S70.
113. **Guo, Z. S., S. H. Thorne, and D. L. Bartlett.** 2008. Oncolytic virotherapy: molecular targets in tumor-selective replication and carrier cell-mediated delivery of oncolytic viruses. *Biochim.Biophys.Acta.* **1785**:217-231.
114. **Guse, K., V. Cerullo, and A. Hemminki.** 2011. Oncolytic vaccinia virus for the treatment of cancer. *Expert.Opin.Biol.Ther.* **11**:595-608.
115. **Guy, C. T., R. D. Cardiff, and W. J. Muller.** 1992. Induction of mammary tumors by expression of polyomavirus middle T oncogene: a transgenic mouse model for metastatic disease. *Mol.Cell Biol.* **12**:954-961.
116. **Haber, D. A., R. L. Sohn, A. J. Buckler, J. Pelletier, K. M. Call, and D. E. Housman.** 1991. Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene WT1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **88**:9618-9622.
117. **Han, Y., S. San-Marina, J. Liu, and M. D. Minden.** 2004. Transcriptional activation of c-myc proto-oncogene by WT1 protein. *Oncogene* **23**:6933-6941.
118. **Hanahan, D. and R. A. Weinberg.** 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* **144**:646-674.
119. **Hanke, T., T. J. Blanchard, J. Schneider, C. M. Hannan, M. Becker, S. C. Gilbert, A. V. Hill, G. L. Smith, and A. McMichael.** 1998. Enhancement of MHC class I-restricted peptide-specific T cell induction by a DNA prime/MVA boost vaccination regime. *Vaccine* **16**:439-445.



120. **Hannum, C., J. Culpepper, D. Campbell, T. McClanahan, S. Zurawski, J. F. Bazan, R. Kastelein, S. Hudak, J. Wagner, J. Mattson, and .** 1994. Ligand for FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase regulates growth of haematopoietic stem cells and is encoded by variant RNAs. *Nature* **368**:643-648.
121. **Hao, N. B., M. H. Lu, Y. H. Fan, Y. L. Cao, Z. R. Zhang, and S. M. Yang.** 2012. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin.Dev.Immunol.* **2012**:948098.
122. **Harari, A., P. A. Bart, W. Stohr, G. Tapia, M. Garcia, E. Medjitna-Rais, S. Burnet, C. Cellera, O. Erlwein, T. Barber, C. Moog, P. Liljestrom, R. Wagner, H. Wolf, J. P. Kraehenbuhl, M. Esteban, J. Heeney, M. J. Frchette, J. Tartaglia, S. McCormack, A. Babiker, J. Weber, and G. Pantaleo.** 2008. An HIV-1 clade C DNA prime, NYVAC boost vaccine regimen induces reliable, polyfunctional, and long-lasting T cell responses. *J.Exp.Med.* **205**:63-77.
123. **Harrington KJ, P. H. V. R.** 2008. Poxviruses as immunotherapy cancer therapeutics., p. 95-114. *In: R. G. V. H. S. P. Kevin J.Harrington (ed.), Viral therapy of cancer.* John Wiley & Sons Ltd.
124. **Harrington, M. A., B. Konicek, A. Song, X. L. Xia, W. J. Fredericks, and F. J. Rauscher, III.** 1993. Inhibition of colony-stimulating factor-1 promoter activity by the product of the Wilms' tumor locus. *J.Biol.Chem.* **268**:21271-21275.
125. **Hassin, D., O. G. Garber, A. Meiraz, Y. S. Schiffenbauer, and G. Berke.** 2011. Cytotoxic T lymphocyte perforin and Fas ligand working in concert even when Fas ligand lytic action is still not detectable. *Immunology.* **133**:190-196.
126. **He, L., H. Feng, A. Raymond, M. Kreeger, Y. Zeng, M. Graner, L. Whitesell, and E. Katsanis.** 2001. Dendritic-cell-peptide immunization provides immunoprotection against bcr-abl-positive leukemia in mice. *Cancer Immunol.Immunother.* **50**:31-40.
127. **Heckman, C., E. Mochon, M. Arcinas, and L. M. Boxer.** 1997. The WT1 protein is a negative regulator of the normal bcl-2 allele in t(14;18) lymphomas. *J.Biol.Chem.* **272**:19609-19614.
128. **Heidari, S., N. Krauzewicz, M. Kalantari, A. Vlastos, B. E. Griffin, and T. Dalianis.** 2000. Persistence and tissue distribution of DNA in normal and immunodeficient mice inoculated with polyomavirus VP1 pseudocapsid complexes or polyomavirus. *J.Virol.* **74**:11963-11965.
129. **Hewitt, S. M., S. Hamada, T. J. McDonnell, F. J. Rauscher, III, and G. F. Saunders.** 1995. Regulation of the proto-oncogenes bcl-2 and c-myc by the Wilms' tumor suppressor gene WT1. *Cancer Res.* **55**:5386-5389.
130. **Hill, A. V., A. Reyes-Sandoval, G. O'Hara, K. Ewer, A. Lawrie, A. Goodman, A. Nicosia, A. Folgari, S. Colloca, R. Cortese, S. C. Gilbert, and S. J. Draper.** 2010. Prime-boost vectored malaria vaccines: progress and prospects. *Hum.Vaccin.* **6**:78-83.

131. **Hiltbold, E. M. and P. A. Roche.** 2002. Trafficking of MHC class II molecules in the late secretory pathway. *Curr.Opin.Immunol.* **14**:30-35.
132. **Hodge, J. W., D. J. Poole, W. M. Aarts, Y. A. Gomez, L. Gritz, and J. Schlom.** 2003. Modified vaccinia virus ankara recombinants are as potent as vaccinia recombinants in diversified prime and boost vaccine regimens to elicit therapeutic antitumor responses. *Cancer Res.* **63**:7942-7949.
133. **Hohenstein, P. and N. D. Hastie.** 2006. The many facets of the Wilms' tumour gene, WT1. *Hum.Mol.Genet.* **15 Spec No 2**:R196-201.:R196-R201.
134. **Hosen, N., Y. Sonoda, Y. Oji, T. Kimura, H. Minamiguchi, H. Tamaki, M. Kawakami, M. Asada, K. Kanato, M. Motomura, M. Murakami, T. Fujioka, T. Masuda, E. H. Kim, A. Tsuboi, Y. Oka, T. Soma, H. Ogawa, and H. Sugiyama.** 2002. Very low frequencies of human normal CD34+ haematopoietic progenitor cells express the Wilms' tumour gene WT1 at levels similar to those in leukaemia cells. *Br.J.Haematol.* **116**:409-420.
135. **Hosono, S., I. Gross, M. A. English, K. M. Hajra, E. R. Fearon, and J. D. Licht.** 2000. E-cadherin is a WT1 target gene. *J.Biol.Chem.* **275**:10943-10953.
136. **Hruskova, V., A. Moravkova, K. Babiarova, V. Ludvikova, J. Fric, V. Vonka, and J. Forstova.** 2009. Bcr-Abl fusion sequences do not induce immune responses in mice when administered in mouse polyomavirus based virus-like particles. *Int.J.Oncol.* **35**:1247-1256.
137. **Huang, F. and Y. G. Chen.** 2012. Regulation of TGF-beta receptor activity. *Cell Biosci.* **2**:9. doi: 10.1186/2045-3701-2-9.:9-2.
138. **Huff, V.** 2011. Wilms' tumours: about tumour suppressor genes, an oncogene and a chameleon gene. *Nat.Rev.Cancer.* **11**:111-121.
139. **Hunder, N. N., H. Wallen, J. Cao, D. W. Hendricks, J. Z. Reilly, R. Rodmyre, A. Jungbluth, S. Gnjatic, J. A. Thompson, and C. Yee.** 2008. Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4+ T cells against NY-ESO-1. *N.Engl.J.Med.* **358**:2698-2703.
140. **Hypes, M. K., L. Pirisi, and K. E. Creek.** 2009. Mechanisms of decreased expression of transforming growth factor-beta receptor type I at late stages of HPV16-mediated transformation. *Cancer Lett.* **282**:177-186.
141. **Iezzi, M., E. Quaglino, A. Amici, P. L. Lollini, G. Forni, and F. Cavallo.** 2012. DNA vaccination against oncoantigens: A promise. *Oncoimmunology.* **1**:316-325.
142. **Iiyama, T., K. Udaka, S. Takeda, T. Takeuchi, Y. C. Adachi, Y. Ohtsuki, A. Tsuboi, S. Nakatsuka, O. A. Elisseeva, Y. Oji, M. Kawakami, H. Nakajima, S. Nishida, T. Shirakata, Y. Oka, T. Shuin, and H. Sugiyama.** 2007. WT1 (Wilms' tumor 1) peptide immunotherapy for renal cell carcinoma. *Microbiol.Immunol.* **51**:519-530.

143. **Inaba, K., M. Inaba, N. Romani, H. Aya, M. Deguchi, S. Ikehara, S. Muramatsu, and R. M. Steinman.** 1992. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J.Exp.Med.* **176**:1693-1702.
144. **Iwasaki, A. and R. Medzhitov.** 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat.Immunol.* **5**:987-995.
145. **Izumoto, S., A. Tsuboi, Y. Oka, T. Suzuki, T. Hashiba, N. Kagawa, N. Hashimoto, M. Maruno, O. A. Elisseeva, T. Shirakata, M. Kawakami, Y. Oji, S. Nishida, S. Ohno, I. Kawase, J. Hatazawa, S. Nakatsuka, K. Aozasa, S. Morita, J. Sakamoto, H. Sugiyama, and T. Yoshimine.** 2008. Phase II clinical trial of Wilms tumor 1 peptide vaccination for patients with recurrent glioblastoma multiforme. *J.Neurosurg.* **108**:963-971.
146. **Jabbour, E., J. Cortes, and H. Kantarjian.** 2007. Optimal first-line treatment of chronic myeloid leukemia. How to use imatinib and what role for newer drugs? *Oncology (Williston.Park)* **21**:653-662.
147. **Jacobs, B. L., J. O. Langland, K. V. Kibler, K. L. Denzler, S. D. White, S. A. Holechek, S. Wong, T. Huynh, and C. R. Baskin.** 2009. Vaccinia virus vaccines: past, present and future. *Antiviral Res.* **84**:1-13.
148. **Kaech, S. M., S. Hemby, E. Kersh, and R. Ahmed.** 2002. Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation. *Cell* **111**:837-851.
149. **Kagi, D., F. Vignaux, B. Ledermann, K. Burki, V. Depraetere, S. Nagata, H. Hengartner, and P. Golstein.** 1994. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science.* **265**:528-530.
150. **Kang, T. H., J. H. Lee, H. C. Bae, K. H. Noh, J. H. Kim, C. K. Song, B. C. Shin, C. F. Hung, T. C. Wu, J. S. Park, and T. W. Kim.** 2006. Enhancement of dendritic cell-based vaccine potency by targeting antigen to endosomal/lysosomal compartments. *Immunol.Lett.* **106**:126-134.
151. **Kaufman, H. L. and M. L. Disis.** 2004. Immune system versus tumor: shifting the balance in favor of DCs and effective immunity. *J.Clin.Invest* **113**:664-667.
152. **Kehrl, J. H.** 1991. Transforming growth factor-beta: an important mediator of immunoregulation. *Int.J.Cell Cloning* **9**:438-450.
153. **Kehrl, J. H., C. Thevenin, P. Rieckmann, and A. S. Fauci.** 1991. Transforming growth factor-beta suppresses human B lymphocyte Ig production by inhibiting synthesis and the switch from the membrane form to the secreted form of Ig mRNA. *J.Immunol.* **146**:4016-4023.
154. **Keilholz, U., A. Letsch, A. Busse, A. M. Asemissen, S. Bauer, I. W. Blau, W. K. Hofmann, L. Uharek, E. Thiel, and C. Scheibenbogen.** 2009. A clinical and immunologic phase 2 trial of Wilms tumor gene product 1 (WT1) peptide vaccination in patients with AML and MDS. *Blood* **113**:6541-6548.

155. **Kennedy, J. S. and R. N. Greenberg.** 2009. IMVAMUNE: modified vaccinia Ankara strain as an attenuated smallpox vaccine. *Expert.Rev.Vaccines*. **8**:13-24.
156. **Kenter, G. G., M. J. Welters, A. R. Valentijn, M. J. Lowik, Berends-van der Meer DM, A. P. Vloon, J. W. Drijfhout, A. R. Wafelman, J. Oostendorp, G. J. Fleuren, R. Offringa, S. H. van der Burg, and C. J. Melief.** 2008. Phase I immunotherapeutic trial with long peptides spanning the E6 and E7 sequences of high-risk human papillomavirus 16 in end-stage cervical cancer patients shows low toxicity and robust immunogenicity. *Clin.Cancer Res*. **14**:169-177.
157. **Kenter, G. G., M. J. Welters, A. R. Valentijn, M. J. Lowik, Berends-van der Meer DM, A. P. Vloon, F. Essahsah, L. M. Fathers, R. Offringa, J. W. Drijfhout, A. R. Wafelman, J. Oostendorp, G. J. Fleuren, S. H. van der Burg, and C. J. Melief.** 2009. Vaccination against HPV-16 oncoproteins for vulvar intraepithelial neoplasia. *N.Engl.J.Med*. **361**:1838-1847.
158. **Kim, J. H., J. Y. Oh, B. H. Park, D. E. Lee, J. S. Kim, H. E. Park, M. S. Roh, J. E. Je, J. H. Yoon, S. H. Thorne, D. Kirn, and T. H. Hwang.** 2006. Systemic armed oncolytic and immunologic therapy for cancer with JX-594, a targeted poxvirus expressing GM-CSF. *Mol.Ther*. **14**:361-370.
159. **King-Underwood, L., J. Renshaw, and K. Pritchard-Jones.** 1996. Mutations in the Wilms' tumor gene WT1 in leukemias. *Blood*. **87**:2171-2179.
160. **Kingston, D., M. A. Schmid, N. Onai, A. Obata-Onai, D. Baumjohann, and M. G. Manz.** 2009. The concerted action of GM-CSF and Flt3-ligand on in vivo dendritic cell homeostasis. *Blood* **114**:835-843.
161. **Kirkwood, J. M., L. H. Butterfield, A. A. Tarhini, H. Zarour, P. Kalinski, and S. Ferrone.** 2012. Immunotherapy of cancer in 2012. *CA Cancer J.Clin*. **62**:309-335.
162. **Kirkwood, J. M., S. Lee, S. J. Moschos, M. R. Albertini, J. C. Michalak, C. Sander, T. Whiteside, L. H. Butterfield, and L. Weiner.** 2009. Immunogenicity and antitumor effects of vaccination with peptide vaccine+/-granulocyte-monocyte colony-stimulating factor and/or IFN-alpha2b in advanced metastatic melanoma: Eastern Cooperative Oncology Group Phase II Trial E1696. *Clin.Cancer Res*. **15**:1443-1451.
163. **Kislin, K. L., M. T. Marron, G. Li, M. W. Graner, and E. Katsanis.** 2007. Chaperone-rich cell lysate embedded with BCR-ABL peptide demonstrates enhanced anti-tumor activity against a murine BCR-ABL positive leukemia. *FASEB J*. **21**:2173-2184.
164. **Kitawaki, T., N. Kadowaki, K. Fukunaga, Y. Kasai, T. Maekawa, K. Ohmori, T. Kondo, R. Maekawa, M. Takahara, M. Nieda, K. Kuzushima, T. Ishikawa, and T. Uchiyama.** 2011. A phase I/IIa clinical trial of immunotherapy for elderly patients with acute myeloid leukaemia using dendritic cells co-pulsed with WT1 peptide and zoledronate. *Br.J.Haematol*. **153**:796-799.

165. **Kitawaki, T., N. Kadowaki, T. Kondo, T. Ishikawa, T. Ichinohe, S. Teramukai, M. Fukushima, Y. Kasai, T. Maekawa, and T. Uchiyama.** 2008. Potential of dendritic-cell immunotherapy for relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, shown by WT1 peptide- and keyhole-limpet-hemocyanin-pulsed, donor-derived dendritic-cell vaccine for acute myeloid leukemia. *Am.J.Hematol.* **83**:315-317.
166. **Klencke, B., M. Matijevic, R. G. Urban, J. L. Lathey, M. L. Hedley, M. Berry, J. Thatcher, V. Weinberg, J. Wilson, T. Darragh, N. Jay, C. M. Da, and J. M. Palefsky.** 2002. Encapsulated plasmid DNA treatment for human papillomavirus 16-associated anal dysplasia: a Phase I study of ZYC101. *Clin.Cancer Res.* **8**:1028-1037.
167. **Knights, A. J., A. Zaniou, R. C. Rees, G. Pawelec, and L. Muller.** 2002. Prediction of an HLA-DR-binding peptide derived from Wilms' tumour 1 protein and demonstration of in vitro immunogenicity of WT1(124-138)-pulsed dendritic cells generated according to an optimised protocol. *Cancer Immunol.Immunother.* **51**:271-281.
168. **Kobayashi, H., T. Nagato, N. Aoki, K. Sato, S. Kimura, M. Tateno, and E. Celis.** 2006. Defining MHC class II T helper epitopes for WT1 tumor antigen. *Cancer Immunol.Immunother.* **55**:850-860.
169. **Komesli, S., D. Vivien, and P. Dutartre.** 1998. Chimeric extracellular domain type II transforming growth factor (TGF)-beta receptor fused to the Fc region of human immunoglobulin as a TGF-beta antagonist. *Eur.J.Biochem.* **254**:505-513.
170. **Konopka, J. B. and O. N. Witte.** 1985. Detection of c-abl tyrosine kinase activity in vitro permits direct comparison of normal and altered abl gene products. *Mol.Cell Biol.* **5**:3116-3123.
171. **Kontani, K., K. Kajino, C. L. Huang, S. Fujino, O. Taguchi, A. Yamauchi, H. Yokomise, and K. Ogasawara.** 2006. Spontaneous elicitation of potent antitumor immunity and eradication of established tumors by administration of DNA encoding soluble transforming growth factor-beta II receptor without active antigen-sensitization. *Cancer Immunol.Immunother.* **55**:579-587.
172. **Koontongkaew, S.** 2013. The tumor microenvironment contribution to development, growth, invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinomas. *J.Cancer* **4**:66-83.
173. **Kotwal, G. J., S. N. Isaacs, R. McKenzie, M. M. Frank, and B. Moss.** 1990. Inhibition of the complement cascade by the major secretory protein of vaccinia virus. *Science* **250**:827-830.
174. **Kotwal, G. J. and B. Moss.** 1988. Vaccinia virus encodes a secretory polypeptide structurally related to complement control proteins. *Nature* **335**:176-178.
175. **Kozak, M.** 1997. Recognition of AUG and alternative initiator codons is augmented by G in position +4 but is not generally affected by the nucleotides in positions +5 and +6. *EMBO J.* **16**:2482-2492.

176. **Krauzewicz, N., C. Cox, E. Soeda, B. Clark, S. Rayner, and B. E. Griffin.** 2000. Sustained ex vivo and in vivo transfer of a reporter gene using polyoma virus pseudocapsids. *Gene Ther.* **7**:1094-1102.
177. **Kroemer, G., L. Galluzzi, O. Kepp, and L. Zitvogel.** 2013. Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annu.Rev.Immunol.* **31**:51-72.
178. **Krug, L. M., T. Dao, A. B. Brown, P. Maslak, W. Travis, S. Bekele, T. Korontsvit, V. Zakhaleva, J. Wolchok, J. Yuan, H. Li, L. Tyson, and D. A. Scheinberg.** 2010. WT1 peptide vaccinations induce CD4 and CD8 T cell immune responses in patients with mesothelioma and non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol.Immunother.* **59**:1467-1479.
179. **Kuball, J., B. K. de, E. Wagner, M. Wattad, E. Antunes, R. D. Weeratna, A. P. Vicari, C. Lotz, D. S. van, S. Hol, P. D. Greenberg, W. Heit, H. L. Davis, and M. Theobald.** 2011. Pitfalls of vaccinations with WT1-, Proteinase3- and MUC1-derived peptides in combination with MontanideISA51 and CpG7909. *Cancer Immunol.Immunother.* **60**:161-171.
180. **Kutinova, L., V. Ludvikova, L. Maresova, S. Nemeckova, J. Broucek, P. Hainz, and V. Vonka.** 1999. Effect of virulence on immunogenicity of single and double vaccinia virus recombinants expressing differently immunogenic antigens: antibody-response inhibition induced by immunization with a mixture of recombinants differing in virulence. *J.Gen.Virol.* **80 ( Pt 11)**:2901-2908.
181. **Kutinova, L., V. Ludvikova, V. Simonova, M. Otavova, J. Krystofova, P. Hainz, M. Press, D. Kunke, and V. Vonka.** 1995. Search for optimal parent for recombinant vaccinia virus vaccines. Study of three vaccinia virus vaccinal strains and several virus lines derived from them. *Vaccine* **13**:487-493.
182. **Kwon, E. D., A. A. Hurwitz, B. A. Foster, C. Madias, A. L. Feldhaus, N. M. Greenberg, M. B. Burg, and J. P. Allison.** 1997. Manipulation of T cell costimulatory and inhibitory signals for immunotherapy of prostate cancer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**:8099-8103.
183. **Kwon, Y. R., M. J. Son, H. J. Kim, and Y. J. Kim.** 2012. Reactivation of Silenced WT1 Transgene by Hypomethylating Agents - Implications for in vitro Modeling of Chemoimmunotherapy. *Immune.Netw.* **12**:58-65.
184. **Lambotte, O., G. Ferrari, C. Moog, N. L. Yates, H. X. Liao, R. J. Parks, C. B. Hicks, K. Owzar, G. D. Tomaras, D. C. Montefiori, B. F. Haynes, and J. F. Delfraissy.** 2009. Heterogeneous neutralizing antibody and antibody-dependent cell cytotoxicity responses in HIV-1 elite controllers. *AIDS* **23**:897-906.
185. **Langland, J. O. and B. L. Jacobs.** 2002. The role of the PKR-inhibitory genes, E3L and K3L, in determining vaccinia virus host range. *Virology* **299**:133-141.
186. **Lee, S. B. and D. A. Haber.** 2001. Wilms tumor and the WT1 gene. *Exp.Cell Res.* **264**:74-99.

187. **Lee, S. B., K. Huang, R. Palmer, V. B. Truong, D. Herzlinger, K. A. Kolquist, J. Wong, C. Paulding, S. K. Yoon, W. Gerald, J. D. Oliner, and D. A. Haber.** 1999. The Wilms tumor suppressor WT1 encodes a transcriptional activator of amphiregulin. *Cell* **98**:663-673.
188. **Li, M. O., S. Sanjabi, and R. A. Flavell.** 2006. Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity*. **25**:455-471.
189. **Li, R. S., G. L. Law, R. A. Seifert, P. J. Romaniuk, and D. R. Morris.** 1999. Ornithine decarboxylase is a transcriptional target of tumor suppressor WT1. *Exp.Cell Res.* **247**:257-266.
190. **Lin, K., K. Doolan, C. F. Hung, and T. C. Wu.** 2010. Perspectives for preventive and therapeutic HPV vaccines. *J.Formos.Med.Assoc.* **109**:4-24.
191. **Liu, K., B. Lemon, and P. Traktman.** 1995. The dual-specificity phosphatase encoded by vaccinia virus, VH1, is essential for viral transcription in vivo and in vitro. *J.Virol.* **69**:7823-7834.
192. **Liu, L., R. Chavan, and M. B. Feinberg.** 2008. Dendritic cells are preferentially targeted among hematolymphocytes by Modified Vaccinia Virus Ankara and play a key role in the induction of virus-specific T cell responses in vivo. *BMC.Immunol.* **9**:15.
193. **Liu, Q., C. Zhang, A. Sun, Y. Zheng, L. Wang, and X. Cao.** 2009. Tumor-educated CD11b<sup>high</sup>Ia<sup>low</sup> regulatory dendritic cells suppress T cell response through arginase I. *J.Immunol.* **182**:6207-6216.
194. **Liu, V. C., L. Y. Wong, T. Jang, A. H. Shah, I. Park, X. Yang, Q. Zhang, S. Lonning, B. A. Teicher, and C. Lee.** 2007. Tumor evasion of the immune system by converting CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells into CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells: role of tumor-derived TGF-beta. *J.Immunol.* **178**:2883-2892.
195. **Liyanage, U. K., T. T. Moore, H. G. Joo, Y. Tanaka, V. Herrmann, G. Doherty, J. A. Drebin, S. M. Strasberg, T. J. Eberlein, P. S. Goedegebuure, and D. C. Linehan.** 2002. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J.Immunol.* **169**:2756-2761.
196. **Loeb, D. M., D. Korz, M. Katsnelson, E. A. Burwell, A. D. Friedman, and S. Sukumar.** 2002. Cyclin E is a target of WT1 transcriptional repression. *J.Biol.Chem.* **277**:19627-19632.
197. **Lousberg, E. L., K. R. Diener, M. P. Brown, and J. D. Hayball.** 2011. Innate immune recognition of poxviral vaccine vectors. *Expert.Rev.Vaccines.* **10**:1435-1449.
198. **Lu, S. L., M. Kawabata, T. Imamura, K. Miyazono, and Y. Yuasa.** 1999. Two divergent signaling pathways for TGF-beta separated by a mutation of its type II receptor gene. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **259**:385-390.



199. **Lucansky, V., E. Sobotkova, R. Tachezy, M. Duskova, and V. Vonka.** 2009. DNA vaccination against bcr-abl-positive cells in mice. *Int.J.Oncol.* **35**:941-951.
200. **Ludvikova, V., L. Kutinova, V. Simonova, and M. Otavova.** 1994. Evaluation of various virulence tests with low virulence vaccinia virus in mice. *Biologicals* **22**:187-190.
201. **Lyman, S. D., K. Brasel, A. M. Rousseau, and D. E. Williams.** 1994. The flt3 ligand: a hematopoietic stem cell factor whose activities are distinct from steel factor. *Stem Cells* **12 Suppl 1**:99-107.
202. **Lyman, S. D., L. James, L. Johnson, K. Brasel, V. P. de, S. S. Escobar, H. Downey, R. R. Splett, M. P. Beckmann, and H. J. McKenna.** 1994. Cloning of the human homologue of the murine flt3 ligand: a growth factor for early hematopoietic progenitor cells. *Blood* **83**:2795-2801.
203. **Lyman, S. D., L. James, T. Vanden Bos, V. P. de, K. Brasel, B. Gliniak, L. T. Hollingsworth, K. S. Picha, H. J. McKenna, R. R. Splett, and .** 1993. Molecular cloning of a ligand for the flt3/flk-2 tyrosine kinase receptor: a proliferative factor for primitive hematopoietic cells. *Cell* **75**:1157-1167.
204. **Lynch, D. H., A. Andreasen, E. Maraskovsky, J. Whitmore, R. E. Miller, and J. C. Schuh.** 1997. Flt3 ligand induces tumor regression and antitumor immune responses in vivo. *Nat.Med.* **3**:625-631.
205. **Macen, J. L., K. A. Graham, S. F. Lee, M. Schreiber, L. K. Boshkov, and G. McFadden.** 1996. Expression of the myxoma virus tumor necrosis factor receptor homologue and M11L genes is required to prevent virus-induced apoptosis in infected rabbit T lymphocytes. *Virology* **218**:232-237.
206. **Mackova, J., L. Kutinova, P. Hainz, J. Krystofova, V. Sroller, P. Otahal, P. Gabriel, and S. Nemeckova.** 2004. Adjuvant effect of dendritic cells transduced with recombinant vaccinia virus expressing HPV16-E7 is inhibited by co-expression of IL12. *Int.J.Oncol.* **24**:1581-1588.
207. **Mackova, J., J. Stasikova, L. Kutinova, J. Masin, P. Hainz, M. Simsova, P. Gabriel, P. Sebo, and S. Nemeckova.** 2006. Prime/boost immunotherapy of HPV16-induced tumors with E7 protein delivered by Bordetella adenylate cyclase and modified vaccinia virus Ankara. *Cancer Immunol.Immunother.* **55**:39-46.
208. **Mailander, V., C. Scheibenbogen, E. Thiel, A. Letsch, I. W. Blau, and U. Keilholz.** 2004. Complete remission in a patient with recurrent acute myeloid leukemia induced by vaccination with WT1 peptide in the absence of hematological or renal toxicity. *Leukemia* **18**:165-166.
209. **Manning, J., M. Indrova, B. Lubyova, H. Pribylova, J. Bieblova, J. Hejnar, J. Simova, T. Jandlova, J. Bubenik, and M. Reinis.** 2008. Induction of MHC class I molecule cell surface expression and epigenetic activation of antigen-processing machinery components in a murine model for human papilloma virus 16-associated tumours. *Immunology* **123**:218-227.

210. **Manthorpe, M., F. Cornefert-Jensen, J. Hartikka, J. Felgner, A. Rundell, M. Margalith, and V. Dwarki.** 1993. Gene therapy by intramuscular injection of plasmid DNA: studies on firefly luciferase gene expression in mice. *Hum.Gene Ther.* **4**:419-431.
211. **Marie, J. C., D. Liggitt, and A. Y. Rudensky.** 2006. Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor-beta receptor. *Immunity.* **25**:441-454.
212. **Marigo, I., L. Dolcetti, P. Serafini, P. Zanovello, and V. Bronte.** 2008. Tumor-induced tolerance and immune suppression by myeloid derived suppressor cells. *Immunol.Rev.* **222**:162-79.
213. **Marshall, N. A., L. E. Christie, L. R. Munro, D. J. Culligan, P. W. Johnston, R. N. Barker, and M. A. Vickers.** 2004. Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma. *Blood* **103**:1755-1762.
214. **Martinez, G. J., Z. Zhang, J. M. Reynolds, S. Tanaka, Y. Chung, T. Liu, E. Robertson, X. Lin, X. H. Feng, and C. Dong.** 2010. Smad2 positively regulates the generation of Th17 cells. *J.Biol.Chem.* **285**:29039-29043.
215. **Martini, M., M. G. Testi, M. Pasetto, M. C. Picchio, G. Innamorati, M. Mazzocco, S. Ugel, S. Cingarlini, V. Bronte, P. Zanovello, M. Krampera, F. Mosna, T. Cestari, A. P. Riviera, N. Brutti, O. Barbieri, L. Matera, G. Tridente, M. Colombatti, and S. Sartoris.** 2010. IFN-gamma-mediated upmodulation of MHC class I expression activates tumor-specific immune response in a mouse model of prostate cancer. *Vaccine* **28**:3548-3557.
216. **Maru, Y.** 2012. Molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Cancer Sci.* **103**:1601-1610.
217. **Maslak, P. G., T. Dao, L. M. Krug, S. Chanel, T. Korontsvit, V. Zakhaleva, R. Zhang, J. D. Wolchok, J. Yuan, J. Pinilla-Ibarz, E. Berman, M. Weiss, J. Jurcic, M. G. Frattini, and D. A. Scheinberg.** 2010. Vaccination with synthetic analog peptides derived from WT1 oncoprotein induces T-cell responses in patients with complete remission from acute myeloid leukemia. *Blood* **116**:171-179.
218. **Massague, J.** 2000. How cells read TGF-beta signals. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **1**:169-178.
219. **Massague, J., J. Seoane, and D. Wotton.** 2005. Smad transcription factors. *Genes Dev.* **19**:2783-2810.
220. **Matthews, W., C. T. Jordan, G. W. Wiegand, D. Pardoll, and I. R. Lemischka.** 1991. A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations. *Cell* **65**:1143-1152.
221. **Mayo, M. W., C. Y. Wang, S. S. Drouin, L. V. Madrid, A. F. Marshall, J. C. Reed, B. E. Weissman, and A. S. Baldwin.** 1999. WT1 modulates apoptosis by transcriptionally upregulating the bcl-2 proto-oncogene. *EMBO J.* **18**:3990-4003.

- 
222. **McCann, S., J. Sullivan, J. Guerra, M. Arcinas, and L. M. Boxer.** 1995. Repression of the c-myc gene by WT1 protein in T and B cell lines. *J.Biol.Chem.* **270**:23785-23789.
223. **McKenna, H. J., K. L. Stocking, R. E. Miller, K. Brasel, S. T. De, E. Maraskovsky, C. R. Maliszewski, D. H. Lynch, J. Smith, B. Pulendran, E. R. Roux, M. Teepe, S. D. Lyman, and J. J. Peschon.** 2000. Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* **95**:3489-3497.
224. **McKinney, B. A., D. M. Reif, M. T. Rock, K. M. Edwards, S. F. Kingsmore, J. H. Moore, and J. E. Crowe, Jr.** 2006. Cytokine expression patterns associated with systemic adverse events following smallpox immunization. *J.Infect.Dis.* **194**:444-453.
225. **Mellman, I., G. Coukos, and G. Dranoff.** 2011. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature.* **480**:480-489.
226. **Melo, J. V., D. E. Gordon, N. C. Cross, and J. M. Goldman.** 1993. The ABL-BCR fusion gene is expressed in chronic myeloid leukemia. *Blood.* **81**:158-165.
227. **Menke, A. L., A. Shvarts, N. Riteco, R. C. van Ham, A. J. van der Eb, and A. G. Jochemsen.** 1997. Wilms' tumor 1-KTS isoforms induce p53-independent apoptosis that can be partially rescued by expression of the epidermal growth factor receptor or the insulin receptor. *Cancer Res.* **57**:1353-1363.
228. **Menke, A. L., A. J. van der Eb, and A. G. Jochemsen.** 1998. The Wilms' tumor 1 gene: oncogene or tumor suppressor gene? *Int.Rev.Cytol.* **181:151-212.**:151-212.
229. **Menssen, H. D., H. J. Renkl, U. Rodeck, J. Maurer, M. Notter, S. Schwartz, R. Reinhardt, and E. Thiel.** 1995. Presence of Wilms' tumor gene (wt1) transcripts and the WT1 nuclear protein in the majority of human acute leukemias. *Leukemia.* **9**:1060-1067.
230. **Meyn, M. A., III, M. B. Wilson, F. A. Abdi, N. Fahey, A. P. Schiavone, J. Wu, J. M. Hochrein, J. R. Engen, and T. E. Smithgall.** 2006. Src family kinases phosphorylate the Bcr-Abl SH3-SH2 region and modulate Bcr-Abl transforming activity. *J.Biol.Chem.* **281**:30907-30916.
231. **Miller-Hodges, E. and P. Hohenstein.** 2012. WT1 in disease: shifting the epithelial-mesenchymal balance. *J.Pathol.* **226**:229-240.
232. **Miwa, H., M. Beran, and G. F. Saunders.** 1992. Expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in human leukemias. *Leukemia.* **6**:405-409.
233. **Mohan, K. V., C. X. Zhang, and C. D. Atreya.** 2009. The proteoglycan bamacan is a host cellular ligand of vaccinia virus neurovirulence factor N1L. *J.Neurovirol.* **15**:229-237.
234. **Monsurro, V., D. Nagorsen, E. Wang, M. Provenzano, M. E. Dudley, S. A. Rosenberg, and F. M. Marincola.** 2002. Functional heterogeneity of vaccine-induced CD8(+) T cells. *J.Immunol.* **168**:5933-5942.

235. **Montross, L., S. Watkins, R. B. Moreland, H. Mamon, D. L. Caspar, and R. L. Garcea.** 1991. Nuclear assembly of polyomavirus capsids in insect cells expressing the major capsid protein VP1. *J.Virol.* **65**:4991-4998.
236. **Moore, A. W., A. Schedl, L. McInnes, M. Doyle, J. Hecksher-Sorensen, and N. D. Hastie.** 1998. YAC transgenic analysis reveals Wilms' tumour 1 gene activity in the proliferating coelomic epithelium, developing diaphragm and limb. *Mech.Dev.* **79**:169-184.
237. **Morita, S., Y. Oka, A. Tsuboi, M. Kawakami, M. Maruno, S. Izumoto, T. Osaki, T. Taguchi, T. Ueda, A. Myoui, S. Nishida, T. Shirakata, S. Ohno, Y. Oji, K. Aozasa, J. Hatazawa, K. Udaka, H. Yoshikawa, T. Yoshimine, S. Noguchi, I. Kawase, S. Nakatsuka, H. Sugiyama, and J. Sakamoto.** 2006. A phase I/II trial of a WT1 (Wilms' tumor gene) peptide vaccine in patients with solid malignancy: safety assessment based on the phase I data. *Jpn.J.Clin.Oncol.* **36**:231-236.
238. **Morrison, D. J., M. A. English, and J. D. Licht.** 2005. WT1 induces apoptosis through transcriptional regulation of the proapoptotic Bcl-2 family member Bak. *Cancer Res.* **65**:8174-8182.
239. **Morrow, M. P., J. Yan, and N. Y. Sardesai.** 2013. Human papillomavirus therapeutic vaccines: targeting viral antigens as immunotherapy for precancerous disease and cancer. *Expert.Rev.Vaccines.* **12**:271-283.
240. **Moshier, J. A., M. Skunca, W. Wu, S. M. Boppana, F. J. Rauscher, III, and J. Dosescu.** 1996. Regulation of ornithine decarboxylase gene expression by the Wilms' tumor suppressor WT1. *Nucleic Acids Res.* **24**:1149-1157.
241. **Moss B.** 2007. Poxviridae: the viruses and their replication. p. 2905-2945. *In: H. P. Knipe DM (ed.), Fields Virology. 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.*
242. **Munger, K. and P. M. Howley.** 2002. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res.* **89**:213-228.
243. **Muraoka, R. S., N. Dumont, C. A. Ritter, T. C. Dugger, D. M. Brantley, J. Chen, E. Easterly, L. R. Roebuck, S. Ryan, P. J. Gotwals, V. Kotliansky, and C. L. Arteaga.** 2002. Blockade of TGF-beta inhibits mammary tumor cell viability, migration, and metastases. *J.Clin.Invest* **109**:1551-1559.
244. **Murphy, G. F., A. Radu, M. Kaminer, and D. Berd.** 1993. Autologous melanoma vaccine induces inflammatory responses in melanoma metastases: relevance to immunologic regression and immunotherapy. *J.Invest Dermatol.* **100**:335S-341S.
245. **Murray-Zmijewski, F., E. A. Slee, and X. Lu.** 2008. A complex barcode underlies the heterogeneous response of p53 to stress. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **9**:702-712.

246. **Nagorsen, D., C. Scheibenbogen, G. Schaller, B. Leigh, A. Schmittel, A. Letsch, E. Thiel, and U. Keilholz.** 2003. Differences in T-cell immunity toward tumor-associated antigens in colorectal cancer and breast cancer patients. *Int.J.Cancer* **105**:221-225.
247. **Najarro, P., P. Traktman, and J. A. Lewis.** 2001. Vaccinia virus blocks gamma interferon signal transduction: viral VH1 phosphatase reverses Stat1 activation. *J.Virol.* **75**:3185-3196.
248. **Nakao, M., S. Yokota, T. Iwai, H. Kaneko, S. Horiike, K. Kashima, Y. Sonoda, T. Fujimoto, and S. Misawa.** 1996. Internal tandem duplication of the *flt3* gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* **10**:1911-1918.
249. **Nam, J. S., M. Terabe, M. J. Kang, H. Chae, N. Voong, Y. A. Yang, A. Laurence, A. Michalowska, M. Mamura, S. Lonning, J. A. Berzofsky, and L. M. Wakefield.** 2008. Transforming growth factor beta subverts the immune system into directly promoting tumor growth through interleukin-17. *Cancer Res.* **68**:3915-3923.
250. **Nemeckova, S., M. Smahel, P. Hainz, J. Mackova, K. Zurkova, P. Gabriel, M. Indrova, and L. Kutinova.** 2007. 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.* **54**:326-333.
251. **Nemeckova, S., R. Stranska, J. Subrtova, L. Kutinova, P. Otahal, P. Hainz, L. Maresova, V. Sroller, E. Hamsikova, and V. Vonka.** 2002. Immune response to E7 protein of human papillomavirus type 16 anchored on the cell surface. *Cancer Immunol.Immunother.* **51**:111-119.
252. **Nichols, K. E., G. G. Re, Y. X. Yan, A. J. Garvin, and D. A. Haber.** 1995. WT1 induces expression of insulin-like growth factor 2 in Wilms' tumor cells. *Cancer Res.* **55**:4540-4543.
253. **NOWELL, P. C.** 1962. The minute chromosome (Ph1) in chronic granulocytic leukemia. *Blut.* **8**:65-66.
254. **Oguiura, N., D. Spehner, and R. Drillien.** 1993. Detection of a protein encoded by the vaccinia virus C7L open reading frame and study of its effect on virus multiplication in different cell lines. *J.Gen.Virol.* **74 ( Pt 7)**:1409-1413.
255. **Oh, S., Y. Song, J. Yim, and T. K. Kim.** 1999. The Wilms' tumor 1 tumor suppressor gene represses transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene. *J.Biol.Chem.* **274**:37473-37478.
256. **Oka, Y., A. Tsuboi, O. A. Elisseeva, H. Nakajima, F. Fujiki, M. Kawakami, T. Shirakata, S. Nishida, N. Hosen, Y. Oji, I. Kawase, and H. Sugiyama.** 2007. WT1 peptide cancer vaccine for patients with hematopoietic malignancies and solid cancers. *ScientificWorldJournal.* **7**:649-665.

- 
257. **Oka, Y., A. Tsuboi, F. Fujiki, Z. Li, H. Nakajima, N. Hosen, T. Shirakata, S. Nishida, Y. Oji, I. Kawase, and H. Sugiyama.** 2009. WT1 peptide vaccine as a paradigm for "cancer antigen-derived peptide"-based immunotherapy for malignancies: successful induction of anti-cancer effect by vaccination with a single kind of WT1 peptide. *Anticancer Agents Med.Chem.* **9**:787-797.
258. **Oka, Y., A. Tsuboi, Y. Oji, I. Kawase, and H. Sugiyama.** 2008. WT1 peptide vaccine for the treatment of cancer. *Curr.Opin.Immunol.* **20**:211-220.
259. **Oka, Y., A. Tsuboi, T. Taguchi, T. Osaki, T. Kyo, H. Nakajima, O. A. Elisseeva, Y. Oji, M. Kawakami, K. Ikegame, N. Hosen, S. Yoshihara, F. Wu, F. Fujiki, M. Murakami, T. Masuda, S. Nishida, T. Shirakata, S. Nakatsuka, A. Sasaki, K. Udaka, H. Dohy, K. Aozasa, S. Noguchi, I. Kawase, and H. Sugiyama.** 2004. Induction of WT1 (Wilms' tumor gene)-specific cytotoxic T lymphocytes by WT1 peptide vaccine and the resultant cancer regression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **101**:13885-13890.
260. **Oka, Y., K. Udaka, A. Tsuboi, O. A. Elisseeva, H. Ogawa, K. Aozasa, T. Kishimoto, and H. Sugiyama.** 2000. Cancer immunotherapy targeting Wilms' tumor gene WT1 product. *J.Immunol.* **164**:1873-1880.
261. **Padron, E., J. S. Painter, S. Kunigal, A. W. Mailloux, K. McGraw, J. M. McDaniel, E. Kim, C. Bebbington, M. Baer, G. Yarranton, J. Lancet, R. S. Komrokji, O. Abdel-Wahab, A. F. List, and P. K. Epling-Burnette.** 2013. GM-CSF-dependent pSTAT5 sensitivity is a feature with therapeutic potential in chronic myelomonocytic leukemia. *Blood.* [Epub ahead of print]
262. **Parajuli, P., R. L. Mosley, V. Pisarev, J. Chavez, A. Ulrich, M. Varney, R. K. Singh, and J. E. Talmadge.** 2001. Flt3 ligand and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor preferentially expand and stimulate different dendritic and T-cell subsets. *Exp.Hematol.* **29**:1185-1193.
263. **Parato, K. A., D. Senger, P. A. Forsyth, and J. C. Bell.** 2005. Recent progress in the battle between oncolytic viruses and tumours. *Nat.Rev.Cancer.* **5**:965-976.
264. **Pardo, J., R. Wallich, P. Martin, C. Urban, A. Rongvaux, R. A. Flavell, A. Mullbacher, C. Borner, and M. M. Simon.** 2008. Granzyme B-induced cell death exerted by ex vivo CTL: discriminating requirements for cell death and some of its signs. *Cell Death.Differ.* **15**:567-579.
265. **Patel, D. D., D. J. Pickup, and W. K. Joklik.** 1986. Isolation of cowpox virus A-type inclusions and characterization of their major protein component. *Virology* **149**:174-189.
266. **Perkus, M. E., S. J. Goebel, S. W. Davis, G. P. Johnson, K. Limbach, E. K. Norton, and E. Paoletti.** 1990. Vaccinia virus host range genes. *Virology* **179**:276-286.

267. **Perrone, G., P. A. Ruffini, V. Catalano, C. Spino, D. Santini, P. Muretto, C. Spoto, C. Zingaretti, V. Sisti, P. Alessandrini, P. Giordani, A. Cicetti, S. D'Emidio, S. Morini, A. Ruzzo, M. Magnani, G. Tonini, C. Rabitti, and F. Graziano.** 2008. Intratumoural FOXP3-positive regulatory T cells are associated with adverse prognosis in radically resected gastric cancer. *Eur.J.Cancer.* **44**:1875-1882.
268. **Petrackova, M., E. Sobotkova, M. Duskova, P. Jinoch, and V. Vonka.** 2009. Isolation and properties of gene-modified mouse bcr-abl-transformed cells expressing various immunostimulatory factors. *Neoplasma.* **56**:194-201.
269. **Petrackova, M., L. Stanek, V. Mandys, P. Dundr, and V. Vonka.** 2012. Properties of bcr-abl-transformed mouse 12B1 cells secreting interleukin-2 and granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF): II. Adverse effects of GM-CSF. *Int.J.Oncol.* **40**:1915-1922.
270. **Petrackova, M., R. Tachezy, and V. Vonka.** 2012. Properties of bcr-abl-transformed mouse 12B1 cells secreting interleukin-2 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: I. Derivation, genetic stability, oncogenicity and immunogenicity. *Int.J.Oncol.* **40**:1668-1676.
271. **Pokorna, D., N. Cerovska, M. Smahel, T. Moravec, V. Ludvikova, J. Mackova, H. Synkova, M. Duskova, P. Hozak, and J. Veleminsky.** 2005. DNA vaccines based on chimeric potyvirus-like particles carrying HPV16 E7 peptide (aa 44-60). *Oncol.Rep.* **14**:1045-1053.
272. **Pokorna, D., I. Polakova, M. Kindlova, M. Duskova, V. Ludvikova, P. Gabriel, L. Kutinova, M. Muller, and M. Smahel.** 2009. Vaccination with human papillomavirus type 16-derived peptides using a tattoo device. *Vaccine* **27**:3519-3529.
273. **Pokorna, D., I. Rubio, and M. Muller.** 2008. DNA-vaccination via tattooing induces stronger humoral and cellular immune responses than intramuscular delivery supported by molecular adjuvants. *Genet.Vaccines.Ther.* **6**:4.
274. **Prussin, C.** 1997. Cytokine flow cytometry: understanding cytokine biology at the single-cell level. *J.Clin.Immunol.* **17**:195-204.
275. **Pulendran, B., J. L. Smith, M. Jenkins, M. Schoenborn, E. Maraskovsky, and C. R. Maliszewski.** 1998. Prevention of peripheral tolerance by a dendritic cell growth factor: flt3 ligand as an adjuvant. *J.Exp.Med.* **188**:2075-2082.
276. **Quintas-Cardama, A. and J. E. Cortes.** 2006. Chronic myeloid leukemia: diagnosis and treatment. *Mayo Clin.Proc.* **81**:973-988.
277. **Rajput, S. and A. Wilber.** 2010. Roles of inflammation in cancer initiation, progression, and metastasis. *Front Biosci.(Schol.Ed).* **2**:176-83.:176-183.
278. **Rauscher, F. J., III, J. F. Morris, O. E. Tournay, D. M. Cook, and T. Curran.** 1990. Binding of the Wilms' tumor locus zinc finger protein to the EGR-1 consensus sequence. *Science.* **250**:1259-1262.

- 
279. **Rayment, I., T. S. Baker, D. L. Caspar, and W. T. Murakami.** 1982. Polyoma virus capsid structure at 22.5 Å resolution. *Nature* **295**:110-115.
280. **Reichert, T. E., C. Scheuer, R. Day, W. Wagner, and T. L. Whiteside.** 2001. The number of intratumoral dendritic cells and zeta-chain expression in T cells as prognostic and survival biomarkers in patients with oral carcinoma. *Cancer* **91**:2136-2147.
281. **Reinis, M.** 2010. Immunotherapy of MHC class I-deficient tumors. *Future.Oncol.* **6**:1577-1589.
282. **Reinis, M., I. Stepanek, J. Simova, J. Bieblova, H. Pribylova, M. Indrova, and J. Bubenik.** 2010. Induction of protective immunity against MHC class I-deficient, HPV16-associated tumours with peptide and dendritic cell-based vaccines. *Int.J.Oncol.* **36**:545-551.
283. **Reits, E. A., J. W. Hodge, C. A. Herberts, T. A. Groothuis, M. Chakraborty, E. K. Wansley, K. Camphausen, R. M. Luiten, A. H. de Ru, J. Neijssen, A. Griekspoor, E. Mesman, F. A. Verreck, H. Spits, J. Schlom, V. P. van, and J. J. Neefjes.** 2006. Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy. *J.Exp.Med.* **203**:1259-1271.
284. **Ren, R.** 2002. The molecular mechanism of chronic myelogenous leukemia and its therapeutic implications: studies in a murine model. *Oncogene* **21**:8629-8642.
285. **Reya, T., S. J. Morrison, M. F. Clarke, and I. L. Weissman.** 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**:105-111.
286. **Rezvani, K., A. S. Yong, S. Mielke, B. Jafarpour, B. N. Savani, R. Q. Le, R. Eniafe, L. Musse, C. Boss, R. Kurlander, and A. J. Barrett.** 2011. Repeated PR1 and WT1 peptide vaccination in Montanide-adjuvant fails to induce sustained high-avidity, epitope-specific CD8<sup>+</sup> T cells in myeloid malignancies. *Haematologica* **96**:432-440.
287. **Rezvani, K., A. S. Yong, S. Mielke, B. N. Savani, L. Musse, J. Superata, B. Jafarpour, C. Boss, and A. J. Barrett.** 2008. Leukemia-associated antigen-specific T-cell responses following combined PR1 and WT1 peptide vaccination in patients with myeloid malignancies. *Blood* **111**:236-242.
288. **Roldao, A., M. C. Mellado, L. R. Castilho, M. J. Carrondo, and P. M. Alves.** 2010. Virus-like particles in vaccine development. *Expert.Rev.Vaccines* **9**:1149-1176.
289. **Rosnet, O., S. Marchetto, O. deLapeyriere, and D. Birnbaum.** 1991. Murine Flt3, a gene encoding a novel tyrosine kinase receptor of the PDGFR/CSF1R family. *Oncogene* **6**:1641-1650.
290. **Rowley, J. D.** 1973. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* **243**:290-293.



291. **Roy, P. and R. Noad.** 2008. Virus-like particles as a vaccine delivery system: myths and facts. *Hum.Vaccin.* **4**:5-12.
292. **Ryan, G., V. Steele-Perkins, J. F. Morris, F. J. Rauscher, III, and G. R. Dressler.** 1995. Repression of Pax-2 by WT1 during normal kidney development. *Development* **121**:867-875.
293. **Saade, F. and N. Petrovsky.** 2012. Technologies for enhanced efficacy of DNA vaccines. *Expert.Rev.Vaccines.* **11**:189-209.
294. **Sahin, U., O. Tureci, H. Schmitt, B. Cochlovius, T. Johannes, R. Schmits, F. Stenner, G. Luo, I. Schobert, and M. Pfreundschuh.** 1995. Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**:11810-11813.
295. **Sakamoto, Y., M. Yoshida, K. Semba, and T. Hunter.** 1997. Inhibition of the DNA-binding and transcriptional repression activity of the Wilms' tumor gene product, WT1, by cAMP-dependent protein kinase-mediated phosphorylation of Ser-365 and Ser-393 in the zinc finger domain. *Oncogene.* **15**:2001-2012.
296. **Sanchez-Puig, J. M., L. Sanchez, G. Roy, and R. Blasco.** 2004. Susceptibility of different leukocyte cell types to Vaccinia virus infection. *Virology.* **1**:10.:10.
297. **Sandel, M. H., F. M. Speetjens, A. G. Menon, P. A. Albertsson, P. H. Basse, M. Hokland, J. F. Nagelkerke, R. A. Tollenaar, d. van, V, and P. J. Kuppen.** 2005. Natural killer cells infiltrating colorectal cancer and MHC class I expression. *Mol.Immunol.* **42**:541-546.
298. **Santin, A. D., S. Bellone, M. Gokden, M. J. Cannon, and G. P. Parham.** 2002. Vaccination with HPV-18 E7-pulsed dendritic cells in a patient with metastatic cervical cancer. *N.Engl.J.Med.* **346**:1752-1753.
299. **Santos, C. R., S. Blanco, A. Sevilla, and P. A. Lazo.** 2006. Vaccinia virus B1R kinase interacts with JIP1 and modulates c-Jun-dependent signaling. *J.Virol.* **80**:7667-7675.
300. **Santos, C. R., F. M. Vega, S. Blanco, R. Barcia, and P. A. Lazo.** 2004. The vaccinia virus B1R kinase induces p53 downregulation by an Mdm2-dependent mechanism. *Virology* **328**:254-265.
301. **Sattler, M. and J. D. Griffin.** 2001. Mechanisms of transformation by the BCR/ABL oncogene. *Int.J.Hematol.* **73**:278-291.
302. **Scheich, F., J. Duyster, C. Peschel, and H. Bernhard.** 2007. The immunogenicity of Bcr-Abl expressing dendritic cells is dependent on the Bcr-Abl kinase activity and dominated by Bcr-Abl regulated antigens. *Blood* **110**:2556-2560.
303. **Schoenberger, S. P., R. E. Toes, E. I. van der Voort, R. Offringa, and C. J. Melief.** 1998. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* **393**:480-483.

304. **Schwarz, K., E. Meijerink, D. E. Speiser, A. C. Tissot, I. Cielens, R. Renhof, A. Dishlers, P. Pumpens, and M. F. Bachmann.** 2005. Efficient homologous prime-boost strategies for T cell vaccination based on virus-like particles. *Eur.J.Immunol.* **35**:816-821.
305. **Senechal, K., J. Halpern, and C. L. Sawyers.** 1996. The CRKL adaptor protein transforms fibroblasts and functions in transformation by the BCR-ABL oncogene. *J.Biol.Chem.* **271**:23255-23261.
306. **Shen, Y. and J. Nemunaitis.** 2005. Fighting cancer with vaccinia virus: teaching new tricks to an old dog. *Mol.Ther.* **11**:180-195.
307. **Sim, E. U., A. Smith, E. Szilagi, F. Rae, P. Ioannou, M. H. Lindsay, and M. H. Little.** 2002. Wnt-4 regulation by the Wilms' tumour suppressor gene, WT1. *Oncogene* **21**:2948-2960.
308. **Slingluff, C. L., Jr.** 2011. The present and future of peptide vaccines for cancer: single or multiple, long or short, alone or in combination? *Cancer J.* **17**:343-350.
309. **Slingluff, C. L., Jr. and D. E. Speiser.** 2005. Progress and controversies in developing cancer vaccines. *J.Transl.Med.* **3**:18.
310. **Slota, M., J. B. Lim, Y. Dang, and M. L. Disis.** 2011. ELISpot for measuring human immune responses to vaccines. *Expert.Rev.Vaccines.* **10**:299-306.
311. **Smahel, M., D. Pokorna, J. Mackova, and J. Vlasak.** 2004. Enhancement of immunogenicity of HPV16 E7 oncogene by fusion with E. coli beta-glucuronidase. *J.Gene Med.* **6**:1092-1101.
312. **Smahel, M., I. Polakova, D. Pokorna, V. Ludvikova, M. Duskova, and J. Vlasak.** 2008. Enhancement of T cell-mediated and humoral immunity of beta-glucuronidase-based DNA vaccines against HPV16 E7 oncoprotein. *Int.J.Oncol.* **33**:93-101.
313. **Smith, D. L., J. Burthem, and A. D. Whetton.** 2003. Molecular pathogenesis of chronic myeloid leukaemia. *Expert.Rev.Mol.Med.* **5**:1-27.
314. **Smith, G. L. and B. Moss.** 1983. Infectious poxvirus vectors have capacity for at least 25 000 base pairs of foreign DNA. *Gene.* **25**:21-28.
315. **Smith, G. L., J. A. Symons, A. Khanna, A. Vanderplasschen, and A. Alcami.** 1997. Vaccinia virus immune evasion. *Immunol.Rev.* **159**:137-154.
316. **Srinivasan, R. and J. D. Wolchok.** 2004. Tumor antigens for cancer immunotherapy: therapeutic potential of xenogeneic DNA vaccines. *J.Transl.Med.* **2**:12.
317. **Strell, C., H. Rundqvist, and A. Ostman.** 2012. Fibroblasts--a key host cell type in tumor initiation, progression, and metastasis. *Ups.J.Med.Sci.* **117**:187-195.
318. **Strobl, H. and W. Knapp.** 1999. TGF-beta1 regulation of dendritic cells. *Microbes.Infect.* **1**:1283-1290.

319. **Sugiyama, H.** 2010. WT1 (Wilms' tumor gene 1): biology and cancer immunotherapy. *Jpn.J.Clin.Oncol.* **40**:377-387.
320. **Sun, J. C. and M. J. Bevan.** 2003. Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* **300**:339-342.
321. **Sun, L., G. Wu, J. K. Willson, E. Zborowska, J. Yang, I. Rajkarunanayake, J. Wang, L. E. Gentry, X. F. Wang, and M. G. Brattain.** 1994. Expression of transforming growth factor beta type II receptor leads to reduced malignancy in human breast cancer MCF-7 cells. *J.Biol.Chem.* **269**:26449-26455.
322. **Sutter, G., A. Ramsey-Ewing, R. Rosales, and B. Moss.** 1994. Stable expression of the vaccinia virus K1L gene in rabbit cells complements the host range defect of a vaccinia virus mutant. *J.Virol.* **68**:4109-4116.
323. **Suzuki, E., V. Kapoor, H. K. Cheung, L. E. Ling, P. A. DeLong, L. R. Kaiser, and S. M. Albelda.** 2004. Soluble type II transforming growth factor-beta receptor inhibits established murine malignant mesothelioma tumor growth by augmenting host antitumor immunity. *Clin.Cancer Res.* **10**:5907-5918.
324. **Tadmor, T., D. Attias, and A. Polliack.** 2011. Myeloid-derived suppressor cells--their role in haemato-oncological malignancies and other cancers and possible implications for therapy. *Br.J.Haematol.* **153**:557-567.
325. **Tamaki, H., H. Ogawa, K. Ohyashiki, J. H. Ohyashiki, H. Iwama, K. Inoue, T. Soma, Y. Oka, T. Tatekawa, Y. Oji, A. Tsuboi, E. H. Kim, M. Kawakami, K. Fuchigami, M. Tomonaga, K. Toyama, K. Aozasa, T. Kishimoto, and H. Sugiyama.** 1999. The Wilms' tumor gene WT1 is a good marker for diagnosis of disease progression of myelodysplastic syndromes. *Leukemia.* **13**:393-399.
326. **Tanaka, H., J. Tanaka, J. Kjaergaard, and S. Shu.** 2002. Depletion of CD4+ CD25+ regulatory cells augments the generation of specific immune T cells in tumor-draining lymph nodes. *J.Immunother.* **25**:207-217.
327. **Tartaglia, J., M. E. Perkus, J. Taylor, E. K. Norton, J. C. Audonnet, W. I. Cox, S. W. Davis, J. van der Hoeven, B. Meignier, M. Riviere, and .** 1992. NYVAC: a highly attenuated strain of vaccinia virus. *Virology.* **188**:217-232.
328. **Tegerstedt, K., A. V. Franzen, K. Andreasson, J. Joneberg, S. Heidari, T. Ramqvist, and T. Dalianis.** 2005. Murine polyomavirus virus-like particles (VLPs) as vectors for gene and immune therapy and vaccines against viral infections and cancer. *Anticancer Res.* **25**:2601-2608.
329. **Terajima, M., J. Cruz, G. Raines, E. D. Kilpatrick, J. S. Kennedy, A. L. Rothman, and F. A. Ennis.** 2003. Quantitation of CD8+ T cell responses to newly identified HLA-A\*0201-restricted T cell epitopes conserved among vaccinia and variola (smallpox) viruses. *J.Exp.Med.* **197**:927-932.
330. **Thomas, D. A. and J. Massague.** 2005. TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell* **8**:369-380.

331. **Tscharke, D. C.** 2007. Adaptive immunity to vaccinia virus: revisiting an old friend. *Future Virology* **2**:163-172.
332. **Tscharke, D. C., W. P. Woo, I. G. Sakala, J. Sidney, A. Sette, D. J. Moss, J. R. Bennink, G. Karupiah, and J. W. Yewdell.** 2006. Poxvirus CD8+ T-cell determinants and cross-reactivity in BALB/c mice. *J.Virol.* **80**:6318-6323.
333. **Udtha, M., S. J. Lee, R. Alam, K. Coombes, and V. Huff.** 2003. Upregulation of c-MYC in WT1-mutant tumors: assessment of WT1 putative transcriptional targets using cDNA microarray expression profiling of genetically defined Wilms' tumors. *Oncogene* **22**:3821-3826.
334. **Vaha-Koskela, M. J., J. E. Heikkila, and A. E. Hinkkanen.** 2007. Oncolytic viruses in cancer therapy. *Cancer Lett.* **254**:178-216.
335. **Valenti, R., V. Huber, M. Iero, P. Filipazzi, G. Parmiani, and L. Rivoltini.** 2007. Tumor-released microvesicles as vehicles of immunosuppression. *Cancer Res.* **67**:2912-2915.
336. **van Poelgeest, M. I., M. J. Welters, E. M. van Esch, L. F. Stynenbosch, G. Kerpershoek, van Persijn van Meerten EL, M. van den Hende, M. J. Lowik, Berends-van der Meer DM, L. M. Fathers, A. R. Valentijn, J. Oostendorp, G. J. Fleuren, C. J. Melief, G. G. Kenter, and S. H. van der Burg.** 2013. HPV16 synthetic long peptide (HPV16-SLP) vaccination therapy of patients with advanced or recurrent HPV16-induced gynecological carcinoma, a phase II trial. *J.Transl.Med.* **11**:88.
337. **Van Tendeloo, V. F., d. van, V, D. A. Van, N. Cools, S. Anguille, K. Ladell, E. Gostick, K. Vermeulen, K. Pieters, G. Nijs, B. Stein, E. L. Smits, W. A. Schroyens, A. P. Gadisseur, I. Vrelust, P. G. Jorens, H. Goossens, I. J. de Vries, D. A. Price, Y. Oji, Y. Oka, H. Sugiyama, and Z. N. Berneman.** 2010. Induction of complete and molecular remissions in acute myeloid leukemia by Wilms' tumor 1 antigen-targeted dendritic cell vaccination. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **107**:13824-13829.
338. **Van, D. A., Z. N. Berneman, and T. Van, V.** 2012. Active specific immunotherapy targeting the Wilms' tumor protein 1 (WT1) for patients with hematological malignancies and solid tumors: lessons from early clinical trials. *Oncologist.* **17**:250-259.
339. **Verfaillie, C. M.** 1998. Biology of chronic myelogenous leukemia. *Hematol.Oncol.Clin.North Am.* **12**:1-29.
340. **Wagner, K. J., C. E. Patek, C. Miles, S. Christie, A. J. Brookes, and M. L. Hooper.** 2001. Truncation of WT1 results in downregulation of cyclin G1 and IGFBP-4 expression. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **287**:977-982.
341. **Walsh, S. R. and R. Dolin.** 2011. Vaccinia viruses: vaccines against smallpox and vectors against infectious diseases and tumors. *Expert.Rev.Vaccines.* **10**:1221-1240.

342. **Wang, R., J. Epstein, Y. Charoenvit, F. M. Baraceros, N. Rahardjo, T. Gay, J. G. Banania, R. Chattopadhyay, I. de, V, T. L. Richie, N. Tornieporth, D. L. Doolan, K. E. Kester, D. G. Heppner, J. Norman, D. J. Carucci, J. D. Cohen, and S. L. Hoffman.** 2004. Induction in humans of CD8+ and CD4+ T cell and antibody responses by sequential immunization with malaria DNA and recombinant protein. *J.Immunol.* **172**:5561-5569.
343. **Wang, Z. Y., S. L. Madden, T. F. Deuel, and F. J. Rauscher, III.** 1992. The Wilms' tumor gene product, WT1, represses transcription of the platelet-derived growth factor A-chain gene. *J.Biol.Chem.* **267**:21999-22002.
344. **Wang, Z. Y., Q. Q. Qiu, and T. F. Deuel.** 1993. The Wilms' tumor gene product WT1 activates or suppresses transcription through separate functional domains. *J.Biol.Chem.* **268**:9172-9175.
345. **Ward, A., J. A. Pooler, K. Miyagawa, A. Duarte, N. D. Hastie, and A. Caricasole.** 1995. Repression of promoters for the mouse insulin-like growth factor II-encoding gene (Igf-2) by products of the Wilms' tumour suppressor gene wt1. *Gene* **167**:239-243.
346. **Watowich, S. S. and Y. J. Liu.** 2010. Mechanisms regulating dendritic cell specification and development. *Immunol.Rev.* **238**:76-92.
347. **Welters, M. J., G. G. Kenter, S. J. Piersma, A. P. Vloon, M. J. Lowik, Berends-van der Meer DM, J. W. Drijfhout, A. R. Valentijn, A. R. Wafelman, J. Oostendorp, G. J. Fleuren, R. Offringa, C. J. Melief, and S. H. van der Burg.** 2008. Induction of tumor-specific CD4+ and CD8+ T-cell immunity in cervical cancer patients by a human papillomavirus type 16 E6 and E7 long peptides vaccine. *Clin.Cancer Res.* **14**:178-187.
348. **Werner, H., F. J. Rauscher, III, V. P. Sukhatme, I. A. Drummond, C. T. Roberts, Jr., and D. LeRoith.** 1994. Transcriptional repression of the insulin-like growth factor I receptor (IGF-I-R) gene by the tumor suppressor WT1 involves binding to sequences both upstream and downstream of the IGF-I-R gene transcription start site. *J.Biol.Chem.* **269**:12577-12582.
349. **Werner, H., G. G. Re, I. A. Drummond, V. P. Sukhatme, F. J. Rauscher, III, D. A. Sens, A. J. Garvin, D. LeRoith, and C. T. Roberts, Jr.** 1993. Increased expression of the insulin-like growth factor I receptor gene, IGF1R, in Wilms tumor is correlated with modulation of IGF1R promoter activity by the WT1 Wilms tumor gene product. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**:5828-5832.
350. **Wherry, E. J.** 2011. T cell exhaustion. *Nat.Immunol.* **12**:492-499.
351. **Wherry, E. J., V. Teichgraber, T. C. Becker, D. Masopust, S. M. Kaech, R. Antia, U. H. von Andrian, and R. Ahmed.** 2003. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat.Immunol.* **4**:225-234.
352. **Whiteside, T. L.** 2006. Immune suppression in cancer: effects on immune cells, mechanisms and future therapeutic intervention. *Semin.Cancer Biol.* **16**:3-15.

- 
353. **Whiteside, T. L.** 2010. Immune responses to malignancies. *J.Allergy Clin.Immunol.* **125**:S272-S283.
354. **Williams, J. A., A. E. Carnes, and C. P. Hodgson.** 2009. Plasmid DNA vaccine vector design: impact on efficacy, safety and upstream production. *Biotechnol.Adv.* **27**:353-370.
355. **Williams, M. A. and M. Fukuda.** 1990. Accumulation of membrane glycoproteins in lysosomes requires a tyrosine residue at a particular position in the cytoplasmic tail. *J.Cell Biol.* **111**:955-966.
356. **Wodnar-Filipowicz, A.** 2003. Flt3 ligand: role in control of hematopoietic and immune functions of the bone marrow. *News Physiol Sci.* **18**:247-251.
357. **Woo, E. Y., H. Yeh, C. S. Chu, K. Schlienger, R. G. Carroll, J. L. Riley, L. R. Kaiser, and C. H. June.** 2002. Cutting edge: Regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation. *J.Immunol.* **168**:4272-4276.
358. **Woolard, S. N. and U. Kumaraguru.** 2010. Viral vaccines and CTL response. *J.Biomed.Biotechnol.* **2010**:141657.
359. **Wrana, J. L., L. Attisano, R. Wieser, F. Ventura, and J. Massague.** 1994. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* **370**:341-347.
360. **Wu, M. Y. and C. S. Hill.** 2009. Tgf-beta superfamily signaling in embryonic development and homeostasis. *Dev.Cell* **16**:329-343.
361. **Wu, T. C., F. G. Guarnieri, K. F. Staveley-O'Carroll, R. P. Viscidi, H. I. Levitsky, L. Hedrick, K. R. Cho, J. T. August, and D. M. Pardoll.** 1995. Engineering an intracellular pathway for major histocompatibility complex class II presentation of antigens. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **92**:11671-11675.
362. **Yamada, A., T. Sasada, M. Noguchi, and K. Itoh.** 2013. Next-generation peptide vaccines for advanced cancer. *Cancer Sci.* **104**:15-21.
363. **Yang, L., Y. Han, S. F. Suarez, and M. D. Minden.** 2007. A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story. *Leukemia.* **21**:868-876.
364. **Yang, S., B. Wang, C. Guan, B. Wu, C. Cai, M. Wang, B. Zhang, T. Liu, and P. Yang.** 2011. Foxp3+IL-17+ T cells promote development of cancer-initiating cells in colorectal cancer. *J.Leukoc.Biol.* **89**:85-91.
365. **Yang, Y. A., O. Dukhanina, B. Tang, M. Mamura, J. J. Letterio, J. MacGregor, S. C. Patel, S. Khozin, Z. Y. Liu, J. Green, M. R. Anver, G. Merlino, and L. M. Wakefield.** 2002. Lifetime exposure to a soluble TGF-beta antagonist protects mice against metastasis without adverse side effects. *J.Clin.Invest* **109**:1607-1615.
366. **Yildiz, I., S. Shukla, and N. F. Steinmetz.** 2011. Applications of viral nanoparticles in medicine. *Curr.Opin.Biotechnol.* **22**:901-908.

- 
367. **Yong, X., Y. F. Xiao, G. Luo, B. He, M. H. Lu, C. J. Hu, H. Guo, and S. M. Yang.** 2012. Strategies for enhancing vaccine-induced CTL antitumor immune responses. *J.Biomed.Biotechnol.* **2012**:605045.
368. **Yotnda, P., H. Firat, F. Garcia-Pons, Z. Garcia, G. Gourru, J. P. Vernant, F. A. Lemonnier, V. Leblond, and P. Langlade-Demoyen.** 1998. Cytotoxic T cell response against the chimeric p210 BCR-ABL protein in patients with chronic myelogenous leukemia. *J.Clin.Invest.* **101**:2290-2296.
369. **Yu, Q., N. Hu, and M. Ostrowski.** 2009. Poxvirus tropism for primary human leukocytes and hematopoietic cells. *Methods Mol.Biol.* **515**:309-28.
370. **Zaia, A., G. C. Fraizer, L. Piantanelli, and G. F. Saunders.** 2001. Transcriptional regulation of the androgen signaling pathway by the Wilms' tumor suppressor gene WT1. *Anticancer Res.* **21**:1-10.
371. **Zeng, Y., H. Feng, M. W. Graner, and E. Katsanis.** 2003. Tumor-derived, chaperone-rich cell lysate activates dendritic cells and elicits potent antitumor immunity. *Blood* **101**:4485-4491.
372. **Zeng, Y., M. W. Graner, S. Thompson, M. Marron, and E. Katsanis.** 2005. Induction of BCR-ABL-specific immunity following vaccination with chaperone-rich cell lysates derived from BCR-ABL+ tumor cells. *Blood.* **105**:2016-2022.
373. **Zhang, L., W. Zhou, V. E. Velculescu, S. E. Kern, R. H. Hruban, S. R. Hamilton, B. Vogelstein, and K. W. Kinzler.** 1997. Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science.* **276**:1268-1272.
374. **Zhang, S. and H. E. Broxmeyer.** 2000. Flt3 ligand induces tyrosine phosphorylation of gab1 and gab2 and their association with shp-2, grb2, and PI3 kinase. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **277**:195-199.
375. **Zurkova, K., K. Babiarova, P. Hainz, J. Krystofova, L. Kutinova, P. Otahal, and S. Nemeckova.** 2009. The expression of the soluble isoform of hFlt3 ligand by recombinant vaccinia virus enhances immunogenicity of the vector. *Oncol.Rep.* **21**:1335-1343.
376. **Zurkova, K., P. Chlanda, Z. Samkova, K. Babiarova, L. Kutinova, J. Krystofova, P. Hainz, and S. Nemeckova.** 2011. Expression of soluble TGF-beta receptor II by recombinant Vaccinia virus enhances E7 specific immunotherapy of HPV16 tumors. *Neoplasma.* **58**:181-188.
377. **Zurkova, K., P. Hainz, J. Krystofova, L. Kutinova, M. Sanda, and S. Nemeckova.** 2010. Attenuation of vaccinia virus by the expression of human Flt3 ligand. *Virolog.J.* **7**:109.

- webové stránky:

web 1)

<http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treatmenttypes/immunotherapy/immunotherapy-non-specific-immunotherapies>

web 2)

<http://www.wiley.com//legacy/wileychi/genmed/clinical/>

web 3)

<http://bensonapbiology.concordcarlisle.wikispaces.net/Poxviruses>

web 4)

<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/REVIEWS/articles/Safrit.html>



## 8. PŘÍLOHY

1. Publikace 5:

**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**

**Autoři:** Pavel Gabriel, Katarína Babiarová, Kamila Žůrková, Jitka Kryštofová, Petr Hainz, Lud'a Kutinová, Šárka Němečková

**Vydáno v časopise:** Viral Immunology 2012; 58(3):181-188; IF 1,78

2. Supplementary Figure 1

3. Supplementary Figure 2

# 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

Pavel Gabriel, Katarina Babiarova, Kamila Zurkova, Jitka Krystofova,  
Petr Hainz, Luda Kutinova, and Sarka Nemeckova

## Abstract

Viral CC chemokine inhibitor (vCCI) of the clone P13 vaccinia virus (VACV) strain PRAHA lacks eight amino acids in the signal peptide sequence. To study the influence of vCCI on virus biology, a virus with the vCCI gene coding for a prolonged signal sequence was prepared. We found that secreted vCCI attenuated the virus *in vivo*, and that it correlated with decreased levels of RANTES, eotaxin, TARC, and MDC in the blood in comparison with the parental virus. We determined the influence of vCCI on the CTL response against VACV E3<sub>(140–148)</sub> (VGPSNSPTF) and HPV16 E7<sub>(49–57)</sub> (RAHYNIVTF) H-2D<sup>b</sup>-restricted epitopes. The examination of the specific CTL response elicited by immunization with the recombinant VACV-expressing tumor-associated HPV16 E7 antigen by IFN- $\gamma$  ELISPOT showed that the immunogenicity of the recombinant VACV-producing secretory vCCI was similar to that of the parent virus or deletion mutant in the C23L/B29R locus. Immunization with the secretory vCCI-producing recombinant virus has a lower therapeutic anti-tumor effect against TC-1 tumors. Viral CCI downregulated the E7-specific response induced by gene gun immunization with the DNA vaccines pBSC-SigE7 LAMP and pBSC-vCCI. We also observed that the immune response against vCCI elicited by the DNA vaccine did not affect the multiplication of VACV *in vivo*.

## Introduction

CHEMOKINES ARE SOLUBLE SMALL PROTEINS (8–14 kDa) which are important in inflammation, embryogenesis, wound healing, angiogenesis, tumorigenicity, and natural and adaptive immunity against microbial pathogens. Binding to cognate 7-span transmembrane G protein-coupled receptors elicits responses of various target cells (1,2). It results in cell migration, macrophage activation, T-cell activation, and cytokine production, or dendritic cell maturation. Virus infection leads to the upregulation of the expression of multiple chemokine genes that are important for the antiviral response (3). To impair host defense, many viruses developed elaborate means to counteract chemokines (4). Poxviruses, the large DNA viruses that encode many immunomodulatory factors, have several mechanisms available to block chemokine activity. One type of secretory viral CC chemokine inhibitors (vCCI) (5) is encoded by many members of the poxvirus family, such as some vaccinia virus strains, cowpox virus, camelpox virus, variola virus, Shope fibroma virus, and

myxoma virus (6–8). The 35- to 40-kDa protein has no homology to any known cellular chemokine receptor or to any other eukaryotic protein. Viral CCI has the ability to bind most CC chemokines (vCCI) with high affinity, thus blocking the interaction with a cellular receptor; however, they do not bind to CXC, C, or CX3C chemokines (9). Secretory vCCI from the Lister strain of vaccinia virus reduces virus virulence and the inflammatory response to infection, as demonstrated in a murine intranasal model (10).

Chemokines play an important role in tumorigenesis. Tumor cells and stromal cells like fibroblasts and leukocytes produce many chemokines which sustain the growth of tumor cells, induce angiogenesis, and facilitate the immune escape of tumor cells. Some CC chemokines contribute to angiogenic progression and development. Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1 or CCL2) is known to potentiate the activity of vascular endothelial growth factor (VEGF) (11) and transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (12). MCP-1 expression in the tumor may mediate angiogenesis through prominent recruitment of macrophages, which subsequently produce angiogenic factors

such as tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6), and IL-8 (13,14). In addition to MCP-1, other CC chemokines have been shown to mediate angiogenesis and modulate extracellular matrix *in vivo* (15–20). The chemokines MCP-1 and RANTES (CCL5) produced by tumors induce the formation of the immunosuppressive environment through initiation of migration of tumor-associated macrophages (TAM) into tumor stroma, which leads to the inhibition of tumor-specific T-cell effectors (21). Attracted TAMs are also stimulated by these chemokines to higher levels of production of pro-tumorigenic factors that promote angiogenesis and degradation of the extracellular matrix, such as the matrix metalloproteinases MMP2 and MMP3, and production of inflammatory cytokines like TNF- $\alpha$ , that induce additional production of tumor-supporting factors such as MMP and the chemokines MCP-1 and RANTES by tumor cells. This shows that MCP-1 and RANTES are at the beginning of the malignant process, inducing repeated cycles of attraction of monocytes and secretion of pro-tumorigenic factors (22). Although the described mode of MCP-1 and RANTES action is employed during breast cancer progression, a similar situation may arise during cervical cancer progression. Elevated plasma levels of RANTES were found in higher stages of cervical cancer, and the amount of RANTES was considerably increased in the primary tumor and metastases in all patients. The higher number of macrophages developing the pro-malignant phenotype correlating with carcinogenesis was observed in the tumor stroma of patients with high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cancer (23). TAMs also play an important role in the development of TC-1 tumors (24).

Poxviruses have been used many times in experimental cancer therapy. They function either as vehicles for delivering therapeutic genes such as tumor-associated antigens and immunomodulatory molecules, or as oncolytic agents (25). To date, a large number of clinical studies have been conducted with vaccinia virus (VACV) vectors. It has been shown that immunization with the vaccinia virus expressing human papillomavirus 16 and 18 E6 and E7 proteins has an anti-tumor effect, and the capability to elicit antigen-specific T-cell responses in laboratory mice (26,27). The therapeutic effect of these vaccines has also been shown in a number of studies in patients with vulval and vaginal neoplasia (28–30).

In our work, we wanted to evaluate the contribution of vCCI to the capability of VACV to induce an immune response. To uncover the role of vCCI in the induction of an antitumor effect by immunization with a recombinant vector derived from the vaccinia virus strain Praha, we constructed deletion and insertion mutants encompassing C23L/B29R loci, and expressing tumor-associated antigen HPV16 E7 protein. Beside the evaluation of the specific CTL response by IFN- $\gamma$  ELISPOT, the anti-tumor effect against TC-1 tumors was tested in therapeutic and preventive arrangements. We also determined the ability of rVACV to modulate chemokine levels in the sera of immunized mice. We showed that vCCI decreased specific cellular immunity elicited by DNA vaccines, and that the vCCI-specific immune response does not affect multiplication of VACV *in vivo*.

## Materials and Methods

### Plasmids

The pD357 plasmid for deletion of vCCI genes from the vaccinia virus was obtained from A. Patel (Glasgow) (5). To

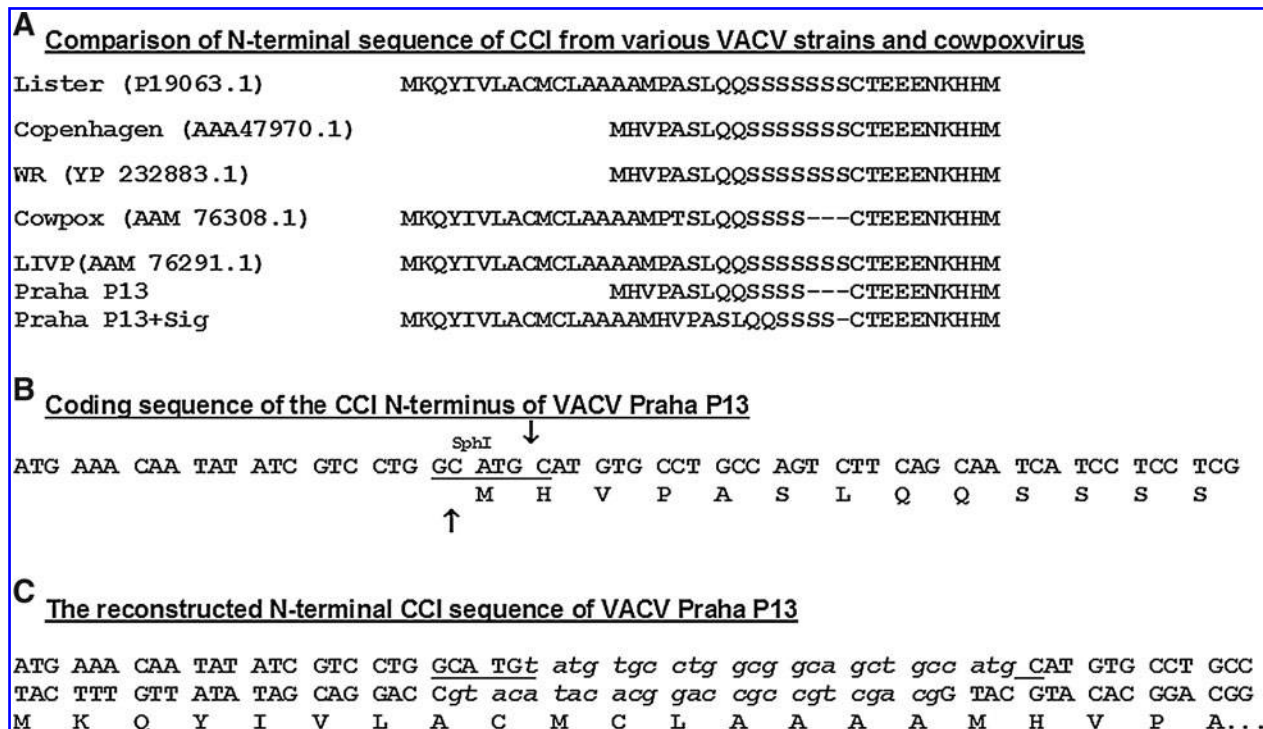
prepare revertant viruses, the 4889-bp fragment containing the C23L gene was amplified by PCR using PfuI polymerase, primers C23L-1: 5'-AACAAAGATTCTTCCTCCAAACA-3' and C23L-2: 5'-AAAAGAAGAAGTCGCGAGAGG-3', and genomic DNA of P13 virus as a template. The amplified nucleotide sequence was inserted into pCR Blunt TOPO plasmid (Invitrogen, Carlsbad, CA) and verified by sequencing. The pD357 plasmid was digested partially with HpaI and NruI, and a fragment containing the C23L gene was substituted for the  $\beta$ -galactosidase gene. The resulting plasmid, denoted as pD357-C23L, was cleaved with EcoRI, and the cassette containing the guanine phosphoribosyl transferase (gpt) gene from *E. coli* and the vaccinia virus p7.5 promoter was inserted. The gpt cassette had been excised from the plasmid pGPT07 (31) and provided with EcoRI-compatible ends. The resulting plasmid was denoted as pD357-Rev. The plasmid for generation of P13 virus, which could express the secreted vCCI, was prepared from pD357-C23L plasmid by cutting with SphI and ligation with the annealed oligonucleotides 35Sig-1: 5'-TATGTGCTGGCGG CAGCTGCCATG-3', and 35Sig-2: 5'-GCAGCTGCCGCCA GGCACATACATG-3'. The sequence and orientation of the insert was determined by sequencing (Fig. 1C). In the next step, the plasmid was cleaved with EcoRI and the fragment containing the gpt cassette was inserted. The resulting plasmid was denoted as pD357-Rev+Sig. The expression plasmid pBSC-Sig vCCI was prepared by the ligation of the pBSC plasmid (32) digested with XhoI and BglII restriction endonucleases with the PCR fragment amplified using vaccinia LIVP1: 5'-ATTCTCGAGCCGCCATGAAACAATATATCGTCC-3' and LIVP2: 5'-TTCAGATCTATAGAGTTATCGATTAG-3' primers, and the vaccinia LVP genomic DNA as a template, and digested with the same enzymes as the plasmid. The pBSC-SigE7LAMP plasmid was described earlier (32).

### Viruses and cells

Vaccinia virus clone P13 was isolated from the Sevac VARIE smallpox vaccine (strain Praha) (33). Vaccinia virus LVP (Lister strain) was obtained from W. Chernos, Moscow, Russia. Viruses were multiplied in BSC40 cells, purified by sucrose-gradient centrifugation (34), and titrated in CV-1 cells. The recombinant virus P13-E7GGG (35) contains the gene of modified E7 protein inserted in the TK gene. E7GGG expression is controlled from the H5 early-late promoter. The P13-PreS2-S virus was described previously (36). HPV16 E6E7-expressing TC-1 cells, derived from C57BL/6 mice, were kindly provided by T.C. Wu (Baltimore). The cells were cultivated in modified E-MEM (EPL) medium containing bovine serum growth-active proteins but no complete serum (37). RMA-S cells obtained from M. Smahel from our department were grown in RPMI-1640 supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin, and 10  $\mu$ M  $\beta$ 2-mercaptoethanol.

### Construction of VV recombinants

Deletion of the vCCI gene (C23L/B29R loci) was achieved by their replacement with the  $\beta$ -galactosidase gene using homologous recombination with the plasmid pD357 (5). Double deletion mutants were selected by repeated isolation of stable "blue plaque" viruses. The absence of the vCCI coding sequence was confirmed by PCR using primers



**FIG. 1.** N-terminal sequence of vCCI of the vaccine strain PRAHA. (A) Comparison of the N-terminal amino acid sequences of various VACV strains and cowpoxvirus. The accession numbers are shown in parentheses. (B) Coding sequences of the vCCI of VACV-P13, and (C) of the reconstructed P13-Sig-vCCI. The sequence of the synthetic oligonucleotide insert is shown in *italics*. The site of insertion (restriction enzyme SphI) is underlined.

5'-TCTCTTCTTCGCTATCTG-3' and 5'-ACACCGACCAAT GATAAGAT-3'. The resulting virus was denoted as P13-ΔvCCI. To prepare the virus carrying the gene for vCCI containing the full-length signal sequence (P13-Sig-vCCI), the P13-ΔvCCI virus was recombined with the pD357-Rev+Sig plasmid. The P13-Sig-vCCI virus was isolated using transient dominant selection (31). First, recombinant viruses carrying the gpt gene were selected and double plaque purified under selection pressure (mycophenolic acid 25 μg/mL, xanthine 250 μg/mL, and hypoxanthine 14 μg/mL). Subsequently, another double plaque purification procedure with selection of "white plaques" enabled reversion to the gpt<sup>-</sup> phenotype and insertion of the vCCI coding region into both loci. The revertants of P13-ΔvCCI and P13-Sig-vCCI to the parental genotype, which are denoted as RevP13-ΔvCCI and RevP13-Sig-vCCI, respectively, were prepared by recombination with pD357-Rev and selected by the same method. Revertant viruses were confirmed by PCR.

#### DNA immunization

Mice were immunized at a 2-week interval with three doses of plasmid DNA coated onto 0.5-mg, 1-μm gold particles (Bio-Rad, Hercules, CA) by the procedure recommended by the producer. Vaccines were delivered into the shaven skin of the abdomen at a discharge pressure of 400 psi by a gene gun (Bio-Rad).

#### Antibodies to viral chemokine inhibitor

Mouse antisera against vCCI were prepared by immunization with DNA vaccine encoding pBSC-vCCI. Mice re-

ceived three doses administered at 2-week intervals. The sera were collected 2 wk after the last immunization.

#### Animal experiments

Six-week-old C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>) female mice obtained from Charles River, Cologne, Germany, were used for all experiments. The animals were maintained under standard conditions at the National Institute of Public Health (Prague). The experiments were performed in compliance with Acts no. 246/92 and 77/2004 on animal protection against cruelty, and Decree no. 311/97 of the Ministry of Health of the Czech Republic, on the care and use of experimental animals. Mice were injected intraperitoneally (IP) with 0.5 mL PBS containing sonicated suspension of rVACV.

#### Tumor induction

Mice received a dose of  $3 \times 10^4$  TC-1 cells injected subcutaneously (SC) into the back. Tumor growth was measured weekly. Differences were statistically analyzed using Prism 3.0 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

#### Immunoblotting

CV-1 cells were infected at MOI 3 with vaccinia virus. Two hours later, the medium was replaced with RPMI without serum. After 20 h, the supernatants were separated, cell cultures were washed twice with PBS, and resuspended in PBS containing protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). The cells were lysed with Laemmli buffer containing 2-mercaptoethanol and heated at 95°C for



5 min. The supernatant of infected cells was supplemented with protease cocktail inhibitor, clarified, and concentrated using Amicon Ultracell-10k (Millipore, Billerica, MA). The concentrate was mixed with Laemmli buffer containing 2-mercaptoethanol and heated at 95°C for 5 min. Proteins were separated by SDS-PAGE in a 12% gel and transferred to a nitrocellulose membrane (Hybond-C Extra, Amersham, Piscataway Township, NJ). The membrane, preincubated with 10% skim milk in PBS for 1 h, was incubated with mouse antiserum against vCCI diluted 1:50 in PBS containing 5% milk at 4°C overnight. The membrane was cut into strips for the examination of the individual mouse sera. After washing, the membrane was incubated with rabbit anti-mouse IgG horseradish-peroxidase-conjugated secondary antibody diluted 1:4000 (Sigma-Aldrich) for 2 h. Proteins were visualized with the ECL Plus system (Amersham).

#### Ligand binding

The cross-linking experiment was performed as described by Alcamí *et al.* (6). The supernatant of infected CV1 cells was prepared by the same procedure as for immunoblotting. The concentrate, equivalent of 20,000 cells, was used for each cross-linking reaction. We utilized radioiodinated human recombinant 0.4 nM macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) <sup>125</sup>I (2000 Ci/mmol) (GE Healthcare, Pittsburgh, PA), 40 mM 1-ethyl-3(3-dimethyl-aminopropyl)-carbodiimide (EDC) (Sigma-Aldrich), and 5  $\mu$ L of concentrated supernatant in 25  $\mu$ L of binding medium (RPMI 1640, 20 mM HEPES [pH 7.4], 0.1% BSA). The samples were analyzed by SDS-PAGE on a 12% gel. The gel was exposed and scanned on a Phosphorimager (Fuji, Cypress, CA).

#### Detection of chemokine levels by ELISA

Levels of 12 common mouse chemokines (RANTES, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , SDF-1, IP10, MIG, EOTAXIN, TARC, MDC, KC, and 6CKine) in mouse sera were determined using a Multi-Analyte ELISA Array Kit (SABiosciences, Frederick, MD), according to the manufacturer's instructions. To be able to perform the complete assay the sera aliquots of four animals were pooled in each group.

#### Detection of VACV multiplication in vivo using quantitative PCR (Q-PCR)

Mice were anesthetized with halothane (Narcotan; Léčiva, Prague, Czech Republic) and sacrificed. The ovaries were dissected, washed in PBS, and homogenized. DNA was extracted using a DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Real-time quantitative PCR was performed as described previously (38).

#### Assay of immune responses

**E7- and VACV-specific T-cell response.** The spleens were removed from mice 12 d after the last immunization and the response of interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )-producing cells was determined by ELISPOT IFN- $\gamma$  assay upon *in vitro* restimulation with 0.025  $\mu$ g/mL HPV16 E7<sub>(49-57)</sub> (RAHYNIVTF), or 1  $\mu$ g VACV E3<sub>(140-148)</sub> (VGPSNSPTF) H-2D<sup>b</sup>-restricted peptides for 20 h as described previously (38). The working concentration was optimized for each peptide. All peptides were purchased from Clonestar (Brno, Czech Republic). The

CTL epitope VACV E3<sub>(140-148)</sub> was predicted using the RANKPEP, SYFPEITHI algorithm. We have shown repeatedly using the ELISPOT assay and intracellular cytokine staining test (ICS), that the splenocytes of C57BL/6 mice, which had been immunized with various strains of VACV including MVA, responded to stimulation with E3 peptide. To confirm here the applicability of the VACV E3<sub>(140-148)</sub> (VGPSNSPTF) peptide for the detection of VACV-specific CTLs, we demonstrate that VACV E3<sub>(140-148)</sub>-specific CTLs are present in animals immunized with recombinant vaccinia virus P13 expressing glucuronidase of *E. coli* (39), and are absent in non-immunized mice. We show also that such splenocytes are not activated by the HPV16 E7<sub>(49-57)</sub> peptide, which is irrelevant for vaccinia virus. The response of splenocytes was determined by ELISPOT-IFN- $\gamma$  (Supplementary Fig. S1A; see online supplementary material at <http://www.liebertpub.com>), and the responding cell population was characterized by ICS (Supplementary Fig. S1B; see online supplementary material at <http://www.liebertpub.com>). For ICS staining, the splenocytes were restimulated with 0.01  $\mu$ g/mL E3 peptide or 0.0025  $\mu$ g/mL E7 peptide in bulk culture for 6 d. Twelve hours before staining, the medium was replaced with fresh medium containing peptide. Brefeldin A (GolgiStop; BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA) was added to the culture medium according to the manufacturer's instructions. Surface CD8 molecules were stained with FITC-conjugated rat anti-mouse CD8 monoclonal antibody (eBioscience). Then the cells were fixed and permeabilized using the Cytofix/Cytoperm kit (BD Biosciences Pharmingen), and intracellular IFN- $\gamma$  was stained with PE-conjugated rat anti-mouse IFN- $\gamma$  monoclonal antibody (eBioscience, San Diego, CA). Further, to determine binding of the VACV E3<sub>(140-148)</sub> peptide epitope with the responsible MHC I molecule, we performed an H-2D<sup>b</sup> stabilization assay with RMA-S cells as described previously (40). The cells were pulsed with 10  $\mu$ M E3, E7, or M1<sub>(13-21)</sub> (SIIPSGPLK) peptide at 25°C, and afterward incubated at 37°C. The H-2D<sup>b</sup> on the cell surface was stained with the FITC-labeled anti-H2-D<sup>b</sup> MAb (clone DTDb; Serotec, Oxford, U.K.). The dead cells were stained with propidium iodide (PI). The intensity of FITC signal in PI-negative cells was determined by flow cytometry. As shown in Supplementary Fig. S2 (see online supplementary material at <http://www.liebertpub.com>), the E3<sub>(140-148)</sub> peptide stabilized the H2-D<sup>b</sup> molecules on the surface, similarly to the previously described HPV16E7<sub>(49-57)</sub> peptide (RAHYNIVTF) (41). As negative control, we used an H2-D<sup>b</sup>-irrelevant peptide derived from influenza A M1 protein, or incubation in medium without any peptide. The MFI values for samples containing peptide were compared with samples incubated without peptide. The differences were tested by two-way ANOVA. The experiment was repeated twice with similar results.

#### Flow cytometry detection of surface molecules on splenocytes

The spleens were mechanically disrupted and a single-cell suspension was acquired after red blood cell lysis using ACK buffer (0.15 M NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, and 0.1 mM EDTA). Cells were stained with the fluorescently-conjugated mAbs CD3-FITC, CD4-FITC, CD8-FITC, CD11b-PE, CD11b-FITC, CD11c-PE, F4/80-PE, and Gr-1(Ly6G-FITC). F4/80-PE mAb

was purchased from ABD-Serotec (Dusseldorf, Germany), and the other mAbs were supplied by BD Biosciences Pharmingen. The expression of surface molecules was determined by flow cytometry using a Coulter-Epics XL flow cytometer (Beckman Instruments, Williamsville, NY) and FlowJo software (Tree Star, Inc., Ashland, OR).

## Results

### *The putative viral inhibitor of CC chemokines encoded by the vaccine strain Praha contains a shortened signal peptide sequence*

Our goal was to determine whether the viral inhibitor of CC chemokines influences the immunogenicity and anti-tumor activity of recombinant vectors derived from an attenuated vaccinia virus strain. First, we sequenced the region encoding the N-terminal part of vCCI of the P13 clone of the strain PRAHA. The comparison of the amino acid sequence translated from a portion of a 4889-bp fragment amplified using C23L-1 and C23L-2 primers with the amino acid sequence of vCCI from other poxviruses revealed that the strain PRAHA encodes vCCI lacking 8 amino acids inside the signal peptide sequence (Fig. 1A and B).

### *Prolongation of the signal sequence of vCCI results in restoration of functional vCCI production*

The production of vCCI by CV1 cells infected with recombinant viruses derived from P13 virus was examined by immunoblot (Fig. 2A). For the detection, a specific antiserum prepared by immunization of mice with the vCCI gene of LIVP in the form of DNA vaccine was used (see materials and methods section). We did not detect any vCCI in the concentrated culture medium of cells infected with the parent P13 virus carrying the E7GGG gene or in mock-infected cells. In the lysate prepared from cells infected with P13-E7GGG, we found only a faint nonspecific band, which was also present in the lysate of mock-infected cells and cells infected with P13- $\Delta$ vCCI-E7GG. To prepare a virus P13 that produces secreted vCCI similarly to the Lister virus, the signal sequence of vCCI-P13 was restored by the insertion of an oligonucleotide coding for eight additional amino acids (Fig. 1C). Immunoblot analysis showed that CV1 cells infected with the resulting virus P13-Sig-vCCI E7GGG secreted the vCCI of the same size as did the LIVP virus (Fig. 2A).

The band of intracellular vCCI detected in samples of cells infected with LIVP and P13-Sig-vCCI-E7GGG was more intense than the non-specific band. In the lysate of LIVP-infected cells, two more bands of a smaller size were detected, probably representing vCCI fragments. Moreover, the supernatant of the cells infected with the P13-Sig-vCCI virus showed similar MIP-1 $\alpha$  chemokine binding activity as the supernatant from the cells infected with the LIVP virus (Fig. 2B). The supernatant of mock-infected cells or cells infected with the parental P13 virus showed no chemokine binding activity. A faint band of lower size appeared if cross-linking agent was used in the absence of any supernatant.

### *Secretory vCCI modulates chemokine levels in the blood of VACV-infected mice*

To determine the activity of rescued vCCI production *in vivo*, we examined the amount of common chemokines in

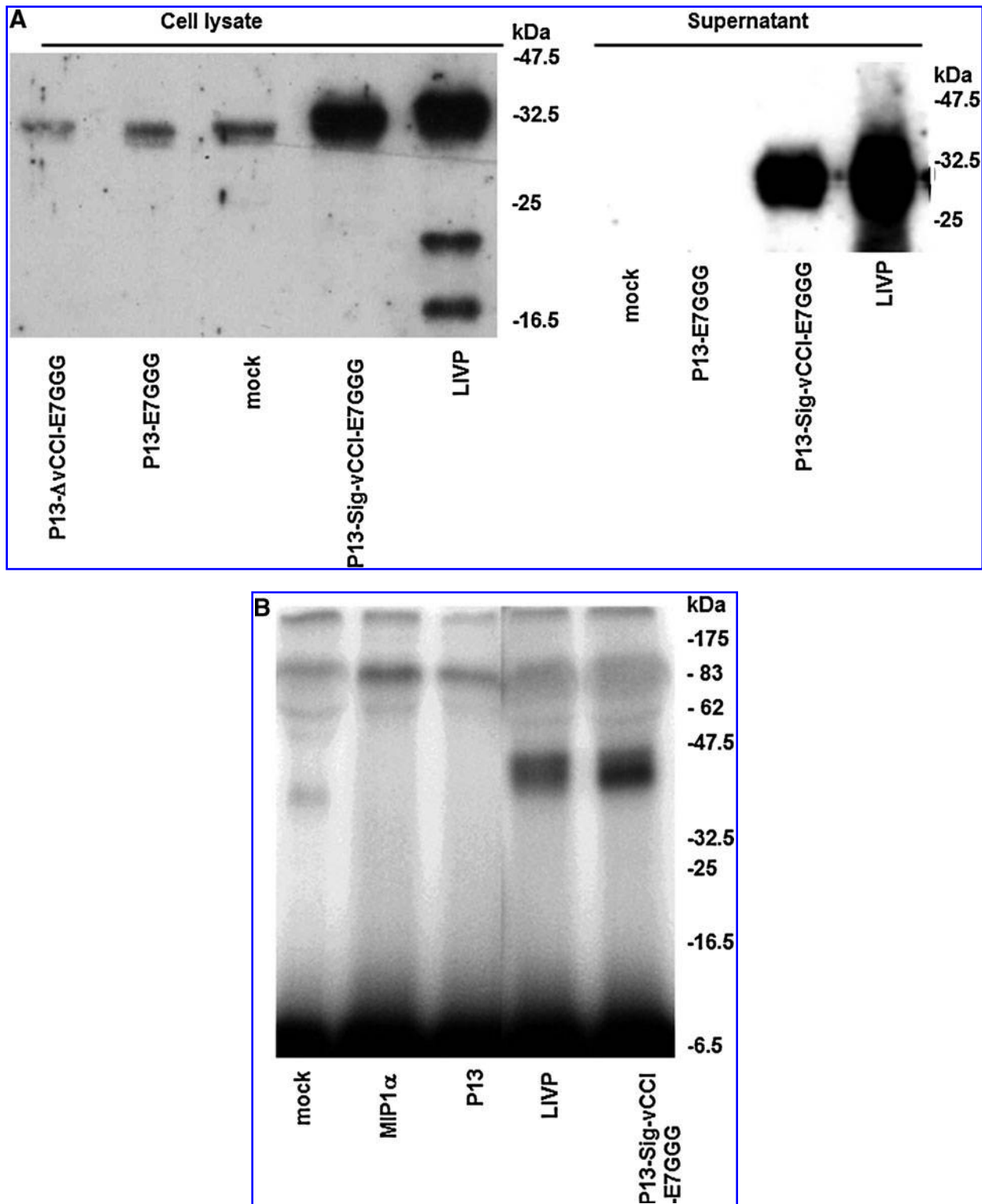
the blood of infected mice by ELISA. The results of two experiments are shown in Table 1. The administration of the P13-E7GGG virus increased the level of RANTES, MCP-1, MIG, eotaxin, TARC, MDC, and KC, on day 3 in comparison with mock-infected mice. The blood of all groups of mice contained non-detectable amounts of MIP-1 $\alpha$  and GCKine. In comparison with undeleted P13-E7GGG virus, the infection with P13-Sig-vCCI-E7GGG reduced the levels of RANTES, eotaxin, TARC, and MDC in the blood. Production of vCCI by vaccinia virus had no effect on the amount of MCP-1, MIG, or KC on day 3. The levels of eotaxin and MDC decreased gradually, and the differences found on day 4 were smaller than those on day 3. The values could not be statistically analyzed, because the chemokine levels were measured in the pooled sera.

### *Production of secretory vCCI attenuated P13 VACV *in vivo**

It has been shown previously that the insertion of the C23L/B29R encoding region from the Lister strain into the genome of a highly virulent virus of the WR strain resulted in a decrease of its virulence in mice. We investigated whether secretory vCCI could further reduce the virulence of the highly attenuated vaccine strain Praha. Groups of mice ( $n=16$ ) were injected IP with  $1 \times 10^6$  PFU of each rVACV on day 0. The ovaries from four animals of each group were collected on days 3, 4, 5, and 7. The viral DNA was determined in the DNA isolated from the ovaries by PCR. DNA of the viruses P13-E7GGG and P13- $\Delta$ vCCI-E7GGG was detected in five animals, and RevP13- $\Delta$ vCCI-E7GGG in six animals, during the observed period. Virus P13-SigvCCI-E7GGG was only found three times on days 3 and 4. Though the differences were not significant due to considerable variability, the results of the DNA assay together with the lower levels of anti-VACV antibodies (Fig. 4B) found in the infected mice, suggested that rescuing secretory vCCI production in P13 virus led to attenuation of viral replication *in vivo* (Fig. 3A).

### *Induction of an antigen-specific immune response toward vCCI protein elicited by the DNA vaccine had no effect on VACV replication *in vivo**

Next we investigated whether the immunity to vCCI could modulate viral replication *in vivo*. We speculated that neutralization of the secretory vCCI by antibodies might result in the increase of virulence of VACV. Alternatively, the VACV-infected cells could be lysed by the vCCI-specific cytotoxic T cells, which would lead to decreased virus replication *in vivo*. Mice immunized with three doses of pBSC-vCCI or pBSC vaccine were challenged with  $10^6$  PFU P13-Sig vCCI-E7GGG on day 39. The viral DNA was measured by PCR in the DNA isolated from the ovaries on days 3 and 4 after the challenge. No statistically significant difference was found between the groups (Fig. 3B). The efficiency of DNA vaccine was determined by the detection of vCCI-specific antibodies in individual mouse sera by immunoblot, as shown in Fig. 3C. We concluded that the presence of antibodies against vCCI did not affect multiplication of a VACV that produced secretory vCCI.



**FIG. 2.** Viral CCI production *in vitro* by (A) immunoblotting assay, or (B) cross-linking assay. The lysate and supernatant of CV-1 cells infected at MOI 3 for 20 h with P13-E7GGG, P13-Sig-vCCI-E7GGG, P13-ΔvCCI-E7GGG, or LVP virus (A), were separated by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was incubated with mouse antiserum against vCCI and rabbit anti-mouse IgG horseradish-peroxidase-conjugated secondary antibody. (B) Supernatants from CV-1 cells infected with P13, LVP virus, or P13-Sig-vCCI-E7GGG, or mock-infected were cross-linked with  $^{125}\text{I}$ -labeled MIP-1 $\alpha$  using EDC. The samples were separated by SDS-PAGE and the radioactive signal was detected by autoradiography.

TABLE 1. CHEMOKINE LEVELS IN SERA OF MICE INOCULATED WITH rVACV EXPRESSING SIG-vCCI

Chemokine	Mouse injected with rVACV <sup>a</sup>					
	P13-E7GGG		P13-Sig vCCI-E7GGG		PBS	
	Exp. 1 <sup>b</sup> day 3	Exp. 2 <sup>c</sup> day 4	Exp. 1 day 3	Exp. 2 day 4	Exp. 1 day 3	Exp. 2 day 4
CCL5 (RANTES)	6.39 <sup>d</sup>		3.48		2.88	
CCL2 (MCP-1)	7.83		8.32		5.39	
CCL3 (MIP-1 $\alpha$ )	0		0		0	
CCL4 (MIG)	8.07		8.13		0	
CCL11 (Eotaxin)	44.26	34.34	36.43	32.33	23.06	32.56
CCL17 (TARC)	2.85		2.12		0	
CCL22 (MDC)	19.41	10.51	16.95	8.95	7.43	7.68
KC	3.07		3.15		2.16	
CCL21 (GCKine)	0		0		0	

<sup>a</sup>Animals were injected with  $3.10^6$  PFU in 0.5 mL PBS IP.

<sup>b</sup>In Experiment 1 blood was collected on day 3. The pool of sera (n=2) was examined for the presence of mouse chemokines.

<sup>c</sup>In Experiment 2 blood was collected on day 4. The pool of sera (n=4) was examined for the presence of CCL11 and CCL22.

<sup>d</sup>The absorbance values were normalized to the baseline value (0%), and to the absorbance that gave the specific chemokine-positive control supplied in the kit (100%). The data were calculated from absorbance values OD 450–OD 630.

#### Secretory vCCI does not enhance the immune response to P13 VACV recombinants and DNA vaccine

In the next step, we examined the effect of vCCI production on the immunogenicity of recombinant viruses expressing the modified HPV16 E7 protein. We determined the CTL response against the dominant CTL epitope HPV16 E7<sub>(49–57)</sub> (RAHY-NIVTF), and against the VACV E3<sub>(140–148)</sub> (VGPSNSPTF) epitope. We found cellular responses elicited by one dose of  $10^6$  PFU P13-E7GGG, P13- $\Delta$ vCCI-E7GGG, Rev-P13- $\Delta$ vCCI-E7GGG, or P13-Sig-vCCI-E7GGG, as detected by IFN- $\gamma$  ELISPOT (Fig. 4A), to be similar in magnitude, with the differences not being statistically significant. It seems that the response of CD8<sup>+</sup> T cells elicited by the recombinant virus is not affected by any form of the vCCI gene. To determine the effect of vCCI expressed by P13-E7GGG on the immune cells, we quantified the major subpopulations of splenocytes by flow cytometry, using surface markers CD4, CD8, CD11b, CD11c, CD25, F4/80, and Gr1. The animals were injected IP with a single dose of  $3.10^6$  PFU, and the splenocytes were analyzed on days 3 and 15. We observed that none of the markers had significant changes in comparison with the splenocytes of naïve mice (data not shown). The antibody response against the vaccinia virus was examined at two time points. In the first experiment, blood was collected from animals examined for a CTL response on day 12. In the second experiment, mice were injected with  $3.10^6$  PFU and blood was collected on day 35 after virus administration (Fig. 4B). In both experiments P13-E7GGG elicited a stronger response than P13-Sig-vCCI-E7GGG in both groups, though the difference was not statistically significant.

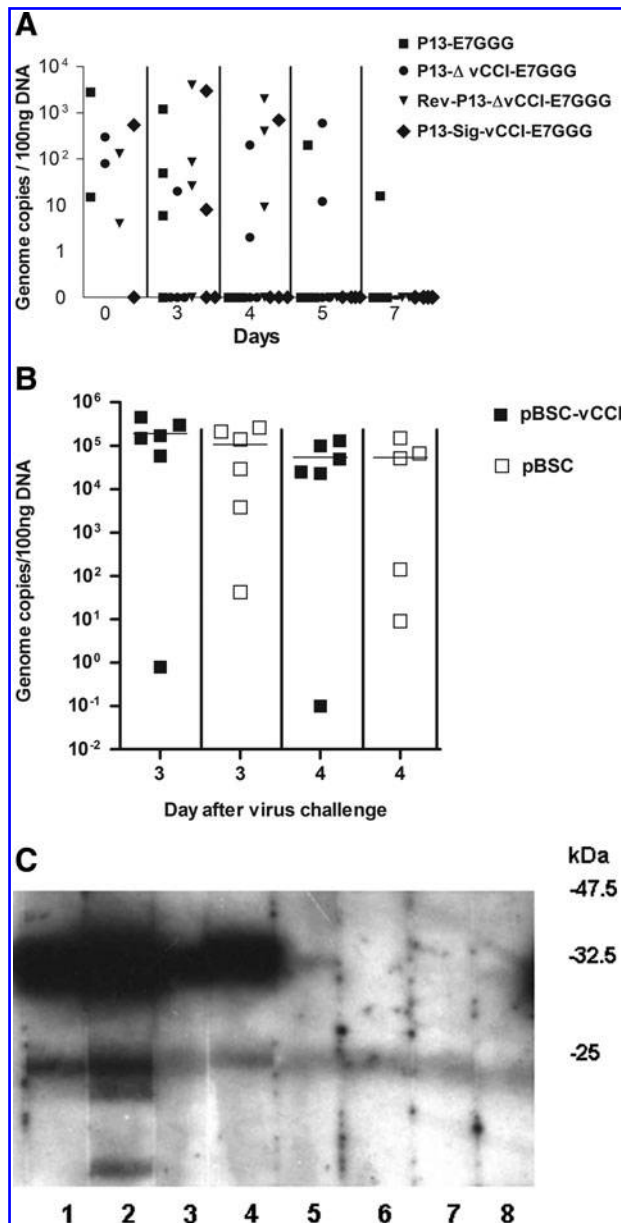
To determine the effects of secretory vCCI on the E7-specific CTL response in the absence of virus infection, we immunized mice against E7 protein with the DNA vaccine in combination with the plasmid carrying the vCCI gene from LIVP virus. The pBSC-SigE7LAMP DNA vaccine and either 1 or 2  $\mu$ g of pBSC-vCCI or pBSC were shot with a gene gun subsequently to the same site. The animals received two doses 2 wk apart. The CTL response was examined 12 d after

the last immunization by IFN- $\gamma$  ELISPOT (Fig. 4C). We observed that the HPV16-E7-specific response was lower in animals that received the pBSC-vCCI plasmid compared to the empty plasmid, which implies that the viral CCI has no enhancing activity on the antigen-specific CTL response. The difference was statistically significant ( $p=0.01$ ) when 2  $\mu$ g of the plasmids were used. Moreover, the immunization with the mixture with 2  $\mu$ g of the pBSC-vCCI plasmid in comparison with the empty vector resulted in a decrease in the number of IFN- $\gamma$  spots ( $p=0.01$ ), when the splenocytes were cultured in the absence of E7 peptide. The effect was dose-dependent, as the addition of 2  $\mu$ g of the pBSC-vCCI plasmid reduced the response more than 1  $\mu$ g ( $p=0.0057$ ).

#### Anti-tumor effect of therapeutic immunization against TC-1 tumors is decreased by the production of secretory vCCI

To learn whether the binding of chemokines to vCCI produced in mice with growing tumors can improve the anti-tumor effect of therapeutic immunization with VACV expressing HPV16 E7, we immunized mice with P13-E7GGG or P13-Sig-vCCI-E7GGG and its deletion and reversion mutants the day following the administration of the TC-1 cells. As the control virus we used P13-PresS2S, which expresses the coding sequence of the middle protein of the surface antigen of the hepatitis B virus. We observed (Fig. 5) that the immunization with P13-E7GGG or its deletion mutant had a significant anti-tumor effect in comparison with the P13-PresS2S, as determined by the *t*-test on day 27. The reversion mutants also had an anti-tumor effect, though it was not significant because of the smaller size of the animal groups. P13-Sig-vCCI-E7GGG had the lowest anti-tumor effect, and the difference was statistically significant in comparison with P13-E7GGG. The outcome was different when mice were first immunized with one dose of rVACV and TC-1 cells were administered 2 wk later. The immunization with both P13-E7GGG and P13-Sig-vCCI-E7GGG resulted in similar inhibition of the growth of tumors (data not shown).





**FIG. 3.** The effect of vCCI on *in vivo* multiplication of VACV in naïve or immunized mice. (A) Mice were injected IP with one dose of  $1 \times 10^6$  PFU P13-E7GGG, P13- $\Delta$ vCCI-E7GGG, RevP13- $\Delta$ vCCI-E7GGG, or P13-Sig-vCCI-E7GGG virus, or (B) were immunized with  $1 \mu\text{g}$  pBSC-vCCI DNA vaccine or control pBSC vaccine, shot with a gene gun on days 0, 7, and 28. Subsequently, the animals were injected intraperitoneally with  $1 \times 10^6$  P13-Sig-vCCI-E7GGG on day 39. (A and B) Replication of viral DNA in the ovaries was determined by Q-PCR at the indicated intervals after virus administration. (C) The presence of vCCI-specific antibodies in the sera of mice immunized with  $1 \mu\text{g}$  pBSC-vCCI DNA vaccine (lanes 1–4), or control pBSC vaccine (lanes 5–8), was determined by immunoblot analysis.

## Discussion

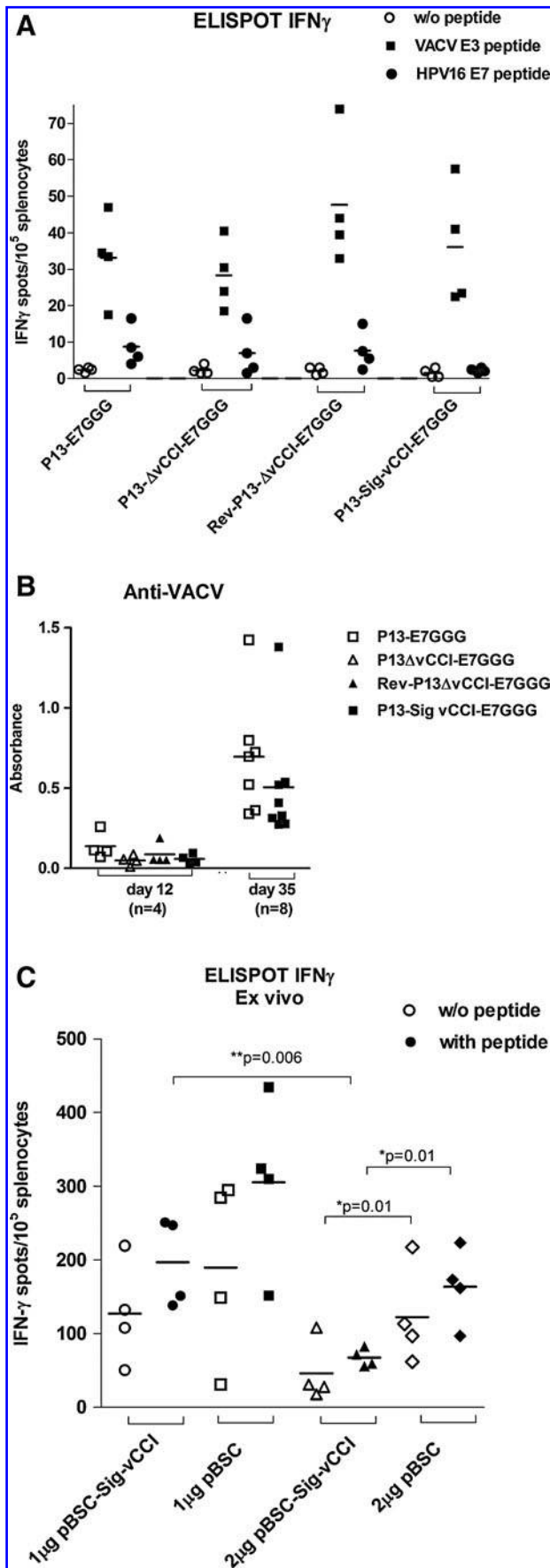
In our study, we examined the influence of the immunomodulatory protein vCCI (35K) on the immunogenicity of recombinants derived from clone P13 of the vaccine strain Praha, and their anti-tumor effect against TC-1 tumors. The

vCCI protein belongs to the group of secreted viral immunomodulatory proteins. Thanks to its capability to efficiently inhibit CC chemokines that direct migration of macrophages, monocytes, DCs, and lymphocytes, it can influence different stages of the antiviral immune response. The importance of CC chemokines in this process was demonstrated for infection with the MVA virus, which induces an increased level of MCP-1 in contrast to the strains Elstree, Wyeth, and WR. The failure of MVA to prevent chemokine expression by blocking NF- $\kappa$ B activation and sequestering MCP-1 by vCCI presumably contributes substantially to its extraordinary vaccination potential (42). We speculated that the vCCI gene deletion from the vaccine virus Praha could lead to the creation of a virus with enhanced immunogenicity that would induce stronger cellular immunity.

VACV P13 was prepared in our laboratory as a plaque-purified clone of the vaccine strain Praha (33). When compared with the VACV strains Wyeth, and LIVP (Lister), the immunogenicity and virulence of the strain Praha is between that of LIVP and Wyeth virus. The P13 clone is the most virulent in comparison to the other Praha clones. The virus LIVP was the most immunogenic and virulent of the three strains tested. To determine the influence of vCCI on the biological properties of the vaccine virus P13, we constructed deletion mutants with insertion inactivation of the C23L/B29R gene, and revertant viruses with genes inserted at both loci in the ITRs. In our experiments, we used the P13 virus expressing the weakly immunogenic HPV16 antigen E7GGG, because it is more suitable for the evaluation of minor differences in the immunogenicity of the vector than the other VACV P13-SigE7LAMP, producing a more immunogenic form of E7 antigen. This recombinant induces the complete rejection of TC-1 tumors (35), and would not allow the measurement of the influence of the small difference in virulence associated with the immunogenicity of Sig-vCCI. Immunization with P13-E7GGG does not inhibit TC-1 tumor formation, but it is able to slow tumor growth.

The comparison of the P13 vCCI ORF nucleotide sequence with the orthopoxvirus homologues revealed the highest 5' end homology of P13 with the vaccinia Copenhagen, WR, Ankara, MVA, and Tian Tian strains, as well as with most variola and monkeypox strains. The gene of these viruses encodes CCI protein lacking the N-terminal signal peptide, unlike vCCI of VACV Lister, the cowpox viruses Brighton and GRI-90, and mousepox virus, which have an N-terminal signal peptide with high cleavage probability between proline 18 and alanine 19. A serine-rich sequence at the N-terminus that is a part of a random coil of the vCCI molecule contains four residues in the Praha strain. The chemokine binding activity of vCCI is not changed, whether it contains four or seven serines in orthopoxviruses, or the TKGI sequence, which was found in leporipoxviruses (8). The signal peptide is essential for CCI secretion, and therefore rVACV P13 with the complete signal sequence of vCCI was created. It was confirmed by Western blot that the virus prepared secretes CCI protein into the medium, and the cross-linking experiment showed that vSigCCI is able to bind the  $^{125}\text{I}$ -radiolabeled chemokine MIP-1 $\alpha$ . The biological activity of vSigCCI produced by P13 virus was also observed *in vivo*.

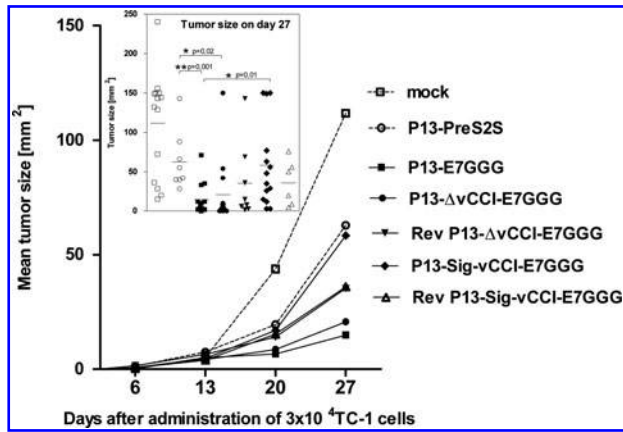
The role of immunomodulatory proteins such as CC chemokine inhibitors in the pathogenesis of poxvirus infection can be tested by comparison of the reactions of the host after



the application of the wild-type virus, and the deletion mutants lacking the studied immunomodulatory protein. The application route used for the evaluation of VACV CC chemokine inhibitors in the mouse model was usually intradermal or intranasal administration (43). We have shown that the secreted form of vCCI attenuated the multiplication of IP-injected virus similarly to that previously described for IN-applied virus (10). However, the IN and ID routes appropriately mimic the typical natural routes of poxvirus infection, and they result in high antibody responses but very low CTL activity. On the other hand, the systemic IP and IV application routes lead to induction of a strong CTL response (44). The attenuated P13-E7GGG was able to elicit a significant CTL response to HPV E7 only after IP inoculation of a high dose  $10^6$  PFU, and for this reason we chose this route of application. Moreover, IP injection was more convenient than the IN route, as we wanted to determine the influence of the secreted form of vCCI on the anti-tumor effect of immunization. It is known that the CC chemokines play an important role during the development of various tumors (45). Even though the influence of chemokines is primarily exerted locally, elevated serum levels are often observed, which correlate with the severity of disease. Blockade of the CC chemokines after the systemic administration of their antagonists may contribute to the inhibition of the growth of tumors, as was tested in the past in several preclinical studies (46–49). The positive effect of CC chemokine antagonists on the immunotherapy of tumors can be also detected via the analysis of the systemic and intratumoral immune responses (50). We also wanted to evoke the systemic production of vCCI, which could eventually act in the tumor microenvironment in the course of tumorigenesis and induce an anti-tumor response.

When measuring chemokine levels in the serum of mice on day 3 after IP infection by the parental virus P13-E7GGG, we found increased levels of the chemokines MCP-1, MIG, RANTES, and MDC. The P13-E7GGG virus is similar in this feature to the MVA virus, which induces the expression of the chemokines MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , RANTES, and MIG, both after *in vitro* infection of macrophages (51), and after IN application to mice (42). On the contrary, the strains NYVAC and WR after *in vitro* infection of macrophages, and the strains Elstree, Wyeth, and WR after IN application to mice, do not induce the production of CC chemokines (42). This presumably relates to the influence of other immunomodulatory proteins present in the strains mentioned above.

**FIG. 4.** The response induced in mice by immunization with rVACVs or DNA vaccine co-expressing vCCI. **(A and B)** Mice were injected IP with  $1 \times 10^6$  P13-E7GGG, P13- $\Delta$ vCCI-E7GGG, RevP13- $\Delta$ vCCI-E7GGG, or P13-Sig-vCCI-E7GGG virus, or **(C)** the animals were immunized with pBSC-SigE7LAMP DNA vaccine and 1 or 2  $\mu$ g of pBSC-vCCI or pBSC vaccine, shot with a gene gun subsequently to the same site. The animals received two doses 2 wk apart. **(A and C)** The CTL response of individual mice against VACV E3 protein **(A)**, and/or HPV16 E7 protein **(A and C)**, was examined 12 d after the last immunization by ELISPOT IFN- $\gamma$ . The data were analyzed by two-way ANOVA **(A and C)**. VACV-specific antibodies elicited in mice at various intervals after virus administration were determined by ELISA. The lines represent arithmetic means **(B)**.



**FIG. 5.** Therapy of TC-1 tumors by immunization against HPV16 E7 with rVACV. Mice were injected SC with  $3 \times 10^4$  TC-1 cells. The next day after the administration of tumor cells, the animals were immunized once IP with  $3 \times 10^6$  PFU P13-E7GGG ( $n=14$ ), P13-ΔvCCI-E7GGG ( $n=14$ ), RevP13-ΔvCCI-E7GGG ( $n=8$ ), P13-Sig-vCCI-E7GGG ( $n=14$ ), or RevP13-Sig-vCCI-E7GGG ( $n=6$ ). The graph shows summarized results of two independent experiments. Tumor growth is shown as the mean tumor area for each group. The differences in the tumor size on day 27 were statistically analyzed by the *t*-test.

While testing the influence of vCCI produced by the IP-administered virus P13-SigCCI-E7GGG on the levels of chemokines, we observed, when compared to controls, a decrease of the chemokines RANTES and eotaxin (i.e., the second and the third chemokines for which vCCI has the highest binding specificity). We also detected a drop in the chemokines TARC and MDC. The chemokine MIP-1 $\alpha$  that binds best to the vCCI, and by the help of which we proved the binding capability of vCCI, was not detected in the mouse serum by the test we used. The level of MCP-1, the fourth best vCCI-bound chemokine, was not influenced by the production of vCCI. This suggests that vCCI is not able to neutralize MCP-1 produced by TC-1 as detected by expression analysis (52), and could partly explain why P13-Sig-vCCI-E7GGG does not exert improved anti-tumor effects. Despite the differences in the levels of chemokines induced by rVACV, the analysis of the immune cells isolated from the mouse spleens after IP application of rVACV with various forms of vCCI found that vCCI produced by P13 did not affect the amount of DCs, myeloid suppressor cells, T-regulatory lymphocytes, CD8<sup>+</sup> lymphocytes, and macrophages.

The examination of revertants carrying vSigCCI showed that the production of the secretory vCCI protein does not influence virus replication *in vitro*, though the measurement of viral DNA in the mouse ovaries injected IP with VACV revealed that the revertant expressing vSigCCI is more attenuated, because after systemic administration, it replicates to lower titers than the parental virus. The decreased replication was also confirmed by the detection of lower levels of specific anti-VACV antibodies on day 32 after infection in response to P13-SigCCI-E7GGG compared to the antibodies elicited by the parental virus. We and others have observed previously that attenuated viruses induced lower titers of antibodies (53). Similar results were obtained by Reading *et al.* (10) after IN infection of mice with the WR virus that

produced the vCCI of the Lister virus. Decreased titers of WR-vCCI were accompanied by less severe infiltration of the lungs by macrophages and lymphocytes, which correlated with reduced levels of the chemokines MIP-1 $\alpha$ , MCP-1, and eotaxin detected in the BAL fluid of IN-infected mice. We also observed a decrease in the level of RANTES.

RANTES is produced in the early stages of infection, mainly by the antigen-presenting cells (DCs, macrophages, NKT cells, and  $\gamma\delta$ T cells), which have receptors for inflammatory cytokines, so they significantly respond to inflammatory conditions (54). RANTES attracts to locations of inflammation and infection cells that express the receptors CCR1, CCR3, and CCR5. They are primarily the cells of innate immunity, such as monocytes, basophils, eosinophils, immature DCs, NK cells, and T cells. It has been demonstrated (55) that activation of CCR5 induced by VACV infection leads to the induction of the permissive phenotype for VACV replication in primary T cells. Since permissive infection of T cells and other CCR5-positive cells might represent a mechanism for VACV dissemination throughout the lymphatic system, sequestration of CCL5 by vCCI, which could result in a decrease in CCR5 activation, could be manifest as a decrease in VACV virulence. It has been recently shown that CCR5<sup>-/-</sup> mice are less susceptible to systemic VACV infection than WT mice (56).

The analysis of immunization experiments and specific immunity against E7 protein and VACV E3 protein by ELISPOT did not prove any significant differences in the immunogenicity between the parental virus, deletion mutant, and revertants, despite the lower virulence of P13-SigCCI-E7GGG. Lower activity of CC chemokines is probably compensated for by the production of large amounts of extrinsic antigens and direct priming of T cells in secondary lymphoid organs during infection with replicating recombinant VACV (57). Moreover, DCs store antigens on a long-term basis, whereas chemokine sequestering during VACV infection coincides with vCCI production up to 7 days when the virus is eliminated, with the greatest effect seen on day 4, when the virus replicates most. The impact of reduced levels of CC chemokines on the T-cell response is not so significant, probably due to the low production of vCCI from day 5 post-infection.

A comparable number of E7-specific IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> cells was detected after immunization with P13 E7GGG-SigCCI and with the parental virus P13-E7GGG. However, the therapy of TC-1 tumors was worse. We can speculate that influencing the early phase of innate immunity with smaller quantities of CC chemokines might lead to weaker direct functional activation of NK cells (58).

To explore the influence of the vCCI on the induction of specific immunity in the absence of viral infection, we constructed a DNA vaccine coding the secretory form of vCCI protein. In this case, the production of vSigCCI caused, in comparison with the control plasmid, the induction of weaker specific immunity. The extent of this effect was dependent on the amount of DNA vaccine. The importance of chemokines for the immunogenicity of DNA vaccine was demonstrated for MIP-1 $\alpha$ . Co-administration of the plasmid encoding MIP-1 $\alpha$  had an adjuvant effect on HIV-1 envelope DNA vaccine (59). We assume that the presence of vCCI at the site of intradermally-administered DNA vaccine against E7 can deeply affect the levels of chemokines, with the greatest impact on chemokines like



MIP-1 $\alpha$ , which are bound to the highest-affinity sites and are available at low concentrations. This can lead to the suppression of the T-cell response.

In summary, the results of our investigation show that the P13 clone of the attenuated rVACV strain PRAHA does not produce, due to a shortened signal peptide sequence, a functional secretory form of vCCI. This finding correlates with the observed increased levels of the CC chemokines RANTES, MCP-1, MIG, eotaxin, TARC, and MDC in the blood of VACV P13-infected mice. The restoration of a functional form of the vCCI gene reduced the multiplication of the virus *in vivo*; nevertheless, it did not affect its ability to elicit a T-cell immune response. In comparison to the parental virus, the anti-tumor activity was reduced in the therapeutic arrangement. The co-expression of 35K protein even impaired the immunization capabilities of DNA vaccines. Our results could be helpful in the selection of the parental viruses used for the construction of immunization vectors for therapeutic purposes.

### Acknowledgments

We thank Dr. A. Patel (Glasgow) for plasmid pD357 and Dr. T.C. Wu from Baltimore for kindly providing TC-1 cells. We also thank Michal Smahel for help with the production of DNA vaccines. This work was supported by the grants NS-10660-3/2009 IGA and MZOUHKT2005 from the Ministry of Health of the Czech Republic, and ERDF OPPK CZ.2.16/3.1.00/24001.

### Author Disclosure Statement

No conflicting financial interests exist.

### References

- Rossi D, and Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 2000;18:217–242.
- Le Y, Zhou Y, Iribarren P, and Wang J: Chemokines and chemokine receptors: their manifold roles in homeostasis and disease. *Cell Mol Immunol* 2004;1:95–104.
- Glass WG, Rosenberg HF, and Murphy PM: Chemokine regulation of inflammation during acute viral infection. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2003;3:467–473.
- Alcami A, and Lira SA: Modulation of chemokine activity by viruses. *Curr Opin Immunol* 2010;22:482–487.
- Patel AH, Gaffney DF, Subak-Sharpe JH, and Stow ND: DNA sequence of the gene encoding a major secreted protein of vaccinia virus, strain Lister. *J Gen Virol* 1990;71:2013–2021.
- Alcami A, Symons JA, Collins PD, Williams TJ, and Smith GL: Blockade of chemokine activity by a soluble chemokine binding protein from vaccinia virus. *J Immunol* 1998;160:624–633.
- Graham KA, Lalani AS, Macen JL, *et al.*: The T1/35kDa family of poxvirus-secreted proteins bind chemokines and modulate leukocyte influx into virus-infected tissues. *Virology* 1997;229:12–24.
- Smith CA, Smith TD, Smolak PJ, *et al.*: Poxvirus genomes encode a secreted, soluble protein that preferentially inhibits beta chemokine activity yet lacks sequence homology to known chemokine receptors. *Virology* 1997;236:316–327.
- Burns JM, Dairaghi DJ, Deitz M, Tsang M, and Schall TJ: Comprehensive mapping of poxvirus vCCI chemokine-binding protein. Expanded range of ligand interactions and unusual dissociation kinetics. *J Biol Chem* 2002;277:2785–2789.
- Reading PC, Symons JA, and Smith GL: A soluble chemokine-binding protein from vaccinia virus reduces virus virulence and the inflammatory response to infection. *J Immunol* 2003;170:1435–1442.
- Goede V, Brogelli L, Ziche M, and Augustin HG: Induction of inflammatory angiogenesis by monocyte chemoattractant protein-1. *Int J Cancer* 1999;82:765–770.
- Ma J, Wang Q, Fei T, Han JD, Chen YG: MCP-1 mediates TGF-beta-induced angiogenesis by stimulating vascular smooth muscle cell migration. *Blood* 2007;109:987–994.
- Ueno T, Toi M, Saji H, *et al.*: Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:3282–3289.
- Liss C, Fekete MJ, Hasina R, Lam CD, and Lingen MW: Paracrine angiogenic loop between head-and-neck squamous-cell carcinomas and macrophages. *Int J Cancer* 2001;93:781–785.
- Salcedo R, Young HA, Ponce ML, *et al.*: Eotaxin (CCL11) induces *in vivo* angiogenic responses by human CCR3+ endothelial cells. *J Immunol* 2001;166:7571–7578.
- Hwang J, Kim CW, Son KN, *et al.*: Angiogenic activity of human CC chemokine CCL15 *in vitro* and *in vivo*. *FEBS Lett* 2004;570:47–51.
- Hwang J, Son KN, Kim CW, *et al.*: Human CC chemokine CCL23, a ligand for CCR1, induces endothelial cell migration and promotes angiogenesis. *Cytokine* 2005;30:254–263.
- Strasly M, Doronzo G, Cappello P, *et al.*: CCL16 activates an angiogenic program in vascular endothelial cells. *Blood* 2004;103:40–49.
- Adler EP, Lemken CA, Katchen NS, and Kurt RA: A dual role for tumor-derived chemokine RANTES (CCL5). *Immunol Lett* 2003;90:187–194.
- Son KN, Hwang J, Kwon BS, and Kim J: Human CC chemokine CCL23 enhances expression of matrix metalloproteinase-2 and invasion of vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;340:498–504.
- Melief CJ: Cancer immunotherapy by dendritic cells. *Immunity* 2008;29:372–383.
- Ben-Baruch A: Host microenvironment in breast cancer development: inflammatory cells, cytokines and chemokines in breast cancer progression: reciprocal tumor-microenvironment interactions. *Breast Cancer Res* 2003;5:31–36.
- Kobayashi A, Weinberg V, Darragh T, and Smith-McCune K: Evolving immunosuppressive microenvironment during human cervical carcinogenesis. *Mucosal Immunol* 2008;1:412–420.
- Lepique AP, Daghasanli KR, Cuccovia IM, and Villa LL: HPV16 tumor associated macrophages suppress antitumor T cell responses. *Clin Cancer Res* 2009;15:4391–4400.
- Harrington KJ, Pandha HS, and Vile RG: Poxviruses as immunomodulatory cancer therapeutics. *Viral Therapy of Cancer*. John Wiley and Sons, Ltd., Hoboken, NJ, 2007, pp. 95–114.
- Hsieh CJ, Kim TW, Hung CF, *et al.*: Enhancement of vaccinia vaccine potency by linkage of tumor antigen gene to gene encoding calreticulin. *Vaccine* 2004;22:3993–4001.
- Mackova J, Stasikova J, Kutinova L, *et al.*: Prime/boost immunotherapy of HPV16-induced tumors with E7 protein delivered by *Bordetella* adenylate cyclase and modified vaccinia virus Ankara. *Cancer Immunol Immunother* 2006;55:39–46.

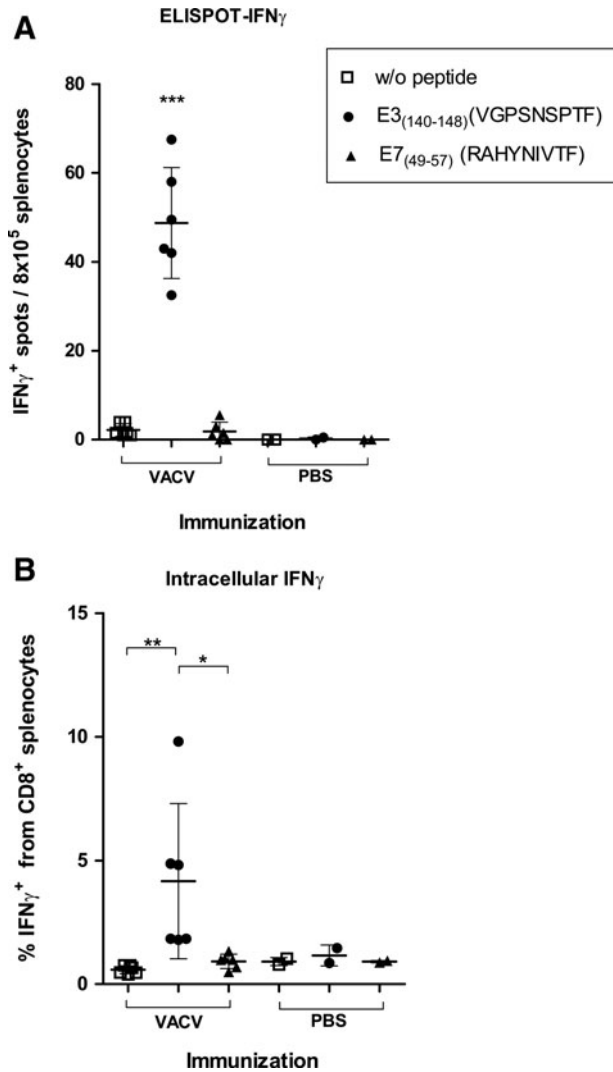
28. Corona Gutierrez CM, Tinoco A, Navarro T, *et al.*: Therapeutic vaccination with MVA E2 can eliminate precancerous lesions (CIN 1, CIN 2, and CIN 3) associated with infection by oncogenic human papillomavirus. *Hum Gene Ther* 2004;15:421–431.
29. Davidson EJ, Faulkner RL, Sehr P, *et al.*: Effect of TA-CIN (HPV 16 L2E6E7) booster immunisation in vulval intraepithelial neoplasia patients previously vaccinated with TA-HPV (vaccinia virus encoding HPV 16/18 E6E7). *Vaccine* 2004;22:2722–2729.
30. Fiander AN, Tristram AJ, Davidson EJ, *et al.*: Prime-boost vaccination strategy in women with high-grade, noncervical anogenital intraepithelial neoplasia: clinical results from a multicenter phase II trial. *Int J Gynecol Cancer* 2006;16:1075–1081.
31. Boyle DB, and Coupar BE: A dominant selectable marker for the construction of recombinant poxviruses. *Gene* 1988;65:123–128.
32. Smahel M, Sima P, Ludvikova V, and Vonka V: Modified HPV16 E7 genes as DNA vaccine against E7-containing oncogenic cells. *Virology* 2001;281:231–238.
33. Kutinova L, Ludvikova V, Simonova V, *et al.*: Search for optimal parent for recombinant vaccinia virus vaccines. Study of three vaccinia virus vaccinal strains and several virus lines derived from them. *Vaccine* 1995;13:487–493.
34. Joklik WK: The purification of four strains of poxvirus. *Virology* 1962;18:9–18.
35. Nemeckova S, Stranska R, Subrtova J, *et al.*: Immune response to E7 protein of human papillomavirus type 16 anchored on the cell surface. *Cancer Immunol Immunother* 2002;51:111–119.
36. Kutinova L, Ludvikova V, Maresova L, *et al.*: Effect of virulence on immunogenicity of single and double vaccinia virus recombinants expressing differently immunogenic antigens: antibody-response inhibition induced by immunization with a mixture of recombinants differing in virulence. *J Gen Virol* 1999;80:2901–2908.
37. Michl J: Metabolism of cells in tissue culture *in vitro*. I. The influence of serum protein fractions on the growth of normal and neoplastic cells. *Exp Cell Res* 1961;23:324–330.
38. Zurkova K, Babiarova K, Hainz P, *et al.*: The expression of the soluble isoform of hFlt3 ligand by recombinant vaccinia virus enhances immunogenicity of the vector. *Oncol Rep* 2009;21:1335–1343.
39. Babiarova K, Kutinova L, Krystofova J, *et al.*: Immunization with WT1 derived peptides by tattooing inhibits the growth of TRAMP-C2 prostate tumor in mice. Submitted 2012.
40. Smahel M, Tejklova P, Smahelova J, Polakova I, and Mackova J: Mutation in the immunodominant epitope of the HPV16 E7 oncoprotein as a mechanism of tumor escape. *Cancer Immunol Immunother* 2008;57:823–831.
41. Feltkamp MC, Smits HL, Vierboom MP, *et al.*: Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. *Eur J Immunol* 1993;23:2242–2249.
42. Lehmann MH, Kastenmuller W, Kandemir JD, Brandt F, Suezter Y, and Sutter G: Modified vaccinia virus Ankara triggers chemotaxis of monocytes and early respiratory immigration of leukocytes by induction of CCL2 expression. *J Virol* 2009;83:2540–2552.
43. Tschärke DC, Reading PC, and Smith GL: Dermal infection with vaccinia virus reveals roles for virus proteins not seen using other inoculation routes. *J Gen Virol* 2002;83:1977–1986.
44. Andrew ME, Coupar BE, and Boyle DB: Humoral and cell-mediated immune responses to recombinant vaccinia viruses in mice. *Immunol Cell Biol* 1989;67:331–337.
45. Hembruff SL, and Cheng N: Chemokine signaling in cancer: Implications on the tumor microenvironment and therapeutic targeting. *Cancer Ther* 2009;7:254–267.
46. Salcedo R, Ponce ML, Young HA, *et al.*: Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood* 2000;96:34–40.
47. Loberg RD, Ying C, Craig M, *et al.*: Targeting CCL2 with systemic delivery of neutralizing antibodies induces prostate cancer tumor regression *in vivo*. *Cancer Res* 2007;67:9417–9424.
48. Qian BZ, Li J, Zhang H, *et al.*: CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* 2011;475:222–225.
49. Cambien B, Richard-Fiardo P, Karimjee BF, *et al.*: CCL5 neutralization restricts cancer growth and potentiates the targeting of PDGFRbeta in colorectal carcinoma. *PLoS One* 2011;6:e28842.
50. Fridlender ZG, Buchlis G, Kapoor V, *et al.*: CCL2 blockade augments cancer immunotherapy. *Cancer Res* 2010;70:109–118.
51. Delaloye J, Roger T, Steiner-Tardivel QG, *et al.*: Innate immune sensing of modified vaccinia virus Ankara (MVA) is mediated by TLR2-TLR6, MDA-5 and the NALP3 inflammasome. *PLoS Pathog* 2009;5:e1000480.
52. Smahel M, Smahelova J, Tejklova P, Tachezy R, and Marinov I: Characterization of cell lines derived from tumors induced by TC-1 cells in mice preimmunized against HPV16 E7 oncoprotein. *Int J Oncol* 2005;27:731–742.
53. Kutinova L, Ludvikova V, Simonova V, *et al.*: Search for optimal parent for recombinant vaccinia virus vaccines. Study of three vaccinia virus vaccinal strains and several virus lines derived from them. *Vaccine* 1995;13:487–493.
54. Appay V, and Rowland-Jones SL: RANTES: a versatile and controversial chemokine. *Trends Immunol* 2001;22:83–87.
55. Rahbar R, Murooka TT, Hinek AA, *et al.*: Vaccinia virus activation of CCR5 invokes tyrosine phosphorylation signaling events that support virus replication. *J Virol* 2006;80:7245–7259.
56. Rahbar R, Murooka TT, and Fish EN: Role for CCR5 in dissemination of vaccinia virus *in vivo*. *J Virol* 2009;83:2226–2236.
57. Hickman HD, Takeda K, Skon CN, *et al.*: Direct priming of antiviral CD8+ T cells in the peripheral interfollicular region of lymph nodes. *Nat Immunol* 2008;9:155–165.
58. Taub DD, Ortaldo JR, Turcovski-Corrales SM, Key ML, Longo DL, and Murphy WJ: Beta chemokines costimulate lymphocyte cytotoxicity, proliferation, and lymphokine production. *J Leukoc Biol* 1996;59:81–89.
59. Sumida SM, McKay PF, Truitt DM, *et al.*: Recruitment and expansion of dendritic cells *in vivo* potentiate the immunogenicity of plasmid DNA vaccines. *J Clin Invest* 2004;114:1334–1342.

Address correspondence to:

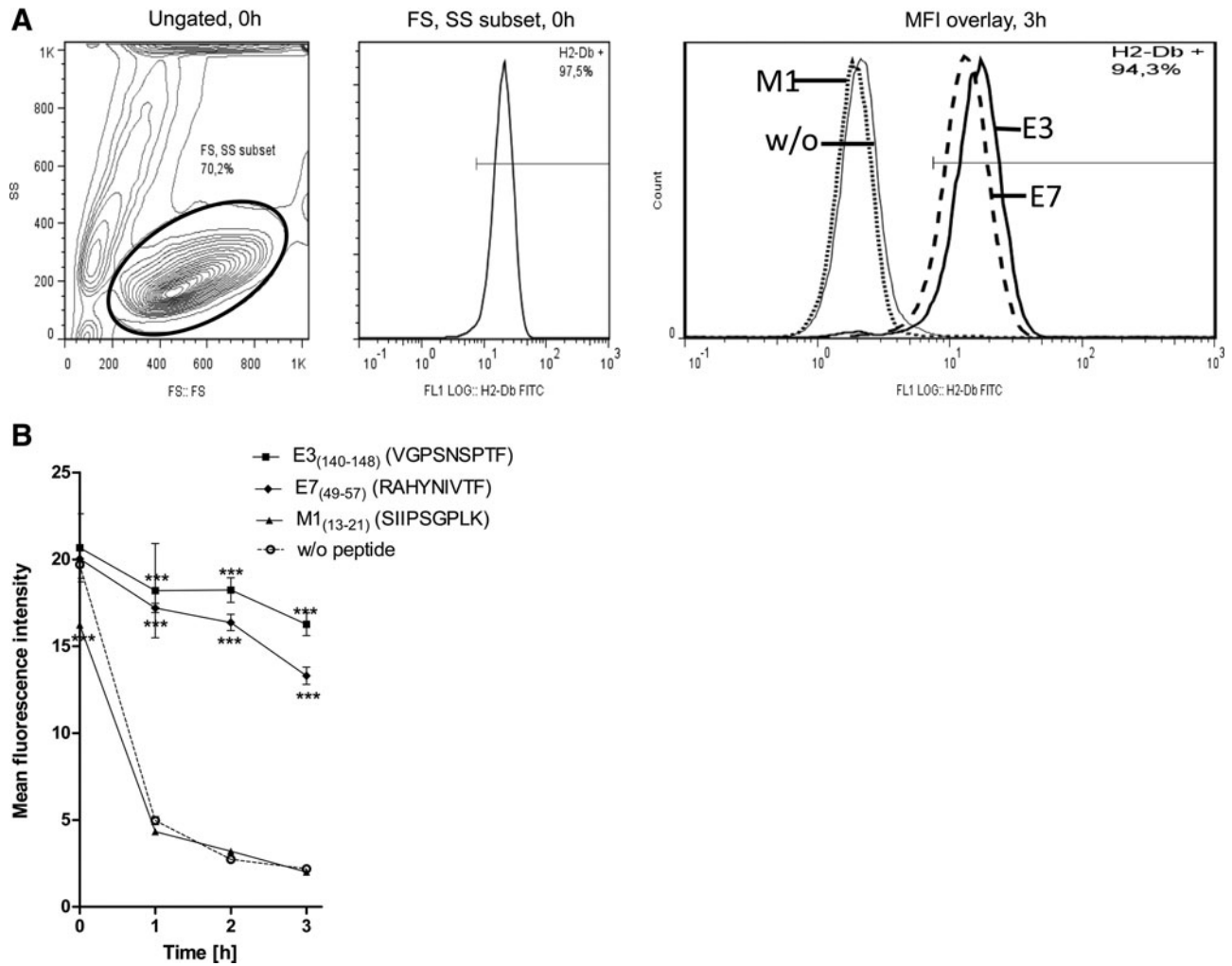
Dr. Sarka Nemeckova  
 Department of Experimental Virology  
 Institute of Hematology and Blood Transfusion  
 U nemocnice 1  
 CZ-128 20 Prague 2, Czech Republic

E-mail: nemeckova@uhkt.cz

Received December 3, 2011; accepted May 23, 2012.



**SUPPLEMENTARY FIG. S1.** The predicted H2-D<sup>b</sup>-restricted E3<sub>(140-148)</sub> epitope is recognized by CD8<sup>+</sup> CTLs of H-2<sup>b</sup> mice immunized with VACV. (A) Mice were injected intraperitoneally with  $3.10^6$  PFU of recombinant vaccinia virus P13 expressing glucuronidase of *E. coli* (P13-GUS) ( $n=6$ ), or with PBS ( $n=2$ ). Splenocytes were isolated 12 d after the immunization. The response of antigen-specific T cells was determined by ELISPOT-IFN  $\gamma$  *ex vivo* as described in the materials and methods section. The E3-specific response was found in all animals immunized with VACV. The response was epitope-specific, as stimulation with E7 peptide yielded no higher count of spots than control without peptide. There was no response seen in non-immunized mice. The difference in spot count between E3-stimulated cells from VACV-immunized mice and any other test group was statistically significant ( $p < 0.001$ ), as determined by one-way ANOVA. (B) Staining of CD8 molecule on the surface of responding cells by ICS staining confirmed that VGPSNSPTF peptide is a natural epitope and can be recognized by CD8<sup>+</sup> T cells.



**SUPPLEMENTARY FIG. S2.** The E3<sub>(140-148)</sub> (VGPSNSPTF) peptide binds to the H2-D<sup>b</sup> molecule. The RMA-S cells were incubated at 25°C for 16 h and pulsed with 10 μM E3, E7, or M1 peptide, or with medium without the peptide, for 20 min. The cells were washed twice with PBS and further incubated at 37°C in medium. The amount of surface H-2D<sup>b</sup> molecules was measured in triplicate by flow cytometry at several time points. An example of the determination of mean fluorescence intensity of the FITC signal in the FS, SS live cell subset at 0 h, and the overlay of MFI values for the three peptides and controls at 3 h are shown in part A. (B) Graph showing the time course of H-2D<sup>b</sup> molecule surface concentration. The statistical analysis was performed by two-way ANOVA (\*\*\*)  $p < 0.001$ .