

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Postgraduální studium biomedicíny  
Studijní obor: buněčná a molekulární biologie, genetika a virologie



**MUDr. Pavel Gabriel**

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

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

**Dizertační práce**

Vedoucí závěrečné práce: RNDr. Šárka Němečková, DrSc

**Praha 2014**

**Prohlášení:**

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

V Praze, 12. 3. 2013

MUDr. Pavel Gabriel

.....

Předkládaná dizertační práce byla vypracována za podpory následujících grantů:

- NS-10660-3/2009 IGA MZ ČR
- MZ0 UHKT 2005 IGA MZ ČR
- ERDF OPPK CZ.2.16/3.1.00/24001.
- NR 8004-3/2004 IGA MZ ČR
- 310/04/004 GA ČR
- 310/05/H5333 GA ČR
- ERDF OPPK CZ.2.16/3.1.00/24001

Chtěl bych poděkovat své školitelce RNDr. Šárce Němečkové, DrSc. za odborné vedení práce, mnohé praktické i teoretické rady, trpělivost a neustálou podporu. Dále bych chtěl poděkovat RNDr. Ludě Kutinové za její pomoc při přípravě některých rekombinant, RNDr. Katarině Babiarové, Ph.D. za provedení metody ELISPOT, Ing. Jitce Kryštofové za provedení qPCR, RNDr. Kamile Žůrkové, Ph.D. za provedení některých měření na průtokovém cytometru, Mgr. Petru Hainzovi a RNDr. Vincentu Lučanskému, Ph.D. za jejich pomoc při *in vivo* pokusech a všem ostatním v laboratoři a doma, kteří mě svým přátelským přístupem podporovali.

## ABSTRAKT

O úspěchu nádorové vakcíny rozhodují jak faktory související s vakcínou, které určují hlavní parametry účinné imunitní odpovědi, tak faktory související s hostitelem představované imunosupresivními mechanismy, které umožňují nádoru uniknout imunitnímu systému.

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

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

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

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

## ABSTRACT

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

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

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

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

## Seznam použitých zkratk

293T	human embryonic kidney cell line
35 K	secreted protein of 35 kDa, viral CC-chemokine inhibitor (vCCI), which binds CC-chemokines with high affinity
3 $\beta$ -HSD	3- $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase
7.5 K	the 7.5K polypeptide of the WR strain of VACV and is a truncated form of the 35K Lister protein
ACK buffer	red cell lysis buffer
AdV	Adenovirus
APC	antigen-presenting cell
ATB	antibiotic
bFGF	fibroblast growth factor-b
bisAA	bisakrylamid
bp	base pair
BSA	bovine serum albumin
BUdR	bromodeoxyuridine
C57Bl/6	strain of laboratory mouse
CAF	carcinoma-associated fibroblasts
CC	CC chemokine
CEF	chickenembryo fibroblasts
CPE	cytopathic effect
CpG-DNA	DNA that harbours immunostimulatory capacity as a result of unmethylated CG-dinucleotide motifs
CPV	Cowpox virus
CsCl	cesium chloride
CSF-1	macrophage-colony stimulating factor-1
CTL	cytotoxic T lymphocyte
CTLA-4	cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 proteins contribute to the suppressor function of regulatory T cells
CVA	chorioallantois vaccinia virus Ankara
DARC	Duffy antigen/receptor for chemokines
DC	dendritic cell

DI <sub>s</sub>	Dairen I strain of VACV
DMSO	dimethyl sulfoxide
dsDNA	double-stranded deoxyribonucleic acid
dsRNA	double-stranded ribonucleic acid
DTT	1,4-Dithiothreitol
ECL	luminol-based chemiluminescent substrate for easy detection of horseradish peroxidase (HRP) on immunoblots
ECM	extracellular matrix
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide
EDTA	ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid (buffer)
EEV	extracellular enveloped virus
EFC	entry-fusion complex
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent screening assay
ELISPOT	a solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay for enumeration of cells secreting specific antibody
E-MEM	Eagles's Minimum Essential Medium
EMT	epithelial to mesenchymal transition
EPL	early primitive ectoderm-like
ER	endoplasmic reticulum
EtBr	ethidium bromide
FBS	fetalbovine serum
FDA	US Food and Drug Administration
FGF	Fibroblast growth factor
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GAG	glycosaminoglycan
GFP	green fluorescent protein
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GPCRI	G-protein coupled receptor 1
GPT	guanine phosphoribosyltransferase
GUS	E. coli $\beta$ -glucuronidase

H-2Kb/H2-Db	mouse MHC class I alloantigens expressed on nucleated cells from mice of the H-2Kb/H-2Db haplotype
HAT	hypoxanthine-aminopterin-thymidine medium - selection medium for mammalian cell culture
HBV	Hepatitis B virus
HeLa	immortal cell line derived from cervical cancer cells
HEPES	hydroxyethyl piperazineethanesulfonic acid (buffering agent)
HIV	Human immunodeficiency virus
HLA	human leucocyte antigen
HPV	Human papillomavirus
HPV16 E6 E7	Oncoproteins E6, E7 encoded by HPV16
HSV	Herpes simplex virus
i.d	intra-dermal(y)
i.n.	intra-nasal(y)
i.p.	intra-peritoneal(y)
i.v.	intra-venous(y)
iDCs	immature dendritic cells
IDO	indoleamine 2,3-dioxygenase
IEV	intra-cellular enveloped virus
IFN	interferon
IFN- $\gamma$ R	interferon $\gamma$ receptor
IgG	immunoglobulin G
IHD-J	Vaccinia Virus strain International Health Department -J
IHD-W	Vaccinia Virus strain International Health Department -W
IL	interleukin
IL-2R	interleukin- 2 receptor
IMV	intra-cellular mature virus
iNOS	inducible nitric oxide synthase
IP-10	interferon gamma-induced protein 10 (CXCL10 chemokine)
ITRs	inverted terminal repeats
IU	international unit



IV	immature virions (of VACV)
Kb	kilobase- 1000 base pairs of DNA or RNA
kDa	1000 Daltons
LacZ	E. coli reporter lacZ gene, which encodes the protein $\beta$ -galactosidase
LC16m8	highly attenuated Vaccinia Virus strain
LIVP	VACV vaccine strain originated from the Lister strain
LPS	lipopolysaccharide
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MCV	Molluscum contagiosum virus
MDSC	myeloid-derived suppressor cells
MHC	major histocompatibility complex
MIP	macrophage inflammatory protein 1 alpha
MK16	a line of oncogenic, HPV16-transformed epitheloid mouse cells, free of MHC class I molecules.
MMP	matrix metalloproteinase
MOI	multiplicity of infection
MV	Myxoma virus
MVA	Modified vaccinia virus Ankara
NF- $\kappa$ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK	natural killer
NOD	nucleotide-binding oligomerization domain
NP40	lysis buffer often used for cell lysis prior to immunoprecipitation
NYVAC	New York Vaccinia Virus
OPV	Orthopoxviruses
ORF	open reading frame
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
pDB	plasmacytoid dendritic cells
PDGF	Platelet-derived growth factor

PE	Phycoerythrin (fluorescent dye)
PEG	polyethylene glycol
PFU	plaque-forming unit
PGN	prostaglandin E
preS2S	HBV envelope medium protein
PRR	Pattern recognition receptor
RAT-2	rat fibroblast cell line, that lacks appreciable levels of nuclear thymidine kinase
RER	rough endoplasmic reticulum
ROS	reactive oxygen species
SAP	shrimp alkaline phosphatase
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis
shRNA	short hairpin RNA
SigE7GGGLAMP	fusion protein consisting of HPV16-E7 and signal sequence of LAMP1
S-T7	type I chemokine binding protein from Shope fibroma virus
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (Transcription factor)
TAA	tumor-associated antigen
TAM	tumor-associated macrophages
TC-1	HPV16-E6, HPV16-E7 and H-ras transformed murine (C57Bl/6 mice) cell line
TC-1/A9	tumor cells characterized by expression of HPV16 oncogenes and downregulation of H-2b molecules
TCR	T-cell receptor
TEMED	tetramethylethylenediamine
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$
Th1, Th2	Th1 and Th2 helper T cell responses
TK	thymidine kinase
TLR	toll-like receptor
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TNE	buffer consisting of Tris, EDTA and NaCl

TNF	Tumor Necrosis Factor
Treg	regulatory T cells
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane- compound of buffer solutions
TSA	tumor specific antigen
Tween 20	a nonionic detergent for use in immunoassay wash buffers
uPA	urokinase plasminogen activator
VACV	Vaccinia Virus
vCCI	viral CC-chemokine inhibitor, secreted protein of 35 kDa, expressed by most poxviruses, which binds CC-chemokines with high affinity
vCKBP	virus-encoded chemokine-binding proteins
vCkRs	viral chemokine receptors
VEGF	vascular endothelial growth factor
VGF	vascular growth factor
VTT	Vaccinia virus strain TianTan
WHO	World Health Organization
WR	Western Reserve strain of Vaccinia virus
wt	wild type
WT1	Wilms' tumor 1
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galacto-pyranoside (chromogenic substrate)
$\beta$ -gal	$\beta$ -galactosidase

# OBSAH

1. Úvod.....	17
2. Literární přehled.....	18
2.1 Nádorová imunoterapie pomocí viru vakcínie.....	18
2.1.1 Virus vakcínie .....	21
2.1.1.1 Struktura virionu .....	21
2.1.1.2 Genom (imunomodulátory).....	22
2.1.1.3 Replikační cyklus.....	23
2.1.1.4 Modulace aktivity chemokinů VACV .....	27
2.1.1.5 VACV CKBPII a jeho terapeutické využití.....	35
2.1.2. Virus vakcínie jako vakcína proti nádorům .....	39
2.1.2.1 Požadavky na nádorovou vakcínu.....	40
2.1.2.2 Strategie vedoucí k zlepšení protinádorového účinku při imunizaci VACV .....	43
2.1.3 Zlepšení imunizačních vlastností VACV.....	49
<i>Delece neesenciálních genů pro imunomodulátory a genů hostitelského spektra.....</i>	49
<i>Atenuace inzercí genů pro imunomodulátory .....</i>	53
<i>Prime-boost režimy .....</i>	53
<i>Překonání preexistující imunity .....</i>	54
<i>Cytokiny jako adjuvans .....</i>	54
2.2. Chemokiny a jejich role v procesu kancerogeneze a při vývoji cervikálního karcinomu.....	55
2.2.1 Inhibice CC chemokinů .....	63
2.3. GM-CSF jako imunoadjuvans nádorových vakcín.....	65
2.5 WT1 protein-modelový protinádorový antigen .....	68
3. Použité materiály a metody.....	71
3.1 Speciální přístroje .....	71
3.2 Počítačové programy.....	72
3.3 Chemikálie .....	72
3.4 Použité enzymy .....	75
3.4.1 Restriční enzymy a pufry .....	75
3.5 Standardy molekulových hmotností.....	76
3.6 Syntetické oligonukleotidy .....	77
3.6.1 Oligonukleotidy použité jako primery při PCR a sekvenování. ....	77
3.6.2 Oligonukleotidy s funkcí signální sekvence .....	78
3.7 Protilátky.....	78
3.8 Komerční soupravy .....	79
3.9 Roztoky a pufry.....	80
3.10 Kultivační média .....	82
3.10.1 Kultivační média pro bakterie.....	82
3.10.2 Kultivační média pro buňky.....	82

3.11	Plazmidy .....	84
	pD357.....	84
	pCR-Blunt TOPO .....	84
	pGPT07.....	84
	pBSC.....	85
	pBSC SigE7GGGLAMP .....	85
	pGM-CSF-N1 .....	85
	pBSC/E7GGG.GUS.....	85
	pBlues WT1 .....	85
	pBK-CMV .....	86
	LMVmWT1 .....	86
3.12	Bakterie.....	86
3.13	Buněčné linie .....	86
	TC-1/A9.....	87
3.14	Pokusná zvířata .....	87
3.15	Viry .....	87
	P13-E7GGG.....	87
	P13-preS2S .....	87
	P13-GM-CSF a MVA-GM-CSF.....	88
	MVA-SigE7LAMP .....	88
	MVA-SigE7LAMP-GM-CSF.....	88
3.16	Metody .....	88
	3.16.1 Práce s DNA .....	88
	3.16.1.1 Izolace DNA z gelu pomocí Lego kitu (Top-Bio).....	88
	3.16.1.2 Čištění plazmidové DNA polyethylenglykolem.....	89
	3.16.1.3 Ligace rychloligačním kitem .....	89
	3.16.1.4 PCR detekce rekombinant .....	89
	3.16.1.5 Sekvenování pomocí kitu Big Dye™ Terminator 3.1 .....	90
	3.16.1.6 Transfekce kalciumfosfátovou precipitací.....	90
	3.16.1.7 Transfekce elektroporací.....	90
	3.16.2 Práce s buňkami .....	91
	3.16.2.1 Kultivace a pasážování buněk.....	91
	3.16.2.2 Zmrazování buněk a rozmrazování buněk.....	91
	3.16.3 Práce s viry.....	91
	3.16.3.1 Rekombinace do viru vakcinie .....	91
	3.16.3.2 Selektce rekombinant barvením při expresi $\beta$ -galaktosidázy.....	92
	3.16.3.3 Selektce rekombinant díky expresi Ecogpt (transient dominantní selektce).....	92
	3.16.3.4 Selektce rekombinant jako TK negativního viru .....	92
	3.16.3.5 Pomnožení viru – zásobní virová suspenze .....	92
	3.16.3.6 Sonikace viru .....	93

3.16.3.7	Izolace DNA pro detekci rekombinant pomocí PCR.....	93
3.16.3.8	Izolace virové DNA z buněk infikovaných VACV pro přípravu genu vCCI .....	93
3.16.3.9	Stanovení DNA viru vakcínie v myších ováriích pomocí Q-PCR.....	94
3.16.4	Práce s proteiny .....	95
3.16.4.1	Příprava vzorků pro SDS-PAGE.....	95
3.16.4.2	Srážení proteinů acetonem .....	95
3.16.4.3	SDS-PAGE.....	95
3.16.4.4	Western blot .....	96
3.16.4.5	Pokus se síťovacím činidlem .....	96
3.16.4.6	ELISA .....	96
3.16.5	Pokusy in vivo.....	97
3.16.5.1	Indukce nádorů.....	97
3.16.5.2	Imunizace viry.....	97
3.16.5.3	DNA imunizace.....	97
3.16.5.4	Intratumorální injekce MVA-GM-CSF .....	97
3.16.5.5	Tvorba a následná léčba minimální reziduální choroby .....	98
3.16.5.6	Izolace buněk nádorů pro analýzu průtokovou cytometrií.....	98
3.16.5.7	Testování buněčné imunity .....	98
3.16.5.8	Průtoková cytometrie .....	99
3.16.5.9	Histologické vyšetření nádorů .....	99
4.	Výsledky .....	100
4.1	Studium vlivu vCCI na biologické vlastnosti VACV_Praha 13.....	100
4.1.1	Konstrukce rekombinačních a expresních plazmidových vektorů .....	100
4.1.1.1	pD357-Rev.....	100
4.1.1.2	Sekvence vCCI VACV kmene Praha- nalezeno zkrácení signální sekvence .....	101
4.1.1.3	pD357-Rev+Sig. ....	102
4.1.1.4	pBSC-Sig vCCI.....	102
4.1.2	Konstrukce rekombinantních virů.....	103
4.1.2.1	P13- $\Delta$ vCCI-E7GGG .....	103
4.1.2.2	P13-Sig-vCCI- E7GGG .....	104
4.1.2.3	RevP13- $\Delta$ vCCI- E7GGG .....	104
4.1.2.4	RevP13-Sig-vCCI-E7GGG.....	104
4.1.2.5	P13- $\Delta$ vCCI-preS2S .....	104
4.1.2.6	RevP13- $\Delta$ vCCI-preS2S .....	104
4.1.2.7	P13-Sig- $\Delta$ vCCI-preS2S .....	105
4.1.3	Prodloužení signální sekvence vCCI vedlo k produkci sekrečního vCCI .....	105
4.1.3.1	Testování produkce vCCI western blotem.....	105
4.1.3.2	Pokus se síťovacím činidlem .....	106

4.1.4	Sekreční vCCI ovlivňoval hladinu chemokinů v krvi myši infikovaných VACV .....	107
4.1.5	Produkce sekreční formy vCCI vedla k atenuaci P13 VACV in vivo.....	109
4.1.5.1	Množení virů s různými formami genu vCCI v myších C57Bl/6.....	109
4.1.5.2	Hladina protilátek v séru.....	110
4.1.6	Replikace rVACV in vivo nebyla ovlivněna specifickou imunitní odpovědí proti vCCI navozenou DNA imunizací .....	110
4.1.7	Produkce sekreční formy vCCI nezvyšovala imunitní odpověď navozenou rVACV kmene Praha 13 nebo DNA vakcínami.....	112
4.1.7.1	Detekce buněčné odpovědi po imunizaci rVACV metodou ELISPOT IFN- $\gamma$ .....	112
4.1.7.2	Analýza vlivu sekreční formy vCCI produkované virem P13-E7GGG na imunitní buňky .....	113
4.1.8	Produkce sekreční formy vCCI vedla ke snížení protinádorového účinku imunizace jak rVACV kmene Praha 13 tak DNA vakcínami.....	115
4.1.8.1	Výsledky preventivní imunizace rVACV.....	115
4.1.8.2	Výsledky terapeutické imunizace rVACV .....	116
4.1.8.3	Výsledky preventivní imunizace DNA vakcínami .....	118
4.1.8.4	Výsledky terapeutické imunizace DNA vakcínami.....	119
4.2	Kombinovaná léčba nádorů pomocí intratumorální injekce MVA-GM-CSF a DNA vakcíny .....	120
4.2.1	Intratumorální injekce MVA-GM-CSF měla vliv na terapii nádorů TC-1/A9 DNA vakcínou.....	121
4.2.1.1	DNA vakcinace.....	121
4.2.1.2	Kombinace DNA vakcinace s aplikací rVACV produkující GM-CSF ...	122
4.2.2	MVA-GM-CSF zlepšil imunoterapii minimální reziduální choroby .....	124
4.2.3	MVA-GM-CSF nezesílil specifickou E7 T buněčnou imunitu po imunizaci DNA vakcínou .....	125
4.2.4	Mikroprostředí MHCI negativních TC-1/A9 nádorů bylo ovlivněno aplikací MVA-GM-CSF a DNA vakcíny .....	126
4.2.5.1	Analýza buněčné skladby nádoru pomocí imunohistochemického barvení histologických řezů .....	126
4.2.5.2	Analýza buněčné skladby nádoru pomocí průtokové cytometrie.....	128
4.2.5.3	Analýza exprese MHCI molekul na povrchu nádorových buněk.....	128
4.3	Příprava transgenní leukemické nádorové linie stabilně exprimující WT1 antigen .....	130
4.3.1	Konstrukce plazmidu BK-CMV/WT1-321 .....	130
4.3.2	Expese proteinu WT1-321 v 293T buňkách.....	132
4.3.3	Transfekce buněk myši myelomonocytární leukemie C1498.....	133
4.3.3.1	Analýza buněk C-1498 transfekovaných nelinearizovaným plazmidem pBK-CMV/WT1-321 .....	133

4.3.3.2	Analýza buněk C-1498 transfekovaných linearizovaným plazmidem pBK-CMV/WT1-321 .....	135
5.	Diskuze.....	138
5.1	Hodnocení výsledků získaných imunizací rVACV s různými formami genu vCCI.....	138
5.2	Hodnocení výsledků imunoterapie TC-1/A9 nádorů s nižší expresí molekul MHC I kombinující DNA imunizaci s intratumorálním podáním VACV exprimujících GM-CSF.....	148
6.	Závěr .....	150
7.	Seznam literatury .....	153
8.	Přílohy.....	200



# 1. Úvod

Výzkum v oblasti vakcín založených na viru vakcinie (VACV) získal v nedávných letech na větším významu vzhledem k riziku potenciálního úmyslného nebo neúmyslného rozšíření viru pravých neštovic, vzrůstající hrozbě monkeypox viru a potřebě získat účinnější vektory pro přípravu vakcín proti HIV, dalším infekčním chorobám a také nádorům.

Činnost oddělení Experimentální virologie ÚHK T je dlouhodobě zaměřena na imunoterapii transplantovaných nádorů exprimujících onkoproteiny HPV16 E6 a E7 pomocí rekombinantního viru vakcinie. Naší snahou je získat bezpečný, oslabený virus navozující účinnou protinádorovou imunitní reakci, který by byl současně schopný působit proti imunosupresivnímu mikroprostředí uvnitř nádoru. V rámci vytyčeného cíle jsou studovány různé neesenciální geny ovlivňující virulenci viru, jako např. geny pro imunomodulátory interferující s imunitní odpovědí hostitele nebo tzv. geny hostitelského spektra, či geny pro různé cytokiny a růstové faktory. Některé z produktů těchto genů jsou pro své pozitivní působení v rámci protinádorových vakcín nazývány imunologická adjuvans. Mezi ně můžeme řadit také cytokin GM-CSF a solubilní inhibitor CC chemokinů (vCCI). Vzhledem k velkému vlivu CC chemokinů na indukci imunity navozené virem a na formování imunosupresivního prostředí nádoru jsme vytvořili rekombinantní viry s různými formami genu vCCI. Tato práce popisuje konstrukci vektorů (virus vakcinie, DNA vakcína) obsahujících imunologická adjuvans GM-CSF a vCCI a následné testování jejich imunizačních vlastností a protinádorových účinků. Součástí práce je dále popis přípravy linie modelových nádorových buněk vhodných pro testování různých metod imunoterapie nádorů exprimujících WT1 antigen.

Cíle práce:

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

## 2. Literární přehled

### 2.1 Nádorová imunoterapie pomocí viru vakcínie

Přes významné pokroky v terapii jsou maligní onemocnění stále předním celosvětovým zdravotním problémem, který vyžaduje, pro získání optimálních výsledků, zavedení nových léčebných postupů (Vergati et al., 2010). Prostřednictvím kombinace chirurgie, záření a chemoterapie není často možné dosáhnout kompletní remise a tato léčba bývá navíc spojena se závažnými vedlejšími účinky. V současnosti je proto věnována velká pozornost imunoterapii, která by, v případě účinnosti, byla schopná aktivovat imunitní systém pacienta a využít jeho obranné schopnosti k eliminaci nádoru. Tato metoda by mohla být velice přínosná nejen díky specifčnosti imunitní reakce, ale také díky možnosti vytvořit dlouhodobou nádorovou imunitu navozením imunologické paměti (Aldrich et al., 2010). Teoreticky by protinádorovou vakcinací mohla být u pacientů navozena imunitní odpověď, která by byla schopná nádor vyléčit nebo jej držet pod kontrolou a tak oddalovat relaps nádoru a vést k prodloužení doby přežití pacienta.

Imunoterapie nádorů se může obecně dělit na pasivní, zahrnující podání buněk nebo protilátek *ex vivo* a aktivní, reprezentovanou vakcínami, jejímž cílem je navození specifické imunitní odpovědi proti tumor specifickým antigenům (TSA) a antigenům asociovaným s nádory (TAA) (Vergati et al., 2010). Profylaktické a terapeutické protinádorové vakcíny představují jeden z nejnadějnějších postupů v rámci multidisciplinární léčby malignit.

Aplikace VACV jako terapeutické nádorové vakcíny je jednou z forem aktivní specifické imunoterapie nádorů. Nádorová imunoterapie prošla, díky obrovskému nárůstu znalostí v oblastech biologie nádorů a imunologie, vývojem od pokusů založených na pozorováních k vědě stojící na pevných teoretických základech, která využívá racionální konstrukci a objektivní testování účinnosti nových nádorových vakcín jako jednu z metod svého rozvoje (Bilusic & Madan, 2012).

V posledních desetiletích byly jako terapeutické nádorové vakcíny použity buněčné vakcíny, DNA a RNA vakcíny, proteinové a peptidové vakcíny a vakcíny založené na virových, bakteriálních a kvasinkových vektorech (Palena et al., 2006). Společným cílem všech těchto modalit je aktivace antigen prezentujících buněk a stimulace antigen specifických cytotoxických T lymfocytů (CTL). Jednou z výhod použití vektoru je, že tento způsob podání rekombinantního proteinu je mnohem imunogennější, než aplikace

proteinu s adjuvans (Kantor et al., 1993a). Volba vektoru může mít významný vliv na navozenou imunitní odpověď proti TAA, protože každý vektor má své vlastní charakteristiky a je schopen stimulovat imunitní systém hostitele unikátním způsobem.

VACV má pro užití v podobě terapeutické nádorové vakcíny mnohé příznivé vlastnosti. Díky úspěšné aplikaci a významné charakterizaci během celosvětového programu eradikace pravých neštovic (Fenner, 1989) společně s rozvojem strategií pro vytváření rekombinantních virů, které efektivně exprimují cizí proteiny, se z VACV stal velice slibný vakcinační vektor (Paoletti, 1996). Je zřejmé, že mnoho charakteristických vlastností VACV, které z něj činily tak účinnou vakcínu proti pravým neštovicím, si ponechává také rekombinantní virus.

VACV především prokázal svou bezpečnost a účinnost při imunizaci více než miliardy lidí během celosvětové eradikační kampaně pravých neštovic. Rekombinantní VACV jsou díky své schopnosti aktivovat vrozenou a adaptivní imunitu (Moss, 2011; Delaloye et al., 2009) zahrnující navození účinné protilátkové (Panicali et al., 1983; Smith et al., 1983) a T buněčné odpovědi (Bennink et al., 1984) velmi vhodnými vektory pro prezentaci slabě imunogenních antigenů, jak bylo prokázáno v mnoha preklinických (Bernards et al., 1987; Lathe et al., 1987; Hareuveni et al., 1990; Meneguzzi et al., 1990; Kaufman et al., 2006; Kantor et al., 1993b) a klinických studiích s TAA (Hamilton, 1994; Tsang et al., 1995; Eder et al., 2000; Gulley et al., 2002). (Podrobněji jsou přednosti VACV vakcín popsány v kap. 2.6.3. Vaccinia virus jako vakcína proti nádorům)

Nevýhodou kmenů používaných k vymýcení neštovic byl bohužel vzácný výskyt závažných komplikací po očkování (Lane et al., 1969). Zatímco použití první generace vakcín založených na VACV je bezpečné pro většinu lidí, existuje velké riziko komplikací u jedinců s oslabenou imunitou a s atopickou dermatitidou v anamnéze (Fenner, 1989; Arness et al., 2004; Eckart et al., 2004). Proto bylo již během eradikační kampaně připraveno několik oslabených kmenů VACV (van der Noordaa et al., 1967; Kempe, 1968; Tagaya et al., 1974). Tyto kmeny byly odvozeny mnohonásobným pasážováním virů na buněčných kulturách alternativních hostitelů, což vedlo k pozměnění vlastností jako jsou hostitelské spektrum, virulence a složení genomu. V současnosti existují tři potenciální vakcinační kmeny, které byly připraveny touto metodou. Jedná se o Lister klon 16m8 (LC16m8), který byl povolen pro použití v Japonsku od roku 1975 (Sugimoto et al., 1985), modifikovaná vakcinie Ankara (MVA) a Dairen I Strain (DIs).

Virus MVA byl vytvořen v 50. letech 20. století opakovaným pasážováním (více než 570 krát) VACV kmenu Ankara na kuřecích fibroblastech (CEF) (Mayr et al., 1978).

Vznikl vysoce atenuovaný virus neschopný replikace ve většině savčích buněk se současným zachováním exprese virových genů (Drexler et al., 1998). Během eradikační kampaně v Německu, kdy byl podán více než 120 tisícům jedinců, bylo prokázáno, že jeho aplikace není doprovázena žádnými vedlejšími účinky (Hochstein-Mintzel et al., 1975). Sekvenace MVA ukázala, že došlo ke ztrátě přibližně 30kb genomu, obzvláště na obou koncích, kde se vyskytují jak neesenciální geny hrající roli při určení hostitelského spektra, tak i geny řídící modulaci přirozené imunitní odpovědi. Mezi významné imunomodulátory, které byly deletovány z MVA, patří geny kódující rozpustné receptory pro IFN typu I a II, TNF a CC chemokiny (Antoine et al., 1998). Jejich absence má významný vliv na schopnost indukovat specifickou imunitu.

Další generace vakcín založených na VACV vzniká v současnosti díky pokrokům v biotechnologiích, které umožňují inzerci, delecí nebo přerušení genů v specifických oblastech virového genomu. V současnosti jsou prováděny pokusy s delecí genů pro imunomodulátory, geny hostitelského spektra, geny metabolismu nukleotidů a esenciální geny, jejichž ztráta může být komplementována buněčnou linií exprimující odstraněný gen VACV. (Podrobněji jsou jednotlivé geny popsány v kapitole 2.1.3. Zlepšení imunizačních vlastností VACV)

Jednou z nejlépe charakterizovaných geneticky atenuovaných mutant VACV je NYVAC, virus neschopný replikace ve většině savčích buněk (Tartaglia et al., 1992; Tartaglia et al., 1994), který byl vytvořen z kmene Copenhagen delecí 18 různých ORF pomocí *in vitro* rekombinace (Tartaglia et al., 1992). Srovnáním imunitní odpovědi indukované kmeny NYVAC a MVA bylo zjištěno, že oba viry indukují kvalitativně různý typ imunitní odpovědi proti vloženému transgenu. To je způsobeno kombinovaným vlivem mnoha virových proteinů, které ovlivňují různé úrovně imunitní reakce. Dokud nebude k dispozici více testů a znalostí umožňujících předpovídat *in vivo* výsledek manipulace s genomem viru, zůstane celý proces stále spíše empirický a závislý na *in vivo* modelech (Draper & Heeney, 2010).

Přestože jsou nereplikující se viry stále, díky své bezpečnosti, hlavními vektory testovanými v různých preklinických studiích, roste, vzhledem k jejich výrazné imunogenosti, zájem o atenuované replikující se viry jako potenciální vektory proti mnoha infekčním chorobám a nádorům. (viz kapitola 2.1.3 Zlepšení imunizačních vlastností VACV)

Podle současné úrovně znalostí by účinná nádorová vakcína měla kromě navození silné specifické cytotoxické odpovědi také působit proti imunosupresivním mechanismům

vytvořeným nádorem. Ty jsou podrobněji popsány společně s imunitními adjuvans použitými k jejich potlačení v kapitole 2.1.2.2 Strategie vedoucí k zlepšení protinádorového účinku při imunizaci VACV.

### 2.1.1 Virus vakcínie

Virus vakcínie patří do velké čeledi DNA virů Poxviridae infikující obratlovce i bezobratlé. Jednotlivé poxviry vykazují následující společné vlastnosti:

- replikační cyklus probíhá v cytoplazmě;
- tvoří velký komplexní virion s řadou enzymů pro syntézu mRNA;
- genom je představován jednou molekulou dsDNA, která je na koncích kovalentně uzavřená;
- velikostí genomu a virových částic patří k největším virům.

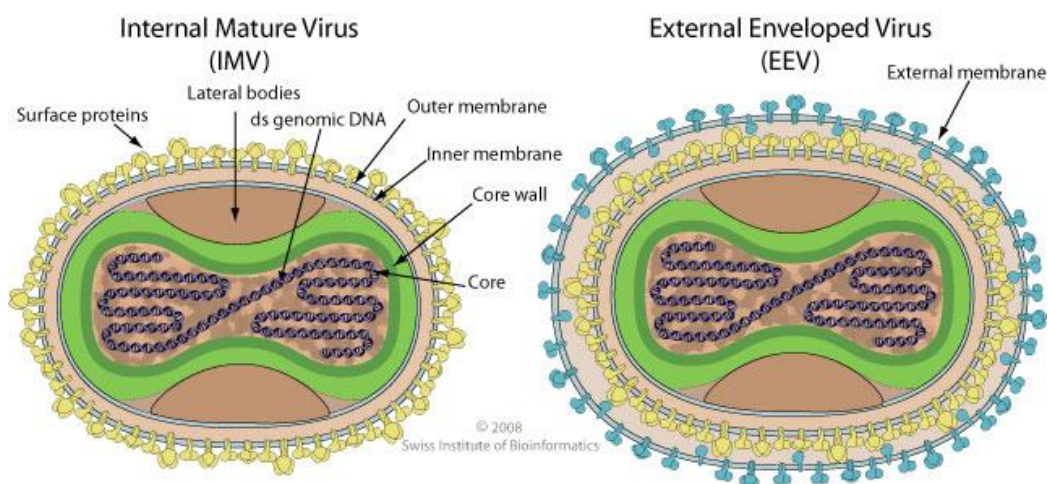
Vztahy mezi poxviry byly v minulosti zjišťovány imunologicky a analýzou proteinů. V současnosti jsou ověřovány fyzickým mapováním a sekvenací. Poxviry jsou členěny podle hostitele na Chordopoxvirinae infikující obratlovce a Entemopoxvirinae infikující hmyz. Chordopoxvirinae jsou dále členěny na Orthopoxviry, Parapoxviry, Avipoxviry, Capripoxviry, Leporipoxviry a Suipoxviry. Entemopoxvirinae se dělí na skupiny A, B.

#### 2.1.1.1 Struktura virionu

V průběhu replikačního cyklu VACV se tvoří dva různé typy virionů, intracelulární zralý virus (IMV) a extracelulární obalený virus (EEV). IMV má cihlovitý nebo oválný tvar velikosti 300-400 nm na 260-270 nm, z buňky se uvolňuje po její lýze. Při zobrazení pomocí elektronového mikroskopu lze rozeznat jedinou vnější membránu, dvě laterální tělíška a konkávní core s nukleoproteinem. Tyto struktury jsou v případě extracelulární formy viru obaleny druhou membránou, která obsahuje osm proteinů, z nichž 7 je glykosylováno. EEV je z buňky exportován před její smrtí. Tento virion se, pokud je zachycen na povrchu buněk, nazývá s buňkou asociovaný obalený virus (CEV), a pokud je uvolněn z povrchu buňky, extracelulární obalený virus (EEV). V membránách IMV a EEV se nacházejí různé virové proteiny, proto jsou strukturně, antigenně a funkčně odlišné. CEV a EEV formy jsou důležité pro šíření virů (Roberts, 2008). EEV zprostředkovává rozsáhlejší šíření *in vitro* a pravděpodobně také v hostiteli (Payne, 1985). Ačkoli několik IMV proteinů, zejména A27 a H3, představuje cíle pro protilátky (Putz, 2006), jediný EEV protein, který vyvolává neutralizační protilátky, je B5 (Putz, 2006). Rozdíly mezi IMV a

EEV ovlivňují také adsorpci viru a vstup a výstup z buněk (Roberts, 2008).

Šíření VACV *in vivo* je převážně zprostředkované EEV. To je dokumentováno několika pozorováními. Za prvé, protilátky, které neutralizují EEV jsou účinnější při poskytování protekce proti orthopoxvirům (OPV), než protilátky, které neutralizují IMV, přestože obě hrají roli a dohromady jsou mnohem účinnější než samotné (Boulter & Appleyard, 1973). Za druhé, EEV se zdá být dobře přizpůsoben k šíření infekce mimo buňku, protože je poměrně odolný vůči neutralizaci protilátkami (Law & Smith, 2001) a je také odolný vůči komplementu (Vanderplasschen et al., 1998). Naproti tomu je IMV snadno neutralizovaný protilátkou a může být zničen komplementem i bez specifické protilátky. Za třetí jsou kmeny viru, které produkují pouze IMV avirulentní a nemohou se šířit *in vivo* (Smith et al., 2002a). Konečně byla zjištěna korelace mezi virulencí kmenů různých VACV v myším modelu a jejich schopností produkovat EEV, ačkoli tato korelace není absolutní a kmen WR je výjimkou se svou virulencí u myši přes nízkou produkci EEV (Payne, 1980). Šíření infekce v těle tedy může být zprostředkováno volnými nebo s buňkou asociovanými viriony (Smith et al., 2003).



Obr. 1 Struktura virionu VACV (ViralZone: [www.expasy.org/viralzone](http://www.expasy.org/viralzone), Swiss Institute of Bioinformatics)

### 2.1.1.2 Genom (imunomodulátory)

Genom viru vakcínie je tvořen lineární dvouvláknovou DNA o velikosti přibližně 190 kbp. Obsahuje 150-200 genů. Lineární DNA je na koncích kovalentně spojena pomocí terminálních vláseček. Tyto jsou bohaté na AT páry a nejsou schopny kompletního párování.

Koncové části DNA jsou tvořeny terminálními invertovanými repeticemi (ITRs), které jsou identické, ale vzájemně opačně orientované. U různých virů jsou variabilní délky a obsahují velké množství tandemových repetic. V této oblasti se nacházejí geny, které jsou neesenciální pro virovou replikaci a zastávají funkci regulátorů hostitelského spektra nebo imunomodulátorů.

Mezi další charakteristické vlastnosti genomu dále patří neschopnost separace vláken, rychlá renaturace, existence ve dvou izomerních formách, přítomnost většiny esenciálních genů v centrální oblasti, nepřítomnost intronů, krátké regulační oblasti, velká hustota genů, bez velkého množství překrývajících se ORF a transkripce probíhající z obou vláken.

Pro pojmenování ORF se používá kombinace:

- písmene, které označuje fragment vzniklý štěpením enzymem Hind III, kde se ORF nachází
- čísla, které určuje pořadí ORF v rámci fragmentu
- písmene L nebo R, které charakterizuje směr transkripce

Názvy proteinů se shodují s názvy ORF bez označení směru transkripce.

### **2.1.1.3 Replikační cyklus**

#### ***Vstup viru do buňky***

Poxviry IMV a EEV nesdílejí společné virové epitopy a k vazbě na povrch buněk používají různé vazebné faktory (Vanderplassen, 1997). Bylo zjištěno, že IMV se váže prostřednictvím interakce proteinů H3, A27 nebo D8 s glykosoaminoglykany (GAG) (Chung et al., 1998; Hsiao, 1999; Lin et al., 2000) nebo interakcí p4c s lamininy (Chiu et al., 2007). Pro volné EEV nebyly objeveny žádné vazebné faktory (Schmidt et al., 2012).

Po navázání může virus do buňky vstoupit dvěma cestami. První, jednodušší cestou je na pH nezávislá fúze membrány IMV s plazmatickou membránou umožňující vstup core do cytoplazmy (Carter et al., 2005). Druhou cestou je endocytóza IMV, po níž následuje fúze virové a vezikulární membrány (Townsend et al., 2006). Poměrně nedávno bylo prokázáno, že hlavním vstupním mechanismem VACV IMV a EEV v HeLa buňkách a jiných typech buněk je endocytóza (Mercer & Helenius, 2008; Huang, 2008; Mercer et al., 2010; Sandgren, 2010).

Přestože jsou do značné míry závislé na stejné buněčné mašinérii, liší se vstup IMV a EEV s ohledem na mechanismy aktivující macropinocytózu a fúze membrán. Zatímco

EEV se musí zbavit vnější membrány, aby se obnažil fúzní komplex, fúze membrán u IMV vyžaduje inaktivaci inhibičních proteinů fúze, které chybí u EEV. Interakce s buněčnými receptory podporuje následující kroky vstupu a určuje, jestli částice viru buď fúzují přímo s plazmatickou membránou nebo spouštějí endocytickou internalizaci (Schmidt et al., 2012). Fúze s plazmatickou membránou je zprostředkována takzvanými entry/fusion komplexy (EFC), což jsou velké makromolekulární shluky proteinů membrán IMV nebo IMV- podobných partikulí, které vznikají z EEV po rozpadu vnější membrány (Senkevich et al., 2005). EFC se skládá z osmi transmembránových proteinů: A16, A21, A28, G3, G9, H2, J5 a L5 (Schmidt et al., 2012) a je spojen se čtyřmi dalšími proteiny virové membrány: I2, F9, L1 a O3 (Schmidt et al., 2012). Přesná architektura EFC a molekulární detaily fúzní reakce nejsou známy.

Nezávisle na spouštěcím mechanismu, fúze EFC virových membrán s membránami makropinosomu uvolňuje virová core do cytosolu buněk hostitele, čímž je dokončen vstup jak IMV, tak EEV. Uvolněná core jsou "aktivována": podstupují morfologické změny (DALES, 1963) a začínají přepisovat časné geny umožňující následné rozvolnění core, jehož výsledkem je uvolnění DNA a replikace viru (Moss B, 2007).

### ***Replikace genomu***

V cytoplazmě se virové core naváže na mikrotubuly, pomocí nichž je transportováno hlouběji do cytoplazmy (Carter et al., 2003). Core obsahuje virové strukturální proteiny, kompaktní virovou DNA, transkripční enzymy a transkripční faktory nezbytné pro expresi časných genů (Condit et al., 2006).

Během transportu dochází k iniciaci transkripce bezprostředně časných a časných genů virovou RNA polymerázou. Tyto geny slouží k rozvolnění core, replikaci virové DNA, ovlivnění proteosyntetického aparátu, modifikaci hostitelské buňky ve prospěch viru a pomoci úniku viru přirozené imunitní odpověď hostitele (Assarsson et al., 2008).

Rozvolnění jádra a virové DNA probíhá v blízkosti membrán endoplazmatického retikula (ER) v okolí jádra (Welsch et al., 2003). Replikace a sestavování virionů poté probíhá v místech cytoplazmy, které jsou obklopeny membránami drsného endoplazmatického retikula (RER) v takzvaných mini jádrech (Tolonen et al., 2001), které se také nazývají virové továrny (Iyer et al., 2006).

Replikace virové DNA začíná přibližně 2 až 5 hodin po infekci. Poxviry vykazují přechodně regulovaný program exprese genů. Exprese časných genů, které představují téměř polovinu virového genomu a kódují intermediální transkripční faktory, transkripční



faktory replikace DNA a velký počet imunomodulátorů (Moss, 2007), spustí expresi intermediálních genů kódujících transkripční faktory pozdních genů (Broyles, 2003). Produkty pozdních genů jsou především strukturální bílkoviny potřebné pro tvorbu virionů, stejně jako enzymy a transkripční faktory časných genů určené k inkorporaci do nových virionů a použitých pro časnou genovou expresi v průběhu další infekce (Broyles & Fesler, 1990; Broyles & Moss, 1988).

Sestavování virionu zahrnuje produkty více než 80 genů viru (Condit et al., 2006). V důsledku výhradně cytoplazmatického životního cyklu VACV kódují své vlastní enzymy a proteiny potřebné pro genovou transkripci, replikaci genomu, tvorbu virionu a morfogenezi a z větší části, není závislá na proteinech hostitelské buňky. Kromě toho infekce VACV vyvolává rychlé a masivní vypnutí exprese genů hostitele, které působí na několika úrovních (Boyle K, 2009; Boyle et al., 2007).

Způsob replikace genomu poxvirů není detailně znám. Pracovní model replikace (Boyle K, 2009; Moss B, 2006) předpokládá, že replikace je zahájena zavedením nicku poblíž jednoho z konců, který pak poskytuje primerový konec, který může být prodlužován procesivní virovou polymerázou. Replikace terminální vlásky umožňuje polymeráze kopírovat obě vlákna jako vedoucí řetězce. Takovýto model replikace by vedl ke vzniku „tail-to-tail“ dimerů a konkatemerů vyššího řádu, které byly pozorovány *in vivo* (Boyle K, 2009; Moyer & Graves, 1981).

Organizace virové továrny VACV se mění opět v pozdní fázi infekce. Místa replikace jsou zcela obklopena membránami RER, dokud není zahájeno sestavování viru. Replikace VACV indukuje expresi pozdních genů, které jsou potřebné pro sestavení virionu. V tom okamžiku se zcela mění organizace virových továren.

### ***Tvorba virionů***

5-6 h po infekci se v DNA oblastech virových továren oddělují membrány RER od míst replikace a jsou zde pozorovány malé membrány nazývané podle svého tvaru membránové půlměsíce nebo také nezralé viriony (IV) (Novoa et al., 2005).

Na rozdíl od většiny ostatních obalených virů je virus vakcinie nezískává pučením do organel nebo přes plasmatické membrány, ale vyvíjejí se uvnitř cytoplasmy, jako malé kusy membrány (Unger et al., 2013) tvořené jedinou lipidovou dvojrůstvou s externí voštinovitou (šestihrannou) mřížkou, sestávající z trimerů D13 proteinu (Heuser, 2005; Hollinshead et al., 1999; Szajner, 2005), které rostou do charakteristických půlměsíců

(Maruri-Avidal et al., 2013; Bisht et al., 2009a). Jak se pŮlměsíce zvětšují, aby tvořily sférické nezralé viriony (IV), elektronopticky hustý materiál obsahující proteiny core a DNA je jimi pohlcen (DALES & SIMINOVITCH, 1961; Morgan, 1976). Vnější strana vyvíjející se membrány je podporována a formována mříží tvořenou proteiny D13. Byly identifikovány tři hlavní složky srpkovitých membrán: dva transmembránové proteiny A17 a A14 a protein lešení D13.

Následně IV prochází dramatickou změnou týkající se ztráty D13 lešení po zpracování membránového proteinu A17 (Bisht et al., 2009b), štěpení hlavních proteinů core (Moss & Rosenblum, 1973) a vzniku intramolekulárních disulfidových vazeb v rámci membránových vstupních proteinů (Senkevich, 2005; Senkevich et al., 2002), což kulminuje vytvořením infekčního zralého virionu tvaru cihly, což je IMV (Condit et al., 2006). Pro většinu virionů končí morfogeneze v této chvíli a IMV jsou uvolňovány po lýze buňky. Zbývající viriony jsou transportovány z virových továren mikrotubuly (Ward, 2005; Sanderson et al., 2000) do míst časných endosómů (Tooze et al., 1993) a trans-Golgi cisteren (Hiller & Weber, 1985; Schmelz et al., 1994), kde jsou obaleny dvojitou buněčnou membránou. Vzniklý virus se nazývá intracelulární obalený virus (IEV) (Moss, 2006).

Mechanismus tvorby IEV není zcela objasněn, ale mezi potřebné virové proteiny patří A27, B5 a F13 (Condit et al., 2006; Smith et al., 2002b). B5 a F13 jsou dva z nejméně devíti virových proteinů, které jsou začleněny do nebo spojeny s obalujícími membránami. IEV jsou přepravovány mikrotubuly na periferii buňky (Geada et al., 2001; Hollinshead et al., 2001; Ward & Moss, 2001; Rietdorf et al., 2001). Při jejich pohybu byl prokázán vliv proteinů F12 a A36 (Van et al., 2002; Ward & Moss, 2001; Rietdorf et al., 2001). Funkcí A36 je nábor a vazba kinesinu-1 na IEV. A přestože A36 spolupracuje s kinesinem-1, není nezbytný pro dopravu IEV k povrchu buňky, zatímco F12 je.

Na periferii buňky IEV partikule musí překonat vrstvy kortikálního aktinu, aby dosáhly plazmatické membrány. Bylo zjištěno, že VACV za tímto účelem moduluje dynamiku periferních microtubulů a kortikální aktin pomocí F11 zprostředkované inhibice RhoA signalizace (Arakawa et al., 2007a; Arakawa et al., 2007b). Jakmile IEV jednou dosáhne plazmatické membrány, vnější membrána IEV fúzuje s plazmatickou membránou, aby se CEV vystavil na povrchu buňky. Během tohoto procesu začíná být bílkovina A36 lokalizována pod CEV, s většinou polypeptidového řetězce na cytosolické straně plazmatické membrány (Van et al., 2002). Zde může být fosforylována (Wolffe et al., 2001) src kinázami, aby došlo k disociaci virionu od kinesinu-1 (Newsome, 2004) a zahájena signalizační kaskáda, která vede k polymeraci aktinu pod CEV (Frischknecht et

al., 1999). Tyto nukleace aktinu tvoří tvorbou aktinových vláken výběžky, které umožní CEV infikovat sousední buňky.

Exocytóza IEV částice není jediný způsob, jakým může být EEV tvořen. Bylo také zdokumentováno pučení IMV přes plasmatickou membránu VACV kmenu IHD-W z FL buněk (Tsutsui, 1983) a kmenů WR, IHD-J a MVA z HeLa buněk (Meiser et al., 2003). V tkáňové kultuře pod tekutým médiem mohou uvolněné EEV infikovat buď sousední buňky nebo se šířit jednosměrným způsobem na distální buňky (Law et al., 2002) a tak tvořit charakteristické plaky ve tvaru komet, jejichž ohony jsou tvořeny sekundárními plakami. Konečně VACV také zvyšuje pohyblivost buňky, což by také mohlo pomoci šíření virové infekce (Sanderson et al., 1998).

#### **2.1.1.4 Modulace aktivity chemokinů VACV**

Poxviry, stejně jako jiné velké DNA viry, vyvinuly četné strategie umožňující modulaci imunitní odpovědi hostitele. Exprimují bílkoviny, které jsou neesenciální pro replikaci viru a současně atakují různé komponenty jak přirozené imunity hrající významnou roli v časných fázích virové infekce, např. rozeznání viru pomocí Toll-like receptorů, interferonový systém, NK buňky a makrofágy, tak i různé složky specifické imunitní T a B buněčné odpovědi, která hraje často klíčovou roli při eliminaci patogenů.

Předpokládá se, že mnoho z genů, které kódují proteiny určující hostitelské spektrum viru a modulují imunitní odpověď (Moss & Shisler, 2001; Werden et al., 2008), bylo převzato virem z imunitního systému hostitele, nicméně některé nesdílejí podobnost s žádným hostitelským genem. Geny pro imunomodulátory jsou tak rozdílné, že neexistuje jediný ortholog, který by byl společný pro všechny poxviry. To je projevem významných rozdílů v patogenezí a hostitelském spektru mezi jednotlivými viry. Např. zatímco orthopoxviry jako je Cowpox virus a Vaccinia virus produkují různé homology receptorů pro tumor necrosis factor (TNF) a interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), skupiny capripox virus, leporipox virus, suipox virus a jatapox virus srovnatelné orthology tvoří (Barry & McFadden, 1997; Moss & Shisler, 2001). Místo toho syntetizují podobné proteiny, které pravděpodobně inhibují prezentaci antigenů pomocí MHC (Yewdell & Hill, 2002).

Podle funkce mohou být tyto poxvirové imunomodulátory děleny do tří skupin (Nash et al., 1999).

- intracelulární inhibitory vnitrobuněčných signálních drah přirozené protivirové imunity;

- intracelulární imunomodulátory snižující expresi receptorů umožňující rozeznání virových antigenů na povrchu infikovaných buněk nebo blokující prezentaci virových antigenů imunitním buňkám (Orange et al., 2002; Yewdell & Hill, 2002)
- extracelulární imunomodulátory nazývané virokiny (napodobující různé molekuly imunitního systému) a viroreceptory (podobné extracelulárním doménám buněčných receptorů), které blokují složky komplementu, interferony, prozánětlivé cytokiny, chemokiny a růstové faktory (Johnston & McFadden, 2003)

Klíčovým procesem zapojeným do reakce hostitele proti infekci je migrace leukocytů do oblastí poranění a infekce během zánětlivého procesu.

### ***Chemokiny***

Chemokiny a chemokinové receptory, které jsou schopné mobilizovat a aktivovat různé třídy leukocytů (Mahalingam & Karupiah, 2000), hrají klíčovou roli v průběhu imunitní odpovědi proti virům (Cook, 1996). Chemokiny nebo také chemotaktické cytokiny představují skupinu strukturně podobných proteinů, které lze nalézt u obratlovců, bakterií i virů. V současnosti je známo přes 50 genů pro chemokiny u lidí, které se vážou na přibližně 25 chemokinových receptorů, které patří do rodiny receptorů se sedmi transmembránovými doménami a asociací s G proteinem.

Přestože byly chemokiny původně studovány jako mediátory migrace leukocytů v průběhu imunitního dohledu a zánětu, je v současnosti známo, že zastávají různé funkce v průběhu ne jen fyziologických procesů jako jsou migrace a zranění leukocytů, vývoj a oprava tkání, hematopoéza a angiogeneze, ale i patologických procesů zahrnujících imunitní reakce v průběhu mikrobiální infekce, zánětlivá a autoimunitní onemocnění, tumorigenezi a metastazování nádorů (Blanchet et al., 2012).

Chemokiny jsou malé bazické proteiny tvořené 70 až 125 aminokyselinami s molekulovou hmotností 6-14 kD. Jsou klasifikovány podle uspořádání cysteinových zbytků na N koncové oblasti molekuly na XC, CC, CXC a CX3C chemokiny, kdy C představuje počet cysteinových zbytků tvořících disulfidické můstky a X počet aminokyselin vyskytujících se mezi prvními dvěma cysteiny. CXC skupina se někdy dále dělí na ELR<sup>+</sup> a ELR<sup>-</sup> typy podle přítomnosti tripletu aminokyselin Glu-Leu-Arg, který v primární aminokyselinové sekvenci předchází první cysteinový zbytek. Zatímco CXC chemokiny s ELR<sup>+</sup> mají angiogenní funkci, ELR<sup>-</sup> chemokiny mají angiostatické vlastnosti.

Chemokiny vykonávají svou biologickou funkci vazbou na specifické receptory na povrchu cílových buněk dělí se do skupin CXCR, CCR, XCR a CX3CR podle

chemokinů, které vážou. Interakce chemokinů s receptory se liší svou selektivitou. Některé chemokiny se váží pouze na jeden receptor (a naopak), ale existuje i redundance vzhledem ke skutečnosti, že některé chemokiny se vážou na více než jeden receptor a mnoho receptorů rozeznává více než jeden chemokin. Také existují takzvané proteiny podobné chemokinovým receptorům Duffy antigen receptor for chemokines (DARC) a D6, které vážou mnoho CXC a CC chemokinů se stejnou afinitou.

Kromě strukturní klasifikace mohou být chemokiny také děleny podle způsobu exprese a funkční aktivity na prozánětlivé, homeostatické a se smíšenou funkcí (Blanchet et al., 2012). Prozánětlivé, inducibilní chemokiny jsou tvořeny působením zánětlivých stimulů, ovlivňují atrahování leukocytů do místa infekce, zánětu, poškození tkání a nádorů a napomáhají koordinaci přirozené a adaptivní imunity. Homeostatické chemokiny jsou produkovány konstitutivně v místech bez přítomnosti zánětu a řídí homeostatickou migraci lymfocytů a DB za fyziologických podmínek při imunitním dohledu periferních tkání a při organogenezi lymfatické tkáně. Dále pak řídí migraci leukocytů v průběhu hematopoézy do kostní dřeně a thymu a v průběhu iniciace adaptivní imunitní odpovědi do sleziny, lymfatických uzlin a Peyerových plaků. Některé chemokiny mají vlastnosti obou skupin a proto jsou nazývány chemokiny se smíšenou funkcí.

Přestože většina chemokinů je přítomna v solubilní formě a některé mohou být asociovány glukosaminoglykany na buněčných površích, chemokiny CX3CL1 (fractalkine) a CXCL16 jsou k buňkám, které je produkují, vázány mucinovou stopkou.

Solubilní chemokiny nebo gradienty chemokinů navázaných na extracelulární matrix řídí migraci leukocytů, jejich lokalizaci v tkáních a systém recirkulace indukci jejich úniku z cév i zpětného návratu. Mohou také řídit migraci jiných typů buněk, jako jsou kmenové a endoteliální buňky.

Chemokiny obecně atrahují různé třídy leukocytů. CC chemokiny atrahují jednu nebo více tříd mononukleárů, eozinofilů a basofilů. ELR+ CXC atrahují neutrofile, ELR- CXC lymfocyty, XC chemokin (lymphotactin) T buňky a CX3CL1 (fractalkine) působí na T buňky, NK buňky a monocyty.

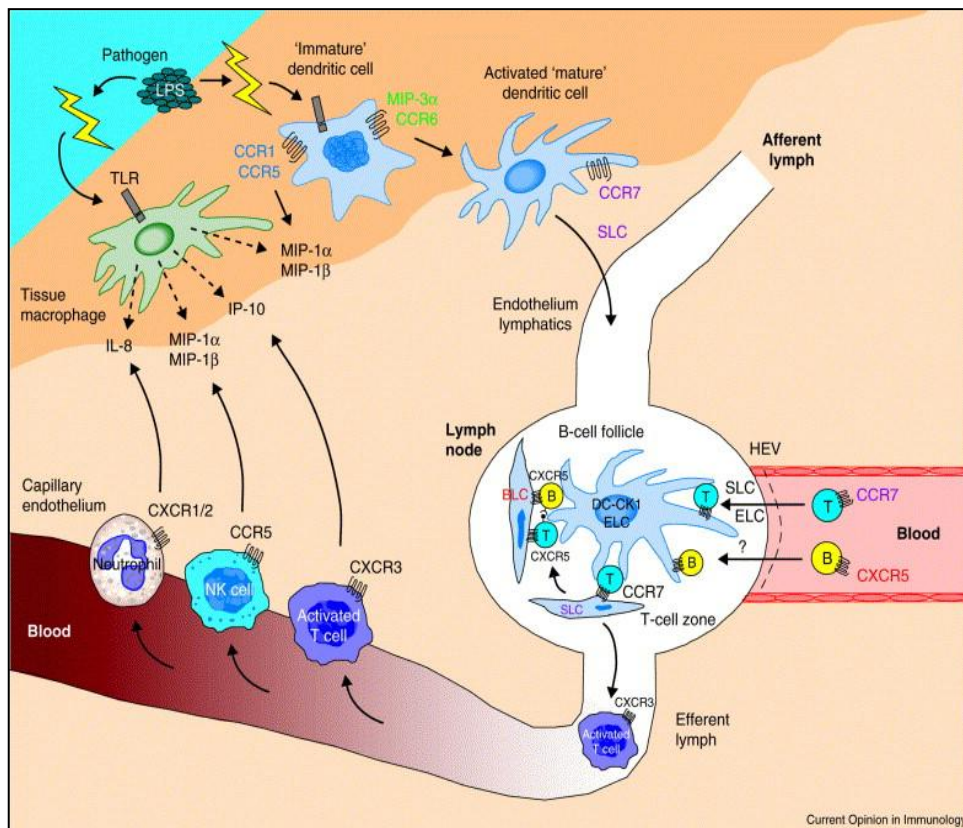
Chemokiny hrají klíčové role v průběhu přirozené a adaptivní imunitní odpovědi. Zánětlivé chemokiny jsou secernovány brzy po začátku infekce během aktivace přirozené imunity DB, makrofágy,  $\gamma\delta$ T epitelovými, parenchymálními a stromálními buňkami v místě vstupu patogenu (Luster, 2002; Moser et al., 2004; Esche et al., 2005; Oo & Adams, 2010). Rozhodující pro iniciaci přirozené imunity je detekce komponent patogenu pronikajícího do organismu, což mohou být produkty mikrobiálního metabolismu

zahrnující LPS, lipoproteiny, peptidoglykan (PGN) a nemethylovanou DNA obsahující CpG motivy (CpG-DNA) nebo také endogenní molekuly asociované s infekcí nebo zraněním, jako jsou fibrinogen, elastáza a defensiny. Tyto takzvané patogen-associated molecular patterns (PAMPs) jsou rozeznávány receptory buněk přirozené imunity takzvanými pattern-recognition receptors (PRR) jako jsou Toll-like receptory (TLR) a nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) 1 a 2 výše zmíněnými buňkami v místě vstupu patogenu, které jsou PRR dobře vybaveny společně s fagocytickými receptory pro pohlcování bakterií a opzonizovaných partikulí. Exprese chemokinů je také stimulována hlavními zánětlivými a imunomodulačními cytokiny indukovanými poraněním nebo infekcí, jako jsou IL-1, TNF- $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 a IL-17.

Aktivací TLR v profesionálních fagocytech (DB, makrofágy) dochází k translokaci NF- $\kappa$ B, hlavního transkripčního faktoru, který řídí časné fáze imunitní odpovědi včetně indukce exprese chemokinů. V makrofázích a dendritických buňkách tvořeny IL-8 (CXCL8), MIP-1 $\alpha$  (CCL3), MIP-1 $\beta$  (CCL4), RANTES (CCL5) a IP-10 (CXCL10). V místě vstupu patogenu tedy dojde k vytvoření zánětlivého prostředí s množstvím zánětlivých chemokinů, což vede k atrahování první vlny efektorových buněk přirozené imunity jako jsou neutrofilů, monocytů, NK buňky a NKT buňky, a také nezralých dendritických buněk, které tvoří spojení mezi přirozenou a adaptivní imunitou (Oo & Adams, 2010).

Patogen může určit charakter imunitní odpovědi prostřednictvím aktivace různých TLR a následné exprese různých chemokinů. Časná produkce chemokinů je rozhodující pro formování charakteru imunitní odpovědi, která následovně vzniká v tkáních. Např. produkce IL-8 navodí atrahování neutrofilů, MIP-1 $\alpha$  a MIP-1 $\beta$  indukují influx NK buněk, makrofágů a nezralých DB a IP-10 navádí aktivované T buňky zpátky do tkání.

Protektivní imunitní odpověď je závislá na koordinované a správně načasované interakci různých buněk v různých mikroprostředích. V průběhu iniciace adaptivní imunitní odpovědi hrají chemokiny roli při určování kvality odpovědi a rozhodování o její velikosti a době trvání. Zánětlivé chemokiny rozšiřují škálu buněk atrahovaných z krevního oběhu a řídí spolupráci mezi nimi. Lze říci, že obecně napomáhají spolupráci v imunitním systému podporováním interakcí mezi jinak řídicí se vyskytujícími buňkami (Bromley et al., 2008).



**Obr. 2 Chemokiny řídí migraci DB, T lymfocytů a B lymfocytů v průběhu indukce imunitní odpovědi (Luster, 2002).**

Nezralé dendritické buňky jsou přitahovány do tohoto místa vstupu patogenu prostřednictvím aktivace receptorů pro zánětlivé chemokiny, jako jsou CCR1, CCR5 a CCR6, které konstitutivně exprimují, aby zde účinně vychytávaly antigeny. Současně začnou být DB vystavovány stimulům, které navozují jejich zrání. Představují je zánětlivé cytokiny, jako  $TNF-\alpha$ , IL-1 a produkty patogenů zahrnující LPS nebo dsRNA. Jejich vlivem DB diferencují na buňky, které mohou aktivovat naivní T lymfocyty. Klíčovým rysem procesu zrání DB je změna jejich migračních schopností. Zrající DB putují ze zánětlivé tkáně aferentními lymfatickými cévami do drénujících lymfatických uzlin, kde se usídlí v T buněčných oblastech.

Během tohoto procesu, dendritická buňka snižuje expresi receptorů CCR1, CCR5 a CCR6 a zvyšuje expresi CCR7, což způsobuje její migraci do aferentního lymfatického systému. Ligand CCR7 SLC, který je exprimován v endotelu aferentního lymfatického systému, hraje důležitou roli v řízení migrace zralých dendritických buněk obsahujících antigen.

Chemokiny se také podílejí na přivádění naivních T a B buněk z krve do lymfatických uzlin a do kontaktu s aktivovanými dendritickými buňkami, což spustí jejich

proliferaci a diferenciaci.

Zatímco některé aktivované T buňky snižují expresi CCR7 a zvyšují expresi CXCR5 a tak jsou nasměrovány do folikulu, kde poskytnou pomoc B buňkám, jiné aktivované T buňky zvýší expresi CXCR3 a jsou atrahovány do zanícené tkáně. T buňky, které jsou aktivovány v regionálních lymfatických uzlinách, po setkání s dendritickými buňkami prezentujícími antigen, se následně vrátí do místa zánětu detekcí chemokinových gradientů, které se v těchto místech vytvořily. Tyto efektorové T buňky zde uplatňují své funkce přímo nebo atrahováním dalších buněk, jako jsou eosinofily, basofily a mastocyty (v případě odpovědi Th2 typu) nebo makrofágy a neutrofilů (v případě odpovědi Th1 typu) prostřednictvím sekrece zánětlivých chemokinů.

### ***Inhibice chemokinů virem vakcínie***

Za nepřímý důkaz významného postavení chemokinů lze považovat množství mechanismů, které viry používají k neutralizaci jejich působení (Smith et al., 1997c; Alcami et al., 1998a; Graham et al., 1997). Účinek chemokinů mohou VACV negativně ovlivňovat již prostřednictvím proteinů, které interferují s TLR signalizací, jako např. A46 a A52 (Bowie et al., 2000; Harte et al., 2003) vlivem proteinů, které inhibují významný transkripční faktor chemokinů NF- $\kappa$ B, jako jsou A52, B14, N1 a K7 (Perdiguerro & Esteban, 2009) nebo díky proteinům blokujícím aktivitu interferonů jako je např. B19, což je účinný IFN- $\alpha/\beta$  vazebný protein sekvencí Ak podobný buněčnému receptoru (Colamonici et al., 1995).

Ovšem mezi hlavní anti-chemokinové strategie, které uplatňují velké DNA viry herpesviry a poxviry, patří tvorba homologů chemokinů nebo chemokinových receptorů a sekrece virových chemokiny vázajících proteinů (vCKBPs) (Alcami, 2007).

Poxviry tvoří homology chemokinů s funkcí jak agonistů, podporujících migraci imunitních buněk do místa infekce a napomáhají tak šíření viru, tak antagonistů kompetitivně inhibujících vazbu chemokinů k jejich přirozeným receptorům (Lalani et al., 2000; Murphy, 2001). Jako příklad může být uveden protein zjištěný u viru molluscum contagiosum (MCV). Tento virus způsobuje benigní nádory kůže u imunokompetentních dětí a oportunní infekce u hostitelů s oslabenou imunitou. Analýza kompletní sekvence genomu lidského MCV odhalila kódující sekvenci proteinu 104-aminokyselinami (MC148R), která je strukturně podobná rodině CC chemokinů (Luttichau et al., 2001).

Homology chemokinových receptorů (vCkRs), kterými poxviry interferují s chemokiny, mohou fungovat jako antagonisté vázající a odstraňující chemokiny, nebo



jako agonisté, které jsou konstitutivně aktivní nebo inducibilně aktivovány chemokiny a navozují proliferaci a migraci infikovaných buněk (Murphy, 2001; Rosenkilde et al., 2001). Analýza dat získaných sekvenací odhalila přítomnost molekul podobných GPCR1 v capripox viru (Cao et al., 1995) a swinepox viru (Massung et al., 1993b).

Chemokin vazebné proteiny (CKBP) neutralizují aktivitu chemokinů jejich vazbou nebo blokují chemokinové gradienty vytvořené vazbou na GAG (Lalani et al., 2000; Murphy, 2001; Lalani & McFadden, 1997; Graham et al., 1997; Smith et al., 1997a; Alami et al., 1998b; Parry et al., 2000; van, Berkel, V et al., 2000). Tyto nejpozději objevené virové modulátory chemokinů nemají buněčné homology, jejich původ je neznámý a podle zdroje a sekvenční homologie jsou klasifikovány do čtyř podskupin.

Skupina vCkBP první třídy (vCkBP-I) je tvořena dvěma proteiny: M-T7 myxoma viru (MV) (váže IFN- $\gamma$  a CXCL8) a S-T7 Shope fibroma viru. MV způsobuje vysoce letální systémové onemocnění zvané myxomatóza u Evropských králíků (Fenner & CHAPPLE, 1965). M-T7 protein kódovaný MV je rozpustný homolog receptoru pro IFN- $\gamma$ , který vazbou s vysokou afinitou inhibuje protivirovou aktivitu IFN- $\gamma$  (Upton et al., 1992; Mossman et al., 1995). Ale na rozdíl od ostatních poxvirových homologů IFN- $\gamma$  R u M-T7 bylo jednoznačně prokázáno, že váže CXC, CC a XC chemokiny bez jakéhokoliv zjevného druhového omezení a následně mu bylo dáno druhé označení CKBP-I (Lalani & McFadden, 1997).

Bylo zjištěno, že vazba chemokinů s CKBP-I je interakcí s nízkou afinitou, která může být blokována heparinem, což naznačuje, že je interakce zprostředkována heparin vazebnou doménou chemokinů (Lalani & McFadden, 1997). Předpokládá se, že vazba heparin vazebných domén chemokinů prostřednictvím CKBP-I může narušit na GAG závislé povrchové buněčné gradienty tvořené chemokiny (Lalani & McFadden, 1997). *In vivo* důkazem svědčícím o tom, že haptotaktický gradient chemokinů může být v průběhu virové infekce narušen CKBP-I, je pozorování dramaticky vyšší migrace leukocytů do místa infekce králíků rekombinantním myxoma virem s přerušným CKBP genem (Mossman et al., 1996).

Mnoho poxvirů produkuje secernované CKBP, které vážou s vysokou afinitou mnoho CC chemokinů a kompetitivně tak inhibují vazbu CC chemokinů na jejich přirozené buněčné receptory (Graham et al., 1997; Smith et al., 1997b; Alami et al., 1998b). Členové této rodiny podobných proteinů jsou nazývány CKBP typu II (CKBP-II) nebo také virové inhibitory CC chemokinů (vCCI) nebo T1/35 kDa rodina CC-CKBP, což

odpovídá zařazení k T1 genům z leporipoxvirů (existuje např. S-T1 Shope fibroma viru, či M-T1 MV) a 35 kDa genům z orthopoxvirů (např. u vakcinia viru, cowpox viru, ectromelia viru, camelpox viru, rabbitpox viru a variola viru). Studie zabývající se vazbou a inhibicí chemokinů prostřednictvím CKBP-II prokázaly specifčnost pro CC chemokiny, ale ne pro XC, CXC a CX3C chemokiny (Graham et al., 1997; Smith et al., 1997a; Alcami et al., 1998a; Burns et al., 2002; Smith & Alcami, 2000).

Na rozdíl od buněčných receptorů chemokinů, které obvykle rozeznávají pouze omezené podskupiny chemokinů jsou tyto poxvirové CKBPs schopné silně interagovat ( $K_d=10^{-12}$ - $10^{-9}$ ) s mnoha CC chemokiny, a mohou účinně blokovat vazbu těchto chemokinů k jejich receptorům (Graham et al., 1997; Smith et al., 1997b; Alcami et al., 1998b; Smith & Alcami, 2000). Aminokyselinovou sekvencí se CKBP-II proteiny nepodobají známým chemokinovým receptorům, GPCR ani jiným savčím proteinům (Graham et al., 1997; Smith et al., 1997b; Alcami et al., 1998b; Smith & Alcami, 2000). Kinetickou analýzou vazby CKBP-II VACV (který je také známý jako VV-35 kDa, B29R nebo vCCI) s chemkinem MCP-1 se zjistilo, že vCCI má velmi příznivé kinetické parametry pro kompetitivní inhibici CC-chemokinů (Seet et al., 2001; Beck et al., 2001).

Funkční srovnání dvou orthopoxvirových CC CKBP, VV-CKBP-II proteinu, který je současně rabbitpoxvirovým 35 kDa proteinem (RPV-CKBP-II), s myxomavirovým (MV) CKBP-II (M-T1), prokázalo, že navzdory pouze 40 % identitě, mají tyto CKBP velmi podobnou schopnost *in vitro* potlačit signalizaci a chemotaxi indukovanou CC-chemokiny (Lalani et al., 1998). Vyřazení genu M-T1 myxoma viru nebo genu RPV-CKBP-II rabbitpox viru vedlo k zvýšení počáteční leukocytární infiltrace tkáně v místě virové infekce, ačkoli byl současně pozorován malý nebo nulový vliv na celkovou virulenci nebo letalitu delečních mutant (Graham et al., 1997; Lalani et al., 1999; Martinez-Pomares et al., 1995). Nicméně pozorování, že tyto poxvirové CKBP-II proteiny mohou *in vivo* významně inhibovat akumulaci leukocytů jak při virové infekci (Graham et al., 1997; Lalani & McFadden, 1999), tak v případě aplikace ve formě purifikovaného proteinu (Alcami et al., 1998b; Dabbagh et al., 2000) poukázalo na možnost použití těchto proteinů jako protizánětlivých léků.

Přítomnost jedinečných, konzervovaných sekvencí poxvirových CKBP-II proteinů a jejich schopnost interagovat s mnoha CC chemokiny různých druhů vzbudily zájem o definování strukturálního základu, pomocí něhož tato rodina proteinů široce rozeznává a inhibuje své ligandy. Rentgenová krystalografie struktury CKBP-II proteinu cowpox viru (CPV) potvrdila, že se jeho struktura doopravdy liší od jakýchkoli GPCR či známých

savcích receptorů, přestože má strukturální záhyb, který vzdáleně připomíná kolagen vazebnou doménu adhesinu bakterie *S. aureus* (Carfi et al., 1999).

Skupina CKBP-3 obsahuje pouze jediný protein M3 gammaherpesviru-68.

Nejnovější skupina CKBP-4 zahrnuje proteiny produkované  $\alpha$  herpes viry, jako je např. koňský herpes virus, bovinní herpes virus, herpes virus 1, apod.

#### **2.1.1.5 VACV CKBPII a jeho terapeutické využití**

Infekce tkáňové kultury buněk virem vakcinie vede k sekreci několika polypeptidů do média. Jako první identifikovali McCrae & Pennington (McCrae & Pennington, 1978) protein velikosti přibližně Mr 35 000 (35 K) který byl vylučován ve velkém množství v časných a pozdních fázích po infekci očkovacím kmenem viru vakcinie Evans. Skupina Dr. Patela poté zjistila, že je podobný protein také secernován po infekci kmenem Lister, ale ne kmeny Wyeth, či Tian Tan. Gen kódující vCCI protein kmenu Lister byl touto skupinou zmapován v oblastech invertovaných terminálních repetací genomu. Sekvence DNA této oblasti ukázala, že konce genu jsou velmi podobné dříve publikovaným sekvencím lemujícím gen WR, který kóduje protein přibližně velikosti 7500 (7.5K), který je zkrácenou formou proteinu vCCI kmenu Lister. Secernovaný protein vCCI kmenu Lister není nezbytný pro množení viru v tkáňové kultuře (Patel et al., 1990).

Funkce tohoto proteinu byla později objevena třemi laboratořemi. V první z nich byla testována pomocí povrchové plasmonové rezonance chemokin vazebná schopnost solubilních proteinů v supernatantu buněk infikovaných VACV a bylo zjištěno, že 35 kDa protein váže CC chemokiny (Smith et al., 1997a). V druhém případě byl protein identifikován jako vCKBP srovnáním s příbuzným proteinem (T1) Leporipoxviru, který má schopnost vázat CC chemokiny (Graham et al., 1997). Ve třetím případě byly v supernatantech VACV infikovaných buněk detekovány proteiny vázající chemokiny značené izotopy a poté byly zmapovány geny, které je kódovaly (Alcami et al., 1998a).

Tyto údaje ukázaly, že protein je secernován z infikovaných buněk během rané a pozdní fáze infekce a váže s vysokou afinitou široké spektrum CC chemokinů. Protein byl schopný vázat CC chemokiny v roztoku a zabránit jim v dosažení jejich přirozených receptorů na buňkách. Blokování vazby chemokinů na buňky tak zabránilo přenosu signálu a chemotaktické reakci. V *in vivo* modelu tento protein inhiboval eozinofilii vyvolanou podáním eotaxinu (Alcami et al., 1998b). Je zřejmé, že vCCI není potřebný pro replikaci viru v buněčné kultuře, protože ne všechny kmeny VACV jej exprimují (Alcami et al., 1998b) a odstranění kódujícího genu z VACV kmene Lister neinhibovalo replikaci viru

(Patel et al., 1990). Existují však důkazy, že tento protein hraje roli *in vivo*. Ve studii zkoumající virulenci virů vakcinie na myším modelu bylo při použití intranazální aplikace prokázáno, že virus upravený tak, aby exprimoval vCKBP, vykazoval při porovnání s kontrolním virem sníženou virulenci (Reading et al., 2003b). Exprese vCKBP způsobila oslabení viru, které se projevilo menší replikací viru, menším šířením a horším atrahováním zánětlivých buněk do plic. V tekutinách získaných bronchoalveolárním výplachem plic zvířat infikovaných virem, který exprimoval vCKBP, byly detekovány nižší hladiny CC chemokinů (MIP-1 $\alpha$ , eotaxinu a MCP-1) a nižší chemotaktická aktivita pro myší leukocyty *in vitro*. Tato pozorování svědčila o tom, že vCCI hraje důležitou roli při regulaci migrace leukocytů do plic v průběhu infekce VACV.

V současnosti se již ví, že vCCI představuje strategii úniku viru imunitě během časných stádií infekce, kdy váže s vysokou afinitou CC chemokiny, kompetitivně inhibuje jejich interakce s buněčnými receptory a redukuje tak iniciální influx leukocytů do místa zánětu. Není přitom esenciální pro růst v buněčné kultuře. Nesdílí sekvenční podobnost se známými buněčnými chemokinovými receptory. Může představovat virovou verzi dosud neobjeveného buněčného receptoru.

Z hlediska struktury sdílejí vCCI proteiny produkované různými poxviry 40-95%-ní sekvenční identitu aminokyselin (Carfi et al., 1999). Charakteristické je pro ně stejné množství a uspořádání cysteinů. Přes výraznou heterogenitu v sekvenci např. mezi vCCI z Leporipoxviru a vCCI z Orthopoxviru je jejich funkční aktivita stejná. Tato funkce je zajištěna konzervativními motivy v proteinu, které navozují vždy stejnou konformaci, což vytváří CC chemokin vazebnou aktivitu (Seet et al., 2001). Z chemického hlediska má molekula proteinu vCCI kompaktní globulární strukturu, která je tvořena dvěma paralelními  $\beta$ -listy, dvěma krátkými  $\alpha$ -helixy a několika kličkami, které spojují tyto sekundární strukturní elementy (Carfi et al., 1999).

Zajímavou otázkou je vliv struktury na vazbu vCCI k místu, kterým se chemokin váže k receptoru. Vazbu na chemokiny se sekvenční odlišností umožní jednak fyzikálně-chemické vlastnosti povrchu chemokinů, které jsou konzervovány přes aminokyselinové odlišnosti, a dále také flexibilita molekuly vCCI, která umožňuje mírně přizpůsobit své uspořádání různým ligandům (Beck et al., 2001).

Mechanismus účinku vCCI spočívá ve způsobu vazby na chemokin. Rozhodující je, na jakém místě chemokin se tento protein váže a jak to ovlivní další oblasti molekuly důležité pro funkci chemokin. vCCI protein může jednak bránit vazbě chemokinů na receptory asociované s G proteinem, čímž blokuje přenos signálu do cílové buňky. Rovněž

tak brání vazbě CC-chemokinů na glykosaminoglykany, což zabraňuje vazbě CCchemokinů na luminální povrch endotelií a vytvoření chemokinového gradientu v extracelulární matrix. Tím je blokována chemotaxe buněk (Beck et al., 2001).

Vazebný profil vCCI proteinu je charakterizován vysokou afinitou především následujících chemokinů (řazeno v sestupném pořadí dle afinity k receptoru): MIP-1 $\alpha$  (CCL3), Eotaxin (CCL11), RANTES (CCL5), MCP-1 (CCL2). Tyto chemokiny hrají významnou roli při navození časně protivirové imunity, protože atrahují a koordinují funkci makrofágů, monocytů, T lymfocytů. Dále ještě protein váže cca 26 CC chemokinů s nižší afinitou. Existují rovněž CC-chemokiny, které vCCI neváže, např. CCL22, CCL17 a CCL25 (Burns et al., 2002).

Protein vCCI je kódován genem C23L-B29R (u kmenu Lister), který se vyskytuje ve dvou kopiích v invertovaných terminálních repeticích, je exprimován pod kontrolou 7,5K promotoru před i po syntéze virové DNA. Tento protein je produkován kmeny Lister (C23L), Evans, Cowpox virus (Hu et al., 1994), Ectromelia virus, Sameopox virus, Rabbitpox virus (Martinez-Pomares et al., 1995), Racoonpox virus, Leporipox virus, Myxoma virus (N-T1) (Graham et al., 1997) a variola virem Somalia (Massung et al., 1993a). V kmenech Copenhagen (C23L-B29R) a Praha je zkrácen mutací s posunem čtecího rámce v signální sekvenci. Dále se vyskytuje pouze ve zkrácené formě 7,5kDa v kmenu WR. V kmenech Tian-Tian a Wyeth není vCCI přítomen. (Alcami et al., 1998a; Graham et al., 1997; Smith et al., 1997a; Lalani & McFadden, 1997).

Pomocí tvorby delečních mutant byla studována role vCCI v patogenezi infekce poxvirů. Delece genu pro vCCI u virů Rabbitpox vedla ke zvýšené virulenci viru po intranasální inokulaci subletálních dávek ( $10^3$  PFU) Balb/C myším a neměla vliv na virulenci po intradermální injekci králíkům (Martinez-Pomares et al., 1995).

Delece 43kDa M-T1 proteinu u Myxoma viru, který patří do stejné skupiny CKBP-2 inhibující CC chemokiny nevedla ke snížení letality myxomatózní infekce králíků. Došlo k výraznému influxu leukocytů, hlavně monocytů a makrofágů do místa infekce, který byl spojen s výraznějšími zánětlivými projevy bez snížení množství viru. Buňky, které infiltrovaly místo infekce, virus neodstranily. Předpokládá se vliv dalších imunomodulačních proteinů, které jejich funkci inhibovaly (Lalani et al., 1999).

Naopak exprese vCCI VACV kmenem WR (s delecí genu pro IFN- $\gamma$ R) vedla k jeho výrazné atenuaci při intranasální infekci myši, která byla spojená s menší infiltrací plic zánětlivými buňkami (Reading et al., 2003c).

Poxvirů mohou produkovat simultánně několik CKBP, které pravděpodobně

fungují různými mechanismy v různých fázích a na více místech virové infekce. Podle některých autorů (Ruiz-Arguello et al., 2008) by v budoucnosti měly být získávány atenuované viry delecí celých skupin imunomodulačních genů.

### ***Terapeutické využití vCCI***

Chemokiny regulují a někdy zhoršují průběh různých onemocnění, jako jsou roztroušená skleróza, cukrovka, artritida nebo zánět vyvolaný alergií (Rothenberg et al., 1999; Yuan et al., 2001; Pease & Williams, 2001; Nelson & Krensky, 2001; Gerard & Rollins, 2001). Předcházení náboru leukocytů do místa zánětu pomocí antagonistů chemokinů představuje intervenci, která by mohla předejít následnému poškození tkáně (Proudfoot et al., 2000). Nicméně ze složitosti a redundance chemokinů vyplývá, že specifické inhibitory chemokinů by mohly být méně účinné, než širokospektré inhibitory zánětlivých chemokinů (McFadden & Kelvin, 1997; Murphy, 2000).

Podle některých autorů (Ruiz-Arguello et al., 2008) se výzkum imunomodulačních virových molekul jako bioterapeutik podobá situaci s peptidy z hadího jedu. Jejich výzkum vedl k vývoji dvou významných farmaceutik používaných při léčbě kardiovaskulárních nemocí, a to inhibitorů angiotensin-konvertujícího enzymu a gpIIb/IIIa antagonistů. Podobně se předpokládá, že výzkum virových imunomodulátorů povede k vývoji nových farmaceutik na léčbu zánětlivých onemocnění.

Současné léky potlačující imunitu mají řadu nevýhod. Působí na celý organismus a jsou doprovázeny vedlejšími účinky. Naproti tomu virové imunomodulátory, které jsou exprimovány viry často pouze přechodně, v nízkých dávkách a v omezeném mikroprostředí infikované tkáně, kombinují vysokou účinnost s výraznou specifitou (Lucas & McFadden, 2004). CKBP-II byly testovány na zvířecích modelech jako potenciální protizánětlivé reagents pro léčbu onemocnění, v jejichž patogenezi hraje alergická nebo nadměrná zánětlivá reakce významnou roli.

Jedním z prvních příkladů prokazujících účinnost CKBP byla studie, v níž byl použit purifikovaný rekombinantní vCCI jako fúzní protein v rámci modelu alergického zánětu u morčete (Alcami et al., 1998b). Intradermální injekce vCCI účinně inhibovaly akumulace eozinofilů vyvolané eotaxinem, ale ne C5a nebo leukotrienem B4 (Alcami et al., 1998b). Poté byl vCCI protein cowpox viru fúzovaný s Fc oblastí lidského imunoglobulinu IgG1 použit jako léčebný prostředek k blokování zánětu dýchacích cest v myším modelu alergenem navozeného perivaskulárního a peribronchiálního zánětu (Dabbagh et al., 2000). Jedna dávka vCCI podaného intranazálně postačovala k zabránění

náboru leukocytů do plic bez současného ovlivnění zánětlivé reakce v pobřišnici. Důležité je, že pomocí vCCI nebyla ovlivněna systémová imunitní odpověď (Dabbagh et al., 2000). Tyto povzbudivé výsledky naznačily, že by proteiny vCCI mohly být vhodné k léčbě i dalších zánětlivých stavů zprostředkovaných CC chemokiny.

Protein vCCI byl dále testován ve formě proteinu exprimovaného adenovirovým vektorem (Ali et al., 2005) a ve formě proteinu exprimovaného lentivirovým vektorem (Bursill et al., 2009). V prvním případě byl adenovirus exprimující vCCI použit pro experimentální léčbu akcelerované aterosklerozy na myším modelu s delecí genu pro Apolipoprotein E. Po systémovém podání prostřednictvím jediné intravenózní injekce adenoviru s vCCI došlo k inhibici chemotaxe zprostředkované CCR5 v myší plazmě a dramatické redukci ztlustění cévní stěny, zmenšení buněčné proliferace, obsahu buněk hladkého svalstva a časnému náboru makrofágů do cévního štěpu postiženého akcelerovanou aterosklerózou (Ali et al., 2005).

Pro experimentální léčbu aterosklerozy na myším modelu s delecí genu pro Apolipoprotein E byla použita také exprese vCCI genu pomocí lentiviru (Bursill et al., 2009). Po intravenózním podání tohoto vektoru byla pozorována dlouhodobá exprese vCCI doprovázená inhibicí aktivity chemokinů a zmenšením velikosti aterosklerotických plátů.

Další verzí proteinu vCCI je MPV vCCI produkovaný Monkeypox virem (MPV). Jeho schopnost vázat CC chemokiny byla testována na modelu primátů - makaků (Jones et al., 2008). Na myším modelu bylo dále zjištěno, že podání purifikovaného rekombinantního MPV vCCI snížilo závažnost akutní fáze a zabránilo relapsu experimentální alergické encefalomyelitidy, která je zvířecím experimentálním modelem rozstroušené sklerozy u lidí (Jones et al., 2008).

Využití tohoto proteinu by mohlo být dále testováno pro experimentální léčbu chorob, v jejichž patogenezi hrají velkou roli chemokiny (např. revmatoidní artritida, Alzheimerova choroba, diabetes prvního typu, Parkinsonova nemoc, Gravesova nemoc, demence spojená s infekcí HIV).

### **2.1.2. Virus vakcinie jako vakcína proti nádorům**

VACV má pro užití jako terapeutická nádorová vakcína mnohé příznivé vlastnosti. Poxvirové vektory mají široké hostitelské spektrum, tvoří stabilní rekombinanty, dobře se replikují a vložené geny podléhají účinnému posttranslačnímu processingu. Velký genom poxvirů (přibližně 190 Kb u savčích poxvirů a 300 Kb u ptačích poxvirů) umožňuje odstranění nebo vložení velkých úseků DNA (více než 10 Kb), aniž by došlo ke ztrátě

infekčnosti (Pastoret & Vanderplasschen, 2003). Intracelulární exprese transgenů umožňuje prezentaci antigenů prostřednictvím MHCI a MHCII, což vede k aktivaci jak CD4+ , tak CD8+ T lymfocytů (Tsang et al., 1995). Humorální odpověď proti nádorovým antigenům může být také navozena. Virová replikace a transkripce poxvirových genů je omezena na cytoplazmu hostitelské buňky, což vylučuje riziko inzerční mutagenese (Roberts & Smith, 2008). VACV infikuje savčí buňky a exprimuje rekombinantní geny přibližně 7 dní, než je infikovaná buňka odstraněna imunitním systémem (Moss, 1996). Avipox viry exprimují transgeny v savčích buňkách 14 až 21 dní (Somogyi et al., 1993). Lyofilizované vakcíny založené na VACV jsou stabilní (COLLIER, 1955), levné, snadno se připravují a aplikují. V mnoha preklinických a klinických pokusech bylo prokázáno, že VACV exprimující antigeny asociované s nádory (TAA) jsou schopny navodit silnou imunitní odpověď.

#### **2.1.2.1 Požadavky na nádorovou vakcínu**

V minulosti bylo navrženo a klinicky testováno velké množství nádorových vakcín zacílených proti dobře charakterizovaným antigenům asociovaným s nádory. Hlavním cílem všech použitých strategií bylo vždy dosažení co největšího množství specifických CD8 T lymfocytů (Pandolfi et al., 2011). S přibývajícemi informacemi získanými v prováděných pokusech se začaly stále častěji objevovat fakta svědčící o tom, že pouze množství specifických lymfocytů není tou nejdůležitější podmínkou úspěšnosti nádorové imunoterapie. I při použití velmi účinných postupů, jako jsou např. adoptivní buněčné terapie, přes dosažení vysokého počtu cirkulujících protinádorových CD8+ T buněk, nebyly tyto buňky asi u poloviny pacientů schopné navodit klinickou regresi nádoru (Slingluff, Jr. & Speiser, 2005).

T buňky infiltrující nádor se běžně projevovaly jako anergické nebo špatně reagující na antigenní stimulaci, což vedlo k vnímání nádorového mikroprostředí jako nepřátelského vůči T buněčné odpovědi (Zippelius et al., 2004) a formování názoru, že efektivní imunitní terapie vyžaduje simultánní indukci T buněčných reakcí proti většímu množství antigenů a podporu aktivity T buněk v nádorové tkáni.

Bylo jasné, že imunitní kontrolu nádorů ovlivňují dosud neznámé faktory, které jsou postupně objasňovány a v současnosti představují hlavní cíle, na něž je zaměřen výzkum v nádorové imunoterapii (Slingluff, Jr. & Speiser, 2005).

Aby tedy byla terapeutická nádorová vakcína účinná, musí dosáhnout dvou cílů. Za první - musí stimulovat specifické imunitní odpovědi vůči příslušnému antigenu. Za druhé –



musí překonat imunosupresivní mechanismy vytvořené nádory (Bilusic & Madan, 2012). V současnosti je za nejdůležitější cíl považováno, spíše než množství specifických IFN- $\gamma$  produkujících protinádorových CD8+ T buněk, vytvoření vysoce kvalitních polyklonálních a polyfunkčních efektorových CD8+ T buněk s vysokou aviditou, které jsou schopné odhojit nádor, protože mají odpovídající migrační a efektorové funkce, které jim umožňují vyhledat a zničit nádorové buňky *in vivo* (Appay et al., 2008; Klechevsky et al., 2008) a také vytvoření dlouze žijících paměťových CD8 + T buněk schopných zabránit relapsu nádoru.

Kromě kvality CD8+ T buněk představuje další klíčový parametr účinnosti protinádorové imunity také kvalita CD4+ T buněk (Pardoll & Topalian, 1998). CD4+ T buňky působí prostřednictvím mechanismů, jako jsou: poskytování pomoci množení antigen specifickým CTL zaměřeným proti nádoru (Antony et al., 2005), aktivace makrofágů v místech nádoru (Corthay et al., 2005) a aktivní zabíjení nádorových buněk (Quezada et al., 2010). Kromě toho je všeobecně přijata teorie, že antigen specifické CD4+ T buňky jsou zásadní pro vznik dlouhodobé imunologické paměti zprostředkované CD8+ T buňkami (Sun & Bevan, 2003).

K dosažení hlavního cíle nádorových vakcín, tedy k vytvoření dlouhodobě funkčních CTL, které mohou působit cytotoxickými účinky na nádorové buňky, musí proběhnout čtyři následující kroky. Dendritické buňky (DB) musí zachytit *in vivo* antigeny z nádorových vakcín. Dále musí DB s nádorovými antigeny aktivovat CTL v lymfatických orgánech. Poté musí aktivované CTL vstoupit do nádorového mikroprostředí, kde je imunitní odpověď tlumena různými negativními signály a vykonávat zde své funkce. A konečně musí cytotoxické účinky navozené CTL překonat toleranci vyvolanou nádorovými buňkami. Každý z těchto jednotlivých kroků je složitým procesem, který může být blokován mnoha způsoby (Yong et al., 2012).

Dendritické buňky jsou rozhodující pro tvorbu imunitní odpovědi a jako takové představují cíle a vektory pro vakcinaci (Palucka et al., 2011). DB hrají klíčovou roli při přímém primingu T buněk nebo prostřednictvím krosprezentace, jak dokazují studie u myší (Banchereau & Steinman, 1998; Yewdell & Haeryfar, 2005). DB také regulují imunitní odpovědi. Pochopení jak DB vyvolávají, regulují a udržují T buňčnou imunitu (Steinman & Banchereau, 2007; Melief, 2008a) je zásadní pro navržení nových nádorových vakcín s lepší klinickou účinností.

Hlavním cílem při užití nádorových vakcín je produkce tzv. kompletně zralých dendritických buněk (DB jsou nejvíce specializované APB), protože jenom ty jsou schopné

stimulovat odpověď antigen specifických T buněk de novo (Vanderlocht et al., 2010). V klasických protokolech jsou DB aktivovány a pulsovány TAA nebo transfektovány RNA kódujícími nádorové epitopy a pak podány hostitelům s nádorem (Di et al., 2009; Chen et al., 2010).

Indukce antigen specifické imunitní odpovědi vyžaduje účinnou interakci mezi antigen specifickými T buňkami a profesionálními antigen prezentujícími buňkami (APC), včetně monocytů, makrofágů a dendritických buněk (Boudreau et al., 2011). DB patří mezi APC, které se jako nezralé DB vyskytují v periferních lymfatických a nelymfatických tkáních kde vychytávají a testují vzorky antigenů a signálů nebezpečí (ligandy pro TLR a jiné systémy PRRs). Signály z těchto receptorů, společně se zánětlivými cytokiny jako je TNF a interferony převádějí DB z klidového stavu (nezralého), v němž navozují toleranci T buněk do aktivovaného stavu (zralého), v němž jsou schopny poskytnout všechny potřebné signály, aby výsledkem prezentace antigenu byl priming T buněk (Nair, 1998; Su et al., 2002). V přítomnosti probíhajících zánětlivých imunitních odpovědi reagují nezralé DB na zánětlivé a patogenem navozené signály diferenciací do zralého stavu.

Během tohoto procesu podstoupí DB řadu morfologických, fenotypických a funkčních změn. Sníží se jejich příjem a processing antigenů, stanou se více pohyblivými a zvýší se jejich exprese CCR7, který řídí migraci z periferie do lymfatických orgánů. Zvýší se jejich exprese MHC I a II a kostimulačních molekul (CD40, CD80, CD83, CD86). Po doputování do sekundárních lymfatických orgánů secernují chemokiny, které atrahují do místního prostředí makrofágy, NK buňky, B buňky, další podskupiny DB a specifické podskupiny T buněk. Také vylučují cytokiny, které jsou rozhodující pro určení povahy následné imunitní reakce (Boudreau et al., 2011).

Je obecně uznáváno, že pro indukci účinných T buněčných odpovědí jsou potřebné tři signály; všechny tři mohou být dodány DB (Boudreau et al., 2011).

První signál pochází z přímé interakce receptoru T buněk (TCR) naivního T lymfocytu s peptidy vázanými na MHC molekuly. Druhý signál potřebný pro aktivaci naivních T buněk vzniká interakcí DB a T buňky, kdy kostimulační molekuly jako jsou CD80 a CD86 na DC povrchu interagují s CD28 na povrchu T buněk. Pokud kostimulační signály neproběhnou, není T lymfocyt aktivován a vznikne anergie T buněk. Třetí signál generovaný DB, který může vést k navození specifické imunitní odpovědi, je indukovanými cytokiny a vede k T buněčné diferenciaci. Existuje několik podskupin aktivovaných pomocných T buněk a diferenciaci naivních CD4 + T buněk na tyto aktivované efektorové

pomocné T buňky je řízena cytokiny tvořenými DB. Nedávno bylo navrženo, že DB poskytují T buňkám další signál (Kalinski, 2009). Tento čtvrtý signál dává T buňkám po interakci s antigenem pulsovanými DB pokyn k migraci do konkrétních tkání tím, že indukuje v těchto buňkách expresi určitých chemokinových receptorů a integrinů (Kalinski, 2009).

Efektivní aktivace T buněk závisí na úrovni exprese a vzájemném působení mezi pozitivními a negativními kostimulačními molekulami u DB a T buněk. Například příjem antigenu bez zánětlivých signálů vede k tvorbě fenotypově nezralých DB, exprimujících nízkou úroveň MHC-II a kostimulačních molekul. Prezentace antigenu v nepřítomnosti účinné pozitivní kostimulace tak může vést k toleranci zprostředkované anergickými T buňkami (Lutz & Schuler, 2002). Tyto DB jsou považovány za "tolerogenní" ve srovnání s "imunogenními" DB, které jsou schopné vyvolat silnou specifickou imunitní odpověď. DB se mohou změnit z imunogenních na tolerogenní podle podmínek mikroprostředí. Například, virové infekce mohou navodit diferenciaci pDB na DB navozující T-helper-1 (Th1) odpověď (Diebold et al., 2003), zatímco IL-13 může vyvolat diferenciaci DB navozujících Th1 odpověď na DB navozující Th 2 odpověď (Liu et al., 2001).

Imunita zprostředkovaná T buňkami zahrnuje více následujících kroků zahrnujících klonální selekci antigen specifických buněk, jejich aktivaci a proliferaci v sekundárních lymfatických tkáních, jejich migraci do míst výskytu antigenu a zánětu, vykonání přímých efektorových funkcí a poskytnutí pomoci (prostřednictvím cytokinů a membránových ligandů) velkému množství efektorových imunitních buněk. Každý z těchto kroků je regulována vzájemným vyvažováním stimulačními a inhibičními signály, které doladují odpověď (Pardoll, 2012).

Každý krok aktivace CTL je složitým procesem, který může být blokován různými způsoby. Nicméně pokud všechny výše zmíněné kroky proběhnou správně (pod vlivem správné regulace), vakcínou navozená protinádorová imunitní odpověď zprostředkovaná CTL může být úspěšnější (Yong et al., 2012).

#### **2.1.2.2 Strategie vedoucí k zlepšení protinádorového účinku při imunizaci VACV**

Jak bylo řečeno v předchozí kapitole, základními dvěma cíli imunoterapie nádorů je vyvolání specifické imunitní reakce proti nádorovým buňkám (Banchereau & Steinman, 1998) a překonání imunosupresivních mechanismů vytvořených nádory (Bilusic & Madan, 2012). Faktory, které rozhodují o úspěchu nádorové vakcíny, jsou faktory související s vakcínou a faktory související s hostitelem. Typ navozené odpovědi je závislý na vektoru

použitím k doručení antigenu a také na adjuvans, je-li použito. Ty určují rozhodující parametry účinné imunitní odpovědi jako je její specifita, velikost a kvalita, která zahrnuje délku trvání reakce, aviditu T lymfocytů i jejich funkční aktivitu vyjádřenou profilem cytokinů.

Pokud se zabýváme jako vakcinačními vektory viry vakcínie, může v současnosti, kdy je z důvodů bezpečnosti dávána přednost oslabeným nereplikujícím se virům, nastat problém s jejich nedostatečnou imunogeností. Přestože existují studie, které ukazují, že vysoce oslabené vektory mohou navodit protektivní imunitu proti široké škále patogenů, jejich omezená replikace vzbuzuje stále obavy ohledně jejich schopnosti indukovat stejně účinnou imunitní odpověď, jako vektory 1. generace (Abaitua et al., 2006; Dai et al., 2008a; Karkhanis & Ross, 2007). Výsledky nedávno provedených pokusů na zvířatech a několika klinických studií porovnávající nereplikující se a replikující se vakcinační vektory ukazují, že nereplikující se VACV jsou ve skutečnosti méně imunogenními vakcínami, než předcházející generace vakcín, přestože mohou fungovat jako agens pro priming u jedinců s kontraindikací pro použití vakcín, založených na replikujících se virech (Artenstein & Grabenstein, 2008; Ferrier-Rembert et al., 2008). Proto je v současnosti věnována pozornost rekombinantním VACV schopným replikace jako potenciálním vakcinačním vektorům. Jsou vyvíjeny oslabené vakcíny schopné replikace, které navozují silnou humorální a buněčnou imunitní odpověď, poskytují dlouhodobou protekci a zároveň vykazují slabší negativní vedlejší účinky. Podrobně jsou jednotlivé postupy vedoucí k zlepšení imunizačních vlastností VACV a zahrnující delece genů pro imunomodulátory a genů hostitelského spektra, atenuace inzercí genů pro imunomodulátory a prime-boost režimy, popsány v kapitole 2.1.3.

Ovšem jak již bylo řečeno, protinádorová vakcína musí také překonat imunosupresivní mechanismy vytvořené nádorem. Vlastnosti umožňující nádoru uniknout specifické imunitě nebo ji utlumit, vznikají díky změnám na úrovni nádorové buňky nebo nádorového mikroprostředí.

Imunitní systém, má v nádorech dvě paradoxní role. Zatímco různé složky vrozené a adaptivní imunitní odpovědi jsou schopny navodit destrukci nádorových buněk, určité druhy imunitních buněk mohou také vytvořit pronádorové prostředí, které podporuje růst nádoru a vznik metastáz (DeNardo et al., 2008).

Nádorové buňky jsou vybaveny mechanismy, které jim umožní uniknout rozeznání imunitním systémem nebo negativně ovlivnit funkci efektorových T buněk. Aby unikly rozpoznání imunitním systémem, snižují nádorové buňky expresi antigenu, součásti

mechanismů zpracovávajících a prezentujících antigeny a expresi molekul hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) (Marincola et al., 2000). Snížená exprese kostimulačních molekul, která má zásadní význam pro aktivaci T buněk a zvýšená exprese molekul, které negativně regulují aktivaci T buněk, například PDL1/B7-H1 a B7-H4, byla prokázána v různých typech nádorů (Dong et al., 2002; Choi et al., 2003; Driessens et al., 2009). Nádorové buňky mohou také potlačit funkci imunitního systému tím, že vylučují různé rozpustné faktory, které inhibují aktivaci, proliferaci a diferenciaci jednotlivých součástí imunitní odpovědi. Mezi tyto molekuly patří TGF- $\beta$  (Thomas & Massague, 2005a), IL-10 (Kurte et al., 2004) a IL-13 (Terabe et al., 2000) a VEGF (Gabilovich et al., 1996).

Konečně nádorové buňky mohou tvořit solubilní imunopresivní faktory, které atrahují buňky různého typu a způsobují tak vytvoření imunopresivního nádorového mikroprostředí. Přední místo mezi nimi zastává VEGF, který atrahuje do nádoru nezralé myeloidní buňky z kostní dřeně, kde se transformují na nezralé dendritické buňky asociované s nádorem (iDCs) a makrofágy asociované s nádorem (TAM) s imunopresivním účinkem. Přestože solubilní faktory produkované nádorem působí především v místě primárního nádoru, může se jejich imunopresivní vliv rozšířit do místních lymfatických uzlin a sleziny a jsou tak rozhodující pro vznik komplexních imunopresivních prostředí napomáhajících růstu nádoru a metastazování.

Další imunopresivní mechanismy působí na úrovni nádorového mikroprostředí. Koncept nádorového mikroprostředí jako nepostradatelné součásti nádorové tkáně (Bissell et al., 2002; Hanahan & Weinberg, 2000) odráží nový pohled na karcinogenezi, kdy nádor již není vnímán jako nemoc způsobená pouze nesmrtelnou transformovanou buňkou s autonomním, invazivním růstem, ale spíše jako nemoc vznikající následkem mnohobuněčných interakcí v nově vznikající nádorové tkáni (Lorusso & Ruegg, 2008).

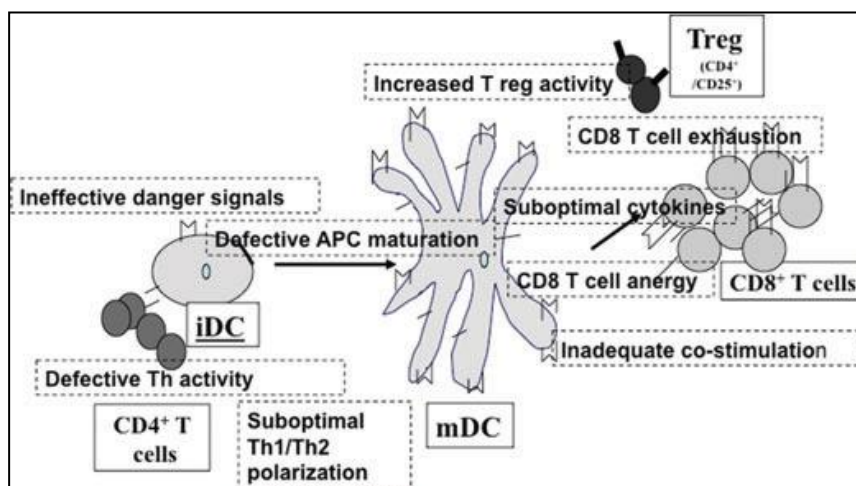
Tyto interakce vedou ke vzniku komplexních imunopresivních sítí (Chow et al., 2012), což jsou mechanismy eliminující vliv imunity na úrovni nádorového mikroprostředí.

Nádor je tvořen nádorovými buňkami a nádorovým stromatem, které se skládá z extracelulární matrix a stromálních buněk, které zahrnují fibroblasty, myofibroblasty, CAF, buňky vaskulatury a buňky přirozené a specifické imunity. Tyto různorodé buňky spolu navzájem komunikují buď přímým kontaktem nebo produkcí cytokinů a chemokinů a společně kontrolují růst nádoru. Je to exprese různých imunitních modulátorů a množství a aktivace různých buněčných typů v nádorovém mikroprostředí, co rozhoduje o tom, jestli

převládne protinádorová imunita nebo spíše pronádorové prostředí (Grivennikov et al., 2010a). U pokročilých nádorů lze detekovat buňky, které se postupně hromadí v nádorovém mikroprostředí, negativně ovlivňují vznik protinádorové T buněčné odpovědi a tím vytvářejí imunosupresivní mikroprostředí nádoru.

Mezi ně patří například T regulační (Treg) lymfocyty (Yamaguchi & Sakaguchi, 2006; Curiel et al., 2004), s nádorem asociované makrofágy (TAM) (Mantovani et al., 2002a; Luo et al., 2006) a pomocné CD4<sup>+</sup> T buňky typu 2 (Th2) (DeNardo et al., 2009; Ziegler et al., 2009). Součástí mikroprostředí několika typů nádorů (Curiel, 2004; Baleeiro et al., 2008; Shurin et al., 2006; Whiteside, 2006; Mantovani et al., 2004b) jsou také DB. Pro nádorové mikroprostředí jsou typické imunosupresivní DB, neschopné navodit specifické imunitní odpovědi, nebo způsobující expanzi regulačních T buněk. Jsou to např. nezralé, částečně diferencované myeloidní DC nebo indolamin-2-3 deoxygenáza (IDO)+ myeloidní DC (Benencia et al., 2012).

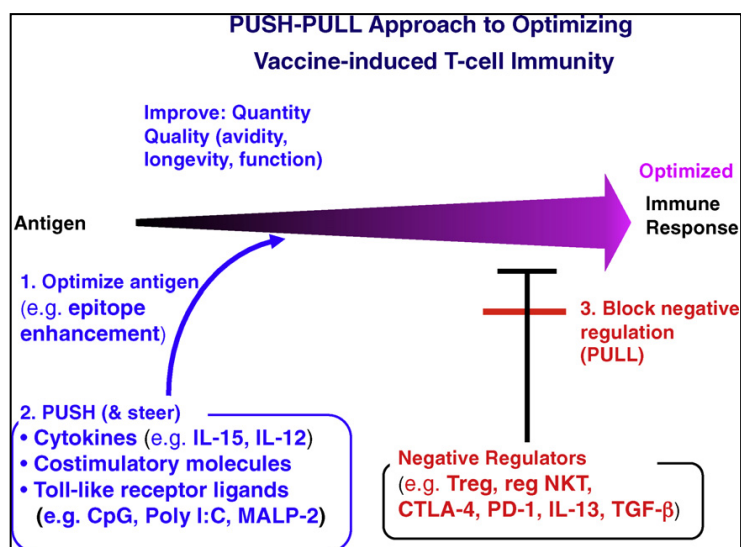
Hlavní imunosupresivní mechanismy, kterými může nádor negativně ovlivňovat aktivaci T buněčné odpovědi představují mechanismy ovlivňující kvantitu nebo kvalitu navozené imunitní odpovědi, jako je absence signalů nebezpečí, nedokonalé zrání DB a suboptimální polarizaci Th buněk, což jsou spíše imunosupresivní mechanismy působící na úrovni nádorové buňky. Dále jsou to mechanismy, které negativně ovlivňují již navozenou T buněčnou odpověď, jako je např. vliv Treg buněk (viz. Obr. 3).



**Obr. 3 Hlavní imunosupresivní mechanismy, které mohou bránit aktivaci protinádorových T buněk (Berinstein, 2009)**

Vliv faktorů souvisejících s hostitelem (imunosupresivních mechanismů vytvořených nádorem) může být eliminován použitím různých biologických adjuvans. Příkladem je „push-pull“ metoda pro optimalizaci vakcín, kdy „push“ znamená posílení

kvality a kvantity imunitní reakce prostřednictvím adjuvans a „pull“ znamená blokování negativní regulace rovněž prostřednictvím adjuvans (Berzofsky et al., 2012).



Obr. 4 Příklady využití imunomodulátorů při optimalizaci vakcín (Berzofsky, 2012).

Imunitní modulatory používané v nádorových vakcínách jsou tedy dvou typů. První zesilují imunitní reakci, pokud je příliš slabá nebo mění její kvalitu, pokud je nesprávného fenotypu. Mezi ně patří imunomodulační cytokiny, kostimulační molekuly, ligandy Toll-like receptorů (TLR) a další molekulární adjuvans (Berzofsky et al., 2004; Ahlers et al., 2003).

Jako příklady použitých imunomodulačních cytokinů mohou být uvedeny cytokiny s vlivem na APC (GM-CSF) a cytokiny s vlivem na T buňky (IL-2, IL-7, IL-15, IL-12) (Ahlers et al., 1997). Podrobněji je vliv těchto cytokinů popsán v kapitolách 2.3. (Imunitní adjuvans) a 2.3.1 (GM-CSF jako imunoadjuvans nádorových vakcín). Kromě pozitivního vlivu GM-CSF na funkce antigen prezentujících buněk, byl také zjištěn jeho synergický účinek s CD40L, kde GM-CSF zvyšuje množství DB a CD40L je poté vazbou na CD40 aktivuje (Ahlers et al., 2002).

Expresí IL-15 vektorem vede ke zvýšení avidity CD8<sup>+</sup> T buněk. Také se zjistilo, že IL-15 může nahradit pomoc CD4<sup>+</sup> T buněk tím, že pomůže zabránit apoptóze zprostředkované TRAIL ligandem (Oh et al., 2008). Jiným přístupem k dosažení stejného cíle by mohlo být použití TLR ligandů, které aktivací DB zvýší jejich expresi kostimulačních molekul a cytokinů (Pulendran, 2004).

Avidita CD8<sup>+</sup> T lymfocytů závisí nejen na vnitřní affinitě TCR, ale také na hustotě TCR, hustotě CD8 koreceptorů (Cawthon et al., 2001; Cawthon & Alexander-Miller,

2002) a pravděpodobně i dalších faktorech podílejících se na přenosu signálu. Schlom se spolupracovníky vyvinuli poxviróvé vektory s trojicí kostimulačních molekul B7-1, ICAM-1 a LFA-3, které v současnosti patří mezi nejnadějnější nádorové vakcíny (Hodge et al., 1999).

Byly objeveny kombinace TLR ligandů (Pulendran, 2004; Napolitani et al., 2005; Zhu et al., 2008), které fungují synergicky jako adjuvans vakcín navozující silnější odpovědi CD8<sup>+</sup> T buněk (Zhu et al., 2008; Zhu et al., 2010). Agonisté Toll-like receptorů mohou zlepšit nedokonalé zrání a aktivaci APC a zvrátit tak anergii T buněk. Například agonisté TLR3 působily synergicky s agonisty TLR2/6 a s TLR9 a ačkoli trojitě kombinace neindukovaly více specifických T buněk, než dvojitě kombinace, navozovaly lepší protekci proti viru, což je vysvětlováno větší funkční aviditou CD8<sup>+</sup> T buněk (Zhu et al., 2010).

Imunitní modulátory jsou dále používány v nádorových vakcínách proto, aby odstranily negativní regulační mechanismy (buňky, povrchové molekuly, cytokiny) nebo inhibitory kontrolních bodů. Tyto strategie jsou považovány za klíčový krok k úspěchu nádorové imunoterapie. Jedním z příkladů, který podporuje tuto myšlenku je nedávný úspěch monoklonální protilátky anti-CTLA-4 (ipilimumab) v léčbě metastazujícího melanomu.

Jedním z nejsilnějších imunosupresivních cytokinů je TGF- $\beta$ , který ovlivňuje imunitní systém více způsoby. TGF- $\beta$  indukuje diferenciaci imunosupresivních Foxp3<sup>+</sup> Treg buněk z CD4<sup>+</sup> T lymfocytů (Chen & Wahl, 2003). TGF- $\beta$  také může přímo potlačovat aktivace/funkci Th1 a CD8<sup>+</sup> T buněk (Thomas & Massague, 2005b) a bylo prokázáno, že atrahuje CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup> myeloidní supresorové buňky (MDSC) do mikroprostředí nádoru (Yang et al., 2008). TGF- $\beta$  podporuje také růst nádorů prostřednictvím posílení angiogeneze, invaze a metastázování (Tian et al., 2011). Bylo prokázáno, že hladiny TGF- $\beta$  v periferní krvi jsou u mnoha malignit přímo úměrné závažnosti prognózy (Teicher, 2007). Pokud jde o zdroj TGF- $\beta$ , původně se předpokládalo, že jej tvoří hlavně nádorové buňky, ale v současnosti se ukazuje, že jeho producentem jsou také Foxp3<sup>+</sup> Treg buňky.

Protože se TGF- $\beta$  podílí na více mechanismech, které mohou podporovat růst nádoru, představuje velmi atraktivní cíl léčby nádorů. Nicméně monoterapii s TGF- $\beta$  antagonisty nepostačuje vždy k vyvolání klinické odpovědi. Ovšem kombinace TGF- $\beta$  antagonistů s vakcínou vedla ke zvýšení její účinnosti ve více myších modelech (Gunn et al., 2001; Kim et al., 2008). Rovněž použití anti-TGF- $\beta$  monoklonální



protilátky 2G7 nebo SM16, což je nízkomolekulární inhibitor TGF- $\beta$  receptorové kinázy blokující TGF- $\beta$  signalizaci má velký potenciál pro zvýšení účinnosti protinádorových vakcín (Kim et al., 2008; Zurkova et al., 2011).

V současnosti jsou v klinických studiích testovány kromě protilátky neutralizující TGF- $\beta$  také protilátky proti IL-10 a protilátky proti Treg buňkám, jako například anti-CD25 nebo fúzní protein Ontak IL-2 a záškrtového toxinu. Dále je testován 1-Methyl-tryptofan jako blokátor IDO pozitivních dendritických buněk, jehož použití by mělo vést snížení množství a funkce Tregů. Odstraňovány nebo inhibovány jsou také NKT buňky typu II nebo myeloidní supresorové buňky (MDSC) (Berzofsky et al., 2004; Terabe & Berzofsky, 2004; Sinha et al., 2005; Kusmartsev & Gabrilovich, 2006).

Také byl testován vliv blokady IL-13 pomocí rozpustného receptoru IL-13R2-Fc, protože IL-13 podporuje imunosupresivní mechanismy MDSC a M2 makrofágů, které hrají klíčovou roli při potlačení imunity u pacientů s nádory, může inhibice IL-13 a jeho signalizace blokovat více cest imunosuprese (Marigo et al., 2008; Gordon & Martinez, 2010). Dále může vést ke zvýšení účinnosti protinádorové vakcíny inhibice molekul CTLA-4 a PD-1 (Curran et al., 2010). Probíhá řada studií s protilátkami, které by měly blokovat negativní signalizaci prostřednictvím CTLA4 (anti-CTLA4) a které mohou zvrátit navození tolerance T-buněk prostřednictvím PD1 cesty (Berinstein, 2009).

V současnosti převládá názor, že pro dosažení optimálního účinku terapeutických nádorových vakcín doprovázených klinickými výsledky bude potřebná současná inhibice více imunosupresivních vlivů (Berinstein, 2009).

### **2.1.3 Zlepšení imunizačních vlastností VACV**

Při používání oslabených virů může nastat problém s jejich nedostatečnou imunogeností. Dalším limitujícím faktorem je imunitní reakce zaměřená proti virovému vektoru. K překonání těchto problémů slouží metoda „prime-boost“ vakcinace a aplikace cytokinů jako adjuvans.

#### ***Delece neesenciálních genů pro imunomodulátory a genů hostitelského spektra***

Inhibice různých složek imunitní odpovědi virem ovlivňuje patogenní vlastnosti viru. Jak bylo prokázáno ve více studiích, delece neesenciálních genů přispívajících k virulenci viru, což mohou být geny, jejichž produkty interferují s imunitní odpovědí hostitele (takzvané imunomodulátory) nebo geny hostitelského spektra, snižuje virulenci viru (Buller et al., 1988; Bloom et al., 1991; Alcamí & Smith, 1992; Isaacs et al., 1992). Předpokládá se, že orthopoxviry s menším počtem aktivních proteinů interferujících

s imunitní odpovědí hostitele by mohly představovat méně virulentní a více imunogenní lidskou vakcínu, jak lze pozorovat u viru vakcinie, který ve srovnání s virem kravských neštovic kóduje mnohem méně genů pro imunomodulátory (Pickup, 2007).

Původně empirickou přípravu oslabených VACV prostřednictvím opakovaného pasážování na buněčných kulturách vystřídal v 80. letech upravování vlastností VACV pomocí cílené mutagenese. Bylo to umožněno poznáním poxvirových proteinů, které aktivně inhibují imunitu hostitele (Kotwal & Moss, 1988), vývojem metod pro manipulaci s genomem poxvirů (Mackett et al., 1982; Panicali et al., 1983) a zavedením účinnějších metod pro sekvenaci virové DNA (Sanger et al., 1977). Role jednotlivých neesenčních genů byly zkoumány ve studiích analyzujících virulenci orthopoxvirů s delecemi genů pro imunomodulátory v průběhu infekce na různých zvířecích modelech. Výsledky experimentů byly často ovlivněny způsobem aplikace viru a zvířecím druhem, na kterém byl virus testován. Několik vědeckých skupin prokázalo, že delece jednoho nebo více genů kódujících proteinů interferujících s imunitní odpovědí hostitele může virus oslabit bez ovlivnění jeho imunogenity (Buller et al., 1985; Lee et al., 1992). V těchto časných studiích byla ovšem snížená virulence často spojena se sníženou replikací viru v hostiteli, jako je u viru MVA. Otázka, jestli delece proteinů interferujících s imunitou může snížit patogenitu a současně zvýšit imunitní odpověď na vakcinaci zůstávala nezodpovězena.

Úroveň atenuace a imunogenita byla zpočátku analyzována u virů s mutacemi v genech řídicích metabolismus nukleotidů a genech kódujících membránové a secernované proteiny. V rámci vývoje vakciniových vektorů umožňujících expresi cizích antigenů na začátku 80. let (Panicali et al., 1983; Smith et al., 1983) bylo zjištěno, že VACV s delecí genu pro Tk se mohou po podání skarifikací lokálně replikovat do normálních titrů, ale mají nižší schopnost diseminace a replikace ve vnitřních orgánech (Buller et al., 1985). Tento virus je při porovnání s divokým virem atenuován o 4 logaritmy. Jedna z prvních úprav VACV prostřednictvím genového inženýrství proběhla při přípravě vakcíny proti vzteklině, kdy byl gen pro glykoprotein viru vztekliny vložen do genu Tk VACV (Kieny et al., 1984). Později byly deletovány geny kódující faktory virulence s funkcí imunomodulátorů. Byly to například geny pro rozpustné receptory cytokinů a chemokinů, geny pro inhibitory serinových proteáz a geny pro inhibitory buněčných antivirových enzymů.

Jedna z prvních studií, které zkoumaly vliv delece imunomodulačních proteinů na imunogenitu VACV se zabývala delecí genu B8R, který kóduje virový receptor pro IFN- $\gamma$  (Verardi et al., 2001). Výsledky této studie ukázaly, že přestože delece snížila

virulenci viru, neovlivnila humorální odpověď nasměrovanou proti homologním nebo heterologním antigenům exprimovaným rekombinantním virem.

Podobně byly VACV postrádající geny B13R pro inhibitor kaspázy a B22R pro inhibitor serinové proteázy méně virulentní při porovnání s divokým virem, přičemž indukovaly stejnou humorální a buněčnou imunitní odpověď (Legrand et al., 2004). Ovšem v další studii prováděné na jiném modelu byly pozorovány malé rozdíly v patogenosti mezi divokým virem a virem s delecí genů B13R a B22R (Kettle et al., 1995). Podobně byly zjištěny malé rozdíly při testování virulence virů s delecí genu B13R eventuálně spojené s delecí genů B5R, B8R, B12R, B14R, B16R, B18R a B19R při hodnocení buněčné a humorální imunity vůči exprimovaným antigenům (Jackson et al., 2005). Tyto rozdíly byly patrně způsobeny použitím odlišných experimentálních podmínek.

Jednou z hlavních překážek všech prováděných analýz je skutečnost, že patogenita a imunologické důsledky virové infekce mohou být ovlivněny širokým spektrem faktorů, jako jsou kmen a staří použitých myši, kmen a dávka viru a způsob jeho aplikace (Buller, 1985; Turner & Moyer, 2002; Tschärke et al., 2002). Tyto první studie tedy sice potvrdily teorii, že delece imunomodulačních proteinů může snížit patogenost VACV, ale současně neposkytly mnoho informací týkajících se otázky, jestli mohou tyto delece zlepšit imunizační vlastnosti VACV. Teprve v poměrně nedávné době výsledky několika studií dokázaly, že delece imunomodulátorů může skutečně zlepšit imunogenost VACV.

Delece VACV genu A44L pro 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenázu (3 $\beta$ -HSD) ukázala, že 3 $\beta$ -HSD při intranasální infekci myši působí imunosupresivně. Viry bez genu A44L stimulovaly atrahování CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T lymfocytů do plic infikovaných myši. Influx buněk schopných produkovat IFN- $\gamma$  a CD8<sup>+</sup> cytotoxických T lymfocytů (CTL) vedl k účinnější eliminaci delečních mutantů ve srovnání s divokým virem (Reading et al., 2003a).

Delece genu C12L VACV, který kóduje IL-18 vazebný protein, snížila virulenci viru a zvýšila přirozenou a adaptivní imunitní odpověď při intranasální aplikaci BALB/c myším (Reading & Smith, 2003). Infekce delečními mutanty pro C12L vedla, ve srovnání s divokým virem, ke zvýšené produkci IFN- $\gamma$  v plicích a zvýšené infiltraci plic, slezin a mediastinálních lymfatických uzlin NK buňkami a VACV specifickými CTL.

Rekombinantní virus MVA s delecí genu B15R pro IL-1 $\beta$  receptor si zachoval svůj avirulentní fenotyp při intranasální aplikaci vysoké dávky (10<sup>8</sup> IU) BALB/c myším, což

bylo zjištěno měřením váhy a tělesné teploty a současně navozoval významně vyšší množství paměťových CD8<sup>+</sup> T lymfocytů (Staib et al., 2005). A když byly BALB/c myši

imunizované MVA nebo MVA- $\Delta$ IL1 $\beta$ R intranasálně infikovány virulentním VACV kmenem WR, myši infikované MVA- $\Delta$ IL1 $\beta$ R vykazovaly lepší protekci než myši infikované MVA.

Dalším genem, jehož delece vedla k zvýšené imunogenosti vakcíny založené na VACV, byl gen A41L (Clark et al., 2006) kódující virový glykoprotein sdílející sekvenční podobnost s dalšími VACV proteiny se schopností vázat CC chemokiny (vCKBP, vCCI), jehož ligandy jsou CCL21, CCL25, CCL26 a CCL28 (Bahar et al., 2008). Tento gen byl detekován u každého sekvenovaného ortopoxvirového druhu a kmenu, tedy u více než 75 virů. V myším intradermálním modelu infekce vedla delece A41L k tvorbě větších lézí, které byly více infiltrovány zánětlivými buňkami (Ng et al., 2001). Po intranasální infekci BALB/c myši VACV kmeny WR nebo MVA s delecí genu A41L bylo detekováno v plicích (ale ne ve slezině) větší množství VACV specifických CD8<sup>+</sup> produkujících IFN- $\gamma$  a silnější odpověď CTL lymfocytů. Těmto výsledkům odpovídala i lepší protekce BALB/c myši imunizovaných MVA bez A41L po intranasální čelenži virem WR, než při imunizaci stejnou dávkou nemodifikované MVA (Ng et al., 2001).

Pozitivní vliv delece A41L genu na imunitu navozenou vakcinací lze vysvětlit funkcí ligandů vázaných proteinem A41 v průběhu indukce a udržení specifické antivirové imunitní odpovědi, především CCL21. Tento chemokin atrahuje CCR7<sup>+</sup> T buňky a DB do lymfatických uzlin (Ashour et al., 2007), 2007), řídí migraci CD4<sup>+</sup> T lymfocytů v rámci lymfatických uzlin (Okada & Cyster, 2007), 2007) a hraje tak klíčovou roli při primingu T buněčné odpovědi, kostimulaci naivních CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T buněk a indukci Th1 polarizace (Flanagan et al., 2004).

Většina mutací genů pro imunomodulátory byla prováděna u viru WR. V poměrně nedávné době byl analyzován vliv delece dvou neesenciálních imunomodulačních genů C12L a A53R (kóduje homolog TNF receptoru) u kmenu Vakcinie Tian Tan (VTT), který byl sice použit jako vakcinační kmen proti pravým neštovicím v Číně, ale je, stejně jako jiné VACV kmeny, patogenní pro imunosuprimované jedince (Dai et al., 2008b). Zatímco delece C12L vedla k desetinásobnému snížení intrakraniální letální dávky a delece A53R k 4,6 násobnému snížení intrakraniální letální dávky u myši, u králíků pouze delece C12L navodila atenuaci viru při inokulaci skarifikací. Nicméně virus VTT s delecí genů C12L a A53R exprimující geny viru HIV byl schopen navodit silnou buněčnou a humorální odpověď proti proteinům HIV (Dai et al., 2008b). Pro atenuaci kmenu VTT byly použity také atenuace genů hostitelského spektra.

Mutací dalšího genu hostitelského spektra a faktoru virulence E3L vznikla řada

atenuovaných VACV. Produkt E3L genu zabraňuje navození antivirového stavu prostřednictvím signálních drah indukovaných IFN (Langland & Jacobs, 2002). Kompletní delecí genu E3L vznikl VACV s omezenou schopností replikace v lidských buňkách (Chang et al., 1995; Vijaysri et al., 2008).

### ***Atenuace inzercí genů pro imunomodulátory***

Viry vakcinie mohou být oslabeny inzercí genů, které kódují proteiny ovlivňující imunitní odpověď hostitele. Mohou to být např. IL-2 a IFN- $\gamma$ . Exprese IL-2 kmenem vakcinia viru WR vedla k vytvoření nepatogenního viru u atymických nahých myší (Flexner et al., 1987). Stejný efekt měla také exprese IFN- $\gamma$  (Giavedoni et al., 1992). Exprese IL-15 viru vakcinie vede ke snížení letality u atymických nahých myší v řádu více než tisíckrát (Perera et al., 2001). Současně ale stále dochází k indukci paměťových CD8+ T buněk a zvýšené buněčné a protilátkové odpovědi u imunokompetentních myší. Exprese IL-15 virem vakcinie vedla k navození účinnější protekce při intranasální infekci divokým kmenem viru (Perera et al., 2007).

Exprese imunomodulátorů může v některých případech vést k posílení imunogenicitě vysoce atenuovaných nereplikujících se VACV. Po manipulaci s kmenem MVA, která vede ke zvýšení produkce cytokinů, pozitivně působících na aktivaci antigen prezentujících buněk, může potencovat imunitní reakci po vakcinaci. V případě použití cytokinů jako jsou GM-CSF nebo Macrophage inflammatory protein 3 $\alpha$  (MIP-3 $\alpha$ ) došlo k až sedminásobnému zvýšení titerů specifických protilátek proti MVA u myší (Chavan et al., 2006).

Vyzkoušena byla též kombinace delece genů pro inhibitory sérinových proteáz B13R nebo B22R spojená s expresí IFN- $\gamma$ . Takto upravený rekombinantní VACV se dobře replikoval v tkáňových kulturách a současně byl při indukci silné specifické imunity proti VACV a virulentní u imunodeficientních a imunokompetentních myší (Legrand et al., 2005; Yilma et al., 2010).

### ***Prime-boost režimy***

Jedním z problémů, které se vyskytují při použití virových vektorů jako vakcín, je vznik imunity proti strukturním proteinům virového vektoru při jeho opakovaných aplikacích, což snižuje imunitní odpověď namířenou proti vloženému inzertu. Tato situace může být překonána použitím tzv. prime-boost vakcinačního režimu, který spočívá v kombinaci virových vektorů s dalšími vakcinačními vektory. Mohou to být např. heterologní viry, DNA vakcíny, peptidy, proteiny (Lu, 2009).

V současnosti jsou vektory, které jsou nejčastěji používány v kombinaci s viry, DNA plazmidy. V jejich případě je využívána schopnost navodit T buněčnou odpověď. Bylo zjištěno, že tato odpověď je nedostatečná pro navození protekce proti různým chorobám, ale může být dále zesílena aplikací viru, který má velkou schopnost aktivovat buněčnou imunitní odpověď (Lu, 2008).

V posledních letech se stále častěji začíná zkoušet kombinace různých rekombinantních virů a vliv různých způsobů jejich aplikace na typ navozené imunitní odpovědi (Seder, 2008, Takayama et al., 2010). Na zvířecích modelech a v klinických pokusech jsou tedy nyní testovány kombinace DNA-MVA, DNA-NYVAC, fowlpox virus-MVA, influenza-MVA, adenovirus-MVA. Tyto kombinace jsou zaměřené na široké spektrum chorob od malárie, tuberkulózy, hepatitidy C až po nádory gomez (Gomez, 2008).

Díky těmto studiím bylo zjištěno, že různé vektory mají různou schopnost aktivovat imunitní odpověď, pokud jsou použity v rámci primingu nebo boostingu. DNA vakcíny, FPV a influenza virus jsou vhodné vektory pro priming, zatímco viry vakcínie (MVA a NYVAC) jsou schopné boostovat T buněčnou odpověď lépe než ostatní (Gomez, 2008).

Jako jedna z forem heterologního prime-boost režimu vakcinace je také testována kombinace tří různých vektorů exprimujících stejný inzert (Sealy et al., 2009). Detailní analýza populací T buněk indukovaných jednotlivými vektory metodou multiparametrické průtokové cytometrie umožňuje přesné určení množství různých populací T buněk, které se liší markery fenotypu, produkcí cytokinů a efektorovými funkcemi (Takayama et al., 2010).

### ***Překonání preexistující imunity***

Překonání preexistující imunity je v případě VACV prováděno použitím nepříbuzných vektorů s jiným hostitelským spektrem (např. fowlpox virus, avipox virus).

### ***Cytokiny jako adjuvans***

Cytokiny používané pro zvýšení imunitní odpovědi mohou působit na úrovni antigen prezentujících buněk nebo na úrovni T lymfocytů (Palena & Schlom, 2010).

Cytokiny zvyšující imunitní odpověď prostřednictvím antigen prezentujících buněk vedou k jejich vzrůstající diferenciaci, aktivaci a akumulaci. Následkem je vyšší prezentace antigenů a aktivace specifických T buněk. Tyto cytokiny mohou zároveň přímo působit na různé subtypy buněk. Do této skupiny cytokinů patří GM-CSF (Kass et al., 2001; Kass et al., 2000). V mnoha preklinických studiích došlo s použitím nádorových

nebo dendritických buněk produkujících biologicky aktivní GM-CSF k navození systémové protinádorové imunitní odpovědi (Dranoff et al., 1993a; Dranoff, 2003). Problematika použití GM-CSF jako adjuvans nádorových vakcín je podrobněji popsána v kapitole 2.3.

Skupina cytokinů působících přímo na T buňky zvýšením jejich proliferace, aktivace a indukci efektorových funkcí, zahrnuje IL-2 (Smith, 2008; Heemskerk et al., 2008), IL-7 (Melchionda et al., 2005), IL-15 (Waldmann, 2006; Sato et al., 2007) a IL-12 (Cheever, 2008). Při aplikaci IL-2 jako monoterapie došlo k navození klinických odpovědí u pacientů s metastazujícím karcinomem ledvin a metastazujícím melanomem (Petrella et al., 2007). Je-li IL-2 použit jako součást vakcíny, může být vyřešen problém s jeho toxicitou, která byla pozorovaná při jeho podání ve vysokých dávkách (Rosenstein et al., 1986).

Cytokin IL-7 navozuje expanzi naivních T buněk a tak rozšiřuje spektrum T buněk (Melchionda et al., 2005; Waldmann, 2006). Cytokin IL-15 je nezbytný pro vývoj paměťových CD8 T buněk a NK buněk (Melchionda et al., 2005). Byla také prokázána jeho role při indukci dlouze přežívajících CD8 T-buněk s vysokou aviditou (Villinger et al., 2004; Kutzler, 2005). Na rozdíl od IL-2 ovšem nedochází při jeho použití k proliferaci regulačních T buněk. Oba výše uváděné cytokiny byly použity v preklinických studiích s protinádorovými vakcínami (Cheever, 2008).

Dále je testován účinek IL-12, který je schopen navodit Th1 polarizaci, na aktivaci T lymfocytů a NK buněk. V preklinických studiích byl pozorován jeho protinádorový efekt (Colombo & Trinchieri, 2002). Vzhledem k jeho toxicitě, která byla zjištěna při systémovém podávání lidem, je lokální produkce IL-12 vakcínou považována za bezpečnější (Leonard et al., 1997).

## **2.2. Chemokiny a jejich role v procesu kancerogeneze a při vývoji cervikálního karcinomu**

Spojitosť mezi zánětem a nádorem je uznávána již od 19. století. Chronický zánět sice přispívá ke vzniku nádorů (Grivennikov et al., 2010b), ale zánět také vzniká vlivem genetických změn, které způsobují transformaci, a to i v nádorech, jejichž vznik není spojen se zánětlivými podmínkami (Mantovani et al., 2008). Zánět je klíčovou komponentou nádorového mikroprostředí, představuje jeden ze sedmi hlavních znaků malignit (Hanahan & Weinberg, 2011) a chemokiny patří mezi mediátory zánětu, které jsou spojeny s nádory bez ohledu na jejich patogenezi (Allavena et al., 2011).

Chemokiny, především ty zánětlivé, byly historicky spojovány s atrahováním leukocytů do nádorů (Mantovani, 1999). V současnosti je známo, že mohou v průběhu kancerogeneze plnit další funkce, jako je regulace angiogeneze (Strieter, 2006), podpora proliferace a přežití nádorových buněk prostřednictvím aktivace MAP/Erk signální dráhy (Balkwill, 2004), či ochrana nádorových buněk před apoptózou (Wang et al., 2008a; Murakami et al., 2003). Aktivace některých chemokinových receptorů může ovšem vést k inhibici nádorové proliferace (Homey et al., 2002), což je případ CCR5 u karcinomu prsu (Manes et al., 2003).

Chemokiny se mohou účastnit také takzvané senescence, což je stabilní, dlouhodobá ztráta proliferační kapacity spojená s přetrvávající životaschopností a metabolickou aktivitou (Kuilman et al., 2010). Chemokiny mohou rovněž ovlivnit proces takzvané epiteliálně-mezenchymální tranzice (EMT), která se za fyziologických podmínek objevuje během embryogeneze a představuje klíčový krok malignizace karcinomu (Thiery et al., 2009). V současnosti je všeobecně přijímáno, že chemokiny hrají významnou roli v invazivitě a metastazování nádorů (Muller et al., 2001). Po prvních nálezech u melanomu (Balentien et al., 1991) se předpokládalo, že chemokiny mohou navádět nádorové buňky při jejich sekundární diseminaci, což není tak překvapivé, protože tento proces má mnoho společných rysů s normální migrací buněk. Tento účinek chemokinů hraje při vývoji nádoru obzvláště významnou roli vzhledem ke skutečnosti, že tvorba metastáz je hlavní příčinou smrti pacientů s nádory.

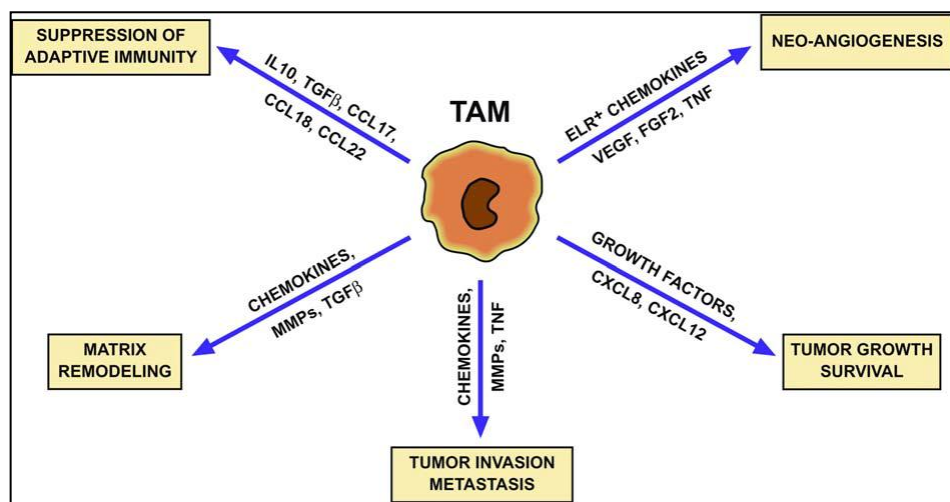
Chemokiny tvořené nádorovými buňkami a buňkami nádorového stromatu mohou také, kromě přímého vlivu na nádorové buňky, regulovat migraci buněk do nádorového mikroprostředí a jejich prostřednictvím nepřímo přispívat k progresi nádoru a vzniku imunosupresivního nádorového mikroprostředí (Mantovani, 2010). Vlivem chemokinů jsou nádory infiltrovány buňkami přirozené a adaptivní imunity jako jsou TAM, MDSC, neutrofilů, NK, DB a tumor infiltruující lymfocyty (Mukaida & Baba, 2012).

Nádorové mikroprostředí se podobá tkáni s probíhající zánětlivou odpovědí na její poškození (Coussens & Werb, 2002). Také zde se vyskytuje velké množství buněk přirozené a adaptivní imunity (atrahovaných řadou chemokinů) a cytokinů, růstových faktorů a proteáz. Na rozdíl od normální tkáně v nádoru přetrvává chronický zánět charakterizovaný přítomností maligních buněk, rozvojem aberantních cév a přetrváním zánětlivých mediátorů (např. TNF- $\alpha$  nebo IL-1).

TAM, které představují v rámci atrahovaných leukocytů nejpočetnější skupinu, sloužily v minulosti jako vzorový příklad působení chemokinů při vzniku zánětu



podporujícího růst nádoru (Bottazzi et al., 1983; Pollard, 2004). TAM vznikají většinou z cirkulujících monocytů, které jsou do nádoru atrahovány lokálně produkovanými chemotaktickými faktory a jejich akumulace koreluje se špatnou prognózou (Lin et al., 2002). TAM mohou jako klíčová zánětlivá složka ovlivňovat různé aspekty nádorového mikroprostředí (Pollard, 2004; Solinas et al., 2009a) jako jsou neoangiogeneze a inhibice vývoje protinádorové T buněčné odpovědi (Mantovani et al., 2006a; Pollard, 2004). Stále více důkazů potvrzuje, že TAM a jiné myeloidní buňky hrají významnou roli v progresi různých nádorů (Mantovani et al., 2002a; Condeelis & Pollard, 2006; Sica & Bronte, 2007; Lewis & Pollard, 2006).



Obr. 5 Funkce TAM podporující růst nádorů zprostředkované chemokiny (Sica, 2006).

Schopnost exprimovat různé funkční programy v rámci reakce na různé signály z prostředí je vlastností makrofágů, která se obvykle projevuje za patologických podmínek, jako jsou infekce a malignity (Mantovani et al., 2004a). Makrofágy jsou aktivovány vlivem signálů z prostředí, jako jsou mikrobiální produkty a cytokiny. Aktivované makrofágy lze rozdělit podle fenotypu na M1 (klasicky aktivované) a M2 (alternativně aktivované) (Mantovani et al., 2002a). Ke klasické aktivaci dochází v rámci reakce na bakteriální produkty, jako je lipopolysacharid (LPS) a imunitní podněty typu interferonu  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ).

Klasická M1 aktivace makrofágů se vyznačuje vysokou schopností prezentovat antigen, vysokou produkcí IL-12 a IL-23, nízkou produkcí IL-10 (Verreck et al., 2004) a následnou aktivací reakce polarizovaného typu I. M1 makrofágy zprostředkovávají jako účinné efektorové buňky rezistenci proti intracelulárním parazitům a nádorům a navozují

reakce poškozující tkáň sekrecí tumoricidních látek jako je TNF- $\alpha$ , IL-12, reaktivní dusík (iNOS) a meziproducty kyslíku (ROS). Kromě toho M1 makrofágy podporují Th1 imunitní odpovědi.

Opačný fenotyp mají makrofágy typu II (M2), které regulují zánětlivé reakce, adaptivní imunitu Th1, remodelace a opravu tkání, odklízí tkáňový debris a podporují angiogenezi. M2 aktivované makrofágy se vyskytují v různých variantách v závislosti na působících signálech, mezi něž patří IL-4, IL-13, IL-10 a glukokortikoidy. V zásadě mají M2 makrofágy imunosupresivní fenotyp a uvolňují cytokiny včetně IL-10, které podporují Th2 imunitní odpovědi (Mantovani et al., 2006b; Martinez et al., 2008; Martinez et al., 2009).

Cytokiny exprimované v místě nádoru hrají ústřední roli v diferenciaci atrahovaných mononukleárních fagocytů, což přispívá k odklonu lokálního imunitního systému od protinádorového působení (Mantovani et al., 2002b). Imunosupresivní cytokiny IL-10 a TGF- $\beta$  jsou produkovány jak nádorovými buňkami, tak TAM (Mantovani et al., 2002b). IL-10 podporuje aktivaci makrofágů a indukuje v TAM expresi funkcí souvisejících s M2 fenotypem. Produkce IL-10, TGF- $\beta$  a prostaglandinu E2 (PGE2) nádorovými buňkami a TAM přispívá k všeobecnému potlačení protinádorové aktivity. Přestože TAM mají převážně fenotyp M2, v současnosti je již známo, že fenotyp TAM závisí na fázi růstu nádoru. M1 makrofágy se často hojně vyskytují v místech, kde nádory vznikají. Fenotyp makrofágů se poté přepne na M2, když se nádor rozvíjí a zvyšuje se jeho invazivita a vaskularize (Biswas et al., 2008).

TAM tvoří málo NO (Dinapoli et al., 1996;Klimp et al., 2001), reaktivních kyslíkových meziproductů (Klimp et al., 2001) i zánětlivých cytokinů (např. IL-12, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6) (Mantovani et al., 2002a).

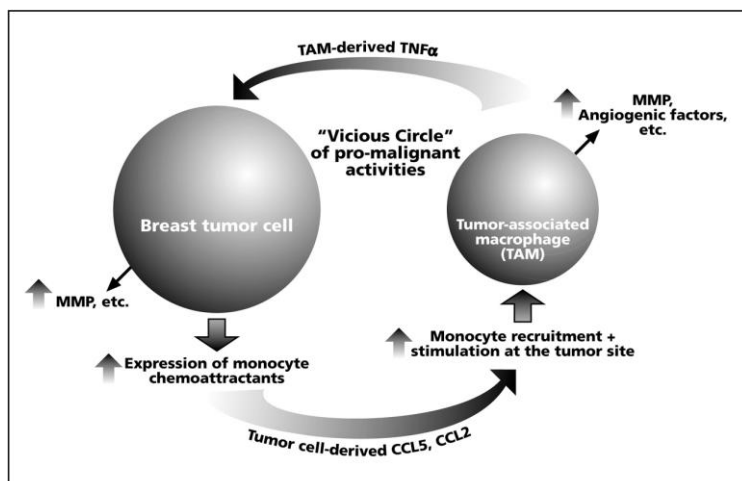
TAM se zapojují do procesu angiogeneze, která představuje klíčovou událost v průběhu růstu a progresu nádoru, produkcí angiogenního faktoru thymidin fosforylázy, která podporuje migraci endoteliálních buněk *in vitro* (Hotchkiss et al., 2003) uvolňováním řady účinných proangiogenních cytokinů, jako jsou VEGF-A, VEGF-C, TNF- $\alpha$ , IL-8 a bFGF (Lewis et al., 2000;Sunderkotter et al., 1994) a tvorbou proangiogenních a pronádorových chemokinů, jako jsou například CXCL12, CCL2, CXCL8, CXCL1, CXCL13, and CCL5 (Balkwill, 2004; Mantovani et al., 2002b; Vicari & Caux, 2002).

TAM dále exprimují širokou škálu proteáz, které navozují destrukci extracelulární matrix. Mezi ně patří aktivátor plazminogenu urokinázového typu (uPA), matrixové

metaloproteinázy MMP-2, MMP-7, MMP-9 a MMP-12 a elastázy (Hildenbrand et al., 1995; Giraudo et al., 2004; Solinas et al., 2009a; Hao et al., 2012). Degradace ECM vede k mobilizaci růstových faktorů a usnadnění migrace cévních buněk do nového prostředí (Balkwill & Mantovani, 2001). Konečně TAM exprimují molekuly, které ovlivňují proliferaci nádorových buněk (společně s angiogenezí a rozvolněním pojivových tkání). Patří mezi ně epidermální růstový faktor (EGF), členové FGF rodiny, TGF- $\beta$ , VEGF a chemokiny (Solinas et al., 2009a; Hao et al., 2012).

Je dlouho známo, že TAM mají nízké antigen prezentující schopnosti a potlačují aktivaci a proliferaci T buněk (Mantovani et al., 2002b). Mezi supresivní mediátory tvořené TAM patří prostaglandiny, IL-10, TGF- $\beta$  a metabolity indolamin dioxigenázy (IDO) (Mantovani et al., 2002b; Mantovani et al., 2004a). TAM navíc nejsou schopny vyrábět IL-12, dokonce i po stimulaci IFN- $\gamma$  a LPS (Sica et al., 2000). S tímto profilem cytokinů, který je charakteristický pro M2 makrofágy, nejsou TAM schopné spustit imunitní reakce Th1 typu, ale spíše indukují T regulační buňky (Treg buňky). Celkově platí, že chemokiny tvořené TAM způsobují nejčastěji nábor efektorových T buněk, které nejsou schopné navodit protektivní protinádorovou imunitu. TAM také produkují chemokiny atrahující T buňky s imunosupresivními funkcemi (Sica et al., 2006a).

TAM, kromě chemokiny podporované produkce tumorogenních faktorů, jako jsou např. MMP-2, MMP-9, přispívají tvorbou zánětlivých cytokinů jako je TNF- $\alpha$  ke vzniku takzvané amplifikační smyčky, v níž tyto zánětlivé cytokiny indukují v nádorových buňkách zvýšenou expresi chemokinů (kromě tumorogenních faktorů), které do nádorů atrahují další monocyty. Zánětlivé chemokiny mohou také přímo prostřednictvím specifických chemokinových receptorů zvyšovat tumorogenní vlastnosti nádorových buněk (např. zvýšením exprese MMP-9) (Ben-Baruch, 2003).

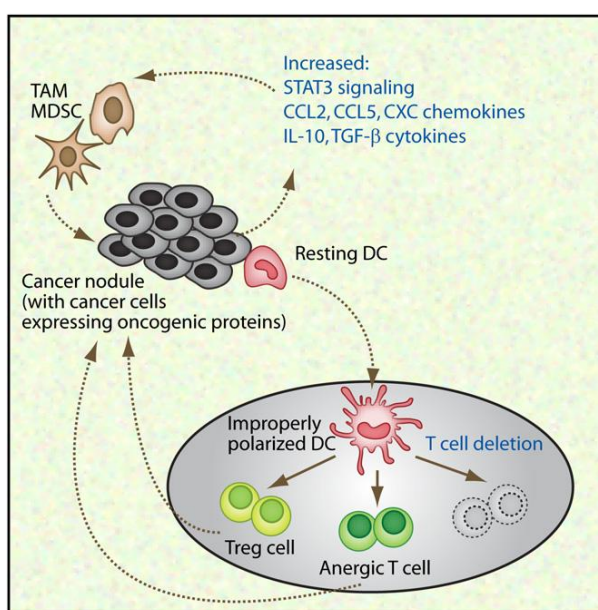


**Obr. 6 Model potenciálních interakcí mezi nádorovými buňkami a buňkami imunitního systému uplatňující se v průběhu rozvoje karcinomu prsu (Ben-Baruch, 2003).**

Hlavními atraktanty monocytických prekurzorů jsou především CC-chemokiny zahrnující CCL-2, CCL-5, CCL-7, CCL-8 (Mantovani, 1999; Conti & Rollins, 2004a; Sawanobori et al., 2008), CXCL12, M-CSF a cytokiny včetně vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF), z krevních destiček odvozeného růstového faktoru (PDGF) a IL-10 (Solinas et al., 2009b; Siveen & Kuttan, 2009; Murdoch et al., 2004; Balkwill, 2004; Mantovani et al., 2008). U mnoha karcinomů korelují hladiny CCL2 a CCL5 s množstvím myeloidních buněk v nádoru (Bottazzi et al., 1983; Balkwill, 2004; Soria et al., 2008). Exprese chemokinů CCL2, pravděpodobně nejčastěji nacházeného CC chemokinu v nádorech (Sica et al., 2006b) a CCL5 byla detekována nejen u nádoru prsu (Luboshits et al., 1999; Ueno et al., 2000), jícnu (Ohta et al., 2002), tlustého střeva (Hu et al., 2009), pankreatu (Monti et al., 2003), cervixu (Zijlmans, 2006), prostaty (Loberg et al., 2006) a melanomů (Varney, 2005), ale také u nádorů ovárií, sarkomů a gliomů (Sica et al., 2006a). Kromě buněk nádoru jsou tyto chemokiny v nádorech rovněž tvořeny fibroblasty, endoteliálními buňkami a makrofágy (Monti et al., 2003; Sica et al., 2006a) a jejich produkce (u lidských malignit) koresponduje se zvýšeným množstvím TAM, metastázami v lymfatických uzlinách a špatnou prognózou (Luboshits et al., 1999; Ueno et al., 2000; Koide et al., 2004). Účinek CCL2 na nádorové buňky závisí na jeho množství v nádorovém mikroprostředí. Např. u melanomu vede nízká exprese CCL2 k mírné infiltraci makrofágy, což směřuje k podpoře růstu nádoru (Nesbit et al., 2001). Naopak vysoké hladiny CCL2 stimulují infiltraci velkým množstvím makrofágů s protinádorovou aktivitou (Nesbit et al., 2001). Podobně CCL5 může mít v určitých situacích protinádorový

účinek, např. u nemalobuněčného karcinomu plic, kde je spojen s účinnou odpovědí lymfocytů (Arenberg et al., 2000).

V současnosti je známo, že CC chemokiny neuplatňují svůj vliv na tvorbu nádorového mikroprostředí pouze prostřednictvím atrahování TAM, ale jejich působení je komplexnější. Exprese onkogenních proteinů v nádorových buňkách způsobuje nadměrnou produkci STAT3, který stimuluje tvorbu chemokinů CCL2, CCL5 a CXC (s cytokiny IL-10 a TGF- $\beta$ ). Tyto faktory atrahují do nádoru TAM a MDSC. Následkem toho dochází k nedostatečné aktivaci a nesprávné polarizaci rezidentních DB v nádoru a v lymfatických uzlinách. To vede ke vzniku anergických a regulačních Treg buněk v lymfatických uzlinách (Melief, 2008b).



**Obr. 7 Rozvrácení odpovědi efektorových buněk během růstu nádoru (Melief, 2008b).**

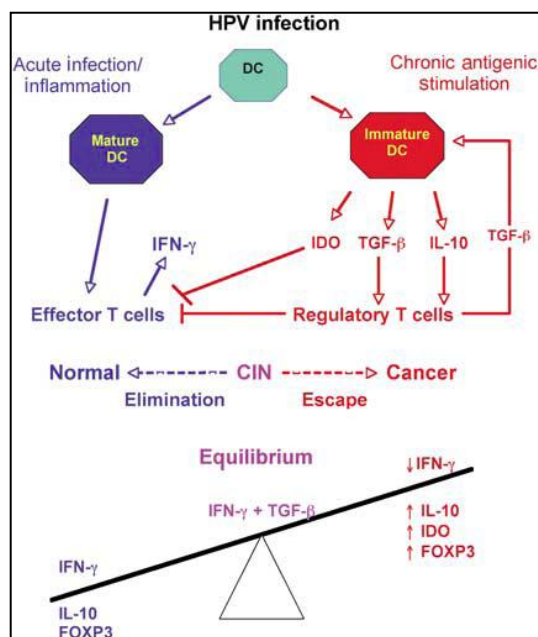
Zatímco bylo mnoha autory popsáno, že buňky děložního čípku (infikované HPV) exprimují atraktanty makrofágů, včetně CCL2, CSF-1 a VEGF, které je možné detekovat ne jen lokálně, ale také v periferní krvi (Riethdorf et al., 1996; Dai et al., 2005; Branca et al., 2006; Adam et al., 1999; Suzuki et al., 1995; Fichorova & Anderson, 1999; Punnonen et al., 1998; Mitsuhashi et al., 2005; Kodama et al., 1999), studiemi role makrofágů v průběhu karcinogeneze cervikálního karcinomu byla získávána vzájemně si odporující data.

Někteří autoři došli k závěrům, že hustota makrofágů s progresí onemocnění klesá (Davidson et al., 1997; Kleine-Lowinski et al., 1999; Heller et al., 2003; Davidson et al., 1999), jiní prokázali, že množství makrofágů se zvyšuje společně s progresí CIN do invazivního karcinomu (Zijlmans et al., 2006; Schoppmann et al., 2002;

Hachisuga et al., 1989; Takehara, 1996; Tay et al., 1987; al-Saleh et al., 1995). Postupně bylo prokázáno silné spojení mezi maligní transformací děložního čípku a lineárním nárůstem počtu CD68+ TAM v intraepiteliálních lézích přecházejících do invazivních stádií (Hammes et al., 2007; Mazibrada et al., 2008).

Studiem cervikálních lézí navozených infekcí HPV bylo zjištěno, že neschopnost imunitního systému vyrovnat se s nádorem u pacientů s karcinomem děložního čípku je způsobena vytvořením nádorového mikroprostředí, pro které je charakteristická přítomnost imunosupresivně působících DB, MDSC, TAM a Treg (Piersma, 2011). Autoři, kteří studovali vývoj imunosupresivního mikroprostředí během karcinogeneze karcinomu cervixu zjistili, že stroma lézí high grade CIN (HGCIN) obsahuje skupinu DB (dendritic cells - DC), které exprimují imunosupresivní faktory (Kobayashi et al., 2008). Tyto buňky se během karcinogeneze vyvíjejí. Postupně se zvětšuje množství buněk exprimujících DC-SIGN a imunosupresivní faktory IL-10 aIDO. Autoři navrhli model cervikální karcinogeneze, ve kterém tyto DB řídí diferenciaci regulačních T buněk a tím ovlivňují polaritu místní imunitní odpovědi. Zkoumáním fenotypu imunitních buněk normálního cervixu, intraepiteliálních neoplázií a karcinomů zjistili, že postupnou malignizací lézí dochází v stromatu ke zvýšení množství Foxp3+ T buněk (Treg buněk), TGFβ+ T buněk, IDO+ DC, IL-10+ DC, buněk exprimujících CD1a a TAM. Naopak koncentrace nádor inhibujících buněk IFN-γ+ a MMP9 pozitivních buněk narůstala od normálního cervixu do CIN a pak strmě klesala.

Přechod z normálního epitelu, přes léze nízkého a vysokého stupně do karcinomu je spojen se ztrátou lokálně exprimovaného IFN-γ (Kobayashi et al., 2008; Scott et al., 2009) a zvýšením množství IL-10 (Kobayashi et al., 2008; Syrjanen et al., 2009). Dochází k vcestování aktivovaných CD4+ a CD8+ T buněk (Kobayashi et al., 2008; Piersma et al., 2007), které nejsou schopné produkovat granzym B (Bontkes et al., 1997) a tvoří PD-1 jako projev vyčerpání (Karim et al., 2009).



**Obr. 8 Model centrální role DC v průběhu imunoeditingu cervikálních lézí indukovaných HPV (Kobayashi, 2008).**

Významnou roli také hrají Foxp3 pozitivní T lymfocyty, které byly detekovány v lymfatických uzlinách postižených metastázami invazivního karcinomu. To svědčí o šíření imunosupresivního vlivu z nádoru do vzdálenějších míst. Toto pozorování by objasňovalo příčinu dříve zjištěné systémové imunitní tolerance k HPV antigenům u pacientů s cervikálním karcinomem (Kobayashi et al., 2008).

Role makrofágů u HPV16 indukovaných nádorů byla také zkoumána s pomocí E6/E7 exprimujícího TC-1 nádorového modelu (Lin et al., 1996; Lepique et al., 2009; Berraondo et al., 2007). Bylo prokázáno, že hlavní populací imunitních buněk infiltrujících TC-1 nádory jsou TAM s M2 profilem (CD45 + CD11b + F4/80 + Argináza I + IL10 +). Získané výsledky jasně ukázaly, že TAM usnadňují růst nádoru inhibicí funkcí protinádorových T buněk prostřednictvím indukce Treg buněk a inhibicí antigenem řízené lymfoproliferace. Odstranění těchto makrofágů z nádorů u myši pomocí lipozomů obsahujících clodronate inhibovalo u myši růst nádoru a zlepšovalo reakce nádorově specifických CD8 T buněk (Lepique et al., 2009).

### 2.2.1 Inhibice CC chemokinů

Aby byla role CC chemokinů při růstu nádorů lépe definována, byly použity různé postupy ke snížení jejich exprese nebo aktivity (shRNA, nízkomolekulární inhibitory, monoklonální protilátky) v rámci preklinických nádorových modelů, v nichž byl stanoven

růst nádoru, metastazování a přežití (Robinson et al., 2003; Nam et al., 2006; Salcedo et al., 2000a; Adler et al., 2003; Stormes et al., 2005; Jayasinghe et al., 2008).

Díky zjištěním, že CCL2 přímo stimuluje přežití, růst a migraci nádorových buněk a nepřímo podporuje infiltraci makrofágy a zrání a činnost osteoklastů (Zhang et al., 2010a; Zhang et al., 2010b) byla testována jako terapeutická možnost protilátka anti-CCL2 v preklinických modelech nádorů prostaty (Loberg et al., 2007a; Li, 2009) a prsu (Lu, 2009). Při systémovém podání neutralizačních protilátek proti CCL2 se ukázalo, že léčba omezila růst nádorových buněk prostaty o 96 % po jejich podání intrakardiální injekcí vedoucí k tvorbě metastáz (Loberg et al., 2007a). Kombinace chemoterapie docetaxelem s podáním neutralizační protilátky proti CCL2 vedla k účinnější inhibici růstu nádoru při porovnání s použitím obou strategií jako monoterapie (Loberg et al., 2007a).

Stejní autoři také zjistili, že systémová aplikace anti-CCL2 protilátky myším s podkožně implantovanými VCaP buňkami karcinomu prostaty podstatně inhibuje růst nádorů (Loberg et al., 2007a). Tato inhibice byla doprovázena nižší infiltrací CD68(+) makrofágy společně s podstatně nižší hustotou mikrovaskulatury.

V preklinickém modelu karcinomu plic byla při kombinaci neutralizační protilátky proti CCL2 s nádorovou vakcínou pozorována výrazně vyšší účinnost s významnou redukcí objemu nádoru a léčebným účinkem přibližně u 50 % nádorů (Fridlender et al., 2010a). Kombinovaná terapie vedla k tvorbě většího množství CD8 + T buněk v nádoru, které byly více aktivovány a více specifické proti nádorovým antigenům, což bylo měřeno pomocí tetramerů. Jako potenciální mechanismus účinku bylo navrženo snížení množství intratumorálních T regulačních buněk.

Prostřednictvím protilátek proti CCL2 byla zjištěna souvislost TAM s modulací růstu nádoru *in vivo* u lidské buněčné linie karcinom pankreatu Panc-1 a lidské melanomové buněčné linie WM115 {Zhang, 1997 4 /id}.

Příkladem pozitivního vlivu inhibice chemokinů CCL2 na imunoterapii nádoru je zesílení protinádorového účinku imunizace AdV5 exprimujícím E7 protein pomocí monoklonální protilátky anti-CCL2/CCL12 při experimentální terapii TC-1 nádorů (Fridlender et al., 2010b). Blokáda CCL2 vedla k významnému posílení imunoterapie. Bylo detekováno zvýšené množství aktivovaných CD8+ T buněk a snížené množství Treg buněk ve slezinách a v nádorech. Množství MDSC, TAM a CD4+ T buněk nebylo blokádou ovlivněno. Byl detekován větší podíl klasicky aktivovaných M1 makrofágů (CD11b+/F4/80+/CD206+) v nádoru. Detekce mRNA různých cytokinů, chemokinů a buněčných adhezních molekul vedla ke zjištění, že blokáda CCL2 proměnila nádorové



mikroprostředí ve více prozánětlivé. Tento stav může vysvětlovat větší množství a aktivaci CD8+ CTL v nádorech (Fridlender et al., 2010a).

Na základě výsledků preklinických testů a díky dostupnosti léků, které ovlivňují chemokiny a byly původně vyvinuty pro použití u autoimunitních a zánětlivých onemocnění, jako je revmatoidní artritida, lupénka, roztroušená skleróza a astma (Horuk & Proudfoot, 2009), bylo zahájeno několik klinických studií. Ve srovnání s množstvím klinických pokusů zaměřených na chemokiny nebo jejich receptory u chorob jako je artritida či astma, je klinických testů zaměřených na chemokiny nebo jejich receptory u nádorů menší množství.

Tyto klinické pokusy se především zabývaly CXCR4 a v menším rozsahu i CCR4, CCR5 a CCL2 (Garber, 2009; Golay & Introna, 2008; Pease & Horuk, 2009; Wells et al., 2006). Jako léky byly použité nízkomolekulární inhibitory, antagonisté peptidů nebo protilátky. Jako antagonisté receptorů byly použity především na N konci zkrácené formy ligandů, což ovlivňovalo signalizaci, ale ne jejich vysoce afinitní vazbu. Nízkomolekulární inhibitory také spíše blokovaly signalizaci receptoru, než vazbu ligandu.

Z různých testovaných léků byly např. čtyři zaměřené na CXCR4, protože to byl jeden z prvních chemokinových receptorů, u něhož bylo zjištěno, že má vliv na metastazování nádorů. Vzhledem k ústřední roli CCR5 v dialogu mezi mesenchymálními kmenovými buňkami (MSC) a nádorovými buňkami (Karnoub et al., 2007), bude blokáda tohoto receptoru také zajímavá, zejména proto, že Maraviroc - antagonist CCR5 byl nedávno schválen FDA pro léčbu HIV infikovaných pacientů. Zatím se stále čeká na výsledky většiny prováděných klinických testů.

Také začala být v rámci terapie karcinomu prostaty v klinických testech fáze I hodnocena bezpečnost neutralizační monoklonální protilátky proti CCL2 (CNTO8880) a účinnost v klinických testech fáze II. Kombinace neutralizačních protilátek proti ose CCL2/CCR2 nebo nízkomolekulárních antagonistů CCR2 s dalšími léčebnými přístupy, jako jsou chemoterapie nebo použití jiných imunomodulátorů, by měly v blízké budoucnosti poskytnout nové terapeutické možnosti léčby karcinomu prostaty a dalších malignit (Zhang et al., 2010b).

### **2.3. GM-CSF jako imunoadjuvans nádorových vakcín**

GM-CSF, který byl původně objeven jako faktor se schopností tvořit kolonie granulocytů a makrofágů z prekurzorových buněk kostní dřeně, může podporovat myeloidní diferenciaci. Receptor pro GM-CSF je exprimován na CD34+ progenitorových

buňkách, všech myeloidních hemopoetických prekurzorech a cévních endoteliálních buňkách. V současnosti se GM-CSF používá v klinice k obnovení populace myeloidních buněk při neutropenii u pacientů po chemo a radioterapii nebo po transplantaci kostní dřeně (Shi et al., 2006). Navíc GM-CSF indukuje proliferaci a migraci endoteliálních buněk, což přispívá k angiogenezi (Bussolino et al., 1993; Mann et al., 2001) a podporuje proliferaci keratinocytů, čímž stimuluje hojení ran (Barrientos et al., 2008; Szabowski, 2000).

GM-CSF je považován za jedno z neúčinnějších adjuvans a byl použit v mnoha nádorových imunizačních schématech zahrnujících vakcinaci prostřednictvím DNA, peptidů, nádorových buněk nebo dendritických buněk (Disis et al., 1996; Slingluff, Jr. et al., 2003; Small et al., 2006).

Při vakcinaci nádorovými buňkami secernujícími GM-CSF byla navozena silná specifická a dlouhotrvající imunita (Dranoff et al., 1993a; Dunussi-Joannopoulos et al., 1997; Hung et al., 1998; Mach et al., 2000a). Bylo zjištěno, že GM-CSF působí na aktivaci makrofágů, granulocytů a NK buněk (Mach et al., 2000b; Gillessen et al., 2003) a současně podporuje lokální atrahování a zrání DB (Ganesh et al., 2009), což hraje významnou roli při indukci T buněčné imunitní odpovědi a vývoji B buněk (Sallusto & Lanzavecchia, 1994; Young et al., 1995; Caux et al., 1992). Tím propojuje přirozenou a adaptivní imunitu (Curtsinger & Mescher, 2010) a hraje významnou roli jak při primingu (Mach et al., 2000c), tak v efektorových fázích protinádorové odpovědi (Scheibenbogen et al., 2000).

GM-CSF může rovněž zvýšit imunogennost nádorových buněk zvýšením prezentace TAA (Fischer et al., 1988). Bylo rovněž prokázáno, že GM-CSF zvyšuje produkci několika cytosinů včetně IL-1, TNF a IL-6, čímž dále podporuje diferenciaci B a T lymfocytů (Armitage, 1998). Navíc GM-CSF zvyšuje citlivost T buněk k IL-2 navozené proliferaci indukci exprese receptoru pro IL-2 (IL-2R) na jejich povrchu (Al-Aoukaty et al., 1994).

Imunitní mechanismy, které jsou odpovědné za protinádorový efekt při použití nádorů exprimujících GM-CSF, jsou cytotoxická odpověď CD8<sup>+</sup> T buněk a CD4<sup>+</sup> T buněk tvořících IFN- $\gamma$  a IL-4, produkce Th1 a Th2 cytokinů, vyšší titry IgG protilátek proti povrchovým a intracelulárním antigenům nádoru, selektivní destrukce cév nádorů, působení aktivovaných eosinophilů a makrophágů.

Imunoterapie pomocí nádorových buněk secernujících GM-CSF byla testována v klinických studiích u pacientů s melanomem, kde vedla k infiltraci metastáz CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T lymfocyty a plazmatickými buňkami, což vedlo k nekróze a fibróze těchto metastáz (Soiffer et al., 1998). Tato metoda byla rovněž testována u pacientů

s nemalobuněčným karcinomem plic (Nemunaitis et al., 2004; Salgia, 2003), karcinomem pankreatu (Jaffee et al., 2001), prostaty (Small et al., 2007) a ledvin (Simons, 1997). Pro určení charakteru imunologického účinky GM-CSF má rozhodující význam dávka podaného cytokinu. Několik pokusů s využitím nižších dávek GM-CSF (< 80 µg/d) ukázalo zlepšení imunitní reakce T-lymfocytů (Parmiani et al., 2007), zatímco pokusy s vyššími dávkami neprokázaly buď žádný účinek nebo sníženou odpověď (Parmiani et al., 2007; Dillman et al., 2003; Weber et al., 2003; Simmons et al., 1999). Předpokládá se, že práh pro nepříznivý účinek GM-CSF je 100 µg/d (Parmiani et al., 2007). Vyšší dávkou mohou být aťhována značná množství MDSC (Serafini et al., 2004a).

Cesta podání a interval mezi dávkami jsou také důležité pro farmakokinetiku GM-CSF (Stute et al., 1992). Pokud bude GM-CSF použit v budoucích studiích, budou muset být tyto důležité vztahy mezi dávkou, způsobem podání, intervalem mezi dávkami a odpovědí brány v potaz.

Předpokládá se, že adjuvantní nebo protinádorový imunizační efekt je maximální, pokud je dosaženo dlouhodobého uvolňování v místě inokulace. Diferenciace DB z primitivních hematopoetických prekurzorů vyžaduje minimálně 6 dnů kultivace v přítomnosti GM-CSF a TNF- $\alpha$  (Morrissey et al., 1987; Caux, 1992). Cytokiny působí parakrinně, což vyžaduje jejich trvalou přítomnost v místě vakcinace. Protein GM-CSF má ovšem krátký poločas rozpadu v plazmě - 0,9 až 2,5 h (Stute et al., 1992). Proto by injekční bolus GM-CSF nebyl pro dosažení silného imunoadjuvantního efektu vhodný.

V mnoha preklinických modelech bylo pozorováno, že trvalé lokální uvolňování GM-CSF v místě vakcinace buňkami secernujícími GM-CSF je efektivní při indukci protinádorové imunity při použití buněk upravených tak, aby uvolňovaly 90 až 300 ng/10<sup>6</sup> buněk/24 hodin (Dranoff et al., 1993b; Teshima et al., 2001). Naproti tomu lokální uvolňování vysokých dávek GM-CSF v místě vakcinace nebo intraperitoneální injekce vedlo k potlačení imunitní protinádorové odpovědi (Serafini, 2004). Vysoké dávky GM-CSF injikované podkožně vedly k expanzi myeloidních supresorových buněk (Filipazzi et al., 2007).

Lokální vliv GM-CSF podaného přímo do nádoru virem vakcinia nebo jinými vektory byl testován v preklinických i klinických studiích v rámci experimentální terapie různých nádorů (Mastrangelo et al., 1999; Stoutenburg et al., 2004). V nádorech bylo zjištěno zvýšené množství dendritických buněk, tumor infiltrujících leukocytů a zvýšené hladiny IFN- $\gamma$ , IL-12 a dalších chemokinů (Pan et al., 2004). Strategie intratumorálního

podání byla v některých případech provázena protinádorovým efektem (Kudo-Saito et al., 2004; Lichtor et al., 2005).

## **2.5 WT1 protein-modelový protinádorový antigen**

Protein 1 Wilmsova nádoru (WT1) je slibný nádorový antigen, který by mohl vést ke vzniku nové třídy univerzálních nádorových vakcín. Ačkoli byl WT1 v prvních publikacích popisován jako tumor supresorový gen (Call et al., 1990; Gessler et al., 1992) vyšlo později najevo, že má také funkci onkogenu (Menke et al., 1998). WT1 je transkripční faktor, který je zapojen do buněčné proliferace, diferenciaci, apoptózy a vývoje orgánů (Drummond et al., 1992; Englert et al., 1995; Hewitt et al., 1995; Goodyer et al., 1995). Některé z jeho charakteristických vlastností z něj činí antigen použitelný pro imunoterapie.

Je významně exprimován v několika typech hematologických malignit stejně jako v solidních nádorech (Oji et al., 1999; Gillmore et al., 2006; Inoue et al., 1997; Nakatsuka et al., 2006; Menssen et al., 1995; Huang et al., 1990; Menssen et al., 1995). Při léčbě antisense oligonukleotidy proti WT1 byla pozorována inhibice růstu leukemických buněk i buněk solidních nádorů (Oji et al., 1999; Yamagami et al., 1996a; Algar et al., 1996; Inoue et al., 1998a) .

WT1 má negativní vliv na diferenciaci, ale podporuje proliferaci progenitorových buněk (Inoue et al., 1998b; Tsuboi et al., 1999). Osaka a kol. (Osaka et al., 1997) ukázali, že buňky s vysokou mírou exprese WT1 měly výraznější tendenci k přechodu do leukémie. WT1 protein je imunogenní a vykazuje vysokou antigenicitu pro T buňky, což bylo popsáno několika skupinami (Gao et al., 2000; Ohminami, 2000; Oka, 2000). U pacientů s malignitami byly prokázány WT1 specifické T buňky, stejně jako IgG protilátky anti-WT1 (Gillmore et al., 2006; Rezvani et al., 2005; Elisseeva et al., 2002; Nicoli et al., 2008; Oji et al., 1999). Ztráta exprese WT vede k zastavení proliferace nebo smrti nádorových buněk. Proto panuje přesvědčení, že riziko vzniku variant nádorových buněk, které by unikly imunitě díky ztrátě antigenů je velmi malé (Oji et al., 1999; Yamagami et al., 1996b).

WT1 je také exprimován v normálních tkáních jako jsou pohlavní orgány (varlata, ovaria), ledviny, slezina a kostní dřeň (Huang, 1990; Hosen, 2002). Navzdory expresi v normálních tkáních, neexistují žádná pozorování, která by svědčila o autoimunitních reakcích jak u myší, tak u lidí po WT specifické imunoterapii (Gao et al., 2000; Ohminami et al., 2000; Oka et al., 2000). Protože WT1 je tělu vlastní antigen, předpokládá se, že T

buňky s vysokou afinitou proti tomuto antigenu jsou odstraněny klonální delecí v thymu (Wiegiers et al., 2011).

V posledních deseti letech byla řada WT1 vakcín testováno v raných fázích klinických zkoušek u mnoha typů solidních a hematologických nádorů (Miyatake et al., 2013; Oji et al., 2010; Ohno et al., 2009; Izumoto et al., 2008; Tsuboi et al., 2007; Kawakami et al., 2007; Morita et al., 2006) . Jako zdroj WT1 antigenu byly použity např. peptidové vakcíny s HLA restrikcí, dlouhé peptidy bez HLA restrikce, DB nesoucí peptidy s HLA restrikcí a DB transfekované mRNA kódující kompletní WT1

Většina testů byla provedena s WT1 peptidy s HLA restrikcí. Vzhledem k vysoké prevalenci HLA- A \* 2402 a HLA-A \* 0201 v japonské a kavkazské populaci byly nejvíce použity peptidové vakcíny omezené na tyto HLA haplotypy. Kromě přirozeně se vyskytujících WT1 peptidů byly použity upravené takzvané heteroklitické peptidy s HLA - A \* 2402 restrikcí (Ohno et al., 2009; Hashii et al., 2010). Heteroklitické peptidy jsou varianty přirozeně se vyskytujících peptidů se stejnou MHC I specifitou, ale s vylepšenou vazbou a stimulační kapacitou T-buněk.

Ačkoli je použití peptidů snadné a levné, má také několik nevýhod. Hlavní nevýhodou je MHC restrikce a tím závislost na pacientově HLA haplotypu. Výběrem peptidu pro jeden typ MHCI molekuly (např. HLA - A \* 0201 nebo HLA - A \* 2402) se zmenšuje počet vhodných pacientů. Navíc jsou v současnosti známé imunodominantní peptidy jen pro omezený počet molekul MHC.

Vakcíny založené na krátkých peptidech jsou schopny především zvýšit množství cytotoxických specifických CD8+ T buněk, ale nemohou přímo aktivovat příbuzné CD4+ pomocné T buňky, které jsou potřebné pro poskytování pomoci cytotoxickým T lymfocytům a k vytvoření dlouhodobé imunity indukci paměťových T buněk. Pro posílení a rozšíření imunostimulační kapacity peptidových vakcín je k dispozici několik možností. Například byly použity delší WT1 peptidy (19-22 aminokyselin) obsahující epitopy MHC II v kombinaci s modifikovanými krátkými WT1 peptidy, v nichž byl arginin (R) na pozici 1 nahrazen zbytkem tyrosinu (Y) (Maslak et al., 2010; Krug et al., 2010).

Zařazení více WT1 epitopů lze získat použitím celého WT1 proteinu, ovšem je známo, že imunizace proteinem vede k indukci humorální místo buněčné imunitní odpovědi a pulsování DB proteiny vedlo převážně k reakci CD4+ pomocných T buněk prostřednictvím prezentace molekulami MHCII bez indukce CD8+ cytotoxických T buněk (Van et al., 2012). Další strategie umožňující obejít HLA restrikce využívá DB

transfekované mRNA WT1, která může obsahovat sekvenci zvýhodňující prezentaci prostřednictvím MHC II, jež byla odvozena z membránových glykoproteinů lysosomů dendritických buněk (Van Tendeloo et al., 2010; Coosemans et al., 2010). Tato strategie je navržena tak, aby zahrnovala všechny epitopy antigenu WT1, které jsou zpracovány DB pro pacientovy vlastní MHC molekuly, bez ohledu na znalost pacientova HLA typu. Využívání mRNA má mnoho dalších výhod, jako například její klinická bezpečnostl bez rizika integrace do hostitelského genomu a možnost současné transfekce DB imunostimulačními molekulami (Van Tendeloo et al., 2007).

### 3. Použité materiály a metody

#### 3.1 Speciální přístroje

<b>Přístroj</b>	<b>Výrobce</b>
ABI Prism 310 genetický analyzátor	PE Corporation
Centrifuga - Labofuge 400R	Heraeus Instruments
Centrifuga - Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments
CO <sub>2</sub> inkubátor	Sanyo
Horizontální elektroforéza EASY-CAST	Owl Scientific
Laminární box - Hera Safe	Heraeus Instruments
Mikroskop Axiovert 200M	Zeiss
Mikroskop MEOPTA DN 817 BI	Meopta
Omni Tissue Homogenizer (TH)	Omni International
Real-time quantitative PCR Rotorgene 3000	Corbett Research
Sonicator MSE- Soniprep 150	MSE Scientific Instruments
Spektrofotometr BIOMATE 3	Thermo Electron Corp.
Thermo-cycler UNOII	Biometra
Trans-Blot SD	BioRad Laboratories
Ultra Microplate Reader EL <sub>x</sub> 808	Bio-Tek Instruments
Ultracentrifuga Optima L-90K	Beckman
UV transiluminátor Gel Doc 2000	BioRad Laboratories
Vertikální elektroforéza Mighty Small II SE	BioRad Laboratories
Vyvolávací přístroj Ecomat 2400	Ecomat
Zdroj napětí - Power pac 200	Biorad Laboratories

## 3.2 Počítačové programy

Název	Výrobce
Vector NTI Suite V.7	InforMax, Inc.
Chromas 1.5	Technelysium Pty Ltd
Clone Manager 9 Professional Edition	Scientific and Educational Software
Enhance Map Draw	Scientific and Educational Software
Flow Jo Version 7.1.2	Tree Star Inc.
GraphPad Prism Version 3.0	GraphPad Software

## 3.3 Chemikálie

Chemikálie	Výrobce
Aceton	Lach-Ner
Agaróza GTG SeaKem	FCM
Agaróza LE SeaKem	FCM
Akrylamid	Serva
Ammonium persulfát	Serva
Ampicilin	Amersham
Antibiotika (penicilin + streptomycin)	Sevapharma
Azid sodný	Serva
Bacto-agar	Difco
Bovinní sérový albumin (BSA)	Sigma
Bromdeoxiuridin (BUdR)	Sigma
Butanol	Lachema
Dihydrogenfosforečnan draselný	Lachema



Dimethylsulfoxid	Sigma
Disodná sůl kyseliny diethyltetraoctové (EDTA)	Sigma
D-MEM	PAA
Dodecyl síran sodný	Sigma
Eosin	Lachema
EPL 4×	Sevapharma
Ethanol 96%	Lachema
Ethidium bromid (EtBr)	Sigma
Fenol	Roth
Fetální bovinní sérum (FBS)	PAA
Fosforečnan sodný	Lachema
Glukóza	Sigma
Glycerol	Sigma
Glycin	Sigma
Histopaque 1077	Sigma
Hydrogenfosforečnan sodný	Lachema
Hydrogenuhlíčan sodný 7,5%	PAA
Hydroxid sodný	Lachema
Hydroxychinolin	Fluka Chemie
Hypoxantin	Sigma
Chloramfenikol	Léčiva
Chlorid cesný	Sigma
Chlorid draselný	Lachema
Chlorid hořečnatý	Sigma

Chlorid sodný	Lachema
Chlorid vápenatý	Sigma
Chloroform	Lachema
Isoamylalkohol	Lach-Ner
Isopropanol	Lach-Ner
Kyselina chlorovodíková	Lachema
Kyselina mykofenolová	Sigma
Kyselina citrónová	Sigma
Kyselina octová	Lachema
Kyselina sírová	Lachema
LB Broth	Amersham
L-glutamin	Sigma
Minimum Essential Medium Eagle (E-MEM)	Sigma
N,N,-Dimethylformamid (DMFO)	Fluka
N,N,N',N' - Tetramethyldiamin (TEMED)	Serva
N,N'-Metylenbis-akrylamid (bisAA)	Serva
Narcotan	Zentiva
Neutrální červeň	Sigma
Octan draselný	Sigma
Octan sodný	Sigma
PBS	Lonza
Peroxid vodíku	Lach-Ner
Persulfát amonný (APS)	Serva
Polyethylenglykol 8000 (PEG)	Sigma

Polyoxyethylensorbitan monolaurát (Tween 20)		Sigma
RPMI 1640		Sigma
Síran hořečnatý		Sigma
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)		Sigma
Trypsin (2%)		Sigma
VIT-MEM		Sevapharma
Vitamíny - MEM vitamins		PAA
3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)		Sigma
4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinetansulfonová (HEPES)	kyselina	Sigma
Xantin		Sigma

### 3.4 Použité enzymy

Proteináza K		Amersham
Ribonukleáza A (Rnáza A)		Amersham
Shrimp alkalická fosfatáza (SAP)		Promega
Taq DNA polymeráza		BioLabs
Pfu DNA polymeráza		Amersham
T4-DNA ligáza		Roche

#### 3.4.1 Restrkiční enzymy a pufry

Alw44I (Apa I)		Fermentas
BamH I		BioLabs
BglII		BioLabs
BlnI		Roche

EcoR I	BioLabs
Hind III	BioLabs
NotI	BioLabs
Hpa I	BioLabs
Nru I	BioLabs
Nsi I	BioLabs
Pst I	BioLabs
Sal I	BioLabs
SphI	BioLabs
Xba I	BioLabs
Xho I	BioLabs
NEBuffer EcoRI	BioLabs
NEBuffer 2	BioLabs
NEBuffer 3	BioLabs
NEBuffer 4	BioLabs
10× Taq polymeráza pufr	BioLabs
10× T4-ligáza pufr	Roche
6× DNA Loading (nanášeci) pufr	Fermentas

### **3.5 Standardy molekulových hmotností**

High Range DNA Marker 1500 – 10000 bp	Fermentas
Low Range DNA Marker 80 – 1031 bp	Fermentas
Protein Marker Broad Range	Biolabs

## 3.6 Syntetické oligonukleotidy

### 3.6.1 Oligonukleotidy použité jako primery při PCR a sekvenování.

LacZ1	Sekvence : 5'- CCC GAG GTG GAA TCA GAA GA -3 Použití: Detekce rekombinant metodou PCR
LacZ2	Sekvence : 5' -TG TCT CCG ATA CGA ACG CTA AAC- 3' Použití: Detekce rekombinant metodou PCR
C23L-1	Sekvence : 5'- AAC AAA GAT TCT TCC TCC AAA CA- 3' Použití: Amplifikace genu C23L a detekce rekombinant metodou PCR
C23I-2	Sekvence : 5'- AAA AGA AGA AGT CGC GAG AGG -3' Použití: Amplifikace genu C23L a detekce rekombinant metodou PCR
35k-intr1	Sekvence : 5'-TCGCTGTCTTTCTCTTCTTCGC -3' Použití: Sekvenování genu vCCI v pCR/Blunt/TOPO a pBSC-Sig vCCI
35SIG-2	Sekvence : 5' -GCA GCT GCC GCC AGG CAC ATA CAT G- 3' Použití: Sekvenování genu vCCI v pCR/Blunt/TOPO a pBSC-Sig vCCI
LIVP1	Sekvence : 5'- ATTCTCGAGCCGCCATGAAACAATATATCGTCC - 3' Použití: Amplifikace genu vCCI viru vakcinie Lister metodou PCR
LIVP2	Sekvence : 5'- TTCAGATCTATAGAGTTATCGATTCA - 3' ' Použití: Amplifikace genu vCCI viru vakcinie Lister metodou PCR
pBSC	Sekvence : 5'-GATAGGCAGCCTGCACCTGA-3'
Reverse	Použití: Sekvenování genu vCCI v plazmidu pBSC-Sig vCCI
pBSC	Sekvence : 5'-TGTGCTGTCTCATCATTTTG-3'
Forward	Použití: Sekvenování genu vCCI v plazmidu pBSC-Sig vCCI
M13	Sekvence : 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'
Reverse	Použití: Sekvenování genu pro vCCI v plazmidu pCR/Blunt/TOPO
M13	Sekvence : 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'
Forward	Použití: Sekvenování genu vCCI v plazmidu pCR/Blunt/TOPO
WTA	Sekvence : 5'- GTG CTG TAT CCT T – 3' Použití: Amplifikace zkráceného myšního genu WT1 metodou PCR
Primer 6	Sekvence : 5'- ATAAGCTTAGATCTTCTCACTGGTTTCAGA T – 3' Použití: Amplifikace zkráceného myšního genu WT1 metodou PCR
pCMV- begL	Sekvence : 5'-AGCTTGGCGTAATCAAGGTC -3' Použití: PCR detekce N-koncové části CMV promotoru zkráceného WT1

pCMV- begR	Sekvence : 5'-TAACCGTATTACCGCCATGC -3' Použití: PCR detekce N-koncové části CMV promotoru zkráceného WT1
Flag L91	Sekvence : 5'-GTCGTCATCGTCCTTGTAATC -3' Použití: PCR detekce vloženého oligopeptidu FLAG zkráceného WT1
Flag R	Sekvence : 5'-TACAGCACGGTCACTTTC-3' Použití: PCR detekce vloženého oligopeptidu FLAG zkráceného WT1

### 3.6.2 Oligonukleotidy s funkcí signální sekvence

Oligonukleotidy s funkcí signální sekvence byly použity pro přípravu viru P13, který exprimoval sekreční formu vCCI.

#### 35SIG-1

Sekvence: 5'-T ATG TGC CTG GCG GCA GCT GCC ATG-3'

Výrobce: Generi Biotech

#### 35SIG-2

Sekvence: 5'-CG TCG ACG GCG GTC CGT GTA TGT AC-3'

Výrobce: Generi Biotech

## 3.7 Protilátky

WT-180, králičí polyklonální IgG proti myšimu WT1	Santa Cruz Biotechnology
Detekční oslí protilátka proti králičím protilátkám	Sigma
Myší protilátka proti epitopu FLAG	Sigma
Detekční králičí protilátka proti myším protilátkám	Sigma
Polyklonální kozí protilátka proti myším IgG značená FITC	BD Pharmingen
Purifikovaná krysí protilátka proti myšimu IFN- $\gamma$	BD Pharmingen
Biotinilovaná krysí protilátka proti myšimu IFN- $\gamma$	BD Pharmingen
Krysí monoklonální protilátka proti myší IFN- $\gamma$ značená PE	eBioscience
Monoklonální protilátka proti H2-Db značená FITC	Serotec, Oxford
Krysí monoklonální protilátka proti myší CD8 značená FITC	eBioscience

Krysí protilátka proti myšimu F4/80 značená PE	ABD Serotec
Krysí protilátka proti myšimu F4/80 značená FITC	Serotec
Krysí protilátka proti myšimu Neutrophile 7/4 značená PE	Serotec
Myší protilátka proti myši H-2Kb/H-2Db	BD-Pharmingen
Krysí protilátka proti myšimu CD8 značená FITC	Pharmingen
Protilátka proti myši CD25 značená Pe.Cyanine 5	eBioscience
Krysí protilátka proti myši CD11b značená FITC	BD-Pharmingen
Křeččí protilátka proti myši CD11b značená PE	BD Pharmingen
Krysí protilátka proti myši CD11c značená FITC	BD-Pharmingen
Křeččí protilátka proti myši CD11c značená PE	BD-Pharmingen
Krysí protilátka proti myši Gr-1(Ly6G) značená FITC	BD-Pharmingen
Krysí protilátka proti myšimu CD3 značená FITC	BD-Pharmingen
Krysí protilátka proti myšimu CD3 značená PE	Serotec
Krysí protilátka proti myšimu CD4 značená FITC	Pharmingen
Myší monoklonální IgG <sub>1</sub> M2 proti oligopeptidu FLAG	Sigma
Králičí polyklonální protilátka WT 180 proti N-konci proteínu WT1	Santa Cruz Biotechnology

### **3.8 Komerční soupravy**

Big Dye <sup>TM</sup> Terminator 3.1 Ready reaction Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
DNA Lego kit	Top-Bio
DNeasy Blood and Tissue Kit	Qiagen
Multi-Analyte ELISArray kit	SABiosciences
ECL Detection Reagents Kit	Amersham
Rapid DNA Ligation Kit	Roche

Z-Competent <i>E.coli</i> Transformation Kit& Buffer set	Zymo Research
BD™ ELISPOT AEC Substrate Set	BD Pharmingen
Cytofix/Cytoperm kit	BD Pharmingen

### 3.9 Roztoky a pufry

Acetátový pufr (0,1 M)	74 ml kyselina octová (0,2 M); 176 ml octan sodný (0,2 M); 750 ml H <sub>2</sub> O; pH 5
ELISA – Blokovací pufr	5% Tween 20 v PBS; 0,05 NaN <sub>3</sub>
ELISA – Promývací roztok	0,05% Tween 20 v PBS
ELISA – Ředící roztok	5% Tween 20 v PBS, 2% BSA
ELISA – Stop roztok	2M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
ELISA – Vyvolávací roztok	1 tabletky TMB; 1 ml DMFO; 9 ml fosfo-citrátového pufru; 2 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
ELISPOT - vyvolávací pufr	5% aminoethylkarbazol v 0,1 M acetátovém pufru
Ethidiumbromid	10 mg ethidiumbromidu do 1 ml TAE
FACS pufr	PBS s 2% fetálního bovinního séra a 0,065% azidu sodného
Fenol-Chloroform-Isoamylalkohol	25 dílů fenolu; 24 dílů chloroformu; 1 díl isoamylalkoholu; 2 zrnka hydroxychinolinu
HeBS 2×	0,28 M NaCl; 0,5 M HEPES; 1,5 M Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,1; v deionizované H <sub>2</sub> O
Laemmliho pufr	60 mM Tris-HCl, pH 6,8; 25% glycerol; 2% SDS; 14,4 mM 2-merkaptoetanol; 0,1 % bromfenolová modř
Lyzovací pufr s proteinázou K	50 mM Tris-Cl, pH 8,0; 1% SDS; 5 mM EDTA, pH 8,0; proteináza K 200 µg/ml
NP40 lyzovací pufr	50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 150 mM NaCl; 1% NP40



PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7.2 – 7,4
SDS-PAGE 12(15)% dělicí gel	4(5) ml 30% akryl-bisakrylamid mix (29 g akrylamid + 1 g N',N'-metylen-bisakrylamid); 3,3(2,3) ml H <sub>2</sub> O; 2,5 ml Tris (1,5 M, pH 8,8); 100 µl 10% SDS; 100 µl 10% amonium persulfát; 4 µl TEMED
SDS-PAGE zaostřovací gel	1ml 30% akryl-bisakrylamid mix; 4,1 ml H <sub>2</sub> O; 750 µl Tris (1M, pH 6,8); 60 µl 10% SDS; 60 µl 10% amonium persulfát; 10 µl TEMED
SDS-PAGE elektroforetický pufr	25 mM Tris; 250 mM glycin; 0,1% SDS; pH 8
Sol I	50 mM glukóza; 25 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA, pH 8
Sol II	0,2 M NaOH; 1% SDS
Sol III	120 ml 5 M octan draselný; 23 ml ledová kyselina octová; doplnit do 200 ml vodou
TAE	40 mM Tris-HCl, pH 7,5; 5 mM acetát sodný; 1mM EDTA-NaOH, pH 8,0
TE	10 mM Tris-HCl, pH 8; 1 mM EDTA-NaOH
TNE	10 mM Tris; 0,2 M NaCl; 1 mM EDTA; pH 7.4
Tris-HCl	12,1 g Tris-báze, doplněno do 100 ml H <sub>2</sub> O, pH upraveno HCl podle potřeby
Western blot – blokovací roztok	10% sušené mléko v PBS
Western blot – blotovací pufr 10×	14 mM Tris; 39 mM glycin; 1,3 mM SDS
Western blot – pracovní semi-dry blotovací pufr s 20% ethanolom	40 ml 10× blotovací pufr; 100 ml ethanol; 360 ml H <sub>2</sub> O
Elektroporační pufr (HeBS)	0,75 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 5 mM KCl, 140 mM NaCl, 6mM glukóza, 25mM Hepes, pH 7,05

## 3.10 Kultivační média

### 3.10.1 Kultivační média pro bakterie

LB médium	10 g Bacto-trypton 5 g Bacto yeast extract 5 g NaCl doplnit do 1 litru deionizovanou H <sub>2</sub> O
LB agar	2% bactoagar v LB médiu
SOB médium	2 g Bacto-trypton 0,5 g Yeast extract 200 µl 5M NaCl 50 µl 1M KCl 1 ml 1M MgCl <sub>2</sub> 1 ml 1M MgSO <sub>4</sub> doplněno do 100 ml deionizovanou H <sub>2</sub> O

### 3.10.2 Kultivační média pro buňky

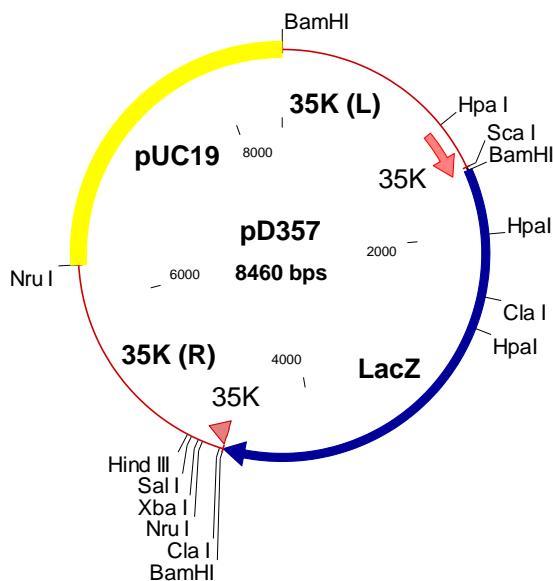
E-MEM	38 ml Minimum Essential Medium Eagle 10× 20 ml FBS 4 ml glutamin (200 mM) 8 ml NaHCO <sub>3</sub> 0,8ml antibiotika (50 000 m.j. penicilin + 50 mg/ml streptomycin, Sevapharma) 4 ml vitamíny 100× konc doplněno do 400 ml H <sub>2</sub> O
EPL	100 ml EPL 4x 8,5 mg VIT-MEM 0,8 ml antibiotika 8 ml NaHCO <sub>3</sub>

R3	38,8 ml RPMI 1640 10× 12 ml FBS 4 ml glutamin (200 mM) 10,6 ml NaHCO <sub>3</sub> 0,8 ml antibiotika 4 ml vitamíny doplněno do 400 ml H <sub>2</sub> O
R4	40 ml RPMI 1640 10× 16 ml FBS 4 ml glutamin 10,6 ml NaHCO <sub>3</sub> 0,8 ml antibiotika 4 ml vitamíny
2×R10	72 ml RPMI 1640 10× 80 ml FBS 8 ml glutamin 21,2 ml NaHCO <sub>3</sub> 1,6 ml antibiotika 8 ml vitamíny
D10	500 ml D-MEM se stabilizovaným NaHCO <sub>3</sub> 50 ml FBS 292 mg L-glutamin (Sigma) 1 ml antibiotika
Verzen/trypsin	40 ml sterilního PBS 0,4 ml 0,5 M EDTA 8 ml Trypsin doplněno do 400 ml H <sub>2</sub> O

## 3.11 Plazmidy

### pD357

Plazmid pD357 (Obr. 9) určený k delecí vCCI genů z viru vakcínie jsme získali od Dr. Patela z MRC Virology Unit, University of Glasgow. Obsahuje DNA fragment z VACV kmenu Lister, ve kterém je 35K protein deletován záměnou za LacZ gen pro  $\beta$ -galaktosidázu E.coli. Tento gen je pod kontrolou promotoru genu vCCI (35K) z viru vakcínie a je lemován jak před (cca 1500 bp), tak za (cca 250 bp) zbytky genu vCCI. Základem tohoto plazmidu je pUC19 (obr. 9).



Obr. 9: Plazmid pD357

### pCR-Blunt TOPO

Plazmid pCR/Blunt/TOPO, který je součástí kitu Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit for Sequencing firmy Invitrogen, byl použitý jako mezistupeň při klónování genu 35K z viru vakcínie Praha 13 do rekombinačního plazmidu pD357.

### pGPT07

Plazmid pGPT07 (Boyle & Coupar, 1988) byl použit jako zdroj markerového genu pro guanin xantin fosforibosyl transferázu (GPT) z E.coli, který byl po vyštěpení zaligován do plazmidu pD357-Rev.

### **pBSC**

Konstrukce tohoto plazmidu, do níž byly zavzaty plazmidy pBCMGNeo.mIL-2 (Karasuyama et al., 1989) a pBluescript-SK (Stratagene), byla popsána v publikaci z roku 2001 (Smahel et al., 2001).

### **pBSC SigE7GGGLAMP**

Tento plazmid, který byl použit jako DNA vakcína při testování vlivu sekreční formy vCCI na navození HPV E7 specifické CTL bez přítomnosti virové infekce, vznikl vložením genu Sig/E7/LAMP-1 do XhoI místa pBSC. Konstrukce byla popsána v roce 2001 (Smahel et al., 2001).

### **pGM-CSF-N1**

Plazmid pGM-CSF-N1, který byl použit pro přípravu rekombinant exprimujících GM-CSF, vznikl zaklonováním genu GM-CSF do pJp plazmidu za 7,5k promotor. Pomocí tohoto plazmidu byl 550 pb fragment s cDNA pro myši GM-CSF vložen do genu pro thymidin kinázu (TK) VACV.

### **pBSC/E7GGG.GUS**

Plazmid pBSC/E7GGG.GUS byl použit jako DNA vakcína obsahující E7 protein HPV16 s třemi bodovými mutacemi ve vazebném místě pro pRb, který byl fúzován s genem pro  $\beta$ -glukuronidázu E.coli (GUS). Konstrukce tohoto plazmidu byla popsána v publikaci z roku 2004 (Smahel et al., 2004). Gen pro  $\beta$ -glukuronidázu E.coli je používán jako reportérový gen při experimentech s rostlinnými buňkami. Kóduje enzym, který je velmi stabilní a detekce jeho aktivity slouží pro zjištění úrovně exprese transgenů. Po fúzi tohoto genu s epitopy zvířecích virů byla pozorována jejich vysoká imunogennost. Ve srovnání s fúzním genem SigE7GGGLAMP byla při DNA imunizaci zjištěna vyšší imunogennost tohoto genu.

### **pBlues WT1**

Plazmid pBlues WT1, exprimující myši gen WT1, byl v průběhu konstrukce plazmidu pBK-CMV<sub>s</sub>WT1 použit jako templát pro pomnožení zkrácené formy WT1 genu metodou PCR. Tento plazmid byl vytvořen z plazmidu CMV-WT1, který nám poskytl Jerry Pelletier (Kanada), ligací 1500bp velkého fragmentu vzniklého štěpením CMV-WT1 enzymem Sau3AI(= Bsp143I) do plazmidu Bluescript naštěpeného enzymem BamHI.

### **pBK-CMV**

Plazmid pBK-CMV je expresní vektor, vytvořený z plazmidu pUC. Umožňuje expresi jak v prokaryotických systémech, kde je řízena Lac promotorem, tak v eukaryotických systémech, kde je pod kontrolou okamžitě časného CMV promotoru. Ke klonální selekci stabilně transfekovaných eukaryotických buněk je použito antibiotikum G418 díky přítomnosti genu pro rezistenci na neomycin/kanamycin pod kontrolou SV40 časného promotoru a terminačního transkripčního a polyadenylačního signálu TK.

### **LMVmWT1**

Plazmid LMVmWT1, který obsahuje gen pro myši WT1 nám laskavě poskytl M. Murakami (Osaka).

## **3.12 Bakterie**

*Escherichia coli* XL1-Blue: *supE44 hsd R17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac-F'*  
[*proAB+lacqlac ZΔM15Tn10(tetr)*]

## **3.13 Buněčné linie**

- CV-1** Buňky odvozená od fibroblastů z ledvin kočkodana zeleného.
- CEF** Primární fibroblasty z kuřecích embryí, které byly použity pro pomnožení viru MVA, byly kultivovány v médiu E 199 (Sevapharma) s 10% prekolostrálního telecího séra.
- RAT-2** Buněčná linie postrádající thimidin kinázu odvozená z krysích emryonálních fibroblastů.
- BSC40** Buněčná linie odvozená od fibroblastů z ledvin kočkodana zeleného adaptovaná na růst při 40°C (Brockman & Nathans, 1974). Rekombinantní VACV pomnoženy před následnou purifikací pomocí sacharózového gradientu.
- 293T** Buněčná linie odvozená od lidských ledvinných epiteliálních 42 buněk, transformovaná adenovirovým genem E1A a LT viru SV-40.
- TC-1** Buněčná linie odvozená z primárních plicních epiteliálních buněk myši C57BL/6 transformovaných proteiny HPV16 E6, E7 a aktivovaným onkogenem ras (Lin et al., 1996). Buňky byly poskytnuty Dr. T. C. Wu z Baltimoru.

**TC-1/A9** Buňky charakterizované nižší expresí MHCI byly použity pro experimentální terapii kombinující DNA vakcinaci s lokálním podáním MVA exprimujícího GM-CSF do nádoru. Byly vytvořeny z TC-1 buněk v myších imunizovaných proti E7 onkoproteinu biobalisticou metodou „gene gun“ (Smahel et al., 2003).

### **3.14 Pokusná zvířata**

Myši kmene: C57Bl/6; stáří 6 týdnů (Charles River, Německo)

### **3.15 Viry**

#### **Virus vakcinie, kmen Praha, klon 13 (P13)**

Vakcinia virus klon P13 byl izolován z vakcíny Sevac VARIE (kmen Praha).

#### **Virus vakcinie, kmen Lister (LIVP)**

Virus vakcinie, kmen Lister (LIVP) byl získán od Dr. Černose z Moskvy. Viry byly pomnoženy na buňkách BSC40, purifikovány centrifukací přes sacharózový gradient a titrovány na CV-1 buňkách.

#### **Virus MVA - modifikovaná vakcinie Ankara**

Virus **MVA** je vysoce atenuovaný virus neschopný replikace ve většině savčích buněk. Byl vytvořen v Německu v 50. letech 20. století opakovaným pasážováním (více než 570krát) chorioalantoidního VACV viru Ankara (CVA), který byl v Turecku používán jako vakcína proti pravým neštovicím, na kuřecích fibroblastech (CEF). U většiny buněk probíhá po infekci MVA časná, intermediální a pozdní exprese bez tvorby virionů. Rekombinantní viry vakcinie na bázi kmene MVA byly připraveny z MVA klonu 2, který byl izolován plakovou purifikací v naší laboratoři z rodičovského MVA. Ten byl získán od W. Altenburgera (Basilej).

#### **P13-E7GGG**

Rekombinantní virus P13-E7GGG obsahuje gen modifikovaného E7 proteinu, který je vložen do TK genu pod kontrolou časně-pozdního promotoru H5.

#### **P13-preS2S**

P13- $\Delta$ 35K-preS2S je rekombinantní VACV P13 exprimující modelový antigen preS2S z HBV. Virus má současně delecii 35K gen. Byl vytvořen jako kontrolní virus.

### **P13-GM-CSF a MVA-GM-CSF**

P13-GM-CSF a MVA-GM-CSF jsou rekombinantní VACV kmene Praha 13 a MVA, které obsahují gen pro GM-CSF vložený do genu TK VACV. K jejich přípravě byl použit plazmid pGM-CSF-N1 (viz. 3.11). Selektce TK- virů byla prováděna na buňkách RAT-2 v přítomnosti BUdR. Rekombinantní viry byly odlišeny od spontánních TK- mutant produkcí vloženého proteinu (ELISA).

### **MVA-SigE7LAMP**

Virus vakcínie MVA obsahující fúzní gen SigE7LAMP pod kontrolou časně-pozdního promotoru 7,5 vložený do lokusu F7L byl vytvořen homologní rekombinací s plazmidem pVS34 (Mackova et al., 2004). Rekombinace a následná selektce rekombinant byly provedeny podle standardních postupů. Rekombinantní viry s genem pro GPT byly selektovány a dvakrát plakově purifikovány pod selekčním tlakem kyseliny mykofenolové, xantinu a hypoxantinu (viz. 3.16.3.3). Poté byla provedena dvojitá plaková purifikace bez selekčního tlaku, která vedla k vytvoření GPT- fenotypu. Viry obsahující fúzní gen SigE7LAMP byly detekovány pomocí PCR.

### **MVA-SigE7LAMP-GM-CSF**

K přípravě dvojité rekombinanty MVA-SigE7LAMP-GM-CSF byl použit virus MVA-SigE7LAMP jako rodičovský, u něhož byl do genu pro TK vložen gen pro GM-CSF.

## **3.16 Metody**

### **3.16.1 Práce s DNA**

Základní metody práce s DNA zahrnující přípravu a transformaci kompetentních bakterií, přípravu konzerv transformovaných bakterií, izolaci plazmidové DNA, čištění plazmidové DNA v CsCl gradientu, ethanolové srážení, štěpení DNA restrikčními enzymy, použití DNA modifikujících enzymů (T4 DNA polymeráza, telecí alkalická fosfatáza) elektroforézu v agarózovém gelu a ligace DNA fragmentů jsme prováděli, pokud není uvedeno jinak, podle manuálu „Molecular Cloning: A laboratory manual (Third Edition)“ (Joseph Sambrook et al., 2000) a „Current Protocols in Molecular Biology“ (Frederick M. Ausubel, 2004).

#### **3.16.1.1 Izolace DNA z gelu pomocí Lego kitu (Top-Bio)**

Z gelu připraveného z GTG nízkotající agarózy jsme vyřízli proužek obsahující požadovanou DNA. Při její následné izolaci jsme postupovali podle návodu, který je součástí soupravy DNA Lego kit (Top-Bio).



### **3.16.1.2 Čištění plazmidové DNA polyethylenglykolem**

K 50 $\mu$ l DNA získané minipreparací jsme přidali 8  $\mu$ l 4M roztoku NaCl a 40 $\mu$ l 13%-ního roztoku PEG 8000. Směs jsme inkubovali na ledu 20 - 30 min. Poté jsme ji centrifugovali 15 min. při 14000 g a 4°C. Vzniklý průhledný pelet jsme opláchli 500  $\mu$ l 70% etanolu, krátce stočili a nechali schnout na vzduchu. Vyschlý pelet jsme sterilně rozpustili ve 20-30  $\mu$ l vody.

### **3.16.1.3 Ligace rychloligačním kitem**

Vektor a insert jsme rozpustili v dilučním DNA pufru v celkovém objemu 10 $\mu$ l směsi (celkový obsah ligované DNA nepřekročil 200ng, maximální množství vektoru bylo 50ng). Poměry molárních množství vektoru vůči insertu byly zvoleny dle velikostí ligovaných fragmentů 1:1, 1:3 až 1:5. Následně jsme ke směsi přidali 10 $\mu$ l T4 DNA ligačního pufru a 1 $\mu$ l T4 DNA ligázy. Ligační reakce probíhala 5 minut při pokojové teplotě. Ligáza byla následně inaktivována inkubací při 65°C po dobu 10 minut. Po elektroforetické analýze jsme 1 $\mu$ l ligační směsi použili k transformaci bakterií.

### **3.16.1.4 PCR detekce rekombinant**

PCR směs připravená v celkovém objemu 10  $\mu$ l obsahovala:

1  $\mu$ l 10x Taq polymeráza pufr

3 pmol primer

3 pmol IGFBP3/left

200 pmol roztok DTP

0,3  $\mu$ l Taq polymeráza

1  $\mu$ l izolovaná DNA

Směs byla umístěna do cykleru, ve kterém probíhala PCR reakce za těchto podmínek:

- 1) 94°C 3 min.
- 2) 50°C 30s
- 3) 72°C 1 min.
- 4) 94°C 30s
- 5) 50°C 30s
- 6) 72°C 1 min.
- 7) 72°C 10 min.
- 8) 4°C do umístění na ledu

Kroky 4 až 6 se 30x opakovaly. Produkty PCR jsme poté analyzovali agarózovou elektroforézou.

#### **3.16.1.5 Sekvenování pomocí kitu Big Dye™ Terminator 3.1**

Pro sekvenování 35K genu z viru vakcinie Praha 13 vloženého do plazmidu pCR4 BLUNT-TOPO jsme použili primery, které jsou součástí kitu – v případě terminálních částí genu se jednalo o primery T3, T7, M13. Centrální část genu jsme sekvenovali pomocí primerů 35K-intr-1 a 35K-intr-2 nalezených programem Vector MTI-suite. Vložení signální sekvence do plazmidu pD357-Rev jsme zjišťovali pomocí primeru SigC35-sekv. Správnost sekvence vCCI jsme během konstrukce expresního plazmidu pBSC-vCCI kontrolovali sekvenováním pomocí primerů pBSC reverse, forward a 35K-intr-1 a 35K-intr-2. K sekvenování jsme použili kit Big Dye™ Terminator v3.1. Jednotlivé vzorky jsme připravili podle protokolu, který je součástí tohoto kitu. Vzniklé fragmenty jsme analyzovali na automatickém sekvenačním přístroji ABI 310 a získané údaje jsme vyhodnotili pomocí programu Chromas 1.5 a programy, které jsou dostupné na internetových stránkách <http://justbio.com> a <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

#### **3.16.1.6 Transfekce kalciumfosfátovou precipitací**

Na Petriho misky jsme nasadili 5 ml suspenze buněk 293T o koncentraci 2.106. Buňky jsme nechali narůst do 60-70%-ní konfluence pro optimální účinnost transfekce a výtěžek. Smíchali jsme 6µg DNA s 20µl CaCl<sub>2</sub> a doplnili vodou do celkového objemu 200µl. Vzniklou směs jsme pomalu přikapávali k 200µl 2x koncentrovaného HeBs a nechali 1 minutu precipitovat při pokojové teplotě. Následně jsme roztok nakapali do média na buňky. Druhý den jsme vyměnili médium za čerstvé. Po 48 hodinách jsme detekovali produkci proteinu transfekovanými buňkami.

#### **3.16.1.7 Transfekce elektroporací**

Elektroporaci jsme provedli pomocí přístroje Gene Pulser Electroporation system (Bio-Rad, Hercules, CA). Před elektroporací byl plazmid pBK-CMV/WT1-321 enzymem Alw44I. Buňky ( $5 \times 10^6$ ) resuspendované v 500 µl elektroporačního pufru jsme umístili do kyvety o světlosti 0,4 cm (Bio - Rad, Hercules, CA) a přidali jsme 15 µg plazmidové DNA. Poté jsme je vystavili elektrickému pulzu 250V, 975 µF při pokojové teplotě. 10 minut jsme je ponechali v elektroporačním pufru a následně jsme je přenesli do Petriho misek se 4 ml kultivačního média. Po 48 hodinách kultivace jsme buňky zcentrifugovali a resuspendovali v selekčním médiu s neomycinem. Abychom optimalizovali postup,

modifikovali jsme postupně experimentální podmínky s použitím plazmidu pTR-UF2 s genem pro GFP. Buňky transfekované pTR-UF2 jsme 24 hodin po elektroporaci prohlédli ve fluorescenčním mikroskopu. Účinnost transfekce jsme určili analýzou exprese GFP pomocí průtokové cytometrie na přístroji Flow Cytometer EPICS XL (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA).

### **3.16.2 Práce s buňkami**

#### **3.16.2.1 Kultivace a pasážování buněk**

Při kultivaci a pasážování buněk jsme postupovali podle manuálu „Culture of animal cells” (R Ian Freshney, 2005). Buňky CV-1 jsme nejdříve kultivovali v médiu R4, později jsme přešli na kultivaci v médiu E-MEM. Buňky BSC40 byly kultivovány v médiu D10, buňky 293T v médiu D10, buňky RAT-2 v médiu R3.

#### **3.16.2.2 Zmrazování buněk a rozmrazování buněk**

Zmrazování a rozmrazování buněk jsme prováděli opět podle manuálu „Culture of animal cells” (R Ian Freshney, 2005).

### **3.16.3 Práce s viry**

Viry jsme pěstovali na buňkách CV-1 a BSC-40. Rekombinaci, selekci a plakovou titraci jsme prováděli podle standardních postupů (Mackett et al., 1984; Paoletti et al., 1984; Perkus et al., 1986).

#### **3.16.3.1 Rekombinace do viru vakcinie**

Při rekombinaci jsme použili kalcium-fosfátovou precipitaci, při které jsme 25 $\mu$ g plazmidové DNA čištěné CsCl gradientem v 50 $\mu$ l H<sub>2</sub>O smíchali se 175  $\mu$ l 2xHeBS. 175 $\mu$ l virového roztoku (0,1 ml viru, titr nejméně 2x10<sup>7</sup> PFU/ml, 0,7 ml H<sub>2</sub>O, 88,8  $\mu$ l 2,5M CaCl<sub>2</sub>) jsme poté přikapávali za stálého protřepávání k roztoku plazmidové DNA v HeBs. Následovalo 30 minut stání při pokojové teplotě. Poté jsme k směsi přidali 0,35 ml média EPL a použili ji k infikování buněk. Po 48 hodinách jsme infikované buňky 3x zmrazili a rozmrazili, zbytky buněk jsme odstranili centrifugací (400g, 4°C, 10 min.), v získaném supernatantu jsme detekovali rekombinantní viry. Ty jsme následně plakově purifikovali s použitím různých metod selekce rekombinant, které jsou popsány v následujících kapitolách a charakterizovali dalšími metodami (restrikční analýza, produkce proteinu testem ELISA nebo western blot).

### **3.16.3.2 Selekcce rekombinant barvením při expresi $\beta$ -galaktosidázy**

Rekombinanty s delecí vCCI exprimující  $\beta$ -galaktosidázu ( $\beta$ -gal) *Escherichia coli* jsme odlišili vizuálně jako modré plaky po obarvení chromogenním substrátem 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosidase (X-gal), který je přeměněn působením  $\beta$ -gal na tmavě modrou barvu. Dvojitě deleční mutanty s  $\beta$ -gal v obou lokusech C23L/B29R jsme získali opakovanou plakovou purifikací až do získání homogenní populace tvořící po obarvení X-galem pouze modré plaky.

### **3.16.3.3 Selekcce rekombinant díky expresi Ecogpt (transient dominantní selekcce)**

Selekcce rekombinant díky expresi Ecogpt jsme použili při přípravě revertních virů RevP13- $\Delta$ vCCI-E7GGG, kde byl gen pro vCCI zpětně vložen v tandemu společně s genem pro guanin fosforibosyl transferázu (GPT). Rekombinanty jsme nejdříve selektovali a dvakrát plakově purifikovali na buňkách CV-1 v přítomnosti kyseliny mykofenolové 25 $\mu$ g/ml, xantinu 250 $\mu$ g/ml a hypoxantinu 14 $\mu$ g/ml. Poté jsme je pomnožili a dvakrát plakově purifikovali již bez selekčního tlaku GPT, aby z viru s přechodným stavem genomu po jednoduchém crossing-overu vznikl rodičovský virus (zde P13- $\Delta$ vCCI-E7GGG) a požadovaný revertní virus, který vznikl dvojitým crossing-overem. Konečný virus jsme nakonec vybrali metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) z virů, které tvořily homogenní populaci bílých plaků při barvení X-Galem na přítomnost genu Lac-Z a nerostly za selekčního tlaku GPT.

### **3.16.3.4 Selekcce rekombinant jako TK negativního viru**

Tuto metodu, která je založená na inzerci cizího genu do TK- lokusu VACV, jsme použili pro přípravu virů P13-GM-CSF, MVA-GM-CSF a MVA-SigE7LAMP-GM-SCF. TK- rekombinanty jsme selektovali plakovou purifikací na TK- negativních buňkách RAT-2 s použitím 5-bromodeoxyuridinu (BudR). Rekombinantní viry jsme odlišili od spontánních TK- mutant produkcí vloženého proteinu, kterou jsme analyzovali metodou ELISA.

### **3.16.3.5 Pomnožení viru – zásobní virová suspenze**

Plně narostlé buňky CV-1 nebo BSC40 na plastové lahvičce o ploše 175 cm<sup>2</sup> jsme infikovali materiálem z 1 mikrozkušky. Po 1 hodině adsorpce jsme buňky přelili 50 ml média D10 a umístili do CO<sub>2</sub> inkubátoru. Druhý den, kdy cytopatický efekt dosahoval zhruba 50%, jsme z buněk slili 20 ml média a buňky jsme kultivovali ještě 1 den. Zbylé

buňky jsme škrabkou uvolnili do média, které jsme centrifugovali 10 min. při 300 g a 4°C. Sediment jsme resuspendovali v 10 ml supernatantu a na ledu sonikovali. Získaný materiál jsme poté centrifugovali při 780 g a 4°C po dobu 20 min. Supernatant (tzv. rychlý koncentrát) jsme rozplnili do mikrozkušavek po 1 ml a uložili na -70°C. Před dalším použitím jsme zjistili titru viru.

#### **3.16.3.6 Sonikace viru**

Suspenzi viru jsme sonikovali na ledu 3 × 1 min. na stupeň 6 se 30s přestávkami pro ochlazení vzorku. Rozsonikovaný virus jsme naředili a použili pro infekci.

#### **3.16.3.7 Izolace DNA pro detekci rekombinant pomocí PCR**

Kulturu CV-1 buněk narostlých do 80% konfluency, které byly nasazené den předem na 24 jamkový panýlek, jsme infikovali 0,1 ml virové suspenze na jamku. Po jedné hodině v inkubátoru jsme přidali 0,9 ml média a panýlky jsme umístili do inkubátoru na 24 hodin. Pokud byl po této době patrný cytopatický efekt (CPE), odsáli jsme médium a buňky jsme jedenkrát opláchli 1ml studeného PBS. Poté jsme přidali 0,5 ml lyzovacího roztoku s proteinázou K. Panýlky jsme ponechali v inkubátoru nejméně 4 hodiny.

Lyzát jsme odsáli do mikrozkušavek a inkubovali 10 minut při teplotě 90°C, aby došlo k inaktivaci proteinázy K. Následně jsme přidali 0,5 ml fenol-chloroform-isoamylalkoholu (25:24:1), mikrozkušavky 15 sekund vortexovali a následně centrifugovali 3 minuty při otáčkách 12000 ot./min. a 24°C. Horní fázi jsme precipitovali etanolem (50μl 3M octanu sodného, pH 5,2 + 1ml ledového absolut etanolu) při -20°C jednu hodinu. Poté jsme ji centrifugovali 30 minut při otáčkách 12000 ot./min. a 4°C. Pelet jsme resuspendovali v ledovém 70% etanolu a opět centrifugovali 30 min. při otáčkách 12000ot./min. a 4°C. Konečný pelet jsme sušili 30 minut při 20°C, resuspendovali v 30μl H<sub>2</sub>O a zmrazili při -20°C.

#### **3.16.3.8 Izolace virové DNA z buněk infikovaných VACV pro přípravu genu vCCI**

Konfluentní buněčnou kulturu jsme po infekci VACV při MOI 0,1 přelili 30-35ml média na jednu Roux lahev. Médium jsme ponechali do úplného cytopatického efektu a kulturu jsme následně zmrazili. Po rozmražení jsme ji pohybem ledové tříštiny odstranili ze stěn láhve. Veškerý obsah jsme centrifugovali 20 minut při 2000 ot./min. a při 4°C. Pelet jsme resuspendovali v 500μl supernatantu a přenesli do mikrozkušavky. V ní jsme jej sonikovali 3krát po jedné minutě při odchylce 6μm za současného chlazení v ledové vodní lázni. Po sonikaci jsme pelet spojili se zbytkem supernatantu, kterým byla mikrozkušavka vypláchnuta. Virovou suspenzi jsme klarifikovali (centrifugace 20 minut při 2000 ot./min.

a 4°C), abychom odstranili buněčnou drť. Supernatant, který obsahoval virus, jsme centrifugovali v rotoru SW 27–28 60 minut při 20000 ot./min. a 4°C. Pelet jsme resuspendovali ve 450µl reakčního pufru (60 mM KCl, 15 mM NaCl, 20 mM TRIS/HCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.8). Poté jsme k němu přidali 1µl zásobního roztoku mikrokokální nukleázy, který byl připravený z lyofilizovaného prášku rozpuštěného v pufru (50mM TRIS/HCl, pH 7.9, 1mM NaCl, 1 mM EDTA, 500µM dithiothreitol – DTT, 0.1% Nonident P-NP-40, 50% glycerol). Směs jsme inkubovali přes noc při 37°C. Reakci jsme zastavili přidáním 200µl 0,5 M EDTA a následně materiál centrifugovali 60 minut při 15000 ot./min. a 4°C. Sediment jsme resuspendovali ve 400µl TNE. Virovou DNA jsme extrahovali přidáním 50µl 5%ního lauroylsarkosinátu a 10µl roztoku proteasy K (1mg/ml) (poté nebylo se směsí třepáno nebo vortexováno). Směs jsme inkubovali hodinu při 37°C, pak jsme provedli trojí extrakci fenol-chloroformovou směsí a jednu extrakci chloroformem s isoamylalkoholem (v poměru 24:1). V průběhu každé extrakce jsme materiál cca 20-30 minut míchali na laboratorním rolleru a následně centrifugovali 10 minut při 13000 ot./min. a 18°C. Po extrakci jsme k vyčištěné vodné fázi přidali desetinu jejího objemu 5M octanu amonného a 2,5 násobek 96% etanolu. Směs byla 30 minut míchána a přes noc precipitována na -20°C. Sraženinu jsme po odstranění etanolu přes noc rozpustili v 10-15µl TE.

### **3.16.3.9 Stanovení DNA viru vakcínie v myších ováriích pomocí Q-PCR**

Po i.p. podání viru jsme myši po aplikaci inhalační anestezie (Narcotan, Léčiva Praha) usmrtili a odebrali z nich ovária, opláchli je v PBS a homogenizovali v 0.4ml PBS pomocí tkáňového homogenizátoru Omni TH-220. Dále jsme z nich extrahovali DNA pomocí DNeasy Tissue Kitu podle protokolu „Purification of Total DNA from Animal Tissue“, který je součástí kitu. Pro odstranění kontaminace RNA jsme DNA vzorky inkubovali 2 minuty se 4µl RNasy A. Real-time kvantitativní PCR jsme provedli s 2µl celkové DNA v reakčním objemu 20µl, 0.2mM dNTP, 5mM MgCl<sub>2</sub>, forward primerem 5'-TTG GCA ATA GTC CGT GTA ATC – 3' (300 nM), reverse primerem 5'- ATA CTT AAT CAT GTC GCC GAC – 3' (300 nM), a Taqman sondou 5'- CCA GTA ACA CGA GCT GGT GCT TGC TAG – 3' BHQ1-FAM (250 nM). Reakce byla vyhodnocena pomocí zařízení real-time quantitative PCR Rotorgene 3000. Pro vytvoření standardní křivky a určení množství virové DNA jsme použili plazmid obsahující amplifikovaný fragment. Množství virové DNA bylo normalizováno s celkovým množstvím DNA v každém vzorku. Detekčním limitem bylo 7 kopií na 100ng celkové DNA.

### **3.16.4 Práce s proteiny**

#### **3.16.4.1 Příprava vzorků pro SDS-PAGE**

V průběhu naší práce jsme analyzovali proteiny v transfekovaných či infikovaných buňkách a v médiích, které byly kondicionovány proteiny produkovanými buňkami po infikování virem. Při přípravě vzorků z transfekovaných buněk jsme nejdříve odsáli médium, buňky jsme opláchli 5 ml vychlazeného PBS a zcentrifugovali při 300 g po dobu 5 min. a 4°C. Následně jsme pelet buněk znovu opláchli 5 ml PBS a stočili. Promyté buňky jsme resuspendovali ve 40 µl NP40 lyzovacího pufru. Směs jsme umístili 10 min. na led, a vzniklý lyzát jsme centrifugovali 2 min. při 12000 g. Poté jsme z něho odebrali 40 µl, k nímž jsme přidali 10 µl Laemmliho pufru a nechali 5 min. povařit. Poté jsme vzorky nanášeli na SDS-PAGE nebo uschovali na -20°C.

Při přípravě vzorků obsahujících secernované virové proteiny jsme nejdříve CV-1 buňky infikovali VACV při MOI 3 (Multiplicity of Infection). Po dvou hodinách jsme kultivační médium vyměnili za RPMI médium bez séra. Po dvaceti hodinách jsme odebrali supernatanty, přidali k němu koktejl inhibitorů proteáz (Sigma, Aldrich, Steinheim,

Německo) a po klarifikaci jej zakoncentrovali pomocí centrifugace v Amicon Ultracell-10k (Millipore). Vzniklý koncentrát jsme smíchali s Laemmliho pufrem obsahujícím 2-merkaptóetanol a zahřáli na 5 min. při 95°C. Zbylé buňky jsme dvakrát opláchli PBS a resuspendovali v PBS, který obsahoval koktejl inhibitorů proteáz. Buňky jsme rovněž lyzovali Laemmliho pufrem obsahujícím 2-merkaptóetanol a následně zahřáli na 5 min. na 95°C. Proteiny byly poté separovány pomocí SDS-PAGE 15%-ní gelové elektroforézy a přeneseny na nitrocelulósovou membránu Hybond-C Extra.

#### **3.16.4.2 Srážení proteinů acetonem**

Médium z transfekovaných buněk jsme přenesli do mikrozkušavek a centrifugovali při 300 g 5 min. a 4°C pro odstranění buněk. Následně jsme 1 ml média vysráželi inkubací s 1 ml acetonu po dobu 15 min. při -20°C. Směs jsme centrifugovali při 12000 g po dobu 5 min. Vzniklý pelet jsme rozpustili v 80 µl NP40 pufru a k roztoku jsme přidali 20 µl Laemmliho pufru. Směs jsme poté 5 min. povařili.

#### **3.16.4.3 SDS-PAGE**

Proteiny jsme separovali na SDS polyakrylamidové gelové elektroforéze podle Laemmliho, jak je popsáno v *Current Protocols in Molecular Biology* (Frederick M. Ausubel, 2004), za redukčních podmínek (Laemmliho vzorkový pufr s 5%

$\beta$ -merkaptoethanolem) (Laemmli, 1970). Velikost proteinů jsme určili porovnáním se standardy (prestained Protein Marker, Broad Range).

#### **3.16.4.4 Western blot**

Proteiny rozdělené na SDS polyakrylamidové gelové elektroforéze v 15%-ním gelu za redukčních podmínek (Laemmli, 1970) jsme elektroforeticky přenesli na nitrocelulózovou membránu Hybond-C Extra. Poté jsme je imunologicky detekovali pomocí odpovídajících primárních (detekčních) a sekundárních protilátek (Protein Methods, 2nd Edition, Bollag, Rozycki, Edelstein).

V případě detekce vCCI jsme nitrocelulózovou membránu s přenesenými vzorky po jednoduhodinové preinkubaci s 10%-ním odstředěným mlékem v PBS inkubovali přes noc při 4°C s myším antisérem proti vCCI naředěným 1:50 v 5%-ním mléku v PBS. Po opláchnutí jsme membránu inkubovali se sekundární králičí antimyší IgG protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou naředěnou 1:4000 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo). Proteiny byly vizualizovány pomocí ECL Plus systému (Amersham).

#### **3.16.4.5 Pokus se síťovacím činidlem**

Cílem pokusu bylo testování biologické aktivity vCCI, konkrétně jeho schopnosti vázat chemokin MIP1- $\alpha$  (Alcami, 1998). Supernatanty z infikovaných CV-1 buněk jsme připravili stejnou metodou jako vzorky pro Western blot. Pro každou reakci bylo použito 5 $\mu$ l koncentrovaného supernatantu v 25 $\mu$ l vazebného roztoku (RPMI 1640, 20mM HEPES pH 7.4, 0.1% BSA) odpovídající 20000 buňkám, 0,4nM lidského rekombinantního MIP 1- $\alpha$ , který byl značený radioaktivním <sup>125</sup>I (2000Ci/mmol) a 40mM síťovacího činidla 1-ethyl-3(3-dimethyl-aminopropyl)-carbodiimide (EDC), které byly doplněny vazebným roztokem do celkového objemu 25 $\mu$ l. Vzorky byly analyzovány pomocí SDS-PAGE s 12%-ním gelem. Gel byl vyhodnocen přístrojem Phosphorimager (Fuji, Cypress, CA).

#### **3.16.4.6 ELISA**

Test ELISA byl použit pro změření hladiny chemokinů v séru pomocí komerčního kitu Multi-Analyte ELISArray kit podle uživatelského manuálu výrobce. Testem ELISA byly také změřeny hladiny specifických anti-VACV IgG<sub>1</sub> protilátek v séru myši proti vytvořeným rekombinantům P13- $\Delta$ vCCI, P13-Sig-vCCI, P13-revI, jak bylo popsáno dříve (Hamsikova et al., 1990).



### **3.16.5 Pokusy in vivo**

Šestitýdenní myši samice C57Bl/67 (H-2<sup>b</sup>) byly získány z Charles River, Německo, a drženy v Státním zdravotním ústavu Praha za standardních podmínek. Experimenty jsme prováděli podle Zákona č. 246/92 Sb. a Zákona č. 77/2004 Sb., na ochranu zvířat proti týrání a Vyhlášky č. 311/97 Ministerstva zdravotnictví ČR, týkající se zacházení s experimentálními zvířaty.

#### **3.16.5.1 Indukce nádorů**

Pro zjištění vlivu imunizace na navození protinádorového efektu při preventivním uspořádání pokusu byla myším intraperitoneálně podána dávka  $3 \times 10^6$  PFU rVACV s různými formami genu vCCI. Po 14 dnech byly myším podány subkutánně na záda nádorové buňky TC-1 v dávce  $3 \times 10^4$ . Při terapeutickém uspořádání pokusu byly nejprve aplikovány myším subkutánně nádorové buňky TC-1 v dávce  $3 \times 10^4$ . Následující den byly myším intraperitoneálně injikovány rekombinantní VACV v dávce  $3 \times 10^6$  PFU.

Růst nádoru byl měřen v týdenních intervalech. Pokud měly myši nádory menší než 4 mm<sup>2</sup>, byly považovány za negativní. Přesáhnul-li nádor velikost 1,5 cm<sup>2</sup>, byla myš narkotizována a usmrcena. Po usmrcení celé kontrolní skupiny byl pokus ukončen a všechny zbylé myši byly rovněž narkotizovány a usmrceny. Rozdíly mezi růstovými křivkami byly analyzovány pomocí testu TWO WAY ANOVA s využitím Prism 3.0 softwaru (GraphPad Software Inc., San Diego, USA).

#### **3.16.5.2 Imunizace viry**

Myším jsme intraperitoneálně injikovali 0,5ml nebo intramuskulárně 0,1ml PBS obsahující rozsonikovanou suspenzi rVACV.

#### **3.16.5.3 DNA imunizace**

Myši jsme imunizovali ve dvoutýdenních intervalech třemi dávkami plazmidové DNA navázané na zlaté partikule o váze 0,5mg a průměru 1μm. Vakcíny byly vpraveny intradermálně (po oholení) do břišní oblasti pomocí biobalistické metody „gene gun“ doporučené výrobcem.

#### **3.16.5.4 Intratumorální injekce MVA-GM-CSF**

Laboratorním myším jsme podali nádorové buňky v množství  $3 \times 10^4$  subkutánně na záda. Rekombinantní viry P13-GM-CSF v dávce  $10^5$  PFU nebo MVA-GM-CSF v dávce  $10^6$  PFU byly podány pomocí inzulínky v objemu 20μl PBS. Pokud nebyl nádor v době

podání viru hmatný, byl virus aplikován subkutánně do místa původního podání nádorových buněk.

### **3.16.5.5 Tvorba a následná léčba minimální reziduální choroby**

Myším jsme podali nádorové buňky TC-1/A9 subkutánně v množství  $6 \times 10^4$ . Nádory jsme chirurgicky odstranili v okamžiku, kdy dosáhly velikosti cca 8 až 12mm v průměru, což bylo přibližně 14 dní po podání. Tím jsme vytvořili model minimální

reziduální choroby. Následně jsme myším aplikovali dvě dávky DNA vakcíny 18. a 25. den po podání nádoru. Do místa nádoru jsme zároveň subkutánně podali virus MVA-GM-CSF.

### **3.16.5.6 Izolace buněk nádorů pro analýzu průtokovou cytometrií**

Nádory jsme rozstříhali na kousky, které jsme dvakrát omyli PBS a poté dvakrát 15 minut trypsinizovali. V případě analýzy buněk infiltrujících nádor jsme všechny buňky získané z nádorové tkáně shromáždili, promyli a následně obarvili protilátkami. Při přípravě nádorových buněk pro detekci exprese MHC I jsme první frakci buněk získaných trypsinizací vyřadili a následující dvě frakce jsme spojili a kultivovali přes noc v médiu

D-MEM. Následující den jsme buňky opět trypsinizovali, obarvili specifickými protilátkami a analyzovali pomocí cytometru Coulter-Epics XL (Beckman Instruments).

### **3.16.5.7 Testování buněčné imunity**

Dvanáct dní po poslední imunizaci jsme z myší odebrali sleziny a odpověď IFN- $\gamma$  produkujících buněk jsme zhodnotili testem ELISPOT IFN- $\gamma$  po šestidenní in vitro restimulaci s H-2Db specifickým peptidem HPV16 E7(49-57) (RAHYNIVTF).

ELISPOT jsme provedli následujícím způsobem. Devadesátišesti jamková destička MAHA 45 (Milipore) byla přes noc za pokojové teploty potažena 50 $\mu$ L (konc. 5 $\mu$ g/ml) antimyší IFN- $\gamma$  monoklonální protilátkou R4-6A2 (Pharmingen) nebo antimyší IL-4 monoklonální protilátkou BVD4-1D11 v 0.1M Na-fosfátovém pufru (pH 9.0). Jamky pokryté protilátkami jsme 4x promyli PBS a blokovali 10%ním fetálním bovinním sérem v RPMI 1640 jednu hodinu při pokojové teplotě. Poté jsme přidali 100 $\mu$ l in vitro restimulovaných splenocytů v kultivačním médiu a inkubovali 20 hodin při 37°C v 5% CO<sub>2</sub> s přidaným peptidem nebo bez peptidu. Destičky jsme poté třikrát promyli PBS a třikrát PBS obsahujícím 0,05% Tween 20. Následovala inkubace přes noc při 4°C s 50 $\mu$ L (konc. 2 $\mu$ g/ml) biotinylované antimyší IFN- $\gamma$  monoklonální protilátky XMG 1.2 nebo s 50 $\mu$ L (konc. 2 $\mu$ g/ml) biotinylované antimyší IL-4 monoklonální protilátky BVD6-2462 v PBS. Destičky jsme promyli PBS s 0.05% Tween 20. Dále jsme přidali konjugát Avidin-

křenová peroxidáza naředěný 1:1000 v PBS a 0.05% Tween 20 na tři hodiny při 37°C. Po opláchnutí destiček PBS byly spoty obarveny 3-amino-9-ethyl karbazolem.

#### **3.16.5.8 Průtoková cytometrie**

Při analýze povrchových markerů splenocytů byly sleziny nejdříve rozstříhány a homogenizovány. Po odstranění erytrocytů lýzou ACK pufrem (0.15 M NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub> a 0.1 mM EDTA) jsme získali suspenzi buněk, které byly po resuspendování ve FACS pufru barveny fluorescenčně značenými monoklonálními protilátkami. Expres povrchových markerů byla detekována průtokovou cytometrií přístrojem Coulter-Epics XL (Beckman Instruments) a výsledky vyhodnoceny pomocí softwaru FlowJo (Tree Star, Inc., Ashland, USA).

#### **3.16.5.9 Histologické vyšetření nádorů**

Nádory byly čtvrtý den po druhé intratumorální injekci viru fixovány v Davisonově roztoku. Po fixaci byly zpracovány a obarveny standardními postupy (Jelinek et al., 2005).

## 4. Výsledky

### 4.1 Studium vlivu vCCI na biologické vlastnosti VACV

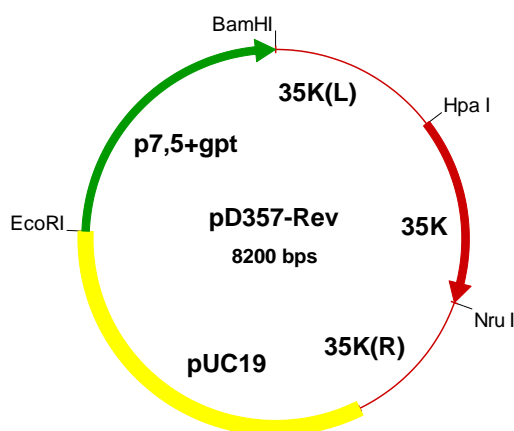
#### Praha 13

Abychom mohli studovat vliv vCCI na biologické vlastnosti VACV, připravili jsme z viru P13-E7GGG dvojnásobnou deleční mutantu viru (P13- $\Delta$ vCCI), kde byl gen pro vCCI v obou lokusech C23L/B29R nahrazen genem pro  $\beta$ -galaktosidázu. K rekombinaci jsme použili plazmid pD357. Aby bylo následně možné vytvořit revertantu tohoto viru, zkonstruovali jsme plazmid, který umožnil opětovnou inzerci genu pro vCCI.

#### 4.1.1 Konstrukce rekombinačních a expresních plazmidových vektorů

##### 4.1.1.1 pD357-Rev.

Prvním krokem při konstrukci plazmidu pD357-Rev., který obsahoval gen pro vCCI, byla amplifikace 1300 pb velkého fragmentu, jenž obsahoval gen C23L, metodou PCR s pomocí polymerázy Pfu1, primerů C23L-1 a C23L-2 a genomové DNA viru P13 jako templátu. Amplifikovaný úsek jsme vložili do plazmidu pCR-blunt TOPO a ověřili sekvenováním. Plazmid pD357 jsme poté částečně štěpili enzymy HpaI a NruI a gen pro  $\beta$ -galaktosidázu jsme nahradili fragmentem obsahujícím gen C23L. Výsledný plazmid označený pD357-C32L jsme poté štěpili enzymy EcoRI a BamHI a pak do něj vložili kazetu obsahující gen pro guanin fosforibosyl transferázu (GPT) z *E. coli* a p7.5 promotor z viru vakcinie, kterou jsme před tím vyštěpili stejnými enzymy z plazmidu pGPT07. Výsledný plazmid jsme nazvali pD357-Rev. (Obr. 10).



Obr. 10: Plazmid pD357-Rev pro přípravu revertanty vCCI.

#### 4.1.1.2 Sekvence vCCI VACV kmene Praha- nalezeno zkrácení signální sekvence

Při přípravě plazmidu pD357-Rev jsme provedli sekvenování genu pro vCCI. Srovnání části 1300 bp velkého fragmentu, který byl amplifikován pomocí primerů C23L-1 a C23-L2, odpovídající oblasti kódující N koncový úsek vCCI s aminokyselinovou sekvencí stejné oblasti vCCI dalších poxvirů prokázalo, že gen vCCI nekóduje 8 aminokyselin nezbytných pro funkci signální sekvence (Obr.11).

Lister (P19063.1)	MKQYIVLACMCLAAAAMPASLQQSSSSSSSCTEEENKHHM
Copenhagen (AAA47970.1)	MHVPASLQQSSSSSSSCTEEENKHHM
WR (YP 232883.1)	MHVPASLQQSSSSSSSCTEEENKHHM
Cowpox (AAM 76308.1)	MKQYIVLACMCLAAAAMPTSLQQSSSS---CTEEENKHHM
LIVP (AAM 76291.1)	MKQYIVLACMCLAAAAMPASLQQSSSSSSSCTEEENKHHM
<b>Praha P13</b>	MHVPASLQQSSSS---CTEEENKHHM
<b>Praha P13+Sig</b>	MKQYIVLACMCLAAAAMHVPASLQQSSSS-CTEEENKHHM

**Obr. 11: Srovnání sekvencí N terminálního konce proteinu vCCI různých kmenů VACV a cowpoxviru. Přístupová čísla jsou uvedena v závorkách.**

Původní neúplná signální sekvence vCCI genu VACV Praha P13 (Obr.12.) byla obnovena vložím oligonukleotidu 35SIG-1, 35SIG-2 (Obr.13, Obr.14) po naštěpení enzymem SphI.

SphI ↓
ATG AAA CAA TAT ATC GTC CTG <u>GC ATG</u> CAT GTG CCT GCC AGT CTT CAG CAA TCA TCC TCC TCG
↑ M H V P A S L Q Q S S S

**Obr. 12: Kódující sekvence vCCI na N-konci VACV Praha P13. Šipky označují štěpící místo restriktázy Sph I**

35SIG-1	5'-t atg tgc ctg gcg gca gct gcc atg-3'	25 nt
35SIG-2	5'-cg tcg acg gcg gtc cgt gta tgt ac-3'	25 nt

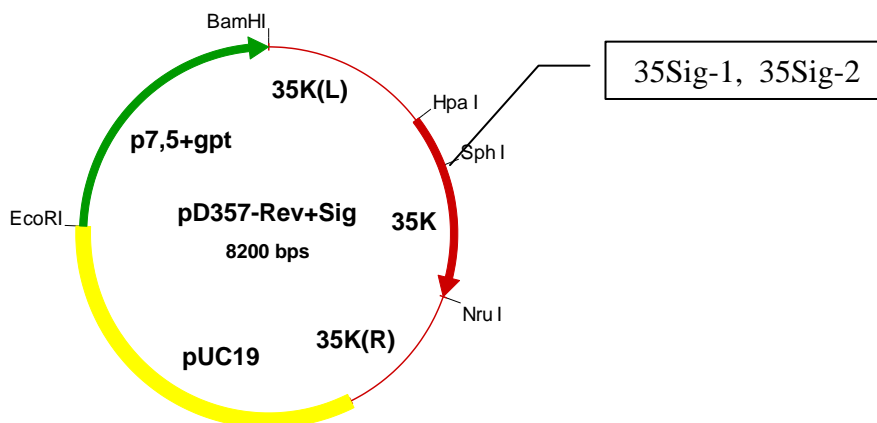
**Obr. 13: Sekvence syntetického oligonukleotidu, který byl použit pro rekonstrukci vCCI VACV Praha P13**

ATG AAA CAA TAT ATC GTC CTG <u>GCA Tgt</u> atg tgc ctg gcg gca gct gcc atg CAT GTG CCT GCC
TAC TTT GTT ATA TAG CAG GAC Cgt <u>aca tac acg gac cgc cgt cga</u> cgg TAC GTA CAC GGA CGG
<b>M K Q Y I V L A C M C L A A A A M H V P A</b>

**Obr. 14: Kódující sekvence rekonstruovaného vCCI viru P13-Sig-vCCI. Sekvence syntetického oligonukleotidového inzertu je zobrazena kurzívou. Místo vložení restriktčního místa enzymu SphI je podtrženo**

#### 4.1.1.3 pD357-Rev+Sig.

Plazmid pro přípravu viru P13, který by exprimoval sekreční formu vCCI, jsme připravili z plazmidu pD357-C23L štěpením enzymem SphI a následnou ligací s oligonukleotidy 35Sig-1 a 35Sig-2. Správnost sekvence a orientace vloženého inzertu jsme ověřili sekvenováním. V dalším kroku byl plazmid štěpen enzymem EcoRI a opět opatřen kazetou obsahující gen pro gpt. Výsledný plazmid jsme nazvali pD357-Rev+Sig (obr. 15).

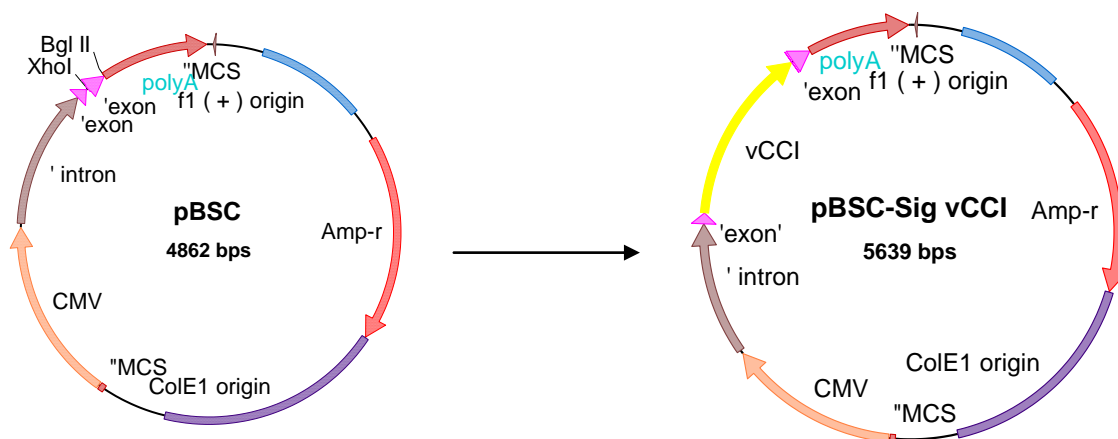


Obr. 15 : Plazmid pD357-Rev+Sig tvořící sekreční formu vCCI.

#### 4.1.1.4 pBSC-Sig vCCI

Zkoušeli jsme detekovat sekreční formu vCCI pomocí western blotu, kdy byly jako zdroje antigenu použity virové lyzáty CV-1 buněk ( P13, WR ) a specifická králičí antiséra proti pročištěnému vCCI kmenu Lister ( 18691, 18692 ) jako primární protilátka, která nám laskavě poskytl Dr. Patel. Nezískali jsme žádný specifický signál, a proto jsme připravili vlastní specifické myší sérum proti vCCI pomocí DNA imunizace.

Expresní plazmid pBSC-Sig vCCI (obr. 16) jsme připravili ligací plazmidu pBSC štěpeného enzymy XhoI a BglII s fragmentem získaným pomocí PCR za využití primerů LIVP1 a LIVP2 a genomické DNA viru vakcinie Lister jako templátu, který byl štěpen stejnými enzymy jako plazmid. Primery LIVP1 a LIVP2 pro PCR amplifikaci genu vCCI jsme navrhli tak, aby vznikly minimální lemující sekvence před a za genem vCCI, které by v případě vnesení do plazmidu pBSC společně s genem 35K mohly negativně ovlivnit jeho expresi. Současně musel amplifikovaný úsek obsahovat tzv. sekvenci Kozakovové a signální sekvenci genu vCCI. Správnost vloženého inzertu jsme ověřili sekvenováním s primery 35k-intr1, 35k-intr2, pBSC Reverse, pBSC Forward a SigC35-Sekv.



Obr. 16: Expresní plazmid pBSC-Sig vCCI pro přípravu myšního polyklonálního séra proti vCCI pomocí DNA imunizace.

#### 4.1.2 Konstrukce rekombinantních virů

Abychom mohli studovat vliv vCCI na navození specifické CTL odpovědi a protinádorového efektu proti nádorům exprimujícím protein HPV16E7, zkonstruovali jsme sadu rekombinantních VACV založených na kmenu Praha 13, které exprimovaly různé formy vCCI a upravený nádorově specifický antigen E7 odvozený od HPV16 (tabulka.1). Skupina zahrnovala rovněž kontrolní viry exprimující antigen preS2S viru hepatitidy B.

1	P13- $\Delta$ vCCI- E7GGG
2	RevP13 $\Delta$ vCCI- E7GGG
3	P13-Sig-vCCI- E7GGG
4	RevP13-Sig-vCCI- E7GGG
5	P13- $\Delta$ vCCI -preS2S
6	RevP13- $\Delta$ vCCI preS2S
7	P13- Sig-vCCI -preS2S-Rev+Sig

Tabulka. 1: Zkonstruované rekombinantní VACV založené na kmenu Praha 13, které exprimovaly různé formy vCCI a nádorově specifický antigen odvozený od HPV16 a kontrolní rekombinantní VACV

##### 4.1.2.1 P13- $\Delta$ vCCI-E7GGG

Virus P13- $\Delta$ vCCI-E7GGG neexprimující vCCI jsme vytvořili vložením genu pro  $\beta$ -galaktosidasu do lokusů C23L/B29R viru P13-E7GGG pomocí rekombinačního plazmidu pD357. Dvojitě deleční mutanty pro vCCI gen byly selektovány metodou barvení při expresi  $\beta$ -galaktosidázy (viz.3.16.3.2) opakovanou izolací viru, který stabilně tvořil modré plaky. Správné rekombinanty jsme identifikovali metodou PCR s primery LacZ1 a

LacZ2, které nám umožnily detekovat přítomnost genu LacZ a primery C23L-1 a C23L-2 původně navrženými pro amplifikaci genu vCCI viru P13, s nimiž jsme tento gen nedetekovaly.

#### **4.1.2.2 P13-Sig-vCCI- E7GGG**

Rekombinantní virus P13-Sig-vCCI-E7GGG jako revertantu viru P13- $\Delta$ vCCI-E7GGG obsahující gen vCCI viru P13 s kompletní signální sekvencí vložený do obou lokusů C23L/B29R jsme vytvořili rekombinací viru P13- $\Delta$ vCCI s plazmidem pD357-Rev+Sig. Virus P13-Sig-vCCI-E7GGG jsme izolovali pomocí transientně dominantní selekce (viz.3.16.3.3). Nejdříve byly rekombinantní viry obsahující gen GPT dvakrát plakově purifikovány pod selekčním tlakem (mykofenolová kyselina, xantin, hypoxantin). Poté dvojitá purifikace se selekcí bílých plaků umožnila návrat ke gpt<sup>-</sup> fenotypu a inzerci vCCI kódujících oblastí do obou locusů. Konečné viry jsme ověřili metodou PCR.

#### **4.1.2.3 RevP13- $\Delta$ vCCI- E7GGG**

Virus RevP13- $\Delta$ vCCI-E7GGG, revertantu viru P13- $\Delta$ vCCI- E7GGG na rodičovský genotyp P13-E7GGG, jsme vytvořili rekombinací viru P13- $\Delta$ vCCI- E7GGG s plazmidem pD357-Rev se selekcí rekombinant metodou transientně dominantní selekce stejně jako virus P13-Sig-vCCI- E7GGG. Konečné viry jsme ověřili metodou PCR.

#### **4.1.2.4 RevP13-Sig-vCCI-E7GGG**

Virus RevP13-Sig-vCCI-E7GGG, revertanta viru P13-Sig-vCCI-E7GGG na rodičovský genotyp P13-E7GGG, který neobsahuje kompletní signální sekvenci, byl vytvořen rekombinací viru P13-Sig-vCCI s plazmidem pD357-Rev se selekcí rekombinant metodou transientně dominantní selekce stejně jako virus P13-Sig-vCCI. Konečné viry jsme ověřili metodou PCR.

#### **4.1.2.5 P13- $\Delta$ vCCI-preS2S**

Kontrolní virus P13-  $\Delta$ vCCI-preS2S s delecí pro vCCI genu exprimující modelový antigen preS2S z HBV jsme vytvořili stejným postupem jako virus P13- $\Delta$ vCCI rekombinací s plazmidem pD357 se selekcí rekombinant metodou barvení při expresi  $\beta$ -galaktosidázy (viz. 3.16.3.2). Konečné viry jsme ověřili metodou PCR.

#### **4.1.2.6 RevP13- $\Delta$ vCCI-preS2S**

Kontrolní virus RevP13- $\Delta$ vCCI-preS2S-Rev, revertantu viru P13- $\Delta$ vCCI-preS2S na rodičovský genotyp P13-preS2S, jsme vytvořili stejně jako virus RevP13 $\Delta$ vCCI



rekombinací s plazmidem pD357-Rev se selekcí rekombinant metodou transientně dominantní selekce (viz. 3.16.3.3). Konečné viry jsme ověřili metodou PCR.

#### **4.1.2.7 P13-Sig-ΔvCCI-preS2S**

Kontrolní virus P13-Sig-ΔvCCI-preS2S, revertantu viru P13-ΔvCCI na rodičovský genotyp P13- preS2S, jejíž protein vCCI má kompletní signální sekvenci, jsme vytvořili obdobně jako jako virus P13-Sig-vCCI rekombinací s plazmidem pD357-Rev+Sig se selekcí rekombinant metodou transientně dominantní selekce. Konečné viry jsme ověřili metodou PCR.

### **4.1.3 Prodloužení signální sekvence vCCI vedlo k produkci sekrečního vCCI**

#### **4.1.3.1 Testování produkce vCCI western blotem**

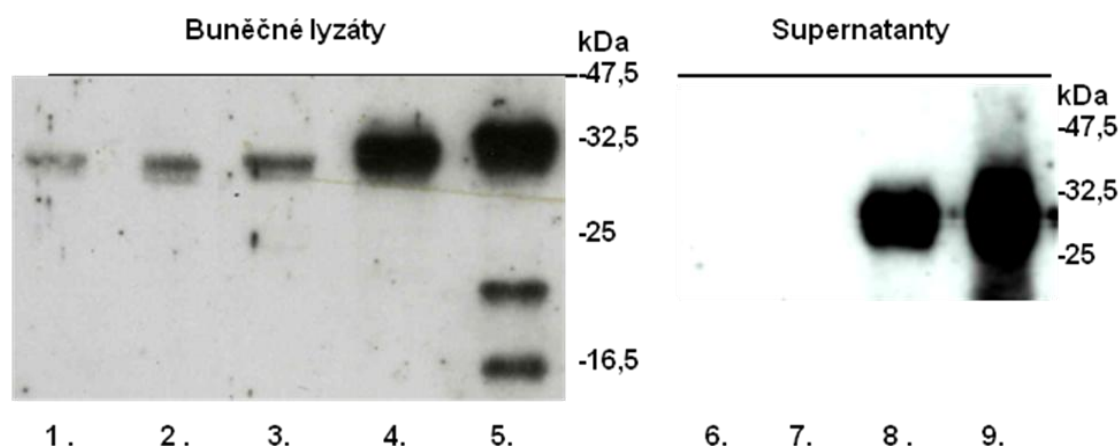
Produkcí vCCI připravenými rVACV a virem LIVP (Tabulka 2) jsme detekovali po infekci buněk CV1 jak v lysátu buněk, tak v zakoncentrovaných kultivačních médiích pomocí western blotu. Jako primární protilátku jsme použili specifické antisérum připravené imunizací myši vCCI genem VACV kmene Lister ve formě DNA vakcíny, jak bylo popsáno v části 3.6.1.

Chemokinový inhibitor vCCI jsme nedetekovali v lysátu neinfikovaných buněk, v lysátu buněk infikovaných rekombinantou obsahující gen E7GGG (P13-E7GGG) či v lysátu buněk infikovaných jeho deleční mutantou bez vCCI kódující sekvence (P13-ΔvCCI- E7GGG). V buněčných lysátech viru P13-E7GGG jsme detekovali pouze slabý nespecifický proužek velikostí shodný vCCI, stejně jako u neinfikovaných buněk a buněk infikovaných virem P13-ΔvCCI- E7GGG (vzorky č. 2, 1 a 3 na Obr. 2). Naopak přítomnost vCCI byla zjištěna v lysátu buněk infikovaných virem LIVP a P13-Sig-vCCI-E7GGG, kde byl proužek správné velikosti mnohem intenzivnější než nespecifický proužek. V lysátu buněk infikovaných LIVP jsme současně pozorovali dva další proužky menší velikosti představující patrně fragmenty vCCI.

Analýza pomocí western blotu ukázala, že CV1 buňky infikované virem P13-Sig-vCCI- E7GGG s obnovenou produkcí sekreční formy vCCI produkovaly vCCI stejné velikosti jako virus LIVP. V koncentrovaném médiu neinfikovaných buněk a buněk infikovaných virem P13-E7GGG jsme vCCI nedetekovali.

	Virus
1	P13
2	P13- E7GGG
3	P13- $\Delta$ vCCI- E7GGG
4	Rev P13 $\Delta$ vCCI- E7GGG
5	P13-Sig-vCCI- E7GGG
6	LIVP

Tabulka 2: Viry použité při testování produkce vCCI western blotem



Obr. 17: Detekce produkce vCCI rVACV western blotem

Lyzáty a supernatany CV-1 buněk infikovaných MOI 3 po dobu 20 h virem P13-E7GGG, P13-Sig-vCCI-E7GGG, P13- $\Delta$ vCCI- E7GGG nebo LIVP, jsme rozdělili pomocí SDS-PAGE gelové elektroforézy a přenesli na nitrocelulózovou membránu. Tu jsme poté inkubovali s myším antisérem proti vCCI a se sekundární králičí antitímýší protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou..

Použitý standard molekulových hmotností udává velikosti v kDa.

- 1.lyzát neinfikovaných buněk CV-1
- 2.lyzáty buněk infikovaných virem P13-E7GGG
3. lyzáty buněk infikovaných virem P13-  $\Delta$ vCCI-E7GGG
4. lyzáty buněk infikovaných virem P13- Sig-vCCI-E7GGG
5. lyzáty buněk infikovaných virem LIVP
6. supernatant neinfikovaných buněk CV-1
7. supernatant buněk infikovaných virem P13-E7GGG
8. supernatant buněk infikovaných virem P13- Sig-vCCI-E7GGG
9. supernatant buněk infikovaných virem LIVP

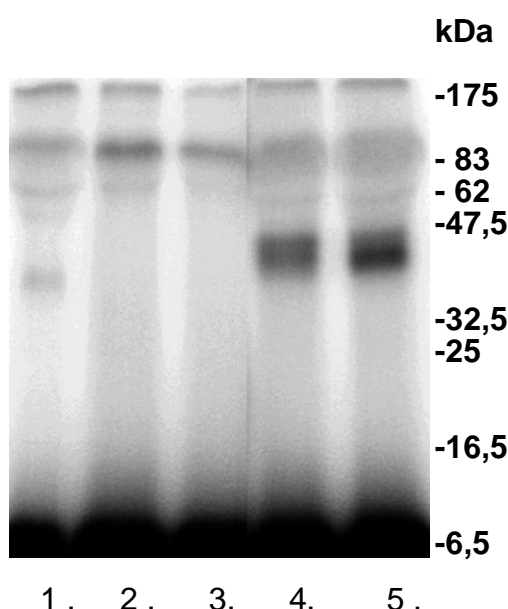
#### 4.1.3.2 Pokus se síťovacím činidlem

Cílem pokusu bylo testování funkční aktivity vCCI, konkrétně jeho schopnosti vázat chemokin MIP-1 $\alpha$ . Supernatanty z neinfikovaných buněk CV-1 a infikovaných virem P13, LIVP nebo P13-Sig-vCCI-E7GGG, jsme inkubovaly se síťovacím činidlem EDC a s radioaktivním  $^{125}$ I značeným MIP-1 $\alpha$ . Vzorky jsme poté rozdělili SDS-PAGE gelovou elektroforézou a radioaktivní signál jsme detekovali autoradiografií. Chemokin vazebnou aktivitu vykazovaly supernatanty buněk infikovaných virem P13-Sig-vCCI- E7GGG a

virem LIVP (vzorky č.5 a 4, Obr. 18). V médiích z neinfikovaných buněk a z buněk infikovaných virem P13-E7GGG (vzorky č.1 a 3, Obr. 18) nebyla detekována žádná MIP-1 $\alpha$  vazebná aktivita. U média z neinfikovaných buněk (vzorek č.1, Obr. 18) byl pouze pozorován proužek slabší intenzity a menší velikosti než předpokládaný komplex MIP-1 $\alpha$  a vCCI.

	Virus
1	P13- E7GGG
2	LIVP
3	P13-Sig-vCCI- E7GGG

**Tabulka 3: Viry použité při testování MIP-1 $\alpha$  vazebné aktivity vCCI v pokusu se síťovacím činidlem**



**Obr. 18: Autoradiogram pokusu se síťovacím činidlem, kterým jsme testovali chemokin vazebnou aktivitu vCCI**

Supernatanty z neinfikovaných buněk CV-1 a infikovaných virem P13, LIVP nebo P13-Sig-vCCI-E7GGG jsme inkubovali se síťovacím činidlem EDC a s radioaktivním  $^{125}\text{I}$  značeným MIP-1 $\alpha$ . Vzorky jsme poté rozdělili SDS-PAGE gelovou elektroforézou a radioaktivní signál jsme detekovali autoradiografií.

1. supernatant neinfikovaných buněk CV-1
2. samotný MIP1 $\alpha$  ve vazebném médiu
3. supernatant buněk infikovaných virem P13-E7GGG
4. supernatant buněk infikovaných virem LIVP
5. supernatant buněk infikovaných virem P13- Sig-vCCI-E7GGG

#### **4.1.4 Sekreční vCCI ovlivňoval hladinu chemokinů v krvi myší infikovaných VACV**

Pokusili jsme se také stanovit biologickou aktivitu sekreční formy vCCI produkované *in vivo* analýzou hladiny chemokinů v krvi myší infikovaných VACV

metodou ELISA. P13-E7GGG, P13-Sig-vCCI-E7GGG a samotný PBS byly myším podány intraperitoneálně v množství 3x10<sup>6</sup> PFU. Třetí a čtvrtý den byla myším odebrána séra. Hladina chemokinů byla stanovena ve směsi sér odebraných od 4 myší. Výsledky dvou nezávislých pokusů ukazují, že po podání viru P13-E7GGG bylo 3.den po infekci při porovnání s kontrolní skupinou pozorováno zvýšení hladin chemokinů RANTES, MCP-1, MIG, Eotaxin, TARC, MDC a KC . V žádné skupině nebyly detekovány chemokiny MIP-1 $\alpha$  a GCKin. Při porovnání se skupinou myší infikovaných virem P13-E7GGG jsme u myší infikovaných P13-Sig-vCCI- E7GGG pozorovali v krvi snížení hladiny chemokinů RANTES, Eotaxin, TARC a MDC. Tvorba sekreční formy vCCI VACV neměla vliv na hladinu chemokinů MCP-1, MIG a KC detekované 3. den po infekci. Hladiny Eotaxinu a MDC postupně klesaly a rozdíly mezi skupinami pozorované 4. den po infekci byly menší než rozdíly pozorované 3. den. Získané výsledky nemohly být statisticky analyzovány, protože hladiny chemokinů byly měřeny pomocí Multi-Analyte ELISArray kitu ve směsi sér.

Chemokiny	P13-E7GGG		P13-SigvCCI-E7GGG		PBS	
	Exp.I den 3	Exp.II den 4	Exp.I den 3	Exp.II den 4	Exp.I den 3	Exp.II den 4
CCL5 (RANTES)	6,39		3,48		2,88	
CCL2 (MCP-1)	7,83		8,32		5,39	
CCL3 (MIP-1 $\alpha$ )	0		0		0	
CXCL10 (IP10)	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	

**Tab. 4 : Hladiny chemokinů v séru myší po infekci rVACV se sekreční formou vCCI.**

Myším bylo i.p. injekcí podáno 3.10<sup>6</sup> PFU nebo 0,5 ml PBS. V experimentu 1 byla krev odebrána 3. den a směs sér (n = 2) byla vyšetřena na přítomnost chemokinů. V experimentu 2 byla krev odebrána 4.den a směs sér (n = 4) byla vyšetřena na přítomnost CCL11 a CCL22. Hodnoty absorbance byly normalizovány vůči základní hodnotě (0 %) a absorbanci detekované u pozitivní kontroly představované specifickým chemikinem (100 %) , která byla součástí kitu . Údaje byly vypočteny z hodnot absorbance OD450- OD630.

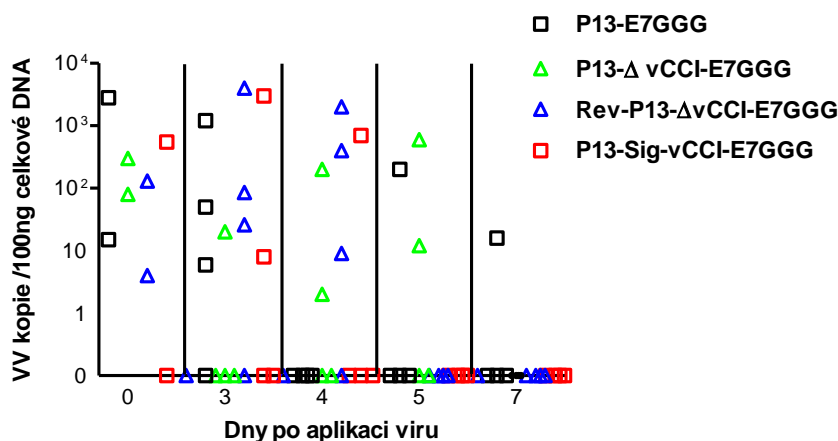
#### 4.1.5 Produkce sekreční formy vCCI vedla k atenuaci P13 VACV in vivo

Dalším cílem naší práce bylo zjistit, zda sekreční vCCI může ještě více snížit virulenci vysoce atenuovaného vakcinačního kmene Praha. V minulosti bylo prokázáno, že inserce C23L/B29R genu pro vCCI kmenu Lister do vysoce virulentního kmenu WR způsobila snížení jeho virulence u myší. Virulenci jsme testovali metodou sledování množení virů v ováriích myší.

##### 4.1.5.1 Množení virů s různými formami genu vCCI v myších C57Bl/6

Množení virů jsme testovali po intraperitoneální inokulaci  $1 \times 10^6$  PFU každého rVACV v čase nula a následujícím stanovení množství virové DNA v ováriích odebraných 3., 4., 5. a 7. den metodou Q-PCR (viz část 3.16.3.9).

Jak ukazuje Obr. 19 DNA virů P13-E7GGG a P13- $\Delta$ vCCI- E7GGG byla v průběhu pokusu detekována u pěti zvířat a DNA Rev P13  $\Delta$ vCCI- E7GGG u šesti jedinců. Virus P13-Sig-vCCI- E7GGG bylo možné prokázat pouze třikrát 3. a 4. den po infekci. Přestože je z provedeného pokusu patrné, že virus Rev P13  $\Delta$ vCCI- E7GGG se v myších ováriích množí méně, než ostatní rVACV, pozorované rozdíly nebyly díky významné variabilitě výsledků statisticky signifikantní.



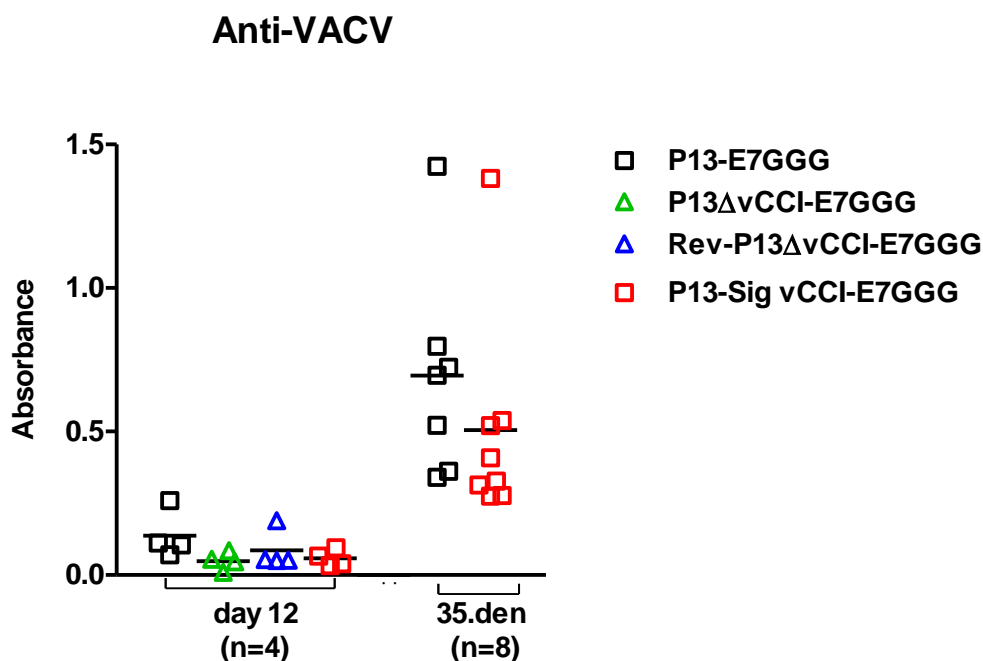
Obr. 19: Množství virové DNA v odebraných ováriích měřené metodou real time PCR

Myšim byla i.p injekcí podána jedna dávka  $1 \times 10^6$  PFU viru P13-E7GGG, P13- $\Delta$ vCCI-E7GGG, RevP13- $\Delta$ vCCI-E7GGG nebo P13-Sig-vCCI- E7GGG virus. Replikace virové DNA ve vaječnicích byla určena Q-PCR v uvedených intervalech po podání viru.

Dalším z parametrů, který nám může nepřímo ukázat množení viru *in vivo*, je detekce množství protilátek proti viru v séru po infekci příslušným virem.

#### 4.1.5.2 Hladina protilátek v séru

Hladiny protilátek proti VACV v séru byly testovány 12. a 35. den po imunizaci rVACV. Zatímco dvanáctý den po imunizaci se naměřené hladiny indukované jednotlivými viry příliš nelišily, testování 35. den prokázala tvorbu výraznějšího titru protilátek proti rodičovskému viru P13-E7GGG v porovnání s P13-Sig-vCCI-E7GGG produkující sekreční formu vCCI. Ovšem díky velké variabilitě hodnot nebyly tyto rozdíly statisticky signifikantní. (Obr. 20).



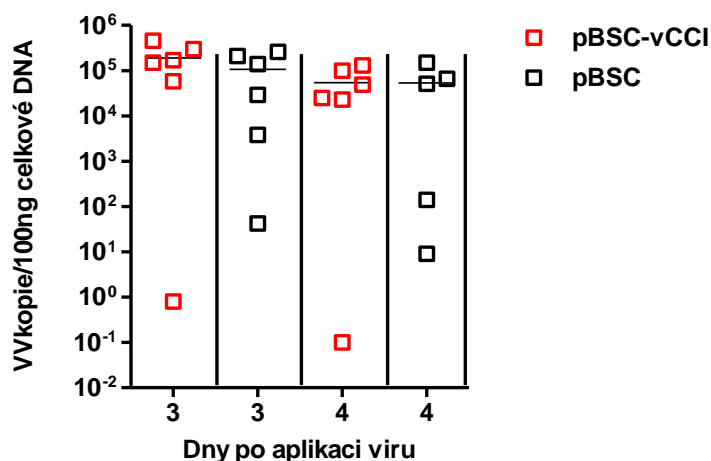
Obr. 20: Hladina specifických protilátek proti VACV v myším séru.

Myšim byla i.p injekcí podána jedna dávka  $1 \times 10^6$  PFU viru P13-E7GGG, P13- $\Delta$ vCCI-E7GGG, RevP13- $\Delta$ vCCI-E7GGG a P13-Sig-vCCI-E7GGG. Hladiny specifických protilátek proti VACV v séru byly stanoveny 12. a 35. den po imunizaci testem ELISA. Horizontální úsečky představují aritmetické průměry.

#### 4.1.6 Replikace rVACV *in vivo* nebyla ovlivněna specifickou imunitní odpovědí proti vCCI navozenou DNA imunizací

Dále jsme se snažili zjistit, jestli imunita zaměřená proti vCCI může ovlivnit množení *in vivo* viru P13-Sig-vCCI-E7GGG, jenž tvoří sekreční formu vCCI. Plazmid pBSC-Sig-vCCI byl myšim aplikován biobalistickou metodou „gene gun“ 3krát v 14denních intervalech. Čtrnáct dní po poslední dávce byl myšim intraperitoneálně podán virus P13-Sig-vCCI-E7GGG v dávce  $10^6$  PFU. Třetí a čtvrtý den po infekci byla myšim odebrána ovária, ve kterých bylo metodou real time PCR zjištěno množství virové DNA.

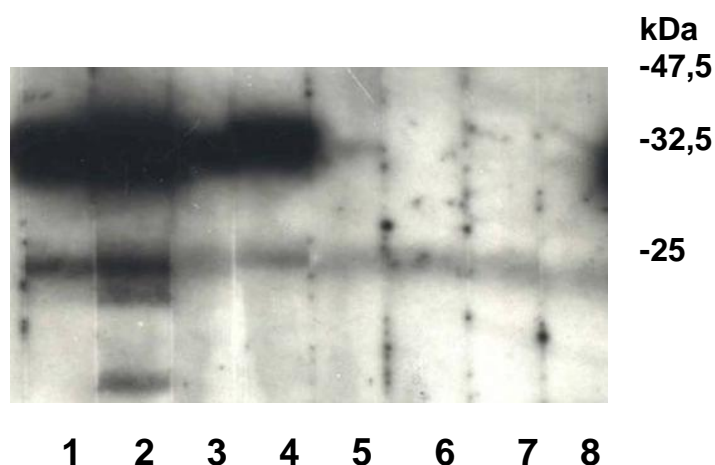
Virus byl zachycen u všech myší imunizovaných plazmidem pBSC-vCCI. Analýzou výsledků (Obr. 21) nebyly zjištěny statisticky signifikantní rozdíly mezi porovnávanými skupinami.



**Obr. 21: Replikace P13-Sig-vCCI- E7GGG in vivo po imunizaci pBSC-Sig-vCCI**

Myši byly imunizovány lg DNA vakcíny pBSC vCCI nebo kontrolní pBSC, které byly podány biobalistickou metodou „gen gun“ ve dnech 0, 7 a 28. Následně bylo myším 39. den intraperitoneálně injikováno  $1 \times 10^6$  PFU P13-Sig-vCCI- E7GGG. Replikace virové DNA ve vaječnících byla určena Q-PCR v uvedených intervalech po podání viru.

Účinnost DNA vakcinace plazmidem pBSC-Sig-vCCI byla potvrzena detekcí specifických protilátek proti vCCI western blotem v sérech jednotlivých imunizovaných myší (Obr. 22).



**Obr. 22: Přítomnost specifických protilátek proti vCCI v sérech myší imunizovaných DNA vakcínami.**

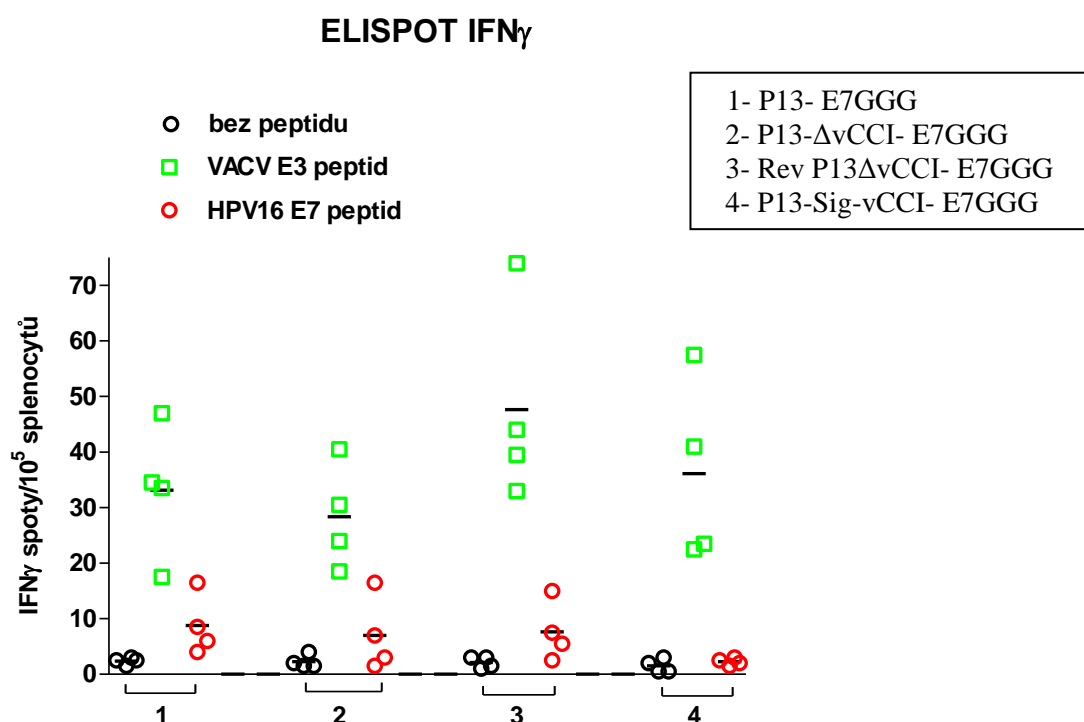
Přítomnost specifických vCCI protilátek v séru myší imunizovaných lg DNA vakcíny pBSC vCCI (dráhy 1–4) nebo kontrolní pBSC (dráhy 5–8) byla stanovena western blotem.

#### 4.1.7 Produkce sekreční formy vCCI nezvyšovala imunitní odpověď navozenou rVACV kmene Praha 13 nebo DNA vakcínami

Dalším cílem naší práce bylo zjistit, jak produkce sekreční formy vCCI ovlivňuje imunogennost rVACV. Byla srovnávána buněčná imunita po infekci rVACV exprimujícími modifikovaný HPV16 E7 protein a různé formy vCCI. Myšim jsme i.p injekcí podali jednu dávku  $1 \times 10^6$  PFU viru P13-E7GGG, P13- $\Delta$ vCCI-E7GGG, RevP13- $\Delta$ vCCI-E7GGG a P13-Sig-vCCI- E7GGG. Specifickou CTL odpověď proti dominantnímu CTL epitopu HPV 16 E7(45-57) (RAHYNIVTF) a proti VACV E3(140-148) (VGPSNSPTF) epitopu jsme detekovali 12 dní po imunizaci metodou ELISPOT IFN- $\gamma$ .

##### 4.1.7.1 Detekce buněčné odpovědi po imunizaci rVACV metodou ELISPOT IFN- $\gamma$

Jak ukazuje Obr. 23, buněčné odpovědi navozené podanými viry a detekované metodou ELISPOT IFN- $\gamma$  se příliš nelišily (rozdíly mezi nimi nebyly statisticky signifikantní). Z toho lze usuzovat, že CTL odpověď navozená rekombinantními viry nebyla ovlivněna žádnou z forem genu vCCI.



Obr. 23: Buněčná imunitní odpověď navozená u myši imunizovaných rVACV s expresí vCCI detekovaná metodou ELISPOT IFN- $\gamma$ .

Myšim byla i.p injekcí podána jedna dávka  $1 \times 10^6$  PFU viru P13-E7GGG, P13- $\Delta$ vCCI-E7GGG, RevP13- $\Delta$ vCCI-E7GGG a P13-Sig-vCCI- E7GGG. CTL odpověď jednotlivých myši proti proteinu VACV E3 a proteinu HPV16 E7 byla detekována 12 dní po imunizaci metodou ELISPOT IFN- $\gamma$ . Získaná data byla analyzována statistickou metodou dvoucestná ANOVA. Horizontální úsečky představují aritmetické průměry.



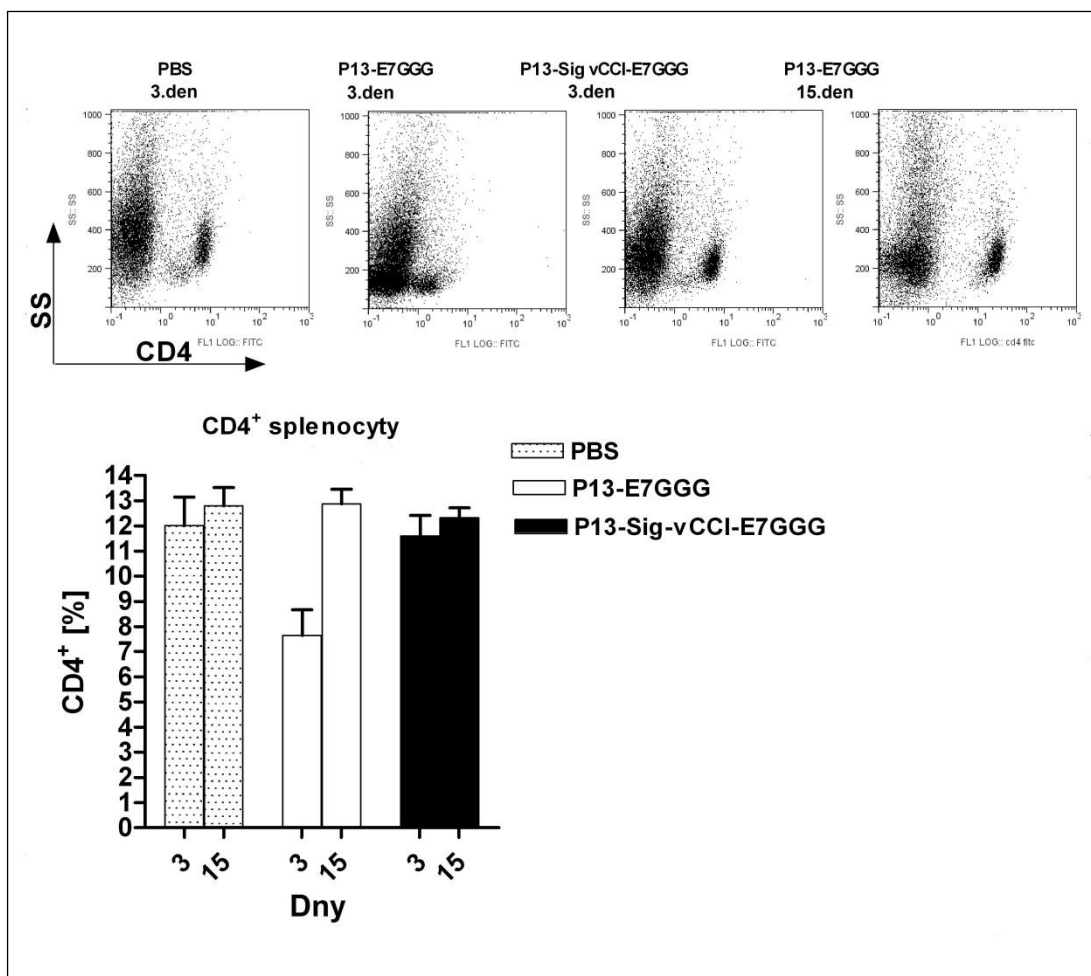
#### 4.1.7.2 Analýza vlivu sekreční formy vCCI produkované virem P13-E7GGG na imunitní buňky

V této části práce bylo naším cílem zjistit vliv sekreční formy vCCI produkovaného virem P13-E7GGG na buňky imunitního systému jako např. dendritické buňky, myeloidní supresorové buňky, T regulační lymfocyty, CD8<sup>+</sup> lymfocyty a makrofágy. Nejdříve jsme myším intraperitoneálně aplikovali PBS nebo 3.10<sup>6</sup> PFU viru P13-E7GGG či P13-Sig-vCCI- E7GGG (Tabulka 5). Poté jsme je v časových intervalech 3,5, 14 a 35 dní usmrtili a na buňkách izolovaných ze slezin jsme po obarvení monoklonálními protilátkami detekovali průtokovou cytometrií povrchové markery definující různé subpopulace splenocytů (Tabulka 5).

Buněčný typ	Detekované povrchové molekuly
Dendritické buňky	CD11b+CD11c
Myeloidní supresorové buňky	Ly6G+CD11b+CD11c
T regulační lymfocyty- tzv. Treg	CD4+CD25+Foxp3
T lymfocyty- CD8+ subpopulace	CD8
Makrofágy	F4/80

**Tabulka 5: Přehled imunitních buněk analyzovaných pomocí FACSu a markerů použitých pro jejich detekci.**

Po vyhodnocení výsledků byl zjištěn pouze fakt, že u viru obsahujícího vCCI s kompletní signální sekvencí nedochází 3.den po infekci k přechodnému poklesu CD4 buněk, jak bylo pozorováno u P13. U ostatních subpopulací splenocytů nebyly při porovnání hodnot odpovídajících jednotlivým virům a negativní kontrole (PBS) zjištěny signifikantní rozdíly (Obr. 24).



Obr. 24: Analýza povrchových markerů splenocytů po imunizaci VACV

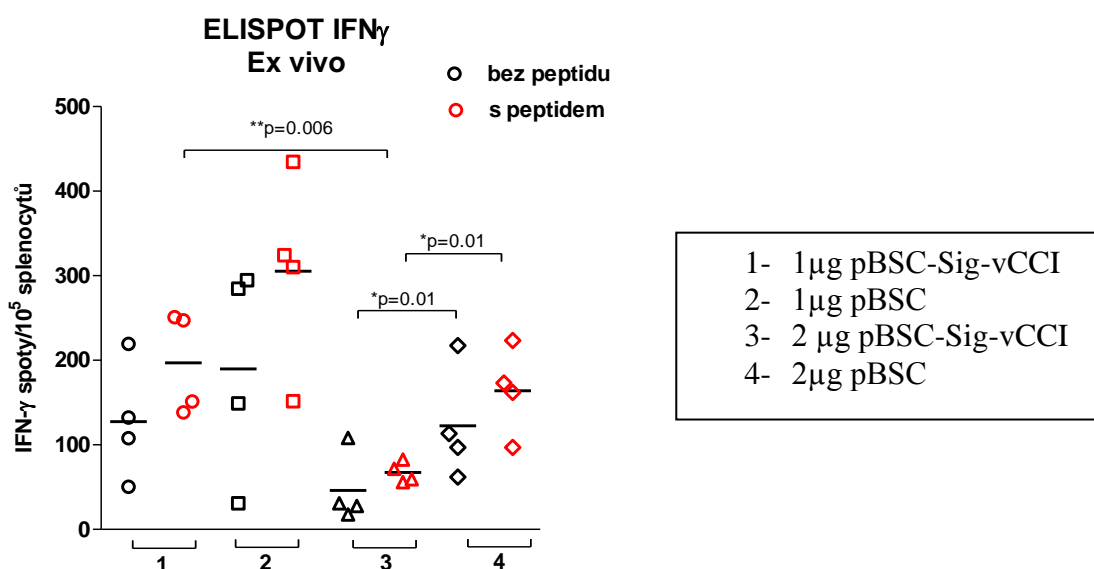
#### 4.1.7.3 Vliv sekreční formy vCCI na navození buněčné odpovědi po imunizaci DNA vakcínami

Abychom zjistili vliv vCCI na navození E7 specifické CTL odpovědi v nepřítomnosti virové infekce, imunizovali jsme myši proti E7 antigenu DNA vakcínou pBSC-SigE7LAMP a 1 $\mu$ g nebo 2 $\mu$ g plazmidu pBSC-Sig-vCCI či kontrolního plazmidu pBSC, které byly podány biobalistickou metodou „gene gun“ ve dvou dávkách do stejného místa v intervalu dvou týdnů (Tabulka 6). CTL odpověď byla testována 14 dní po poslední imunizaci metodou ELISPOT IFN- $\gamma$ . Analýza výsledků ukázala, že produkce sekreční formy vCCI plazmidem pBSC- vCCI nevedla, při porovnání s plazmidem pBSC, ke zvýšení, ale ke snížení specifické E7 specifické CTL odpovědi. Rozdíl byl statisticky signifikantní při podání 2  $\mu$ g plazmidu pBSC-vCCI, pokud byly splenocyty kultivovány jak bez, tak v přítomnosti peptidu E7 ( $p = 0,01$ ). Snížení bylo závislé na dávce, protože

přidání 2 $\mu$ g plazmidu pBSC- vCCI snížilo CTL odpověď více než přidání 1 $\mu$ g téhož plazmidu ( $p = 0.0057$ ) (Obr.25).

Číslo skupiny	1. imunizace		2. imunizace	
	1	pBSC- Sig-vCCI	pBSC-SigE7LAMP	pBSC-Sig-vCCI 1 $\mu$ g
2	pBSC	pBSC-SigE7LAMP	pBSC 1 $\mu$ g	pBSC-SigE7LAMP
3	pBSC-Sig-vCCI	pBSC-SigE7LAMP	pBSC-Sig-vCCI 2 $\mu$ g	pBSC-SigE7LAMP
4	pBSC	pBSC-igE7LAMP	pBSC 2 $\mu$ g	pBSC-SigE7LAMP

**Tabulka 6** - Schéma pokusu určující vliv sekreční formy 35K na navození buněčné odpovědi po imunizaci



**Obr. 25:** Buněčná imunitní odpověď navozená u myši imunizovaných DNA vakcínami s expresí vCCI detekovaná metodou ELISPOT IFN- $\gamma$ .

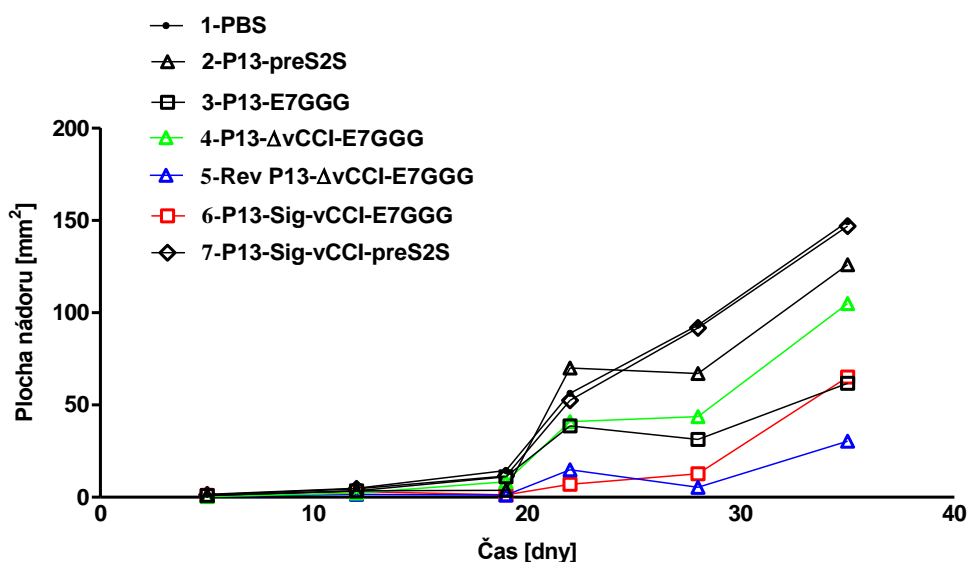
Myši jsme imunizovali DNA vakcínou pBSC-SigE7LAMP a 1 $\mu$ g nebo 2 $\mu$ g plazmidu pBSC-vCCI či kontrolního plazmidu pBSC , které byly podány biobalistickou metodou „gene gun“ ve dvou dávkách do stejného místa v intervalu dvou týdnů. CTL odpověď jednotlivých myši proti proteinu VACV E3 a proteinu HPV16 E7 byla detekována metodou ELISPOT IFN- $\gamma$  12 dní po poslední imunizaci. Získaná data byla analyzována statistickou metodou dvoucestná ANOVA.

#### 4.1.8 Produkce sekreční formy vCCI vedla ke snížení protinádorového účinku imunizace jak rVACV kmene Praha 13 tak DNA vakcínami

##### 4.1.8.1 Výsledky preventivní imunizace rVACV

Abychom zjistili vliv vCCI na protinádorový efekt imunizace rVACV exprimujícími HPVE7 při preventivním uspořádání pokusu, byla myším nejdříve intraperitoneálně aplikována dávka  $3 \times 10^6$  PFU rekombinantního VACV s různou formou

genu pro vCCI. Po 14 dnech byly myším subkutánně podány nádorové buňky TC-1 v dávce  $3 \times 10^4$ . Jak ukazuje Obr. 26, nejlepší protinádorový efekt v preventivním uspořádání pokusu byl pozorován u rekombinanty Rev P13  $\Delta$ vCCI- E7GGG s opětně vloženým genem vCCI bez kompletní signální sekvence. Rodičovský virus P13-E7GGG navozoval slabší protinádorovou protekci, u viru P13-Sig-vCCI- E7GGG s produkcí sekreční formy vCCI byla protekce proti nádoru ještě nižší a u P13- $\Delta$ vCCI-E7GGG s kompletní delecí vCCI byla ze všech testovaných virů nejhorší. Ovšem při analýze rozdílů mezi růstovými křivkami pomocí testu two-way ANOVA nebyly mezi výše zmíněnými viry zjištěny statisticky signifikantní rozdíly.



**Obr. 26: Imunizace P13- $\Delta$ vCCI-E7GGG a revertantami a čelenž TC-1.**

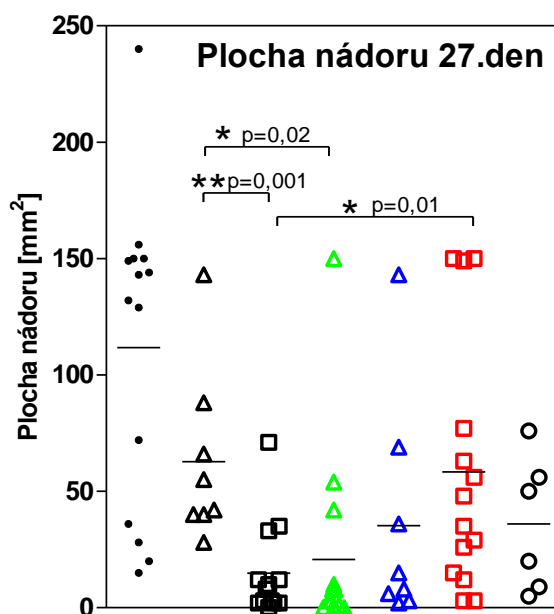
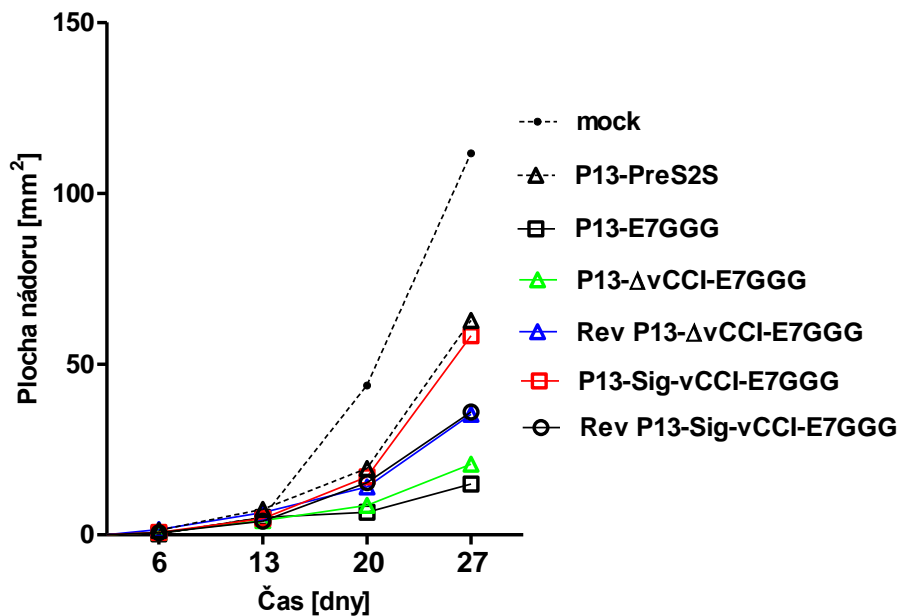
Skupinám myši byly intraperitoneálně podány rVACV s různými formami genu vCCI v dávce  $3 \times 10^6$  PFU . Po 14 dnech bylo myším aplikováno subkutánně na záda  $3 \times 10^4$  nádorových buněk TC-1. Růst nádoru byl měřen v týdenních intervalech. Pokud měly myši nádory menší než  $4 \text{ mm}^2$ , byly považovány za negativní. Přesáhnul-li nádor velikost  $1,5 \text{ cm}^2$ , byla myš narkotizována a usmrcena. Po usmrcení celé kontrolní skupiny byl pokus ukončen a všechny zbylé myši byly rovněž narkotizovány a usmrceny. Rozdíly mezi růstovými křivkami byly statisticky analyzovány pomocí testu dvoucestná ANOVA .

#### 4.1.8.2 Výsledky terapeutické imunizace rVACV

Při terapeutickém uspořádání pokusu jsme myším nejdříve subkutánně aplikovali nádorové buňky TC-1 v dávce  $3 \times 10^4$ . Následující den byly myším intraperitoriálně podány rVACV P13 s různou formou genu vCCI v dávce  $3 \times 10^6$  PFU.

Jak ukazuje obr. 27, imunizace viry P13-E7GGG a P13- $\Delta$ vCCI- E7GGG vedla při srovnání s P13-preS2S k navození signifikantního protinádorového efektu (analyzováno t-

testem 27. den). Revertanty vykazovaly také protinádorový efekt, který ovšem nebyl, díky menšímu počtu myši ve skupinách, statisticky signifikantní. Virus P13-Sig-vCCI- E7GGG měl nejnižší protinádorový efekt a rozdíl byl při porovnání s P13-E7GGG statisticky signifikantní.



**Obr. 27: Terapie nádorů TC-1 rVACV s E7GGG a různou formou genu vCCI**

Myšim bylo podáno s.c. injekcí  $3 \times 10^4$  buněk TC-1. Následující den byly myši i.p. imunizovány jednou dávkou  $1 \times 10^6$  PFU viru P13-E7GGG (n = 14), P13-ΔvCCI-E7GGG (n = 14), RevP13-ΔvCCI-E7GGG (n = 8), P13-Sig-vCCI-E7GGG (n = 14), RevP13-Sig-vCCI- E7GGG (n = 6). Graf zobrazuje souhrnné výsledky dvou nezávislých experimentů. Růst nádoru je zobrazen jako průměrná plocha nádoru pro každou skupinu. Rozdíly ve velikosti nádorů 27. den byly statisticky analyzovány pomocí t- testu.

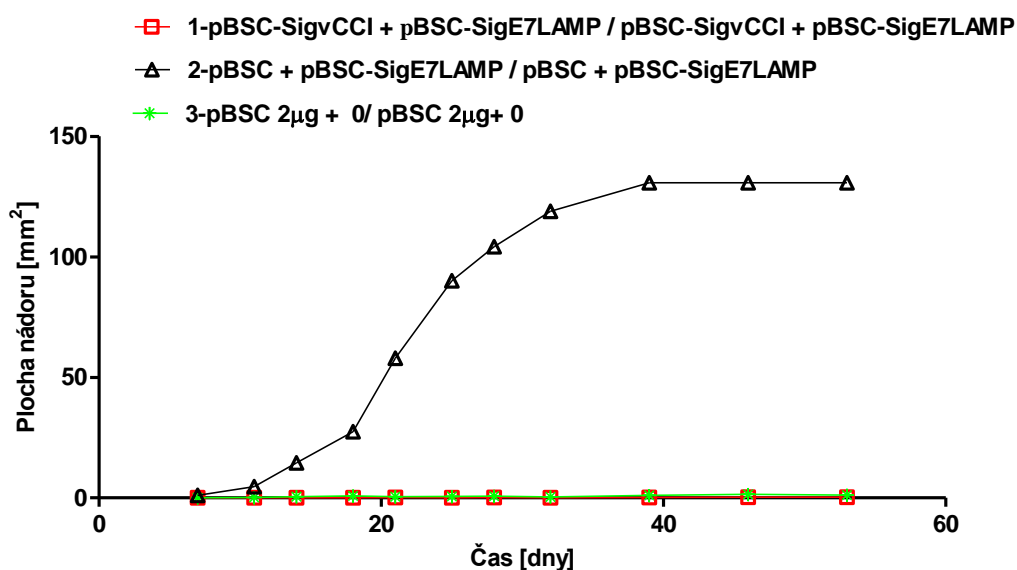
#### 4.1.8.3 Výsledky preventivní imunizace DNA vakcínami

Vliv koexprese vCCI na navození imunity DNA vakcínou E7GGGLAMP proti TC-1 nádorům jsme nejdříve testovali pokusem v preventivním uspořádání. Myšim byly dvakrát po sobě v intervalu 14 dnů aplikovány intradermálně do břišní oblasti metodou „gene gun“ DNA vakcíny (Tabulka 7). Čtrnáct dní po poslední imunizaci byly podány TC-1 nádorové buňky subkutánně v dávce  $3 \times 10^4$ .

Číslo skupiny	1.imunizace		2.imunizace	
1	pBSC-Sig-vCCI 1 $\mu$ g	pBSC-SigE7LAMP	pBSC-Sig-vCCI 1 $\mu$ g	pBSC-SigE7LAMP
2	pBSC 1 $\mu$ g	pBSC-	pBSC 1 $\mu$ g	pBSC-SigE7LAMP
3	pBSC 2 $\mu$ g	-	pBSC 2 $\mu$ g	-

Tabulka 7: Schéma pokusu určující vliv sekreční formy vCCI na navození protinádorového efektu po imunizaci DNA vakcínou při preventivním uspořádání.

Jak je patrné z Obr.28, imunizace plazmidem pBSC-SigE7LAMP měla tak výrazný protinádorový efekt, že vliv koexprese vCCI nemohl být hodnocen.



Obr. 28: Vliv koexprese vCCI na protektivitu DNA vakcíny E7GGGLAMP před TC-1 nádory.

Myši jsme imunizovali ve dvoutýdenních intervalech třemi dávkami plazmidové DNA navázané na zlaté partikule o váze 0,5mg a průměru 1 $\mu$ m. Vakcíny byly vpraveny intradermálně (po oholení) do břišní oblasti pomocí biobalistické metody „gene gun“. Čtrnáct dní po poslední imunizaci byly podány TC-1 nádorové buňky subkutánně v dávce  $3 \times 10^4$ . Růst nádoru byl měřen v týdenních intervalech. Rozdíly mezi růstovými křivkami byly statisticky analyzovány pomocí testu dvoucestná ANOVA.

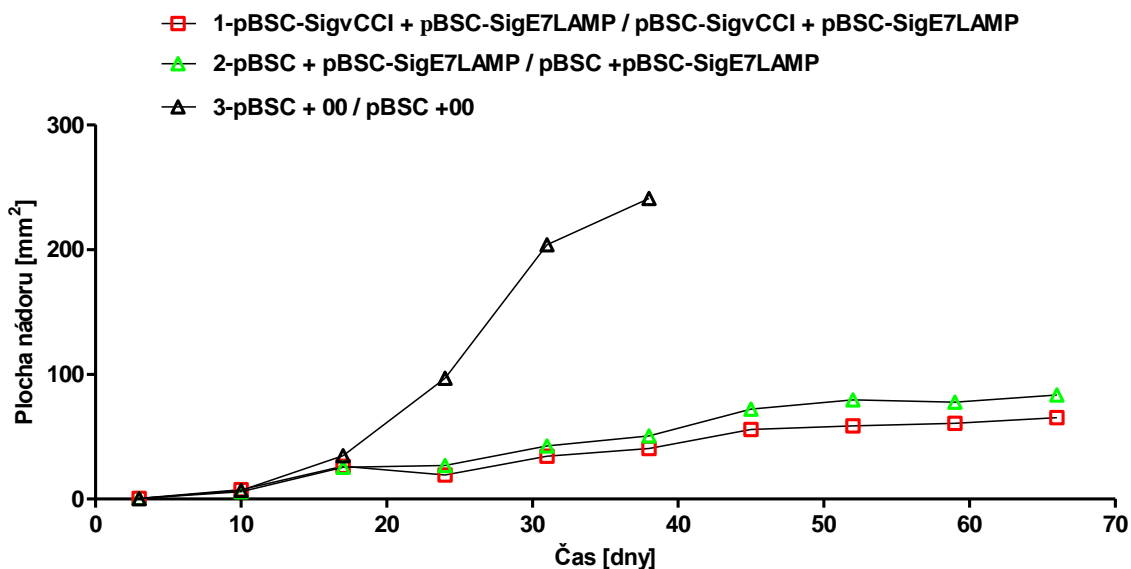
#### 4.1.8.4 Výsledky terapeutické imunizace DNA vakcínami

Testování vlivu koexprese vCCI na navození imunity DNA vakcínou E7GGGLAMP proti TC-1 nádorům při terapeutickém uspořádání experimentu jsme prováděli následovně. Myším jsme subkutánně aplikovali TC-1 nádorové buňky v dávce  $3 \times 10^4$ . Tři dny poté byla provedena imunizace metodou „gene gun“, která byla opakována po sedmi dnech (Tabulka. 8).

Číslo skupiny	1. imunizace			2. imunizace	
	1	pBSC-Sig-vCCI 1 μg	pBSC-SigE7LAMP	pBSC-Sig-vCCI 1 μg	pBSC-SigE7LAMP
2	pBSC 1 μg	pBSC-SigE7LAMP	pBSC 1 μg	pBSC-SigE7LAMP	
3	pBSC 1 μg	-	pBSC 1 μg	-	

**Tabulka 8:** Schéma pokusu určující vliv sekreční formy vCCI na navození protinádorového efektu po imunizaci DNA vakcínou při terapeutickém uspořádání.

Jak ukazuje Obr. 29, při porovnání vlivu plazmidu pBSC-Sig-vCCI exprimujícího vCCI s kontrolním pBSC můžeme pozorovat mírné zlepšení protinádorového efektu. Ovšem při analýze rozdílů mezi růstovými křivkami těchto dvou skupin pomocí testu two-way ANOVA nebyly zjištěny statisticky signifikantní rozdíly.



**Obr. 29:** Vliv koexprese vCCI na terapii TC-1 nádorů DNA vakcínou E7GGGLAMP

Myším jsme nejprve podali subkutánně na záda nádorové buňky TC-1 v dávce  $3 \times 10^4$ . Po týdnu jsme je imunizovali ve dvoutýdenních intervalech třemi dávkami DNA vakcíny aplikované intradermálně (po oholení) do břišní oblasti pomocí biobalistické metody „gene gun“. Růst nádoru byl měřen v týdenních intervalech. Rozdíly mezi růstovými křivkami byly statisticky analyzovány pomocí testu dvoucestná ANOVA.

## 4.2 Kombinovaná léčba nádorů pomocí intratumorální injekce MVA-GM-CSF a DNA vakcíny

Přes přítomnost virových antigenů získají někdy transformované buňky schopnost uniknout protinádorové imunitní reakci. Tento jev se často vyskytuje v klinických studiích testujících nádorové vakcíny a nádorovou imunoterapii a může být způsoben ztrátou schopnosti nádorových buněk prezentovat antigenní peptidy v komplexu s MHC I molekulami. Změny tohoto typu se také často vyskytují u progredujících nádorů a metastáz v důsledku snížení exprese molekul MHC I.

Nádory se sníženou expresí molekul MHC I. třídy nelze účinně ničit pomocí antigen specifické imunizace, která je založena na odpovědi efektorových T buněk závislých na MHC I (Smahel et al., 2003). Nicméně protinádorový účinek DNA vakcín proti takovýmto buňkám může být posílen imunizací nádorovými buňkami, které exprimují GM-CSF. Již dříve bylo v pokusech s HPV16 E6 E7 pozitivními nádorovými buňkami MK16 pozorováno (Rittich et al., 2005a), že léčba myši s nádory pomocí kombinací těchto vakcín vedla k dočasné inhibici růstu nádorů.

V rámci kombinované imunoterapie popsané v této práci jsme k intratumorální expresi GM-CSF použili virový vektor, což nám umožnilo vyhnout se časově náročné přípravě buněčných linií exprimujících GM-CSF, které by byly odvozeny z nádorových buněk pacienta. Poxvirové vektory navíc *in vivo* účinně infikují širokou škálu savčích buněk, velikost exprese transgenů je možné upravit typem použitého promotoru a jejich aplikace není spojena s rizikem inzerční mutageneze.

Bylo opakovaně zjištěno, že GM-CSF se chová jako imunitní adjuvans vakcín díky své schopnosti stimulovat antigen prezentující buňky, což vede k zvýšené aktivaci CD4 +, CD8 + T-buněk a CD1d pozitivních NK1.1 buněk (které jsou účinné u MHC negativních nádorů) a zvýšené produkci protilátek. Na myších nádorových modelech bylo prokázáno, že adjuvantní a protinádorové aktivity GM-CSF jsou závislé na použité dávce a způsobu podání (Serafini et al., 2004b). Abychom minimalizovali imunosupresivní účinky vyvolané vysokou koncentrací GM-CSF v místě vpichu a vzhledem k tomu, že místní koncentrace rekombinantních cytokinů injikovaných *in situ* velmi rychle klesá, vnesli jsme transgen GM-CSF do nádoru prostřednictvím živých rekombinantních virů vakcinie. Srovnali jsme tři různé cesty podání nereplikujícího se MVA-GM-CSF, který vytváří nižší množství GM-CSF nebo replikující se P13-GM-CSF s vysokou expresí transgenů.



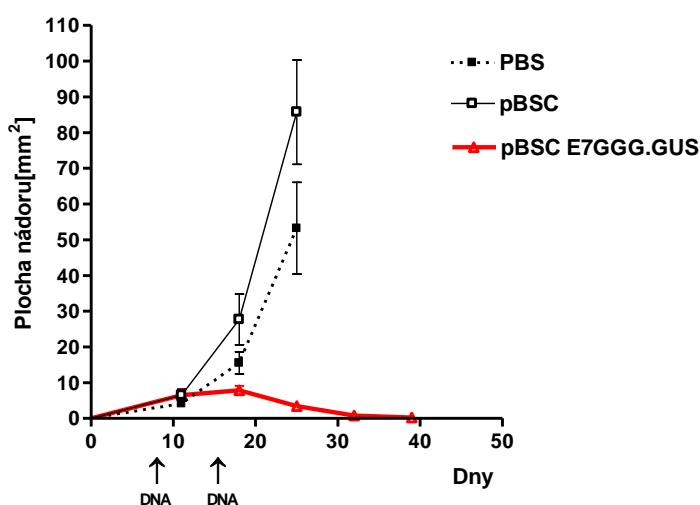
V našem nádorovém modelu jsme myši C57BL/6 s nádory TC-1/A9, které jsou charakterizovány expresí HPV16 onkogenů a sníženou expresí molekul H-2b, imunizovali vysoce imunogenní DNA vakcínou E7GGG.GUS exprimující fúzní gen modifikovaného HPV16 E7 (E7GGG) s  $\beta$ -glukuronidázou E. coli (GUS). DNA vakcíny jsme podali biobalisticou metodou “gene gun” 7. a 14. den po s.c. injekci nádorových buněk.

Špatný účinek DNA vakcíny při léčbě TC-1/A9 buněk jsme se snažili zlepšit pomocí GM-CSF. Myším byly podáno i.p., i.m. nebo i.t. injekcí  $10^5$  PFU P13-GM-CSF nebo  $10^6$  PFU MVA-GM-CSF v době první (event. i druhé) imunizace DNA vakcínou. Zjistili jsme, že podání nereplikujícího se MVA-GM-CSF vedlo k lepším výsledkům než použití replikujícího se P13-GM-CSF. Při porovnávání tří různých cest podání viru byl nejvyšší účinek pozorován u opakovaných i.t. injekcí MVA-GM-CSF.

## 4.2.1 Intratumorální injekce MVA-GM-CSF měla vliv na terapii nádorů TC-1/A9 DNA vakcínou

### 4.2.1.1 DNA vakcinace

Myším jsme nejdříve aplikovali  $3 \times 10^4$  nádorových buněk TC-1 nebo TC-1/A9 s nízkou expresí MHC I molekul. Jeden týden poté, když nádory dosahovaly průměrné velikosti  $0.75-1.68 \text{ mm}^2$ , jsme začali terapeutickou imunizací 1.dávkou plazmidu pBSC E7GGG.GUS. 2. dávka DNA vakcíny byla podána po sedmi dnech. Jak ukazuje obr.30, u myší, kterým byly podány nádorové buňky TC-1, DNA imunizace zapůsobila s velkou terapeutickou účinností a vedla až k úplné inhibici růstu nádorů.



Obr. 30: Vliv DNA vakcinace plazmidem pBSC E7GGG.GUS na terapii nádorů TC-1

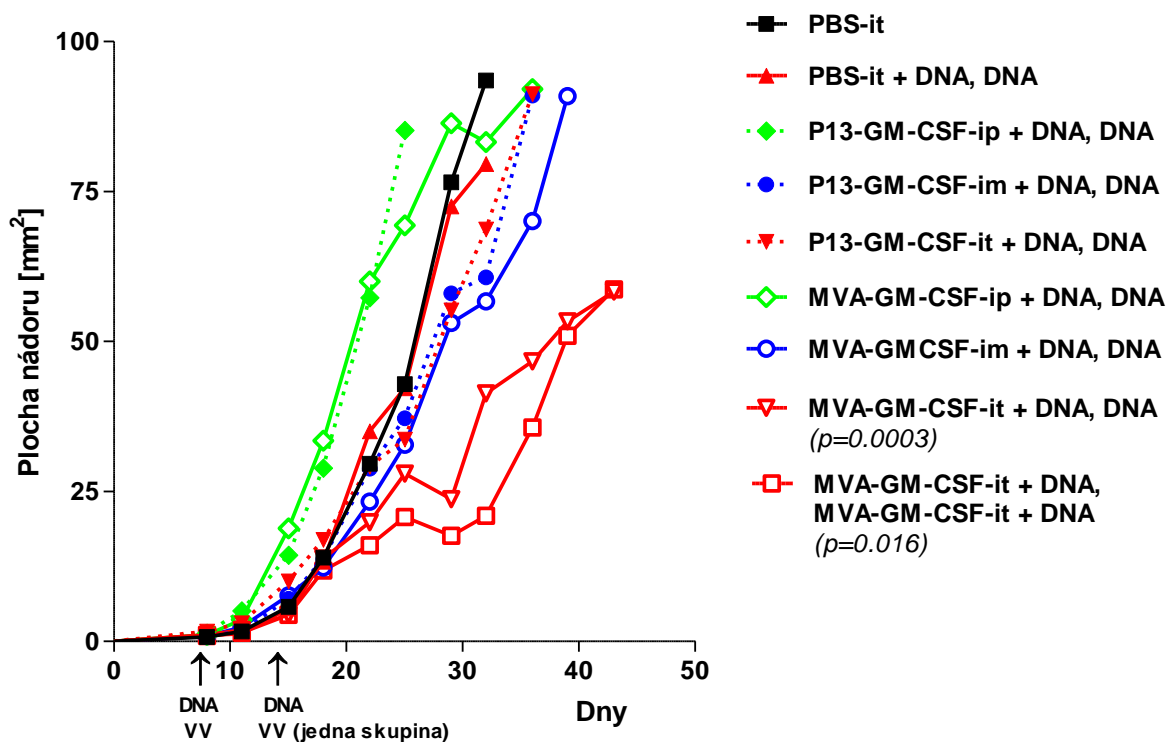
Skupinám myší (n = 6 na skupinu) jsme v den 0 podali s.c. injekcí  $3 \times 10^4$  nádorových buněk TC-1. Po sedmi a čtrnácti dnech byly myši imunizovány DNA vakcínou.

Jak je patrné z Obr. 31, u myši, kterým jsme aplikovali nádorové buňky TC-1/A9 se sníženou expresí molekul MHC I. třídy, neměla DNA vakcinace terapeutický účinek.

#### 4.2.1.2 Kombinace DNA vakcinace s aplikací rVACV produkující GM-CSF

Naším dalším cílem bylo zlepšit nízkou účinnost DNA vakcinace při terapii TC-1/A9 nádorů zvýšením koncentrace GM-CSF v nádorů. Proto jsme současně s 1. dávkou DNA vakcíny podali intraperitoneálně, intramuskulárně nebo intratumorálně  $10^5$  PFU P13-GM-CSF nebo  $10^6$  PFU MVA-GM-CSF.

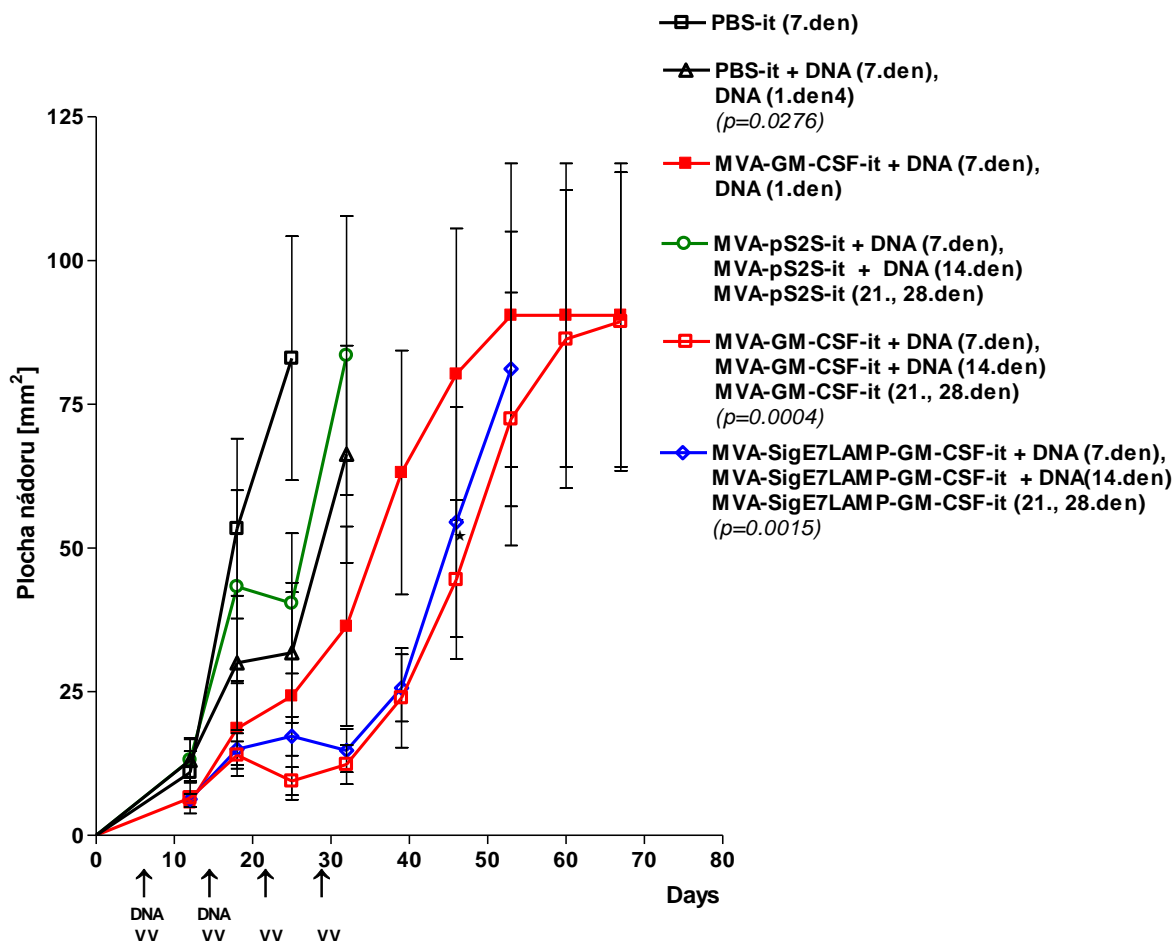
Analýza výsledků ukázala (viz. Obr. 31), že intraperitoneální a intramuskulární podání viru, stejně jako použití viru P13-GM-CSF, nemělo signifikantní vliv na růst nádoru. Aplikace nereplikujícího se viru MVA-GM-CSF do nádoru vedla při srovnání se skupinou léčenou PBS s DNA vakcínou k signifikantní inhibici růstu nádorů ( $p=0,0003$ ) u 3 myši z 8. Pokud jsme MVA-GM-CSF podali do nádoru ve dvou následných dávkách, protinádorový efekt byl výraznější. ( $P=0,016$ ).



**Obr. 31: Vliv aplikace rVACV-GM-CSF na terapii TC-1/A9 nádorů DNA vakcinací plazmidem pBSC E7GGG.GUS ( rVACV a DNA vakcíny byly společně podané v jedné nebo ve dvou dávkách )**

Skupinám myši ( $n = 6$  na skupinu) byly v den 0 podáno s.c. injekcí  $3 \times 10^4$  buněk TC-1/A9 . Po sedmi a čtrnácti dnech byly myši imunizovány DNA vakcínou. Myším bylo dále v době první imunizace DNA vakcínou podáno i.p., i.m. nebo i.t.injekcí  $10^5$  PFU P13-GM-CSF nebo  $10^6$  PFU MVA-GM-CSF . Skupiny imunizované jednou ( $p = 0,0003$ ) nebo dvěma ( $p = 0,016$ ) dávkami MVA-GM-CSF a DNA byly porovnány se skupinou imunizovanou pouze DNA.

Ovšem jak je patrné z Obr. 32, pokud byl MVA-GM-CSF intratumorálně injikován v týdenních intervalech v počtu až čtyřech dávek, byl protinádorový efekt ještě větší.



**Obr. 32: Vliv intratumorální aplikace MVA-GM-CSF na terapii TC-1/A9 nádorů DNA vakcínací plazmidem pBSC E7GGG.GUS**

Skupinám myší ( $n = 6$  na skupinu) byly v den 0 podáno s.c. injekcí  $3 \times 10^4$  buněk TC-1/A9 . Po sedmi a čtrnácti dnech byly myši imunizovány DNA vakcínou. Myším bylo dále v době imunizace DNA vakcínou podáno i.t.injekcí  $10^6$  PFU MVA-GM-CSF nebo  $10^6$  PFU MVA-GM-CSF SigE7LAMP . Skupina imunizovaná DNA byla porovnána se skupinou, které byl podán PBS ( $p = 0.0276$ ) a skupiny, které dostaly i.t. injekci MVA-GM-CSF ( $p = 0,0004$ ) nebo MVA-GM-CSF-SigE7LAMP( $p=0.0015$ ) a DNA byly porovnány se skupinou léčenou MVA-pS2S a DNA.

V případě intratumorální aplikace viru MVA-pS2S jsme nepozorovali žádný protinádorový efekt, což potvrzuje, že účinek intratumorálně podaných virů byl závislý na produkci GM-CSF (Obr. 32). Ve stejném pokusu jsme dále testovali vliv produkce GM-CSF intratumorálně podanou dvojitou rekombinantou MVA, která současně exprimovala protein E7 ve formě vysoce imunogenního fúzního proteinu Sig/E7/LAMP. Jak ukazuje Obr. 32, inhibice růstu nádorů byla v tomto případě přibližně stejná jako při

použití jednoduché rekombinanty MVA-GM-CSF.

#### 4.2.2 MVA-GM-CSF zlepšil imunoterapii minimální reziduální choroby

V této části práce jsme se snažili zjistit, jestli je možné použít DNA vakcinaci společně s lokální aplikací MVA-GM-CSF pro imunoterapii chirurgicky navozené minimální reziduální nemoci.

V den 0 jsme myším subkutánně podali  $6 \cdot 10^4$  buněk TC-1/A9. Po 14 dnech byly myším nádory chirurgicky odstraněny a jak je zobrazeno v Tabulce 9, myším byla 18 a 25.den (4. a 11. po operaci) metodou „gene gun“ aplikována DNA vakcína pBSC E7GGG.GUS a současně subkutánně do místa odoperovaného nádoru injikováno  $10^6$  PFU MVA-GM-CSF. Množství přežívajících jedinců jsou zobrazena v Tabulce 9. Frekvence relapsu nádorů je přibližně stejná ve všech testovaných skupinách myší, ale u skupin léčených DNA vakcínou společně s jednou nebo dvěma dávkami MVA-GM-CSF byla v porovnání se skupinami léčenými pouze DNA vakcínou nebo jednou nebo dvěma dávkami MVA-GM-CSF nástup relapsů opožděný.

Skupina <sup>a</sup>	1.dávka viru 4.den po operaci	1.dávka DNA vakcíny 4.den po operaci	2.dávka viru 11. den po operaci	2.dávka DNA vakcíny 11. den po operaci	Přežívající myši 25. den po operaci [%]	Myši s nádory
1	- <sup>b</sup>	-	-	-	30	6/7
2	-	+	-	+	32	6/6
4	MVA-GMCSF	-	-	-	32	5/6
5	MVA-GMCSF	+	-	+	58	6/7
6	MVA-GMCSF	+	MVA-GMCSF	+	58	6/7

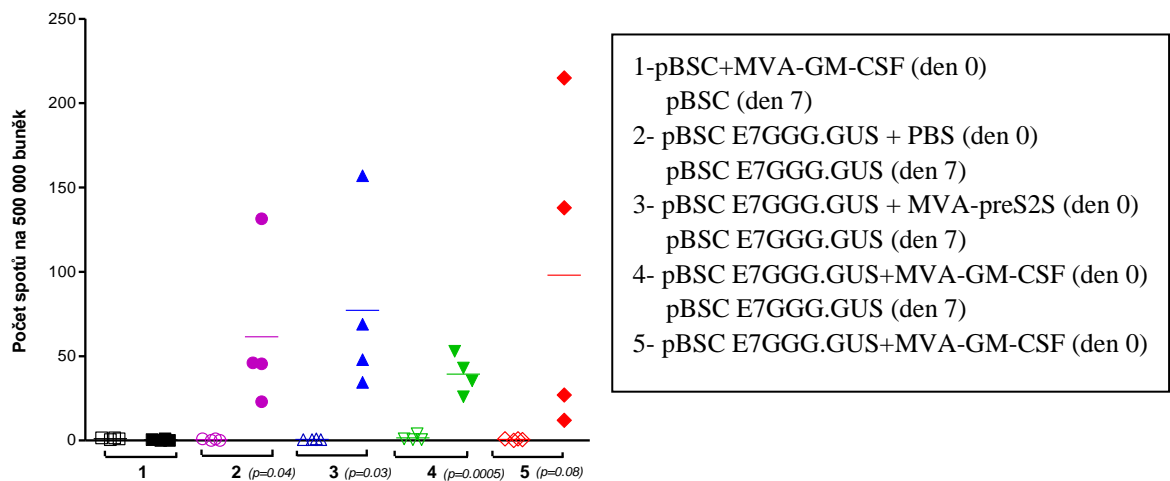
**Tabulka 9 : Léčba minimální zbytkové nemoci po aplikaci nádorů TC-1/A9 prostřednictvím MVA-GM-CSF a DNA vakcíny.**

<sup>a</sup>Byly vytvořeny skupiny myší se stejnou distribucí nádorů různé velikosti

<sup>b</sup>Kontrolní skupině byl podán PBS.

### 4.2.3 MVA-GM-CSF nezesílil specifickou E7 T buněčnou imunitu po imuniza DNA vakcínou

Abychom analyzovali mechanismus, kterým působí lokálně podaný GM-CSF na buněčnou imunitu, detekovali jsme E7 specifickou T buněčnou odpověď u myši imunizovaných podle stejného schématu jako při léčbě minimální zbytkové nemoci, ale bez vytvoření nádorů. Myši jsme imunizovali dvěma dávkami DNA vakcíny podané metodou „gene gun“ a MVA- GM-CSF, které jsme v dávce  $10^6$  PFU injikovali subkutánně do dorzální části těla (obvyklé místo odoperovaného nádoru) . Specifická buněčná odpověď byla testována metodou ELISPOT-IFN- $\gamma$  u *ex vivo* splenocytů, které byly přes noc stimulovány E7(49-57) peptidem RAHYNIVTF. Jak ukazuje Obr. 33, u všech skupin, které byly imunizovány plazmidem pBSC/E7GGG.GUS ( skupiny 2-5) byla, při porovnání s kontrolní skupinou, které byl podán plazmid pBSC, detekována signifikantně zvýšená specifická E7 T buněčná odpověď. Nejvyšší průměrné hodnoty specifické E7 odpovědi jsme pozorovali u myši, kterým byly podány DNA vakcína a MVA-GM-CSF dvakrát (skupina 5), ale díky vysokému rozptylu detekovaných hodnot nebyly rozdíly statisticky signifikantní . Srovnání odpovědí skupin, které byly imunizovány pBSC E7GGG.GUS (2, 3, 4, 5), z nichž některým byly současně i.t. injikovány různé rekombinanty MVA ukázalo, že aplikace viru nevedla k signifikantnímu zvýšení E7-specifické T buněčné odpovědi. To nás vedlo úvaze, že role MVA-GM-CSF při terapii TC-1/A9 nádorů může spočívat v úpravě lokálního nádorového mikroprostředí.



**Obr. 33: Vliv podání MVA-GM-CSF na specifickou E7 T buněčnou odpověď navozenou DNA imunizací**

Skupiny myši (n = 4 ve skupině) jsme imunizovali dvěma dávkami DNA vakcíny metodou „gene gun“ a současně jsme jim s.c. do hřbetní oblasti aplikovali  $10^6$  PFU rMVA v 20  $\mu$ l PBS. Jednotlivé skupiny dostaly následující kombinace DNA vakcíny a viru: 1:pBSC + MVA-GM-CSF (den 0), pBSC (7. den), 2: pBSC E7GGG.GUS + PBS (den 0), pBSC E7GGG.GUS (7. den), 3: pBSC E7GGG.GUS + MVA-preS2S (den 0), pBSC E7GGG.GUS (7. den), 4: pBSC E7GGG.GUS + MVA-GMCSF (den 0), pBSC Fuze E7GGG.GUS (7. den), 5: pBSC E7GGG.GUS + MVAGM-CSF (den 0), pBSC E7GGG.GUS + MVA-GM-CSF (7. den). Množství E7-specifických CD8 + T lymfocytů u každé myši stanovili IFN- $\gamma$  ELISPOT. Průměrné počty buněk produkujících IFN- $\gamma$  získané v nepřítomnosti (prázdné symboly) a v přítomnosti peptidu E7(49-57) (plné symboly) jsme porovnali a analyzovali nepárovým t-testem.

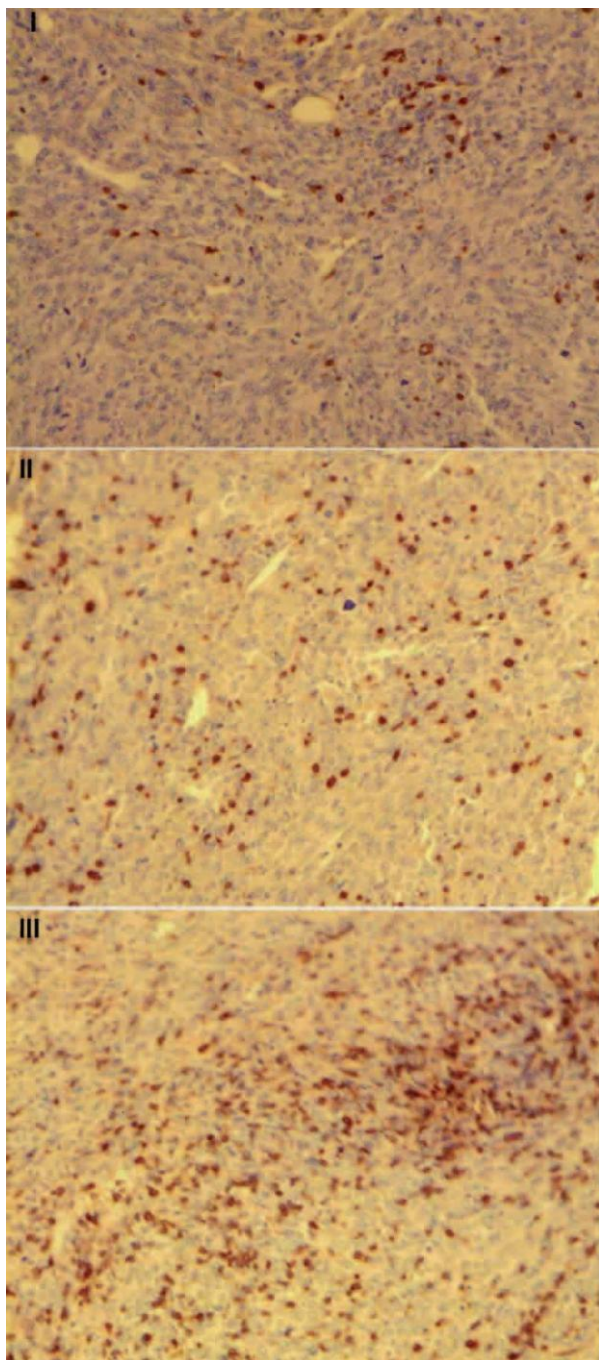
#### **4.2.4 Mikroprostředí MHC I negativních TC-1/A9 nádorů bylo ovlivněno aplikací MVA-GM-CSF a DNA vakcíny**

Na závěr této části naší práce jsme se pokusili zjistit, jaký má námi použitá imunoterapie vliv na mikroprostředí nádoru.

##### **4.2.5.1 Analýza buněčné skladby nádoru pomocí imunohistochemického barvení histologických řezů**

Skupinám myší po 6 jedincích jsme nejdříve podali  $6 \cdot 10^4$  buněk TC-1/A9, abychom je 7 a 14 dní poté imunizovali DNA vakcínou pBSC/E7GGG.GUS. Současně s imunizací jsme myším intratumorálně injikovali viry MVA-GM-CSF a kontrolní MVA-preS2S. Čtyři dny po druhé intratumorální injekci byly vždy tři nádory podobné velikosti z každé skupiny histologicky vyšetřeny.

V nádorech myší neimunizovaných myší, kterým byl do nádoru injikován PBS nebo u myší imunizovaných DNA vakcínou, kterým byl do nádoru injikován PBS, byla pozorována pouze slabá difúzní infiltrace CD3<sup>+</sup> T buňkami. V nádorech myší, kterým byl do nádoru aplikován virus MVA-GM-CSF, byly pozorovány menší oblasti se zvýšeným množstvím CD3<sup>+</sup> T buněk. Při aplikaci kontrolního viru MVA-pS2S došlo pouze ke slabé infiltraci nádoru CD3<sup>+</sup> T buňkami.

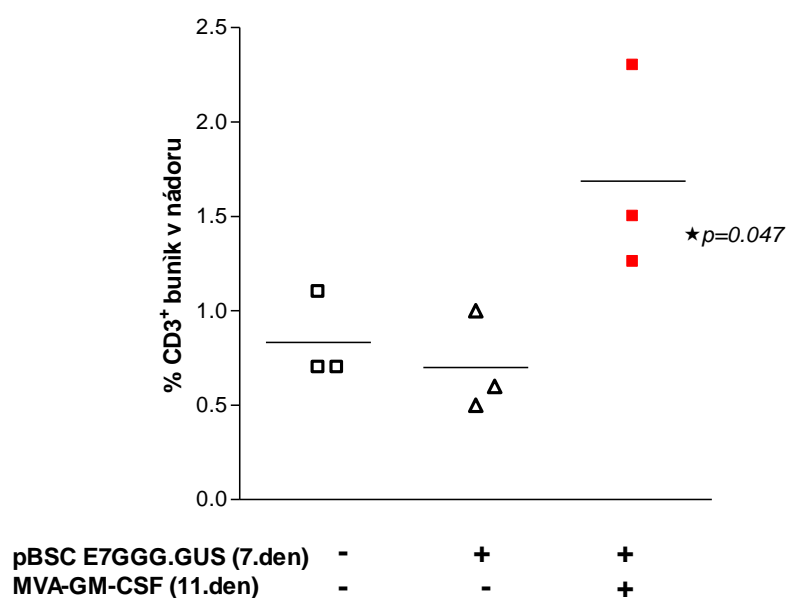


**Obr. 34: Analýza buněk infiltrujících nádor pomocí imunohistochemického barvení histologických řezů**

Skupinám myší ( $n = 6$  na skupinu) jsme v den 0 podali s.c. injekcí  $3 \times 10^4$  buněk TC-1/A9 . Po sedmi a čtrnácti dnech jsme je imunizovali DNA vakcínou a současně jsme jim podali i.t.injekcí  $10^6$  PFU MVA-GM-CSF a jejich nádory jsme analyzovali imunohistochemickým barvením CD3 + T-buněk v nádoru. Obrázek I zobrazuje kontrolní myši, obrázek II myši imunizované pBSC E7GGG.GUS a obrázek III myši , které obdržely pBSC E7GGG.GUS a i.t. injekci MVA-GM-CSF. Histologické řezy byly barveny krysí protilátkou proti lidskému CD3 a hematoxylinem.

#### 4.2.5.2 Analýza buněčné skladby nádoru pomocí průtokové cytometrie

Nádory jsme vyjmuli sedm dní po druhé intratumorální aplikaci viru a v buňkách celého nádoru jsme pomocí průtokové cytometrie detekovali leukocytární markery. Jak ukazuje Obr. 35., analýza změřených dat potvrdila výsledky získané imunohistochemickým barvením histologických řezů. Nádory myši léčených kombinací DNA vakcíny s intratumorálním podáním MVA-GM-CSF obsahovaly statisticky signifikantně větší množství  $CD3^+$  pozitivních buněk. Nicméně při detekci buněk pozitivních pro markery Ly6G, CD11c, F4/80 a marker neutrofilů 7/4 jsme nepozorovali významné rozdíly mezi skupinami myši, které se lišily předcházejícím způsobem léčby (data nejsou ukázána).



Obr. 35 : Analýza buněk infiltrujících nádor pomocí průtokové cytometrie

Skupinám myši (n = 6 na skupinu) jsme v den 0 podali s.c. injekcí  $3 \times 10^4$  buněk TC-1/A9. Po sedmi a čtrnácti dnech jsme je imunizovali DNA vakcínou a současně jsme jim podali i.t.injekcí  $10^6$  PFU MVA-GM-CSF. Jako jednou z metod zkoumajících vliv i.t. injekce MVA-GM-CSF na mikroprostředí MHC I negativních TC-1/A9 nádorů byla na povrchu buněk izolovaných z nádorů detekována průtokovou cytometrií exprese  $CD3^+$  antigenů.

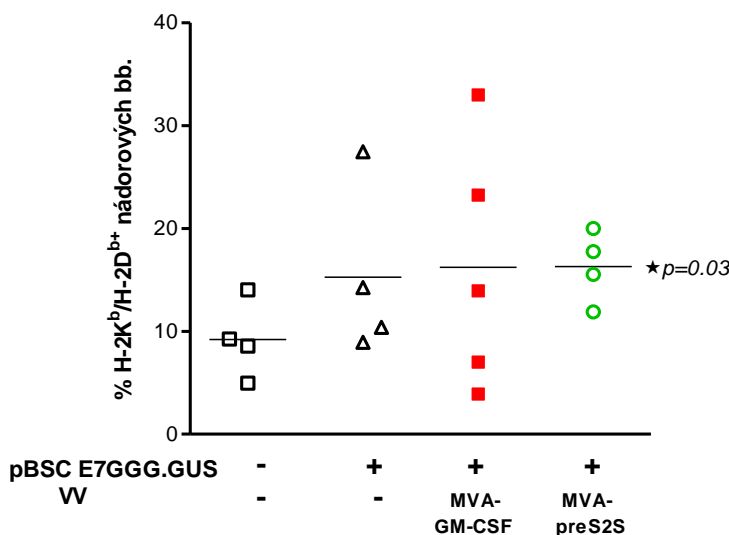
#### 4.2.5.3 Analýza exprese MHCI molekul na povrchu nádorových buněk

V minulosti bylo pozorováno, že ošetření buněk TC-1/A9 buněk  $IFN-\gamma$  vede ke zvýšené expresi molekul MHCI na povrchu nádorových buněk (Smahel et al., 2003). Buňky TC-1/A9, které rostly *in vivo*, také vykazovaly na povrchu zvýšené množství MHCI



molekul ve srovnání s buňkami pěstovanými *in vitro*. Abychom zjistili vliv léčby nádorů *in situ* pomocí různých rVACV, detekovali jsme MHC I molekuly na povrchu buněk izolovaných z nádorů vytvořených podáním TC-1/A9 buněk.

Skupinám myší po čtyřech nebo pěti jedincích jsme subkutánně injikovali  $6 \cdot 10^4$  buněk TC-1/A9. Sedm a čtrnáct dní poté jsme je imunizovali DNA vakcínou pBSC/E7GGG.GUS a současně jsme jim intratumorálně podali virus MVA-GM-CSF. Expresi MHC I molekul na povrchu jsme detekovali u adherentních buněk excidovaných 3.den po druhé imunizaci. Jak je patrné z Obr. 36, u všech skupin, kterým byla aplikována DNA vakcína, došlo při porovnání s neléčenou kontrolní skupinou ke zvýšení exprese MHC I. Naopak při porovnání skupin léčených intratumorálním podáním MVA-GM-CSF nebo MVA-preS2S se skupinou neléčenou virem, nebyly zaznamenány žádné rozdíly.



**Obr. 36: Analýza exprese molekul H-2Kb a H-2Db na povrchu adherentních buněk izolovaných z nádorů vytvořených podáním TC-1/A9 pomocí průtokové cytometrie**

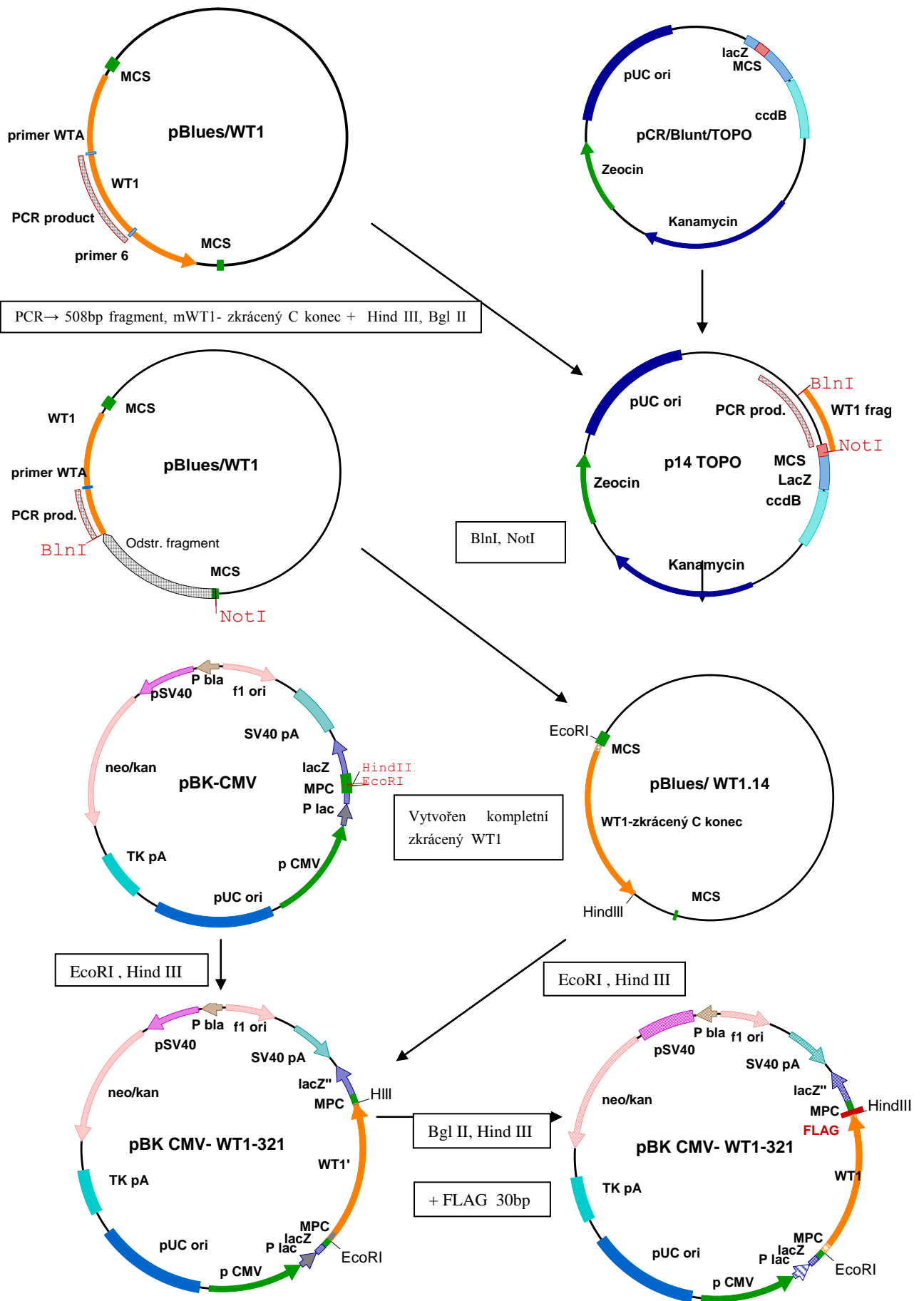
Skupinám myší ( $n = 6$  na skupinu) jsme v den 0 podali s.c. injekcí  $3 \times 10^4$  buněk TC-1/A9. Po sedmi a čtrnácti dnech jsme je imunizovali DNA vakcínou a současně jsme jim podali i.t.injekcí  $10^6$  PFU MVA-GM-CSF. Jako jednou z metod zkoumajících vliv intratumorální injekce MVA-GM-CSF na mikroprostředí MHC I negativních TC-1/A9 nádorů byla na povrchu adherentních buněk izolovaných z nádorů a kultivovaných přes noc *in vitro* detekována průtokovou cytometrií exprese H-2Kb and H-2Db antigenů.

## **4.3 Příprava transgenní leukemické nádorové linie stabilně exprimující WT1 antigen**

V této části naší práce bylo naším cílem vytvoření linie modelových nádorových buněk C1498 vhodných pro testování různých metod imunoterapie nádorů exprimujících WT1 antigen, která by obsahovala zkrácenou formu myšího WT1 proteinu postrádající 121 aminokyselin na C konci. Vzniklému proteinu by tak chyběla DNA vazebná doména (helix-loop-helix), která způsobuje, že modelové nádorové buňky produkující WT1 podléhají rychle apoptóze. Zkrácený protein WT1 měl být také snadno detekovatelný pomocí protilátky proti oligopeptidu FLAG, jehož gen byl vložen na nově vytvořený C konec. Za tímto účelem jsme se rozhodli připravit plazmid pBK-CMV sWT1.

### **4.3.1 Konstrukce plazmidu BK-CMV/WT1-321**

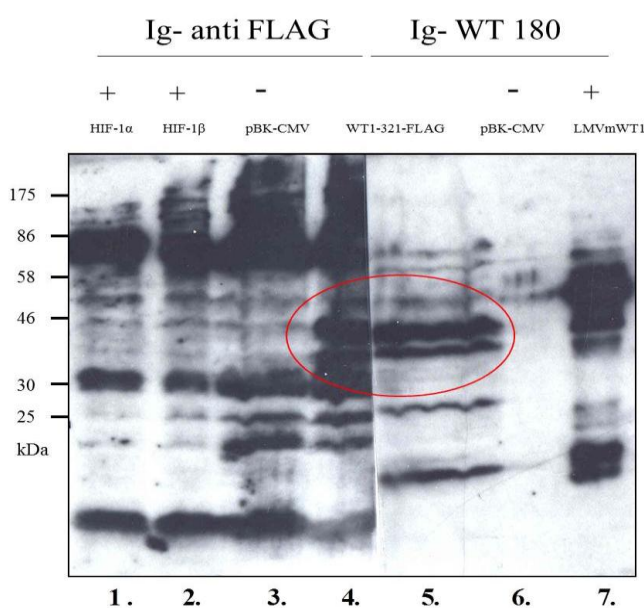
Konstrukce plazmidu pBK-CMV sWT1 zahrnovala následující kroky. Přibližně 500 bp (518) velký fragment myšího genu WT obsahující zkrácenou C koncovou část jsme amplifikovali metodou PCR pomocí Pfu polymerázy, primerů WTA a 6 a plazmidu pBlue WT1 jako DNA templátu. Díky primeru 6 byla na C konec dodána restrikční místa HindIII a BglIII, umožňující pozdější ligaci oligopeptidu FLAG. Vzniklý fragment opatřený, díky použití polymerázy Pfu, tupými konci jsme poté vligovali do plazmidu pCR Blunt TOPO. Z takto vytvořeného plazmidu jsme následně enzymy BlnI a NotI vyštěpili 280 bp velkou sekvenci (tvořenou 268 bp vloženého fragmentu WT1 zahrnující zkrácený a upravený C konec a 12 bp TOPO plazmidu) a vložili ji zpět do plazmidu pBlue WT1, který byl před tím také štěpen enzymy BlnI a NotI. Hotový zkrácený WT1 gen jsme z plazmidu pBlueWT1-14 vyštěpili enzymy EcoRI a HindIII a zaligovali do expresního plazmidu pBKCMV po jeho naštěpení stejnými enzymy. Posledním krokem konstrukce pBK-CMV sWT1 bylo vložení oligopeptidu FLAG na C konec zkráceného WT1 s použitím restrikčních míst EcoRI a HindIII. Správnost jednotlivých kroků konstrukce jsme vždy ověřili restrikční analýzou. Fragment WT1 obsahující zkrácený a upravený C konec byl ověřen sekvenací a sekvenace byla také použita pro překontrolování finálního plazmidu.



Obr. 37: Konstrukce vektoru pBK-CMV/WT1-321

### 4.3.2 Exprese proteinu WT1-321 v 293T buňkách

Dále jsme zjišťovali schopnost tohoto plazmidu navodit expresi zkonstruovaného proteinu. pBK-CMV/WT1-321 jsme přečistili kitem QIAGEN Plazmid Mega Kit a následně jím metodou kalcium fosfátové precipitace transfekovali buňky 293T. Ty jsme dva dny poté zlyzovali a takto připravené proteiny jsme analyzovali metodou western blot (obr. 38). Po použití SDS-PAGE elektroforézy s 12%-ním gelem a primárních protilátek proti N-konci WT1 proteinu (WT-180, ředění 1:400) a proti oligopeptidu FLAG (M2, ředění 1:400) s odpovídajícími sekundárními protilátkami, byly detekovány “ proužky “ (proteiny) správné velikosti (dráhy 4 a 5).



**Obr. 38: Western blot buněk 293T transfekovaných plazmidem pBK-CMV/WT1-321**

Buňky 293T jsme transfekovali metodou kalcium fosfátové precipitace plazmidem pBK-CMV/WT1-321 přečištěným kitem QIAGEN Plazmid Mega Kit. Po dvou dnech jsme je zlyzovali a takto připravené proteiny jsme analyzovaly metodou western blot s použitím SDS-PAGE elektroforézy s 12% gelem. Membránu s navázaným proteiny jsme rozstříhli za dráhou 4. Levou část (dráhy 1-4) jsme nechali inkubovat s s monoklonální protilátkou proti oligopeptidu FLAG (M2) a pravou část s polyklonální protilátkou proti N-konci WT1 proteinu (WT-180).

Použitý standard molekulových hmotností udává velikosti v kDa.

**Ig-anti Flag**-protilátka proti oligopeptidu FLAG

**Ig-WT180**- protilátka proti N-konci WT1 proteinu

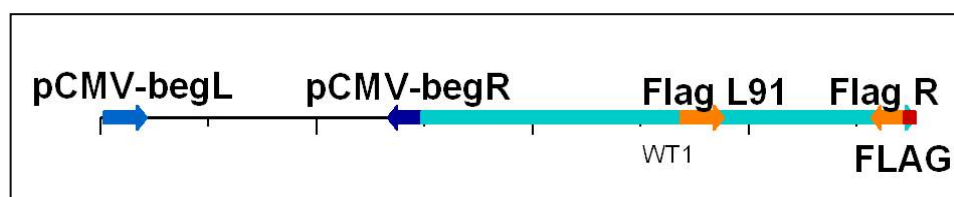
1. pozitivní kontrola (lyzát 293T buněk transfekovaných plazmidem pBSC, který obsahuje fúzní protein hypoxia inducible faktoru 1 $\alpha$  s FLAGEM)
2. pozitivní kontrola (lyzát 293T buněk transfekovaných plazmidem pBSC, který obsahuje fúzní protein hypoxia inducible faktoru 1 $\beta$  s FLAGEM)
3. negativní kontrola (lyzát 293T buněk transfekovaných plazmidem pBK-CMV)
4. lyzáty 293T buněk transfekovaných plazmidem WT1-321-FLAG (protilátka proti oligopeptidu FLAG)
5. lyzáty 293T buněk transfekovaných plazmidem WT1-321-FLAG (protilátka proti N-konci WT1 proteinu)
6. negativní kontrola (lyzát 293T buněk transfekovaných plazmidem pBK-CMV)
7. pozitivní kontrola (lyzát 293T buněk transfekovaných plazmidem LMVmWT1, který obsahuje myší WT1)

### 4.3.3 Transfekce buněk myši myelomonocytární leukemie C1498

Plazmidem pBK-CMV/WT1-321 (jak v cirkulární, tak lineární formě po naštěpení enzymem Alw44I (Apa I) jsme metodou elektroporace transfekovali nádorové buňky C1498. Následně jsme 14 dní pěstovali v selekčním médiu s antibiotikem (neomycin). Po uplynutí této doby jsme provedli klonování, které spočívalo z nanesení buněk naředěných na koncentraci 0,2 buňky na jamku na 96 jamkový panýlek, nalezení jamky s jednou buňkou a následné sledování množení buněk v těchto jamkách po dobu 10 až 14 dnů. Buňky, které se množily, jsme zmrazili, rozmrazili a poté jsme u nich testovali nejdříve přítomnost genu pro zkrácený WT1 protein metodou PCR a pokud jsme našli pozitivní klony, zjišťovali jsme u nich přítomnost zkráceného WT1 proteinu metodou western blot.

#### 4.3.3.1 Analýza buněk C-1498 transfekovaných nelinearizovaným plazmidem pBK-CMV/WT1-321

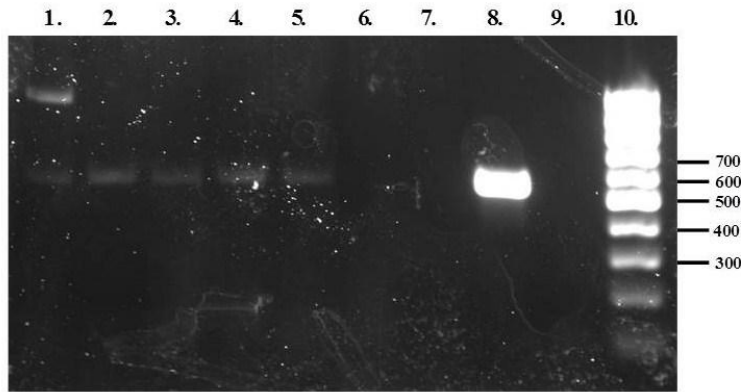
Získané klony jsme analyzovali metodou PCR s použitím primerů, které umožňovaly detekci vloženého oligopeptidu FLAG (FlagL91, FlagR)(Obr.40).



Obr. 39: Schématické zobrazení primerů použitých pro detekci zkráceného WT1 genu

CMV beg L, CMV beg- R – primery pro detekci N-koncové části CMV promotoru

FlagL91, FlagR – primery pro detekci vloženého oligopeptidu FLAG

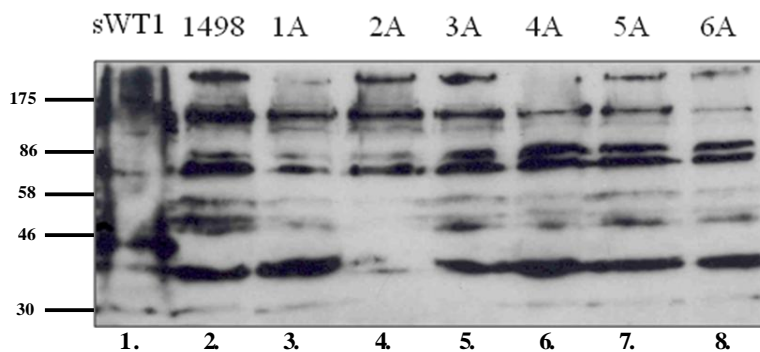


**Obr. 40: Detekce zkráceného WT1 genu metodou PCR pomocí primerů FlagL91, FlagR**

Z buněk C-1498 transfekovaných nelinearizovaným plazmidem pBK-CMV/WT1-321 jsme izolovali DNA pomocí DNeasy and Blood and Tissue kitu (Qiagen), kterou jsme poté použili s primery FlagL91 a FlagR pro detekci vloženého oligopeptidu FLAG metodou PCR.

1. klon 6 2. klon 5 3. klon 4 4. klon 3 5. klon 2A 6. klon 2B 7. negativní kontrola (buňky 1498K) 7. negativní kontrola 8. pozitivní kontrola- plazmid pBK-CMV/WT1-321 9. negativní kontrola- produkt PCR reakce bez DNA

Pozitivní plaky jsme dále analyzovali metodou western blot, která byla provedena za stejných podmínek, jako při výše popsané detekci zkráceného proteinu WT po transfekci buněk 293T. Bohužel, jak je patrné z Obr. 41, u žádného z připravených klonů nebyl nalezen protein správné velikosti.



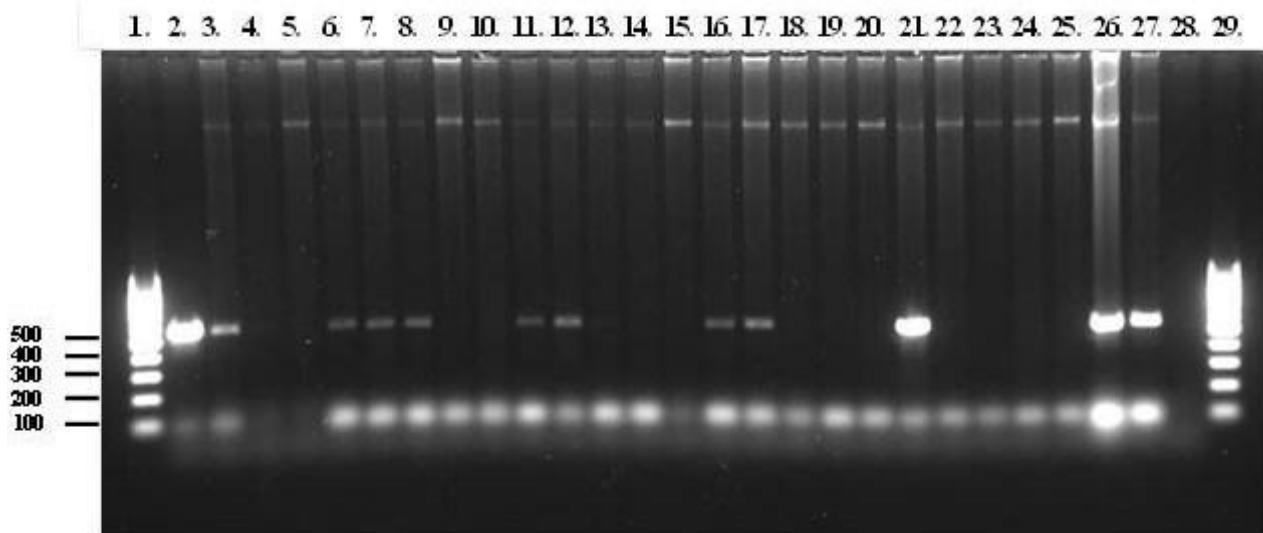
**Obr. 41: Western blot buněk C-1498 transfekovaných nelinearizovaným plazmidem pBK-CMV/WT1-321**

Buňky C-1498 transfekované nelinearizovaným plazmidem pBK-CMV/WT1-321 jsme zlyzovali a takto připravené proteiny jsme analyzovaly metodou western blot s použitím SDS-PAGE elektroforézy s 12% gelem. Membránu s navázanými proteiny jsme inkubovali s monoklonální protilátkou proti oligopeptidu FLAG (M2). Použitý standard molekulových hmotností udává velikosti v kDa.

1. pozitivní kontrola- lyzát 293T buněk transfekovaných plazmidem pBK-CMV/WT1-321-FLAG 2. netransfekované buňky C1498 3. klon 1A 4. Klon 2A 5. klon 3A 6. klon 4A 7. Klon 5A 8. Klon 6A

### 4.3.3.2 Analýza buněk C-1498 transfekovaných linearizovaným plazmidem pBK-CMV/WT1-321

Získané klony jsme opět nejdříve analyzovali metodou PCR s použitím primerů, které umožňovaly detekci v tomto případě ne pouze genu vloženého oligopeptidu FLAG (FlagL91, FlagR), ale i N-koncovou část CMV promotoru (CMV beg L, CMV beg R). Nejdříve jsme našli klony, které byly pozitivní při užití primerů umožňujících detekci genu pro FLAG (Obr.42). Byly to klony 10, 11,15,16,19,20,21,28,29,30,32 a 33.

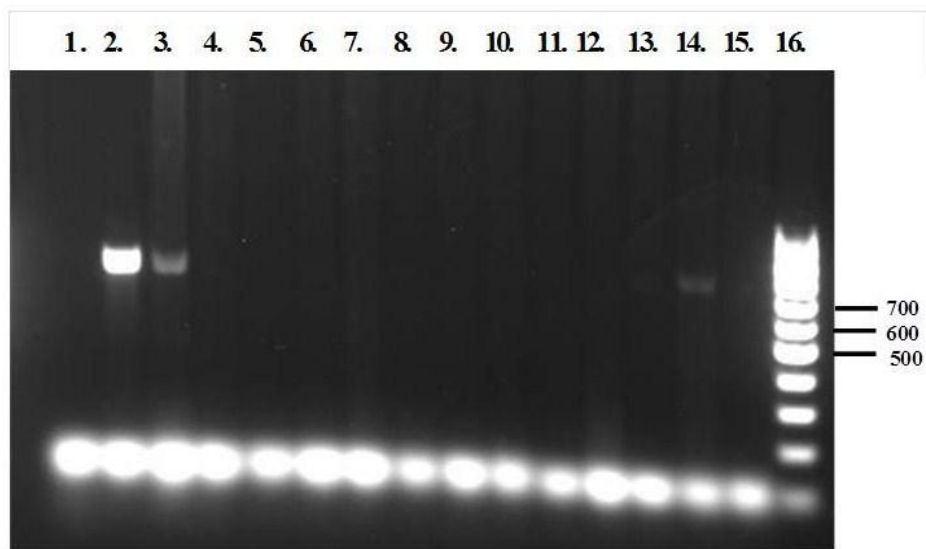


**Obr. 42: Detekce zkráceného WT1 genu metodou PCR pomocí primerů FlagL91, FlagR**

Z buněk C-1498 transfekovaných linearizovaným plazmidem pBK-CMV/WT1-321 jsme izolovali DNA pomocí DNeasy and Blood and Tissue kitu (Qiagen), kterou jsme poté použili s primery FlagL91 a FlagR pro detekci vloženého oligopeptidu FLAG metodou PCR.

1. Low Range DNA Marker 2. pozitivní kontrola- pBK-CMV/WT1-321-FLAG 3. klon 33 4. pozitivní klon 32 5. negativní klon 31 6. pozitivní klon 30 7. klon 29 8. pozitivní klon 28 9. negativní klon 27 10. negativní klon 24 11. pozitivní klon 21 12. pozitivní klon 20. 13. pozitivní klon 19 14. negativní klon 18 15. negativní klon 17 16. pozitivní klon 16 17. pozitivní klon 15 18. negativní klon 14 19. negativní klon 13 20. negativní klon 12 21. pozitivní klon 11 22. pozitivní klon 10 23. negativní klon 9 24. negativní klon 8 25. negativní klon 7 26. 27. pozitivní kontrola- plazmid LMVmWT1, který obsahuje myši WT1 28. negativní kontrola- produkt PCR reakce bez DNA 29. Low Range DNA Marker

Z nich jsme dále vybrali klony, které byly současně pozitivní při užití primerů umožňujících detekci CMV promotoru (Obr. 43). Byly to klony 11, 15 a 30.



**Obr. 43: Detekce zkráceného WT1 genu metodou PCR pomocí primerů CMV beg L, CMV beg R1.**

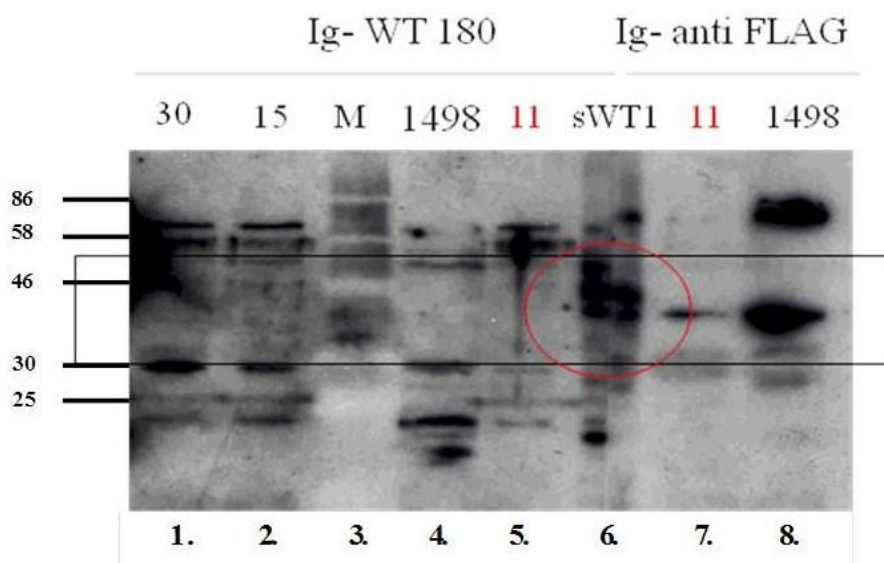
Z buněk C-1498 transfekovaných linearizovaným plazmidem pBK-CMV/WT1-321 jsme izolovali DNA pomocí DNeasy and Blood and Tissue kitu (Qiagen), kterou jsme poté použili s primery CMV beg L, CMV beg- R pro detekci N-koncové části CMV promotoru metodou PCR.

1.negativní kontrola- produkt PCR reakce bez DNA 2. pozitivní kontrola- pBK-CMV/WT1-321-FLAG .  
3. pozitivní kontrola plazmid LMVmWT1, který obsahuje myší WT1 4. negativní klon 33 5. negativní klon 32 6. negativní klon 29 7. negativní klon 28 8. negativní klon 31 9. pozitivní klon 30 10. negativní klon 20 11. negativní klon 19 12. negativní klon 16 13. pozitivní klon klon 15 14. pozitivní klon 11 15. negativní kontrola- produkt PCR reakce bez DNA 16. Low Range DNA Marker

Pozitivní plaky jsme nakonec analyzovali western blotem, který byl proveden za stejných podmínek, jako při výše popsáné detekci zkráceného WT1 proteinu po transfekci 293T buněk.



Bohužel jak je patrné z Obr. 44, ani u žádného z těchto klonů nebyl nalezen protein správné velikosti.



**Obr. 44: Western blot buněk C-1498 transfekovaných linearizovaným plazmidem pBK-CMV/WT1-321**

Buňky C-1498 transfekované linearizovaným plazmidem pBK-CMV/WT1-321 jsme zlyzovali a takto připravené proteiny jsme analyzovaly metodou western blot s použitím SDS-PAGE elektroforézy s 12% gelem. Membránu s navázanými proteiny jsme rozstříhli uprostřed dráhy 6. Levou část (dráhy 1-6) jsme nechali inkubovat s polyklonální protilátkou proti N-konci WT1 proteinu (WT-180) a pravou část s monoklonální protilátkou proti oligopeptidu FLAG (M2).

Použitý standard molekulových hmotností udává velikosti v kDa.

**1.**klon 30 **2.**klon 15 **3.** Protein Marker Broad Range **4.** netransfekované buňky C1498 **6.** .pozitivní kontrola-lyzát 293T buněk transfekovaných plazmidem pBK-CMV/WT1-321-FLAG **7.** klon 11 **8.** netransfekované buňky C1498

Závěrem tedy musíme konstatovat, že se nám podařilo vytvořit C1498 buňky s rezistencí na antibiotika, u kterých ovšem nebyla detekována exprese zkráceného WT1 proteinu. Možnou příčinou může být vložení pouze části plazmidu s genem pro ATB rezistenci nebo delece či mutace genu WT1-321 s jeho následnou fragmentací či vytvořením předčasného stop kodonu, což by mohlo navodit inhibici translace .

## 5. Diskuze

### 5.1 Hodnocení výsledků získaných imunizací rVACV s různými formami genu vCCI

V naší studii jsme zkoumali vliv imunomodulačního proteinu vCCI na imunogenost rekombinant odvozených z klonu P13 očkovacího kmene Praha a jejich protinádorové účinky proti nádorům TC-1.

Poxviry byly mnohokrát použity při experimentální terapii nádorů. Fungují buď jako vektory pro dopravování terapeutických genů jako jsou TAA a imunomodulační molekuly, nebo jako onkolytické viry (Harrington KJ, 201). S vektory založenými na VACV bylo provedeno velké množství klinických studií. Bylo prokázáno, že imunizace virem vakcinie exprimujícími proteiny E6 a E7 lidského papillomaviru 16 a 18 má protinádorové účinky a schopnost navodit u laboratorních myší reakce antigen specifických T-buněk (Hsieh et al., 2004; Mackova et al., 2006). Léčebný účinek těchto vakcín se ukázal i v řadě studií u pacientů s vulvárními a vaginálními neoplazii (Corona Gutierrez et al., 2004; Davidson et al., 2004; Fiander et al., 2006).

Současné imunoterapie jsou primárně zaměřeny na vyvolání nebo zvyšování protinádorových T-buněčných reakcí a v posledních letech bylo provedeno mnoho klinických studií fáze II a III s tímto cílem (Emens, 2008). Jednou z cest aktivace silné T buněčné odpovědi je užití oslabených replikujících se virů, které mohou být připraveny např. delecí genů pro imunomodulační proteiny. Poxviry, stejně jako ostatní velké DNA viry, disponují různými strategiemi pro ovlivnění hostitelské imunitní odpovědi (Johnston & McFadden, 2003). V posledních letech bylo věnováno mnoho pozornosti secernovaným virovým verzím receptorů pro cytokiny, např. IL-1 $\beta$ , TNF, IFN- $\alpha/\beta$ , IFN- $\gamma$  (Epperson et al., 2012). Kromě nich rovněž poxviry produkují secernované proteiny, které vážou s vysokou afinitou CC-chemokiny (Alcami, 2007). S mnoha těmito geny bylo manipulováno, aniž by bylo dosaženo požadovaných výsledků, nicméně delece genů IL-18, IL-1 $\beta$ R, A41L vedla k vytvoření atenuovaných VACV navozujících silnější imunitní odpověď (Pickup, 2007).

Protein vCCI patří do skupiny secernovaných virových imunomodulačních proteinů. Díky své schopnosti účinně inhibovat CC chemokiny, které řídí migraci makrofágů, monocytů, DB a lymfocytů může ovlivňovat různé fáze protivirové imunitní reakce. Význam CC chemokinů v tomto procesu byl demonstrován u infekce virem MVA, který při porovnání s kmeny Elstree, Wyeth a WR vyvolává zvýšené hladiny chemokinu CCL2.

Neschopnost MVA zabránit expresi chemokinů blokováním aktivace NF- $\kappa$ B a sekvestrací CCL2 prostřednictvím vCCI pravděpodobně významně přispívá k jeho mimořádnému imunizačnímu potenciálu (Lehmann et al., 2009). Spekulovali jsme, že odstranění genu vCCI z očkovacího viru Praha by mohlo vést k vytvoření oslabeného viru, který by navozoval silnější buněčnou imunitní reakci.

Přestože u řady protinádorových imunoterapeutických postupů bylo prokázáno, že generují aktivní CTL, účinnost u pacientů byla omezená nádorem navozenou lokální nebo systémovou imunosupresí (Rosenberg et al., 2004). Nádorové imunoterapie mohou, kromě indukce imunitní stimulace, také vyvolávat imunosupresivní mechanismy, jako je zvýšení exprese inhibičních povrchových molekul na T buňkách (například CTLA-4 nebo PD1) nebo tvorbu Treg buněk (Parmiani et al., 2007; Gajewski, 2007). Nádory také navozují tvorbu inhibičních cytosinů a chemokinů (Finn, 2003; Finke et al., 1999).

Proto je stále více přijímán názor, že tvorba CTL je nezbytná, ale nikoliv postačující pro účinnou protinádorovou reakci (Emens, 2008; Finn, 2008), která bude vyžadovat aplikaci přístupů vedoucích ke změně mikroprostředí nádoru a snížení imunosuprese (Pardoll, 2003) prostřednictvím eliminace inhibitorů imunitní reakce. Byly použity různé postupy, jako např. blokáda TGF- $\beta$  nebo TGF- $\beta$  signalizace (Kim et al., 2008), použití inhibitorů cyklooxygenázy 2 (Haas et al., 2006), deplece Treg buněk (Comes et al., 2006) nebo blokování CTLA-4 (Egen, 2002).

Chemokiny, tvořené nádorovými buňkami a buňkami nádorového stromatu, mohou hrát důležitou roli v procesu tumorigeneze jak přímým vlivem na nádorové buňky např. prostřednictvím podpory proliferace a přežití (Balkwill, 2004), či ochranou nádorových buněk před apoptózou (Wang et al., 2008a; Murakami et al., 2003), tak nepřímo regulací migrace buněk přirozené a adaptivní imunity jako jsou TAM, MDSC, neutrofilů, NK, DB a tumor infiltrující lymfocyty (Mukaida & Baba, 2012), které přispívají k progresi nádoru a vzniku imunosupresivního nádorového mikroprostředí (Mantovani et al., 2009)

Hlavními atraktanty monocytických prekurzorů jsou především CC-chemokiny zahrnující CCL2, CCL5, CCL7, CCL8 (Mantovani, 1999; Conti & Rollins, 2004a) (Sawanobori et al., 2008), CXCL12 a M-CSF (Singh et al., 2009). Exprese chemokinů CCL2, pravděpodobně nejčastěji nacházeného CC chemokinů v nádorech (Sica et al., 2006a) a CCL5 byla detekována u mnoha nádorů (Sica et al., 2006a) a jejich produkce (u lidských malignit) koresponduje se zvýšeným množstvím TAM, metastázami v lymfatických uzlinách a špatnou prognózou (Luboshits et al., 1999; Ueno et al., 2000).

CCL2 patrně přímo posiluje růst a invazivitu některých nádorových buněk, které exprimují CCR2 receptor (Conti & Rollins, 2004a; Loberg et al., 2006), podporuje angiogenezi (Salcedo et al., 2000b), může sloužit jako chemoatraktant pro Treg buňky (Fu et al., 2004; Jordan et al., 2008) a konečně má přímé inhibiční účinky na funkci T buněk (Peng et al., 1997; Terwey et al., 2005), jako je například inhibice efektorových funkcí T buněk a přepínání diferenciací T buněk směrem k fenotypu Th2 buněk (Hu et al., 2007).

V literatuře panovaly určité rozpory ohledně role CCL2 při rozvoji nádoru. CCL2, který byl původně poznán jako silný chemoatraktant monocytů (Conti & Rollins, 2004b; Loberg et al., 2007b), může také vyvolávat nádorový tropismus T buněk, včetně paměťových T buněk (Brown, 2007; Carr et al., 1994; Wang et al., 2008b). Panovala představa, že CCL2 může fungovat jako inhibitor růstu nádoru. Rané práce také prokázaly, že transfekované nádorové buňky, které vytvářejí vysoké hladiny CCL2, navozují masivní infiltraci nádorové masy monocytů/makrofágy, což vede k její destrukci (Nesbit et al., 2001).

Ovšem vysoká hladina CCL2 byla zjištěna u více typů nádorů, včetně nemalobuněčného karcinomu plic (Conti & Rollins, 2004b; Negus et al., 1995; Arenberg et al., 2000) a jeho vysoké hladiny obvykle korelovaly se špatnými klinickými výsledky (Ueno et al., 2000). Ve studii, kterou provedl Loberg (Loberg et al., 2007a), vedlo systémové podání anti-CCL2 neutralizačních protilátek k výraznému zpomalení růstu nádoru. Použití anti-CCL2 monoklonálních protilátek vyvolalo u myši s xenografty karcinomu prostaty omezení tumorogeneze a metastazování nádorů (Loberg et al., 2007a).

Tato pozorování podpořila představu o spíše protumorogenním (Conti & Rollins, 2004b) účinku CCL2 v netransdukovaných nádorech. Dnes se již ví, že většina monocytů atrahovaných do nádorů neusmrcuje nádorové buňky, ale mění se na M2 fenotyp, který podporuje růst nádoru (Allavena et al., 2008).

Bylo prokázáno, že kromě CCL2 i ostatní CC chemokiny zprostředkovávají angiogenezi a modulují extracelulární matrix *in vivo* (Salcedo et al., 2001; Hwang et al., 2004; Hwang et al., 2005; Strasly et al., 2004; Adler et al., 2003; Son et al., 2006). Chemokiny CCL2 a CCL5 produkované nádory vyvolávají vznik imunosupresivního prostředí prostřednictvím zahájení migrace TAM do nádorového stromatu, což vede k inhibici nádorově specifických efektorových T-buněk (Melief, 2008b). Atrahované TAM jsou také stimulovány těmito chemokiny k vyšší produkci tumorogenních faktorů, které podporují angiogenezi a degradaci extracelulární matrix, aktivitu matrixových metaloproteináz MMP2 a MMP3 a produkci zánětlivých cytokinů typu TNF- $\alpha$ , který

vyvolává další produkci tumor podporujících faktorů, jako jsou MMP a chemokiny CCL2 a CCL5 nádorových buněk.

To ukazuje, že CCL2 a CCL5 jsou prostřednictvím těchto opakujících se cyklů atrahování monocytů a sekrece protumorigenních faktorů na začátku maligního procesu (Ben-Baruch, 2003). Přestože popsán způsob působení CCL2 a CCL5 byl popsán během progresu rakoviny prsu, podobná situace může vzniknout také během progresu rakoviny děložního čípku.

Zvýšené plazmatické hladiny CCL5 byly nalezeny u vyšších stádií karcinomu děložního čípku, a množství CCL5 bylo značně zvýšeno u primárních nádorů a metastáz všech pacientů. Vyšší množství makrofágů s promaligním fenotypem korelující s karcinogenezí bylo pozorováno v nádorovém stromatu pacientů s cervikálními intraepiteliálními neopláziemi vyššího stupně a s karcinomem (Kobayashi et al., 2008). TAM také hrají důležitou roli v rozvoji nádorů TC-1 (Lepique et al., 2009).

Vzhledem k výše popsaným vlastnostem CC chemokinů, především CCL2 a CCL5, které fungují jako inhibitory účinku nádorové imunoterapie, jsme předpokládali, že jejich blokáda prostřednictvím vCCI by mohla být prospěšná.

VACV P13 byl připraven v naší laboratoři jako plakově purifikovaný klon očkovacího kmene Praha (Kutinova et al., 1995). Ve srovnání s VACV kmeny Wyeth a LIVP (Lister), je imunogennost a virulence kmene Praha mezi viry LIVP a Wyeth. Klon P13 je nejvíce virulentní ve srovnání s ostatními klony Praha. Virus LIVP byl nejvíce virulentní a nejvíce imunogenní ze tří testovaných kmenů.

Genetické příčiny atenuovaného fenotypu viru P13 zatím nebyly zjištěny. Restriční analýza virových linií odvozených z kmene Praha odhalila rozdíly v terminálních částech genomu, které obsahují geny určující virulenci viru, geny hostitelského spektra a geny pro imunomodulátory. Dále bylo zjištěno, že virus P13 exprimuje gen B8R kódující sekretovaný IFN- $\gamma$  receptor.

Abychom stanovili vliv vCCI na biologické vlastnosti vakcinačního viru P13, vytvořili jsme deleční mutanty s inzerční inaktivací genu C23L/B29R a revertanty, v nichž byly tyto geny opět vloženy do obou lokusů v ITR. V našich pokusech jsme použili P13 virus exprimující slabě imunogenní antigen HPV16 E7GGG, protože je vhodnější pro hodnocení menších rozdílů v imunogenosti vektoru než VACV P13-SigE7LAMP, který tvoří více imunogenní podobu E7 antigenu. Tato rekombinanta navozuje úplné odhojení TC-1 nádorů (Nemeckova et al., 2002) a neumožňuje měření vlivu malých rozdílů ve virulenci a imunogenosti SigvCCI. Imunizace P13-E7GGG neinhibuje tvorbu TC-1

nádorů, ale je schopna zpomalovat růst nádorů (Nemeckova et al., 2002).

Srovnání sekvence nukleotidů P13 vCCI ORF s homologickými sekvencemi dalších orthopoxvirů odhalilo nejvyšší homologii 5' konce P13 s kmeny vakcinie Kodaň, WR, Ankara, MVA a Tian Tian, stejně jako s většinou kmenů varioly a opičího poxviru. Gen těchto virů kóduje vCCI protein postrádající N-terminální signální peptid, na rozdíl od vCCI VACV Lister, viru kravských neštovic Brighton a GRI-90 a myšního poxviru, které mají N-terminální signální peptid s vysokou pravděpodobností štěpení mezi prolinem 18 a alaninem 19.

Na Serin bohatá sekvence na N-konci, která je součástí náhodné spirály vCCI molekuly obsahuje v kmenu Praha čtyři aminokyselinové zbytky. Chemokin vazebná aktivita vCCI není změněna, pokud obsahuje u orthopoxvirů čtyři nebo sedm serinů, nebo TKGI sekvenci, která byla nalezena u leporipoxvirů (Smith et al., 1997b). Signální peptid má klíčový význam pro sekreci CCI a proto byl vytvořen rVACV P13 s kompletní signální sekvencí.

Western blotem s použitím polyklonálního séra myši imunizovaných vakcínou pBSC-SigvCCI bylo potvrzeno, že vytvořený virus secernuje protein CCI do média a kroslinkační pokus ukázal, že vSigCCI je schopen vázat chemokin CCL3 označený radioaktivním <sup>125</sup>I.

Biologická aktivita vSigCCI produkovaného virem P13 byla také pozorována *in vivo*. Role imunomodulačních proteinů jako jsou inhibitory CC chemokinů v patogenezi infekce poxvirů může být testována porovnáním reakcí hostitele po aplikaci divokého viru a delečních mutant postrádajících studovaný imunomodulační protein. Pro hodnocení VACV inhibitorů CC chemokinů v myším modelu byla v minulosti většinou použita intradermální nebo intranazální cesta podání (Tscharke et al., 2002). Ačkoli i.n. a i.d. cesty aplikace vhodně napodobují typické přirozené cesty poxvirové infekce, navozují silnou protilátkovou odpověď a současně velmi nízkou aktivitu CTL. Naopak systémové i.p. a i.v. aplikace vedou k indukci silné reakce CTL (Andrew et al., 1989). Oslabený P13-E7GGG byl schopen vyvolat významnou CTL odpověď vůči HPV E7 pouze po i.p. vakcinaci vysokou dávkou 10<sup>6</sup> PFU a z tohoto důvodu jsme zvolili tuto cestu aplikace. Zjistili jsme, že secernovaná forma vCCI oslabovala množení i.p. podaného viru podobně, jak bylo již dříve popsáno pro i.n. aplikovaný virus (Reading et al., 2003b).

Navíc i.p. injekce byla mnohem vhodnější než i.n. podání, pokud jsme chtěli zjistit vliv secernované formy vCCI na protinádorový účinek imunizace.

Je známo, že CC chemokiny hrají důležitou roli během vývoje různých nádorů

(Hembruff & Cheng, 2009). Přestože vliv chemokinů je primárně lokální, jsou často pozorovány zvýšené sérové hladiny, které korelují se závažností onemocnění. Blokáda CC chemokinů po systémovém podání jejich antagonistů může přispět k inhibici růstu nádorů, jako bylo v minulosti testováno v několika preklinických studiích (Salcedo et al., 2000b; Loberg et al., 2007a; Qian et al., 2011; Cambien et al., 2011). Pozitivní účinek antagonistů CC chemokinů na imunoterapii nádorů lze také zjistit prostřednictvím analýzy systémové a intratumorální imunitní odpovědi (Fridlender et al., 2010a). Proto jsme chtěli navodit systémovou produkci vCCI, jenž by mohl působit v mikroprostředí nádoru během tumorogeneze a napomoci indukci protinádorové odpovědi.

Při měření hladiny chemokinů v séru myší 3. den po i.p. infekci rodičovským virem P13-E7GGG jsme detekovali zvýšené hladiny chemokinů CCL2, CXCL9, CCL5 a CCL22. Virus P13-E7GGG je tímto rysem podobný viru MVA, který navozuje expresi chemokinů, CCL2 a CCL3, CCL5, CXCL9, jak po *in vitro* infekci makrofágů (Delaloye et al., 2009), tak po i.n. aplikaci myším (Lehmann et al., 2009). Naopak kmeny NYVAC a WR po *in vitro* infekci makrofágů a kmeny Elstree, Wyeth a WR po i.n. aplikaci myším nevyvolávají produkci CC chemokinů (Lehmann et al., 2009). To pravděpodobně souvisí s vlivem jiných imunomodulačních proteinů, které jsou přítomné ve výše uvedených kmenech. Při testování vlivu vCCI produkovaného i.p. podaným virem P13-SigvCCI-E7GGG na hladiny chemokinů jsme pozorovali, při porovnání s kontrolami, snížení chemokinů CCL5 a CCL11 (tj. druhého a třetího z chemokinů, pro které má vCCI nejvyšší vazebnou specifitu). Také jsme detekovali pokles chemokinů CCL17 a CCL22. Chemokin CCL3, který se váže nejlépe k vCCI a s jehož pomocí jsme dokázali vazebnou schopnost vCCI, nebyl detekován v myším séru testem ELISA, který jsme použili. Hladina CCL2, čtvrtého nejlépe vCCI vázaného chemokinů, nebyla ovlivněna produkcí vCCI. To naznačuje, že vCCI není schopen neutralizovat CCL2, který produkují TC-1 buňky, jak bylo zjištěno analýzou exprese (Smahel, 2005), což může zčásti vysvětlit, proč P13-SigvCCI-E7GGG nevykazoval lepší protinádorové účinky.

Přes rozdíly v úrovních chemokinů navozených rVACV analýza imunitních buněk izolovaných ze slezin myší po i.p. aplikaci rVACV s různými formami vCCI pomocí průtokové cytometrie ukázala, že vCCI produkovaný P13 neovlivnil množství DB, myeloidních supresorových buněk, T regulačních lymfocytů, CD8+ lymfocytů a makrofágů.

Testování revertant obsahujících vSigvCCI ukázalo, že zatímco produkce sekrečního vCCI proteinu nemá vliv na replikaci viru *in vitro*, měření virové DNA v myších ováriích

imunizovaných i.p. VACV ukázala, že revertanta exprimující vSigCCI je více oslabená, protože se po systémovém podání replikuje méně než rodičovský virus bez rekonstruované signální sekvence. Snížení replikace bylo také potvrzeno detekcí nižší hladiny specifických anti-VACV protilátek 32. den po infekci v porovnání s protilátkami navozenými rodičovským virem.

Uvažovali jsme, že tento jev by mohl být způsoben imunitou zaměřenou proti vCCI proteinu, která vede k atenuaci viru. Molekula vCCI může být štěpena v proteazómu krátce po syntéze, prezentována pomocí MHC molekul na povrchu infikovaných buněk a rozeznávána buněčnou imunitou. Tato hypotéza vysvětlující atenuovaný fenotyp viru P13 s produkcí vCCI byla testována analýzou množství virové DNA v ováriích myší infikovaných rVACV, jejichž i.p. aplikaci předcházela DNA imunizace plazmidem pBSC-Sig-vCCI, která ukázala, že imunita proti tomuto proteinu neovlivňuje replikaci viru.

Jak naše, tak i jiné skupiny v minulosti pozorovaly, že oslabené viry navozují nižší titry protilátek (Kutinova et al., 1995). Podobné výsledky byly získány Readingem (Reading et al., 2003b) po i.n. infekci myší WR virem, který produkoval vCCI viru Lister. Nižší titry WR-vCCI byly doprovázeny méně závažnou infiltrací plic makrofágy a lymfocyty, které korelovaly s nižší hladinou chemokinů CCL2, CCL3 a CCL11 u detekovaného v BAL tekutině i.n. infikovaných myší. Také my jsme pozorovali pokles hladiny CCL5.

CCL5 je produkovaný v raných fázích infekce, hlavně antigen prezentujícími buňkami (DB, makrofágy, NKT buňkami a  $\gamma\delta$ T buňkami), které mají receptory pro zánětlivé cytokiny, takže výrazně reagují na zánětlivé podmínky (Appay & Rowland-Jones, 2001). CCL5 atrahuje do míst zánětu a infekce buňky, které exprimují receptory CCR1, CCR3 a CCR5. Jsou to především buňky přirozené imunity, jako jsou monocyty, bazofily, eozinofily, nezralé DB, NK buňky a T buňky. Bylo prokázáno (Rahbar et al., 2006), že aktivace CCR5 navozená infekcí VACV vede k indukci permisivního fenotypu pro VACV replikaci v primárních T buňkách. Vzhledem k tomu, že permisivní infekce T buněk a jiných CCR5 pozitivních buněk může představovat mechanismus šíření VACV lymfatickým systémem, sekvestrace CCL5 prostřednictvím vCCI, která by mohla mít za následek snížení CCR5 aktivace, by se mohla manifestovat jako snížení virulence VACV. Nedávno bylo prokázáno že CCR5 - / - myši jsou méně vnímavé k systémové infekci VACV než WT myši (Rahbar et al., 2009)

Analýza imunizačních experimentů a specifické imunity proti E7 proteinu a VACV



E3 proteinu metodou ELISPOT neprokázala žádný signifikantní rozdíl v imunogenitě mezi rodičovským virem, deleční mutantou a revertantami, navzdory nižší virulenci P13-SigCCI-E7GGG. Nižší aktivita CC chemokinů je pravděpodobně kompenzována produkcí velkého množství vnějších antigenů a přímým primingem T buněk v sekundárních lymfatických orgánech během infekce replikujícím se rekombinantním virem vakcinie (Hickman, 2008).

Navíc DB skladují antigeny dlouhodobě, zatímco sekvestrace chemokinů během infekce VACV se časově shoduje s produkcí vCCI až do 7 dnů, kdy je virus odstraněn, s největší účinností pozorovanou 4.den, kdy se virus množí nejvíce. Dopad snížených hladin CC chemokinů na reakce T buněk není tak významný, pravděpodobně v důsledku nízké produkci vCCI od 5. den po infekci. Po imunizaci P13-E7GGG-SigCCI a rodičovským virem P13-E7GGG byla detekována srovnatelná množství E7 specifických IFN- $\gamma$  + CD8 + buněk.

Ovšem terapie TC-1 nádorů byla po imunizaci P13-E7GGG-SigCCI horší. Můžeme spekulovat, že ovlivnění rané fáze přirozené imunity menším množstvím CC chemokinů mohlo vést k slabší přímé funkční aktivaci NK buněk (Taub et al., 1996). Zánětlivé chemokiny, ke kterým CCL5 patří, mají vliv na diferenciaci T buněk ovlivněním množství a typu antigen prezentujících buněk (APC) atrahovaných do místa zánětu prostřednictvím přímého vlivu na polarizaci APC, prostřednictvím přímé interference s polarizací T buněk nebo selektivním atrahováním specifických T buněk do místa zánětu a jejich následným pomnožením.

Snížení hladiny CCL5 blokováním vCCI proteinem může ovlivnit aktivaci jak přirozené, tak specifické imunity. Protože tento proces v případě produkce vCCI a rVACV probíhá maximálně 7 dní, než je virus eliminován, s maximem 4. den, kdy se virus nejvíce replikuje, je tedy nejvíce ovlivněnou fází atrahování různých antigen prezentujících buněk do místa zánětu. Vliv snížené hladiny CCL5 na putování aktivovaných T buněk z lymfatických uzlin do periferie bude pravděpodobně méně významným díky nízké produkci vCCI od 5. dne po infekci.

Lze spekulovat, že prostřednictvím aktivace odlišných APC v rámci časné fáze přirozené imunity došlo k indukci kvalitativně odlišných IFN- $\gamma$  CD8+ T buněk. Dále by se mělo vzít do úvahy, že hladina specifické buněčné imunity indukované rVACV je v tomto případě tak nízká, že neumožňuje zaznamenání významných rozdílů mezi viry P13 a P13-vCCI. Horší protinádorový efekt viru P13-vCCI může být způsoben indukcí nižšího množství CCL5 atenuovaným virem v časných fázích infekce. V tomto případě je navíc

CCL5 blokován produkovaným proteinem vCCI. Toto může vést k slabší přímé funkční aktivaci NK buněk a dalších buněk přirozené imunity.

Abychom prozkoumali vliv vCCI na indukci specifické imunity proti E7 proteinu a navození protinádorového efektu při absenci virové infekce, zkonstruovali jsme DNA vakcínu kódující sekreční forma vCCI proteinu. V tomto případě způsobila produkce vSigCCI, při porovnání s kontrolním plazmidem, indukci slabší specifické imunity. Velikost tohoto efektu byla závislá na množství DNA vakcíny. Význam chemokinů pro imunogennost DNA vakcíny byl v minulosti prokázán u MIP-1 $\alpha$ . Společné podání plazmidu kódujícího CCL3 mělo adjuvantní vliv při imunizaci DNA vakcínou exprimující obalový protein gp120 viru HIV-1 (Sumida et al., 2004). Předpokládáme, že přítomnost vCCI v místě intradermálně podané DNA vakcíny proti E7 může významně ovlivnit hladiny chemokinů, s největším vlivem na chemokiny jako je MIP-1 $\alpha$ , které jsou vázány na místa s nejvyšší afinitou (vCCI) a jsou k dispozici v nízkých koncentracích. To může vést k potlačení reakce T-buněk.

Nicméně protinádorový efekt nebyl koexpresí vCCI proteinu snížen, jak bylo pozorováno po imunizaci virem P13-vCCI. Naopak se mírně zlepšil. Produkce vCCI proteinu DNA vakcínou ovlivnila imunizační vlastnosti vektoru jiným způsobem než v případě VACV.

Pro vysvětlení těchto výsledků mohou být použity zjištění studie zkoumající vliv chemokinů CCL5 a CXCL9 na průběh infekce Theilerovým virem (Ure et al., 2005). Po aplikaci dvou dávek antiséra anti-CCL5 bylo pozorováno snížení hladiny RNA pro IL-2. Současně byla detekovaná zvýšená hladina mRNA pro IL-10. Tento efekt nebyl navozen jednou dávkou antiséra. Autoři studie předpokládali, že hladiny IL-2 a IL-10 reflektují poměr Th1 a Th2 lymfocytů. Pokles IL-2 by odpovídal hypotéze, že Th1 lymfocyty produkující IL-2 jsou klíčové pro imunitní kontrolu viru, jehož titr po poklesu IL-2 stoupl.

Blokáda CCL5 proteinem vCCI produkovaným po DNA vakcinaci pravděpodobně vedla k převaze Th2 odpovědi nad Th1. Rozdíly v navozené specifické imunitě a protinádorovém efektu po imunizaci VACV a DNA vakcínou s produkcí vCCI proteinu můžeme vysvětlit různými mechanismy aktivace specifické imunity, které jsou navíc různě ovlivněny odlišnou produkcí vCCI proteinu.

Po podání jedné dávky rVACV nebyla pozorována převaha Th2 odpovědi, stejně jako v experimentu s Theilerovým virem po podání jedné dávky antiséra CCL5. Negativní vliv produkce vCCI proteinu na nádorovou terapii byl způsoben atenuací viru nižší hladinou CCL5. V případě DNA vakcíny byla situace odlišná. Protože byl tento vektor

aplikován společně s DNA kódující vCCI ve dvou dávkách, lze předpokládat, že došlo k produkci většího množství vCCI proteinu. To mohlo vést k dominanci Th2 odpovědi nad Th1, která je indukována po imunizaci DNA vakcínou kódující SigE7 Lamp. Tak může být vysvětleno nižší množství detekovaných IFN- $\gamma$  CD8+ T buněk. Dále lze předpokládat, že vyšší a dlouhodobější produkce vCCI proteinu po opakované aplikaci DNA vakcíny mohla vést, na rozdíl od vCCI produkovaného VACV, k blokádě CCL5 indukované migrace aktivovaných T buněk do periferie.

Během analýzy hladiny chemokinů v myším séru, po i.p. aplikaci P13-Sig-vCCI, byly detekovány nižší hladiny chemokinů CCL17/TARC a CCL22/MDC. V literatuře je popsána významná exprese těchto chemokinů kožními dendritickými buňkami během zánětu. Blokáda těchto chemokinů může ovlivnit aktivaci specifické imunity po i.d. podání DNA biolistickou metodou. CCL17 a CCL22 ovlivňují buňky exprimující CCR4, které mají převážně fenotyp Th2. Produkce těchto chemokinů dendritickými buňkami může vést k posílení Th2 odpovědi. Jejich blokáda by tedy mohla na rozdíl od blokády CCL5 naopak posílit Th1 odpověď. Podle našeho názoru lze mírné zlepšení terapie TC-1 nádorů doprovázené horší specifickou imunitou vysvětlit inhibicí výše jmenovaných chemokinů vlivem vCCI v mikroprostředí nádoru.

V souhrnu výsledky našeho zkoumání ukazují, že klon P13 atenuovaného rVACV kmene PRAHA netvoří, díky zkrácení signální peptidové sekvence, funkční sekreční formu vCCI. Tato zjištěná vlastnost viru koreluje se zvýšenou hladinou CC chemokinů CCL5, CCL2, CXCL9, CCL11, CCL17 a CCL22 v krvi myši infikovaných VACV P13. Obnovení funkční formy genu vCCI snížilo množení viru *in vivo*, nicméně neovlivnilo jeho schopnost vyvolat imunitní odpověď T buněk. Při porovnání s rodičovským virem se v terapeutickém uspořádání snížila jeho protinádorová účinnost. Koexprese vCCI snížila imunizační schopnosti DNA vakcín. Naše výsledky by mohly být užitečné při výběru rodičovských virů používaných pro konstrukci imunizačních vektorů.

Výše uvedené výsledky poskytují zajímavý pohled na různé schopnosti vCCI přispět k navození specifické protinádorové imunity, pokud je použit v rámci různých vakcinačních vektorů.

V případě zakomponování do silně imunogenního vektoru jako je VACV může, díky navození imunity, dojít k omezení replikace viru a v jeho důsledku ke snížení exprese jak specifického antigenu, tak proteinu vCCI. Při intraperitoneálním podání VACV s expresí Flt-3 ligandu (Zurkova et al., 2010) kopírovala hladina tohoto proteinu průběžně množení viru v myši. Flt-3 dosáhl svého maxima 4. den po infekci a již 7. den nebyly jeho

hladiny v séru detekovatelné. Z toho lze usuzovat, že po eliminaci viru dojde současně k rychlému poklesu exprimovaného transgenu.

V rámci testování hladiny vCCI v séru myši, kterým byl podán lentivirus kódující tento protein, byl vCCI detekován měsíce po aplikaci. To bylo ale doprovázeno trvalou detekcí lentivirové DNA v jaterní tkáni, která byla lentivirem dlouhodobě infikována (Bursill et al., 2009). Proto lze předpokládat, že po intraperitoneálním podání viru vakcinie dochází nejspíše k příliš krátké produkci vCCI proteinu virem vakcinie a není tedy pravděpodobné, že by v tomto případě příznivě ovlivňoval imunosupresivní prostředí nádoru.

Zcela jiná situace nastává při podání vCCI ve formě DNA vakcíny, která je pro navození specifické imunity v tomto případě mnohem příznivější. Po aplikaci DNA vakcíny gene gunem může exprese daného proteinu přetrvávat i měsíce (Guan et al., 2010). Může tedy dojít k vysoké a dlouhodobé expresi vCCI, který svou schopností vázat CC chemokiny může pravděpodobně příznivě ovlivnit imunosupresivní prostředí nádoru. Podobný efekt byl popsán při terapii TC-1 nádorů vakcinia virem, která byla doprovázená opakovaným podáním protilátek proti proteinu vCCI (Fridlender et al., 2010a).

## **5.2 Imunoterapie TC-1/A9 nádorů s nižší expresí molekul MHCII kombinující DNA imunizaci s intratumorálním podáním VACV exprimujících GM-CSF**

Cílem tohoto projektu bylo posoudit vliv VACV kmenů P13 a MVA exprimujících GM-CSF na protinádorový efekt navozený DNA vakcinací.

Bylo opakovaně zjištěno, že GM-CSF se chová jako imunitní adjuvans vakcín díky své schopnosti stimulovat antigen prezentující buňky, což má za následek zvýšenou aktivaci CD4+, CD8+ T buněk a CD1d+ NK1.1 buněk a zvýšenou produkci protilátek. Navíc očkování s nádorovými buňkami upravenými *ex vivo* tak, aby tvořily GM-CSF vyvolalo silnou a dlouhotrvající protinádorovou imunitu (Dranoff, 2002).

V myším nádorovém modelu bylo prokázáno, že adjuvantní a protinádorová aktivita GM-CSF závisí na dávce a způsobu podání (Serafini et al., 2004c). Vzhledem ke skutečnosti, že koncentrace rekombinantních cytokinů podaných injekčně velmi rychle klesá (Kudo-Saito et al., 2005) a také aby byla minimalizována imunosupresivní aktivita vyvolaná vysokou koncentrací GM-CSF v místě vpichu, jsme podali GM-CSF prostřednictvím živých rekombinantních virů vakcinie. Použili jsme poxvirový vektor, protože účinně infikuje širokou škálu savčích buněk *in vivo*, velikost exprese transgenu lze

upravit typem použitého promotoru a jeho použití nepředstavuje žádné riziko inzerční mutageneze.

Při imunoterapii myších nádorů asociovaných s HPV TC-1/A9 s nižší expresí MHCI podáním DNA vakcíny pBSC/E7GGG.GUS metodou „gene gun“ společně s rVACV exprimující GM-CSF jsme zjistili, že aplikace nereplikujícího se MVA-GM-CSF, který produkoval nižší hladiny GM-CSF přinášelo lepší výsledky, než použití replikujícího se P13-GM-CSF, který navozoval vysokou expresi transgenu.

Při porovnávání tří různých cest podání viru byl nejvyšší účinek pozorován při opakovaném podání MVA-GM-CSF viru prostřednictvím i.t. injekcí. Ve studiích, v nichž byla protinádorová účinnost GM-CSF také nejvyšší v případě podání do mikroprostředí nádorů, byla pozorována změna aktivačního stavu antigen prezentujících buněk v regionálních lymfatických uzlinách (Kass et al., 2001; Vuylsteke et al., 2004). Patrně také v našem pokusu měl GM-CSF tvořený po i.t. injekci MVA-GM-CSF pouze lokální účinek, protože jeho vlivem nedošlo k zvýšení množství E7 specifických T buněk navozených DNA vakcínou, která byla podána gen gunem do oblasti břicha. Vzhledem k této skutečnosti předpokládáme, pozitivní vliv i.t. inokulace nereplikujícího se MVA-GM-CSF na protinádorový účinek DNA vakcinace mohl být způsoben jeho vlivem na místní nádorové mikroprostředí.

Práce provedené v minulosti ukázaly, že intratumorální aplikace genu pro GM-CSF vedla k zvýšení počty DB, tumor infiltrujících leukocytů a hladin IFN- $\gamma$ , IL-12 a některých chemokinů v nádoru (Pan et al., 2004).

Ovlivění nádorového mikroprostředí léčbou bylo zkoumáno histologickým vyšetřením nádorů. Analýzou buněk infiltrujících nádor byla zjištěno pouze větší množství CD3<sup>+</sup> T buněk v případě myši, kterým byl společně s i.d.podanou DNA vakcínou vstřelenou gene gunem opakovaně intratumorálně injikován virus MVA-GM-CSF. Vyšetření buněk infiltrujících nádor průtokovou cytometrií po obarvení monoklonálními protilátkami proti povrchovým markerům makrofágů, dendritických buněk a neutrofilů, nebyly zjištěny rozdíly mezi jednotlivými skupinami myši. Současně nebylo zaznamenáno zvýšené množství myeloidních leukocytů, z čehož je možné usuzovat, že množství GM-CSF produkované virem MVA-GM-CSF nevedlo k proliferaci imunosupresivních Gr1<sup>+</sup>/C11b<sup>+</sup> (Serafini et al., 2004c). I při analýze buněk infiltrujících nádor průtokovou cytometrií bylo pozorováno vyšší procento CD3<sup>+</sup> T buněk.

Dále bylo průtokovou cytometrií na povrchu nádorových buněk izolovaných z nádorů a podrobených DNA vakcinaci zjištěno zvýšení exprese MHCI. Na tento fakt

však neměla vliv produkce GM-CSF současně podaným rVACV do nádoru. Zvýšená exprese MHCI je pravděpodobně způsobená IFN- $\gamma$  produkovaným E7 specifickými T buňkami a IFN- $\alpha/\beta$  plasmacytoidními dendritickými buňkami po jejich stimulaci CpG motivy DNA bakteriálního plazmidu.

Můžeme také spekulovat, že v tomto případě došlo k aktivaci takzvané antigenní kaskády, kdy je prostřednictvím cross-prezentace indukována odpověď specifických CD8+ T buněk vůči dalším antigenům exprimovaným nádorem, které nebyly součástí vakcíny a tato odpověď může být mnohem silnější, než odpověď indukovaná vakcínou (Kudo-Saito et al., 2005).

Nádory s nižší expresí MHCI nemohou být účinně eliminovány vakcinačními postupy, založenými na navození specifické T buněčné odpovědi, které je závislé na prezentaci antigenu pomocí MHCI. Nicméně vliv DNA vakcíny na terapii MHCI negativních nádorů může být zesílen imunizací nádorovými buňkami exprimujícími GM-CSF, jak již bylo dříve zjištěno s použitím nádorového modelu HPV16 E6 E7 + MK16 (Rittich et al., 2005b). V rámci kombinované imunoterapie popsané v této práci je virový vektor použit pro in situ expresi cytokinu, což nahrazuje časově náročnou přípravu buněčných linií exprimujících cytokiny z nádorových buněk pacienta.

Podobně jako v jiné studii (Nair et al., 2006) došlo i v našem experimentu pouze k přechodné inhibici růstu nádorů. Lze usuzovat, že jako u intratumorální injekce IL-12 a GM-CSF patrně dochází k lokálnímu zvýšení IFN- $\gamma$  a poklesu imunosupresivních cytokinů TGF- $\beta$  a IL-10. Tento účinek je pouze přechodný a následuje zvýšení množství T supresorových buněk v nádoru doprovázené opětovným zvýšením TGF- $\beta$  a IL-10 (Nair et al., 2006). Nezaznamenali jsme poškození vnitřních orgánů, které bylo pozorováno při testování nádorových buněk produkujících značné množství GM-CSF (Petrankova et al., 2012).

Výsledky této studie ukazují, že nereplikující se virus vakcinie MVA-GM-CSF je vhodným nástrojem pro místní dodání GM-CSF, což neinterferuje s imunizací DNA vakcínou proti antigenu E7 a přispívá k protinádorovým účinkům imunizace proti nádorům se sníženou expresí MHC molekul I. třídy.

## 6. Závěr

V rámci obou projektů této práce byl testován vliv imunologických adjuvans na navození protinádorového účinku prostřednictvím rVACV. V případě manipulace s genem vCCI mohl být vzhledem k jeho funkci chemokin vazebného imunomodulačního proteinu

předpokládán vliv jak na úrovni viru, tak na úrovni mikroprostředí nádoru, jehož imunopresivní vlastnosti mohl, díky své schopnosti vázat chemokiny CCL2 a CCL5, pozitivně ovlivnit.

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

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

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

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

Aplikace DNA vakcíny exprimující sekreční formu genu vCCI vSigCCI vedla k indukci slabší specifické imunity měřené metodou ELISPOT IFN- $\gamma$  při společné imunizaci s plazmidem, který expimoval gen SigE7LAMP. Velikost tohoto efektu byla závislá na množství DNA vakcíny. Při tomto způsobu imunizace ovšem došlo k mírnému zesílení protinádorového účinku proti TC-1 nádorům, a to jak při preventivním, tak při terapeutickém uspořádání experimentu. Vzhledem k teoretické představě o působení vCCI na součásti imunity (vazba chemokinů CCL2 a CCL5) během navození protinádorové imunitní reakce, lze předpokládat vliv na imunopresivní prostředí nádoru.

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

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

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

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

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



## 7. Seznam literary

1. Abaitua, F., Rodriguez, J. R., Garzon, A., Rodriguez, D., Esteban, M., 2006. Improving recombinant MVA immune responses: potentiation of the immune responses to HIV-1 with MVA and DNA vectors expressing Env and the cytokines IL-12 and IFN-gamma. *Virus Res.* 116, 11-20.
2. Adam, R. A., Horowitz, I. R., Tekmal, R. R., 1999. Serum levels of macrophage colony-stimulating factor-1 in cervical human papillomavirus infection and intraepithelial neoplasia. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 180, 28-32.
3. Adler, E. P., Lemken, C. A., Katchen, N. S., Kurt, R. A., 2003. A dual role for tumor-derived chemokine RANTES (CCL5). *Immunol.Lett.* 90, 187-194.
4. Ahlers, J. D., Belyakov, I. M., Berzofsky, J. A., 2003. Cytokine, chemokine, and costimulatory molecule modulation to enhance efficacy of HIV vaccines. *Curr.Mol.Med.* 3, 285-301.
5. Ahlers, J. D., Belyakov, I. M., Terabe, M., Koka, R., Donaldson, D. D., Thomas, E. K., Berzofsky, J. A., 2002. A push-pull approach to maximize vaccine efficacy: abrogating suppression with an IL-13 inhibitor while augmenting help with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and CD40L. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99, 13020-13025.
6. Ahlers, J. D., Dunlop, N., Alling, D. W., Nara, P. L., Berzofsky, J. A., 1997. Cytokine-in-adjuvant steering of the immune response phenotype to HIV-1 vaccine constructs: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and TNF-alpha synergize with IL-12 to enhance induction of cytotoxic T lymphocytes. *J.Immunol.* 158, 3947-3958.
7. Al-Aoukaty, A., Giaid, A., Sinoff, C., Ho, A. D., Maghazachi, A. A., 1994. Priming effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor are coupled to cholera toxin-sensitive guanine nucleotide binding protein in human T lymphocytes. *Blood* 83, 1299-1309.
8. al-Saleh, W., Delvenne, P., Arrese, J. E., Nikkels, A. F., Pierard, G. E., Boniver, J., 1995. Inverse modulation of intraepithelial Langerhans' cells and stromal macrophage/dendrocyte populations in human papillomavirus-associated squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Virchows Arch.* 427, 41-48.
9. Alcamí, A., 2007. New insights into the subversion of the chemokine system by poxviruses. *Eur.J.Immunol.* 37, 880-883.
10. Alcamí, A., Smith, G. L., 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.
11. Alcamí, A., Symons, J. A., Collins, P. D., Williams, T. J., Smith, G. L., 1998a. Blockade of chemokine activity by a soluble chemokine binding protein from vaccinia virus. *J.Immunol.* 160, 624-633.

12. Alcami, A., Symons, J. A., Collins, P. D., Williams, T. J., Smith, G. L., 1998b. Blockade of chemokine activity by a soluble chemokine binding protein from vaccinia virus. *J.Immunol.* 160, 624-633.
13. Aldrich, J. F., Lowe, D. B., Shearer, M. H., Winn, R. E., Jumper, C. A., Kennedy, R. C., 2010. Vaccines and immunotherapeutics for the treatment of malignant disease. *Clin.Dev.Immunol.* 2010, 697158.
14. Algar, E. M., Khromykh, T., Smith, S. I., Blackburn, D. M., Bryson, G. J., Smith, P. J., 1996. A WT1 antisense oligonucleotide inhibits proliferation and induces apoptosis in myeloid leukaemia cell lines. *Oncogene* 12, 1005-1014.
15. Ali, Z. A., Bursill, C. A., Hu, Y., Choudhury, R. P., Xu, Q., Greaves, D. R., Channon, K. M., 2005. Gene transfer of a broad spectrum CC-chemokine inhibitor reduces vein graft atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation* 112, I235-I241.
16. Allavena, P., Germano, G., Marchesi, F., Mantovani, A., 2011. Chemokines in cancer related inflammation. *Exp.Cell Res.* 317, 664-673.
17. Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., Mantovani, A., 2008. The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunol.Rev.* 222, 155-161.
18. Andrew, M. E., Coupar, B. E., Boyle, D. B., 1989. Humoral and cell-mediated immune responses to recombinant vaccinia viruses in mice. *Immunol.Cell Biol.* 67 ( Pt 5), 331-337.
19. Antoine, G., Scheiflinger, F., Dorner, F., Falkner, F. G., 1998. The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses. *Virology* 244, 365-396.
20. Antony, P. A., Piccirillo, C. A., Akpınarlı, A., Finkelstein, S. E., Speiss, P. J., Surman, D. R., Palmer, D. C., Chan, C. C., Klebanoff, C. A., Overwijk, W. W., Rosenberg, S. A., Restifo, N. P., 2005. CD8<sup>+</sup> T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4<sup>+</sup> T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells. *J.Immunol.* 174, 2591-2601.
21. Appay, V., Douek, D. C., Price, D. A., 2008. CD8<sup>+</sup> T cell efficacy in vaccination and disease. *Nat.Med.* 14, 623-628.
22. Appay, V., Rowland-Jones, S. L., 2001. RANTES: a versatile and controversial chemokine. *Trends Immunol.* 22, 83-87.
23. Arakawa, Y., Cordeiro, J. V., Schleich, S., Newsome, T. P., Way, M., 2007a. The release of vaccinia virus from infected cells requires RhoA-mDia modulation of cortical actin. *Cell Host.Microbe* 1, 227-240.
24. Arakawa, Y., Cordeiro, J. V., Way, M., 2007b. F11L-mediated inhibition of RhoA-mDia signaling stimulates microtubule dynamics during vaccinia virus infection. *Cell Host.Microbe* 1, 213-226.

25. Arenberg, D. A., Keane, M. P., DiGiovine, B., Kunkel, S. L., Strom, S. R., Burdick, M. D., Iannettoni, M. D., Strieter, R. M., 2000. Macrophage infiltration in human non-small-cell lung cancer: the role of CC chemokines. *Cancer Immunol.Immunother.* 49, 63-70.
26. Armitage, J. O., 1998. Emerging applications of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 92, 4491-4508.
27. Arness, M. K., Eckart, R. E., Love, S. S., Atwood, J. E., Wells, T. S., Engler, R. J., Collins, L. C., Ludwig, S. L., Riddle, J. R., Grabenstein, J. D., Tornberg, D. N., 2004. Myopericarditis following smallpox vaccination. *Am.J.Epidemiol.* 160, 642-651.
28. Artenstein, A. W., Grabenstein, J. D., 2008. Smallpox vaccines for biodefense: need and feasibility. *Expert.Rev.Vaccines.* 7, 1225-1237.
29. Ashour, A. E., Turnquist, H. R., Singh, R. K., Talmadge, J. E., Solheim, J. C., 2007. CCL21-induced immune cell infiltration. *Int.Immunopharmacol.* 7, 272-276.
30. Assarsson, E., Greenbaum, J. A., Sundstrom, M., Schaffer, L., Hammond, J. A., Paschetto, V., Oseroff, C., Hendrickson, R. C., Lefkowitz, E. J., Tscharke, D. C., Sidney, J., Grey, H. M., Head, S. R., Peters, B., Sette, A., 2008. Kinetic analysis of a complete poxvirus transcriptome reveals an immediate-early class of genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 105, 2140-2145.
31. Bahar, M. W., Kenyon, J. C., Putz, M. M., Abrescia, N. G., Pease, J. E., Wise, E. L., Stuart, D. I., Smith, G. L., Grimes, J. M., 2008. Structure and function of A41, a vaccinia virus chemokine binding protein. *PLoS.Pathog.* 4, e5.
32. Baleeiro, R. B., Anselmo, L. B., Soares, F. A., Pinto, C. A., Ramos, O., Gross, J. L., Haddad, F., Younes, R. N., Tomiyoshi, M. Y., Bergami-Santos, P. C., Barbuto, J. A., 2008. High frequency of immature dendritic cells and altered in situ production of interleukin-4 and tumor necrosis factor-alpha in lung cancer. *Cancer Immunol.Immunother.* 57, 1335-1345.
33. Balentien, E., Mufson, B. E., Shattuck, R. L., Derynck, R., Richmond, A., 1991. Effects of MGSA/GRO alpha on melanocyte transformation. *Oncogene* 6, 1115-1124.
34. Balkwill, F., 2004. Cancer and the chemokine network. *Nat.Rev.Cancer* 4, 540-550.
35. Balkwill, F., Mantovani, A., 2001. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357, 539-545.
36. Banchereau, J., Steinman, R. M., 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.
37. Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M. S., Brem, H., Tomic-Canic, M., 2008. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound.Repair Regen.* 16, 585-601.

38. Barry, M., McFadden, G., 1997. Virus encoded cytokines and cytokine receptors. *Parasitology* 115 Suppl, S89-100.
39. Beck, C. G., Studer, C., Zuber, J. F., Demange, B. J., Manning, U., Urfer, R., 2001. The viral CC chemokine-binding protein vCCI inhibits monocyte chemoattractant protein-1 activity by masking its CCR2B-binding site. *J.Biol.Chem.* 276, 43270-43276.
40. Ben-Baruch, A., 2003. Host microenvironment in breast cancer development: inflammatory cells, cytokines and chemokines in breast cancer progression: reciprocal tumor-microenvironment interactions. *Breast Cancer Res.* 5, 31-36.
41. Benencia, F., Sprague, L., McGinty, J., Pate, M., Muccioli, M., 2012. Dendritic cells the tumor microenvironment and the challenges for an effective antitumor vaccination. *J.Biomed.Biotechnol.* 2012, 425476.
42. Bennink, J. R., Yewdell, J. W., Smith, G. L., Moller, C., Moss, B., 1984. Recombinant vaccinia virus primes and stimulates influenza haemagglutinin-specific cytotoxic T cells. *Nature* 311, 578-579.
43. Berinstein, N. L., 2009. Strategies to enhance the therapeutic activity of cancer vaccines: using melanoma as a model. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1174, 107-117.
44. Bernardis, R., Destree, A., McKenzie, S., Gordon, E., Weinberg, R. A., Panicali, D., 1987. Effective tumor immunotherapy directed against an oncogene-encoded product using a vaccinia virus vector. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 84, 6854-6858.
45. Berraondo, P., Nouze, C., Preville, X., Ladant, D., Leclerc, C., 2007. Eradication of large tumors in mice by a tritherapy targeting the innate, adaptive, and regulatory components of the immune system. *Cancer Res.* 67, 8847-8855.
46. Berzofsky, J. A., Terabe, M., Oh, S., Belyakov, I. M., Ahlers, J. D., Janik, J. E., Morris, J. C., 2004. Progress on new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cancer. *J.Clin.Invest* 113, 1515-1525.
47. Berzofsky, J. A., Terabe, M., Wood, L. V., 2012. Strategies to use immune modulators in therapeutic vaccines against cancer. *Semin.Oncol.* 39, 348-357.
48. Bilusic, M., Madan, R. A., 2012. Therapeutic cancer vaccines: the latest advancement in targeted therapy. *Am.J.Ther.* 19, e172-e181.
49. Bisht, H., Weisberg, A. S., Szajner, P., Moss, B., 2009a. Assembly and disassembly of the capsid-like external scaffold of immature virions during vaccinia virus morphogenesis. *J.Virol.* 83, 9140-9150.
50. Bisht, H., Weisberg, A. S., Szajner, P., Moss, B., 2009b. Assembly and disassembly of the capsid-like external scaffold of immature virions during vaccinia virus morphogenesis. *J.Virol.* 83, 9140-9150.
51. Bissell, M. J., Radisky, D. C., Rizki, A., Weaver, V. M., Petersen, O. W., 2002. The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast. *Differentiation* 70, 537-546.

52. Biswas, S. K., Sica, A., Lewis, C. E., 2008. Plasticity of macrophage function during tumor progression: regulation by distinct molecular mechanisms. *J.Immunol.* 180, 2011-2017.
53. Blanchet, X., Langer, M., Weber, C., Koenen, R. R., von, H. P., 2012. Touch of chemokines. *Front Immunol.* 3, 175.
54. Bloom, D. C., Edwards, K. M., Hager, C., Moyer, R. W., 1991. Identification and characterization of two nonessential regions of the rabbitpox virus genome involved in virulence. *J.Virol.* 65, 1530-1542.
55. Bontkes, H. J., de Gruijl, T. D., Walboomers, J. M., van den Muysenberg, A. J., Gunther, A. W., Scheper, R. J., Meijer, C. J., Kummer, J. A., 1997. Assessment of cytotoxic T-lymphocyte phenotype using the specific markers granzyme B and TIA-1 in cervical neoplastic lesions. *Br.J.Cancer* 76, 1353-1360.
56. Bottazzi, B., Polentarutti, N., Balsari, A., Boraschi, D., Ghezzi, P., Salmona, M., Mantovani, A., 1983. Chemotactic activity for mononuclear phagocytes of culture supernatants from murine and human tumor cells: evidence for a role in the regulation of the macrophage content of neoplastic tissues. *Int.J.Cancer* 31, 55-63.
57. Boudreau, J. E., Bonehill, A., Thielemans, K., Wan, Y., 2011. Engineering dendritic cells to enhance cancer immunotherapy. *Mol.Ther.* 19, 841-853.
58. Boulter, E. A., Appleyard, G., 1973. Differences between extracellular and intracellular forms of poxvirus and their implications. *Prog.Med.Virol.* 16, 86-108.
59. Bowie, A., Kiss-Toth, E., Symons, J. A., Smith, G. L., Dower, S. K., O'Neill, L. A., 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.
- 60.
61. Boyle, D. B., Coupar, B. E., 1988. A dominant selectable marker for the construction of recombinant poxviruses. *Gene* 65, 123-128.
62. Boyle, K. A., Arps, L., Traktman, P., 2007. Biochemical and genetic analysis of the vaccinia virus d5 protein: Multimerization-dependent ATPase activity is required to support viral DNA replication. *J.Virol.* 81, 844-859.
63. Branca, M., Giorgi, C., Santini, D., Di, B. L., Ciotti, M., Benedetto, A., Paba, P., Costa, S., Bonifacio, D., Di, B. P., Accardi, L., Favalli, C., Syrjanen, K., 2006. Aberrant expression of VEGF-C is related to grade of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and high risk HPV, but does not predict virus clearance after treatment of CIN or prognosis of cervical cancer. *J.Clin.Pathol.* 59, 40-47.
64. Brockman, W. W., Nathans, D., 1974. The isolation of simian virus 40 variants with specifically altered genomes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 71, 942-946.
65. Bromley, S. K., Mempel, T. R., Luster, A. D., 2008. Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic. *Nat.Immunol.* 9, 970-980.

66. Broyles, S. S., 2003. Vaccinia virus transcription. *J.Gen.Virol.* 84, 2293-2303.
67. Broyles, S. S., Fesler, B. S., 1990. Vaccinia virus gene encoding a component of the viral early transcription factor. *J.Virol.* 64, 1523-1529.
68. Broyles, S. S., Moss, B., 1988. DNA-dependent ATPase activity associated with vaccinia virus early transcription factor. *J.Biol.Chem.* 263, 10761-10765.
69. Buller, R. M., 1985. The BALB/c mouse as a model to study orthopoxviruses. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 122, 148-153.
70. Buller, R. M., Chakrabarti, S., Cooper, J. A., Twardzik, D. R., Moss, B., 1988. Deletion of the vaccinia virus growth factor gene reduces virus virulence. *J.Virol.* 62, 866-874.
71. Buller, R. M., Smith, G. L., Cremer, K., Notkins, A. L., Moss, B., 1985. Decreased virulence of recombinant vaccinia virus expression vectors is associated with a thymidine kinase-negative phenotype. *Nature* 317, 813-815.
72. Burns, J. M., Dairaghi, D. J., Deitz, M., Tsang, M., Schall, T. J., 2002. Comprehensive mapping of poxvirus vCCI chemokine-binding protein. Expanded range of ligand interactions and unusual dissociation kinetics. *J.Biol.Chem.* 277, 2785-2789.
73. Bursill, C. A., McNeill, E., Wang, L., Hibbitt, O. C., Wade-Martins, R., Paterson, D. J., Greaves, D. R., Channon, K. M., 2009. Lentiviral gene transfer to reduce atherosclerosis progression by long-term CC-chemokine inhibition. *Gene Ther.* 16, 93-102.
74. Bussolino, F., Colotta, F., Bocchietto, E., Guglielmetti, A., Mantovani, A., 1993. Recent developments in the cell biology of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor: activities on endothelial cells. *Int.J.Clin.Lab Res.* 23, 8-12.
75. Call, K. M., Glaser, T., Ito, C. Y., Buckler, A. J., Pelletier, J., Haber, D. A., Rose, E. A., Kral, A., Yeger, H., Lewis, W. H., .., 1990. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell* 60, 509-520.
76. Cambien, B., Richard-Fiardo, P., Karimjee, B. F., Martini, V., Ferrua, B., Pitard, B., Schmid-Antomarchi, H., Schmid-Alliana, A., 2011. CCL5 neutralization restricts cancer growth and potentiates the targeting of PDGFRbeta in colorectal carcinoma. *PLoS.One.* 6, e28842.
77. Cao, J. X., Gershon, P. D., Black, D. N., 1995. Sequence analysis of HindIII Q2 fragment of capripoxvirus reveals a putative gene encoding a G-protein-coupled chemokine receptor homologue. *Virology* 209, 207-212.
78. Carfi, A., Smith, C. A., Smolak, P. J., McGrew, J., Wiley, D. C., 1999. Structure of a soluble secreted chemokine inhibitor vCCI (p35) from cowpox virus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96, 12379-12383.

79. Carr, M. W., Roth, S. J., Luther, E., Rose, S. S., Springer, T. A., 1994. Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91, 3652-3656.
80. Carter, G. C., Law, M., Hollinshead, M., Smith, G. L., 2005. Entry of the vaccinia virus intracellular mature virion and its interactions with glycosaminoglycans. *J.Gen.Virol.* 86, 1279-1290.
81. Carter, G. C., Rodger, G., Murphy, B. J., Law, M., Krauss, O., Hollinshead, M., Smith, G. L., 2003. Vaccinia virus cores are transported on microtubules. *J.Gen.Virol.* 84, 2443-2458.
82. Caux, C., Dezutter-Dambuyant, C., Schmitt, D., Banchereau, J., 1992. GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 360, 258-261.
83. Cawthon, A. G., Alexander-Miller, M. A., 2002. Optimal colocalization of TCR and CD8 as a novel mechanism for the control of functional avidity. *J.Immunol.* 169, 3492-3498.
84. Cawthon, A. G., Lu, H., Alexander-Miller, M. A., 2001. Peptide requirement for CTL activation reflects the sensitivity to CD3 engagement: correlation with CD8alpha-beta versus CD8alpha-alpha expression. *J.Immunol.* 167, 2577-2584.
85. Chang, H. W., Uribe, L. H., Jacobs, B. L., 1995. Rescue of vaccinia virus lacking the E3L gene by mutants of E3L. *J.Virol.* 69, 6605-6608.
86. Chavan, R., Marfatia, K. A., An, I. C., Garber, D. A., Feinberg, M. B., 2006. 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.
87. Cheever, M. A., 2008. Twelve immunotherapy drugs that could cure cancers. *Immunol.Rev.* 222, 357-368.
88. Chen, W., Wahl, S. M., 2003. TGF-beta: the missing link in CD4+CD25+ regulatory T cell-mediated immunosuppression. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14, 85-89.
89. Chen, Y. Z., Yao, X. L., Tabata, Y., Nakagawa, S., Gao, J. Q., 2010. Gene carriers and transfection systems used in the recombination of dendritic cells for effective cancer immunotherapy. *Clin.Dev.Immunol.* 2010, 565643.
90. Chiu, W. L., Lin, C. L., Yang, M. H., Tzou, D. L., Chang, W., 2007. Vaccinia virus 4c (A26L) protein on intracellular mature virus binds to the extracellular cellular matrix laminin. *J.Virol.* 81, 2149-2157.
91. Choi, I. H., Zhu, G., Sica, G. L., Strome, S. E., Cheville, J. C., Lau, J. S., Zhu, Y., Flies, D. B., Tamada, K., Chen, L., 2003. Genomic organization and expression analysis of B7-H4, an immune inhibitory molecule of the B7 family. *J.Immunol.* 171, 4650-4654.

92. Chow, M. T., Moller, A., Smyth, M. J., 2012. Inflammation and immune surveillance in cancer. *Semin.Cancer Biol.* 22, 23-32.
93. Chung, C. S., Hsiao, J. C., Chang, Y. S., Chang, W., 1998. A27L protein mediates vaccinia virus interaction with cell surface heparan sulfate. *J.Virol.* 72, 1577-1585.
94. Clark, R. H., Kenyon, J. C., Bartlett, N. W., Tscharke, D. C., Smith, G. L., 2006. Deletion of gene A41L enhances vaccinia virus immunogenicity and vaccine efficacy. *J.Gen.Virol.* 87, 29-38.
95. Colamonici, O. R., Domanski, P., Sweitzer, S. M., Larner, A., Buller, R. M., 1995. Vaccinia virus B18R gene encodes a type I interferon-binding protein that blocks interferon alpha transmembrane signaling. *J.Biol.Chem.* 270, 15974-15978.
96. COLLIER, L. H., 1955. The development of a stable smallpox vaccine. *J.Hyg.(Lond)* 53, 76-101.
97. Colombo, M. P., Trinchieri, G., 2002. Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13, 155-168.
98. Comes, A., Rosso, O., Orengo, A. M., Di, C. E., Sorrentino, C., Meazza, R., Piazza, T., Valzasina, B., Nanni, P., Colombo, M. P., Ferrini, S., 2006. CD25+ regulatory T cell depletion augments immunotherapy of micrometastases by an IL-21-secreting cellular vaccine. *J.Immunol.* 176, 1750-1758.
99. Condeelis, J., Pollard, J. W., 2006. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 124, 263-266.
100. Condit, R. C., Moussatche, N., Traktman, P., 2006. In a nutshell: structure and assembly of the vaccinia virion. *Adv.Virus Res.* 66, 31-124.
101. Conti, I., Rollins, B. J., 2004a. CCL2 (monocyte chemoattractant protein-1) and cancer. *Semin.Cancer Biol.* 14, 149-154.
102. Conti, I., Rollins, B. J., 2004b. CCL2 (monocyte chemoattractant protein-1) and cancer. *Semin.Cancer Biol.* 14, 149-154.
103. Cook, D. N., 1996. The role of MIP-1 alpha in inflammation and hematopoiesis. *J.Leukoc.Biol.* 59, 61-66.
104. Coosemans, A., Wolfl, M., Berneman, Z. N., Van, T., V, Vergote, I., Amant, F., Van Gool, S. W., 2010. Immunological response after therapeutic vaccination with WT1 mRNA-loaded dendritic cells in end-stage endometrial carcinoma. *Anticancer Res.* 30, 3709-3714.
105. Corona Gutierrez, C. M., Tinoco, A., Navarro, T., Contreras, M. L., Cortes, R. R., Calzado, P., Reyes, L., Posternak, R., Morosoli, G., Verde, M. L., Rosales, R., 2004. 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.* 15, 421-431.



106. Corthay, A., Skovseth, D. K., Lundin, K. U., Rosjo, E., Omholt, H., Hofgaard, P. O., Haraldsen, G., Bogen, B., 2005. Primary antitumor immune response mediated by CD4+ T cells. *Immunity*. 22, 371-383.
107. Coussens, L. M., Werb, Z., 2002. Inflammation and cancer. *Nature* 420, 860-867.
108. Curiel, T. J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J. R., Zhang, L., Burow, M., Zhu, Y., Wei, S., Kryczek, I., Daniel, B., Gordon, A., Myers, L., Lackner, A., Disis, M. L., Knutson, K. L., Chen, L., Zou, W., 2004. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat.Med.* 10, 942-949.
109. Curran, M. A., Montalvo, W., Yagita, H., Allison, J. P., 2010. PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 107, 4275-4280.
110. Curtsinger, J. M., Mescher, M. F., 2010. Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. *Curr.Opin.Immunol.* 22, 333-340.
111. Dabbagh, K., Xiao, Y., Smith, C., Stepick-Biek, P., Kim, S. G., Lamm, W. J., Liggitt, D. H., Lewis, D. B., 2000. Local blockade of allergic airway hyperreactivity and inflammation by the poxvirus-derived pan-CC-chemokine inhibitor vCCI. *J.Immunol.* 165, 3418-3422.
112. Dai, K., Liu, Y., Liu, M., Xu, J., Huang, W., Huang, X., Liu, L., Wan, Y., Hao, Y., Shao, Y., 2008a. Pathogenicity and immunogenicity of recombinant Tiantan Vaccinia Virus with deleted C12L and A53R genes. *Vaccine* 26, 5062-5071.
113. Dai, K., Liu, Y., Liu, M., Xu, J., Huang, W., Huang, X., Liu, L., Wan, Y., Hao, Y., Shao, Y., 2008b. Pathogenicity and immunogenicity of recombinant Tiantan Vaccinia Virus with deleted C12L and A53R genes. *Vaccine* 26, 5062-5071.
114. Dai, Y., Zhang, X., Peng, Y., Wang, Z., 2005. The expression of cyclooxygenase-2, VEGF and PGs in CIN and cervical carcinoma. *Gynecol.Oncol.* 97, 96-103.
115. DALES, S., 1963. The uptake and development of vaccinia virus in strain L cells followed with labeled viral deoxyribonucleic acid. *J.Cell Biol.* 18, 51-72.
116. DALES, S., SIMINOVITCH, L., 1961. The development of vaccinia virus in Earle's L strain cells as examined by electron microscopy. *J.Biophys.Biochem.Cytol.* 10, 475-503.
117. Davidson, B., Goldberg, I., Gotlieb, W. H., Lerner-Geva, L., Ben-Baruch, G., Agulansky, L., Novikov, I., Kopolovic, J., 1999. Macrophage infiltration and angiogenesis in cervical squamous cell carcinoma--clinicopathologic correlation. *Acta Obstet.Gynecol.Scand.* 78, 240-244.
118. Davidson, B., Goldberg, I., Kopolovic, J., 1997. Inflammatory response in cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Pathol.Res.Pract.* 193, 491-495.

119. Davidson, E. J., Faulkner, R. L., Sehr, P., Pawlita, M., Smyth, L. J., Burt, D. J., Tomlinson, A. E., Hickling, J., Kitchener, H. C., Stern, P. L., 2004. 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* 22, 2722-2729.
120. Deguine, J., Breart, B., Lemaitre, F., Di Santo, J. P., Bousso, P., 2010. Intravital imaging reveals distinct dynamics for natural killer and CD8(+) T cells during tumor regression. *Immunity*. 33, 632-644.
121. Delaloye, J., Roger, T., Steiner-Tardivel, Q. G., Le, R. D., Knaup, R. M., Akira, S., Petrilli, V., Gomez, C. E., Perdiguero, B., Tschopp, J., Pantaleo, G., Esteban, M., Calandra, T., 2009. Innate immune sensing of modified vaccinia virus Ankara (MVA) is mediated by TLR2-TLR6, MDA-5 and the NALP3 inflammasome. *PLoS.Pathog.* 5, e1000480.
122. DeNardo, D. G., Barreto, J. B., Andreu, P., Vasquez, L., Tawfik, D., Kolhatkar, N., Coussens, L. M., 2009. CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. *Cancer Cell* 16, 91-102.
123. DeNardo, D. G., Johansson, M., Coussens, L. M., 2008. Immune cells as mediators of solid tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 27, 11-18.
124. Di, N. M., Zappasodi, R., Carlo-Stella, C., Mortarini, R., Pupa, S. M., Magni, M., Devizzi, L., Matteucci, P., Baldassari, P., Ravagnani, F., Cabras, A., Anichini, A., Gianni, A. M., 2009. Vaccination with autologous tumor-loaded dendritic cells induces clinical and immunologic responses in indolent B-cell lymphoma patients with relapsed and measurable disease: a pilot study. *Blood* 113, 18-27.
125. Diebold, S. S., Montoya, M., Unger, H., Alexopoulou, L., Roy, P., Haswell, L. E., Al-Shamkhani, A., Flavell, R., Borrow, P., Reis e Sousa, 2003. Viral infection switches non-plasmacytoid dendritic cells into high interferon producers. *Nature* 424, 324-328.
126. Dillman, R. O., Wiemann, M., Nayak, S. K., DeLeon, C., Hood, K., DePriest, C., 2003. Interferon-gamma or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor administered as adjuvants with a vaccine of irradiated autologous tumor cells from short-term cell line cultures: a randomized phase 2 trial of the cancer biotherapy research group. *J.Immunother.* 26, 367-373.
127. Dinapoli, M. R., Calderon, C. L., Lopez, D. M., 1996. The altered tumoricidal capacity of macrophages isolated from tumor-bearing mice is related to reduce expression of the inducible nitric oxide synthase gene. *J.Exp.Med.* 183, 1323-1329.
128. Disis, M. L., Bernhard, H., Shiota, F. M., Hand, S. L., Gralow, J. R., Huseby, E. S., Gillis, S., Cheever, M. A., 1996. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: an effective adjuvant for protein and peptide-based vaccines. *Blood* 88, 202-210.
129. Dong, H., Strome, S. E., Salomao, D. R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D. B., Roche, P. C., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K., Lennon, V. A., Celis, E., Chen, L., 2002.

- Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat.Med.* 8, 793-800.
130. Dranoff, G., 2002. GM-CSF-based cancer vaccines. *Immunol.Rev.* 188, 147-154.
  131. Dranoff, G., 2003. GM-CSF-secreting melanoma vaccines. *Oncogene* 22, 3188-3192.
  132. Dranoff, G., Jaffee, E., Lazenby, A., Golumbek, P., Levitsky, H., Brose, K., Jackson, V., Hamada, H., Pardoll, D., Mulligan, R. C., 1993a. Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90, 3539-3543.
  133. Dranoff, G., Jaffee, E., Lazenby, A., Golumbek, P., Levitsky, H., Brose, K., Jackson, V., Hamada, H., Pardoll, D., Mulligan, R. C., 1993b. Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90, 3539-3543.
  134. Draper, S. J., Heeney, J. L., 2010. Viruses as vaccine vectors for infectious diseases and cancer. *Nat.Rev.Microbiol.* 8, 62-73.
  135. Drexler, I., Heller, K., Wahren, B., Erfle, V., Sutter, G., 1998. Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara replicates in baby hamster kidney cells, a potential host for virus propagation, but not in various human transformed and primary cells. *J.Gen.Virol.* 79 ( Pt 2), 347-352.
  136. Driessens, G., Kline, J., Gajewski, T. F., 2009. Costimulatory and coinhibitory receptors in anti-tumor immunity. *Immunol.Rev.* 229, 126-144.
  137. Drummond, I. A., Madden, S. L., Rohwer-Nutter, P., Bell, G. I., Sukhatme, V. P., Rauscher, F. J., III, 1992. Repression of the insulin-like growth factor II gene by the Wilms tumor suppressor WT1. *Science* 257, 674-678.
  138. Dunussi-Joannopoulos, K., Weinstein, H. J., Arceci, R. J., Croop, J. M., 1997. Gene therapy with B7.1 and GM-CSF vaccines in a murine AML model. *J.Pediatr.Hematol.Oncol.* 19, 536-540.
  139. Eckart, R. E., Love, S. S., Atwood, J. E., Arness, M. K., Cassimatis, D. C., Campbell, C. L., Boyd, S. Y., Murphy, J. G., Swerdlow, D. L., Collins, L. C., Riddle, J. R., Tornberg, D. N., Grabenstein, J. D., Engler, R. J., 2004. Incidence and follow-up of inflammatory cardiac complications after smallpox vaccination. *J.Am.Coll.Cardiol.* 44, 201-205.
  140. Eder, J. P., Kantoff, P. W., Roper, K., Xu, G. X., Buble, G. J., Boyden, J., Gritz, L., Mazzara, G., Oh, W. K., Arlen, P., Tsang, K. Y., Panicali, D., Schlom, J., Kufe, D. W., 2000. A phase I trial of a recombinant vaccinia virus expressing prostate-specific antigen in advanced prostate cancer. *Clin.Cancer Res.* 6, 1632-1638.
  141. Elisseeva, O. A., Oka, Y., Tsuboi, A., Ogata, K., Wu, F., Kim, E. H., Soma, T., Tamaki, H., Kawakami, M., Oji, Y., Hosen, N., Kubota, T., Nakagawa, M.,

- Yamagami, T., Hiraoka, A., Tsukaguchi, M., Udaka, K., Ogawa, H., Kishimoto, T., Nomura, T., Sugiyama, H., 2002. Humoral immune responses against Wilms tumor gene WT1 product in patients with hematopoietic malignancies. *Blood* 99, 3272-3279.
142. Emens, L. A., 2008. Cancer vaccines: on the threshold of success. *Expert.Opin.Emerg.Drugs* 13, 295-308.
  143. Englert, C., Hou, X., Maheswaran, S., Bennett, P., Ngwu, C., Re, G. G., Garvin, A. J., Rosner, M. R., Haber, D. A., 1995. WT1 suppresses synthesis of the epidermal growth factor receptor and induces apoptosis. *EMBO J.* 14, 4662-4675.
  144. Epperson, M. L., Lee, C. A., Fremont, D. H., 2012. Subversion of cytokine networks by virally encoded decoy receptors. *Immunol.Rev.* 250, 199-215.
  145. Esche, C., Stellato, C., Beck, L. A., 2005. Chemokines: key players in innate and adaptive immunity. *J.Invest Dermatol.* 125, 615-628.
  146. Fenner, F., 1989. Risks and benefits of vaccinia vaccine use in the worldwide smallpox eradication campaign. *Res.Virol.* 140, 465-466.
  147. Fenner, F., CHAPPLE, P. J., 1965. EVOLUTIONARY CHANGES IN MYXOMA VIRUS IN BRITAIN. AN EXAMINATION OF 222 NATURALLY OCCURRING STRAINS OBTAINED FROM 80 COUNTIES DURING THE PERIOD OCTOBER-NOVEMBER 1962. *J.Hyg.(Lond)* 63, 175-185.
  148. Ferrier-Rembert, A., Drillien, R., Tournier, J. N., Garin, D., Crance, J. M., 2008. Short- and long-term immunogenicity and protection induced by non-replicating smallpox vaccine candidates in mice and comparison with the traditional 1st generation vaccine. *Vaccine* 26, 1794-1804.
  149. Fiander, A. N., Tristram, A. J., Davidson, E. J., Tomlinson, A. E., Man, S., Baldwin, P. J., Sterling, J. C., Kitchener, H. C., 2006. 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* 16, 1075-1081.
  150. Fichorova, R. N., Anderson, D. J., 1999. Differential expression of immunobiological mediators by immortalized human cervical and vaginal epithelial cells. *Biol.Reprod.* 60, 508-514.
  151. Filipazzi, P., Valenti, R., Huber, V., Pilla, L., Canese, P., Iero, M., Castelli, C., Mariani, L., Parmiani, G., Rivoltini, L., 2007. Identification of a new subset of myeloid suppressor cells in peripheral blood of melanoma patients with modulation by a granulocyte-macrophage colony-stimulation factor-based antitumor vaccine. *J.Clin.Oncol.* 25, 2546-2553.
  152. Finke, J., Ferrone, S., Frey, A., Mufson, A., Ochoa, A., 1999. Where have all the T cells gone? Mechanisms of immune evasion by tumors. *Immunol.Today* 20, 158-160.

153. Finn, O. J., 2003. Cancer vaccines: between the idea and the reality. *Nat.Rev.Immunol.* 3, 630-641.
154. Finn, O. J., 2008. Cancer immunology. *N.Engl.J.Med.* 358, 2704-2715.
155. Fischer, H. G., Frosch, S., Reske, K., Reske-Kunz, A. B., 1988. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor activates macrophages derived from bone marrow cultures to synthesis of MHC class II molecules and to augmented antigen presentation function. *J.Immunol.* 141, 3882-3888.
156. Flanagan, K., Moroziewicz, D., Kwak, H., Horig, H., Kaufman, H. L., 2004. The lymphoid chemokine CCL21 costimulates naive T cell expansion and Th1 polarization of non-regulatory CD4+ T cells. *Cell Immunol.* 231, 75-84.
157. Flexner, C., Hugin, A., Moss, B., 1987. Prevention of vaccinia virus infection in immunodeficient mice by vector-directed IL-2 expression. *Nature* 330, 259-262.
158. Frederick M.Ausubel, 2004. *Current Protocols in Molecular Biology.* John Wiley & Sons.
159. Fridlender, Z. G., Buchlis, G., Kapoor, V., Cheng, G., Sun, J., Singhal, S., Crisanti, M. C., Wang, L. C., Heitjan, D., Snyder, L. A., Albelda, S. M., 2010a. CCL2 blockade augments cancer immunotherapy. *Cancer Res.* 70, 109-118.
160. Fridlender, Z. G., Buchlis, G., Kapoor, V., Cheng, G., Sun, J., Singhal, S., Crisanti, M. C., Wang, L. C., Heitjan, D., Snyder, L. A., Albelda, S. M., 2010b. CCL2 blockade augments cancer immunotherapy. *Cancer Res.* 70, 109-118.
161. Frischknecht, F., Moreau, V., Rottger, S., Gonfloni, S., Reckmann, I., Superti-Furga, G., Way, M., 1999. Actin-based motility of vaccinia virus mimics receptor tyrosine kinase signalling. *Nature* 401, 926-929.
162. Fu, S., Yopp, A. C., Mao, X., Chen, D., Zhang, N., Chen, D., Mao, M., Ding, Y., Bromberg, J. S., 2004. CD4+ CD25+ CD62+ T-regulatory cell subset has optimal suppressive and proliferative potential. *Am.J.Transplant.* 4, 65-78.
163. Gabrilovich, D. I., Chen, H. L., Girgis, K. R., Cunningham, H. T., Meny, G. M., Nadaf, S., Kavanaugh, D., Carbone, D. P., 1996. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat.Med.* 2, 1096-1103.
164. Gajewski, T. F., 2007. Failure at the effector phase: immune barriers at the level of the melanoma tumor microenvironment. *Clin.Cancer Res.* 13, 5256-5261.
165. Gallina, G., Dolcetti, L., Serafini, P., De, S. C., Marigo, I., Colombo, M. P., Basso, G., Brombacher, F., Borrello, I., Zanovello, P., Biccato, S., Bronte, V., 2006. Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells. *J.Clin.Invest* 116, 2777-2790.
166. Ganesh, B. B., Cheatem, D. M., Sheng, J. R., Vasu, C., Prabhakar, B. S., 2009. GM-CSF-induced CD11c+CD8a--dendritic cells facilitate Foxp3+ and IL-10+

- regulatory T cell expansion resulting in suppression of autoimmune thyroiditis. *Int.Immunol.* 21, 269-282.
167. Gao, L., Bellantuono, I., Elsasser, A., Marley, S. B., Gordon, M. Y., Goldman, J. M., Stauss, H. J., 2000. Selective elimination of leukemic CD34(+) progenitor cells by cytotoxic T lymphocytes specific for WT1. *Blood* 95, 2198-2203.
  168. Garber, K., 2009. First results for agents targeting cancer-related inflammation. *J.Natl.Cancer Inst.* 101, 1110-1112.
  169. Geada, M. M., Galindo, I., Lorenzo, M. M., Perdiguero, B., Blasco, R., 2001. Movements of vaccinia virus intracellular enveloped virions with GFP tagged to the F13L envelope protein. *J.Gen.Virol.* 82, 2747-2760.
  170. Gerard, C., Rollins, B. J., 2001. Chemokines and disease. *Nat.Immunol.* 2, 108-115.
  171. Gessler, M., Konig, A., Bruns, G. A., 1992. The genomic organization and expression of the WT1 gene. *Genomics* 12, 807-813.
  172. Giavedoni, L. D., Jones, L., Gardner, M. B., Gibson, H. L., Ng, C. T., Barr, P. J., Yilma, T., 1992. Vaccinia virus recombinants expressing chimeric proteins of human immunodeficiency virus and gamma interferon are attenuated for nude mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89, 3409-3413.
  173. Gillessen, S., Naumov, Y. N., Nieuwenhuis, E. E., Exley, M. A., Lee, F. S., Mach, N., Luster, A. D., Blumberg, R. S., Taniguchi, M., Balk, S. P., Strominger, J. L., Dranoff, G., Wilson, S. B., 2003. CD1d-restricted T cells regulate dendritic cell function and antitumor immunity in a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-dependent fashion. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100, 8874-8879.
  174. Gillmore, R., Xue, S. A., Holler, A., Kaeda, J., Hadjiminias, D., Healy, V., Dina, R., Parry, S. C., Bellantuono, I., Ghani, Y., Coombes, R. C., Waxman, J., Stauss, H. J., 2006. Detection of Wilms' tumor antigen--specific CTL in tumor-draining lymph nodes of patients with early breast cancer. *Clin.Cancer Res.* 12, 34-42.
  175. Giraud, E., Inoue, M., Hanahan, D., 2004. An amino-bisphosphonate targets MMP-9-expressing macrophages and angiogenesis to impair cervical carcinogenesis. *J.Clin.Invest* 114, 623-633.
  176. Golay, J., Introna, M., 2008. Chemokines and antagonists in non-Hodgkin's lymphoma. *Expert.Opin.Ther.Targets.* 12, 621-635.
  177. Goodyer, P., Dehbi, M., Torban, E., Bruening, W., Pelletier, J., 1995. Repression of the retinoic acid receptor-alpha gene by the Wilms' tumor suppressor gene product, wt1. *Oncogene* 10, 1125-1129.
  178. Gordon, S., Martinez, F. O., 2010. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity.* 32, 593-604.
  179. Graham, K. A., Lalani, A. S., Macen, J. L., Ness, T. L., Barry, M., Liu, L. Y., Lucas, A., Clark-Lewis, I., Moyer, R. W., McFadden, G., 1997. The T1/35kDa

family of poxvirus-secreted proteins bind chemokines and modulate leukocyte influx into virus-infected tissues. *Virology* 229, 12-24.

180. Grivennikov, S. I., Greten, F. R., Karin, M., 2010a. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140, 883-899.
181. Grivennikov, S. I., Greten, F. R., Karin, M., 2010b. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140, 883-899.
182. Guan, X., Nishikawa, M., Takemoto, S., Ohno, Y., Yata, T., Takakura, Y., 2010. Injection site-dependent induction of immune response by DNA vaccine: comparison of skin and spleen as a target for vaccination. *J.Gene Med.* 12, 301-309.
183. Gulley, J., Chen, A. P., Dahut, W., Arlen, P. M., Bastian, A., Steinberg, S. M., Tsang, K., Panicali, D., Poole, D., Schlom, J., Michael, H. J., 2002. Phase I study of a vaccine using recombinant vaccinia virus expressing PSA (rV-PSA) in patients with metastatic androgen-independent prostate cancer. *Prostate* 53, 109-117.
184. Gunn, G. R., Zubair, A., Peters, C., Pan, Z. K., Wu, T. C., Paterson, Y., 2001. Two *Listeria monocytogenes* vaccine vectors that express different molecular forms of human papilloma virus-16 (HPV-16) E7 induce qualitatively different T cell immunity that correlates with their ability to induce regression of established tumors immortalized by HPV-16. *J.Immunol.* 167, 6471-6479.
185. Haas, A. R., Sun, J., Vachani, A., Wallace, A. F., Silverberg, M., Kapoor, V., Albelda, S. M., 2006. Cyclooxygenase-2 inhibition augments the efficacy of a cancer vaccine. *Clin.Cancer Res.* 12, 214-222.
186. Hachisuga, T., Fukuda, K., Hayashi, Y., Iwasaka, T., Sugimori, H., 1989. Immunohistochemical demonstration of histiocytes in normal ectocervical epithelium and epithelial lesions of the uterine cervix. *Gynecol.Oncol.* 33, 273-278.
187. Hamilton, J. M., 1994. Adjuvant therapy for gastrointestinal cancer. *Curr.Opin.Oncol.* 6, 435-440.
188. Hammes, L. S., Tekmal, R. R., Naud, P., Edelweiss, M. I., Kirma, N., Valente, P. T., Syrjanen, K. J., Cunha-Filho, J. S., 2007. Macrophages, inflammation and risk of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) progression--clinicopathological correlation. *Gynecol.Oncol.* 105, 157-165.
189. Hamsikova, E., Zavadova, H., Kutinova, L., Ludvikova, V., Krchnak, V., Nemeckova, S., Vonka, V., 1990. Priming effect of recombinant vaccinia virus coding for the middle hepatitis B surface antigen. *Arch.Virol.* 113, 283-289.
190. Hanahan, D., Weinberg, R. A., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
191. Hanahan, D., Weinberg, R. A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.

192. Hao, N. B., Lu, M. H., Fan, Y. H., Cao, Y. L., Zhang, Z. R., Yang, S. M., 2012. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin.Dev.Immunol.* 2012, 948098.
193. Hareuveni, M., Gautier, C., Kieny, M. P., Wreschner, D., Chambon, P., Lathe, R., 1990. Vaccination against tumor cells expressing breast cancer epithelial tumor antigen. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87, 9498-9502.
- 194.
195. Harte, M. T., Haga, I. R., Maloney, G., Gray, P., Reading, P. C., Bartlett, N. W., Smith, G. L., Bowie, A., O'Neill, L. A., 2003. The poxvirus protein A52R targets Toll-like receptor signaling complexes to suppress host defense. *J.Exp.Med.* 197, 343-351.
196. Hashii, Y., Sato, E., Ohta, H., Oka, Y., Sugiyama, H., Ozono, K., 2010. WT1 peptide immunotherapy for cancer in children and young adults. *Pediatr.Blood Cancer* 55, 352-355.
197. Heemskerk, B., Liu, K., Dudley, M. E., Johnson, L. A., Kaiser, A., Downey, S., Zheng, Z., Shelton, T. E., Matsuda, K., Robbins, P. F., Morgan, R. A., Rosenberg, S. A., 2008. Adoptive cell therapy for patients with melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes genetically engineered to secrete interleukin-2. *Hum.Gene Ther.* 19, 496-510.
198. Heller, D. S., Hameed, M., Cracchiolo, B., Wiederkehr, M., Scott, D., Skurnick, J., Ammar, N., Lambert, W. C., 2003. Presence and quantification of macrophages in squamous cell carcinoma of the cervix. *Int.J.Gynecol.Cancer* 13, 67-70.
199. Hembruff, S. L., Cheng, N., 2009. Chemokine signaling in cancer: Implications on the tumor microenvironment and therapeutic targeting. *Cancer Ther.* 7, 254-267.
200. Heuser, J., 2005. Deep-etch EM reveals that the early poxvirus envelope is a single membrane bilayer stabilized by a geodetic "honeycomb" surface coat. *J.Cell Biol.* 169, 269-283.
201. Hewitt, S. M., Hamada, S., McDonnell, T. J., Rauscher, F. J., III, Saunders, G. F., 1995. Regulation of the proto-oncogenes bcl-2 and c-myc by the Wilms' tumor suppressor gene WT1. *Cancer Res.* 55, 5386-5389.
202. Hildenbrand, R., Dilger, I., Horlin, A., Stutte, H. J., 1995. Urokinase and macrophages in tumour angiogenesis. *Br.J.Cancer* 72, 818-823.
203. Hiller, G., Weber, K., 1985. Golgi-derived membranes that contain an acylated viral polypeptide are used for vaccinia virus envelopment. *J.Virol.* 55, 651-659.
204. Hochstein-Mintzel, V., Hanichen, T., Huber, H. C., Stickl, H., 1975. [An attenuated strain of vaccinia virus (MVA). Successful intramuscular immunization against vaccinia and variola (author's transl)]. *Zentralbl.Bakteriol.Orig.A* 230, 283-297.



205. Hodge, J. W., Sabzevari, H., Yafal, A. G., Gritz, L., Lorenz, M. G., Schlom, J., 1999. A triad of costimulatory molecules synergize to amplify T-cell activation. *Cancer Res.* 59, 5800-5807.
206. Hollinshead, M., Rodger, G., Van, E. H., Law, M., Hollinshead, R., Vaux, D. J., Smith, G. L., 2001. Vaccinia virus utilizes microtubules for movement to the cell surface. *J.Cell Biol.* 154, 389-402.
207. Hollinshead, M., Vanderplasschen, A., Smith, G. L., Vaux, D. J., 1999. Vaccinia virus intracellular mature virions contain only one lipid membrane. *J.Virol.* 73, 1503-1517.
208. Homey, B., Muller, A., Zlotnik, A., 2002. Chemokines: agents for the immunotherapy of cancer? *Nat.Rev.Immunol.* 2, 175-184.
209. Horuk, R., Proudfoot, A. E., 2009. Drug discovery targeting the chemokine system--where are we? *Front Biosci.(Elite.Ed)* 1, 209-219.
210. Hotchkiss, K. A., Ashton, A. W., Klein, R. S., Lenzi, M. L., Zhu, G. H., Schwartz, E. L., 2003. Mechanisms by which tumor cells and monocytes expressing the angiogenic factor thymidine phosphorylase mediate human endothelial cell migration. *Cancer Res.* 63, 527-533.
211. Hsieh, C. J., Kim, T. W., Hung, C. F., Juang, J., Moniz, M., Boyd, D. A., He, L., Chen, P. J., Chen, C. H., Wu, T. C., 2004. Enhancement of vaccinia vaccine potency by linkage of tumor antigen gene to gene encoding calreticulin. *Vaccine* 22, 3993-4001.
212. Hu, F. Q., Smith, C. A., Pickup, D. J., 1994. Cowpox virus contains two copies of an early gene encoding a soluble secreted form of the type II TNF receptor. *Virology* 204, 343-356.
213. Hu, H., Sun, L., Guo, C., Liu, Q., Zhou, Z., Peng, L., Pan, J., Yu, L., Lou, J., Yang, Z., Zhao, P., Ran, Y., 2009. Tumor cell-microenvironment interaction models coupled with clinical validation reveal CCL2 and SNCG as two predictors of colorectal cancer hepatic metastasis. *Clin.Cancer Res.* 15, 5485-5493.
214. Hu, K., Xiong, J., Ji, K., Sun, H., Wang, J., Liu, H., 2007. Recombined CC chemokine ligand 2 into B16 cells induces production of Th2-dominant [correction of dominant] cytokines and inhibits melanoma metastasis. *Immunol.Lett.* 113, 19-28.
215. Huang, A., Campbell, C. E., Bonetta, L., McAndrews-Hill, M. S., Chilton-MacNeill, S., Coppes, M. J., Law, D. J., Feinberg, A. P., Yeger, H., Williams, B. R., 1990. Tissue, developmental, and tumor-specific expression of divergent transcripts in Wilms tumor. *Science* 250, 991-994.
216. Hung, K., Hayashi, R., Lafond-Walker, A., Lowenstein, C., Pardoll, D., Levitsky, H., 1998. The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response. *J.Exp.Med.* 188, 2357-2368.

217. Hwang, J., Kim, C. W., Son, K. N., Han, K. Y., Lee, K. H., Kleinman, H. K., Ko, J., Na, D. S., Kwon, B. S., Gho, Y. S., Kim, J., 2004. Angiogenic activity of human CC chemokine CCL15 *in vitro* and *in vivo*. *FEBS Lett.* 570, 47-51.
218. Hwang, J., Son, K. N., Kim, C. W., Ko, J., Na, D. S., Kwon, B. S., Gho, Y. S., Kim, J., 2005. Human CC chemokine CCL23, a ligand for CCR1, induces endothelial cell migration and promotes angiogenesis. *Cytokine* 30, 254-263.
219. Inoue, K., Ogawa, H., Sonoda, Y., Kimura, T., Sakabe, H., Oka, Y., Miyake, S., Tamaki, H., Oji, Y., Yamagami, T., Tatekawa, T., Soma, T., Kishimoto, T., Sugiyama, H., 1997. Aberrant overexpression of the Wilms tumor gene (WT1) in human leukemia. *Blood* 89, 1405-1412.
220. Inoue, K., Tamaki, H., Ogawa, H., Oka, Y., Soma, T., Tatekawa, T., Oji, Y., Tsuboi, A., Kim, E. H., Kawakami, M., Akiyama, T., Kishimoto, T., Sugiyama, H., 1998a. Wilms' tumor gene (WT1) competes with differentiation-inducing signal in hematopoietic progenitor cells. *Blood* 91, 2969-2976.
221. Inoue, K., Tamaki, H., Ogawa, H., Oka, Y., Soma, T., Tatekawa, T., Oji, Y., Tsuboi, A., Kim, E. H., Kawakami, M., Akiyama, T., Kishimoto, T., Sugiyama, H., 1998b. Wilms' tumor gene (WT1) competes with differentiation-inducing signal in hematopoietic progenitor cells. *Blood* 91, 2969-2976.
222. Isaacs, S. N., Kotwal, G. J., Moss, B., 1992. Vaccinia virus complement-control protein prevents antibody-dependent complement-enhanced neutralization of infectivity and contributes to virulence. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89, 628-632.
223. Iyer, L. M., Balaji, S., Koonin, E. V., Aravind, L., 2006. Evolutionary genomics of nucleo-cytoplasmic large DNA viruses. *Virus Res.* 117, 156-184.
224. Izumoto, S., Tsuboi, A., Oka, Y., Suzuki, T., Hashiba, T., Kagawa, N., Hashimoto, N., Maruno, M., Elisseeva, O. A., Shirakata, T., Kawakami, M., Oji, Y., Nishida, S., Ohno, S., Kawase, I., Hatazawa, J., Nakatsuka, S., Aozasa, K., Morita, S., Sakamoto, J., Sugiyama, H., Yoshimine, T., 2008. Phase II clinical trial of Wilms tumor 1 peptide vaccination for patients with recurrent glioblastoma multiforme. *J.Neurosurg.* 108, 963-971.
225. Jackson, S. S., Ilyinskii, P., Philippon, V., Gritz, L., Yafal, A. G., Zinnack, K., Beaudry, K. R., Manson, K. H., Lifton, M. A., Kuroda, M. J., Letvin, N. L., Mazzara, G. P., Panicali, D. L., 2005. Role of genes that modulate host immune responses in the immunogenicity and pathogenicity of vaccinia virus. *J.Virol.* 79, 6554-6559.
226. Jaffee, E. M., Hruban, R. H., Biedrzycki, B., Laheru, D., Schepers, K., Sauter, P. R., Goemann, M., Coleman, J., Grochow, L., Donehower, R. C., Lillemoe, K. D., O'Reilly, S., Abrams, R. A., Pardoll, D. M., Cameron, J. L., Yeo, C. J., 2001. Novel allogeneic granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-secreting tumor vaccine for pancreatic cancer: a phase I trial of safety and immune activation. *J.Clin.Oncol.* 19, 145-156.

227. Jayasinghe, M. M., Golden, J. M., Nair, P., O'Donnell, C. M., Werner, M. T., Kurt, R. A., 2008. Tumor-derived CCL5 does not contribute to breast cancer progression. *Breast Cancer Res.Treat.* 111, 511-521.
228. Jego, G., Palucka, A. K., Blanck, J. P., Chalouni, C., Pascual, V., Banchereau, J., 2003. Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity.* 19, 225-234.
229. Jelinek, F., Sobotkova, E., Vonka, V., 2005. Characteristics of two mouse bcr-abl-transformed cell lines. II. Pathological lesions induced in mice. *Folia Biol.(Praha)* 51, 93-102.
230. Johnston, J. B., McFadden, G., 2003. Poxvirus immunomodulatory strategies: current perspectives. *J.Virol.* 77, 6093-6100.
231. Jones, J. M., Messauodi, I., Estep, R. D., Orzechowska, B., Wong, S. W., 2008. Monkeypox virus viral chemokine inhibitor (MPV vCCI), a potent inhibitor of rhesus macrophage inflammatory protein-1. *Cytokine* 43, 220-228.
232. Jordan, J. T., Sun, W., Hussain, S. F., DeAngulo, G., Prabhu, S. S., Heimberger, A. B., 2008. Preferential migration of regulatory T cells mediated by glioma-secreted chemokines can be blocked with chemotherapy. *Cancer Immunol.Immunother.* 57, 123-131.
233. Joseph Sambrook, David Russell, David W.Russell, 2000. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual Third Edition.* Cold Spring Harbor Laboratory Press.
234. Kalinski, P., 2009. Dendritic cells in immunotherapy of established cancer: Roles of signals 1, 2, 3 and 4. *Curr.Opin.Investig.Drugs* 10, 526-535.
235. Kantor, J., Abrams, S., Irvine, K., Snoy, P., Kaufman, H., Schlom, J., 1993a. Specific immunotherapy using a recombinant vaccinia virus expressing human carcinoembryonic antigen. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 690, 370-373.
236. Kantor, J., Abrams, S., Irvine, K., Snoy, P., Kaufman, H., Schlom, J., 1993b. Specific immunotherapy using a recombinant vaccinia virus expressing human carcinoembryonic antigen. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 690, 370-373.
237. Karasuyama, H., Tohyama, N., Tada, T., 1989. Autocrine growth and tumorigenicity of interleukin 2-dependent helper T cells transfected with IL-2 gene. *J.Exp.Med.* 169, 13-25.
238. Karim, R., Jordanova, E. S., Piersma, S. J., Kenter, G. G., Chen, L., Boer, J. M., Melief, C. J., van der Burg, S. H., 2009. Tumor-expressed B7-H1 and B7-DC in relation to PD-1+ T-cell infiltration and survival of patients with cervical carcinoma. *Clin.Cancer Res.* 15, 6341-6347.
239. Karkhanis, L. U., Ross, T. M., 2007. Mucosal vaccine vectors: replication-competent versus replication-deficient poxviruses. *Curr.Pharm.Des* 13, 2015-2023.

240. Karnoub, A. E., Dash, A. B., Vo, A. P., Sullivan, A., Brooks, M. W., Bell, G. W., Richardson, A. L., Polyak, K., Tubo, R., Weinberg, R. A., 2007. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 449, 557-563.
241. Kass, E., Panicali, D. L., Mazzara, G., Schlom, J., Greiner, J. W., 2001. Granulocyte/macrophage-colony stimulating factor produced by recombinant avian poxviruses enriches the regional lymph nodes with antigen-presenting cells and acts as an immunoadjuvant. *Cancer Res.* 61, 206-214.
242. Kass, E., Parker, J., Schlom, J., Greiner, J. W., 2000. Comparative studies of the effects of recombinant GM-CSF and GM-CSF administered via a poxvirus to enhance the concentration of antigen- presenting cells in regional lymph nodes. *Cytokine* 12, 960-971.
243. Kaufman, H. L., Cohen, S., Cheung, K., DeRaffele, G., Mitcham, J., Moroziewicz, D., Schlom, J., Hesdorffer, C., 2006. Local delivery of vaccinia virus expressing multiple costimulatory molecules for the treatment of established tumors. *Hum.Gene Ther.* 17, 239-244.
244. Kawakami, M., Oka, Y., Tsuboi, A., Harada, Y., Elisseeva, O. A., Furukawa, Y., Tsukaguchi, M., Shirakata, T., Nishida, S., Nakajima, H., Morita, S., Sakamoto, J., Kawase, I., Oji, Y., Sugiyama, H., 2007. Clinical and immunologic responses to very low-dose vaccination with WT1 peptide (5 microg/body) in a patient with chronic myelomonocytic leukemia. *Int.J.Hematol.* 85, 426-429.
245. Kempe, C. H., 1968. Smallpox vaccination of eczema patients with attenuated live vaccinia virus. *Yale J.Biol.Med.* 41, 1-12.
246. Kettle, S., Blake, N. W., Law, K. M., Smith, G. L., 1995. Vaccinia virus serpins B13R (SPI-2) and B22R (SPI-1) encode M(r) 38.5 and 40K, intracellular polypeptides that do not affect virus virulence in a murine intranasal model. *Virology* 206, 136-147.
247. Kieny, M. P., Lathe, R., Drillien, R., Spehner, D., Skory, S., Schmitt, D., Wiktor, T., Koprowski, H., Lecocq, J. P., 1984. Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus. *Nature* 312, 163-166.
248. Kim, S., Buchlis, G., Fridlender, Z. G., Sun, J., Kapoor, V., Cheng, G., Haas, A., Cheung, H. K., Zhang, X., Corbley, M., Kaiser, L. R., Ling, L., Albelda, S. M., 2008. Systemic blockade of transforming growth factor-beta signaling augments the efficacy of immunogene therapy. *Cancer Res.* 68, 10247-10256.
249. Klechevsky, E., Gallegos, M., Denkberg, G., Palucka, K., Banchereau, J., Cohen, C., Reiter, Y., 2008. Antitumor activity of immunotoxins with T-cell receptor-like specificity against human melanoma xenografts. *Cancer Res.* 68, 6360-6367.
250. Kleine-Lowinski, K., Gillitzer, R., Kuhne-Heid, R., Rosl, F., 1999. Monocyte-chemo-attractant-protein-1 (MCP-1)-gene expression in cervical intra-epithelial neoplasias and cervical carcinomas. *Int.J.Cancer* 82, 6-11.

251. Klimp, A. H., Hollema, H., Kempinga, C., van der Zee, A. G., de Vries, E. G., Daemen, T., 2001. Expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in human ovarian tumors and tumor-associated macrophages. *Cancer Res.* 61, 7305-7309.
252. Kobayashi, A., Weinberg, V., Darragh, T., Smith-McCune, K., 2008. Evolving immunosuppressive microenvironment during human cervical carcinogenesis. *Mucosal.Immunol.* 1, 412-420.
253. Kodama, J., Seki, N., Tokumo, K., Hongo, A., Miyagi, Y., Yoshinouchi, M., Okuda, H., Kudo, T., 1999. Vascular endothelial growth factor is implicated in early invasion in cervical cancer. *Eur.J.Cancer* 35, 485-489.
254. Koide, N., Nishio, A., Sato, T., Sugiyama, A., Miyagawa, S., 2004. Significance of macrophage chemoattractant protein-1 expression and macrophage infiltration in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Am.J.Gastroenterol.* 99, 1667-1674.
255. Kotwal, G. J., Moss, B., 1988. Vaccinia virus encodes a secretory polypeptide structurally related to complement control proteins. *Nature* 335, 176-178.
256. Krug, L. M., Dao, T., Brown, A. B., Maslak, P., Travis, W., Bekele, S., Korontsvit, T., Zakhaleva, V., Wolchok, J., Yuan, J., Li, H., Tyson, L., Scheinberg, D. A., 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.
257. Kudo-Saito, C., Schlom, J., Hodge, J. W., 2004. Intratumoral vaccination and diversified subcutaneous/ intratumoral vaccination with recombinant poxviruses encoding a tumor antigen and multiple costimulatory molecules. *Clin.Cancer Res.* 10, 1090-1099.
258. Kudo-Saito, C., Schlom, J., Hodge, J. W., 2005. Induction of an antigen cascade by diversified subcutaneous/intratumoral vaccination is associated with antitumor responses. *Clin.Cancer Res.* 11, 2416-2426.
259. Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W. J., Peeper, D. S., 2010. The essence of senescence. *Genes Dev.* 24, 2463-2479.
260. Kurte, M., Lopez, M., Aguirre, A., Escobar, A., Aguillon, J. C., Charo, J., Larsen, C. G., Kiessling, R., Salazar-Onfray, F., 2004. A synthetic peptide homologous to functional domain of human IL-10 down-regulates expression of MHC class I and Transporter associated with Antigen Processing 1/2 in human melanoma cells. *J.Immunol.* 173, 1731-1737.
261. Kusmartsev, S., Gabilovich, D. I., 2006. Role of immature myeloid cells in mechanisms of immune evasion in cancer. *Cancer Immunol.Immunother.* 55, 237-245.
262. Kutinova, L., Ludvikova, V., Simonova, V., Otavova, M., Krystofova, J., Hainz, P., Press, M., Kunke, D., Vonka, V., 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.

263. Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
264. Lalani, A. S., Barrett, J. W., McFadden, G., 2000. Modulating chemokines: more lessons from viruses. *Immunol.Today* 21, 100-106.
265. Lalani, A. S., Masters, J., Graham, K., Liu, L., Lucas, A., McFadden, G., 1999. Role of the myxoma virus soluble CC-chemokine inhibitor glycoprotein, M-T1, during myxoma virus pathogenesis. *Virology* 256, 233-245.
266. Lalani, A. S., McFadden, G., 1997. Secreted poxvirus chemokine binding proteins. *J.Leukoc.Biol.* 62, 570-576.
267. Lalani, A. S., McFadden, G., 1999. Evasion and exploitation of chemokines by viruses. *Cytokine Growth Factor Rev.* 10, 219-233.
268. Lalani, A. S., Ness, T. L., Singh, R., Harrison, J. K., Seet, B. T., Kelvin, D. J., McFadden, G., Moyer, R. W., 1998. Functional comparisons among members of the poxvirus T1/35kDa family of soluble CC-chemokine inhibitor glycoproteins. *Virology* 250, 173-184.
269. Lane, J. M., Ruben, F. L., Neff, J. M., Millar, J. D., 1969. Complications of smallpox vaccination, 1968. *N.Engl.J.Med.* 281, 1201-1208.
270. Langland, J. O., Jacobs, B. L., 2002. The role of the PKR-inhibitory genes, E3L and K3L, in determining vaccinia virus host range. *Virology* 299, 133-141.
271. Lathe, R., Kieny, M. P., Gerlinger, P., Clertant, P., Guizani, I., Cuzin, F., Chambon, P., 1987. Tumour prevention and rejection with recombinant vaccinia. *Nature* 326, 878-880.
272. Law, M., Hollinshead, R., Smith, G. L., 2002. Antibody-sensitive and antibody-resistant cell-to-cell spread by vaccinia virus: role of the A33R protein in antibody-resistant spread. *J.Gen.Virol.* 83, 209-222.
273. Law, M., Smith, G. L., 2001. Antibody neutralization of the extracellular enveloped form of vaccinia virus. *Virology* 280, 132-142.
274. Lee, M. S., Roos, J. M., McGuigan, L. C., Smith, K. A., Cormier, N., Cohen, L. K., Roberts, B. E., Payne, L. G., 1992. Molecular attenuation of vaccinia virus: mutant generation and animal characterization. *J.Virol.* 66, 2617-2630.
275. Legrand, F. A., Verardi, P. H., Chan, K. S., Peng, Y., Jones, L. A., Yilma, T. D., 2005. Vaccinia viruses with a serpin gene deletion and expressing IFN-gamma induce potent immune responses without detectable replication *in vivo*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102, 2940-2945.
276. Legrand, F. A., Verardi, P. H., Jones, L. A., Chan, K. S., Peng, Y., Yilma, T. D., 2004. Induction of potent humoral and cell-mediated immune responses by attenuated vaccinia virus vectors with deleted serpin genes. *J.Virol.* 78, 2770-2779.

277. Lehmann, M. H., Kastenmuller, W., Kandemir, J. D., Brandt, F., Suezter, Y., Sutter, G., 2009. Modified vaccinia virus ankara triggers chemotaxis of monocytes and early respiratory immigration of leukocytes by induction of CCL2 expression. *J.Virol.* 83, 2540-2552.
278. Leonard, J. P., Sherman, M. L., Fisher, G. L., Buchanan, L. J., Larsen, G., Atkins, M. B., Sosman, J. A., Dutcher, J. P., Vogelzang, N. J., Ryan, J. L., 1997. Effects of single-dose interleukin-12 exposure on interleukin-12-associated toxicity and interferon-gamma production. *Blood* 90, 2541-2548.
279. Lepique, A. P., Daghanastanli, K. R., Cuccovia, I. M., Villa, L. L., 2009. HPV16 tumor associated macrophages suppress antitumor T cell responses. *Clin.Cancer Res.* 15, 4391-4400.
280. Lewis, C. E., Pollard, J. W., 2006. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res.* 66, 605-612.
281. Lewis, J. S., Landers, R. J., Underwood, J. C., Harris, A. L., Lewis, C. E., 2000. Expression of vascular endothelial growth factor by macrophages is up-regulated in poorly vascularized areas of breast carcinomas. *J.Pathol.* 192, 150-158.
282. Lichtor, T., Glick, R. P., Lin, H., Sullivan, I., Cohen, E. P., 2005. Intratumoral injection of IL-secreting syngeneic/allogeneic fibroblasts transfected with DNA from breast cancer cells prolongs the survival of mice with intracerebral breast cancer. *Cancer Gene Ther.* 12, 708-714.
283. Lin, C. L., Chung, C. S., Heine, H. G., Chang, W., 2000. Vaccinia virus envelope H3L protein binds to cell surface heparan sulfate and is important for intracellular mature virion morphogenesis and virus infection *in vitro* and *in vivo*. *J.Virol.* 74, 3353-3365.
284. Lin, E. Y., Gouon-Evans, V., Nguyen, A. V., Pollard, J. W., 2002. The macrophage growth factor CSF-1 in mammary gland development and tumor progression. *J.Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.* 7, 147-162.
285. Lin, K. Y., Guarnieri, F. G., Staveley-O'Carroll, K. F., Levitsky, H. I., August, J. T., Pardoll, D. M., Wu, T. C., 1996. Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. *Cancer Res.* 56, 21-26.
286. Liu, Y. J., Kanzler, H., Soumelis, V., Gilliet, M., 2001. Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nat.Immunol.* 2, 585-589.
287. Loberg, R. D., Day, L. L., Harwood, J., Ying, C., St John, L. N., Giles, R., Neeley, C. K., Pienta, K. J., 2006. CCL2 is a potent regulator of prostate cancer cell migration and proliferation. *Neoplasia.* 8, 578-586.
288. Loberg, R. D., Ying, C., Craig, M., Day, L. L., Sargent, E., Neeley, C., Wojno, K., Snyder, L. A., Yan, L., Pienta, K. J., 2007a. Targeting CCL2 with systemic delivery of neutralizing antibodies induces prostate cancer tumor regression *in vivo*. *Cancer Res.* 67, 9417-9424.

289. Loberg, R. D., Ying, C., Craig, M., Yan, L., Snyder, L. A., Pienta, K. J., 2007b. CCL2 as an important mediator of prostate cancer growth *in vivo* through the regulation of macrophage infiltration. *Neoplasia*. 9, 556-562.
290. Lorusso, G., Rugg, C., 2008. The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis. *Histochem.Cell Biol.* 130, 1091-1103.
291. Luboshits, G., Shina, S., Kaplan, O., Engelberg, S., Nass, D., Lifshitz-Mercer, B., Chaitchik, S., Keydar, I., Ben-Baruch, A., 1999. Elevated expression of the CC chemokine regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) in advanced breast carcinoma. *Cancer Res.* 59, 4681-4687.
292. Lucas, A., McFadden, G., 2004. Secreted immunomodulatory viral proteins as novel biotherapeutics. *J.Immunol.* 173, 4765-4774.
293. Luo, Y., Zhou, H., Krueger, J., Kaplan, C., Lee, S. H., Dolman, C., Markowitz, D., Wu, W., Liu, C., Reisfeld, R. A., Xiang, R., 2006. Targeting tumor-associated macrophages as a novel strategy against breast cancer. *J.Clin.Invest* 116, 2132-2141.
294. Luster, A. D., 2002. The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. *Curr.Opin.Immunol.* 14, 129-135.
295. Lutichau, H. R., Gerstoft, J., Schwartz, T. W., 2001. MC148 encoded by human molluscum contagiosum poxvirus is an antagonist for human but not murine CCR8. *J.Leukoc.Biol.* 70, 277-282.
296. Lutz, M. B., Schuler, G., 2002. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol.* 23, 445-449.
297. Mach, N., Gillessen, S., Wilson, S. B., Sheehan, C., Mihm, M., Dranoff, G., 2000a. Differences in dendritic cells stimulated *in vivo* by tumors engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or Flt3-ligand. *Cancer Res.* 60, 3239-3246.
298. Mach, N., Gillessen, S., Wilson, S. B., Sheehan, C., Mihm, M., Dranoff, G., 2000b. Differences in dendritic cells stimulated *in vivo* by tumors engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or Flt3-ligand. *Cancer Res.* 60, 3239-3246.
299. Mach, N., Gillessen, S., Wilson, S. B., Sheehan, C., Mihm, M., Dranoff, G., 2000c. Differences in dendritic cells stimulated *in vivo* by tumors engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or Flt3-ligand. *Cancer Res.* 60, 3239-3246.
300. Mackett, M., Smith, G. L., Moss, B., 1982. Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 79, 7415-7419.
301. Mackett, M., Smith, G. L., Moss, B., 1984. General method for production and selection of infectious vaccinia virus recombinants expressing foreign genes. *J.Virol.* 49, 857-864.



302. Mackova, J., Kutinova, L., Hainz, P., Krystofova, J., Sroller, V., Otahal, P., Gabriel, P., Nemeckova, S., 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.
303. Mackova, J., Stasikova, J., Kutinova, L., Masin, J., Hainz, P., Simsova, M., Gabriel, P., Sebo, P., Nemeckova, S., 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.
304. Mahalingam, S., Karupiah, G., 2000. Modulation of chemokines by poxvirus infections. *Curr.Opin.Immunol.* 12, 409-412.
305. Manes, S., Mira, E., Colomer, R., Montero, S., Real, L. M., Gomez-Mouton, C., Jimenez-Baranda, S., Garzon, A., Lacalle, R. A., Harshman, K., Ruiz, A., Martinez, A., 2003. CCR5 expression influences the progression of human breast cancer in a p53-dependent manner. *J.Exp.Med.* 198, 1381-1389.
306. Mann, A., Breuhahn, K., Schirmacher, P., Blessing, M., 2001. Keratinocyte-derived granulocyte-macrophage colony stimulating factor accelerates wound healing: Stimulation of keratinocyte proliferation, granulation tissue formation, and vascularization. *J.Invest Dermatol.* 117, 1382-1390.
307. Mantovani, A., 1999. Chemokines. Introduction and overview. *Chem.Immunol.* 72, 1-6.
308. Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., Balkwill, F., 2008. Cancer-related inflammation. *Nature* 454, 436-444.
309. Mantovani, A., Schioppa, T., Porta, C., Allavena, P., Sica, A., 2006a. Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 25, 315-322.
310. Mantovani, A., Schioppa, T., Porta, C., Allavena, P., Sica, A., 2006b. Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 25, 315-322.
311. Mantovani, A., Sica, A., Allavena, P., Garlanda, C., Locati, M., 2009. Tumor-associated macrophages and the related myeloid-derived suppressor cells as a paradigm of the diversity of macrophage activation. *Hum.Immunol.* 70, 325-330.
312. Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., Locati, M., 2004a. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25, 677-686.
313. Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., Sica, A., 2002a. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 23, 549-555.
314. Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., Sica, A., 2002b. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 23, 549-555.

315. Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Schioppa, T., Saccani, A., Allavena, P., Sica, A., 2004b. Infiltration of tumours by macrophages and dendritic cells: tumour-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Novartis.Found.Symp.* 256, 137-145.
316. Marigo, I., Dolcetti, L., Serafini, P., Zanovello, P., Bronte, V., 2008. Tumor-induced tolerance and immune suppression by myeloid derived suppressor cells. *Immunol.Rev.* 222, 162-179.
317. Marincola, F. M., Jaffee, E. M., Hicklin, D. J., Ferrone, S., 2000. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv.Immunol.* 74, 181-273.
318. Martinez, F. O., Helming, L., Gordon, S., 2009. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu.Rev.Immunol.* 27, 451-483.
319. Martinez, F. O., Sica, A., Mantovani, A., Locati, M., 2008. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci.* 13, 453-461.
320. Martinez-Pomares, L., Thompson, J. P., Moyer, R. W., 1995. Mapping and investigation of the role in pathogenesis of the major unique secreted 35-kDa protein of rabbitpox virus. *Virology* 206, 591-600.
321. Maruri-Avidal, L., Weisberg, A. S., Bisht, H., Moss, B., 2013. Analysis of viral membranes formed in cells infected by a vaccinia virus L2-deletion mutant suggests their origin from the endoplasmic reticulum. *J.Virol.* 87, 1861-1871.
322. Maslak, P. G., Dao, T., Krug, L. M., Chanel, S., Korontsvit, T., Zakhaleva, V., Zhang, R., Wolchok, J. D., Yuan, J., Pinilla-Ibarz, J., Berman, E., Weiss, M., Jurcic, J., Frattini, M. G., Scheinberg, D. A., 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.
323. Massung, R. F., Esposito, J. J., Liu, L. I., Qi, J., Utterback, T. R., Knight, J. C., Aubin, L., Yuran, T. E., Parsons, J. M., Loparev, V. N., ., 1993a. Potential virulence determinants in terminal regions of variola smallpox virus genome. *Nature* 366, 748-751.
324. Massung, R. F., Jayarama, V., Moyer, R. W., 1993b. DNA sequence analysis of conserved and unique regions of swinepox virus: identification of genetic elements supporting phenotypic observations including a novel G protein-coupled receptor homologue. *Virology* 197, 511-528.
325. Mastrangelo, M. J., Maguire, H. C., Jr., Eisenlohr, L. C., Laughlin, C. E., Monken, C. E., McCue, P. A., Kovatich, A. J., Lattime, E. C., 1999. Intratumoral recombinant GM-CSF-encoding virus as gene therapy in patients with cutaneous melanoma. *Cancer Gene Ther.* 6, 409-422.
326. Mayr, A., Stickl, H., Muller, H. K., Danner, K., Singer, H., 1978. [The smallpox vaccination strain MVA: marker, genetic structure, experience gained with the

- parenteral vaccination and behavior in organisms with a debilitated defence mechanism (author's transl)]. *Zentralbl.Bakteriol.B* 167, 375-390.
327. Mazibrada, J., Ritta, M., Mondini, M., De, A. M., Azzimonti, B., Borgogna, C., Ciotti, M., Orlando, A., Surico, N., Chiusa, L., Landolfo, S., Gariglio, M., 2008. Interaction between inflammation and angiogenesis during different stages of cervical carcinogenesis. *Gynecol.Oncol.* 108, 112-120.
  328. McCrae, M. A., Pennington, T. H., 1978. Specific secretion of polypeptides from cells infected with vaccinia virus. *J.Virol.* 28, 828-834.
  329. McFadden, G., Kelvin, D., 1997. New strategies for chemokine inhibition and modulation: you take the high road and I'll take the low road. *Biochem.Pharmacol.* 54, 1271-1280.
  330. Meiser, A., Sancho, C., Krijnse, L. J., 2003. Plasma membrane budding as an alternative release mechanism of the extracellular enveloped form of vaccinia virus from HeLa cells. *J.Virol.* 77, 9931-9942.
  331. Melchionda, F., Fry, T. J., Milliron, M. J., McKirdy, M. A., Tagaya, Y., Mackall, C. L., 2005. Adjuvant IL-7 or IL-15 overcomes immunodominance and improves survival of the CD8+ memory cell pool. *J.Clin.Invest* 115, 1177-1187.
  332. Melief, C. J., 2008a. Cancer immunotherapy by dendritic cells. *Immunity.* 29, 372-383.
  333. Melief, C. J., 2008b. Cancer immunotherapy by dendritic cells. *Immunity.* 29, 372-383.
  334. Meneguzzi, G., Kieny, M. P., Lecocq, J. P., Chambon, P., Cuzin, F., Lathe, R., 1990. Vaccinia recombinants expressing early bovine papilloma virus (BPV1) proteins: retardation of BPV1 tumour development. *Vaccine* 8, 199-204.
  335. Menke, A. L., van der Eb, A. J., Jochemsen, A. G., 1998. The Wilms' tumor 1 gene: oncogene or tumor suppressor gene? *Int.Rev.Cytol.* 181, 151-212.
  336. Menssen, H. D., Renkl, H. J., Rodeck, U., Maurer, J., Notter, M., Schwartz, S., Reinhardt, R., Thiel, E., 1995. Presence of Wilms' tumor gene (wt1) transcripts and the WT1 nuclear protein in the majority of human acute leukemias. *Leukemia* 9, 1060-1067.
  337. Mercer, J., Helenius, A., 2008. Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science* 320, 531-535.
  338. Mercer, J., Knebel, S., Schmidt, F. I., Crouse, J., Burkard, C., Helenius, A., 2010. Vaccinia virus strains use distinct forms of macropinocytosis for host-cell entry. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 107, 9346-9351.
  339. Mitsuhashi, A., Suzuka, K., Yamazawa, K., Matsui, H., Seki, K., Sekiya, S., 2005. Serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-C levels as tumor markers in patients with cervical carcinoma. *Cancer* 103, 724-730.

340. Miyatake, T., Ueda, Y., Morimoto, A., Enomoto, T., Nishida, S., Shirakata, T., Oka, Y., Tsuboi, A., Oji, Y., Hosen, N., Nakatsuka, S., Morita, S., Sakamoto, J., Sugiyama, H., Kimura, T., 2013. WT1 peptide immunotherapy for gynecologic malignancies resistant to conventional therapies: a phase II trial. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.* 139, 457-463.
341. Monti, P., Leone, B. E., Marchesi, F., Balzano, G., Zerbi, A., Scaltrini, F., Pasquali, C., Calori, G., Pessi, F., Sperti, C., Di, C., V, Allavena, P., Piemonti, L., 2003. The CC chemokine MCP-1/CCL2 in pancreatic cancer progression: regulation of expression and potential mechanisms of antimalignant activity. *Cancer Res.* 63, 7451-7461.
342. Morgan, C., 1976. The insertion of DNA into vaccinia virus. *Science* 193, 591-592.
343. Morita, S., Oka, Y., Tsuboi, A., Kawakami, M., Maruno, M., Izumoto, S., Osaki, T., Taguchi, T., Ueda, T., Myoui, A., Nishida, S., Shirakata, T., Ohno, S., Oji, Y., Aozasa, K., Hatazawa, J., Udaka, K., Yoshikawa, H., Yoshimine, T., Noguchi, S., Kawase, I., Nakatsuka, S., Sugiyama, H., Sakamoto, J., 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.
344. Morrissey, P. J., Bressler, L., Park, L. S., Alpert, A., Gillis, S., 1987. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augments the primary antibody response by enhancing the function of antigen-presenting cells. *J.Immunol.* 139, 1113-1119.
345. Moser, B., Wolf, M., Walz, A., Loetscher, P., 2004. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol.* 25, 75-84.
- 346.
- 347.
- 348.
349. Moss, B., 1996. Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93, 11341-11348.
- 350.
351. Moss, B., 2011. Smallpox vaccines: targets of protective immunity. *Immunol.Rev.* 239, 8-26.
352. Moss, B., Rosenblum, E. N., 1973. Letter: Protein cleavage and poxvirus morphogenesis: tryptic peptide analysis of core precursors accumulated by blocking assembly with rifampicin. *J.Mol.Biol.* 81, 267-269.
353. Moss, B., Shisler, J. L., 2001. Immunology 101 at poxvirus U: immune evasion genes. *Semin.Immunol.* 13, 59-66.
354. Mossman, K., Nation, P., Macen, J., Garbutt, M., Lucas, A., McFadden, G., 1996. Myxoma virus M-T7, a secreted homolog of the interferon-gamma receptor, is a

- critical virulence factor for the development of myxomatosis in European rabbits. *Virology* 215, 17-30.
355. Mossman, K., Upton, C., McFadden, G., 1995. The myxoma virus-soluble interferon-gamma receptor homolog, M-T7, inhibits interferon-gamma in a species-specific manner. *J.Biol.Chem.* 270, 3031-3038.
  356. Moyer, R. W., Graves, R. L., 1981. The mechanism of cytoplasmic orthopoxvirus DNA replication. *Cell* 27, 391-401.
  357. Mukaida, N., Baba, T., 2012. Chemokines in tumor development and progression. *Exp.Cell Res.* 318, 95-102.
  358. Muller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M. E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S. N., Barrera, J. L., Mohar, A., Verastegui, E., Zlotnik, A., 2001. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410, 50-56.
  359. Murakami, T., Cardones, A. R., Finkelstein, S. E., Restifo, N. P., Klaunberg, B. A., Nestle, F. O., Castillo, S. S., Dennis, P. A., Hwang, S. T., 2003. Immune evasion by murine melanoma mediated through CC chemokine receptor-10. *J.Exp.Med.* 198, 1337-1347.
  360. Murdoch, C., Giannoudis, A., Lewis, C. E., 2004. Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood* 104, 2224-2234.
  361. Murphy, P. M., 2000. Viral antichemokines: from pathogenesis to drug discovery. *J.Clin.Invest* 105, 1515-1517.
  362. Murphy, P. M., 2001. Viral exploitation and subversion of the immune system through chemokine mimicry. *Nat.Immunol.* 2, 116-122.
  363. Nair, R. E., Kilinc, M. O., Jones, S. A., Egilmez, N. K., 2006. Chronic immune therapy induces a progressive increase in intratumoral T suppressor activity and a concurrent loss of tumor-specific CD8+ T effectors in her-2/neu transgenic mice bearing advanced spontaneous tumors. *J.Immunol.* 176, 7325-7334.
  364. Nair, S. K., 1998. Immunotherapy of cancer with dendritic cell-based vaccines. *Gene Ther.* 5, 1445-1446.
  365. Nakatsuka, S., Oji, Y., Horiuchi, T., Kanda, T., Kitagawa, M., Takeuchi, T., Kawano, K., Kuwae, Y., Yamauchi, A., Okumura, M., Kitamura, Y., Oka, Y., Kawase, I., Sugiyama, H., Aozasa, K., 2006. Immunohistochemical detection of WT1 protein in a variety of cancer cells. *Mod.Pathol.* 19, 804-814.
  366. Nam, J. S., Kang, M. J., Suchar, A. M., Shimamura, T., Kohn, E. A., Michalowska, A. M., Jordan, V. C., Hirohashi, S., Wakefield, L. M., 2006. Chemokine (C-C motif) ligand 2 mediates the prometastatic effect of dysadherin in human breast cancer cells. *Cancer Res.* 66, 7176-7184.

367. Napolitani, G., Rinaldi, A., Bertonni, F., Sallusto, F., Lanzavecchia, A., 2005. Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat.Immunol.* 6, 769-776.
368. Nash, P., Barrett, J., Cao, J. X., Hota-Mitchell, S., Lalani, A. S., Everett, H., Xu, X. M., Robichaud, J., Hnatiuk, S., Ainslie, C., Seet, B. T., McFadden, G., 1999. Immunomodulation by viruses: the myxoma virus story. *Immunol.Rev.* 168, 103-120.
369. Negus, R. P., Stamp, G. W., Relf, M. G., Burke, F., Malik, S. T., Bernasconi, S., Allavena, P., Sozzani, S., Mantovani, A., Balkwill, F. R., 1995. The detection and localization of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in human ovarian cancer. *J.Clin.Invest* 95, 2391-2396.
370. Nelson, P. J., Krensky, A. M., 2001. Chemokines, chemokine receptors, and allograft rejection. *Immunity.* 14, 377-386.
371. Nemeckova, S., Stranska, R., Subrtova, J., Kutinova, L., Otahal, P., Hainz, P., Maresova, L., Sroller, V., Hamsikova, E., Vonka, V., 2002. Immune response to E7 protein of human papillomavirus type 16 anchored on the cell surface. *Cancer Immunol.Immunother.* 51, 111-119.
372. Nemunaitis, J., Stermann, D., Jablons, D., Smith, J. W., Fox, B., Maples, P., Hamilton, S., Borellini, F., Lin, A., Morali, S., Hege, K., 2004. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene-modified autologous tumor vaccines in non-small-cell lung cancer. *J.Natl.Cancer Inst.* 96, 326-331.
373. Nesbit, M., Schaidler, H., Miller, T. H., Herlyn, M., 2001. Low-level monocyte chemoattractant protein-1 stimulation of monocytes leads to tumor formation in nontumorigenic melanoma cells. *J.Immunol.* 166, 6483-6490.
374. Ng, A., Tschärke, D. C., Reading, P. C., Smith, G. L., 2001. The vaccinia virus A41L protein is a soluble 30 kDa glycoprotein that affects virus virulence. *J.Gen.Virol.* 82, 2095-2105.
375. Nicoli, P., Defilippi, I., Carturan, S., Roetto, A., Messa, F., Arruga, F., Messa, E., Rotolo, A., Iacobucci, I., Bracco, E., Saglio, G., Cilloni, D., 2008. Detection of humoral immune responses against WT1 antigen in patients affected by different hematological malignancies. *Acta Haematol.* 120, 47-50.
376. Novoa, R. R., Calderita, G., Arranz, R., Fontana, J., Granzow, H., Risco, C., 2005. Virus factories: associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis. *Biol.Cell* 97, 147-172.
377. Oh, S., Perera, L. P., Terabe, M., Ni, L., Waldmann, T. A., Berzofsky, J. A., 2008. IL-15 as a mediator of CD4+ help for CD8+ T cell longevity and avoidance of TRAIL-mediated apoptosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 105, 5201-5206.
378. Ohminami, H., Yasukawa, M., Fujita, S., 2000. HLA class I-restricted lysis of leukemia cells by a CD8(+) cytotoxic T-lymphocyte clone specific for WT1 peptide. *Blood* 95, 286-293.

379. Ohno, S., Kyo, S., Myojo, S., Dohi, S., Ishizaki, J., Miyamoto, K., Morita, S., Sakamoto, J., Enomoto, T., Kimura, T., Oka, Y., Tsuboi, A., Sugiyama, H., Inoue, M., 2009. Wilms' tumor 1 (WT1) peptide immunotherapy for gynecological malignancy. *Anticancer Res.* 29, 4779-4784.
380. Ohta, M., Kitadai, Y., Tanaka, S., Yoshihara, M., Yasui, W., Mukaida, N., Haruma, K., Chayama, K., 2002. Monocyte chemoattractant protein-1 expression correlates with macrophage infiltration and tumor vascularity in human esophageal squamous cell carcinomas. *Int.J.Cancer* 102, 220-224.
381. Oji, Y., Ogawa, H., Tamaki, H., Oka, Y., Tsuboi, A., Kim, E. H., Soma, T., Tatekawa, T., Kawakami, M., Asada, M., Kishimoto, T., Sugiyama, H., 1999. Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in solid tumors and its involvement in tumor cell growth. *Jpn.J.Cancer Res.* 90, 194-204.
382. Oji, Y., Oka, Y., Nishida, S., Tsuboi, A., Kawakami, M., Shirakata, T., Takahashi, K., Murao, A., Nakajima, H., Narita, M., Takahashi, M., Morita, S., Sakamoto, J., Tanaka, T., Kawase, I., Hosen, N., Sugiyama, H., 2010. WT1 peptide vaccine induces reduction in minimal residual disease in an Imatinib-treated CML patient. *Eur.J.Haematol.* 85, 358-360.
383. Oka, Y., Elisseeva, O. A., Tsuboi, A., Ogawa, H., Tamaki, H., Li, H., Oji, Y., Kim, E. H., Soma, T., Asada, M., Ueda, K., Maruya, E., Saji, H., Kishimoto, T., Udaka, K., Sugiyama, H., 2000. Human cytotoxic T-lymphocyte responses specific for peptides of the wild-type Wilms' tumor gene (WT1 ) product. *Immunogenetics* 51, 99-107.
384. Okada, T., Cyster, J. G., 2007. CC chemokine receptor 7 contributes to Gi-dependent T cell motility in the lymph node. *J.Immunol.* 178, 2973-2978.
385. Oo, Y. H., Adams, D. H., 2010. The role of chemokines in the recruitment of lymphocytes to the liver. *J.Autoimmun.* 34, 45-54.
386. Orange, J. S., Fassett, M. S., Koopman, L. A., Boyson, J. E., Strominger, J. L., 2002. Viral evasion of natural killer cells. *Nat.Immunol.* 3, 1006-1012.
387. Osaka, M., Koami, K., Sugiyama, T., 1997. WT1 contributes to leukemogenesis: expression patterns in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced leukemia. *Int.J.Cancer* 72, 696-699.
388. Palena, C., Abrams, S. I., Schlom, J., Hodge, J. W., 2006. Cancer vaccines: preclinical studies and novel strategies. *Adv.Cancer Res.* 95, 115-145.
389. Palena, C., Schlom, J., 2010. Vaccines against human carcinomas: strategies to improve antitumor immune responses. *J.Biomed.Biotechnol.* 2010, 380697.
390. Palucka, K., Ueno, H., Roberts, L., Fay, J., Banchereau, J., 2011. Dendritic cell subsets as vectors and targets for improved cancer therapy. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 344, 173-192.

391. Pan, P. Y., Li, Y., Li, Q., Gu, P., Martinet, O., Thung, S., Chen, S. H., 2004. In situ recruitment of antigen-presenting cells by intratumoral GM-CSF gene delivery. *Cancer Immunol.Immunother.* 53, 17-25.
392. Pandolfi, F., Cianci, R., Pagliari, D., Casciano, F., Bagala, C., Astone, A., Landolfi, R., Barone, C., 2011. The immune response to tumors as a tool toward immunotherapy. *Clin.Dev.Immunol.* 2011, 894704.
393. Panicali, D., Davis, S. W., Weinberg, R. L., Paoletti, E., 1983. Construction of live vaccines by using genetically engineered poxviruses: biological activity of recombinant vaccinia virus expressing influenza virus hemagglutinin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 80, 5364-5368.
394. Paoletti, E., 1996. Applications of pox virus vectors to vaccination: an update. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93, 11349-11353.
395. Paoletti, E., Lipinskas, B. R., Samsonoff, C., Mercer, S., Panicali, D., 1984. Construction of live vaccines using genetically engineered poxviruses: biological activity of vaccinia virus recombinants expressing the hepatitis B virus surface antigen and the herpes simplex virus glycoprotein D. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 81, 193-197.
396. Pardoll, D., 2003. Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu.Rev.Immunol.* 21, 807-839.
397. Pardoll, D. M., 2012. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat.Rev.Cancer* 12, 252-264.
398. Pardoll, D. M., Topalian, S. L., 1998. The role of CD4+ T cell responses in antitumor immunity. *Curr.Opin.Immunol.* 10, 588-594.
399. Parmiani, G., Castelli, C., Pilla, L., Santinami, M., Colombo, M. P., Rivoltini, L., 2007. Opposite immune functions of GM-CSF administered as vaccine adjuvant in cancer patients. *Ann.Oncol.* 18, 226-232.
400. Parry, C. M., Simas, J. P., Smith, V. P., Stewart, C. A., Minson, A. C., Efstathiou, S., Alcami, A., 2000. A broad spectrum secreted chemokine binding protein encoded by a herpesvirus. *J.Exp.Med.* 191, 573-578.
401. Pastoret, P. P., Vanderplasschen, A., 2003. Poxviruses as vaccine vectors. *Comp Immunol.Microbiol.Infect.Dis.* 26, 343-355.
402. Patel, A. H., Gaffney, D. F., Subak-Sharpe, J. H., Stow, N. D., 1990. DNA sequence of the gene encoding a major secreted protein of vaccinia virus, strain Lister. *J.Gen.Virol.* 71 ( Pt 9), 2013-2021.
403. Payne, L. G., 1980. Significance of extracellular enveloped virus in the *in vitro* and *in vivo* dissemination of vaccinia. *J.Gen.Virol.* 50, 89-100.
404. Pease, J. E., Horuk, R., 2009. Chemokine receptor antagonists: Part 1. *Expert.Opin.Ther.Pat* 19, 39-58.



405. Pease, J. E., Williams, T. J., 2001. Eotaxin and asthma. *Curr.Opin.Pharmacol.* 1, 248-253.
406. Peng, L., Shu, S., Krauss, J. C., 1997. Monocyte chemoattractant protein inhibits the generation of tumor-reactive T cells. *Cancer Res.* 57, 4849-4854.
407. Perdiguero, B., Esteban, M., 2009. The interferon system and vaccinia virus evasion mechanisms. *J.Interferon Cytokine Res.* 29, 581-598.
408. Perera, L. P., Goldman, C. K., Waldmann, T. A., 2001. Comparative assessment of virulence of recombinant vaccinia viruses expressing IL-2 and IL-15 in immunodeficient mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 5146-5151.
409. Perera, L. P., Waldmann, T. A., Mosca, J. D., Baldwin, N., Berzofsky, J. A., Oh, S. K., 2007. Development of smallpox vaccine candidates with integrated interleukin-15 that demonstrate superior immunogenicity, efficacy, and safety in mice. *J.Virol.* 81, 8774-8783.
410. Perkus, M. E., Panicali, D., Mercer, S., Paoletti, E., 1986. Insertion and deletion mutants of vaccinia virus. *Virology* 152, 285-297.
411. Petrackova, M., Stanek, L., Mandys, V., Dundr, P., Vonka, V., 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.
412. Petrella, T., Quirt, I., Verma, S., Haynes, A. E., Charette, M., Bak, K., 2007. Single-agent interleukin-2 in the treatment of metastatic melanoma: a systematic review. *Cancer Treat.Rev.* 33, 484-496.
413. Pickup, D. J., 2007. Understanding orthopoxvirus interference with host immune responses to inform novel vaccine design. *Expert.Rev.Vaccines.* 6, 87-95.
414. Piersma, S. J., 2011. Immunosuppressive tumor microenvironment in cervical cancer patients. *Cancer Microenviron.* 4, 361-375.
415. Piersma, S. J., Jordanova, E. S., van Poelgeest, M. I., Kwappenberg, K. M., van der Hulst, J. M., Drijfhout, J. W., Melief, C. J., Kenter, G. G., Fleuren, G. J., Offringa, R., van der Burg, S. H., 2007. High number of intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes is associated with the absence of lymph node metastases in patients with large early-stage cervical cancer. *Cancer Res.* 67, 354-361.
416. Pollard, J. W., 2004. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat.Rev.Cancer* 4, 71-78.
417. Proudfoot, A. E., Power, C. A., Wells, T. N., 2000. The strategy of blocking the chemokine system to combat disease. *Immunol.Rev.* 177, 246-256.
418. Pulendran, B., 2004. Modulating vaccine responses with dendritic cells and Toll-like receptors. *Immunol.Rev.* 199, 227-250.

419. Punnonen, R., Teisala, K., Kuoppala, T., Bennett, B., Punnonen, J., 1998. Cytokine production profiles in the peritoneal fluids of patients with malignant or benign gynecologic tumors. *Cancer* 83, 788-796.
420. Qian, B. Z., Li, J., Zhang, H., Kitamura, T., Zhang, J., Campion, L. R., Kaiser, E. A., Snyder, L. A., Pollard, J. W., 2011. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* 475, 222-225.
421. Quezada, S. A., Simpson, T. R., Peggs, K. S., Merghoub, T., Vider, J., Fan, X., Blasberg, R., Yagita, H., Muranski, P., Antony, P. A., Restifo, N. P., Allison, J. P., 2010. Tumor-reactive CD4(+) T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. *J.Exp.Med.* 207, 637-650.
422. R Ian Freshney, 2005. *Culture of Animal Cells*. John Wiley & Sons, Inc..
423. Rahbar, R., Murooka, T. T., Fish, E. N., 2009. Role for CCR5 in dissemination of vaccinia virus *in vivo*. *J.Virol.* 83, 2226-2236.
424. Rahbar, R., Murooka, T. T., Hinek, A. A., Galligan, C. L., Sassano, A., Yu, C., Srivastava, K., Plataniias, L. C., Fish, E. N., 2006. Vaccinia virus activation of CCR5 invokes tyrosine phosphorylation signaling events that support virus replication. *J.Virol.* 80, 7245-7259.
425. Reading, P. C., Moore, J. B., Smith, G. L., 2003a. Steroid hormone synthesis by vaccinia virus suppresses the inflammatory response to infection. *J.Exp.Med.* 197, 1269-1278.
426. Reading, P. C., Smith, G. L., 2003. Vaccinia virus interleukin-18-binding protein promotes virulence by reducing gamma interferon production and natural killer and T-cell activity. *J.Virol.* 77, 9960-9968.
427. Reading, P. C., Symons, J. A., Smith, G. L., 2003b. A soluble chemokine-binding protein from vaccinia virus reduces virus virulence and the inflammatory response to infection. *J.Immunol.* 170, 1435-1442.
428. Reading, P. C., Symons, J. A., Smith, G. L., 2003c. A soluble chemokine-binding protein from vaccinia virus reduces virus virulence and the inflammatory response to infection. *J.Immunol.* 170, 1435-1442.
429. Rezvani, K., Brenchley, J. M., Price, D. A., Kilical, Y., Gostick, E., Sewell, A. K., Li, J., Mielke, S., Douek, D. C., Barrett, A. J., 2005. 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.* 11, 8799-8807.
430. Rietdorf, J., Ploubidou, A., Reckmann, I., Holmstrom, A., Frischknecht, F., Zettl, M., Zimmermann, T., Way, M., 2001. Kinesin-dependent movement on microtubules precedes actin-based motility of vaccinia virus. *Nat.Cell Biol.* 3, 992-1000.

431. Riethdorf, L., Riethdorf, S., Gutzlaff, K., Prall, F., Loning, T., 1996. Differential expression of the monocyte chemoattractant protein-1 gene in human papillomavirus-16-infected squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinomas of the cervix uteri. *Am.J.Pathol.* 149, 1469-1476.
432. Rittich, S., Duskova, M., Mackova, J., Pokorna, D., Jinoch, P., Smahel, M., 2005a. Combined immunization with DNA and transduced tumor cells expressing mouse GM-CSF or IL-2. *Oncol.Rep.* 13, 311-317.
433. Rittich, S., Duskova, M., Mackova, J., Pokorna, D., Jinoch, P., Smahel, M., 2005b. Combined immunization with DNA and transduced tumor cells expressing mouse GM-CSF or IL-2. *Oncol.Rep.* 13, 311-317.
434. Roberts, K. L., Smith, G. L., 2008. Vaccinia virus morphogenesis and dissemination. *Trends Microbiol.* 16, 472-479.
435. Robinson, S. C., Scott, K. A., Wilson, J. L., Thompson, R. G., Proudfoot, A. E., Balkwill, F. R., 2003. A chemokine receptor antagonist inhibits experimental breast tumor growth. *Cancer Res.* 63, 8360-8365.
436. Rosenberg, S. A., Yang, J. C., Restifo, N. P., 2004. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat.Med.* 10, 909-915.
437. Rosenkilde, M. M., Waldhoer, M., Luttichau, H. R., Schwartz, T. W., 2001. Virally encoded 7TM receptors. *Oncogene* 20, 1582-1593.
438. Rosenstein, M., Ettinghausen, S. E., Rosenberg, S. A., 1986. Extravasation of intravascular fluid mediated by the systemic administration of recombinant interleukin 2. *J.Immunol.* 137, 1735-1742.
439. Rothenberg, M. E., Zimmermann, N., Mishra, A., Brandt, E., Birkenberger, L. A., Hogan, S. P., Foster, P. S., 1999. Chemokines and chemokine receptors: their role in allergic airway disease. *J.Clin.Immunol.* 19, 250-265.
440. Ruiz-Arguello, M. B., Smith, V. P., Campanella, G. S., Baleux, F., Arenzana-Seisdedos, F., Luster, A. D., Alcami, A., 2008. An ectromelia virus protein that interacts with chemokines through their glycosaminoglycan binding domain. *J.Virol.* 82, 917-926.
441. Salcedo, R., Ponce, M. L., Young, H. A., Wasserman, K., Ward, J. M., Kleinman, H. K., Oppenheim, J. J., Murphy, W. J., 2000a. Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood* 96, 34-40.
442. Salcedo, R., Ponce, M. L., Young, H. A., Wasserman, K., Ward, J. M., Kleinman, H. K., Oppenheim, J. J., Murphy, W. J., 2000b. Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood* 96, 34-40.
443. Salcedo, R., Young, H. A., Ponce, M. L., Ward, J. M., Kleinman, H. K., Murphy, W. J., Oppenheim, J. J., 2001. Eotaxin (CCL11) induces *in vivo* angiogenic responses by human CCR3+ endothelial cells. *J.Immunol.* 166, 7571-7578.

444. Sallusto, F., Lanzavecchia, A., 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J.Exp.Med.* 179, 1109-1118.
445. Sanderson, C. M., Hollinshead, M., Smith, G. L., 2000. The vaccinia virus A27L protein is needed for the microtubule-dependent transport of intracellular mature virus particles. *J.Gen.Virol.* 81, 47-58.
446. Sanderson, C. M., Way, M., Smith, G. L., 1998. Virus-induced cell motility. *J.Virol.* 72, 1235-1243.
447. Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 74, 5463-5467.
448. Sato, N., Patel, H. J., Waldmann, T. A., Tagaya, Y., 2007. The IL-15/IL-15Ralpha on cell surfaces enables sustained IL-15 activity and contributes to the long survival of CD8 memory T cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 104, 588-593.
449. Sawanobori, Y., Ueha, S., Kurachi, M., Shimaoka, T., Talmadge, J. E., Abe, J., Shono, Y., Kitabatake, M., Kakimi, K., Mukaida, N., Matsushima, K., 2008. Chemokine-mediated rapid turnover of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Blood* 111, 5457-5466.
450. Scheibenbogen, C., Schmittel, A., Keilholz, U., Allgauer, T., Hofmann, U., Max, R., Thiel, E., Schadendorf, D., 2000. Phase 2 trial of vaccination with tyrosinase peptides and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with metastatic melanoma. *J.Immunother.* 23, 275-281.
451. Schmelz, M., Sodeik, B., Ericsson, M., Wolffe, E. J., Shida, H., Hiller, G., Griffiths, G., 1994. Assembly of vaccinia virus: the second wrapping cisterna is derived from the trans Golgi network. *J.Virol.* 68, 130-147.
452. Schmidt, F. I., Bleck, C. K., Mercer, J., 2012. Poxvirus host cell entry. *Curr.Opin.Virol.* 2, 20-27.
453. Schoppmann, S. F., Birner, P., Stockl, J., Kalt, R., Ullrich, R., Caucig, C., Kriehuber, E., Nagy, K., Alitalo, K., Kerjaschki, D., 2002. Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. *Am.J.Pathol.* 161, 947-956.
454. Scott, M. E., Ma, Y., Kuzmich, L., Moscicki, A. B., 2009. Diminished IFN-gamma and IL-10 and elevated Foxp3 mRNA expression in the cervix are associated with CIN 2 or 3. *Int.J.Cancer* 124, 1379-1383.
455. Sealy, R., Slobod, K. S., Flynn, P., Branum, K., Surman, S., Jones, B., Freiden, P., Lockey, T., Howlett, N., Hurwitz, J. L., 2009. Preclinical and clinical development of a multi-envelope, DNA-virus-protein (D-V-P) HIV-1 vaccine. *Int.Rev.Immunol.* 28, 49-68.

456. Seet, B. T., Singh, R., Paavola, C., Lau, E. K., Handel, T. M., McFadden, G., 2001. Molecular determinants for CC-chemokine recognition by a poxvirus CC-chemokine inhibitor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 9008-9013.
457. Senkevich, T. G., Ojeda, S., Townsley, A., Nelson, G. E., Moss, B., 2005. Poxvirus multiprotein entry-fusion complex. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102, 18572-18577.
458. Senkevich, T. G., White, C. L., Koonin, E. V., Moss, B., 2002. Complete pathway for protein disulfide bond formation encoded by poxviruses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99, 6667-6672.
459. Serafini, P., Carbley, R., Noonan, K. A., Tan, G., Bronte, V., Borrello, I., 2004a. High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells. *Cancer Res.* 64, 6337-6343.
460. Serafini, P., Carbley, R., Noonan, K. A., Tan, G., Bronte, V., Borrello, I., 2004b. High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells. *Cancer Res.* 64, 6337-6343.
461. Serafini, P., Carbley, R., Noonan, K. A., Tan, G., Bronte, V., Borrello, I., 2004c. High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells. *Cancer Res.* 64, 6337-6343.
462. Shi, Y., Liu, C. H., Roberts, A. I., Das, J., Xu, G., Ren, G., Zhang, Y., Zhang, L., Yuan, Z. R., Tan, H. S., Das, G., Devadas, S., 2006. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: what we do and don't know. *Cell Res.* 16, 126-133.
463. Shurin, M. R., Shurin, G. V., Lokshin, A., Yurkovetsky, Z. R., Gutkin, D. W., Chatta, G., Zhong, H., Han, B., Ferris, R. L., 2006. Intratumoral cytokines/chemokines/growth factors and tumor infiltrating dendritic cells: friends or enemies? *Cancer Metastasis Rev.* 25, 333-356.
464. Sica, A., Bronte, V., 2007. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *J.Clin.Invest* 117, 1155-1166.
465. Sica, A., Sacconi, A., Bottazzi, B., Polentarutti, N., Vecchi, A., van, D. J., Mantovani, A., 2000. Autocrine production of IL-10 mediates defective IL-12 production and NF-kappa B activation in tumor-associated macrophages. *J.Immunol.* 164, 762-767.
466. Sica, A., Schioppa, T., Mantovani, A., Allavena, P., 2006a. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur.J.Cancer* 42, 717-727.
467. Sica, A., Schioppa, T., Mantovani, A., Allavena, P., 2006b. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur.J.Cancer* 42, 717-727.

468. Simmons, S. J., Tjoa, B. A., Rogers, M., Elgamal, A., Kenny, G. M., Ragde, H., Troychak, M. J., Boynton, A. L., Murphy, G. P., 1999. GM-CSF as a systemic adjuvant in a phase II prostate cancer vaccine trial. *Prostate* 39, 291-297.
469. Singh, S., Singh, R., Sharma, P. K., Singh, U. P., Rai, S. N., Chung, L. W., Cooper, C. R., Novakovic, K. R., Grizzle, W. E., Lillard, J. W., Jr., 2009. Serum CXCL13 positively correlates with prostatic disease, prostate-specific antigen and mediates prostate cancer cell invasion, integrin clustering and cell adhesion. *Cancer Lett.* 283, 29-35.
470. Sinha, P., Clements, V. K., Ostrand-Rosenberg, S., 2005. Reduction of myeloid-derived suppressor cells and induction of M1 macrophages facilitate the rejection of established metastatic disease. *J.Immunol.* 174, 636-645.
471. Siveen, K. S., Kuttan, G., 2009. Role of macrophages in tumour progression. *Immunol.Lett.* 123, 97-102.
472. Slingluff, C. L., Jr., Petroni, G. R., Yamshchikov, G. V., Barnd, D. L., Eastham, S., Galavotti, H., Patterson, J. W., Deacon, D. H., Hibbitts, S., Teates, D., Neese, P. Y., Grosh, W. W., Chianese-Bullock, K. A., Woodson, E. M., Wiernasz, C. J., Merrill, P., Gibson, J., Ross, M., Engelhard, V. H., 2003. Clinical and immunologic results of a randomized phase II trial of vaccination using four melanoma peptides either administered in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in adjuvant or pulsed on dendritic cells. *J.Clin.Oncol.* 21, 4016-4026.
473. Slingluff, C. L., Jr., Speiser, D. E., 2005. Progress and controversies in developing cancer vaccines. *J.Transl.Med.* 3, 18.
474. Smahel, M., Pokorna, D., Mackova, J., Vlasak, J., 2004. Enhancement of immunogenicity of HPV16 E7 oncogene by fusion with *E. coli* beta-glucuronidase. *J.Gene Med.* 6, 1092-1101.
475. Smahel, M., Sima, P., Ludvikova, V., Marinov, I., Pokorna, D., Vonka, V., 2003. Immunisation with modified HPV16 E7 genes against mouse oncogenic TC-1 cell sublines with downregulated expression of MHC class I molecules. *Vaccine* 21, 1125-1136.
476. Smahel, M., Sima, P., Ludvikova, V., Vonka, V., 2001. Modified HPV16 E7 Genes as DNA Vaccine against E7-Containing Oncogenic Cells. *Virology* 281, 231-238.
477. Small, E. J., Sacks, N., Nemunaitis, J., Urba, W. J., Dula, E., Centeno, A. S., Nelson, W. G., Ando, D., Howard, C., Borellini, F., Nguyen, M., Hege, K., Simons, J. W., 2007. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor--secreting allogeneic cellular immunotherapy for hormone-refractory prostate cancer. *Clin.Cancer Res.* 13, 3883-3891.
478. Small, E. J., Schellhammer, P. F., Higano, C. S., Redfern, C. H., Nemunaitis, J. J., Valone, F. H., Verjee, S. S., Jones, L. A., Hershberg, R. M., 2006. Placebo-controlled phase III trial of immunologic therapy with sipuleucel-T (APC8015) in patients with metastatic, asymptomatic hormone refractory prostate cancer. *J.Clin.Oncol.* 24, 3089-3094.

479. Smith, C. A., Smith, T. D., Smolak, P. J., Friend, D., Hagen, H., Gerhart, M., Park, L., Pickup, D. J., Torrance, D., Mohler, K., Schooley, K., Goodwin, R. G., 1997a. Poxvirus genomes encode a secreted, soluble protein that preferentially inhibits beta chemokine activity yet lacks sequence homology to known chemokine receptors. *Virology* 236, 316-327.
480. Smith, C. A., Smith, T. D., Smolak, P. J., Friend, D., Hagen, H., Gerhart, M., Park, L., Pickup, D. J., Torrance, D., Mohler, K., Schooley, K., Goodwin, R. G., 1997b. Poxvirus genomes encode a secreted, soluble protein that preferentially inhibits beta chemokine activity yet lacks sequence homology to known chemokine receptors. *Virology* 236, 316-327.
481. Smith, G. L., Murphy, B. J., Law, M., 2003. Vaccinia virus motility. *Annu.Rev.Microbiol.* 57, 323-342.
482. Smith, G. L., Murphy, B. R., Moss, B., 1983. Construction and characterization of an infectious vaccinia virus recombinant that expresses the influenza hemagglutinin gene and induces resistance to influenza virus infection in hamsters. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 80, 7155-7159.
483. Smith, G. L., Symons, J. A., Khanna, A., Vanderplasschen, A., Alcami, A., 1997c. Vaccinia virus immune evasion. *Immunol.Rev.* 159, 137-154.
484. Smith, G. L., Vanderplasschen, A., Law, M., 2002a. The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus. *J.Gen.Virol.* 83, 2915-2931.
485. Smith, G. L., Vanderplasschen, A., Law, M., 2002b. The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus. *J.Gen.Virol.* 83, 2915-2931.
486. Smith, V. P., Alcami, A., 2000. Expression of secreted cytokine and chemokine inhibitors by ectromelia virus. *J.Virol.* 74, 8460-8471.
487. Soiffer, R., Lynch, T., Mihm, M., Jung, K., Rhuda, C., Schmollinger, J. C., Hodi, F. S., Liebster, L., Lam, P., Mentzer, S., Singer, S., Tanabe, K. K., Cosimi, A. B., Duda, R., Sober, A., Bhan, A., Daley, J., Neuberger, D., Parry, G., Rokovich, J., Richards, L., Drayer, J., Berns, A., Clift, S., Cohen, L. K., Mulligan, R. C., Dranoff, G., 1998. Vaccination with irradiated autologous melanoma cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor generates potent antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 13141-13146.
488. Solinas, G., Germano, G., Mantovani, A., Allavena, P., 2009a. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J.Leukoc.Biol.* 86, 1065-1073.
489. Solinas, G., Germano, G., Mantovani, A., Allavena, P., 2009b. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J.Leukoc.Biol.* 86, 1065-1073.
490. Somogyi, P., Frazier, J., Skinner, M. A., 1993. Fowlpox virus host range restriction: gene expression, DNA replication, and morphogenesis in nonpermissive mammalian cells. *Virology* 197, 439-444.

491. Son, K. N., Hwang, J., Kwon, B. S., Kim, J., 2006. Human CC chemokine CCL23 enhances expression of matrix metalloproteinase-2 and invasion of vascular endothelial cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 340, 498-504.
492. Soria, G., Yaal-Hahoshen, N., Azenshtein, E., Shina, S., Leider-Trejo, L., Ryvo, L., Cohen-Hillel, E., Shtabsky, A., Ehrlich, M., Meshel, T., Keydar, I., Ben-Baruch, A., 2008. Concomitant expression of the chemokines RANTES and MCP-1 in human breast cancer: a basis for tumor-promoting interactions. *Cytokine* 44, 191-200.
493. Staib, C., Kisling, S., Erfle, V., Sutter, G., 2005. Inactivation of the viral interleukin 1beta receptor improves CD8+ T-cell memory responses elicited upon immunization with modified vaccinia virus Ankara. *J.Gen.Virol.* 86, 1997-2006.
494. Steinman, R. M., Banchereau, J., 2007. Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 449, 419-426.
495. Stormes, K. A., Lemken, C. A., Lepre, J. V., Marinucci, M. N., Kurt, R. A., 2005. Inhibition of metastasis by inhibition of tumor-derived CCL5. *Breast Cancer Res.Treat.* 89, 209-212.
496. Stoutenburg, J. P., Schrope, B., Kaufman, H. L., 2004. Adjuvant therapy for malignant melanoma. *Expert.Rev.Anticancer Ther.* 4, 823-835.
497. Strasly, M., Doronzo, G., Cappello, P., Valdembri, D., Arese, M., Mitola, S., Moore, P., Alessandri, G., Giovarelli, M., Bussolino, F., 2004. CCL16 activates an angiogenic program in vascular endothelial cells. *Blood* 103, 40-49.
498. Stute, N., Santana, V. M., Rodman, J. H., Schell, M. J., Ihle, J. N., Evans, W. E., 1992. Pharmacokinetics of subcutaneous recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in children. *Blood* 79, 2849-2854.
499. Su, Z., Vieweg, J., Weizer, A. Z., Dahm, P., Yancey, D., Turaga, V., Higgins, J., Boczkowski, D., Gilboa, E., Dannull, J., 2002. Enhanced induction of telomerase-specific CD4(+) T cells using dendritic cells transfected with RNA encoding a chimeric gene product. *Cancer Res.* 62, 5041-5048.
500. Sugimoto, M., Yasuda, A., Miki, K., Morita, M., Suzuki, K., Uchida, N., Hashizume, S., 1985. Gene structures of low-neurovirulent vaccinia virus LC16m0, LC16m8, and their Lister original (LO) strains. *Microbiol.Immunol.* 29, 421-428.
501. Sumida, S. M., McKay, P. F., Truitt, D. M., Kishko, M. G., Arthur, J. C., Seaman, M. S., Jackson, S. S., Gorgone, D. A., Lifton, M. A., Letvin, N. L., Barouch, D. H., 2004. Recruitment and expansion of dendritic cells *in vivo* potentiate the immunogenicity of plasmid DNA vaccines. *J.Clin.Invest* 114, 1334-1342.
502. Sun, J. C., Bevan, M. J., 2003. Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* 300, 339-342.
503. Sunderkotter, C., Steinbrink, K., Goebeler, M., Bhardwaj, R., Sorg, C., 1994. Macrophages and angiogenesis. *J.Leukoc.Biol.* 55, 410-422.



504. Suzuki, M., Ohwada, M., Sato, I., Nagatomo, M., 1995. Serum level of macrophage colony-stimulating factor as a marker for gynecologic malignancies. *Oncology* 52, 128-133.
505. Syrjanen, S., Naud, P., Sarian, L., Derchain, S., Roteli-Martins, C., Longatto-Filho, A., Tatti, S., Branca, M., Erzen, M., Hammes, L. S., Costa, S., Syrjanen, K., 2009. Immunosuppressive cytokine Interleukin-10 (IL-10) is up-regulated in high-grade CIN but not associated with high-risk human papillomavirus (HPV) at baseline, outcomes of HR-HPV infections or incident CIN in the LAMS cohort. *Virchows Arch.* 455, 505-515.
506. Tagaya, I., Amano, H., Komatsu, T., Uchida, N., Kodama, H., 1974. Supplement to the pathogenicity and immunogenicity of an attenuated vaccinia virus, strain DIs, in cynomolgus monkeys. *Jpn.J.Med.Sci.Biol.* 27, 215-228.
507. Takayama, E., Ono, T., Carnero, E., Umemoto, S., Yamaguchi, Y., Kanayama, A., Oguma, T., Takashima, Y., Tadakuma, T., Garcia-Sastre, A., Miyahira, Y., 2010. Quantitative and qualitative features of heterologous virus-vector-induced antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells against *Trypanosoma cruzi* infection. *Int.J.Parasitol.* 40, 1549-1561.
508. Takehara, K., 1996. [Local immune responses in uterine cervical carcinogenesis]. *Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 48, 1063-1070.
509. Tartaglia, J., Cox, W. I., Pincus, S., Paoletti, E., 1994. Safety and immunogenicity of recombinants based on the genetically-engineered vaccinia strain, NYVAC. *Dev.Biol.Stand.* 82, 125-129.
510. Tartaglia, J., Perkus, M. E., Taylor, J., Norton, E. K., Audonnet, J. C., Cox, W. I., Davis, S. W., van der Hoeven, J., Meignier, B., Riviere, M., ., 1992. NYVAC: a highly attenuated strain of vaccinia virus. *Virology* 188, 217-232.
511. Taub, D. D., Ortaldo, J. R., Turcovski-Corrales, S. M., Key, M. L., Longo, D. L., Murphy, W. J., 1996. Beta chemokines costimulate lymphocyte cytolysis, proliferation, and lymphokine production. *J.Leukoc.Biol.* 59, 81-89.
512. Tay, S. K., Jenkins, D., Maddox, P., Hogg, N., Singer, A., 1987. Tissue macrophage response in human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia. *Br.J.Obstet.Gynaecol.* 94, 1094-1097.
513. Teicher, B. A., 2007. Transforming growth factor-beta and the immune response to malignant disease. *Clin.Cancer Res.* 13, 6247-6251.
514. Terabe, M., Berzofsky, J. A., 2004. Immunoregulatory T cells in tumor immunity. *Curr.Opin.Immunol.* 16, 157-162.
515. Terabe, M., Matsui, S., Noben-Trauth, N., Chen, H., Watson, C., Donaldson, D. D., Carbone, D. P., Paul, W. E., Berzofsky, J. A., 2000. NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. *Nat.Immunol.* 1, 515-520.

516. Terwey, T. H., Kim, T. D., Kochman, A. A., Hubbard, V. M., Lu, S., Zakrzewski, J. L., Ramirez-Montagut, T., Eng, J. M., Muriglian, S. J., Heller, G., Murphy, G. F., Liu, C., Budak-Alpdogan, T., Alpdogan, O., van den Brink, M. R., 2005. CCR2 is required for CD8-induced graft-versus-host disease. *Blood* 106, 3322-3330.
517. Teshima, T., Mach, N., Hill, G. R., Pan, L., Gillessen, S., Dranoff, G., Ferrara, J. L., 2001. Tumor cell vaccine elicits potent antitumor immunity after allogeneic T-cell-depleted bone marrow transplantation. *Cancer Res.* 61, 162-171.
518. Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y., Nieto, M. A., 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139, 871-890.
519. Thomas, D. A., Massague, J., 2005a. TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell* 8, 369-380.
520. Thomas, D. A., Massague, J., 2005b. TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell* 8, 369-380.
521. Tian, M., Neil, J. R., Schiemann, W. P., 2011. Transforming growth factor-beta and the hallmarks of cancer. *Cell Signal.* 23, 951-962.
522. Tolonen, N., Doglio, L., Schleich, S., Krijnse, L. J., 2001. Vaccinia virus DNA replication occurs in endoplasmic reticulum-enclosed cytoplasmic mini-nuclei. *Mol.Biol.Cell* 12, 2031-2046.
523. Tooze, J., Hollinshead, M., Reis, B., Radsak, K., Kern, H., 1993. Progeny vaccinia and human cytomegalovirus particles utilize early endosomal cisternae for their envelopes. *Eur.J.Cell Biol.* 60, 163-178.
524. Townsley, A. C., Weisberg, A. S., Wagenaar, T. R., Moss, B., 2006. Vaccinia virus entry into cells via a low-pH-dependent endosomal pathway. *J.Virol.* 80, 8899-8908.
525. Tsang, K. Y., Zaremba, S., Nieroda, C. A., Zhu, M. Z., Hamilton, J. M., Schlom, J., 1995. Generation of human cytotoxic T cells specific for human carcinoembryonic antigen epitopes from patients immunized with recombinant vaccinia-CEA vaccine. *J.Natl.Cancer Inst.* 87, 982-990.
526. Tschärke, D. C., Reading, P. C., Smith, G. L., 2002. Dermal infection with vaccinia virus reveals roles for virus proteins not seen using other inoculation routes. *J.Gen.Virol.* 83, 1977-1986.
527. Tsuboi, A., Oka, Y., Nakajima, H., Fukuda, Y., Elisseeva, O. A., Yoshihara, S., Hosen, N., Ogata, A., Kito, K., Fujiki, F., Nishida, S., Shirakata, T., Ohno, S., Yasukawa, M., Oji, Y., Kawakami, M., Morita, S., Sakamoto, J., Udaka, K., Kawase, I., Sugiyama, H., 2007. Wilms tumor gene WT1 peptide-based immunotherapy induced a minimal response in a patient with advanced therapy-resistant multiple myeloma. *Int.J.Hematol.* 86, 414-417.
528. Tsuboi, A., Oka, Y., Ogawa, H., Elisseeva, O. A., Tamaki, H., Oji, Y., Kim, E. H., Soma, T., Tatekawa, T., Kawakami, M., Kishimoto, T., Sugiyama, H., 1999. Constitutive expression of the Wilms' tumor gene WT1 inhibits the differentiation

- of myeloid progenitor cells but promotes their proliferation in response to granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF). *Leuk.Res.* 23, 499-505.
529. Tsutsui, K., 1983. Release of vaccinia virus from FL cells infected with the IHD-W strain. *J.Electron Microsc.(Tokyo)* 32, 125-140.
  530. Turner, P. C., Moyer, R. W., 2002. Poxvirus immune modulators: functional insights from animal models. *Virus Res.* 88, 35-53.
  531. Ueno, T., Toi, M., Saji, H., Muta, M., Bando, H., Kuroi, K., Koike, M., Inadera, H., Matsushima, K., 2000. Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer. *Clin.Cancer Res.* 6, 3282-3289.
  532. Unger, B., Mercer, J., Boyle, K. A., Traktman, P., 2013. Biogenesis of the vaccinia virus membrane: genetic and ultrastructural analysis of the contributions of the A14 and A17 proteins. *J.Virol.* 87, 1083-1097.
  533. Upton, C., Mossman, K., McFadden, G., 1992. Encoding of a homolog of the IFN-gamma receptor by myxoma virus. *Science* 258, 1369-1372.
  534. Ure, D. R., Lane, T. E., Liu, M. T., Rodriguez, M., 2005. Neutralization of chemokines RANTES and MIG increases virus antigen expression and spinal cord pathology during Theiler's virus infection. *Int.Immunol.* 17, 569-579.
  535. van der Noordaa, J., Dekking, F., Posthuma, J., Beunders, B. J., 1967. Primary vaccination with an attenuated strain of vaccinia virus. *Arch.Gesamte Virusforsch.* 22, 210-214.
  536. Van Tendeloo, V. F., Ponsaerts, P., Berneman, Z. N., 2007. mRNA-based gene transfer as a tool for gene and cell therapy. *Curr.Opin.Mol.Ther.* 9, 423-431.
  537. Van Tendeloo, V. F., Van, d., V, Van, D. A., Cools, N., Anguille, S., Ladell, K., Gostick, E., Vermeulen, K., Pieters, K., Nijs, G., Stein, B., Smits, E. L., Schroyens, W. A., Gadisseur, A. P., Vrelust, I., Jorens, P. G., Goossens, H., de Vries, I. J., Price, D. A., Oji, Y., Oka, Y., Sugiyama, H., Berneman, Z. N., 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.
  538. van, B., V, Barrett, J., Tiffany, H. L., Fremont, D. H., Murphy, P. M., McFadden, G., Speck, S. H., Virgin HW, I. V., 2000. Identification of a gammaherpesvirus selective chemokine binding protein that inhibits chemokine action. *J.Virol.* 74, 6741-6747.
  539. Van, D. A., Berneman, Z. N., Van Tendeloo, V. F., 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.
  540. Van, E. H., Hollinshead, M., Rodger, G., Zhang, W. H., Smith, G. L., 2002. The vaccinia virus F12L protein is associated with intracellular enveloped virus

- particles and is required for their egress to the cell surface. *J.Gen.Virol.* 83, 195-207.
541. Vanderlocht, J., Van Elssen, C. H., Senden-Gijsbers, B. L., Meek, B., Cloosen, S., Libon, C., Bos, G. M., Germeraad, W. T., 2010. Increased tumor-specific CD8+ T cell induction by dendritic cells matured with a clinical grade TLR-agonist in combination with IFN-gamma. *Int.J.Immunopathol.Pharmacol.* 23, 35-50.
  542. Vanderplasschen, A., Mathew, E., Hollinshead, M., Sim, R. B., Smith, G. L., 1998. Extracellular enveloped vaccinia virus is resistant to complement because of incorporation of host complement control proteins into its envelope. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 7544-7549.
  543. Verardi, P. H., Jones, L. A., Aziz, F. H., Ahmad, S., Yilma, T. D., 2001. Vaccinia virus vectors with an inactivated gamma interferon receptor homolog gene (B8R) are attenuated *In vivo* without a concomitant reduction in immunogenicity. *J.Virol.* 75, 11-18.
  544. Vergati, M., Intrivici, C., Huen, N. Y., Schlom, J., Tsang, K. Y., 2010. Strategies for cancer vaccine development. *J.Biomed.Biotechnol.* 2010.
  545. Verreck, F. A., de, B. T., Langenberg, D. M., Hoeve, M. A., Kramer, M., Vaisberg, E., Kastelein, R., Kolk, A., de Waal-Malefyt, R., Ottenhoff, T. H., 2004. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101, 4560-4565.
  546. Vicari, A. P., Caux, C., 2002. Chemokines in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13, 143-154.
  547. Vijaysri, S., Jentarra, G., Heck, M. C., Mercer, A. A., McInnes, C. J., Jacobs, B. L., 2008. Vaccinia viruses with mutations in the E3L gene as potential replication-competent, attenuated vaccines: intra-nasal vaccination. *Vaccine* 26, 664-676.
  548. Villinger, F., Miller, R., Mori, K., Mayne, A. E., Bostik, P., Sundstrom, J. B., Sugimoto, C., Ansari, A. A., 2004. IL-15 is superior to IL-2 in the generation of long-lived antigen specific memory CD4 and CD8 T cells in rhesus macaques. *Vaccine* 22, 3510-3521.
  549. Vuylsteke, R. J., Molenkamp, B. G., Gietema, H. A., van Leeuwen, P. A., Wijnands, P. G., Vos, W., van Diest, P. J., Scheper, R. J., Meijer, S., de Gruijl, T. D., 2004. Local administration of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor increases the number and activation state of dendritic cells in the sentinel lymph node of early-stage melanoma. *Cancer Res.* 64, 8456-8460.
  550. Waldmann, T. A., 2006. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat.Rev.Immunol.* 6, 595-601.
  551. Wang, J., Seethala, R. R., Zhang, Q., Gooding, W., van, W. C., Hasegawa, H., Ferris, R. L., 2008a. Autocrine and paracrine chemokine receptor 7 activation in head and neck cancer: implications for therapy. *J.Natl.Cancer Inst.* 100, 502-512.

552. Wang, T., Dai, H., Wan, N., Moore, Y., Dai, Z., 2008b. The role for monocyte chemoattractant protein-1 in the generation and function of memory CD8+ T cells. *J.Immunol.* 180, 2886-2893.
553. Ward, B. M., 2005. Visualization and characterization of the intracellular movement of vaccinia virus intracellular mature virions. *J.Virol.* 79, 4755-4763.
554. Ward, B. M., Moss, B., 2001. Vaccinia virus intracellular movement is associated with microtubules and independent of actin tails. *J.Virol.* 75, 11651-11663.
555. Weber, J., Sondak, V. K., Scotland, R., Phillip, R., Wang, F., Rubio, V., Stuge, T. B., Groshen, S. G., Gee, C., Jeffery, G. G., Sian, S., Lee, P. P., 2003. Granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor added to a multi-peptide vaccine for resected Stage II melanoma. *Cancer* 97, 186-200.
556. Wells, T. N., Power, C. A., Shaw, J. P., Proudfoot, A. E., 2006. Chemokine blockers--therapeutics in the making? *Trends Pharmacol.Sci.* 27, 41-47.
557. Welsch, S., Doglio, L., Schleich, S., Krijnse, L. J., 2003. The vaccinia virus I3L gene product is localized to a complex endoplasmic reticulum-associated structure that contains the viral parental DNA. *J.Virol.* 77, 6014-6028.
558. Werden, S. J., Rahman, M. M., McFadden, G., 2008. Poxvirus host range genes. *Adv.Virus Res.* 71, 135-171.
559. Whiteside, T. L., 2006. The role of immune cells in the tumor microenvironment. *Cancer Treat.Res.* 130, 103-124.
560. Wieggers, G. J., Kaufmann, M., Tischner, D., Villunger, A., 2011. Shaping the T-cell repertoire: a matter of life and death. *Immunol.Cell Biol.* 89, 33-39.
561. Wolffe, E. J., Weisberg, A. S., Moss, B., 2001. The vaccinia virus A33R protein provides a chaperone function for viral membrane localization and tyrosine phosphorylation of the A36R protein. *J.Virol.* 75, 303-310.
562. Yamagami, T., Sugiyama, H., Inoue, K., Ogawa, H., Tatekawa, T., Hirata, M., Kudoh, T., Akiyama, T., Murakami, A., Maekawa, T., 1996a. Growth inhibition of human leukemic cells by WT1 (Wilms tumor gene) antisense oligodeoxynucleotides: implications for the involvement of WT1 in leukemogenesis. *Blood* 87, 2878-2884.
563. Yamagami, T., Sugiyama, H., Inoue, K., Ogawa, H., Tatekawa, T., Hirata, M., Kudoh, T., Akiyama, T., Murakami, A., Maekawa, T., 1996b. Growth inhibition of human leukemic cells by WT1 (Wilms tumor gene) antisense oligodeoxynucleotides: implications for the involvement of WT1 in leukemogenesis. *Blood* 87, 2878-2884.
564. Yamaguchi, T., Sakaguchi, S., 2006. Regulatory T cells in immune surveillance and treatment of cancer. *Semin.Cancer Biol.* 16, 115-123.
565. Yang, L., Huang, J., Ren, X., Gorska, A. E., Chytil, A., Aakre, M., Carbone, D. P., Matrisian, L. M., Richmond, A., Lin, P. C., Moses, H. L., 2008. Abrogation of TGF

- beta signaling in mammary carcinomas recruits Gr-1+CD11b+ myeloid cells that promote metastasis. *Cancer Cell* 13, 23-35.
566. Yewdell, J. W., Haeryfar, S. M., 2005. Understanding presentation of viral antigens to CD8+ T cells *in vivo*: the key to rational vaccine design. *Annu.Rev.Immunol.* 23, 651-682.
567. Yewdell, J. W., Hill, A. B., 2002. Viral interference with antigen presentation. *Nat.Immunol.* 3, 1019-1025.
568. Yilma, T., Verardi, P., Jones, L., 2010. Development of safe and efficacious viral vaccines for animals. *Crit Rev.Immunol.* 30, 223-237.
569. Yong, X., Xiao, Y. F., Luo, G., He, B., Lu, M. H., Hu, C. J., Guo, H., Yang, S. M., 2012. Strategies for enhancing vaccine-induced CTL antitumor immune responses. *J.Biomed.Biotechnol.* 2012, 605045.
570. Young, J. W., Szabolcs, P., Moore, M. A., 1995. Identification of dendritic cell colony-forming units among normal human CD34+ bone marrow progenitors that are expanded by c-kit-ligand and yield pure dendritic cell colonies in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor alpha. *J.Exp.Med.* 182, 1111-1119.
571. Yuan, G. H., Masuko-Hongo, K., Sakata, M., Tsuruha, J., Onuma, H., Nakamura, H., Aoki, H., Kato, T., Nishioka, K., 2001. The role of C-C chemokines and their receptors in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 44, 1056-1070.
572. Zhang, J., Patel, L., Pienta, K. J., 2010a. CC chemokine ligand 2 (CCL2) promotes prostate cancer tumorigenesis and metastasis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21, 41-48.
573. Zhang, J., Patel, L., Pienta, K. J., 2010b. Targeting chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) as an example of translation of cancer molecular biology to the clinic. *Prog.Mol.Biol.Transl.Sci.* 95, 31-53.
574. Zhu, Q., Egelston, C., Gagnon, S., Sui, Y., Belyakov, I. M., Klinman, D. M., Berzofsky, J. A., 2010. Using 3 TLR ligands as a combination adjuvant induces qualitative changes in T cell responses needed for antiviral protection in mice. *J.Clin.Invest* 120, 607-616.
575. Zhu, Q., Egelston, C., Vivekanandhan, A., Uematsu, S., Akira, S., Klinman, D. M., Belyakov, I. M., Berzofsky, J. A., 2008. Toll-like receptor ligands synergize through distinct dendritic cell pathways to induce T cell responses: implications for vaccines. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 105, 16260-16265.
576. Ziegler, A., Heidenreich, R., Braumuller, H., Wolburg, H., Weidemann, S., Mocikat, R., Rocken, M., 2009. EpCAM, a human tumor-associated antigen promotes Th2 development and tumor immune evasion. *Blood* 113, 3494-3502.
577. Zijlmans, H. J., Fleuren, G. J., Baelde, H. J., Eilers, P. H., Kenter, G. G., Gorter, A., 2006. The absence of CCL2 expression in cervical carcinoma is associated with increased survival and loss of heterozygosity at 17q11.2. *J.Pathol.* 208, 507-517.

578. Zippelius, A., Batard, P., Rubio-Godoy, V., Bioley, G., Lienard, D., Lejeune, F., Rimoldi, D., Guillaume, P., Meidenbauer, N., Mackensen, A., Rufer, N., Lubenow, N., Speiser, D., Cerottini, J. C., Romero, P., Pittet, M. J., 2004. Effector function of human tumor-specific CD8 T cells in melanoma lesions: a state of local functional tolerance. *Cancer Res.* 64, 2865-2873.
579. Zurkova, K., Chlanda, P., Samkova, Z., Babiarova, K., Kutinova, L., Krystofova, J., Hainz, P., Nemeckova, S., 2011. Expression of soluble TGF-beta receptor II by recombinant Vaccinia virus enhances E7 specific immunotherapy of HPV16 tumors. *Neoplasma* 58, 181-188.
580. Zurkova, K., Hainz, P., Krystofova, J., Kutinova, L., Sanda, M., Nemeckova, S., 2010. Attenuation of vaccinia virus by the expression of human Flt3 ligand. *Virology* 7, 109.

## 8. Přílohy

1. Publikace:

**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 Babiarova, Kamila Žůrková, Jitka Kryštofová,  
Petr Hainz, Luďa Kutinová, Šárka Němečková

**Vydáno v časopise:** Viral immunology. 2012 Oct;25(5):411-22., IF 1.750

2. Supplementary Figure 1:

3. Supplementary Figure 2

4. Publikace:

**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.**

**Autoři:** Šárka Němečková, Michal Šmahel, Petr Hainz, Jana Macková,  
Kamila Žůrková, Pavel Gabriel, Marie Indrova a Luďa Kutinová

**Vydáno v časopise:** Neoplasma. 2007;54(4):326-33. IF 1.574



# 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

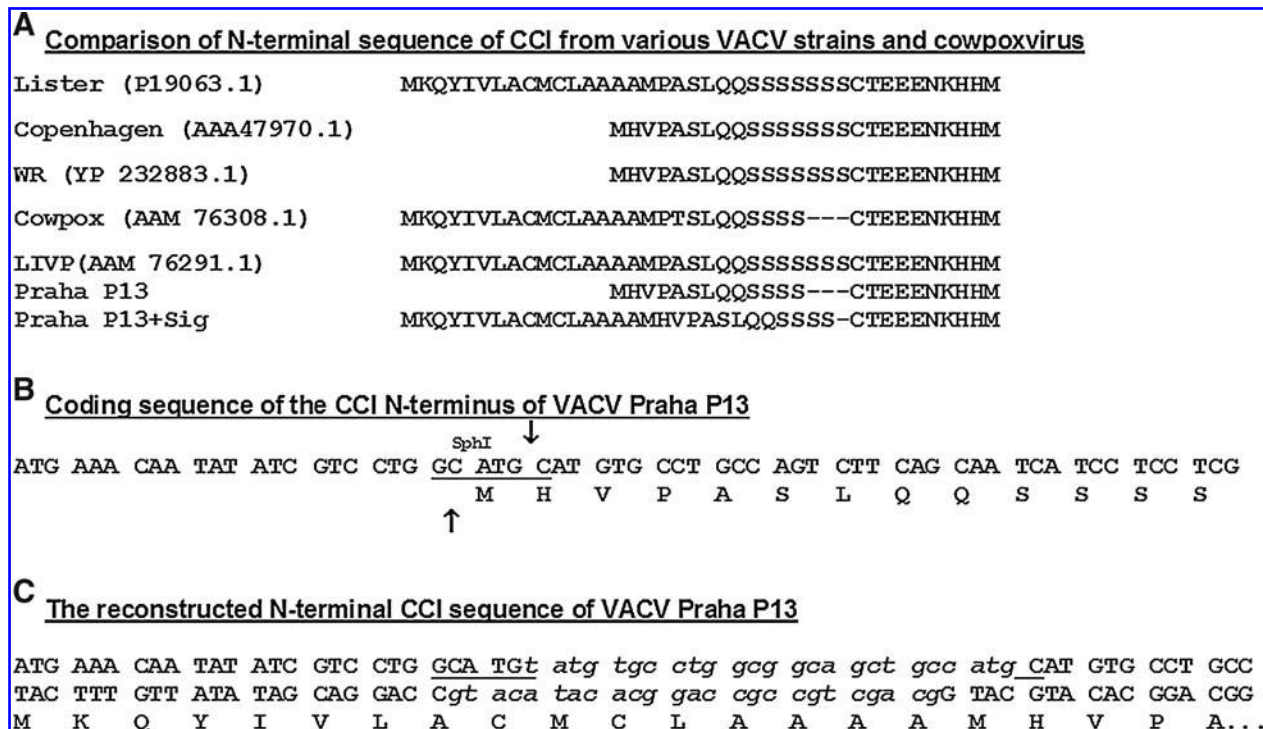
prepare revertant viruses, the 4889-bp fragment containing the C23L gene was amplified by PCR using PfuI polymerase, primers C23L-1: 5'-AACAAAGATTCTTCCTCCAAACA-3' and C23L-2: 5'-AAAAGAAGAAGTCGCGAGAGG-3', and genomic DNA of P13 virus as a template. The amplified nucleotide sequence was inserted into pCR 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 guanosine 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-ΔvCCI-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

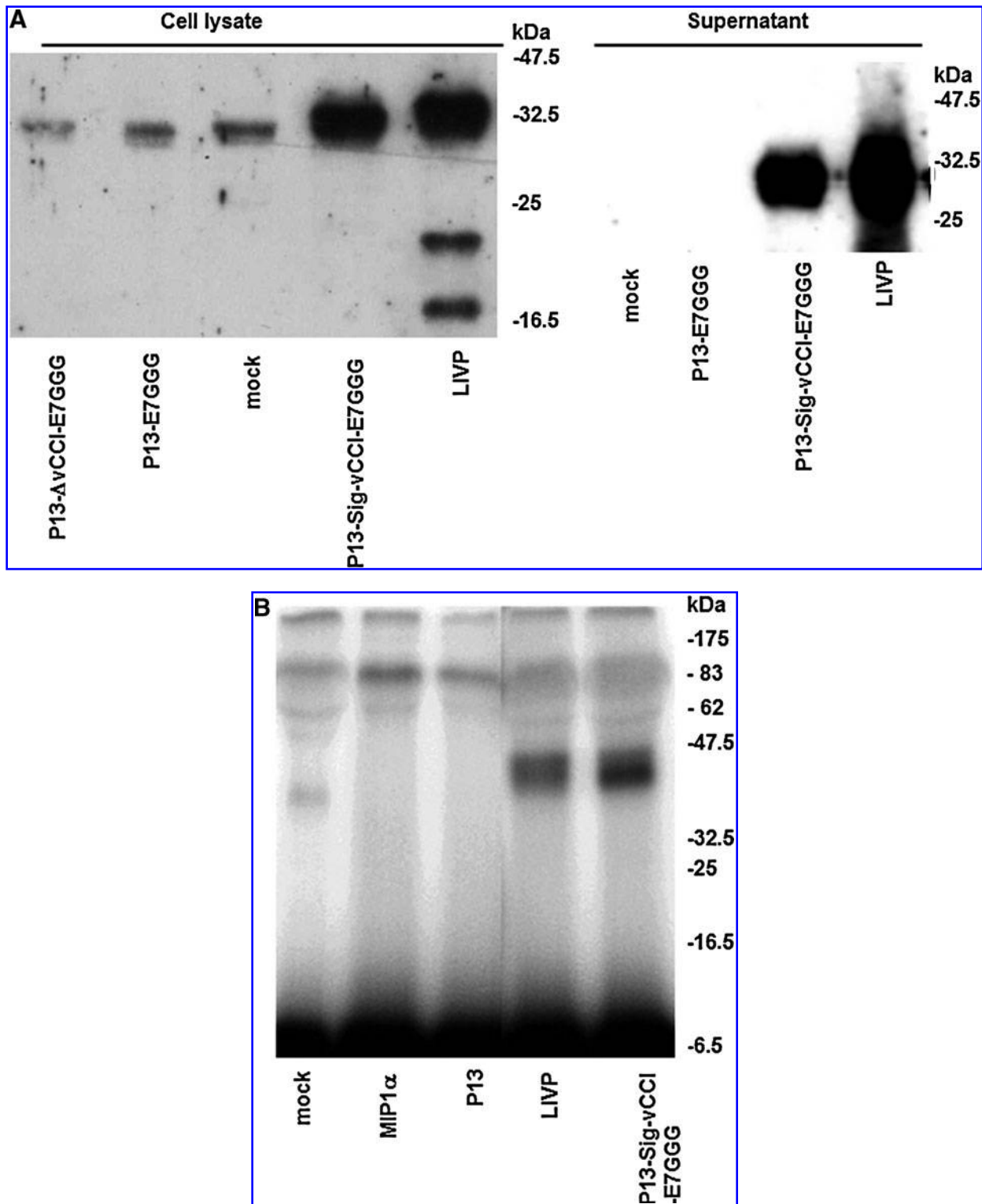
the blood of infected mice by ELISA. The results of two experiments are shown in Table 1. The administration of the P13-E7GGG virus increased the level of RANTES, MCP-1, MIG, eotaxin, TARC, MDC, and KC, on day 3 in comparison with mock-infected mice. The blood of all groups of mice contained non-detectable 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-ΔvCCI-E7GGG was detected in five animals, and RevP13-ΔvCCI-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

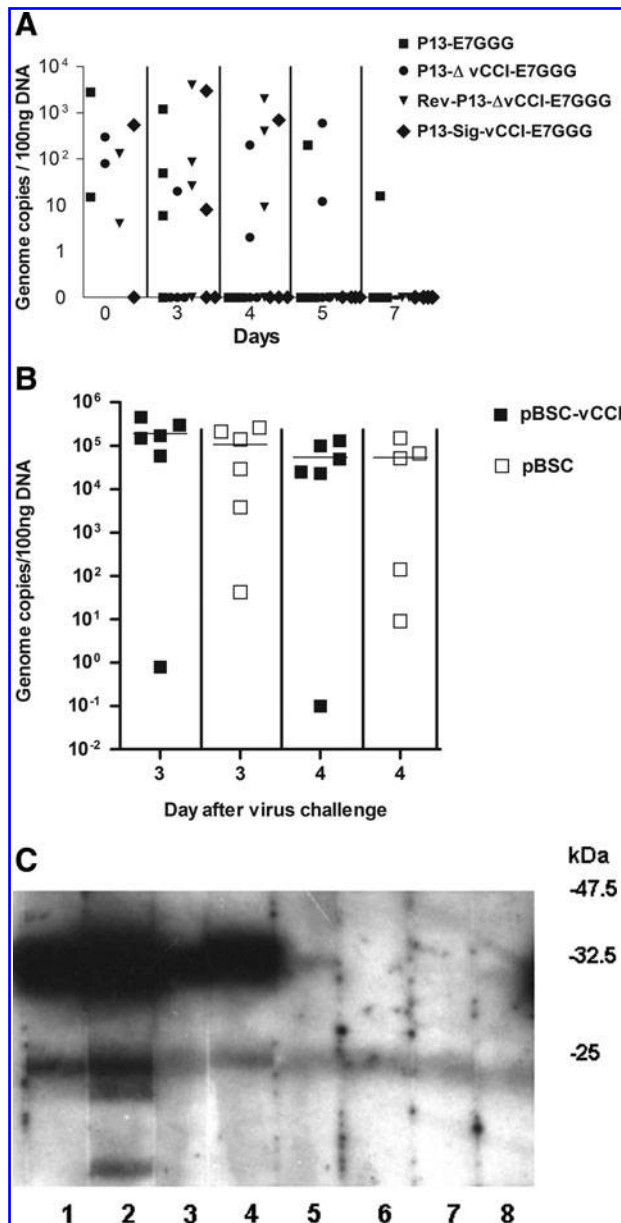
In the next step, we examined the effect of vCCI production on the immunogenicity of recombinant viruses expressing the modified HPV16 E7 protein. We determined the CTL response against the dominant CTL epitope HPV16 E7<sub>(49–57)</sub> (RAHY-NIVTF), and against the VACV E3<sub>(140–148)</sub> (VGPSNSPTF) 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

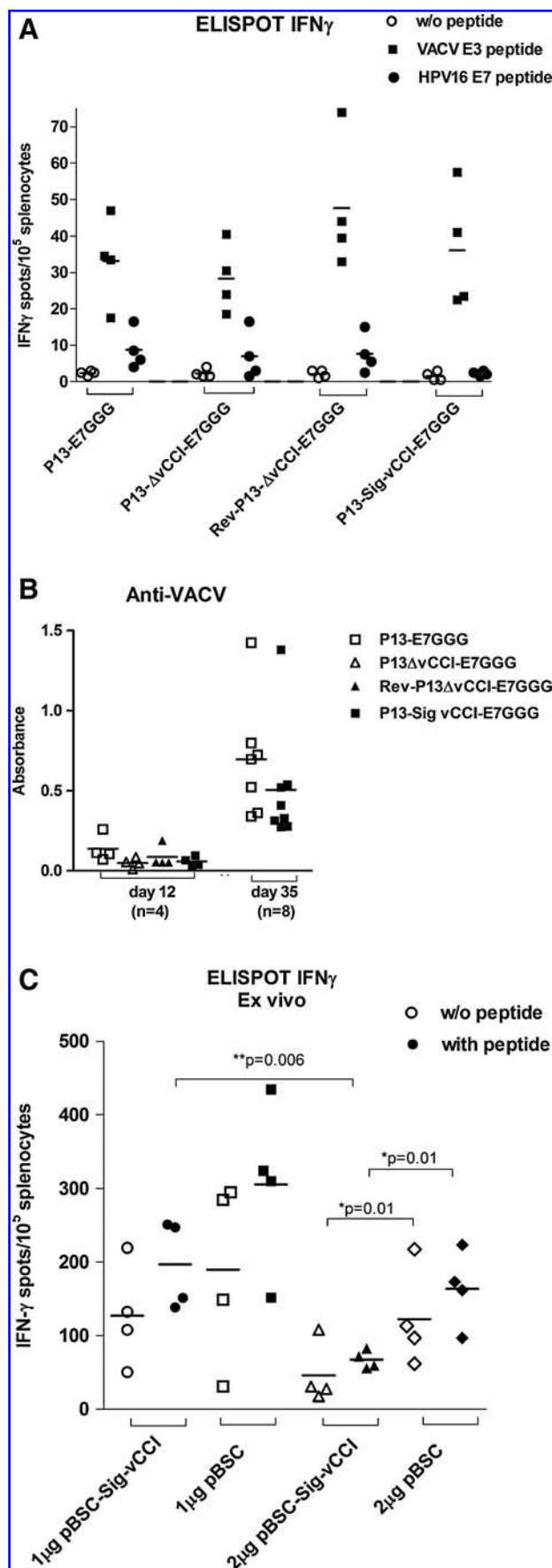
vCCI protein belongs to the group of secreted viral immunomodulatory proteins. Thanks to its capability to efficiently inhibit CC chemokines that direct migration of macrophages, monocytes, DCs, and lymphocytes, it can influence different stages of the antiviral immune response. The importance of CC 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

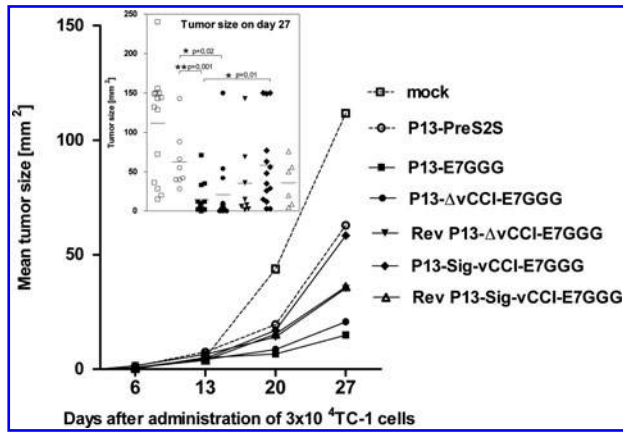




the application of the wild-type virus, and the deletion mutants lacking the studied immunomodulatory protein. The application route used for the evaluation of VACV CC chemokine inhibitors in the mouse model was usually intradermal or intranasal administration (43). We have shown that the secreted form 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 OPVK 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.

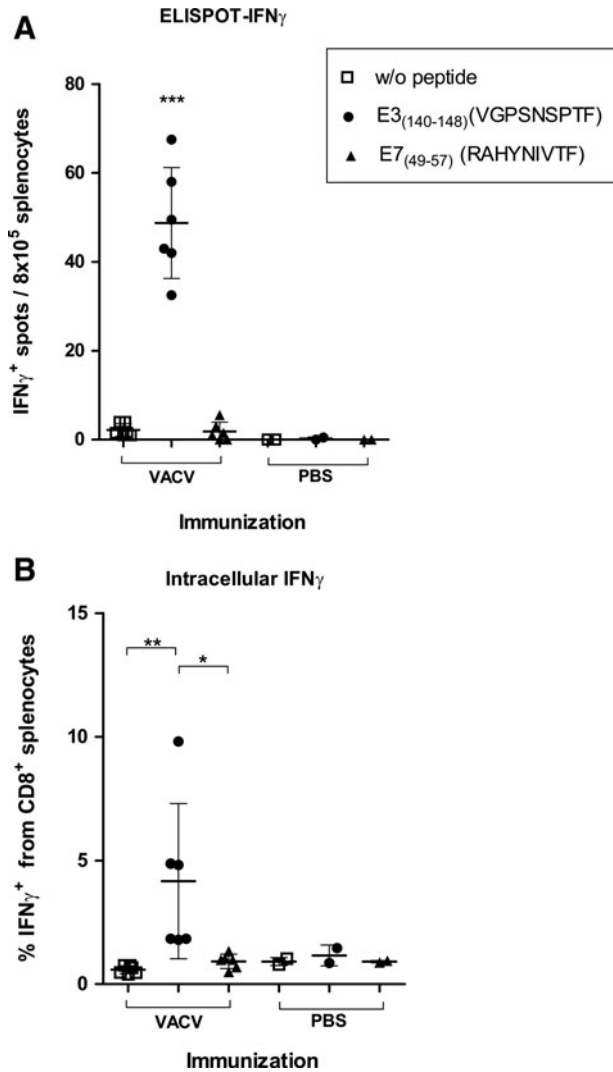
28. Corona Gutierrez CM, Tinoco A, Navarro T, *et al.*: Therapeutic vaccination with MVA E2 can eliminate precancerous lesions (CIN 1, CIN 2, and CIN 3) associated with infection by oncogenic human papillomavirus. *Hum Gene Ther* 2004;15:421–431.
29. Davidson EJ, Faulkner RL, Sehr P, *et al.*: Effect 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:

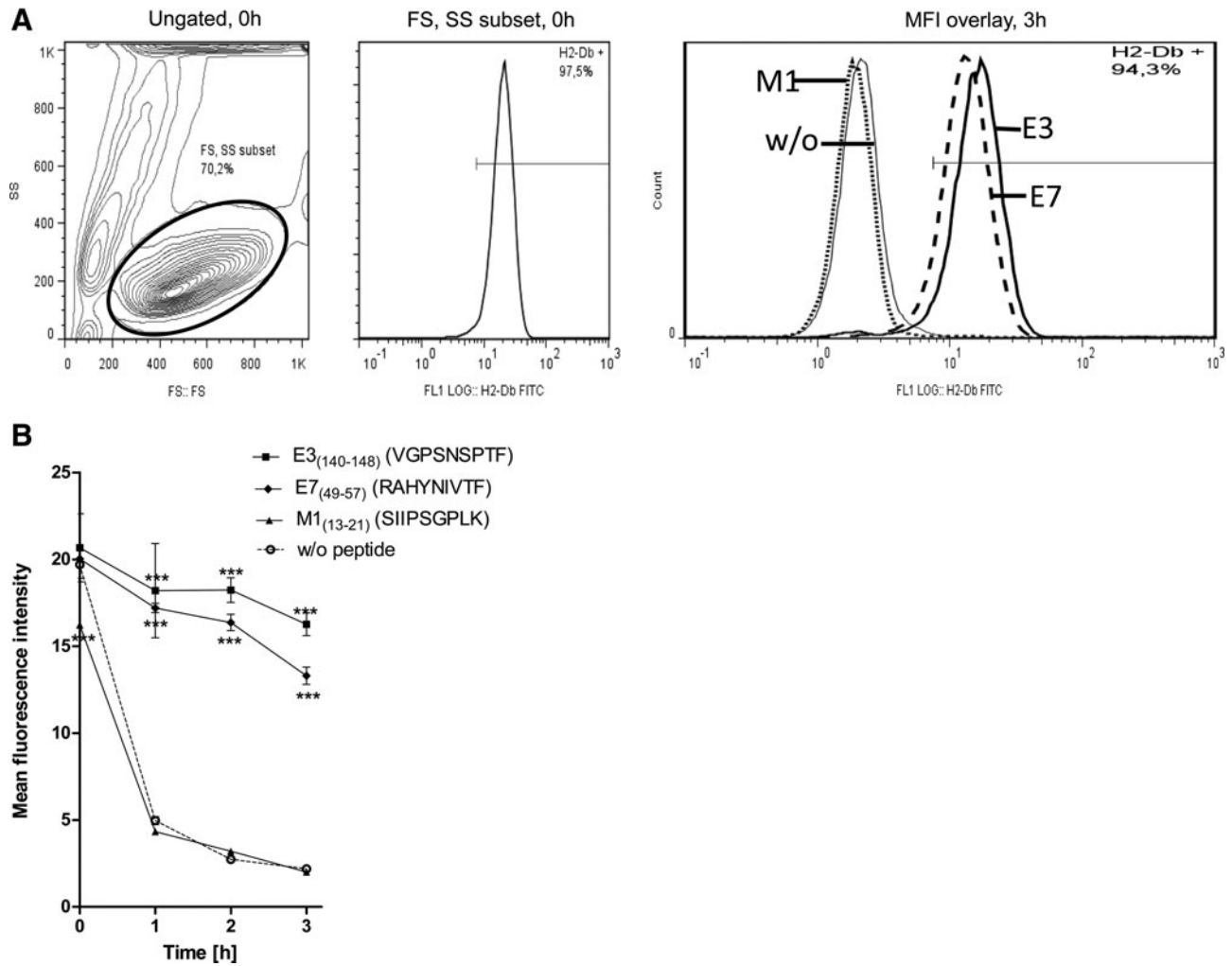
Dr. Sarka Nemeckova  
 Department of Experimental Virology  
 Institute of Hematology and Blood Transfusion  
 U nemocnice 1  
 CZ-128 20 Prague 2, Czech Republic

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<sup>6</sup> 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  $\mu$ M 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 (\*\*\*) $p < 0.001$ .

## 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

S. NEMECKOVA<sup>1\*</sup>, M. SMAHEL<sup>1</sup>, P. HAINZ<sup>1</sup>, J. MACKOVA<sup>1</sup>, K. ZURKOVA<sup>1</sup>, P. GABRIEL<sup>1</sup>, M. INDROVA<sup>2</sup> AND L. KUTINOVA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic, sarkan@uhkt.cz, <sup>2</sup>Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

Received December 18, 2006

Downregulation of MHC class I molecules is believed to be often the cause of tumor immune escape and at the same time it is the major obstacle to T-cell based immunotherapy of tumors. In our experimental model, the C57BL/6 mice bearing tumors induced by TC-1/A9 cells characterized by expression of HPV16 oncogenes and downregulation of H-2<sup>b</sup> molecules were immunized with highly immunogenic E7GGG.GUS DNA vaccine expressing the fused gene of modified HPV16 E7 (E7GGG) with *E.coli*  $\beta$ -glucuronidase (GUS). The DNA vaccine was administered by gene gun on days 7 and 14 after s.c. injection of tumor cells. The tumors *in situ* were injected with recombinant vaccinia virus MVA expressing the gene for murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (MVA-GM-CSF). Two doses of the DNA vaccine combined with at least two consecutive local treatments with MVA-GM-CSF were able to inhibit significantly the growth of tumors. We have shown by ELISPOT-IFN $\gamma$  that *in situ* expression of the GM-CSF gene did not enhance the E7 specific systemic T-cell response. We found that local injections of MVA-GM-CSF induced an increase of intratumoral CD3<sup>+</sup> T cell counts and that the DNA vaccination resulted in up-regulation of MHC type I molecules on tumor cells *in vivo*. We suppose that i.t. delivery of MVA-GM-CSF changed the local tumor microenvironment and rendered tumors more attractive and better accessible to effector T cells.

*Key words: GM-CSF, vaccinia virus, MVA, DNA vaccine, HPV16 E7, tumor.*

Human papillomaviruses (HPVs) have been identified as the etiological agent of cervical carcinoma, the second most common malignancy in women worldwide. Moreover, HPVs are suspected to be also involved in the induction of other tumors [1]. Despite of recent approval of prophylactic vaccine against high risk HPVs, development of a therapeutic vaccines against HPVs remains of utmost priority. The early viral proteins E6 and E7 expressed in precancerous lesions and invasive cancers are essential for the induction and maintenance of oncogenic transformation of HPV infected cells [2]. Since Th<sub>1</sub> and CD8<sup>+</sup> T cell immune responses against early proteins E2, E6 and E7 can cause regression of lesions in HPV16-infected humans, it is widely accepted that vaccina-

tion strategies for therapy of HPV associated neoplasia are to be based on early viral proteins which play the role of tumor associated rejection antigens.

Despite the presence of viral antigens, the transformed cells sometimes gain the ability to escape from anti-tumor immune responses. This phenomenon is frequently encountered in clinical trials on tumor vaccines and immunotherapy and it can be caused by loss of the ability of tumor cells to present antigenic peptides in the complex with MHC class I molecules which implies that such cells would be a poor target for specific T cells. Changes of this type occur frequently in progressing tumors and metastases as a result of down-regulation of MHC class I expression. The molecular mechanisms responsible for the defect include: mutations in  $\beta_2$ -microglobulin or MHC heavy chain and alterations in expression of proteins involved in the antigen processing path-

\*Corresponding author

way e.g. proteasome subunits or transporter associated with antigen processing (TAP). MHC class I down-regulation caused by the latter mechanism can be corrected by cytokine treatment, particularly that with IFN $\gamma$ . The TC-1/A9 cell clone with down-regulated surface H-2<sup>b</sup> expression was isolated from an immunoresistant tumor grown after challenge with TC-1 cells in a mouse immune against HPV16 E7 protein. Recovery of MHC class I molecules on the surface of TC-1/A9 cells could be induced by culture in the presence of IFN $\gamma$  and correlated with TAP-1 expression. The cells proliferating *in vivo* retained their immunoresistance, despite partial restoration of H-2<sup>b</sup> on their surface [3].

Previous reports indicated that intratumoral GM-CSF gene delivery increased the counts of *in situ* DCs and tumor infiltrating leukocytes and modified levels of IFN $\gamma$ , IL12 and some chemokines inside tumors [4]. Moreover, intratumoral delivery of tumor associated antigens together with multiple immunostimulatory molecules including GM-CSF induced anti-tumor activity [5,6]. Anti-tumor effect of local gene therapy with GM-CSF carried by vaccinia virus or other vectors was confirmed in clinical therapies of different tumors [7,8].

Recombinant poxviruses have been used for expression of tumor antigens, cytokines and chemokines in numerous pre-clinical models. Besides high levels of expression, these vectors were accepted for administration to patients with different malignancies for their good safety profile. The strongest safety record was achieved with non-replicating viruses such as the modified vaccinia virus Ankara (MVA) that had been attenuated due to at least six major deletions representing about 15% of the original genome of the parental Ankara strain. Indeed, MVA is currently used in advanced stage clinical trials of several prophylactic and therapeutic vaccines against infectious diseases and cancer [9].

Previously, we prepared a highly immunogenic E7GGG.GUS DNA vaccine expressing the fused gene of the modified HPV16 E7 oncogene (E7GGG) with the gene encoding *E. coli*  $\beta$ -glucuronidase (GUS) [10]. Although the E7GGG.GUS DNA vaccine was able to prevent the growth of TC-1/A9 induced tumors only in a portion of experimental mice, it was ineffective in inhibiting the growth of tumors with the therapy started on day 4 after s.c. injection of TC-1/A9 cells.

In this report, we targeted GM-CSF expression in the local microenvironment of tumors with down-regulated expression of MHC class I molecules using the recombinant vaccinia virus MVA and simultaneously mice immunized with the highly immunogenic DNA vaccine. Two doses of the DNA vaccine combined with at least two consecutive intratumoral doses of MVA-GM-CSF were able to inhibit significantly the growth of tumors. When analyzing the cellular immune response to the HPV16 E7 protein by ELISPOT-IFN $\gamma$ , we found that *in situ* expression of the GM-CSF gene did not enhance the systemic E7 specific T-cell response. We found that local injections of MVA-GM-CSF induced an increase of

intratumoral CD3<sup>+</sup> T cell counts and that the DNA vaccination resulted in up-regulation of MHC type I molecules on tumor cells *in vivo*.

## Materials and methods

**Viruses.** Recombinant vaccinia viruses (rVV) (strain MVA) were prepared from a clone isolated by plaque purification in our laboratory from the MVA vaccine kindly provided by W. Altenburger, Basel, Switzerland. The MVA-GM-CSF virus carries a 550 bp fragment containing the mouse GM-CSF cDNA [11] inserted in the thymidine kinase (TK) gene. Transgene expression is controlled by the 7.5k promoter. TK deficient RAT 2 rat cells [12] were used for the selection of TK<sup>-</sup> VV recombinants. Vaccinia viruses P13-GM-CSF, MVA-preS2S [13] and MVA-SigE7LAMP [14] were described previously. MVA-SigE7LAMP was used as the parental virus for insertion of the GM-CSF gene resulting in a double recombinant MVA-SigE7LAMP-GM-CSF.

P13-GM-CSF virus was propagated in BSC-40 cells and MVA recombinants (rMVA) were multiplied in primary chicken fibroblast cultures. All viruses were purified by sucrose-gradient centrifugation [15].

**Antibodies.** For immunohistochemical staining the rat anti-human CD3, clone CD3-12 (Serotec Ltd. Oxford, UK) and secondary antibody Ultratec HRP (Immunotech, Marseille, France) were used. For flow cytometry antibodies against CD3-PE (clone KT3, Serotec), Ly6G-FITC (clone1A8, BD-Pharmingen, San Diego, CA), CD11c-FITC (clone HL3, BD-Pharmingen), F4/80 FITC (cloneCI:A3-1, Serotec), neutrophil 7/4-PE (Serotec), anti-mouse H-2K<sup>b</sup>/H-2D<sup>b</sup> (clone 28-8-6, BD-Pharmingen), FITC labelled polyclonal goat anti-mouse IgG (BD-Pharmingen) were used.

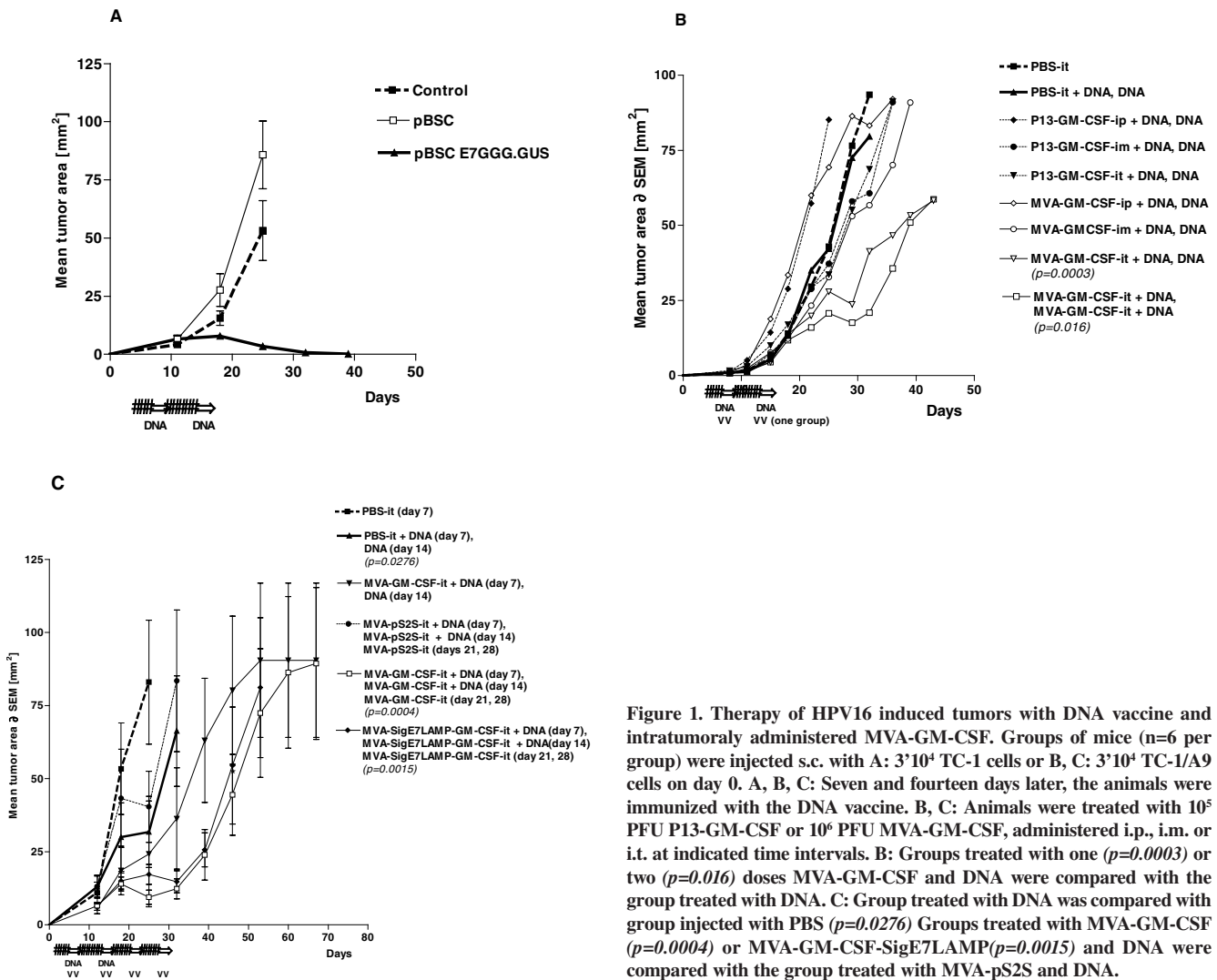
**DNA vaccine.** Mice were immunized against the HPV16 E7 protein with the plasmid pBSC/E7GGG.GUS carrying a fused gene consisting of the mutated HPV16 E7 gene (E7GGG) and *E. coli*  $\beta$ -glucuronidase (GUS) [10]. The empty plasmid pBSC was used as a negative control. One  $\mu$ g/dose of plasmids was administered into the abdominal skin of mice by a gene gun as reported earlier [16].

**Cell lines.** HPV16 E6- and E7-expressing TC-1 cells derived from C57BL/6 mouse lung cells [17] were kindly provided by T.C. Wu (Baltimore). TC-1/A9 cells were derived from the TC-1 tumor as an immunoresistant MHC class I<sup>-</sup> subline [3].

**Animal experiments.** 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 Act No. 246/92 on the animal protection of animals against cruelty and Decree No. 311/97 of the Ministry of Health of the Czech Republic, on the care and use of experimental animals.

**Tumor induction and intratumoral injection of MVA-GM-CSF.** Mice received a dose of  $3 \cdot 10^4$  tumor cells injected subcutaneously (s.c.) into the back. Recombinant viruses were





**Figure 1.** Therapy of HPV16 induced tumors with DNA vaccine and intratumorally administered MVA-GM-CSF. Groups of mice ( $n=6$  per group) were injected s.c. with A:  $3 \times 10^4$  TC-1 cells or B, C:  $3 \times 10^4$  TC-1/A9 cells on day 0. A, B, C: Seven and fourteen days later, the animals were immunized with the DNA vaccine. B, C: Animals were treated with  $10^5$  PFU P13-GM-CSF or  $10^6$  PFU MVA-GM-CSF, administered i.p., i.m. or i.t. at indicated time intervals. B: Groups treated with one ( $p=0.0003$ ) or two ( $p=0.016$ ) doses MVA-GM-CSF and DNA were compared with the group treated with DNA. C: Group treated with DNA was compared with group injected with PBS ( $p=0.0276$ ) Groups treated with MVA-GM-CSF ( $p=0.0004$ ) or MVA-GM-CSF-SigE7LAMP ( $p=0.0015$ ) and DNA were compared with the group treated with MVA-pS2S and DNA.

injected into tumors (i.t.) in 20  $\mu$ l PBS using an insulin syringe with a 30 gauge needle. If a palpable tumor was absent at the time of i.t. treatment, the recombinant virus was inoculated s.c. at the site of usual injection of tumor cells. Tumor growth was measured weekly. Differences between growth curves were statistically analyzed by the two-way ANOVA using the Prism 3.0. software (GraphPad Software Inc., San Diego, USA).

**Induction of surgical minimal residual tumor disease (SMRTD).** Mice were inoculated s.c. with  $6.10^4$  TC-1/A9 tumor cells. After 14 days, the transplanted tumors, reaching approximately 8–12mm in diameter, were excised under i.p. anaesthesia (0,3 ml/mouse, Hypnomidate, Jansen Pharmaceutica, Beerse, Belgium), leaving no macroscopically visible tumor residuum [18].

**Assay of E7 specific T-cell responses.** The spleens were removed from mice twelve days after the last immunization and the response of IFN $\gamma$ -producing cells was determined by

ELISPOT-IFN $\gamma$  assay upon *in vitro* restimulation with H-2D<sup>b</sup> restricted HPV 16 E7<sub>(49-57)</sub> peptide (RAHYNIVTF) for 6 days, as described previously [14].

**Immunohistochemistry.** Tumors were fixed in Davison's solution. After fixation, samples were processed and stained as reported previously [19].

**Detection of surface markers on cells isolated from tumors.** The animals were sacrificed and their subcutaneous tumors were excised, cut into pieces and washed twice with PBS. Tumor fragments were trypsinized 2x15 min. For analysis of tumor infiltrate, all cells released from the tumor tissue were collected, washed and stained with antibodies. To prepare tumor cells for detection of MHC class I expression, the first fraction of cells released by trypsinization was discarded and the following two fractions were combined and cultured in D-MEM medium overnight. The next day, the cells were trypsinized, stained with specific antibodies and analyzed using a Coulter-Epics XL flow cytometer (Beckman Instruments).

**Results**

*Local administration of MVA-GM-CSF has an effect on the therapy of TC-1/A9 tumors by immunization with the DNA vaccine.* Therapeutic immunization of mice with the plasmid pBSC/E7GGG.GUS started one week after transplantation of 3.10<sup>4</sup> tumor cells when the mean tumor size was 0.75 – 1.68 mm<sup>2</sup>. The second dose of the vaccine was administered on day 7 following the dose 1. High therapeutic efficacy of immunization was demonstrated in animals injected with TC-1 cells where it resulted in complete inhibition of tumor growth (Fig. 1A), whereas in animals carrying TC-1/A9 induced tumors with down-regulated MHC class I molecules it proved ineffective (Fig. 1B, full triangles, full bold line).

We attempted to enhance the poor therapeutic effect of the DNA vaccine against TC-1/A9 cells using GM-CSF. Since the local concentration of recombinant cytokines injected *in situ* ceases very quickly we introduced the transgene GM-CSF into the tissue of the tumor and its environment by the recombinant vaccinia virus. The animals were injected i.p., i.m. or i.t. with 10<sup>5</sup> pfu P13-GM-CSF or 10<sup>6</sup> pfu MVA-GM-CSF at the time of the first immunization with the DNA vaccine (Fig. 1B). We observed that the i.p. and i.m. virus injections as well as the use of the replicating recombinant virus P13-GM-CSF remained without any significant effect on tumor growth. On the other hand, transduction of tumors with the non-replicating virus MVA expressing GM-CSF resulted in inhibition of tumor growth (p=0.0003) in 3/8 animals in comparison with the group treated with PBS i.t.+DNA (0/8 animals without tumor). The effect of two consecutive intratumoral injections of MVA-GM-CSF (p=0.016) was more pronounced than with one dose only. Even a superior tumor growth inhibition was achieved if the number of repeated i.t. injections with MVA-GM-CSF administered in weekly intervals was increased to four (Fig. 1C, p=0.0004). The anti-tumor effect was dependent on GM-CSF, as inoculation of control virus MVA-pS2S did not change the growth of tumors. In the same experiment (Fig. 1C) we have shown that the therapeutic immune response was not boosted by i.t. immunization with the E7 protein when co-expressed with GM-CSF in the form of highly immunogenic Sig/E7/LAMP fusion protein. Tumor growth inhibition was similar in animals injected with either single recombinant MVA-GM-CSF

or double recombinant MVA-SigE7LAMP-GM-CSF. In additional experiments we observed the highest anti-tumor effects with i.t. MVA-GM-CSF injections when not coadministered concurrently with the DNA vaccine, but given four days later (not shown).

*MVA-GM-CSF enhances immunotherapy of surgical minimal residual tumor disease.* Furthermore, we investigated whether or not the local treatment with MVA-GM-CSF together with DNA vaccine immunization could be used for immunotherapy of surgical minimal residual tumor disease. Mice were s.c. injected with 6.10<sup>4</sup> TC-1/A9 cells (day 0) and growing tumors were surgically removed 14 days later. Operated animals (n=6 or 7) were immunized with two doses of the DNA vaccine on days 18 and 25 and the sites of the former tumors were treated by s.c. injection of MVA-GM-CSF on the day of immunization. Survival of the operated animals on day 25 is summarized in Table I. The overall rates of tumor recurrence were similar in all groups (6/7 or 5/6), but tumor development was somewhat hindered in groups 5 and 6 which had been treated both with the DNA vaccine and one or two doses of MVA-GM-CSF in comparison with the untreated controls or animals given only one type of treatment.

*MVA-GM-CSF administration does not enhance the E7 specific T cell response induced by immunization with the DNA vaccine.* To determine the possible mechanism of the effect of local delivery of GM-CSF on the cellular immune response we measured E7 specific T-cell immunity in mice treated using the same schedule as for tumor therapy but without administration of tumor cells. MVA-GM-CSF was inoculated at the site of usual injection of tumor cells. Mice were immunized with two doses of the DNA vaccine by gene gun and injected s.c. with 10<sup>6</sup> PFU of rMVA into the dorsal region as described in legend of Fig. 2. The response of ex vivo splenocytes stimulated overnight with the E7<sub>(49-57)</sub> peptide RAHYNIVTF was tested by ELISPOT-IFN $\gamma$ .

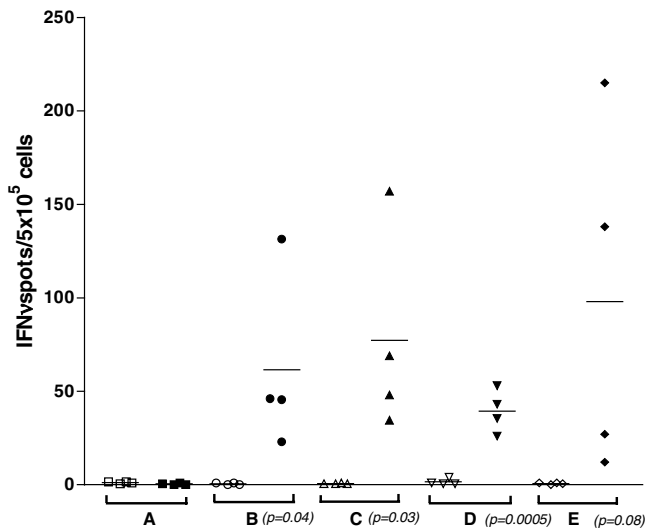
The response of mice to immunization with pBSC/E7GGG.GUS was significantly increased in groups B, C, D compared to group A. The highest mean value for the E7 response was found in mice which were treated twice with MVA-GM-CSF and DNA (group E), but due to high variance the differences were not statistically significant. Comparison of responses between groups which were immunized with

**TABLE 1 – Therapy of operated tumors TC-1/A9 with MVA-GM-CSF and DNA vaccine**

Group <sup>a</sup>	Dose 1 of virus day 4 after operation	Dose 1 of DNA vaccine day 4 after operation	Dose 2 of virus day 11 after operation	Dose 2 of DNA vaccine day 11 after operation	Survival of mice on day 25 after operation [%]	Mice with tumors
1	– <sup>b</sup>	–	–	–	30	6/7
2	–	+	–	+	32	6/6
4	MVA-GMCSF	–	–	–	32	5/6
5	MVA-GMCSF	+	–	+	58	6/7
6	MVA-GMCSF	+	MVA-GMCSF	+	58	6/7

<sup>a</sup>The groups of mice with identical distribution of tumor size were formed on the day of operation.

<sup>b</sup>Mock infected tumors were injected with PBS.



**Figure 2.** The effect of MVA-GM-CSF on E7 specific cellular response induced by DNA immunization. Groups of mice ( $n=4$  per group) were immunized with two doses of the DNA vaccine by g.g. and the animals were injected with  $10^6$  PFU of rMVA in  $20 \mu\text{l}$  of PBS administered s.c. at the dorsal region on every immunization day. Different groups received A pBSC+MVA-GM-CSF (day 0), pBSC (day 7), B pBSC/E7GGG.GUS+PBS (day 0), pBSC E7GGG.GUS (day 7), C pBSC E7GGG.GUS+MVA-preS2S (day 0), pBSC E7GGG.GUS (day 7), D pBSC E7GGG.GUS+MVA-GM-CSF (day 0), pBSC E7GGG.GUS (day 7), E pBSC E7GGG.GUS+MVA-GM-CSF (day 0), pBSC E7GGG.GUS +MVA-GM-CSF (day 7). The E7-specific CD8<sup>+</sup> T lymphocytes were determined in each mice by IFN $\gamma$  ELISPOT. The mean counts of IFN $\gamma$  producing cells obtained in the absence (empty symbols) and presence (full symbols) of the E7<sub>(49-57)</sub> peptide were compared and analyzed by unpaired t-test.

pBSC/E7GGG.GUS (B, C, D, E), and some of which were inoculated with different MVA recombinants revealed, that the treatment with virus did not increase number of spots significantly. Our results suggest that i.t. injections coadministered with the DNA vaccine did not affect the magnitude of the E7-specific T cell response and hint that the role of inoculation of non-replicating MVA-GM-CSF could consist in modification of the local tumor microenvironment.

*Microenvironment of MHC class I negative tumors is changed following intratumoral MVA-GM-CSF injections and DNA vaccine immunization.* To determine the effect of the treatment on tumor microenvironment we analyzed surface markers of tumor infiltrating cells. Groups of mice ( $n = 6$ ) were injected s.c. with  $6.10^4$  TC-1/A9 cells and 7 and 14 days later were immunized with the pBSC/E7GGG.GUS DNA vaccine. Concurrently with immunization the mice were injected i.t. with MVA-GM-CSF or the control virus MVA-pS2S. Tissue of three tumors of similar size from each group was examined by immunohistochemical staining (Fig.3A) four days after the second intratumoral virus injection. We observed only a sparse diffuse infiltration of CD3<sup>+</sup> T cells in tumors injected with PBS in non-immunized mice

(Fig.3A-I) and in PBS injected tumors of mice immunized with the DNA vaccine (Fig.3A-II). The tumor tissue injected with MVA-GM-CSF of DNA immunized mice contained distinct areas with increased counts of CD3<sup>+</sup>T cells (Fig.3A-III). Injection with the MVA-pS2S virus yielded a weak infiltration of CD3<sup>+</sup> cells only (not shown).

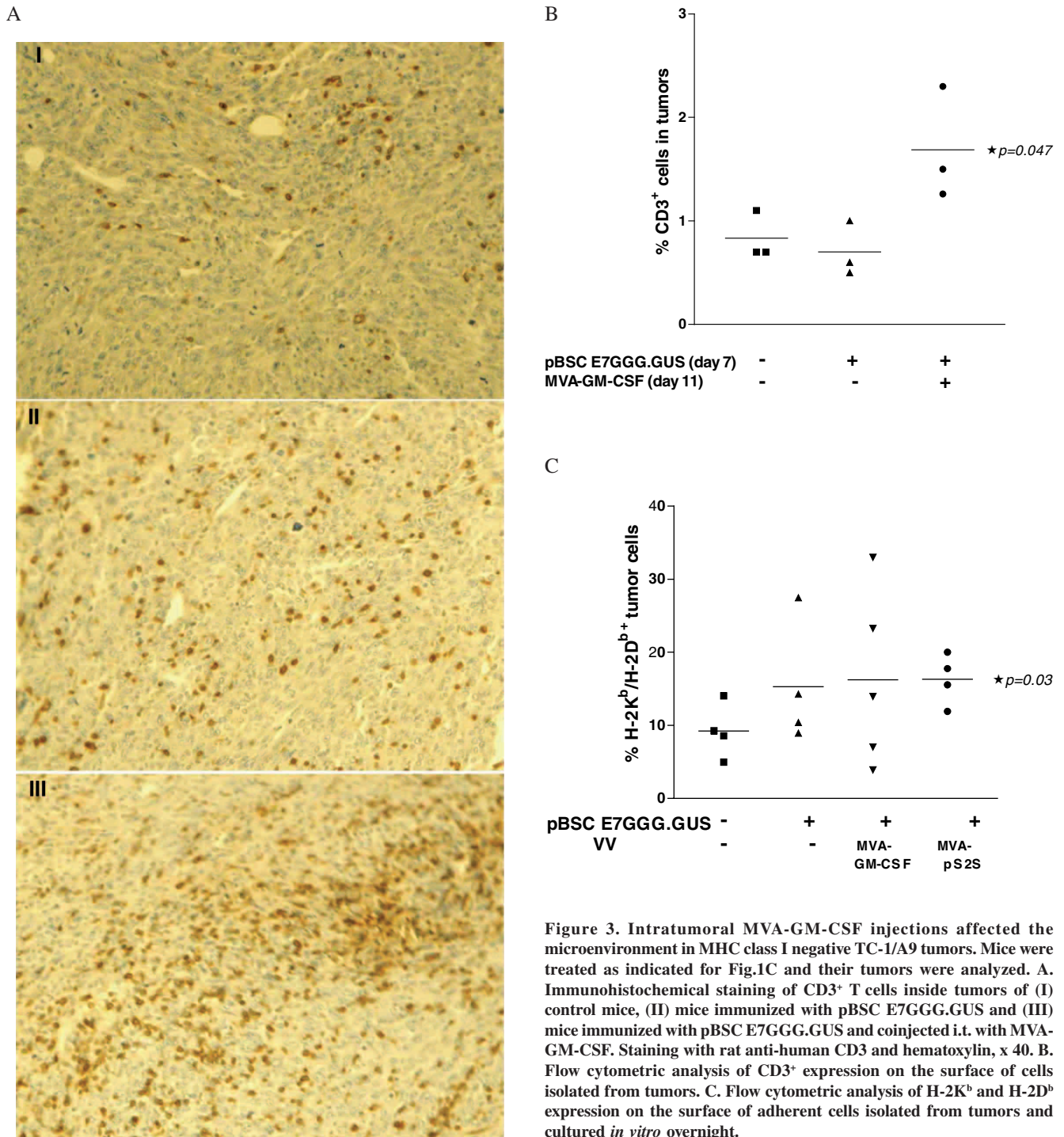
The cellular composition of tumors was also analyzed by flow cytometry. The tumors were excised seven days after the second i.t. virus injection and leukocyte markers were measured in the whole cell population. Flow cytometry analysis confirmed the results of immunohistochemical staining (Fig.3B). However, we did not observe any differences in the count of cells positive for Ly6G, CD11c, F4/80 and neutrophil 7/4 markers in correlation with the previous tumor treatment (not shown).

It has been shown previously that the treatment of TC-1/A9 cells with IFN $\gamma$  resulted in up-regulation of surface MHC class I molecules. *In vivo* growing TC-1/A9 cells also had increased amounts of MHC class I molecules in comparison with *in vitro* cultured cells [3]. To examine the effect of *in situ* treatments of tumors with different recombinant vaccinia viruses, we determined MHC class I molecules on the surface of cells isolated from TC-1/A9 induced tumors. Groups of mice ( $n = 4$  or  $5$ ) were injected s.c. with  $6 \cdot 10^4$  TC-1/A9 cells and 7 and 14 days later were immunized with the DNA vaccine pBSC/E7GGG.GUS. On the immunization day, the tumors were treated by i.t. injection of MVA-GM-CSF. Surface MHC class I molecules were determined on adherent cells of explanted tumors 3 days after the second treatment (Fig. 3C). In comparison with non-immunized controls, MHC class I expression was increased in all groups immunized with the DNA vaccine but any difference was not found between the mock infected tumors and tumors pretreated with MVA-GM-CSF and MVA-pS2S.

## Discussion

Using a murine model of HPV-associated tumors with down-regulated MHC class I expression, we report increased efficacy of the DNA vaccine therapy combined with i.t. GM-CSF gene delivery via a non-replicating vaccinia virus vector.

It was observed repeatedly that GM-CSF acts as an immune adjuvant for vaccines because of its capability to stimulate antigen presenting cells which results in increased activation of CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T cells and CD1d-restricted NK1.1<sup>+</sup> cells and enhanced production of antibodies. Moreover, vaccination with tumor cells engineered *ex vivo* produce GM-CSF elicited potent and long-lasting anti-tumor immunity (for review see [20]). It has been shown in a murine tumor model that the adjuvant and anti-tumor activity of GM-CSF depends on dosage and route of administration [21]. To minimize immunosuppressive activity induced by high concentrations of GM-CSF at the injection site, we delivered GM-CSF via a live recombinant vaccinia virus. We used a poxviral vector because it efficiently infects a broad range of mammalian cells



**Figure 3.** Intratumoral MVA-GM-CSF injections affected the microenvironment in MHC class I negative TC-1/A9 tumors. Mice were treated as indicated for Fig.1C and their tumors were analyzed. **A.** Immunohistochemical staining of CD3<sup>+</sup> T cells inside tumors of (I) control mice, (II) mice immunized with pBSC E7GGG.GUS and (III) mice immunized with pBSC E7GGG.GUS and coinjected i.t. with MVA-GM-CSF. Staining with rat anti-human CD3 and hematoxylin, x 40. **B.** Flow cytometric analysis of CD3<sup>+</sup> expression on the surface of cells isolated from tumors. **C.** Flow cytometric analysis of H-2K<sup>b</sup> and H-2D<sup>b</sup> expression on the surface of adherent cells isolated from tumors and cultured *in vitro* overnight.

*in vivo*, the magnitude of transgene expression can be adjusted by the type of the promoter used and its use poses no risk of insertional mutagenesis. We found the administration of a non-replicating MVA-GM-CSF which produced lower levels of GM-CSF superior to the use of replication competent P13-GM-CSF which induces high transgene expression. When

comparing three different routes of virus administration, the highest effect was observed with repeated i.t. MVA-GM-CSF virus injections. In other studies, anti-tumor activity of GM-CSF was highest with cytokine administered into the local microenvironment of tumors where it has an effect on the activation status of antigen presenting cells in regional lymph

nodes [22,23]. Similarly, GM-CSF produced after i.t. injection of MVA-GM-CSF had only a local effect because it was not able to enhance the E7 specific T cell response induced by the DNA vaccine administered by gene gun into the abdominal part of the body.

Tumors with down-regulated MHC class I expression cannot be effectively targeted by the antigen specific vaccination therapy which is based on the response of MHC-I restricted effector T cells [3]. However, the anti-tumor effect of a DNA vaccine against such cells can be enhanced by immunization with tumor cells expressing GM-CSF. It was observed previously using a HPV16 E6 E7+ MK16 tumor model [24] that the treatment of tumor bearing mice with such a combination of vaccines resulted in temporary tumor growth inhibition. In the combined immunotherapy described in this report, the virus vector is employed for *in situ* expression of the cytokine to avoid the time consuming engineering of cytokine expressing cell lines derived from tumor cells of the patient.

DNA immunization alone caused up-regulation of MHC class I expression on the surface of tumor cells isolated from tumors, which can be due to IFN $\gamma$  produced by E7-specific T cells and IFN $\alpha/\beta$  produced by plasmacytoid DCs induced by CpG motifs present in bacterial plasmid DNA. Tumors after repeated combined therapy with the DNA vaccine and i.t. GM-CSF expression were infiltrated with the higher amount of CD3<sup>+</sup> T cells. An increase in intratumoral myeloid leukocytes was not observed, which implies, that the dose of GM-CSF was not able to induce the response of immunosuppressive Gr1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> cells [21].

It has been shown repeatedly that local delivery of GM-CSF caused only temporary regression of tumors. Intratumoral injections of IL12 and GM-CSF resulted in the beneficial increase in IFN $\gamma$  and decrease in TGF $\beta$  and IL10 production but the effect was only transient and was followed by the development of an enhanced intratumoral T-suppressor-cell response characterized by high levels of immunosuppressor cytokines TGF $\beta$  and IL10 [25]. We speculate that the suppressor T cells were responsible for transient effect of the combined therapy in our study and plan to supplement the local therapy with agents that would block the immune suppression elicited by growing tumors.

Nonetheless, the present study provides evidence that the nonreplicating vaccinia virus MVA-GM-CSF is a suitable tool for local GM-CSF delivery that does not interfere with the DNA vaccine immunization against the E7 antigen and contributes to anti-tumor effects of immunization against tumors with down-regulated MHC class I molecule expression.

We thank T.C. Wu for providing the essential reagents. We also thank prof. MVDr. F. Jelinek for immunohistochemical analysis. This work was supported by grant NR 8004-3/2004 of the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of Czech Republic and grant 310/04/004 of Grant agency of the Czech Republic.

## References

- [1] zurHAUSEN H. Papillomaviruses in human cancers. Proc Assoc Am Physicians 1999; 111: 581–587.
- [2] von KNEBEL-DOEBERITZ, OLTERS DORF T, SCHWARZ E et al. 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.
- [3] SMAHEL M, SIMA P, LUDVIKOVA V et al. Immunisation with modified HPV16 E7 genes against mouse oncogenic TC-1 cell sublines with downregulated expression of MHC class I molecules. Vaccine 2003; 21: 1125–1136.
- [4] PAN PY, LI Y, LI Q et al. In situ recruitment of antigen-presenting cells by intratumoral GM-CSF gene delivery. Cancer Immunol Immunother 2004; 53: 17–25.
- [5] KUDO-SAITO C, SCHLOM J and HODGE JW. Intratumoral vaccination and diversified subcutaneous/ intratumoral vaccination with recombinant poxviruses encoding a tumor antigen and multiple costimulatory molecules. Clin Cancer Res 2004; 10: 1090–1099.
- [6] LICHTOR T, GLICK RP, LIN H et al. Intratumoral injection of IL-secreting syngeneic/allogeneic fibroblasts transfected with DNA from breast cancer cells prolongs the survival of mice with intracerebral breast cancer. Cancer Gene Ther 2005; 12: 708–714.
- [7] MASTRANGELO MJ, MAGUIRE HC, Jr., EISENLOHR LC et al. Intratumoral recombinant GM-CSF-encoding virus as gene therapy in patients with cutaneous melanoma. Cancer Gene Ther 1999; 6: 409–422.
- [8] STOUTENBURG JP, SCHROPE B and KAUFMAN HL. Adjuvant therapy for malignant melanoma. Expert Rev Anticancer Ther 2004; 4: 823–835.
- [9] SUTTER G and STAIB C. Vaccinia vectors as candidate vaccines: the development of modified vaccinia virus Ankara for antigen delivery. Curr Drug Targets Infect Disord 2003; 3: 263–271.
- [10] 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.
- [11] GOUGH NM, METCALF D, GOUGH J et al. Structure and expression of the mRNA for murine granulocyte-macrophage colony stimulating factor. EMBO J 1985; 4: 645–653.
- [12] TOPP WC. Normal rat cell lines deficient in nuclear thymidine kinase. Virology 1981; 113: 408–411.
- [13] NEMECKOVA S, SROLLER V, HAINZ P et al. Experimental therapy of HPV16 induced tumors with IL12 expressed by recombinant vaccinia virus in mice. Int J Mol Med 2003; 12: 789–796.
- [14] 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.
- [15] JOKLIK WK. The purification of four strains of poxvirus. Virology 1962; 18: 9–18.

- [16] SMAHEL M, SIMA P, LUDVIKOVA V et al. Modified HPV16 E7 Genes as DNA Vaccine against E7-Containing Oncogenic Cells. *Virology* 2001; 281: 231–238.
- [17] LIN KY, GUARNIERI FG, STAVELEY-O'CARROLL KF 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.
- [18] VLK V, ROSSNER P, INDROVA M et al. Interleukin-2 gene therapy of surgical minimal residual tumour disease. *Int J Cancer* 1998; 76: 115–119.
- [19] JELINEK F, SOBOTKOVA E and VONKA V. Characteristics of two mouse bcr-abl-transformed cell lines. II. Pathological lesions induced in mice. *Folia Biol (Praha)* 2005; 51: 93–102.
- [20] DRANOFF G. GM-CSF-based cancer vaccines. *Immunol Rev* 2002; 188:147-54.: 147–154.
- [21] SERAFINI P, CARBLEY R, NOONAN KA et al. High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells. *Cancer Res* 2004; 64: 6337–6343.
- [22] KASS E, PANICALI DL, MAZZARA G et al. Granulocyte/macrophage-colony stimulating factor produced by recombinant avian poxviruses enriches the regional lymph nodes with antigen-presenting cells and acts as an immunoadjuvant. *Cancer Res* 2001; 61: 206–214.
- [23] VUYLSTEKE RJ, MOLENKAMP BG, GIETEMA HA et al. Local administration of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor increases the number and activation state of dendritic cells in the sentinel lymph node of early-stage melanoma. *Cancer Res* 2004; 64: 8456–8460.
- [24] RITTICH S, DUSKOVA M, MACKOVA J et al. Combined immunization with DNA and transduced tumor cells expressing mouse GM-CSF or IL-2. *Oncol Rep* 2005; 13: 311–317.
- [25] NAIR RE, KILINC MO, JONES SA et al. Chronic immune therapy induces a progressive increase in intratumoral T suppressor activity and a concurrent loss of tumor-specific CD8+ T effectors in her-2/neu transgenic mice bearing advanced spontaneous tumors. *J Immunol* 2006; 176: 7325–7334.