

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE
KATEDRA GENETIKY A MIKROBIOLOGIE**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Využití chimerických virových částic pro
terapeutické účely**

Michael Jelínek

Školitel: Mgr. Alena Morávková, Ph.D.

2006/ 2007

Abstrakt

S rozšiřujícím se poznáním podstaty různých onemocnění (nádory, vrozené vady) vzniká potřeba vývoje nových léčebných přístupů, založených na molekulární bázi. Takovými přístupy jsou imunoterapie a genová terapie. Obě technologie spočívají v doručení léčiva, proteinu či nukleové kyseliny do organismu, respektive přímo do cílových buněk. Jedním z problémů který je třeba v této souvislosti řešit je konstrukce vhodného vektoru, který dopraví neporušené terapeutikum specificky do žádaného místa. Virům podobné částice (VLPs) mají vhodné vlastnosti pro takové léčebné využití. Lze je snadno zkonstruovat *in vitro* z virových kapsidových proteinů, které navíc mohou být dále modifikovány. VLPs jsou nereplikativní a neinfekční, ale přitom si zachovávají receptorovou specifitu infekční virové částice a schopnost aktivovat imunitní systém příjemce.

Kvalita, velikost a stabilita uměle vytvořených VLPs se řídí mnoha faktory, především faktory fyzikálními (pH, iontová síla, přítomnost malých iontů) a biochemickými (velikost vkládaných peptidů, konformační stabilita).

V této práci je srovnány vlastnosti a využití VLPs odvozených od malých DNA virů (Parvoviry, Polyomaviry, Papilomaviry).

Klíčová slova: Viru podobné částice, VLPs, chimerické viru podobné částice, CVLPs, malé DNA viry, vektor, epitop, imunizace, imunoterapie nádorů

Abstract

Increasing knowledge in principles of some serious diseases (tumours, congenital defects) led to the need of progress of new medical treatments that are based on molecular platform. Such treatments are immunotherapy and gene therapy. Both the technologies repose upon delivering of medicaments, proteins or nuclear acid to patient, right to the target cells. There is a problem that has to be solved: The construction of acceptable vector that will derive therapeutic agent specifically to desired place. Virus-like particles are appropriated for the therapeutic utilization. They can be easily constructed *in vitro* from viral capsids proteins that can be modified. VLPs are non-replicative, non-infectious and are able to bind receptors and activate immune system of recipient.

Quality, size and stability of *in vitro* created VLPs are dependent on many factors. These factors are physical (pH, ionic strength, present of small ions) and biochemical (size of added peptides, stability).

In this thesis are compared features and utility of VLPs derived of small DNA viruses (Parvoviruses, Polyomaviruses, Papillomaviruses).

Key words: Virus-like particles, VLPs, chimeric virus-like particles. CVLPs, small DNA viruses, vectors, epitops, immunisation, tumor immunotherapy

Poděkování: Chtěl bych poděkovat Doc. RNDr. J. Forstové, Csc. a Mgr. A.Morávkové, Ph.D. za veškerou pomoc.

Obsah

Obsah.....	5
Seznam zkratek.....	6
1. Úvod.....	7
2. Produkce virových proteinů.....	8
2.1. Prokaryotické expresní systémy.....	8
2.2. Eukaryotické expresní systémy.....	8
3. Obecné vlastnosti VLPs a CVLPs.....	10
3.1. Podmínky skládání.....	10
3.2. Minoritní proteiny.....	11
3.3. Velikost a lokalizace vložených fragmentů.....	12
3.4. Vstup do buněk.....	14
3.5. Imunitní reakce na VLPs.....	14
4. VLPs a CVLPs parvovirů.....	16
4.1. Erythrovirus.....	16
4.2. Parvovirus.....	17
5. VLPs a CVLPs polyomavirů.....	18
5.1. Vektory pro prezentaci epitopů.....	19
5.1.1. Imunizace.....	19
5.1.2. Imunoterapie nádorů pomocí PyV CVLPs.....	19
5.2. Použití polyomavirových CVLPs pro genovou terapii a onkolytické vektory.....	20
6. VLPs a CVLPs papilomavirů.....	22
6.1. VLPs obsahující pouze strukturní proteiny – vakcinace.....	22
6.2. CVLPs obsahující nestrukturní proteiny, proteiny jiných virů a geny.....	24
7. Závěr.....	26
8. Seznam literatury.....	27

Seznam zkratek

aa	aminokyseliny (amino acids)
APC	antigen prezentující buňka (antigen presenting cell)
BHK	ledviny novorozených křečků (Baby hamster kidney)
BPV	hovězí papilomavirus (bovinní papilomavirus)
BFDV	virus nemoci mladých papoušků (budgerigar fledgling disease virus)
CPV	psí parvovirus (canine parvovirus)
CRPV	králíčí papilomavirus (Cottontail rabbit papilomavirus)
CVLPs	chimerická viru podobná částice (chimeric virus-like particles)
CML	chronická myeloidní leukémie
DC	dendritická buňka (dendritic cell)
HaPyV	polymavirus napadající křečky (hamster polyomavirus)
HPV	lidský papilomavirus (human papilomavirus)
HSV	herpes simplex virus
LC	Langerhansova buňka (Langerhans cell)
MEV	virus enteritidy norků (mink enteritis virus)
MHV	virus myši hepatitidy (mouse hepatitis virus)
PPV	prasečí parvovirus (porcine parvovirus)
SV40	opičí virus 40 (simian vacuolating virus 40)
tVP1	zkrácený VP1 (truncated VP1)
VLPs	viru podobné částice (virus-like particles)
wt	divoký typ (wild type)

1. Úvod

Jednou ze základních vlastností proteinů virových kapsid je schopnost uspořádání se do větších celků. Některé druhy virů s ikozahedrání symetrií navíc dokáží skládat kapsidám podobné struktury bez přítomnosti nukleové kyseliny a proteinů hostitele.

První úrovní skládání je tvorba jednotlivých kapsomer. Při vhodných podmínkách (pH, iontová síla) je možné získat celé „kapsidy“. Tyto proteinové útvary mohou být prázdné nebo obsahovat fragmenty DNA a označují se VLPs, z anglického virus-like particles.

VLPs mají celou řadu vlastností, které je předurčují k tomu být dobrými nástroji pro humánní i veterinární medicínu. Stejně jako plné virové partikule obsahují imunogenní epitopy, vazebná místa pro buněčné receptory a v podstatě zachovávají tvar a objem virové partikule. Pokud jsou prázdné, nebo obsahují jen malé množství nukleové kyseliny (artefakt při přípravě apod.), liší se hmotností a hustotou od plných částic. To umožňuje jejich snadnou izolaci ultracentrifugací. Navíc je jejich terapeutické využití zcela bezpečné, protože neobsahují virovou nukleovou kyselinu a jsou tedy nereplikativní a neinfekční.

Přibližně v polovině osmdesátých let se začala zkoumat možnost přípravy VLPs, které by kromě majoritního kapsidového proteinu obsahovaly další proteiny. Tyto VLPs se dodnes označují jako chimerické (CVLPs). Nejprve byly připravovány CVLPs, které byly tvořeny ještě minoritními kapsidovými proteiny, později se dovnitř zabalovaly i některé produkty časných genů. Posléze byly vyvinuty CVLPs obsahující proteiny z více druhů virů. Během následujícího vývoje se objevily CVLPs s dalšími proteiny - bakteriálními, lidskými, zvířecími atd. Cizorodý epitop může být umístěn na povrch prázdné kapsidy nebo do jejího vnitřku. Většinou jsou CVLPs tvořeny hybridními proteiny, které vznikly expresí fúzního genu. Někdy je ale epitop na virový protein připojen kovalentní, nebo nekovalentní vazbou nebo (u malých ligandů) je cizí látka prostě zabalena do kapsidy.

V současnosti existují dva základní způsoby využití CVLPs. Buď jako vakcinace proti viru, z kterého je CVLPs odvozena nebo jako vektor pro imunoterapii. Dále je možno použít CVLPs pro tvorbu monoklonálních protilátek, jako vektory pro genovou terapii apod. CVLPs se připravují z proteinů virů hepatitidy (DELPEYROUX et al., 1986), rotavirů (FRENCH et al., 1990), filovirů (WARFIELD et al., 2003), polyomavirů, papillomavirů, parvovirů atd.

Ve své rešeršní práci jsem se soustředil na CVLPs malých DNA virů. Tomuto tématu bych se chtěl věnovat i ve své diplomové práci, která bude zaměřena na tvorbu polyomavirového vektoru nesoucího epitop Bcr/Abl pro imunoterapii chronické myeloidní leukémie.

2. Produkce virových proteinů

VLPs se dají získat dvěma hlavními způsoby: Složením *in vitro* z pentamerů, které byly izolovány po produkci majoritního virového kapsidového proteinu expresním systémem nebo jako již složené VLPs přímo z jader buněk exprimujících virové proteiny.

Pro produkci virových proteinů jsou využívány různé expresní systémy. Můžeme je rozdělit na systémy prokaryotické (*Escherichia coli*) a eukaryotické (kvasinky, hmyzí buňky, rostliny).

2.1 Prokaryotické expresní systémy

Zřejmě nepoužívanějším prokaryotickým organismem pro produkci virových proteinů je *E. coli*. Manipulace s ní je poměrně snadná a levná. VLPs se ale v tomto případě neskládají uvnitř buněk. V buňce *E. coli* je totiž redukční prostředí, což brání tvorbě VLPs, aniž by však bylo dotčeno skládání pentamerů. Takto vzniklé pentamery je nutné purifikovat a skládat *in vitro*. Existuje tedy riziko kontaminace, zkrácení imunitní odpovědi a zároveň je dosahováno nižších výtěžků. Nicméně takto získané VLPs mají většinou přesně definovanou velikost a lze s nimi očkovat (ZHANG et al., 2000).

Odlišná situace je u druhu *Lactobacillus casei* (AIRES et al., 2006) a atenuovaného kmene *Salmonella typhimurium* (NARDELLI-HAEFLIGER et al., 1997). VLPs se skládají přímo v cytoplazmě přičemž se předpokládá, že se proteiny shromažďují v místech s neredukčními podmínkami, tzv. mikrosférách. Tyto útvary vznikají v cytoplazmě bakteriálních buněk intenzivním shlukováním virových proteinů. AIRES et al., (2006) zjistili, že z buněk *L. casei* je možné izolovat prázdné kapsidy různých velikostí (33-60 nm). Při požadavku definovaných částic se tento rozptyl velikostí může stát problémem. V obou případech lze očkovat přímo bakteriálními buňkami, které produkují VLPs na sliznici. Druh *L. casei* je bezpečnější, protože je přirozený komenzál a nehrozí u něj reverze jako u atenuované *Salmonelly*. Výhodou atenuované *Salmonelly* je schopnost působit jako silné adjuvans.

2.2 Eukaryotické expresní systémy

Hlavní výhodou eukaryotických systémů je široký repertoár postranlačních úprav oproti prokaryotickým systémům a buněčná kompartmentalizace. Prázdné virové kapsidy se bez větších problémů skládají přímo v buňkách.

Nejproduktivnějším systémem je určitě systém bakulovirový. Po infekci hmyzích buněk rekombinantním bakulovirem jsou izolovány VLPs s relativně velkými výtěžky. Tyto VLPs je ale často nutné pracně purifikovat, protože jsou produkovány i částice různé velikosti,

objevují se různé trubicovité útvary apod. (KOSUKEGAWA et al., 1996). Jedno z možných řešení je použít jako rekombinantní vektor Semlike Forest virus a infikovat s ním buňky ledvin křečků (BHK) (HEINO et al., 1995). V tomto systému lze získat přesně definované částice. Podobně jako u bakulovirového systému je ovšem součástí pokusu poměrně dlouhá, složitá a nákladná příprava.

Přibližný kompromis nabízejí buňky kvasinek. Ať už se produkují virové proteiny v kvasinkách *Saccharomyces cerevisie* (HOFMANN et al., 1995), nebo *Schizosacharomyces pombe* (SASAGAVA et al., 1995) výsledky jsou podobné. Protože jsou posttranslační úpravy kvasinkových buněk podobnější savčím buňkám než hmyzím, VLPs se většinou skládají v jádrech kvasinek bez přítomnosti trubicovitých útvarů a „nestandardních“ útvarů. Produkce proteinů v kvasinkách je také jednodušší a levnější než v bakulovirových systémech, ale absolutní výtěžky jsou většinou menší (HOFMANN et al., 1995, SASAGAVA et al., 1995).

Na konci devadesátých let se začala rozvíjet další metoda produkce virových proteinů, jejíž výhodou jsou velmi nízké náklady. Jako expresní systémy se začaly používat transgenní rostliny z čeledi lilkovitých.

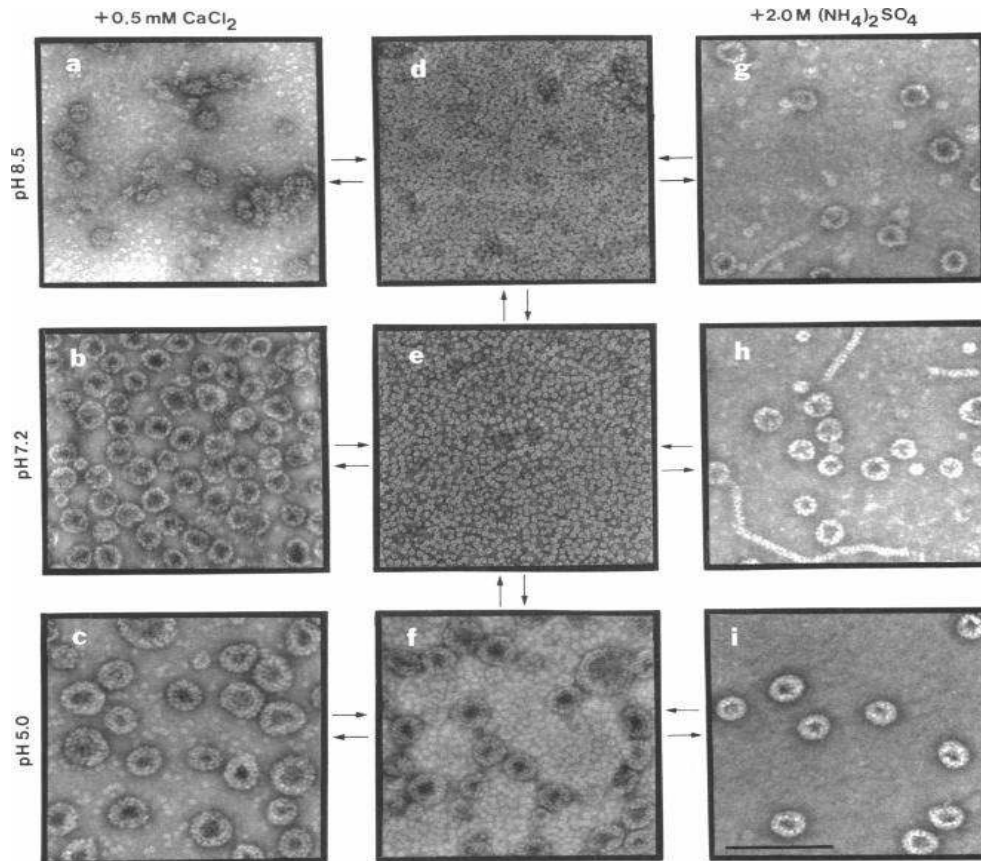
Proteiny HPV L1 produkované tabákem a lilkem se skládají do VLPs přímo v rostlinných buňkách. Tyto VLPs je možné použít jako vakcínu (BIEMELT et al., 2003). Rovněž LIU et al., (2005) získal standardní 55 nm HPV VLPs produkcí v tabáku. Oproti tomu když KOHL et al., (2006) připravovali VLPs z L1 CRPV (cottontail rabbit papillomavirus), pentamery se do VLPs neskládaly. Zatím není možné určit, jestli je to specifická vlastnost králičího papilomaviru nebo rozdíly v pracovním postupu.

Virový protein lze produkovat dvěma způsoby – buď infekcí virovým vektorem nebo transformací bakterií *Agrobacterium tumefaciens* obsahující plazmid, který se integruje do rostlinného genomu. Vedle nízkých nákladů je velkou výhodou jednoduchá manipulace s rekombinantními proteiny a také nepřítomnost živočišných endogenních provirů (riziko hmyzích a hlavně savčích buněk). Dosavadní dosažené výtěžky sice nejsou dostačující pro komerční výrobu, ale předpokládají se velké rezervy – hlavně ve vývoji transgenních rostlin (BIEMELT et al., 2003).

3. Obecné vlastnosti VLPs a CVLPs

3.1 Podmínky skládání

Nejdůležitější podmínkou vzniku VLPs je dostatečné množství majoritního virového proteinu (minoritní proteiny viz 3.2). Ten se samovolně skládá do pentameru a ve vhodných podmínkách okolního prostředí (přítomnost vápenatých iontů, neredukční prostředí, pH) i do vyšších celků.



Obr. 1. V horní řádce (a, d, g) jsou VLPs odvozené od myšního polyomaviru v pH 8.5, v prostřední (b, e, h) v pH 7 a v dolní (c, f, i) v pH 5. V prvním sloupci (a, b, c) jsou vápenaté ionty a neredukční podmínky, v druhém (d, e, f) redukční podmínky bez vápenatých iontů a v třetím (g, h, i) není vápník ani redukční podmínky, ale je zde vysoká iontová síla.

Fyziologickým podmínkám odpovídá (b) - tvoří se VLPs se standardními rozměry (průměr 45-50nm). Po zvýšení nebo snížení pH VLPs ubývá a klesá i počet standardních (a,c). V nepřítomnosti Ca^{2+} iontů a v redukčním prostředí se VLPs rozpadají do jednotlivých pentamerů (d,e). Pouze při snížení pH na se tvoří VLPs, jejichž rozměry kolísají od 30 do 100 nm (f). V třetím sloupci je různorodost agregátů největší. V zásaditém prostředí se objevují vláknité útvary (průměr kolem 150 nm) (g), kterých výrazně přibývá v neutrálním pH (h), ale které téměř vymizely v kyselém pH (i). SALUNKE et al., (1989).

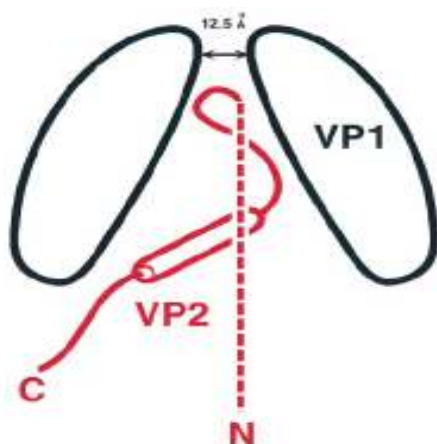
Podobně jako infekční viriony malých DNA virů i VLPs z nich odvozené potřebují pro své složení vápenaté ionty. Po přidání chelatačního činidla se partikule rozpadají do kapsomerových pentamerů. Když se k těmto pentamerům přidají vápenaté ionty, kapsidy se opět skládají (BRADY et al., 1977). Protože jsou peptidové řetězce ve virových proteinech spojeny mnoha disulfidickými můstky, rozpadají se kapsidy do pentamerů i při přidání silného redukčního činidla (BRADY et al., 1977). Kromě těchto dvou podmínek ovlivňují skládání VLPs i iontová síla a pH (obr. 1).

3.2 Minoritní proteiny

Mimo majoritního proteinu, který tvoří většinu virové kapsidy a tedy i VLPs, obsahují viriony i minoritní kapsidové proteiny. Ty mají většinou stavební funkce – stabilizaci kapsidy, vazbu DNA, mohou se ale podílet i na vstupu virionu do buněk nebo disociaci kapsid v endosomu.

U parvovirů se minoritní protein VP1 nachází ve vrcholu os tříčetné symetrie. Je velmi důležitý pro vyvolání imunitní odpovědi, protože 227 aa od N-konce vyčnívá ven z povrchu kapsidy. Je pravděpodobné, že se parvovirový protein VP1 podílí na vazbě na receptor (KAWASE et al., 1995). Protein VP2 je vlastně o 227 aa zkrácená verze proteinu VP1. Zkrátí-li se protein VP1 o 150 -227 aa, má podobné nebo stejné vlastnosti jako VP2 a je možné skládat VLPs pouze ze zkráceného minoritního proteinu (WONG et al., 1994).

U polyomavirů jsou dva minoritní proteiny: VP2 a jeho na N konci zkrácená verze VP3.



Obr.2 Reakce minoritního proteinu VP2/VP3 (N-konec VP2 čárkovaně) s pentamerem VP1 u polyomaviru (CHEN et al., 1998).

V každém VP1 pentameru se nachází jeden z těchto proteinů, celkem tedy 72 molekul VP2 nebo VP3 na jeden virion.

Minoritní proteiny nevyčnívají z povrchu kapsidy a nebyl nalezen důkaz, že by se vázaly na buněčné receptory. Existuje však teorie, že se při navázání virionu na receptor pentamery rozvolní. Tím je umožněna vazba myristilové kotvy proteinu VP2 do membrány hostitelské buňky (CHEN et al., 1998). Proteiny VP2 a

VP3 polyomaviru mají DNA vazebnou aktivitu a mohou se podílet na vazbě strukturních proteinů k virovému minichromosomu. Nejpravděpodobnější je ale úloha minoritních proteinů při disociaci kapsidy v endosomu, uvolnění DNA a tvorbě nových infekčních virionů v jádře. Polyomaviry s mutacemi v minoritních proteinech tvoří nefunkční viriony (MANNOVA et al., 2002) a většinou neobsahují dobře sbalenou DNA (BAROUCH A HARRISON, 1994).

Papilomavirové kapsidy obsahují jen jeden minoritní protein L2. Ten je na povrchu kapsidy. Na rozdíl od polyomavirů je jich v kapsidě méně, 12-35. Jejich funkce je rovněž poněkud odlišná, ovlivňují skládání kapsid o $T = 7$ a mají vazebná místa pro buněčné receptory (KAWANA et al., 2001, FINNEN et al., 2003). Při zkoumání vlivu mutací v L2 na infekčnost virionů bylo dosaženo velice podobných výsledků jako u polyomavirů – mutace v minoritních proteinech zabrání tvorbě funkčních virionů.

U malých DNA virů není nezbytná přítomnost minoritních kapsidových proteinů při skládání VLPs (KAJIGAYA et al., 1991). Nicméně se tyto proteiny pro *in vitro* tvorbu VLPs používají a to ze dvou důvodů: Především zvyšují stabilitu pseudokapsid. Za druhé bylo mnohokrát ověřeno (u parvovirů to platí vždycky), že minoritní proteiny výrazně zvyšují imunitní odpověď na VLPs (BANSAL et al., 1993, BREITBURD et al., 1995).

3.3 Velikost a lokalizace vložených fragmentů

Před vložením cizího epitopu na povrch nebo dovnitř VLPs je potřebné vyřešit vzhledem ke stabilitě vzniklých CVLPs dvě otázky: Velikost a lokalizace připojeného nebo vloženého proteinu. Dnes už je nezbytnou součástí přípravy k těmto pokusům modelování na počítačích.

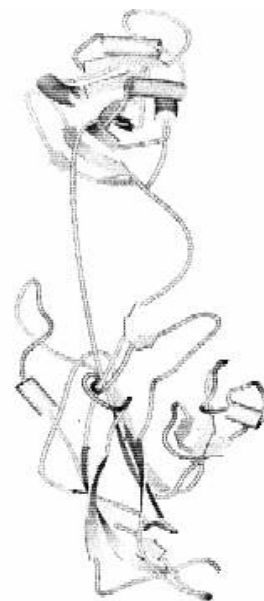
Cizorodé peptidy je možno vložit dovnitř VLPs nebo naopak vystavit na povrchu partikule. V obou případech jsou dobře prezentovány imunitnímu systému (proteiny vložené dovnitř pseudokapsidy jsou prezentovány na DC). Aby bylo možné skládání CVLPs z pentamerů, je nutné zohlednit prostorové zábrany. Někdy se například neskládají CVLPs z VP1 s dvěma připojenými epitopy 1 a 2 na jednom VP1, ale bez problému se složí CVLPs ze směsi proteinů VP1/epitop1 a VP1/epitop2 (SHIN A FOLK, 2003). Nicméně v některých případech je možné zvýšit imunitní odpověď připojením více (menších) epitopů na jeden VP1 protein (GEDVILATE et al. 2000, MIYAMURA et al., 1994).

U parvovirů je možné nahrazovat nejméně 150aa od N-konce VP1 cizím ligandem (viz 3.2). Ze směsi proteinů VP2 a ligand/tVP1 vznikaly CVLPs s mnoha zabudovanými molekulami ligand/tVP1. Na protein VP2 je možné oproti tomu připojit asi jen 10 aa (MIYAMURA et al., 1994)

Obr. 3. Model připojené enzymové domény (nahore) do HI smyčky polyomavirového proteinu VP1 (GLEITER et al., 1999)

U polyomavirů se cizí epitopy vkládají buď do povrchových smyček VP1, na C konec VP1 nebo dovnitř kapsidy na C-konec proteinu VP2 nebo VP3.

Experimentálně ověřená maximální možná velikost ligandu vloženého do povrchové smyčky (HI smyčka) polyomavirového proteinu VP1 je asi 150 aminokyselin. GLEITER et al., (1999) připojovali takto dlouhou enzymovou doménu a zkonstruovali CVLPs s rozměry 20-40 nm, CVLPs o standardních rozměrech (50 nm) nejsou zřejmě stabilní. GEDVILAITE et al., (2004) pokles stability při připojení 120 aminokyselin do míst 80-89 a 288-289 aa nepozorovali, ale vložení cizorodého epitopu do místa 220-240 aa provázal prudký pokles stability. Navíc VLPs měly zvýšenou tendenci agregovat. V obou těchto pokusech byl používán spojovací hydrofobní oligopeptid. Připojením proteinu EGFP dovnitř CVLPs na C-konec proteinu VP3 (kap.3.2) vznikají stabilní fluorescenční CVLPs, které lze použít k pozorování dynamiky CVLPs v buňce (BOUŘA et al., 2005).



Vkládání epitopů na povrch nebo dovnitř papilomavirových VLPs je podobné jako u polyomavirů. V pokuse SLUPETZKÉHO (2001) je dokázáno, že vložení cizího epitopu do imunodominantních míst proteinu L1 (282-286 a 351-355) zcela změní povahu protilátkové odpovědi. Ta je proti L1 naprosto zanedbatelná v porovnání s odpovědí proti cizímu peptidu.

Papilomaviry se používají podobně jako polyomaviry pro vkládání fragmentů dovnitř VLP. Při připojení cizorodého proteinu na L2 se směs proteinů L1 a ligand/L2 složí do CVLPs, které mají ligand vevnitř kapsidy. Takto lze prezentovat proteiny až několik set aminokyselin velké (GREENSTONE et al., 1998)

3.4 Vstup do buněk

Na jednu buňku se *in vitro* naváže až 20 000 VLPs, což zhruba odpovídá počtu infekčních virových partikulí (adenovirus 16000, poliovirus 3000). Stejně jako infekční viriony vstupují VLPs do buněk receptorem zprostředkovanou endocytózou. (VOLPERS et al., 1995).

Parvoviry se váží na P-antigeny, které jsou běžnými receptory na erythrocytech, endoteliích, fibroblastech, hladké svalovině placenty, nádorech a dalších intenzivně se dělících tkáních (BROWN et al., 1993). Lidské papillomaviry se váží na α -6 integrin a další integriny na buňkách epitelů (EVANDER et al. 1997). Polyomaviry BKV a MPyV mají afinitu k receptorům s koncovou sialovou kyselinu – hlavně gangliosidům G1b a G1a, SV40 k MHCI glykoproteinům (LOW et al., 2006) a JCV k serotoninovému receptoru (ELPHICK et al., 2004)

Po navázání na receptor se do 30 minut vytvoří membránový váček, který je buňkou internalizován. Váčky se spojují s ER, odkud neznámým způsobem cestují do jádra. Dendritické buňky a jiné APC pohlcují VLPs aktivní fagocytózou (LOW et al., 2006, TEGERSTEDT et al., 2007). Aby bylo možné pozorovat pseudokapsidy po vstupu přímo v buňce, byly vytvořeny CVLPs obsahující fluorescenční protein EGFP. Tento protein je připojen k minoritním proteinům a je uzavřen uvnitř kapsidy. Detekcí fluorescence lze získat informace o pohybu CVLPs po buňce (GILBERT et al 2004, BOUŘA et al.,2005).

3.5 Imunitní reakce na VLPs

Proti virové infekci se obratlovci brání třemi hlavními způsoby: Neutralizací a opsonizací protilátkami (Th2 typ imunitní odpovědi), zničením infikované buňky pomocí Tc buněk (Th1 odpověď) a nespecificky pomocí NK a tvorbou interferonů.

Odpověď na VLPs je převážně Th2 typu, ale mnohé CVLPs mohou vyvolat i Th1 odpověď (DUPUY et al., 1997).

Po aplikaci VLPs do organismu jsou partikule neutralizovány přirozenými protilátkami, ničeny komplementem a fagocytovány. Některé ze zbylých VLPs jsou pohlceny antigen prezentující buňkou (APC), většinou dendritickou buňkou (DC).

Parvovirové VLPs jsou pohlcovány DC a jejich fragmenty jsou prezentovány lymfocytům. VLPs způsobují zvýšení hustoty receptorů na povrchu DC, ale míra jejich maturace není zatím známa (MORON et al., 2002)

Polyomavirové VLPs sice aktivovaly v DC tvorbu IL-12, ale nezvyšovaly hustotu povrchových receptorů typických pro maturované DC *in vitro* (TEGERSTEDT et al., 2007,

BOUŘA et al., 2005). Současně probíhající výzkum však ukazuje, že DC mohou být *in vivo* aktivovány VLPs odvozenými z myšího polyomaviru (MAREK, osobní sdělení).

První APC, které přijdou do styku s virem HPV-16 po infekci jsou Langerhansovy buňky (LC). V práci FAUSCHE et al., (2002) je porovnávána aktivace DC a LC *in vitro* pomocí VLPs. Jednoznačným závěrem je, že zatímco DC maturují, migrují, aktivují T-lymfocyty a produkují IL-12, LC tyto aktivity nevykazují, nicméně nepůsobí ani imunosupresivně. Příčinou může být snížená hustota receptorů na povrchu LC nebo odlišná signální dráha spuštěná HPV VLPs.

YANG et al., (2004) popsal reakci HPV VLPs s dvěma odlišnými myšími slezinnými populacemi DC. Zatímco populace s transmembránovými proteiny $CD11^+ CD4^+$ produkovala interleukiny Th2 odpovědi, populace nesoucí $CD11^+ CD8^+$ produkovala $IFN\gamma$ a IL-12, podporující Th1 odpověď. Transmembránový protein na DC $CD8\alpha$ je homodimér, na rozdíl od heterodiméru $CD8\alpha\beta$, který se nachází v membráně Tc buněk.

Th2 odpověď

Maturované APC prezentují peptidy z VLPs na MHC II glykoproteinech. Th2 lymfocyty podporují proliferaci a aktivaci B-lymfocytů, které produkují příslušné protilátky. Když byly porovnávány protilátkové odpovědi proti pentamerům a proti VLPs, zjistilo se, že se liší jen nepatrně, v obou případech jsou však prokazatelně vyšší než proti purifikovaným proteinům. (BROWN et al., 1991, NEUGEBAUER et al., 2006). Nicméně je možné, že se alespoň jistá frakce pentamerů složí v organismu do VLPs a zásadně ovlivní výsledek srovnání (NEUGEBAUER et al., 2006).

Na VLPs se podobně jako na funkční viriony vážou protilátky typu IgM a po opakované inokulaci i IgG. Když byly VLPs podány na sliznici, vyvolávaly i silnou protilátkovou odpověď typu IgA. (SEDLIK et al., 1997, ZHANG et al., 2004, AIRES et al., 2006). Rozdíl v produkci protilátek proti VLPs a živým virům byl pozorován v T-deficientních myších. Zatímco proti živým virům se protilátky typu IgG tvořily, proti VLPs a pentamerům nikoliv. Je pravděpodobné, že množící virus aktivuje diferenciaci B lymfocytů (SZOMOLANYI-TSUDA et al., 1998)

Protilátková odpověď však není úplně žádoucí v případě, když se CVLPs používají jako vektory. Při opakované imunizaci jsou totiž CVLPs protilátkami (vytvořenými po prvním kontaktu s vektorem) neutralizovány dříve, než donesou cizí epitop do místa určení (TEGERSTEDT et al., 2005).

Th1 odpověď

Jako příklad mohou sloužit CVLPs HPV – 16 L1L2/E7. Ty jsou pohlcovány DC, které poté aktivují Th1 a Tc lymfocty. Aktivované CD8⁺ lymfocty specifické k proteinu E7 ničí buňky napadené virem, které produkují a prezentují E7 protein na MHC I molekulách (RUDOLF et al., 2001).

Poměrně atypickou odpověď aktivovaly CVLPs tvořené HBsA+fragment proteinu (gp120) viru HIV (SCHLIENGER et al., 1992). V tomto pokusu byly totiž aktivovány Th lymfocty obou typů, které intenzivně proliferovaly a aktivovaly tak buněčnou i protilátkovou odpověď.

4. VLPs a CVLPs parvovirů

Parvoviry jsou nejmenší DNA viry. Jejich neobalené partikule s T=1 měří kolem 25nm v průměru a jsou složeny z majoritního proteinu VP2 (60 jednotek), a minoritních proteinů VP1 a VP3. Dělí se na dvě podčeledi: *Densovirinae* a *Parvovirinae*. Z čeledi Parvovirinae jsou nejdůležitější tři rody: *Parvovirus*, *Erythrovirus* a rod *Dependovirus*. Dependoviry jsou významnými nástroji pro genovou terapii.

4.1 Rod *Erythrovirus*

Z rodu *Erythrovirus* je zřejmě nejdůležitější virus B19, který napadá především imunodeficientní jedince, děti a plody. Způsobuje tzv. pátou nemoc, aplastické krize a komplikace po transplantacích. Pokud jsou jeho strukturní proteiny produkovány v savčích buňkách, skládají se do prázdných kapsid (KAJIGAYA et al., 1991). Savčí buňky lze nahradit účinnějšími bakulovirovými expresními systémy. VLPs B19 jsou imunogenní samy o sobě a lze je tedy použít jako pro očkování proti viru B19 (KAJIGAYA et al., 1989).

Využití viru B19 jako vektoru pro cizí epitopy

Jedním z prvních pokusů, který měl objasnit vlastnosti viru B19 jako vektoru, bylo připojení 147 aminokyselinové domény lysozymu ze slepičího vejce na N-konec proteinu VP1 (3.2). Enzymová doména zůstala funkční i po připojení na VLPs. B19 se tedy jeví jako výborný vektor pro peptidovou terapii, případně pro onkolýzu (vložením „prodrug“) (MIYAMURA et al., 1994)

B19 je také testován jako nosič pro prezentaci proteinů z cizích virů. Po připojení epitopů

z herpes simplex viru (HSV) nebo viru myši hepatitidy (MHV) na N-konec kapsidového proteinu byla v obou případech detekována přítomnost protilátek proti proteinům ligandu i vektoru. Myši byly také částečně ochráněny proti letálním účinkům MHV (BROWN et al., 1994). V dalších pokusech byl umístěn na povrch kapsidy viru B19 protektivní antigen, toxin z druhu *Bacillus anthracis*. Očkování těmito CVLPs ochránilo myši před letální dávkou toxinu (OGASAWARA et. al., 2006). VLPs viru B19 byly dále použity při hledání vakcíny proti viru horečky dengue. K VP2 proteinu byly přidány fragmenty VP1 proteinu s doménou (nebo částí domény) III serotypu 2 viru horečky dengue. Sérum získané ze zvířat očkovaných těmito partikulami snížilo tvorbu plaků utvořených virem horečky dengue 40 až 120 krát (AMEXIS AND YOUNG, 2006).

4.2 Rod Parvovirus

Zástupci rodu parvovirus způsobují nemoci plodů a mláďat u zvířat. Viry jsou přísně druhově specifické a napadají kočky, psy, prasata, norky atd. Protože způsobují velké hospodářské ztráty, zkoumalo se možné využití jejich VLPs pro imunizace. Kromě použití jako vakcíny a vektoru pro imunoterapii se zkoumá využití VLPs pro onkolytické účely (SINGH et al., 2006).

Tým LOPEZE DE TURISO (1992) zkoušel očkovat psy CVLPs produkoványými hmyzími buňkami. CVLPs, obsahující proteiny VP2 a 1, ochránily všechna sledovaná pokusná zvířata před propuknutím nemoci způsobené psím parvovirem (CPV). Dosažené výsledky byly téměř srovnatelné s atenuovanou vakcínou. SALIKY (1992) naproti tomu získal očkováním CPV VLPs nižší hladiny protilátek, než které se dosahují po očkování atenuovanou vakcínou. To bylo pravděpodobně způsobeno tím, že jím použité pseudokapsidy neobsahovaly protein VP1 (viz 3.2).

CHRISTENSEN (1994) zkoušel očkovat norky CVLPs složených z proteinů VP1 a VP2. Tehdy ze dvou skupin očkovaných norků, kteří byli infikováni virem enteritidy norků (MEV) neonemocněl ani jeden. Výsledky byly srovnávány s běžnou mrtvou vakcínou. Zjistilo se, že VLPs složené pouze z proteinu VP2 jsou pro vakcinaci účinnější než mrtvá komerční vakcína.

Pro parvoviry zřejmě platí, že nejvyšší hladinu protilátek (nejúčinnější Th2 odpověď) vyvolává živá atenuovaná vakcína. Podle schopnosti vyvolat imunitní odpovědi je tedy možné vakcíny seřadit takto: atenuovaná vakcína – CVLPs (VP1/2) – VLPs (VP2) – mrtvá vakcína.

Rod Parvovirus jako vektor

I parvovirové CVLPs byly od začátku výzkumu používány jako vektory pro imunizaci. SEDLIK (1997) zkoumal možnosti ochrany myši před lymphocytickým choriomeningitickým virem (LCMV). Ve svých pokusech použil VLP prasečího parvoviru (PPV) s připojeným fragmentem LCM viru. Tyto partikule vyvolávaly imunitní odpověď buněčného typu. Očkování –bez adjuvans– ochránilo myši před letální dávkou viru. Kromě intraperitoneální imunizace byla testována možnost intranasální a perorální aplikace stejných CVLPs. Zatímco perorální imunizace odpověď nevyvolala, intranasální podání VLPs mělo částečný efekt v podobě protilátkové odpovědi, která ale neochránila myši před letální dávkou viru (SEDLIK et al 1999).

Dalším možným využitím parvovirových CVLPs je příprava nové vakcíny proti polio viru. Poliovirový epitop C3B byl umístěn na protein VP2. Podání těchto CVLPs vyvolalo imunitní odpověď Th2 typu proti parvovirovému vektoru i poliovirovému epitopu. (CASAL, 1999).

5. VLPs a CVLPs polyomavirů

Polyomaviry jsou malé neobalené DNA viry. Jejich partikule mají v průměru 45 nm a T=7. Jejich kapsomera se skládá z 360 (72 pentamerů) molekul majoritního proteinu VP1 a dvou minoritních proteinů: VP2 a VP3.

Do této čeledi se řadí 13 druhů. Z nich nejvýznamnější jsou BK (lidská onemocnění močové soustavy) a JC virus (lidská progresivní multifokální leukoencefalopatie), simian vacuolating virus (SV40) a myši polyomavirus (MPyV). Všechny známé viry této čeledi mají tumorogenní účinek. Lidské polyomaviry napadají většinou jedince s oslabenou imunitou.

VLPs se tvoří u všech dosud zkoumaných druhů z čeledi *Polyomaviridae*, lze je vyzolovat či sestavit *in vitro* jak ze samotného VP1, tak v přítomnosti VP2 nebo VP3. Vlastnosti VLPs nejsou obvykle ovlivněny přítomností DNA (SALUNKE et al., 1989, KOSUKEGAWA et al., 1996, RODGERS et al., 1994). Za jistých (dosud ne přesně specifikovaných) podmínek se však pentamery mohou vázat nespecificky na DNA a tvořit trubcovité útvary (MONTROSS et al., 1991).

5.1 Vektory pro prezentaci cizích epitopů

5.1.1 Imunizace

Podobně jako parvoviry jsou i polyomavirové CVLPs používány jako vektory pro prezentaci proteinů a navíc ještě jako vektory pro genovou terapii.

V prvních pokusech byla připojena do HI smyčky proteinu VP1 enzymová doména (dihydrofolát reduktáza z *Escherichia coli*). Tato doména na povrchu CVLPs vykazovala enzymatickou aktivitu *in vitro*. Po připojení enzymu ale CVLPs nebyly stabilní jako kopsidy divokého typu (wt) (GLEITER et al., 1999).

Když byl připojen na pentamery VP1 polyomaviru křečků (HaPyV) fragment S1 z pre-S1 domény HBV, v pokusných zvířatech se tvořily protilátky proti vektoru i viru hepatitidy (GEDVILATE et al., 2000). Dalším připojeným ligandem s podobnou imunitní odpovědí byla doména Z ze Stafylokokového proteinu A (GLEITER A LILIE, 2001).

Po připojení fragmentů z nukleokapsidového proteinu *Puumala* hantaviru na VP1 HaPyV, CVLPs vyvolávaly imunitní odpověď Th1 i Th2 typu proti proteinům polyomavirového vektoru i fragmentům *Puumala* viru. Při připojení delšího fragmentu *Puumala* viru (120aa) začala ale převažovat odpověď Th2. Je tedy zřejmě možné vytvářet kombinované vakcíny a dokonce délkou fragmentu regulovat typ imunitní odpovědi (GEDVILATE et al., 2004).

5.1.2 Imunoterapie nádorů pomocí PyV CVLPs

VLPs polyomavirů jsou zkoumány také z hlediska využití pro imunoterapii nádorů. Byly připraveny CVLPs s transmembránovou a extracelulární doménou proteinu Her2 připojenou na protein VP2 (dovnitř partikule). Protein Her-2/neu je fúzní protein prezentovaný na buňkách některých nádorů epitelu prsu a jiných epitelů (TEGERSTEDT et al., 2005). Imunizované myši nevytvářely proti Her2 epitopu protilátky, ale buňky, které nádorový protein produkovaly, byly zničeny Tc lymfocyty *in vitro*. Vakcína VP1/VP2Her2 sice neumožňuje odhojení už vytvořeného nádoru, ale ochrání proti letální dávce nádorových buněk (D2F2/E2). Ochrání také transgenní myši, které produkují v buňkách prsního epitelu potkaní Her2 protein, před tvorbou nádorů (TEGERSTEDT et al., 2005).

V dalších pokusech byly myši imunizovány dendritickými buňkami, izolovanými z kostní dřeni femuru a aktivovanými *in vitro* přidáním CVLPs VP1/VP2Her2. Po aplikaci aktivovaných DC byla sledována indukce imunitní odpovědi. Nejenže zvířatům stačily mnohem menší očkovací dávky, ale protilátková odpověď proti CVLPs se šestkrát zmenšila, aniž by to ovlivnilo odpověď typu Th1 (viz 3.5) (TEGERSTEDT et al., 2007).

V naší laboratoři byla připojena na C-konec proteinu VP3 značná část proteinu Bcr–Abl, což je fúzní protein prezentovaný na buňkách chronické myeloidní leukémie (CML). CVLPs se skládají *in vitro*. Na myším modelu zkoumáme aktivaci DC a imunitní odpověď proti leukemickým buňkám. Dosavadní výsledky ukazují že kvalita imunitní odpovědi závisí především na velikosti a umístění prezentovaného epitopu (BOHÁČOVÁ, ústní sdělení).

5.2 Použití polyomavirových CVLPs pro genovou terapii a onkolytické vektory

Polyomavirové CVLPs se používají také pro genovou terapii. Principem genové terapie je přenos cizích genů do konkrétního typu buněk. Stejně jako u imunoterapie je zde důležité přesné cílení vektoru.

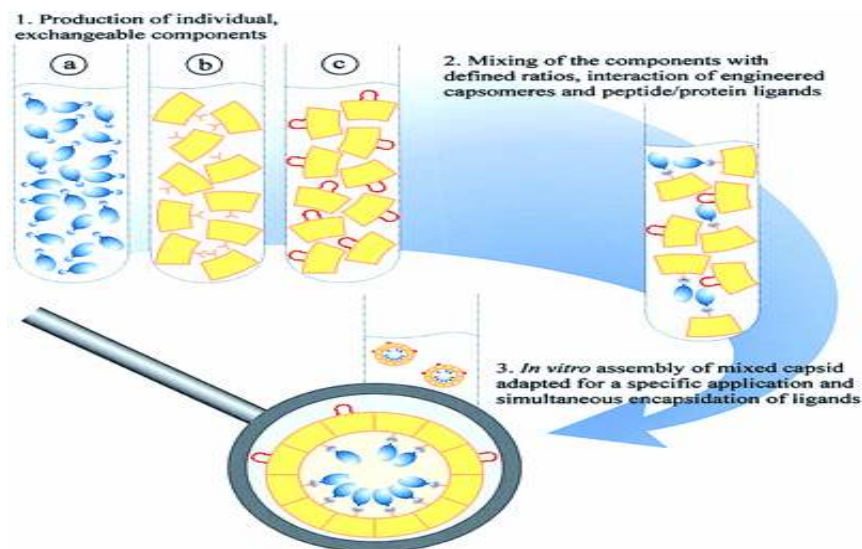
Nechají-li se pentamery skládat v přítomnosti cizí DNA a vysoké koncentraci soli (osmotický šok) tvoří se VLPs obsahující tuto cizí DNA. DNA se přitom váže nespecificky váže na VP1 MPyV (FORSTOVÁ et al., 1995), i SV 40 (SANDALON et al., 1997). Proteiny VP1 lze upravit přidáním epitopu se specifickou vazebnou aktivitou.

Jako u jiných virů i u polyomavirů se zkoumá možnost cílení CVLPs pomocí fragmentu protilátek. Vloží-li se do povrchové HI smyčky proteinu VP1 Fv část protilátky s protinádorovou specifitou, CVLPs se váží specificky na nádorové buňky (STUBENRAUCH et al., 2001). Výsledkem jsou téměř perfektní partikule pro antinádorovou genovou terapii.

Připojí-li se na protein VP1 část proteinu urokinázaplazminogen aktivatoru (uPa), váží se vzniklé CVPLs na receptor uPa. Protože je tento receptor přítomný také na některých nádorových buňkách, je možné takto cílit CVLPs obsahující gen nebo i terapeutikum (SHIN A FOLK, 2003).

Pro dosažení specifity pro konkrétní buňku i ligand byla připojena na VP1 dovnitř CVLPs WW doména FBP11, která váže polyprolin. Protein s polyprolinovou sekvencí se bude vázat na FBP11 a tím i dovnitř CVLPs. Přidá-li se do směsi VP1/FBP11 a proteinu s polyprolinovou sekvencí ještě VP1 s proteinovým adaptorem pro vazbu na konkrétní povrchové struktury cílových buněk, vzniknou dvojité chimerické CVLPs. Tyto CVLPs dopraví mnoho molekul vybraného proteinu specificky jen do některých buněk - Obr.4 (SCHMIDT et al. 2001).

Obr. 4. V části a) jsou ligandy určené k transportu, v části b) produkty fúzního genu VP1 s proteinovým nástavcem, v části c) produkty fúzního genu VP1 s ligandem pro buněčný receptor. Ze směsi těchto komponent se za definovaných podmínek vytvoří CVLPs, schopné dopravit ligand do jednoho typu buněk. (SCHMIDT et al., 2001)



Druhým typem použití VLPs jako dopravního systému je prosté zabalení cizí látky do partikule. Proteiny VP1 viru JCV se skládají a disociují v přítomnosti propidium jodidu. PI lze v partikulích snadno detekovat pomocí cytofluorometrie (GOLDMANN et al., 2000). Po přecílení takto upravených kapsid by bylo možné doslova „posílat“ do nádorových buněk jedy nebo toxiny.

Polyomavírové VLPs se tedy výrazně neuplatňují jako jednoduché vakcíny. O to více se pracuje na jejich použití pro kombinované vakcíny, imunoterapii a genovou terapii. Pro genovou terapii je velmi výhodná jejich vlastnost nespecificky vázat DNA.

Problémem při použití PyV VLPs je jejich neschopnost opustit endosom (na rozdíl od virionu kap. 3.4) což vede k jejich předčasné degradaci (STUBENRAUCH et al 2001).

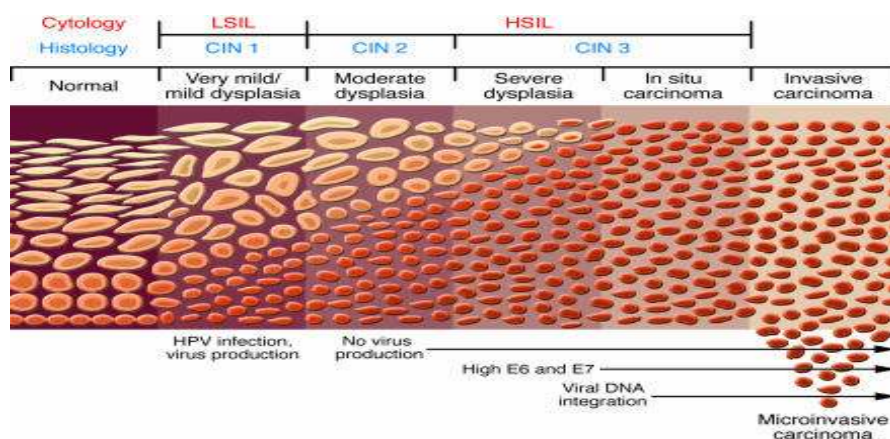
6. VLPs a CVLPs papilomavirů

Papilomaviry jsou neobalené DNA viry s kapsidou 55nm v průměru a T=7. Kapsida je tvořena 360 (72 pentamerů) molekulami proteinu L1 a minoritním DNA vazebným proteinem L2.

Papilomaviry jsou tumorogenní a napadají obratlovce včetně člověka. Lidské papilomaviry (HPV) se dělí podle genotypu na více než 100 typů. Typy HPV1-4 způsobují obyčejné bradavice, HPV6 a HPV11 jsou zodpovědné za vznik genitálních bradavic. Nejnebezpečnější jsou typy HPV16 a 18, které způsobují displazii epitelu a byly nalezeny v nádorech rakoviny děložního čípku (HPV16 až v 50% všech případů).

Za jejich onkogenní vlastnosti jsou zodpovědné dva nestrukturní proteiny: E6, který ubiquitiniluje p53 (SCHEFFNER et al., 1993) a E7, který způsobuje disociaci komplexu EF2–pRb (CHELLAPPAN et al., 1992).

Kromě vakcinace proti proteinům kapsidy se tedy také zjišťovala možnost vyvolání imunitní odpovědi proti těmto onkogenům (imunoterapie).



Obr. 5 Patologické změny v epitelu způsobené papilomavirem HPV 16 (LOWY A SCHILLER, 2006).

6.1 VLPs obsahující pouze strukturní proteiny – vakcinace

Tento problém řešili KIRNBAUER et al., (1992) produkcí hlavního kapsidového proteinu L1 bovinního viru (BPV) a HPV-16 nebo HPV-18 pomocí bakulovirového expresního systému. Proteiny L1 se skládají do kapsidy a vyvolávají efektivní imunitní odpověď Th2 typu u králíků. V rámci snahy o nalezení preventivní vakcíny proti HPV byly studovány i možnosti nestandardních adjuvans (mutovaný toxin z E.coli a nemetylovaná DNA) a forem vakcinace (GERBER et al., 2001). Při orálním podávání VLPs HPV-16 a HPV-18 myším byla imunitní

odpověď třikrát vyšší s adjuvans než bez něho. BALMELLI et al., (1998) zjistili, že intranasální imunizace mírně zvyšuje hladinu protilátek, ale perorální očkování nikoli. Silné adjuvans je ale nutné v obou případech. Výsledně je tedy nejúčinnější očkování do podkožních vrstev (CHRISTENSEN et al., 1994), intranasální méně, a nejproblematictější je imunizace perorálně. Přitom očkování na sliznici je výhodné, jak z hlediska použití tak díky aktivaci specifického typu imunitní odpovědi.

Protože jsou papilomavirové minoritní proteiny umístěny na povrchu kapsidy (viz 3.2), lze vyvolat imunitní odpověď proti L2 proteinům jiného typu HPV. V konkrétním pokuse byl připojen epitop L2 z HPV6 na L1 viru HPV16. Vyvolaná Th2 odpověď byla namířena proti proteinům z obou virů. (VARSANI et al., 2003). Další vývoj bude zřejmě směřovat k připojování minoritních proteinů dalších HPV.

V současnosti už probíhají III. (poslední) fáze pokusů s profylatickými vakcínami: Merckelova a GlaxoSmithKline vakcína. Merckelova quadrivalentní vakcína obsahuje VLPs čtyř typů HPV: 6, 11, 16 a 18 (viz 6.2). VLPs jsou složeny z proteinu L1 produkovaného hmyzími buňkami a jako adjuvans se používá oxid hlinitý. Tato vakcína ochránila všechny pokusné osoby před vznikem rakoviny děložního čípku i genitálních bradavic. GlaxoSmithKline vakcína je bivalentní, obsahuje CVLPs z proteinů L1 typů HPV16 a 18 produkovaného kvasinkami. I tato vakcína prošla všemi testy a je už komerčně dostupná. Protože se typy HPV 6, 11, 16 a 18 šíří pohlavním stykem, je nejlepším věkem pro očkování pubertální období. Stále však zbývá vyřešit několik technických problémů: Tyto vakcíny jsou pouze profylaktické, a léčebné účinky malé. Hlavním problémem ovšem zůstává jejich cena s ohledem na to, že jsou tyto vakcíny nejvíce potřebné v zemích třetího světa. (LOWY A SCHILLER, 2006).

Paralelně s vývojem vakcíny proti lidským papilomavírům probíhal vývoj proti papilomavírům zvířecím. Při přípravě vakcíny proti CRPV (Cottontail rabbit papilomavirus), bylo použito několik strategií. Z různých možností – VLPs z L1 bez adjuvans, z L1 s adjuvans L1/L2 apod. se nejlepší ukázala být VLP z proteinů L1/L2 s Freundovým adjuvans. (BREITBURD et al., 1995) Tato kombinace byla účinnější než ostatní zmíněné, ale hlavně ochránila králíky před vznikem papilomů výrazně lépe než denaturovaný L1. Specifita vakcíny byla ověřena podáním irelevantních VLPs, které neměly ochranný účinek.

Jako další příklad použití VLPs pro veterinární účinky může sloužit bovinní papilomavirus 4 (BPV 4). Podání CVLPs tvořené proteinem L1/L2 ochránilo 13 z 15 krav před tvorbou papilomu. V porovnání s tím 9 z 10 krav kontrolního souboru vytvořilo papilomy po infekci BPV 4 (KIRNBAUER et al., 1996).

6.2 CVLPs obsahující nestrukturní proteiny, proteiny jiných virů a geny

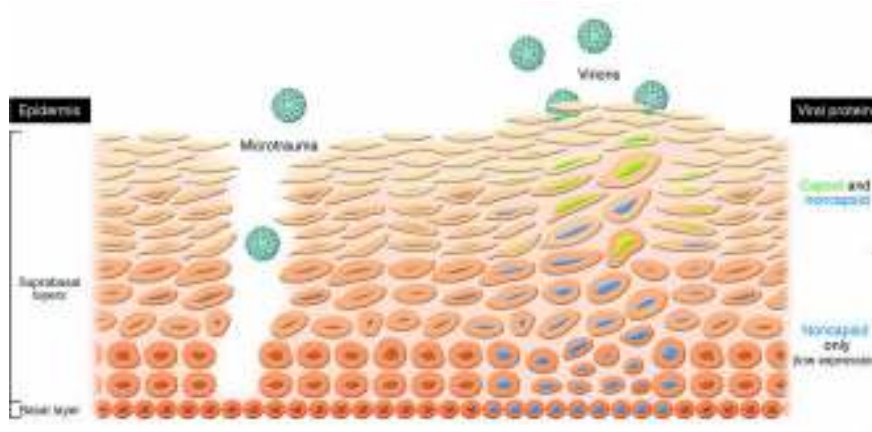
Jsou dva způsoby přípravy vakcín proti více HPV najednou. Buď jako směs VLPs, kde každá obsahuje proteiny pouze z jednoho HPV (SCHILLER A LOWY 2006, kap.6.1) nebo jako CVLPs obsahující proteiny z více HPV na jedné VLP.

Například v pokuse CHRISTENSENA et al., (2001) byl umístěn epitop proteinu L1 HPV16 na protein L1 HPV11. Kapsidy se bez větších problémů skládaly a zvířata produkovala protilátky proti oběma proteinům.

Nádorová imunita

Z charakteru rakovinového onemocnění vyplývá, že odpověď zprostředkovaná Tc lymfocyty bude účinnější. Nádorové buňky totiž nejsou ničeny v průběhu odpovědi Th2 typu. Na to, aby byla buňka objevena a zničena APC aktivovaným Tc lymfocitem je nutné, aby prezentovala cílové epitopy na MHC I glykoproteinech.

Na základě této úvahy a poznatků o životním cyklu papilomavirů (viz obr. 6) byly vytvořeny první partikule obsahující onkogeny papilomavirů (MÜLLER et al., 1997).



Obr. 6. Životní cyklus papilomavirů. Kapsidové proteiny jsou produkovány až v pozdější fázi infekce. Na MHC I bazálních buněk jsou tedy prezentovány mimo jiné i nestrukturní proteiny E6 a E7 (Lowy a Schiller 2006).

Když byla na povrchový C-konec proteinu L1 připojena část E7 (až 60 aa), vyvolala v pokusných zvířatech protilátkovou odpověď. Po vstupu CVLP do buňky se ovšem objevovaly fragmenty E7 i na MHC I (MÜLLER et al., 1997) Mnohem účinnější ochranu ovšem poskytují HPV16 CVLPs, které obsahují proteiny E7 a E2. Tyto proteiny jsou připojeny k L2 a nejsou tedy na povrchu, ale uvnitř partikulí. (GREENSTONE et al., 1998). Partikule L1/L2/E2 nebo E7 vyvolávají jednak protilátkovou odpověď proti L1, ale hlavně cytotoxickou odpověď proti E2/E7. Po vakcinaci CVLPs a následné aplikaci nádorových

buněk prezentujících na povrchu E7 jsou tyto nádorové buňky ničeny Tc lymfocyty. Kontrolní soubory očkované pouze L1/L2 tvoří nádory, které nejsou odhojovány (GREENSTONE et al., 1998). Protože je většina vakcín pouze preventivních, nepomáhá jejich aplikace v průběhu nemoci (SCHILLER A LOWY, 2006). L1/L2/E2 CVLPs budou pravděpodobně snižovat progresi nádoru, ale jejich nevýhodou je zavádění onkogenů do organismu. Rozvoj intenzivního zánětu v místě infekce (Tc lymfocyty) je diskutabilní už z principu. Nadějně jsou výsledky ZHANGA et al., (2000), kteří zrychlili odhojování genitálních bradavic pomocí L1/L2 CVLPs.

Zkoumala se také možnost připojení nepapilomavirových fragmentů na kapsidový protein L1. Protilátky proti viru HIV jsou většinou produkovány až v pozdějším stadiu infekce. Primární infekce virem HIV ale končí většinou abortivně v případě, že jsou v organismu připravené protilátky.

Pokud se do oblasti 282–286 a 351–355 L1 (povrchové imunodominantní smyčky) HPV přidá fragment z gp 41 viru HIV, myši produkovaly protilátky proti tomuto fragmentu (SLUPETZKY et al., 2001). ZHANG et al., (2004) dále pracovali s BPV jako vektorem a podobným fragmentem gp 41. Zjistil, že vyvolání slizniční Th2 odpovědi ochrání zvířata před nákazou virem HIV. Navíc myši produkovaly protilátky použitelné jako pasivní sérum.

Využití CVLPs pro genovou terapii

Poněkud méně zkoumanou je možnost využití papilomavirových CVLPs pro genovou terapii. Byl-li na L2 připojen konstrukt obsahující gen pro nestrukturní protein E6, buňky produkovaly tento protein. Jeho fragmenty prezentovaly na MHC I glykoproteinech a byly ničeny Tc lymfocyty. Tyto CVLPs je možné použít pro antinádorovou terapii (MALBOEUF et al., 2007).

Papilomavirové VLPs se tedy už používají jako vakcíny v humánní i veterinární medicíně. Jejich CVLPs lze použít pro kombinovanou vakcínu, ale také pro terapeutické účely. Velké rezervy se předpokládají ve využití CVLPs jako vektoru pro genovou terapii a imunoterapii.

7. Závěr

V této práci jsou srovnávány možnosti konstrukce a využití VLPs a CVLPs odvozených od malých DNA virů. Parvovirové VLPs je možné využít pro vakcinaci, především ve veterinární praxi a CVLPs od nich odvozené jako vektor pro prezentaci cizích epitopů. Polyomavirové CVLPs lze využít navíc jako vektor pro genovou a protinádorovou terapii. Papilomavirové VLPs jsou již běžně používány pro vakcinaci proti HPV-16 a -18, které jsou zodpovědné za vznik nádorů děložního čípku. Předpokládají se velké rezervy ve využití papilomavirých CVLPs pro prezentaci cizích epitopů a genovou terapii. Částice odvozené od virových kapsidových proteinů mají již nyní využití v prevenci a terapii některých virových onemocnění. Velké rezervy jsou zatím v použití CVLPs jako nosičů peptidů a nukleových kyselin pro protinádorovou a genovou terapii. Další možnosti skýtá použití těchto virových struktur v nanotechnologiích.

Seznam literatury

- Aires, K.A., Cianciarullo, A.M., Carneiro, S.M., Villa, L.L., Boccardo, E., Perez-Martinez, G., Perez-Arellano, I., Oliveira, M.L., Ho, P.L. (2006): Production of human papillomavirus type 16 L1 virus-like particles by recombinant *Lactobacillus casei* cells. *Appl Environ Microbiol.* 72: 745-52
- Amexis, G., Young, N.S. (2006): Parvovirus B19 empty capsids as antigen carriers for presentation of antigenic determinants of dengue 2 virus. *J Infect Dis.* 194: 790-4.
- Balmelli, C., Roden, R., Potts, A., Schiller, J., De Grandi, P., Nardelli-Haeffliger, D. (1998): Nasal immunization of mice with human papillomavirus type 16 virus-like particles elicits neutralizing antibodies in mucosal secretions. *J Virol.* 72: 8220-9.
- Bansal, G.P., Hatfield, J.A., Dunn, F.E., Kramer, A.A., Brady, F., Riggin, C.H., Collett, M.S., Yoshimoto, K., Kajigaya, S., Young, N.S. (1993): Candidate recombinant vaccine for human B19 parvovirus. *J Infect Dis.* 167: 1034-44.
- Barouch D.H., Harrison S.C. (1994): Interactions among the major and minor coat proteins of polyomavirus. *J Virol.* 68:3982-9.
- Biemelt S, Sonnewald U, Galmbacher P, Willmitzer L, Muller M. (2003): Production of human papillomavirus type 16 virus-like particles in transgenic plants. *J Virol.* 77: 9211-20.
- Boura, E., Liebl, D., Spisek, R., Fric, J., Marek, M., Stokrova, J., Holan, V., Forstova, J. (2005): Polyomavirus EGFP-pseudocapsids: analysis of model particles for introduction of proteins and peptides into mammalian cells. *FEBS Lett.* 579: 6549-58
- Brady, J.N., Winston, V.D., Consigli, R.A. (1977): Dissociation of polyoma virus by the chelation of calcium ions found associated with purified virions. *J Virol.* 23: 717-24.
- Breitburd, F., Kirnbauer, R., Hubbert, N.L., Nonnenmacher, B., Trin-Dinh-Desmarquet, C., Orth, G., Schiller, J.T., Lowy, D.R. (1995): Immunization with viruslike particles from cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) can protect against experimental CRPV infection. *J Virol.* 69: 3959-63.
- Brown, C.S., Van Lent, J.W., Vlak, J.M., Spaan, W.J. (1991): Assembly of empty capsids by using baculovirus recombinants expressing human parvovirus B19 structural proteins. *J Virol.* 65: 2702-6.
- Brown, K.E., Anderson, S.M., Young, N.S. (1993): Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus. *Science.* 262: 114-7.
- Brown, C.S., Welling-Wester, S., Feijlbrief, M., Van Lent, J.W., Spaan, W.J. (1994): Chimeric parvovirus B19 capsids for the presentation of foreign epitopes. *Virology.* 198: 477-88.
- Casal JI. (1999): Use of parvovirus-like particles for vaccination and induction of multiple immune responses. *Biotechnol Appl Biochem.* 29:141-50.

Chellappan S, Kraus VB, Kroger B, Munger K, Howley PM, Phelps WC, Nevins JR. (1992): Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89: 4549-53.

Chen, X.S., Stehle, T., Harrison, S.C. (1998): Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with the major capsid protein VP1 and implications for participation of VP2 in viral entry. *EMBO J* 17: 3233-40.

Christensen, J., Alexandersen, S., Bloch, B., Aasted, B., Uttenthal, A. (1994): Production of mink enteritis parvovirus empty capsids by expression in a baculovirus vector system: a recombinant vaccine for mink enteritis parvovirus in mink. *J Gen Virol.* 75: 149-55.

Christensen, N.D., Kirnbauer, R., Schiller, J.T., Ghim, S.J., Schlegel, R., Jenson, A.B., Kreider, J.W. (1994): Human papillomavirus types 6 and 11 have antigenically distinct strongly immunogenic conformationally dependent neutralizing epitopes. *Virology.* 205: 329-35.

Christensen, N.D., Cladel, N.M., Reed, C.A., Budgeon, L.R., Embers, M.E., Skulsky, D.M., McClements, W.L., Ludmerer, S.W., Jansen, K.U. (2001): Hybrid papillomavirus L1 molecules assemble into virus-like particles that reconstitute conformational epitopes and induce neutralizing antibodies to distinct HPV types. *Virology.* 291: 324-34.

Delpeyroux, F., Chenciner, N., Lim, A., Malpiece, Y., Blondel, B., Crainic, R., van der Werf, S., Streeck, R.E. (1986): A poliovirus neutralization epitope expressed on hybrid hepatitis B surface antigen particles. *Science.* 233: 472-5.

Dupuy, C., Buzoni-Gatel, D., Touze, A., Le Cann, P., Bout, D., Coursaget, P. (1997): Cell mediated immunity induced in mice by HPV 16 L1 virus-like particles. *Microb Pathog.* 22: 219-25.

Elphick, G.F., Querbes, W., Jordan, J.A., Gee, G.V., Eash, S., Manley, K., Dugan, A., Stanifer, M., Bhatnagar, A., Kroeze, W.K., Roth, B.L., Atwood, W.J. (2004): The human polyomavirus, JCV, uses serotonin receptors to infect cells. *Science.* 306: 1380-3.

Evander, M., Frazer, I.H., Payne, E., Qi, Y.M., Hengst, K., McMillan, N.A. (1997): Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol.* 71: 2449-56.

Fausch, S.C., Da Silva, D.M., Rudolf, M.P., Kast, W.M. (2002): Human papillomavirus virus-like particles do not activate Langerhans cells: a possible immune escape mechanism used by human papillomaviruses. *J Immunol.* 169: 3242-9.

Finnen, R.L., Erickson, K.D., Chen, X.S., Garcea, R.L. (2003): Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins. *J Virol.* 77: 4818-26.

Forstova, J., Krauzewicz, N., Sandig, V., Elliott, J., Palkova, Z., Strauss, M., Griffin, B.E. (1995): Polyoma virus pseudocapsids as efficient carriers of heterologous DNA into mammalian cells. *Hum Gene Ther.* 6: 297-306.

French, T.J., Marshall, J.J., Roy, P. (1990): Assembly of double-shelled, viruslike particles of bluetongue virus by the simultaneous expression of four structural proteins. *J Virol.* 64: 5695-700.

Gedvilaite, A., Frommel, C., Sasnauskas, K., Micheel, B., Ozel, M., Behrsing, O., Staniulis, J., Jandrig, B., Scherneck, S., Ulrich, R. (2000): Formation of immunogenic virus-like particles by inserting epitopes into surface-exposed regions of hamster polyomavirus major capsid protein. *Virology.* 273: 21-35.

Gedvilaite, A., Zvirbliene, A., Staniulis, J., Sasnauskas, K., Kruger, D.H., Ulrich, R (2004): Segments of puumala hantavirus nucleocapsid protein inserted into chimeric polyomavirus-derived virus-like particles induce a strong immune response in mice. *Viral Immunol.* 17: 51-68.

Gerber, S., Lane, C., Brown, D.M., Lord, E., DiLorenzo, M., Clements, J.D., Rybicki, E., Williamson, A.L., Rose, R.C. (2001): Human papillomavirus virus-like particles are efficient oral immunogens when coadministered with Escherichia coli heat-labile enterotoxin mutant R192G or CpG DNA. *J Virol.* 75: 4752-60.

Gilbert, L., Toivola, J., Lehtomaki, E., Donaldson, L., Kapyla, P., Vuento, M., Oker-Blom, C. (2004): Assembly of fluorescent chimeric virus-like particles of canine parvovirus in insect cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 313: 878-87.

Gleiter, S., Stubenrauch, K., Lilie, H. (1999): Changing the surface of a virus shell fusion of an enzyme to polyoma VP1. *Protein Sci.* 8: 2562-9.

Gleiter, S., Lilie, H. (2001): Coupling of antibodies via protein Z on modified polyoma virus-like particles. *Protein Sci.* 10: 434-44.

Goldmann, C., Stolte, N., Nisslein, T., Hunsmann, G., Luke, W., Petry, H. (2000): Packaging of small molecules into VP1-virus-like particles of the human polyomavirus JC virus. *J Virol Methods.* 90: 85-90.

Greenstone, H.L., Nieland, J.D., de Visser, K.E., De Bruijn, M.L., Kirnbauer, R., Roden R.B., Lowy, D.R., Kast, W.M., Schiller, J.T. (1998): Chimeric papillomavirus virus-like particles elicit antitumor immunity against the E7 oncoprotein in an HPV16 tumor model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95: 1800-5.

Heino, P., Dillner, J., Schwartz, S. (1995): Human papillomavirus type 16 capsid proteins produced from recombinant Semliki Forest virus assemble into virus-like particles. *Virology.* 214: 349-59.

Hiebert, S.W., Chellappan, S.P., Horowitz, J.M., Nevins, J.R. (1992): The interaction of RB with E2F coincides with an inhibition of the transcriptional activity of E2F. *Genes Dev.* 6: 177-85.

- Hofmann, K.J, Cook, J.C, Joyce, J.G., Brown, D.R., Schultz, L.D., George, H.A., Rosolowsky, M., Fife, K.H., Jansen, K.U. (1995): Sequence determination of human papillomavirus type 6a and assembly of virus-like particles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Virology*. 209: 506-18.
- Kajigaya, S., Shimada, T., Fujita, S., Young, N.S. (1989): A genetically engineered cell line that produces empty capsids of B19 (human) parvovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 86: 7601-5.
- Kajigaya, S., Fujii, H., Field, A., Anderson, S., Rosenfeld, S., Anderson, L.J., Shimada, T., Young, N.S. (1991): Self-assembled B19 parvovirus capsids, produced in a baculovirus system, are antigenically and immunogenically similar to native virions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88: 4646-50.
- Kawana, Y., Kawana, K., Yoshikawa, H., Taketani, Y., Yoshiike, K., Kanda, T. (2001): Human papillomavirus type 16 minor capsid protein L2 N-terminal region containing a common neutralization epitope binds to the cell surface and enters the cytoplasm. *J Virol*. 75: 2331-6.
- Kawase, M., Momoeda, M., Young, N.S., Kajigaya, S. (1995): Most of the VP1 unique region of B19 parvovirus is on the capsid surface. *Virology*. 211: 359-66
- Kirnbauer, R., Booy, F., Cheng, N., Lowy, DR., Schiller, J.T. (1992): Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89: 12180-4.
- Kirnbauer, R., Chandrachud, L.M., O'Neil, B.W., Wagner, E.R., Grindlay, G.J., Armstrong, A., McGarvie, G.M., Schiller, J.T., Lowy, D.R., Campo, M.S. (1996): Virus-like particles of bovine papillomavirus type 4 in prophylactic and therapeutic immunization. *Virology*. 219: 37-44.
- Kohl, T., Hitzeroth, I.I., Stewart, D., Varsani, A., Govan, V.A., Christensen, N.D., Williamson, A.L., Rybicki, E.P. (2006): Plant-produced cottontail rabbit papillomavirus L1 protein protects against tumor challenge: a proof-of-concept study. *Clin Vaccine Immunol*. 13: 845-53
- Kosukegawa, A., Arisaka, F., Takayama, M., Yajima, H., Kaidow, A., Handa, H. (1996): Purification and characterization of virus-like particles and pentamers produced by the expression of SV40 capsid proteins in insect cells. *Biochim Biophys Acta*. 1290: 37-45.
- Liu, H.L., Li, W.S., Lei, T., Zheng, J., Zhang, Z., Yan, X.F., Wang, Z.Z., Wang, Y.L., Si, L.S. (2005): Expression of human papillomavirus type 16 L1 protein in transgenic tobacco plants. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 37: 153-8.
- Lopez de Turiso, J.A., Cortes, E., Martinez, C., Ruiz de Ybanez, R., Simarro, I., Vela, C., Casal, I. (1992): Recombinant vaccine for canine parvovirus in dogs. *J Virol*. 66: 2748-53.
- Low, J.A., Magnuson, B., Tsai, B., Imperiale, M.J. (2006): Identification of gangliosides GD1b and GT1b as receptors for BK virus. *J Virol*. 80: 1361-6.

- Malboeuf, C.M., Simon, D.A., Lee, Y.E., Lankes, H.A., Dewhurst, S., Frelinger, J.G., Rose, R.C. (2007): Human papillomavirus-like particles mediate functional delivery of plasmid DNA to antigen presenting cells in vivo. *Vaccine*. 2007 [Epub ahead of print]
- Mannova, P., Liebl D., Krauzewicz, N., Fejtova, A., Stokrova, J., Palkova, Z., Griffin, B.E., Forstova, J. (2002). Analysis of mouse polyomavirus mutants with lesions in the minor capsid proteins. *J Gen Virol*. 83:2309-19.
- Miyamura, K., Kajigaya, S., Momoeda, M., Smith-Gill, S.J., Young, N.S. (1994): Parvovirus particles as platforms for protein presentation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91: 8507-11.
- Montross, L., Watkins, S., Moreland, R.B., Mamon, H., Caspar, D.L., Garcea, R.L. (1991): Nuclear assembly of polyomavirus capsids in insect cells expressing the major capsid protein VP1. *J Virol*. 65: 4991-8.
- Moron, G., Rueda, P., Casal, I., Leclerc, C. (2002): CD8alpha- CD11b+ dendritic cells present exogenous virus-like particles to CD8+ T cells and subsequently express CD8alpha and CD205 molecules. *J Exp Med*. 195: 1233-45.
- Muller M, Zhou J, Reed TD, Rittmuller C, Burger A, Gabelsberger J, Braspenning J, Gissmann L. (1997): Chimeric papillomavirus-like particles. *Virology* ;234: 93-111.
- Nardelli-Haeffliger, D., Roden, R.B, Benyacoub, J., Sahli, R., Kraehenbuhl, J.P., Schiller, J.T., Lachat, P., Potts, A., De Grandi, P. (1997): Human papillomavirus type 16 virus-like particles expressed in attenuated *Salmonella typhimurium* elicit mucosal and systemic neutralizing antibodies in mice. *Infect Immun*. 65: 3328-36.
- Neugebauer, M., Walders, B., Brinkman, M., Ruehland, C., Schumacher, T., Bertling, W.M., Geuther, E., Reiser, C.O., Reichel, C., Strich, S., Hess J. (2006): Development of a vaccine marker technology: display of B cell epitopes on the surface of recombinant polyomavirus-like pentamers and capsoids induces peptide-specific antibodies in piglets after vaccination. *Biotechnol J*. 1: 1435-46.
- Ogasawara, Y., Amexis, G., Yamaguchi, H., Kajigaya, S., Leppla, S.H., Young, N.S. (2006): Recombinant viral-like particles of parvovirus B19 as antigen carriers of anthrax protective antigen. *In Vivo*.20: 319-24.
- Rodgers, R.E., Chang, D., Cai, X., Consigli, RA. (1994): Purification of recombinant budgerigar fledgling disease virus VP1 capsid protein and its ability for in vitro capsid assembly. *J Virol*. 68: 3386-90.
- Rudolf, M.P., Fausch, S.C., Da Silva, D.M., Kast, W.M. (2001): Human dendritic cells are activated by chimeric human papillomavirus type-16 virus-like particles and induce epitope-specific human T cell responses in vitro. *J Immunol*. 166: 5917-24.
- Saliki, J.T., Mizak, B., Flore, H.P., Gettig, R.R., Burand, J.P., Carmichael, L.E., Wood, H.A., Parrish, C.R. (1992): Canine parvovirus empty capsids produced by expression in a baculovirus vector: use in analysis of viral properties and immunization of dogs. *J Gen Virol*. 73:369-74.

Salunke, D.M., Caspar, D.L., Garcea, R.L. (1989): Polymorphism in the assembly of polyomavirus capsid protein VP1. *Biophys J.* 56: 887-900.

Sandalon, Z., Dalyot-Herman, N., Oppenheim, A.B., Oppenheim, A. (1997): In vitro assembly of SV40 virions and pseudovirions: vector development for gene therapy. *Hum Gene Ther.* 8: 843-9.

Sasagawa, T., Pushko, P., Steers, G., Gschmeissner, S.E., Hajibagheri, M.A., Finch, J., Crawford, L., Tommasino, M. (1995): Synthesis and assembly of virus-like particles of human papillomaviruses type 6 and type 16 in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Virology.* 206: 126-35.

Scheffner, M., Huibregtse, J.M., Vierstra, R.D., Howley, P.M. (1993): The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell.* 75: 495-505.

Schiller, J.T., Lowy, D.R. (2001): Papillomavirus-like particle vaccines. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 28: 50-4. Review.

Schlienger K, Mancini M, Riviere Y, Dormont D, Tiollais P, Michel ML. (1992): Human immunodeficiency virus type 1 major neutralizing determinant exposed on hepatitis B surface antigen particles is highly immunogenic in primates. *J Virol.* 66:2570-6.

Schmidt, U., Gunther, C., Rudolph, R., Bohm, G. (2001): Protein and peptide delivery via engineered polyomavirus-like particles. *FASEB* 15: 1646-8.

Sedlik, C., Saron, M., Sarraseca, J., Casal, I., Leclerc, C. (1997): Recombinant parvovirus-like particles as an antigen carrier: a novel nonreplicative exogenous antigen to elicit protective antiviral cytotoxic T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94: 7503-8.

Sedlik, C., Dridi, A., Deriaud, E., Saron, M.F., Rueda, P., Sarraseca, J., Casal, J.I., Leclerc, C. (1999): Intranasal delivery of recombinant parvovirus-like particles elicits cytotoxic T-cell and neutralizing antibody responses. *J Virol.* 73: 2739-44

Shin, Y.C., Folk, W.R. (2003): Formation of polyomavirus-like particles with different VP1 molecules that bind the urokinase plasminogen activator receptor. *J Virol.* 2003 77: 11491-8.

Singh, P., Destito, G., Schneemann, A., Manchester, M. (2006): Canine parvovirus-like particles, a novel nanomaterial for tumor targeting. *J Nanobiotechnology.* 4:2.

Slupetzky, K., Shafti-Keramat, S., Lenz, P., Brandt, S., Grassauer, A., Sara, M., Kimbauer, R. (2001): Chimeric papillomavirus-like particles expressing a foreign epitope on capsid surface loops. *J Gen Virol.* 82: 2799-804.

Stubenrauch, K., Gleiter, S., Brinkmann, U., Rudolph, R., Lilie, H. (2001): Conjugation of an antibody Fv fragment to a virus coat protein: cell-specific targeting of recombinant polyomavirus-like particles. *Biochem J.* 356: 867-73.

- Szomolanyi-Tsuda, E., Le, Q.P., Garcea, R.L., Welsh, R.M. (1998): T-Cell-independent immunoglobulin G responses in vivo are elicited by live-virus infection but not by immunization with viral proteins or virus-like particles. *J Virol.* 72: 6665-70.
- Tegerstedt, K., Lindencrona, J.A., Curcio, C., Andreasson, K., Tullus, C., Forni, G., Dalianis, T., Kiessling, R., Ramqvist, T. (2005): A single vaccination with polyomavirus VP1/VP2Her2 virus-like particles prevents outgrowth of HER-2/neu-expressing tumors. *Cancer Res.* 65: 5953-7.
- Tegerstedt, K., Franzen, A., Ramqvist, T., Dalianis, T. (2007): Dendritic cells loaded with polyomavirus VP1/VP2Her2 virus-like particles efficiently prevent outgrowth of a Her2/neu expressing tumor. *Cancer Immunol Immunother.* [Epub ahead of print]
- Yang, R., Murillo, F.M., Lin, K.Y., Yutzy, W.H., 4th., Uematsu, S., Takeda, K., Akira, S., Viscidi, R.P., Roden, R.B. (2004): Human papillomavirus type-16 virus-like particles activate complementary defense responses in key dendritic cell subpopulations. *J Immunol.* 173: 2624-31.
- Varsani, A., Williamson, A.L., de Villiers, D., Becker, I., Christensen, N.D., Rybicki, EP. (2003): Chimeric human papillomavirus type 16 (HPV-16) L1 particles presenting the common neutralizing epitope for the L2 minor capsid protein of HPV-6 and HPV-16. *J Virol.* 77: 8386-93.
- Volpers, C., Unckell, F., Schirmacher, P., Streeck, R.E., Sapp, M. (1995): Binding and internalization of human papillomavirus type 33 virus-like particles by eukaryotic cells. *J Virol.* 69: 3258-64.
- Warfield, K.L., Bosio, C.M., Welcher, B.C., Deal, E.M., Mohamadzadeh, M., Schmaljohn, A., Aman, M.J., Bavari S. (2003): Ebola virus-like particles protect from lethal Ebola virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100: 15889-94.
- Wong, S., Momoeda, M., Field, A., Kajigaya, S., Young, N.S. (1994): Formation of empty B19 parvovirus capsids by the truncated minor capsid protein. *J Virol.* 68: 4690-4.
- Zhang, L.F., Zhou, J., Chen, S., Cai, L.L., Bao, Q.Y., Zheng, F.Y., Lu, J.Q., Padmanabha, J., Hengst, K., Malcolm, K., Frazer, I.H. (2000): HPV6b virus like particles are potent immunogens without adjuvant in man. *Vaccine* 18: 1051-8.
- Zhang, H., Huang, Y., Fayad, R., Spear, G.T., Qiao, L (2004): Induction of mucosal and systemic neutralizing antibodies against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by oral immunization with bovine Papillomavirus-HIV-1 gp41 chimeric virus-like particles. *J Virol.* 78: 8342-8.