

Mariana de Oliveira Diniz

**Avaliação da resposta imunológica e protetora de uma
vacina de DNA contra tumores induzidos por HPV-16**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto
Butantan/IPT, para obtenção do título de Doutor
em Biotecnologia.

São Paulo
2010

Mariana de Oliveira Diniz

**Avaliação da resposta imunológica e protetora de uma
vacina de DNA contra tumores induzidos por HPV-16**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Luis Carlos de Souza Ferreira

São Paulo
2010

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Diniz, Mariana de Oliveira.

Avaliação da resposta imunológica e protetora de uma vacina de DNA contra tumores induzidos por HPV-16 / Mariana de Oliveira Diniz. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Luis Carlos de Souza Ferreira.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Microbiologia

Versão do título para o inglês: Immune response and anti-tumor therapeutic effects generated by a DNA vaccine against HPV-16-induced tumors.

Descritores: 1. HPV 2. E6 3. E7 4. Vacina de DNA 5.Câncer cervical I. Ferreira, Luis Carlos de Souza II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Prgrama de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. III. Título.

ICB/SBIB0177/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Mariana de Oliveira Diniz.

Título da Tese: Avaliação da resposta imunológica e protetora de uma vacina de DNA contra tumores induzidos por HPV-16.

Orientador(a): Luis Carlos de Souza Ferreira.

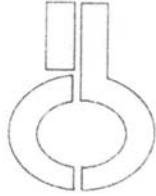
A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitaria "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091 7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA.09 .10
WTL/mcgn

São Paulo, 04 de maio de 2010.

REF.: Protocolo nº107/06.

"Avaliação da resposta imunológica e protetora de uma vacina de DNA contra tumores induzidos por HPV-16"

Prezado Professor,

Informo que a sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epigrate, **foi prorrogada até 17.10.2012**.

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da Comissão de Ética
no Uso de Animal - ICB /USP

Ilmo,Sr.

Prof. Dr. LUIS CARLOS DE SOUZA FERREIRA
Departamento de Microbiologia
Instituto de Ciências Biomedicas - USP



Aos meus pais,
Ana e Armando

Aos meus irmãos,
Eduardo e Henrique

Ao Caio,
com muito carinho

Uma pequena dedicatória
a pessoas de enorme importância

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Luís Carlos de Souza Ferreira, meu orientador, por sua dedicação e contribuição ao desenvolvimento deste trabalho, por toda ajuda e incentivo ao meu desenvolvimento científico e profissional, e pelos ensinamentos compartilhados e amizade durante os mais de oito anos de convivência em que estive no laboratório.

Aos amigos do Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas, Liliana, Beth, Melissa, Marcio, Wilson, Juliano, Eduardo, Cristiane, Fabiano, Domingos, Otto, Rafael, Juliana, Catarina, Bruna, Camila Santos, Carolina, Aline, Renata, Milene, Bruno, Priscila, Cariri, Vinicius, Jaime, a todos que tive a oportunidade de conhecer no laboratório, pela amizade, colaborações no trabalho e por momentos de descontração.

Aos amigos que contribuíram com o “grupo HPV”, Marcio, Otto, Bruna, Rafael e Domingos, que ajudaram na consolidação desta linha de pesquisa. Aos amigos Cariri e Vinicius, pela participação na expansão do grupo abordando outros alvos vacinais e, sobretudo, pela ajuda e convivência harmoniosa durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Liliana, Melissa, Catarina e Juliana, pelas discussões, e também divagações científicas e pela amizade que excede as paredes do laboratório.

À Dra. Maria Elizabete Sbrogio de Almeida pelos ensinamentos com os camundongos e pelo carinho com todas as pessoas do laboratório.

À Profa. Rita de Cássia Café Ferreira por suas dicas profissionais, sua alegria e carinho com nosso laboratório.

Aos amigos do laboratório da Profa. Rita, Alexandre, Elisa, Hugo, Karine, Sabrina, Juliano, Roberto, Daniela, Robert e Débora, pela amizade e discussões científicas.

À Loren, Camila Calderon e Eduardo, pelo suporte técnico e ajuda na organização do laboratório que tanto contribuem para o andamento do nosso trabalho.

Aos amigos vizinhos dos laboratórios do CEVAT-GENE pela troca de experiência e pelos momentos de descontração.

À Dra Sandra Alexandre, Juliane e Luis, que cuidam com muita dedicação do biotério da parasitologia e ao Carlos do biotério da microbiologia, pela competência e carinho com nossos camundongos.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e do Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, por sua ajuda com preparo de materiais e resolvendo as dúvidas sobre o programa.

Às minhas amigas Daniela, Renata e Tatiana, aos queridos tios e primos, pelo carinho e pela forte torcida. A todos os amigos e familiares que vibram comigo a cada conquista.

Aos meus avós por suas histórias de vida.

Aos meus irmãos por estarem sempre ao meu lado.

Ao Caio pela ajuda e paciência durante a confecção desta tese, mas principalmente, pelo companheirismo, amor e por valorizar tanto o meu trabalho.

Aos meus pais por terem sempre investido e prezado pela minha educação, por me dedicarem tanto do seu amor, por cada pensamento e oração.

Obrigada!!!

RESUMO

DINIZ, M. O. Avaliação das respostas imunológicas e protetora de uma vacina de DNA contra tumores induzidos por HPV-16. 2010. 171 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

O desenvolvimento de abordagens imunoterapêuticas contra o vírus do papiloma humano (HPV) representa uma prioridade para o controle de neoplasias induzidas por esse vírus e para o câncer de colo uterino. No presente trabalho, desenvolvemos uma estratégia vacinal baseada em vacinas de DNA que codificam proteínas do HPV-16, o tipo viral de maior relevância epidemiológica, fusionadas à glicoproteína D (gD) do vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1). A vacina que contém o gene da E7 de HPV-16 fusionada à gD de HSV-1 (pgDE7), administrada em regime vacinal de quatro doses, foi capaz de gerar significativa ativação de células T CD8⁺ E7-específicas e apresentar 40% de efeito protetor anti-tumoral terapêutico em camundongos desafiados com células transformadas que expressam as proteínas E6 e E7 do HPV-16 (linhagem TC-1). A partir das evidências geradas, desenvolvemos um novo vetor vacinal que codifica as proteínas E7, E6 e E5 do HPV-16 (pgD-E7E6E5) fusionadas à proteína gD. Em ensaios em modelo murino, apenas uma dose da vacina foi capaz de gerar ativação de células T CD8⁺ específicas e 70% dos camundongos previamente desafiados com células da linhagem TC-1 e inoculados com 3 doses da vacina mantiveram-se livres de tumores. Como tentativa de potencializar o efeito antitumoral encontrado, adotamos duas medidas: a co-administração de plasmídeos que codificam citocinas e a otimização de códons da sequência gênica correspondente à proteína quimérica. A combinação das vacinas pgDE7 ou pgD-E7E6E5 com plasmídeos que carregam os genes das citocinas IL-2, IL-12 ou GM-CSF foi capaz de aumentar a proteção terapêutica para 100% em regime vacinal de dose única. A adequação da sequência antigênica ao sistema de expressão humano, aumentou em cerca de 5 vezes o potencial terapêutico do vetor vacinal pgDE7. Em conjunto, os dados apresentados nesta tese demonstram a evolução do desenvolvimento de uma estratégia vacinal contra tumores induzidos por HPV-16 e encorajam seu uso em ensaios clínicos.

Palavras-chave: HPV. Vacina de DNA. E6. E7. Câncer cervical.

ABSTRACT

DINIZ, M. O. **Immune responses and anti-tumor therapeutic effects generated by a DNA vaccine against HPV-16-induced tumors.** 2010. 171 p. Doutorado em Biotecnologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The development of immunotherapeutic strategies against human papillomaviruses (HPV) is a priority for the control of HPV-induced neoplasia and cervical cancer. In this study, we developed DNA vaccines encoding HPV-16 proteins genetically fused to the glycoprotein D (gD) of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) as an approach to control HPV-16 induced tumors. The vaccine encoding HPV-16 E7 fused to gD (pgDE7), when administered in a four dose vaccine regimen, induced significant activation of E7-specific CD8⁺ T cells and 40% of therapeutic anti-tumor effect in mice previously challenged with tumor cells expressing HPV-16 E6 and E7 proteins (TC-1 cell lineage). Following these evidences, we developed a new vaccine vector encoding HPV-16 E7, E6, E5 proteins genetically fused to gD (pgD-E7E6E5). Only one vaccine dose induced antigen-specific CD8⁺ T cell responses and three doses conferred 70% protection to mice previously challenged with TC-1 cells. As an attempt to enhance the observed therapeutic anti-tumor effects, we tested two additional approaches: co-administration of cytokine-expressing plasmids and codon optimization of the gene encoding the chimeric protein. The combination of the pgDE7 or pgD-E7E6E5 vaccines with plasmids encoding the cytokines IL-2, IL-12 or GM-CSF increased the therapeutic protection to 100% after a single dose. The codon optimization increased by a factor of 5 the therapeutic anti-tumor effect of the pgDE7 vaccine. In summary, the data presented in this study describes the development of a new therapeutic vaccine concept against HPV-16-associated tumors and further support its evaluation in clinical trials.

Key words: HPV. DNA vaccine. E6. E7. Cervical câncer.

LISTA DE ABRVIATURAS

APC	<i>Antigen presenting cell</i> (célula apresentadora de antígeno)
AP	<i>Activator protein</i> (proteína ativadora)
APC	Aloflicocianina
AMP	Ampicilina
BTLA	<i>B and T lymphocyte attenuator</i> (atenuador de linfócitos B e T)
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CFSE	<i>Carboxyfluorescein succinimidyl ester</i>
CIN	<i>Cervical intraepitelial neoplasia</i> (neoplasia intraepitelial cervical)
CIS	Carcinoma in situ
CMV	Citomegalovírus
CpG	Oligodeoxinucleotídeos contendo dinucleotídeos CG não metilados
CRD	<i>Cysteine-rich domains</i> (domínios ricos em cisteína)
CRT	Calreticulina
CSF1R	Receptor de fator de estimulação de colônia 1
CTL	<i>Cytotoxic T lymphocyte</i> (linfócito T citotóxico)
DCs	<i>Dendritic cells</i> (células dendríticas)
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucléico)
E	<i>Early protein</i> (proteína de expressão precoce)
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i> (receptor de fator de crescimento epidermal)
ELISPOT	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Spot</i>
ERK1/2 MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos ERK1/2
FDA	<i>Food and drug administration</i>

FITC	Fluoresceína
gD	Glicoproteína D
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> (fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos)
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i> (antígeno leucocitário humano)
HPV	<i>Human papilloma virus</i> (vírus do papiloma humano)
HSP	<i>Heat shock protein</i> (proteína de choque térmico)
HSV	<i>Herpes simplex virus</i> (vírus herpes simplex)
HVEM	<i>Herpes virus entry mediator</i>
IFN-γ	Interferon-γ
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
KAN	Kanamicina
L	<i>Late protein</i> (proteína de expressão tardia)
LB	Meio Luria-Bertani
LEEP	<i>Loop electrosurgical excision procedure</i> (excisão eletrocirúrgica de alça)
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (complexo principal de histocompatibilidade)
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa B</i> (Fator nuclear kappa B)
NIA	Neoplasia intraepitelial anal
NK	<i>Natural killer cells</i>
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> (células mononucleares do sangue periférico)
PBS	<i>Phosphatase buffered saline</i> (tampão salina fosfato)

PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (reação de polimerase em cadeia)
PDGF β R	<i>Platelet-derived growth factor β receptor</i> (receptor de fator de crescimento- β derivado de plaquetas)
PE	Ficoeritrina
PI3K/Akt	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt</i>
PNI	Programa Nacional de Imunização
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (ácido ribonucléico)
RSV	<i>Rous sarcoma vírus</i> (vírus rous sarcoma)
SFB	Soro fetal bovino
SIL	<i>Scamous intraepitelial lesion</i> (lesão intraepitelial escamosa)
SV40	<i>Smian virus 40</i> (vírus 40 de simian)
TAP	<i>Transporter associated protein</i> (proteína associada a transporte)
Th	T <i>helper</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> (fator de necrose tumoral)
TNFR	<i>Tumor necrosis factor receptor</i> (receptor de fator de necrose tumoral)
Treg	Células T regulatórias
VLPs	<i>Virus like particles</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Progressão de lesões induzidas por HPV a câncer cervical	20
Figura 2 - Indução de resposta imune celular e humoral por vacinas de DNA.....	34
Figura 3 - Esquema dos vetores vacinais	44
Figura 4 - Ensaio de proteção terapêutica em camundongos C57BL/6 desafiados com células TC-1 e imunizados com a vacina pgD-E7E6E5 co-administrada a plasmídeos que expressam citocinas.....	93
Figura 5 - Ensaio de proteção terapêutica em camundongos C57BL/6 desafiados com células TC-1 e imunizados com a vacina pgD-E7E6E5 co-administrada ao plasmídeo que expressa a citocina IL-2, utilizando diferentes números de doses.....	95
Figura 6 - Ensaio de proteção terapêutica em camundongos C57BL/6 desafiados com células TC-1 e imunizados com a vacina pgD-E7E6E5 co-administrada ao plasmídeo que expressa a citocina IL-2, utilizando diferentes quantidades de DNA por dose.....	96
Figura 7 - Ensaio de proteção terapêutica em camundongos C57BL/6 desafiados com células TC-1 e imunizados com a vacina pgD-E7E6E5 co-administrada ao plasmídeo que expressa a citocina IL-2 pelo método da biobalística.....	97
Figura 8 - Ensaio de proteção terapêutica de camundongos C57BL/6 desafiados com células TC-1 e imunizados com a vacina pgDE7 co-administrada ao plasmídeo que expressa a citocina IL-2 com diferentes quantidades de DNA por dose.....	98
Figura 9 - Ensaio de proteção terapêutica de camundongos C57BL/6 desafiados com células TC-1 e imunizados com a vacina pgDE7 co-administrada ao plasmídeo que expressa a citocina IL-2 em diferentes períodos de tempo após o desafio	100
Figura 10 - Análise de células produtoras de IFN-γ mediante estímulo <i>in vitro</i> com peptídeo específico de E7. Camundongos C57BL/6 foram previamente desafiados com $7,5 \times 10^4$ células TC-1 por animal e imunizados, 3 dias após, com uma dose de 50 µg de pIL-2, pgDE7 ou 50 µg de pgDE7 misturado a 50 µg de pIL-2 pela via intramuscular.....	103
Figura 11 - Análise de células T CD8⁺ E7-específicas em camundongos imunizados. Camundongos C57BL/6 foram previamente desafiados com $7,5 \times 10^4$ células TC-1 por animal e imunizados 3 dias após com uma dose de 50 µg de pIL-2, pgDE7 ou 50µg de pgDE7 misturado a 50 µg de pIL-2 pela via intramuscular.....	104
Figura 12 - Células T CD8⁺ infiltrantes em tumores formados por células TC-1 em camundongos imunizados.....	105
Figura 13 - Resposta de citotoxicidade <i>in vivo</i> em camundongos imunizados com pgDE7 combinado a pIL-2.....	107

Figura 14 - Ensaio de proteção terapêutica de camundongos C57BL/6 desafiados com células TC-1 e imunizados com a vacina pgDE7h co-administrada ao plasmídeo que expressa a citocina IL-2 utilizando diferentes quantidades de DNA.....113

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Vírus HPV	17
1.2 Ciclo da infecção e Patogenia	18
1.3 HPV e câncer cervical	21
1.4 Resposta imune na infecção e câncer	22
1.5 Mecanismos de Escape do vírus e do tumor	23
1.6 Prevenção e tratamentos tradicionais	24
1.7 Vacinas Profiláticas	26
1.8 Vacinas Terapêuticas	28
1.9 Vacinas de DNA	31
1.10 Desenvolvimento de uma vacina de DNA para tumores induzidos por HPV	37
2 OBJETIVOS	40
3 MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1 Vetores vacinais	43
3.2 Linhagens celulares	45
3.3 Imunização e desafio com as células tumorais	45
3.4 Detecção de células produtoras de IFN-γ por ELISPOT	47
3.5 Ensaio de marcação intracelular de IFN-γ em células CD8 ⁺	48
3.6 Marcação com trâmero e avaliação de linfócitos infiltrantes no tumor	48
3.7 Ensaio de citotoxicidade <i>in vivo</i>	49
4 RESULTADOS.....	50
4.1 Capítulo I	51
4.2 Capítulo II	62
4.3 Capítulo III	72
4.4 Capítulo IV	89
4.4.1 <i>Descrição dos resultados</i>	91
4.4.2 <i>Discussão do capítulo IV</i>	108
4.5 Capítulo V	111
4.5.1 <i>Descrição dos resultados</i>	111
4.5.2 <i>Discussão do capítulo V</i>	114
5 DISCUSSÃO FINAL	115
6 CONCLUSÕES	123
REFERÊNCIAS	126
ANEXOS	149
ANEXO A - Súmula Curricular	150
ANEXO B - Artigo no prelo	154

1 INTRODUÇÃO

1.1 Vírus HPV

O vírus do papiloma humano (HPV) é um vírus não envelopado com DNA dupla fita circular e capacidade de infectar o epitélio estratificado (MC MURRAY et al., 2001; MC CANCE, 1998). O genoma do vírus HPV, que possui cerca de 8.000 pares de bases, é composto por dois genes de expressão tardia, que codificam as proteínas L1 e L2 (L, do inglês *late*), e seis genes de expressão precoce, que codificam as proteínas E1, E2, E4, E5, E6 e E7 (E, do inglês *early*). As proteínas L1 e L2 são proteínas estruturais que compõe o capsídeo viral. As proteínas codificadas por genes de expressão precoce exercem papel na regulação do ciclo viral, controlando a replicação do DNA viral (E1 e E2), transcrição de RNA viral (E2), montagem das partículas virais (E4) e o ciclo celular (E5, E6 e E7).

A proteína E5 é capaz de estimular proliferação celular formando complexos com receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR), receptor de fator de crescimento- β derivado de plaquetas (PDGF β R) e receptor de fator de estimulação de colônia (CSF1R) (MARTIN et al., 1989; HWANG; NOTTOLI; DIMAIO, 1995). Recentemente, também foi descrita a capacidade de E5 em prevenir apoptose através do estímulo de Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt (PI3K/Akt) e de proteína quinase ativada por mitógenos ERK1/2 (ERK1/2 MAPK), componentes de vias de sinalização de sobrevivência de resposta ao stress (ZHANG; SPANDAU; ROMAN, 2002).

As proteínas E6 e E7 atuam na malignização celular através de interação com um vasto repertório de proteínas, promovendo bloqueio de apoptose, proliferação celular e instabilidade cromossômica. A proteína E6, com participação da proteína associada à E6 (E6-AP), promove degradação de p53, um fator de transcrição que estimula a expressão de genes envolvidos em apoptose e na parada do ciclo celular (WERNES; LEVINE; HOWLEY, 1990; HUIBREGTSE; SCHEFFNER; HOWLEY, 1993). Além deste papel mais proeminente, E6 é capaz de degradar a proteína pro-apoptótica BAK (JACKSON et al., 2000) e ativar telomerase (VELDMAN et al., 2010). A proteína E7 interage com a proteína retinoblastoma (pRb) liberando o fator de transcrição E2F, que ativa genes envolvidos em síntese de DNA e progressão do ciclo celular (DYSON et al., 1989). E7 também pode promover proliferação celular

através de interação com fatores de transcrição AP-1 (NEAD et al., 1998) e expressão de ciclina A e ciclina E (ZERFASS et al., 1995).

Mais de 120 tipos de HPV foram descritos e cerca de 40 apresentam tropismo para infectar a mucosa do trato anogenital (BOSCH et al., 1995, PAAVONEN, 2007b). Os vírus com este tropismo podem ser classificados de acordo com seu potencial oncogênico. Os genótipos de baixo risco podem causar verrugas genitais e lesões benignas de baixo grau, sendo os mais prevalentes, os HPV-6 e HPV-11 (DE VILLIERS et al., 2004). Os genótipos do HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33 e HPV-45 são os mais freqüentemente associados a lesões de alto grau e tumores malignos, pertencendo ao grupo dos genótipos de alto risco (MUNOZ et al., 2003). Os HPV-16 e HPV-18 destacam-se por serem responsáveis por cerca de 70% dos casos de câncer do colo do útero. O HPV-16 sozinho causa cerca de 55% dos casos deste tipo de câncer, podendo ser considerado o principal agente etiológico da doença (BOSCH et al., 1995).

1.2 Ciclo da infecção e Patogenia

O ciclo de vida do vírus HPV está intimamente relacionado com o estado de diferenciação das células epitélio cervical (DOORBAR, 2007). O vírus HPV é capaz de infectar as camadas mais basais do epitélio através de microlesões no tecido. As proteínas de expressão precoce E5, E6, E7, E1 e E2 são expressas nas camadas basais e intermediárias. Em queratinócitos em estágio mais avançado de diferenciação, ocorre a expressão de E4 e das proteínas tardias L1 e L2, ocorrendo então, o arranjo das partículas virais. A liberação das partículas virais ocorre com o descamamento natural dos queratinócitos mais superficiais. O ciclo produtivo da infecção ocorre quando o genoma do HPV encontra-se sob a forma episomal, entretanto o genoma do HPV pode se integrar ao genoma da célula hospedeira, e nesses casos, a maioria dos genes de HPV é perdida. De fato, em células com genoma do HPV integrado, apenas os genes de E6 e E7 são expressos.

O vírus HPV pode promover descontrole da maturação normal do epitélio cervical, levando à formação de lesão de baixo grau chamada de neoplasia intraepitelial cervical (CIN) ou lesão intraepitelial escamosa (SIL), que na maioria das vezes, são assintomáticas e podem ser apenas detectadas através de exames

citológicos, como o papanicolau. Se não forem tratadas, as lesões podem evoluir para lesões de alto grau e atingir todas as camadas do epitélio cervical, progredindo para carcinoma cervical *in situ* (CIS). Esses tumores podem ultrapassar a membrana basal do epitélio e se tornar invasivos, sendo capazes de atingir veias sanguíneas ou linfáticas, tornando-se metastáticos (Figura 1). Esse processo de evolução é lento, mas ocorre em uma proporção substancial de pacientes com CIS.

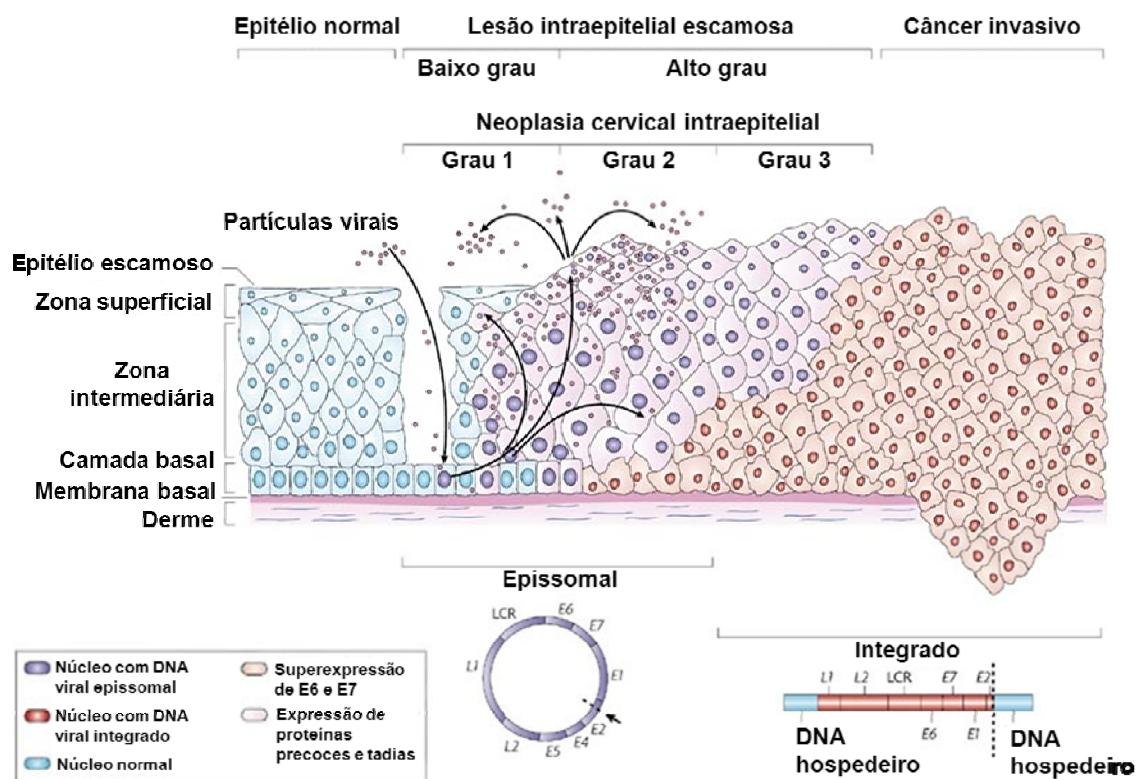


Figura 1 - Progressão de lesões induzidas por HPV a câncer cervical. O vírus HPV acessa a camadas basal do epitélio através de microlesões no epitélio cervical. Seguido da infecção, ocorre a síntese das proteínas de expressão precoce E1, E2, E4, E5, E6 and E7 e replicação do genoma viral a partir do DNA viral na forma episomtal (núcleo roxo). Nas camadas superiores (zonas intermediária e superficial) ocorre a expressão das proteínas E4, L1 e L2, ocorrendo a encapsulação do genoma viral e posterior liberação das partículas virais com o descamamento dos queratinócitos da superfície do epitélio. As lesões intraepiteliais de baixo grau correlacionam com infecções virais produtivas. Algumas infecções por HPV de alto risco são persistentes e podem progredir para neoplasia intraepitelial cervical. A progressão de lesões não tratadas a lesões invasivas está associada com a integração do genoma do HPV ao genoma do hospedeiro (núcleo vermelho), com perda do gene de E2 e subsequente superexpressão de E6 and E7. Fonte: modificado de Woodman; Collins; Young (2007).

1.3 HPV e câncer cervical

A infecção por vírus HPV de alto risco é freqüente entre mulheres sexualmente ativas, com uma incidência entre 15 a 40% (BOSCH, 2003). Estima-se que, até atingir 50 anos de idade, pelo menos 80% das mulheres serão infectadas por algum tipo de HPV de alto risco em algum momento de suas vidas (BASEMAN e KOUTSKY, 2005), o que faz dessa infecção, a doença sexualmente transmissível mais comum (EBRAHIM et al., 2005).

A maioria das infecções por HPV é transitória, cerca de 90% delas são eliminadas em 2 anos sem intervenção (MOSCICKI et al., 2004). Entretanto, algumas infecções persistem e iniciam uma série de eventos capazes de transformar o epitélio cervical, causando neoplasias no tecido. Entre a infecção e o desenvolvimento de lesões, podem se passar algumas décadas. O pico de incidência e de prevalência de infecção por vírus HPV ocorre em mulheres entre 20 e 30 anos de idade e esses índices reduzem drasticamente a partir desta faixa etária (BROWN et al., 2005). Já o câncer cervical, é mais freqüentemente detectado em mulheres a partir de 40 anos de idade.

A progressão de lesões benignas para tumores invasivos está relacionada com a conversão do genoma de HPV da forma episomtal para a forma integrada ao genoma do hospedeiro, após quebra no genoma viral com perda de alguns genes. O potencial de malignização aumenta com a inativação do gene E2 um regulador negativo da expressão de E6 e E7, que passam, então, a ser expressas em níveis constitutivos. A expressão contínua das proteínas E6 e E7 de genótipos de alto risco pode causar malignização celular e levar ao desenvolvimento de lesões de baixo grau, que podem evoluir para câncer (HOWLEY, 1991).

Infecções por HPV de alto risco estão relacionadas a diversos tipos de câncer, sendo responsáveis por diferentes freqüências no número de casos: 85% de câncer anal, 50% de câncer de vulva, vagina e pênis, 20% de câncer de orofaringe e 10% de câncer de laringe e esôfago (ZUR HAUSEN, 1996; SPENCE; FRANCO; FERENCZY, 2005). A associação entre HPV e câncer mais evidente ocorre em relação ao câncer cervical, suportado pela evidência epidemiológica de que o DNA de HPV pode ser encontrado em 99,7% dos casos deste tipo de câncer (WALBOOMERS et al., 1999; SCHIFFMAN et al., 1993). De fato, está bem

estabelecido que a infecção por HPV de alto risco é a principal causa do câncer cervical (CLIFFORD et al., 2003; FRANCO; ROHAN; VILLA, 1999). Em resumo, a infecção por um tipo de HPV de alto risco e o desenvolvimento de lesões pré-malignas, são causas necessárias, porém não suficientes para a indução deste tipo de tumor.

O câncer de colo de útero apresenta relevância epidemiológica significativa, correspondendo à segunda causa de morte por câncer em mulheres de todo no mundo, causando 200.000 mortes por ano (PISIANI et al., 1999). Aproximadamente, 500.000 novos casos de câncer cervical são diagnosticados por ano, atingindo mundialmente cerca de 1% das mulheres (ZUR HAUSEN, 2006). Dados epidemiológicos divulgados pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) revelam que, no Brasil, a cada 100 mil mulheres, cerca de 20 apresentam casos positivos de câncer de colo do útero e, a cada ano, são diagnosticados 20 mil novos casos e, entre essas, aproximadamente 9.000 vão a óbito.

1.4 Resposta imune na infecção e câncer

A resposta imune do hospedeiro elimina a maioria das infecções por HPV e lesões induzidas pelo vírus, podendo ser detectadas resposta imune humoral e celular contra antígenos de HPV (JENSON; KURMAN; LANCASTER, 1991; HÖPFLE et al., 2000). A produção de anticorpos específicos para a proteína L1 do vírus HPV pode ser detectada entre 4 meses e 5 anos após a infecção natural (CARTER et al., 2000), mas apenas cerca de 60% das pessoas soroconvertem (CARTER et al., 1996). Aparentemente, o processo de soroconversão é lento e guiado por exposição antigênica, podendo ser associado a cargas virais altas e infecção persistente (HO et al., 2004). As concentrações de anticorpos no soro são baixas, mas mesmo após 10 anos do período de soroconversão, pelo menos 25% das mulheres continuam a apresentar respostas de anticorpos detectáveis (AF GEIJERSSTAM et al., 1998). Estudos demonstram que os anticorpos específicos para proteínas do capsídeo, gerados pela infecção natural, não necessariamente são protetores em infecções subsequentes por HPV do mesmo tipo viral ou tipos geneticamente semelhantes (VISCIDI et al., 2004).

O desenvolvimento de lesões e tumores relacionados ao HPV-16 foi associado à resposta imune celular defectiva contra as proteínas E6 e E7 (DE JONG et al., 2004). A indução de células T CD4⁺ e CD8⁺ que reconhecem epitopos dessas proteínas, infiltradas nos tumores e presentes no sangue dos pacientes, está associada à proteção contra infecções persistentes e regressão de lesões. Estudos demonstraram que a ausência de indução de células T CD8⁺ citotóxicas (CTL) pode ser notada em pacientes com carcinoma (BONTKES et al., 2000). Neste tipo de câncer, a indução de resposta de células T CD4⁺ Th1 parece ser crítica para o desencadeamento de uma resposta citotóxica, pois é capaz de promover a expansão da população de células efetoras, mesmo na ausência de sinais inflamatórios locais (JANSSEN et al., 2003). Além disso, pacientes com lesões de alto grau que apresentam infecções persistentes por HPV-16 mostram aumento na frequênciade células T regulatórias CD4⁺CD25^{high} (Treg) no sangue e infiltradas nas lesões (MOLLING et al., 2007; VAN DER BURG et al., 2007).

1.5 Mecanismos de Escape do vírus e do tumor

A persistência da infecção por HPV é consequência do fracasso do sistema imunológico do hospedeiro em eliminar as células infectadas. Mecanismos de evasão do sistema imune estão presentes tanto na infecção viral como no tumor induzido por HPV. Durante o ciclo de infecção produtivo, a expressão das proteínas virais é baixa, devido às regiões promotoras serem relativamente fracas e à utilização de códons raros pelo genoma viral (PHELPS e HOWLEY, 1987; MÜLLER, 2005). A baixa expressão da maquinaria envolvida na apresentação de antígenos, como a TAP, Tapasin, LMP2 e LMP7, limita a proteólise pelo sistema de proteassoma e a apresentação de antígenos via complexo principal de histocompatibilidade I (MHC I) (RITZ et al., 2001).

O próprio ciclo viral pode ser considerado um importante mecanismo de evasão (LEPIQUE; RABACHINI; VILLA, 2009). Nas camadas mais basais do epitélio, em células expostas às células apresentadoras de antígenos, a expressão das proteínas virais de expressão precoce é baixa. A expressão das proteínas do capsídeo e a montagem das partículas virais ocorrem em camadas mais superficiais, em células próximas ao final do programa de diferenciação e afastadas de células do

sistema imunológico (FRATTINI et al., 1997). Além disso, o ciclo de vida viral causa lise celular. As partículas virais geradas são eliminadas com as células que morrem naturalmente, num processo sem inflamação.

As lesões associadas ao HPV também apresentam mecanismos de evasão da resposta imune. As células tumorais expressam diferentes citocinas que recrutam e induzem a diferenciação de leucócitos em células supressoras. Em pacientes, observou-se que lesões cervicais de alto grau correlacionam com uma maior infiltração de macrófagos (HAMMES et al., 2007; MAZIBRADA et al., 2008) e de células T CD4⁺ regulatórias. Os linfócitos de mulheres com tumores secretam IL-10 em resposta aos抗ígenos do HPV (DE JONG et al., 2004), enquanto de pacientes assintomáticas secretam IFNy, TNF, IL-2, IL-5 e IL-10. Além disso, TGF-β é secretado no ambiente do tumor e juntamente com IL-10, é um indutor do fenótipo de células T regulatórias (NIEDERKORN, 2008; POGGI e ZOCCHI, 2008; WAN e FLAVELL, 2008). A capacidade das proteínas virais, em particular E7, em induzir tolerância, parece contribuir com a ausência de resposta inflamatória local (KANODIA; FAHEY; KAST, 2007; TINDLE, 2002).

1.6 Prevenção e tratamentos tradicionais

O monitoramento das lesões induzidas por infecções permanentes é uma importante arma no controle de tumores associados ao HPV. Por meio dos exames preventivos, podem ser detectadas lesões pré-cancerosas ou tumores em estágios iniciais, o que colabora para o diagnóstico precoce e melhor prognóstico. O amplo aumento da prática do exame papanicolau em países desenvolvidos, durante os últimos 50 anos, foi capaz de gerar um declínio de 75% no número de mortes por câncer cervical (FRANCO; MAYRAND; Trottier, 2006). O custo de realização deste exame ainda representa um obstáculo para a sua implantação generalizada pelos sistemas de saúde pública de países em desenvolvimento, onde ocorrem cerca de 80% das mortes por câncer cervical.

Os tratamentos atualmente utilizados para câncer de colo do útero envolvem cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou combinação desses. A escolha do tratamento depende do tamanho do tumor, se o câncer se espalhou, ou se a mulher deseja engravidar algum dia. Os tumores de câncer de colo de útero em estágio mais inicial

(estágio IA) são geralmente tratados por cirurgia (histerectomia), com remoção do útero e parte da vagina. Um estágio um pouco mais avançado do tumor (estágio IA2) exige também remoção cirúrgica dos linfonodos. Uma alternativa para pacientes que desejam se manter férteis, ou que estão com tumor de colo de útero em estágio mais inicial, é o tratamento cirúrgico local não mutilante como a crioterapia, a terapia com laser, conização ou o procedimento de excisão eletrocirúrgica de alça (LEEP). Tumores em estágio inicial IB1 ou IIA (com menos de 4 cm) podem ser tratados com histerectomia radical com remoção dos linfonodos combinado à radioterapia. A radiação pode ser aplicada externamente sobre a área pélvica ou internamente. Tumores de estágio inicial IB2 e IIA maiores (com mais de 4cm) podem ser tratados com radioterapia e quimioterapia (cisplatina) ou histerectomia seguida por radioterapia ou quimioterapia. Tumores em estágio avançado IIB-IVA são tratados com radioterapia e quimioterapia (cisplatina).

Com tratamento cerca de 72% das mulheres apresentam sobrevida de no mínimo 5 anos, mas o prognóstico depende do estágio no qual o câncer foi diagnosticado. A taxa de sobrevida, de acordo com o grau de desenvolvimento do tumor no início do tratamento, é de 92% em estágios mais iniciais do câncer, 80% para estágio I e 55% para estágio II. A mortalidade é mais crítica nos estágios mais avançados da doença, sendo que apenas 30% das mulheres em estágio III e 15% em estágio IV de câncer de colo do útero se sobrevivem por pelo menos 5 anos após o diagnóstico. Conforme o câncer se espalha para outras partes do corpo, o prognóstico favorável é reduzido bruscamente porque o tratamento local das lesões geralmente é mais efetivo do que tratamentos sistêmicos como a quimioterapia. Depois do tratamento, a paciente deve ser examinada com frequência para o monitoramento do aparecimento de tumores recorrentes que ocorrem em cerca de 35% das pacientes.

Os tratamentos atualmente disponíveis para câncer de colo do útero são invasivos, e muitas vezes, agressivos e mutilantes. Tais tratamentos não agem especificamente sobre as células tumorais, causando morte ou remoção de tecidos saudáveis. Além de causar efeitos colaterais indesejáveis, os tratamentos tradicionais para câncer de colo do útero são também dispendiosos. O tratamento para câncer cervical pode custar entre 7 e 24 mil dólares por paciente, dependendo do estágio de desenvolvimento do câncer. Os países em desenvolvimento muitas

vezes não têm condições financeiras ou estruturais para oferecer exames preventivos ou o tratamento ideal junto ao sistema público de saúde, contribuindo com a alta incidência de morte por câncer cervical nesses países. Esse conjunto de dados reforça a necessidade de medidas de prevenção ou de tratamentos novos menos invasivos e mais eficazes. Nesse contexto, diversas estratégias vacinais vêm sendo desenvolvidas para se conter a infecção viral ou tratar lesões e tumores induzidos por HPV.

1.7 Vacinas Profiláticas

Como o câncer cervical é causado por um tipo de infecção viral, seria esperado que uma vacina capaz de gerar anticorpos neutralizantes dirigidos contra as proteínas do capsídeo viral L1 e/ou L2, fossem capazes de bloquear a entrada do vírus, e com isso, reduzir a incidência desse tipo de câncer em longo prazo. As proteínas do capsídeo viral, tanto L1 como L2, se ligam a anticorpos neutralizantes, que reconhecem epitopos conformacionais (CHRISTENSEN e KREIDER, 1991; HINES et al., 1994), sendo portanto alvos para vacinas profiláticas à infecção pelo vírus HPV. A proteína L1, sozinha ou associada a L2, forma VLPs (do inglês, *virus like particles*) (HAGENSEE; YAEGASHI; GALLOWAY, 1993; KIRNBAUER et al., 1992) que são altamente imunogênicos e induzem resposta de anticorpos neutralizantes para o HPV (BROWN et al., 2001).

Duas vacinas profiláticas baseadas em VLPs (Virus like particles) formados por proteínas L1 de HPV-6, -11, -16 e 18 (Gardasil) ou HPV-16 e -18 (Cervarix) estão disponíveis no mercado. Ambas as vacinas demonstraram ser altamente imunogênicas em ensaios clínicos, resultando em 100% de soroconversão nas diferentes populações estudadas, com títulos pelo menos 10 vezes maiores que os gerados após a infecção natural (HARPER et al., 2004; VILLA et al., 2006; GARLAND et al., 2007). As vacinas Gardasil e Cervarix também foram capazes de conferir proteção contra o desenvolvimento de lesões induzidas pelos tipos de HPV cobertos pelas formulações vacinais. Atualmente, a duração da proteção conferida pelas vacinas não é conhecida, no entanto a continuação dos estudos tem mostrado que a eficácia é mantida por pelo menos cinco anos (HARPER et al., 2006; OLSSON et al., 2007). Os estudos demonstraram que além de proteger contra infecções para

os tipos virais cobertos pelas vacinas, verificou-se a proteção cruzada contra a infecção com HPV tipos 45 e 31 (PAAVONEN et al., 2007a). No entanto, não houve proteção significativa contra os tipos 33, 52 ou 58. Indivíduos imunizados com a vacina quadrivalente apresentaram proteção contra a infecção ou indução de lesões causadas por 10 tipos de HPV, incluindo o HPV 31, 33, 35, 52 e 58 (BROWN et al., 2009; WHEELER et al., 2009).

As vacinas Gardasil e Cervarix apesar de demonstrarem alta eficiência na geração de anticorpos e proteção contra lesões induzidas por vários tipos de HPV, não estão sendo amplamente utilizadas, principalmente devido ao seu alto custo. O preço de cada dose dessas vacinas é cerca de R\$ 500,00 e o protocolo vacinal de ambas requer três doses das vacinas. Para haver de fato uma redução significativa nas taxas de câncer cervical, as vacinas profiláticas deveriam ser amplamente utilizadas, preferencialmente antes do início da atividade sexual. Essa situação não se encontra no cenário econômico de países em desenvolvimento, uma vez que, no caso do Brasil, a oferta gratuita de alguma dessas vacinas representaria uma despesa anual de cerca de R\$ 1,8 bilhões estimativa esta, superior aos R\$ 700 milhões anuais gastos com o Programa Nacional de Imunização (PNI), segundo dados do Ministério da Saúde. Mesmo considerando-se uma imunização em massa com essas vacinas, somente a partir de aproximadamente 20 anos, seria possível detectar reduções nas taxas de incidência de câncer cervical, justificado pela alta prevalência do vírus na população e pelo lento processo da carcinogênese na grande maioria dos casos.

As vacinas de caráter preventivo não demonstraram efeito em pessoas que já possuem lesões induzidas vírus HPV. Nas lesões de alto grau e tumores, o genoma do vírus HPV encontra-se integrado ao genoma do hospedeiro, fenômeno que ocorre com a perda de alguns genes de HPV, incluindo os que codificam para as proteínas do capsídeo L1 e L2. Além disso, em mulheres já infectadas pelo HPV, mas sem indício de lesões, as vacinas profiláticas não terão qualquer efeito sobre o surgimento de neoplasias. Nessas situações, o desenvolvimento de estratégias imunoterapêuticas voltadas para o controle ou prevenção de tumores associados ao HPV pode levar à redução da mortalidade e da morbidade associada à doença. Nesse contexto, a imunoterapia antígeno-específica contra o câncer se mostra uma excelente estratégia no controle de tumores, por sua capacidade de desenvolver

imunidade específica contra células neoplásticas, não destruindo células normais.

1.8 Vacinas Terapêuticas

Quando se pensa em vacinas terapêuticas contra tumores, uma vantagem em relação a tumores associados ao HPV é a presença de抗ígenos alvo codificados pelo vírus. As chances de escape imunológico por perda de抗ígenos são muito baixas quando se consideram tumores associados a HPV uma vez que a expressão dos抗ígenos é necessária para a manutenção do estado neoplásico. Além disso, somente as células tumorais seriam afetadas por terapias.

As vacinas contra lesões induzidas por HPV podem ser chamadas de vacinas terapêuticas e devem privilegiar a indução de respostas citotóxicas contra as oncoproteínas do HPV. As proteínas E6 e E7 dos vírus HPV de alto risco são os principais alvos desta abordagem vacinal. Essas proteínas são expressas constitutivamente nas células do carcinoma cervical e são necessárias para a manutenção das células no estado transformado (VON KNEBEL DOEBERITZ et al., 1994). As proteínas E6 e E7 do HPV são expressas em todas as células tumorais e a inibição de sua expressão leva as células à senescência (ALVAREZ-SALAS e DIPAOLO, 2007). Outras proteínas também foram investigadas, mas em menor escala, como E5 e E2, expressas em células que possuem o genoma de HPV sob a forma epissomal.

As proteínas E6 e E7 contêm regiões antigenicas apresentadas por moléculas de MHC classe I e II tanto em camundongos como em humanos (KANODIA; DA SILVA; KAST, 2008). As respostas imunes envolvidas na erradicação de células tumorais são essencialmente mediadas por células T CD8⁺. No entanto, uma atividade efetiva e sustentada de linfócitos T CD8⁺ pode ser estimulada por colaboração de células T CD4⁺ Th1. A indução de uma resposta citotóxica eficiente e a superação dos mecanismos de tolerância induzidos pelas proteínas E6 e E7 estão entre os principais desafios encontrados para o desenvolvimento de vacinas terapêuticas para tumores induzidos por HPV. Nesse sentido, muitas plataformas vacinais têm sido avaliadas, incluindo vacinas baseadas em peptídeos ou proteínas, vetores vivos virais ou bacterianos, vacinas de DNA ou RNA, células inteiras ou abordagens combinadas.

As vacinas baseadas em peptídeos não apresentam reações adversas graves, fáceis de fabricar em larga escala e possibilitam a combinação de diversos epitopos. No entanto, os epitopos antigênicos carregados por esses peptídeos vacinais são restritos às moléculas de MHC classe I ou II do fenótipo expresso por um indivíduo. Desta forma, as vacinas peptídicas não são necessariamente eficazes em todos aqueles que estão sendo imunizados. Outra questão associada a este tipo de vacina é sua baixa imunogenicidade. Sendo assim, as vacinas peptídicas requerem a administração conjunta de agentes imunomoduladores, ou adjuvantes, como ligantes de receptores do tipo *toll like* (TLR), citocinas ou moléculas co-estimulatórias. O desenvolvimento de vacinas peptídicas para o câncer cervical foi viabilizado pela identificação de epitopos MHC-restritos CD4⁺ ou CD8⁺ das proteínas de expressão precoce do HPV-16, compreendendo epitopos murino (H-2dB) e humanos (HLAA.2) (FELTKAMP et al., 1993; LIU et al., 2007). Estudos pré-clínicos demonstraram a ativação de células T CD8⁺ E7-específicas pelas vacinas baseadas em peptídeos através da combinação com os adjuvantes ligante 4-1BB (SHARMA et al., 2009), oligodeoxynucleotideo CpG (CHEN et al., 2004; DAFTARIAN et al., 2007), toxina colérica mutante (MANURI et al., 2007) para aumentar a potência da vacina.

Uma estratégia vacinal peptídica avaliada em ensaios clínicos fase I/II baseou-se em dois peptídeos compreendidos pela proteína E7 de HPV-16 (aminoácidos de 11 a 20 e de 86 a 93), correspondendo a epitopos HLA-A 0201 MHC classe I restritos, combinados ao peptídeo pan HLA-DR (PADRE), não específico para células T CD4⁺ *helper*, e emulsificados com o adjuvante Montanide ISA 51. Em pacientes com câncer cervical avançado positivos para HPV-16, essas vacinas não foram capazes de induzir resposta de células T CD8⁺ E7-específicas, o que indicou a baixa imunocompetência de pacientes com estágios de câncer muito avançados (VAN DRIEL et al., 1999; RESSING et al., 2000). Em particular, uma estratégia vacinal peptídica bastante promissora é composta por 13 peptídeos longos (9 de E6 e 4 de E7, com 35 aminoácidos cada) que possuem sobreposição de 10-14 aminoácidos, compreendendo todo o comprimento das proteínas E6 e E7 de HPV-16, emulsificados com o adjuvante Montanide ISA 51. Essa vacina foi testada em diversos ensaios clínicos em pacientes com grau avançado de tumores induzidos por HPV-16 (MELIEF et al., 2007; KENTER et al., 2008) e mostrou a indução tanto de resposta imune celular, como regressão de lesões. Os peptídeos

utilizados nesta abordagem vacinal se sobrepõem, o que pode ser uma forma de contornar o não reconhecimento de epítópos devido a especificidade das moléculas de MHC. Além disso, estes peptídeos são longos, e se mostraram mais imunogênicos do que peptídeos menores em ensaios em camundongos (ZWAVELING et al., 2002), o que pode estar associado à internalização e processamento de peptídeos longos de forma mais eficiente por APCs.

As vacinas baseadas em proteínas recombinantes têm vantagem sobre as abordagens baseadas em peptídeos no que se refere à entrega de todos os epitópos potenciais para o processamento do antígeno por células do sistema imunológico. No entanto, a ativação de respostas celulares, particularmente aquelas com características citotóxicas é, em geral, deficiente. Uma alternativa voltada para o aumento da imunogenicidade celular de proteínas recombinantes inclui a obtenção de fusões com proteínas de choque térmico (hsp, do inglês *heat shock protein*) ou formulações que empregam adjuvantes adequados para a ativação de células T (FRAZER et al., 1999; GOLDSTONE et al., 2002).

Uma vacina composta pela proteína E7 de HPV-16 fusionada a hsp65 de *Mycobacterium bovis* BCG teve sua eficácia comprovada protegendo camundongos da formação de tumores induzidos por células que expressam as proteínas E6 e E7 de HPV-16 (células TC-1) (CHU et al., 2000). Esses estudos precederam ensaios clínicos com esta vacina em fase I e II, nos quais a mesma se mostrou ser bem tolerada e capaz de induzir algum grau de regressão em vários tipos de lesões associadas ao HPV-16, incluindo lesões de baixo grau (GOLDSTONE et al., 2002), papilomatose respiratória recorrente (DERKAY et al., 2005), neoplasia intraepitelial anal (NIA) (PALEFSKY et al., 2006) e neoplasia intraepitelial cervical de alto grau (CIN) (ROMAN et al., 2007; EINSTEIN et al., 2007; VAN DOORSLAER et al., 2009). De maneira geral, as vacinas baseadas em proteínas se mostram seguras, mas a imunogenicidade não pode ser demonstrada em todos os pacientes, e nem sempre se correlaciona com melhorias clínicas, sendo detectada apenas em pacientes imunocompetentes ou com doenças pré-invasivas (FRAZER et al., 2004).

Vacinas baseadas em vetores virais ou bacterianos são capazes de gerar forte resposta celular e humoral (GUNN et al., 2001; JABBAR et al., 2000; LIN et al., 2002). Entretanto, as respostas imunológicas do hospedeiro pré-existentes contra esses agentes podem potencialmente reduzir a eficácia de vacinas vetoriais ou

limitar o número de possíveis vacinações repetidas. Além disso, o potencial intrínseco patogênico de alguns vetores virais e bacterianos pode representar um risco da administração dessas vacinas em indivíduos imunocomprometidos. Vetores vivos, tais como adenovírus e *Listeria monocytogenes* foram modificados para permitir a formulação de tais vacinas. Há muitos estudos pré-clínicos sobre a eficácia de viver vetores virais, tais como vírus vaccinia (ZURKOVA et al., 2009; HSIEH et al., 2004; GOMEZ-GUTIERREZ et al., 2007), adenovírus (LEE et al., 2008; ZHOU et al., 2009) e vírus da estomatite vesicular (VSV) (LIAO et al., 2008; BRANDSMA et al., 2009). Um estudo em camundongos utilizando um vetor adenoviral para entregar a proteína E7 de HPV-16 fusionada à calreticulina (CRT) mostrou a eficácia em proteger camundongos em ensaios de desafio com as células TC-1. Em ensaios clínicos fase I / II um vírus vaccinia recombinante expressando E6 e E7 de HPV16 e 18 foi avaliado em 8 pacientes com câncer cervical de grau avançado, mas não foi detectada regressão de lesões.

As vacinas baseadas em células inteiras incluem vacinas de células dendríticas ou células tumorais. As vacinas baseadas em células dendríticas exigem uma preparação individual de células dendríticas (DCs) pulsadas com peptídeos E6/E7, transfecção com DNA ou RNA que codificam esses peptídeos, ou com vetores vivos que carregam E6/E7. Essa abordagem é trabalhosa e onerosa para ser aplicada a programas de imunização em larga escala. Vacinas baseadas em células tumorais envolvem a administração sistêmica de células de tumor inteiras a fim de auxiliar no reconhecimento de抗ígenos tumorais associadas ao HPV pelo sistema imunológico. No entanto, a introdução de células malignas em pacientes representa um procedimento clínico inviável. A inoculação em ensaios clínicos de DCs pulsadas com a proteína E7 de HPV-16 e HPV-18, na ausência (FERRARA et al., 2003) ou presença (SANTIN et al., 2006) de interleucina 2 (IL-2) humana, promoveu ativação de resposta celular em parte dos pacientes tratados, mas não gerou regressão de lesões.

1.9 Vacinas de DNA

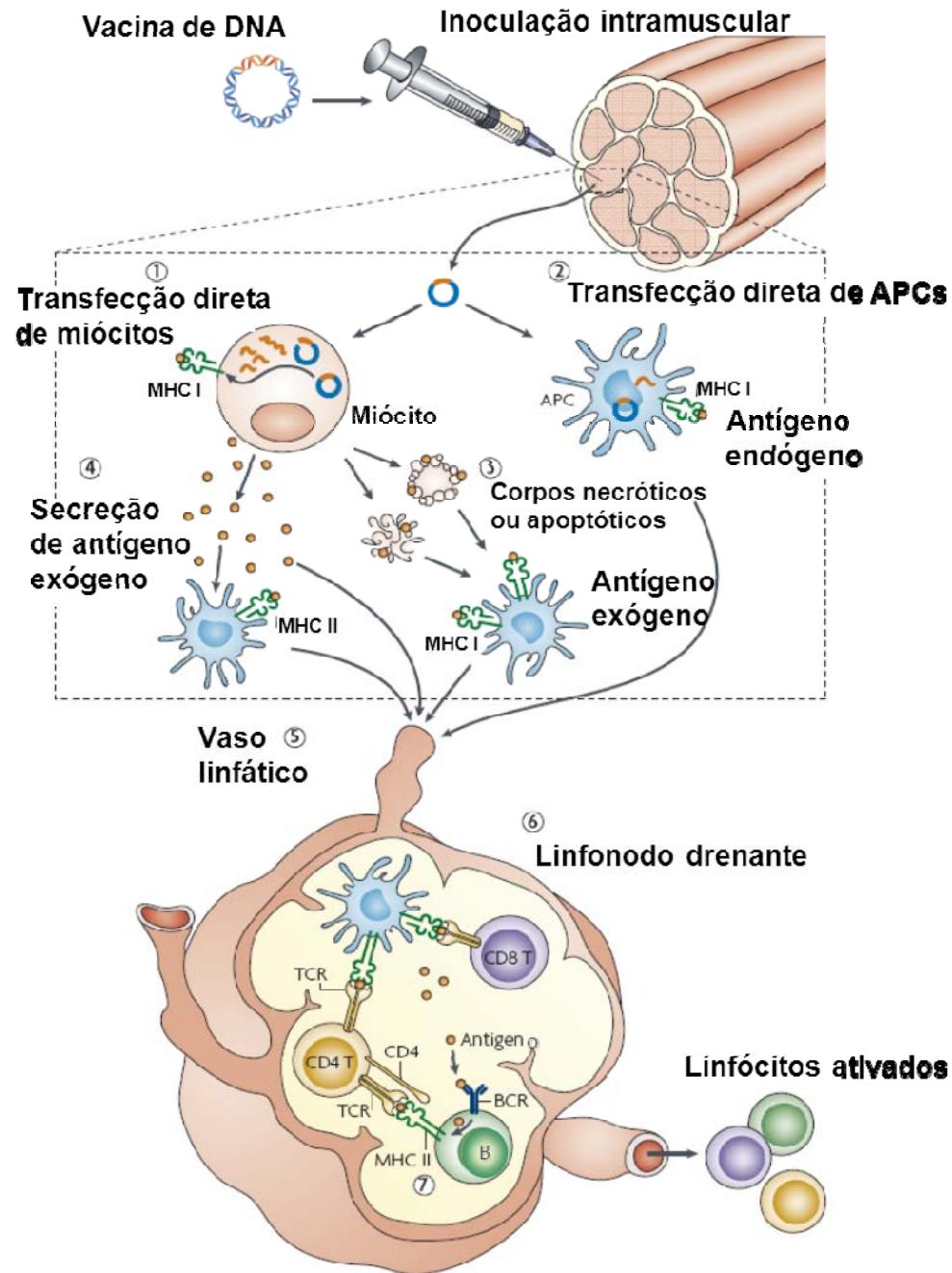
As vacinas de DNA representam uma estratégia interessante na geração de resposta imune antígeno-específica por sua simplicidade, segurança e possibilidade

de administrações repetidas (MONIZ et al., 2003; SHEDLOCK e WEINER, 2000). Além disso, a produção em larga escala deste tipo de vacina é considerada não muito custosa e a comercialização não necessita de uma rede de refrigeração, pois estas vacinas são estáveis à temperatura ambiente, facilitando o transporte, a distribuição e viabilizando a transferência da tecnologia para países em desenvolvimento. Outra vantagem associada às vacinas de DNA é a possibilidade de criação de formulações multivalentes por meio da inserção em um único plasmídeo de vários genes que codifiquem para antígenos distintos, derivados de um mesmo patógeno, ou de patógenos diferentes (DAVIS e MC CLUSKIE, 1999). As vacinas de DNA não se integram ao genoma do hospedeiro e não se replicam no hospedeiro final (NICHOLS et al., 1995). Além disso, não há evidências de mutagênese ou respostas auto-imunes induzidas em indivíduos vacinados com vacinas de DNA (MOR et al., 1997).

Essa estratégia vacinal é composta basicamente por um plasmídeo de origem bacteriana capaz de codificar antígenos sob o controle de promotores fortes. Os vetores plasmídeos, quando injetados nos animais, entram nas células próximas aos locais da administração, incluindo algumas células apresentadoras de antígeno (APCs). As células transfetadas por estes vetores plasmidiais tornam-se capazes de expressar a proteína codificada e podem fazer o processamento das mesmas em peptídeos, que podem ser apresentados via MHC classe I ou II (VOGEL e SARVER, 1995; TIGHE et al., 1998; WEINER e KENNEDY, 1999). As APCs carregadas de antígenos migram para linfonodos drenantes, onde apresentam esses antígenos para células T virgens em combinação com os sinais co-estimulatórios adequados (Figura 2). Também nesse ambiente, as APCs são capazes de estimular células B e ativar a cascata de produção de anticorpos. As APCs desempenham papel fundamental no mecanismo de ação dessas vacinas, pois somente elas podem promover os sinais secundários adequados para gerar células respondedoras ao peptídeo apresentado no contexto da molécula de MHC. As APCs encontram os antígenos codificados pelas vacinas de DNA por transfeção direta, ou mecanismos de apresentação cruzada ainda não completamente esclarecidos, mas que parecem envolver a captação por estas células de corpos necróticos ou apoptóticos de células somáticas que foram transfetadas, ou transferência de peptídeos ou proteínas (DONNELLY et al., 1997).

Figura 2 - Indução de resposta imune celular e humoral por vacinas de DNA. O plasmídeo vacinal é inoculado no hospedeiro através de algum método de entrega disponível (representação de injeção por via intramuscular). Através da maquinaria celular, o plasmídeo entra no núcleo de miócitos tranfetados (1) ou de células apresentadoras de抗ígenos residentes (2). Os componentes do plasmídeo permitem a expressão da proteína codificada que corresponde à produção do抗ígeno sob a forma de proteína ou processados em peptídeos, que podem ser apresentados no contexto de moléculas de MHC classe I ou II. As APCs desempenham um papel fundamental na indução da resposta imune induzida por vacinas de DNA, sendo capazes de apresentar peptídeos via MHC I por transfeção direta de APCs (2) ou por apresentação cruzada de抗ígenos exógenos associados a células, adquiridos por exemplo através da fagocitose de corpos apoptóticos de células transfectadas (3). Além disso, as APCs podem apresentar peptídeos via MHC II a partir da captação de proteínas secretadas por células transfectadas (4). As APCs carregadas com抗ígenos migram para linfonodos drenantes através dos vasos linfáticos (5) onde apresentam os peptídeos para células T virgens através do receptor TCR, em combinação com moléculas co-estimulatórias, promovendo a sinalização adequada para a proliferação de células T (6). A resposta de células B pode ser ativada através da captação de proteínas secretadas por células transfectadas pelos receptores BCR destas células, favorecido por sinais co-estimulatórios e citocinas produzidas por células T CD4 helper.

Fonte: modificado de Kutzler e Weiner (2008).



As vacinas de DNA são mais freqüentemente administradas por injeção direta do DNA em solução salina no músculo do animal, ou pela via intradérmica utilizando o método da biobalística (HASSET e WHITTON, 1996). As duas vias de inoculação têm se mostrado eficientes na geração de resposta humoral ou celular, mas a via intramuscular requer quantidades de DNA maiores por dose, atribuído à escassez de APCs no tecido muscular. Na biobalística, microesferas de ouro são impregnadas com o DNA plasmidial e administradas através do *gene gun* (BARRY et al., 1995), que direciona as partículas para as células da pele, incluindo células Langerhans, que atuam como células apresentadoras de antígeno, mais abundantes neste tecido. Outras vias de inoculação e muitos métodos diferentes de entrega são investigados para vacinas de DNA como micropartículas biodegradáveis, lipossomas, injeção intramuscular seguido por eletroporação *in vivo*, aerosol para entrega em mucosas e adesivos sobre a pele.

Em geral, os primeiros testes clínicos com vacinas de DNA não demonstraram altos níveis de imunidade das vacinas em seres humanos, embora contribuíram para a confirmação da segurança dessa plataforma vacinal. Contudo, novas modificações e melhorias devolveram otimismo quanto à essa tecnologia vacinal. Várias maneiras podem ser utilizadas para aumentar a expressão do antígeno e a imunogenicidade das vacinas de DNA como a otimização dos elementos de transcrição do plasmídeo com o objetivo de melhorar os níveis de expressão do antígeno, inclusão de adjuvantes na formulação ou imunomoduladores e a utilização de novos métodos de entrega (KUTZLER e WEINER, 2008). Esses métodos, especialmente quando combinados, induzem níveis aumentados de resposta imune em roedores, bem como em modelos animais de grande porte. O recente licenciamento de quatro produtos veterinários baseados em plasmídeos (para cavalos, cães, porcos e peixes) também contribuíram para a retomada de fôlego para o campo das vacinas de DNA.

Plasmídeos que codificam citocinas são potentes adjuvantes capazes de aumentar a resposta imune humoral e citotóxica. A co-expressão de diversas citocinas, como IL-2, IL-12, GM-CSF, IL-15, IL-18, entre outras, potencializa respostas a抗ígenos codificados por vacinas de DNA. A interleucina-2 (IL-2) é uma citocina potente produzida por células T ativadas capaz de ativar múltiplos compartimentos do sistema imune e promover a proliferação clonal de células T

(WALDMANN, 2006). Seu uso clínico foi aprovado pelo FDA (do inglês, *food and drug administration*) para o tratamento de câncer renal metastático e melanoma maligno, sendo capaz de induzir respostas clínicas em 15% dos pacientes com esses tipos de câncer (ROSENBERG et al., 1994). Alguns estudos que empregam plasmídeos capazes de codificar a IL-2 têm obtido aumento significativo na resposta imunológica contra o herpes bovino tipo I (KUHNLE et al., 1996), Vírus de hepatite C (GEISSLER et al., 1997), Vírus da imunodeficiência adquirida humana (MOORE et al., 2002), e contra tumores que expressam o HER2/Neu (LIN et al., 2004). A co-expressão de IL-2 também tem sido utilizada para aumentar a resposta imune à glicoproteína D (gD) do HSV-1 utilizada como antígeno em vacinas de DNA (LI et al., 2006).

O tratamento com a citocina IL-12 tem demonstrado acentuada atividade anti-tumoral e anti-metastática em diversos modelos animais (MAZZOLINI; PRIETO; MELERO, 2003; RIEZEBOS-BILAMAN et al., 2009). A capacidade de IL-12 em induzir resposta imune antígeno-específica está relacionada principalmente a sua habilidade em polarizar as respostas imunológicas para um padrão Th1 (HSIEH et al., 1993; MANETTI et al., 1993; TSUNG et al., 1997). Além disso, promove maturação células T citotóxicas e NK (WATFORD et al., 2005) e atua como um sinal secundário ao antígeno no aumento da população de células T CD8⁺ efetoras e de memória (CURTSINGER et al., 2003; VALENZUELA; SCHMIDT; MESCHER, 2002; VALENZUELA; HAMMERBECK; MESCHER, 2005). A IL-12 também é capaz de facilitar a apresentação de抗ígenos através do aumento na expressão de moléculas de MHC classe I e II (WEISS et al., 2007), associado à sua capacidade em promover a expressão de IFN-γ (MANETTI et al., 1993).

GM-CSF é capaz de estimular a proliferação, diferenciação e ativação de macrófagos, neutrófilos e várias APCs (WAKIMOTO et al., 1996; JAGER et al., 1996; JONES; STERN; LIN, 1994; DISIS et al., 1996). Em conjunto com vacinas, GM-CSF demonstrou aumentar a apresentação antigênica atraindo células dendríticas para o sítio de vacinação (TOUBAJI et al., 2007) e a respostas de células T específicas (AHLERS et al., 1997). Além disso, GM-CSF é utilizado em ensaios clínicos como adjuvante para vacinas baseadas em peptídeos (WEBER et al., 2003; CHIANESE-BULLOCK et al., 2005) e para tratamentos de diversos tipos de tumores (SPLITER

et al., 2000; CORREALE et al., 2005; CARTRON et al., 2008; HONKOOP et al., 1999).

Outro aperfeiçoamento técnico que tem contribuído para o ressurgimento de interesse nas vacinas de DNA é a otimização de genes. A substituição dos códons da sequência gênica da proteína de interesse, por códons mais comuns à espécie que receberá o plasmídeo vacinal, promove um aumento na expressão da proteína antigênica e, subsequentemente, nas respostas de células T (YAN et al., 2007; RAMAKRISHNA et al., 2004) e de anticorpos (CHEUNG et al., 2004; NARUM et al., 2001; YADAVA; OCKENHOUSE, 2003).

1.10 Desenvolvimento de uma vacina de DNA para tumores induzidos por HPV

A imunização de camundongos com plasmídeos que codificam os genes de E6 ou E7 sozinhos promove baixos níveis de ativação de células T CD8⁺ e de proteção de tumores associados ao HPV-16. Sendo assim, inúmeros esforços têm sido feitos para aumentar a imunogenicidade destas vacinas, buscando aumentar o número de células dendríticas transfectadas por esses plasmídeos vacinais, favorecer o processamento e apresentação dos抗ígenos via MHC classe I e II, e tornar mais eficiente a interação entre APCs e células T CD8⁺. Nesse sentido, foram estudadas diversas estratégias de vacinas de DNA que codificam as proteínas de HPV fusionadas a proteínas com diferentes ações adjuvantes (CHEN et al., 2000; CHENG et al., 2001; HUNG et al., 2001; TRIMBLE et al., 2003; KIM et al., 2004), gerando formulações vacinais capazes de estimular a ativação de células T CD8⁺ específicas para E7 e E6, conferir proteção profilática total e algum grau de proteção terapêutica em camundongos desafios com células TC-1 transformadas com as proteínas E6 e E7 do HPV-16.

Duas formulações vacinais que tiveram sua prova de conceito realizada em camundongos desafiados com células TC-1, encontram-se atualmente em testes clínicos. Essas vacinas de DNA codificam a proteína E7 (com mutações que impedem a interação desta proteína com a proteína celular Rb) fusionada à proteína HSP70 de *Mycobacterium tuberculosis* (pNGVL4a-Sig/E7(detox)/HSP70) ou à CRT (pNGVL4a/E7(detox)/CRT). Outra formulação vacinal utilizada em ensaios clínicos,

VGX-3100, teve seu método de inoculação testado primeiramente em modelo animal. A eletroporação *in vivo* tem sido usada com sucesso para a administração de vacinas de DNA para tumores associados a HPV em camundongos (SEO et al., 2009) e macacos rhesus (YAN et al., 2008), o que levou à sua utilização em ensaio clínico fase I. Essa vacina codifica as proteínas E6 e E7 dos HPV-16 e 18 e está sendo testada em pacientes com câncer cervical de alto grau.

A vacina de DNA que está em estágio mais avançado em ensaios clínicos utiliza o método de entrega de DNA microencapsulados. A vacina ZYC101, que codifica um epitopo de E7 HLA-A2 restrito (aminoácidos de 83 a 95), passou por dois ensaios clínicos fase I, em pacientes com câncer cervical de alto grau (SHEETS et al., 2003) e com neoplasias intraepiteliais anais de alto grau (KLENCKE et al., 2002). Em ambos os ensaios, a imunização da vacina pela via intramuscular mostrou-se segura e, em alguns pacientes, resultou em regressão histológica de lesões, bem como geração de células T CD8⁺ E7-específicas produtoras de IFN-γ. Uma nova versão dessa vacina foi desenvolvida, ZYC-101a, e codifica as proteínas E6 e E7 de HPV-16 e HPV-18. Essa vacina tem sido utilizada em ensaio clínico de fase II em pacientes com câncer cervical de alto grau e demonstrou promover a resolução das lesões da maioria (70%) dos pacientes com menos de 25 anos (GARCIA et al., 2004).

A estratégia desenvolvida em nosso laboratório para o combate de tumores induzidos por HPV-16 emprega proteínas de HPV geneticamente fusionadas à glicoproteína D (gD) do Vírus Herpes Simplex tipo I (HSV). A gD é um componente estrutural do envelope do HSV e, depois de expressa, localiza-se na membrana plasmática de células infectadas (NORRILD, 1980). A gD está envolvida no processo de ligação ao receptor, fusão e invasão de células nervosas, representando o alvo principal da resposta imunológica contra o HSV (FULLER e LEE, 1992; COHEN et al., 1988).

A gD possui uma região transmembrana e, desta forma, as oncoproteínas do HPV-16 a ela fusionadas são expressas no meio extracelular (ancoradas), reduzindo os riscos de malignização das células transfetadas. Esse direcionamento celular proporcionado pela gD também pode contribuir para um aumento no reconhecimento de proteínas a ela fusionadas por células do sistema imune. Além disso, foi demonstrado que a proteína gD é capaz de gerar sinais estimulatórios para

as células do sistema imune por meio da ativação de NF-κB (POLLARA et al., 2004; CHEUNG et al., 2009).

A proteína gD deve também de aumentar a imunogenecidade de E7 ou outras proteínas a ela fusionadas por exercer uma competição com BTLA (B and T lymphocyte attenuator) pelo sítio de interação com o receptor HVEM (Herpes vírus entry mediator), reduzindo os efeitos co-inibitórios de BTLA em linfócitos T e B (LASARO et al., 2008). O receptor HVEM faz parte da família dos receptores de fatores de necrose tumoral (TNFR) e, além de participar da entrada do vírus HSV em diversos tipos celulares, é capaz de promover a sinalização de sinais co-estimulatórios e co-inibitórios ao sistema imune por meio da interação com diferentes ligantes (CAI e FREEMAN, 2009). Pela interação com os ligantes da família dos fatores de necrose tumoral (TNF), LIGHT e linfotoxina α, a ativação de NF-κB promove a transcrição de diversos genes relacionados à ativação de células do sistema imune. A interação com os ligantes membros da superfamília Ig, BTLA e CD160, promovem a inibição de sinais promovidos pelo reconhecimento de抗ígenos em células T e B.

A proteína gD se liga ao domínio CRD1 de HVEM, bem como BTLA e CD160. Desta forma, ao se ligar ao HVEM, gD impede que BTLA e CD160 se liguem ao receptor, evitando os sinais co-inibitórios promovidos por esses ligantes (LASARO et al., 2008). Já LIGHT e linfotoxina α se ligam ao domínio CRD3 de HVEM, podendo então estar ligada ao receptor simultaneamente com gD, que então irá transmitir seus sinais co-estimulatórios (CROFT et al., 2006).

2 OBJETIVOS

A presente tese de doutorado tem como objetivo a avaliação imunológica de vacinas de DNA contra tumores induzidos por HPV-16 que contêm os genes das proteínas E7 ou E7, E6 e E5 fusionados geneticamente à glicoproteína D (gD) do HSV-1. O trabalho também envolveu a investigação do potencial adjuvante de plasmídeos que codificam as citocinas IL-2, IL-12 ou GM-CSF e do papel da otimização de códons da seqüência que codifica a proteína antigênica. As formulações vacinais foram avaliadas em modelo murino quanto à resposta imune celular induzida e à capacidade de induzir proteção antitumoral preventiva ou terapêutica por meio de implante de células transformadas que expressam as oncoproteínas E6 e E7 do HPV-16.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Vetores vacinais

A construção do vetor pgDE7 (Figura 3A) foi descrita anteriormente (LASARO et al., 2005; nomeada nesse artigo pRE4E7). Em suma, o gene de E7 do HPV-16 foi amplificado por PCR sem seu códon de terminação a partir do genoma total de HPV-16 (gentilmente cedido pelo Dr.Willy Beçak, Instituto Butantan). O gene de E7 do HPV-16 foi clonado no sítio de *Apal* da seqüência da gD do HSV-1 presente no plasmídeo pRE4.

A construção dos vetores pgD-E7E6E5 (Figura 3B) e pE7E6E5 foi descrita anteriormente (LASARO et al., 2008). Resumidamente, o vetor pgD-E7E6E5 foi obtido com a clonagem dos genes E7, E6 e E5 do HPV-16, nesta seqüência e separados por 6 bases que codificam para dois aminoácidos Alanina, no sítio de *Apal* da seqüência do gene da glicoproteína D do HSV-1 presente no vetor pRE4 (COHEN et al., 1988; gentilmente cedido pelos Profs. Gary Cohen e Roselyn Eisenberg, Universidade da Pensilvânia, EUA). Os genes E7, E6 e E5 foram amplificados por PCR separadamente a partir do genoma total do HPV-16 sem seus respectivos códons de terminação. O vetor pE7E6E5 foi gerado pela amplificação dos genes E7, E6 e E5 a partir da seqüência do vetor pgD-E7E6E5 e clonados no sítio de *HindIII* do vetor pRE4 após remoção da seqüência da gD do HSV-1 deste vetor. O vetor pRE4 contém promotor de vírus rous sarcoma (RSV), gene que confere resistência à ampicilina e o sinal de poliadenilação de vírus 40 de simian (SV40).

O vetor pIL-12, gentilmente cedido por Dr. Sérgio Oliveira da Universidade Federal de Minas Gerais, contém o gene da interleucina 12 (IL-12) de camundongo sob o controle do promotor do citomegalovírus (CMV) do vetor pcDNA3.1 (Invitrogen). O vetor pIL-2, gentilmente cedido por Hildegund C. Ertl do Instituto Wistar (Universidade da Pennsylvania, EUA), contém o gene da interleucina 2 (IL-2) de camundongo sob o controle do promotor do CMV do vetor pcDNA3.1 (Invitrogen). O vetor pGM-CSF foi gentilmente cedido por Marina S Palermo (Academia Nacional de Medicina, Argentina) e contém o gene do fator estimulante de colônia de macrófagos granulócitos (GM-CSF) clonado no vetor pcDNA3.1 (Invitrogen).

A construção do plasmídeo pgDE7h (Figura 3C) foi realizada após clonagem do gene sintético gDE7h, que contém a seqüência do gene da E7 do HPV-16

fusionado ao gene da gD de HSV-1 (na posição do sítio de *Apa*I), com a seqüência de códons otimizada para expressão em células humanas. O gene sintético (GenScript, EUA) apresenta, aproximadamente, 50% das bases nitrogenadas da seqüência híbrida (gDE7) modificadas, sem alterar a seqüência da proteína codificada. Nessa seqüência foram inseridos os sítios de clonagem das enzimas de restrição *Not*I (6 primeiras bases) e *Bgl*III (6 últimas bases) para possibilitar a clonagem da seqüência no plasmídeo pUMVC3 (Aldevron, EUA). Além disso, nessa seqüência foram realizadas duas mutações pontuais para impedir a interação da proteína E7 de HPV-16 com a proteína celular Rb, evitando assim o potencial oncogênico de E7. Tais mutações consistiram na troca de uma cisteína por uma glicina na posição 24 de E7 e de um ácido glutâmico por uma glicina na posição 26 de E7. O plasmídeo pUMVC3, que contém promotor de CMV, gene que confere resistência à canamicina e sinal de poliadenilação da β -globina de coelho, foi licenciado para uso em testes clínicos.

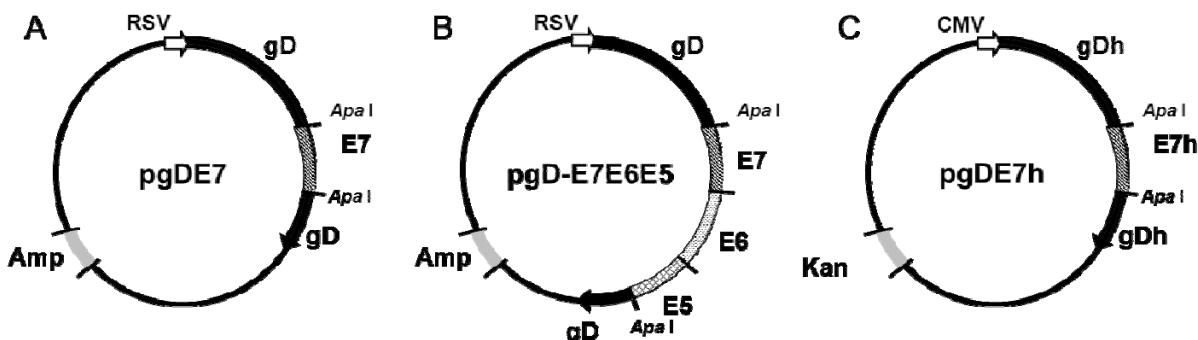


Figura 3 – Esquema dos vetores vacinais. O plasmídeo vacinal pgDE7 (A) codifica a proteína E7 do HPV-16 fusionada à gD do HSV-1, contém gene que confere resistência à ampicilina (Amp) e promotor do RSV. O plasmídeo vacinal pgD-E7E6E5 (B) codifica as proteínas E7, E6 e E5 do HPV-16 fusionadas à gD do HSV-1, contém gene que confere resistência à ampicilina e promotor do RSV. O plasmídeo vacinal pgDE7h (C) codifica a proteína E7 do HPV-16 fusionada à gD do HSV-1 com a sequência gênica otimizada para o sistema de expressão humano, contém gene que confere resistência à canamicina (Kan) e promotor do CMV.

A obtenção dos plasmídios, para serem usados nas imunizações, foi realizada através de propagações em larga escala em linhagens de *Escherichia coli* DH5 α transformadas com os diferentes vetores, em meio LB suplementado com

ampicilina (100 µg/mL) ou canamicina (50 µg/mL), seguido da purificação dos plasmídeos utilizando o kit de purificação de plasmídeos de “Giga Prep” (QIAGEN Endo Free Plasmid Giga, QIAGEN), seguindo instruções do fabricante. As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro a 260nm e confirmadas por inspeção visual em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, utilizando para comparação, fragmentos de DNA padrões com concentrações conhecidas (Invitrogen). Os plasmídeos foram mantidos a -20 °C até o momento de uso, quando a concentração foi ajustada entre 0,05 e 1 µg/µL em PBS.

3.2 Linhagens celulares

A linhagem celular TC-1 (LIN et al., 1996), derivada de células primárias do epitélio pulmonar de C57BL/6 transformadas com v-Has-ras e os genes de E6 e E7 do HPV-16, foi gentilmente cedida pelo Dr. T.C. Wu (Universidade Johns Hopkins, EUA). As células TC-1 foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 2 mM L-glutamina, 1 mM piruvato de sódio, 2 mM aminoácidos não essenciais, 10 mM tampão HEPES, 50 U/mL penicilina/estreptomicina, 10% de soro fetal bovino (SFB) e mantidas a 37 °C e 5% de CO₂. Para o desafio de camundongos C57BL/6, as células foram tratadas com tripsina, lavadas duas vezes, e ressuspensas em meio sem soro, na concentração apropriada para a inoculação, em volume final de 100 µL por camundongo.

3.3 Imunização e desafio com as células tumorais

Os experimentos de imunização foram realizados com camundongos fêmeas C57BL/6 com idade entre 6 e 8 semanas adquiridos do Biotério de Camundongos Isogênicos do Depto de Parasitologia da Universidade de São Paulo, manuseados de acordo com as normas estabelecidas pela comissão de ética do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. Grupos de 5 a 10 animais foram vacinados com as vacinas de DNA por via intramuscular ou intradérmica.

A imunização pela via intramuscular foi feita utilizando entre 5 e 100 µg de DNA diluído em 100 µl de PBS através de inoculação nos músculos tibial anterior de

cada pata (50 µl por pata). A imunização utilizando o processo de biobalística foi feita com uma pistola acoplada a um cilindro de hélio (*gene gun*) de acordo com as instruções do fabricante (BIORAD). Resumidamente, micropartículas de ouro são revestidas pelo plasmídeo vacinal na concentração final de 1 µg de DNA/bala. As micropartículas com o DNA são aceleradas por uma alta pressão de gás hélio (400 psi) e entregues à região abdominal depilada do animal (2 µg de DNA/animal).

A inoculação das células TC-1 foi feita por via subcutânea em camundongos C57BL/6. As células TC-1 foram inicialmente utilizadas na concentração de 5×10^5 células por animal, gerando tumores palpáveis a partir de cerca de 7 dias. Posteriormente, as células TC-1 foram utilizadas na concentração de $7,5 \times 10^4$ células por animal, gerando tumores palpáveis a partir de cerca de 15 dias. As células foram ressuspensas em 100 µL de meio sem soro e inoculadas na região dorso-lateral do animal.

Para a execução do modelo de análise de efeito tumoral preventivo com células TC-1, os camundongos receberam a quantidade determinada de células duas semanas após a última dose do protocolo de imunização. Para determinar o efeito de regressão de tumores já estabelecidos, os camundongos foram desafiados com as células TC-1 e 8 horas após (inicialmente) foi iniciado o protocolo de imunização. O intervalo entre o desafio com as células TC-1 e o início do protocolo de imunização sofreu variações de 0 (8 horas após) a 10 dias. O acompanhamento da evolução dos tumores nos ensaios de proteção profilática e terapêutica foi feito três vezes a cada semana por um período mínimo de 60 dias. Os tumores quando presentes foram medidos com o auxílio de um paquímetro e os animais que apresentaram tumores maiores que 1.5 cm de diâmetro foram sacrificados.

Os experimentos de imunização envolvendo co-administração de plasmídeos que codificam citocinas foram realizados com o número de doses variando entre uma e três. Pela via intramuscular, a quantidade de DNA/dose aplicada foi de 5, 10, 25, 50 ou 100 µg de DNA de cada plasmídeo, diluído em 100µl de PBS e inoculados nos músculos tibial anterior de cada pata (50 µl por pata). A dose da combinação vacinal foi administrada no mesmo dia (dia 0), 3, 7, 10 ou 14 após o desafio com as células tumorais. A combinação vacinal também foi inoculada pela via intradérmica com o uso da biobalística, com o uso de 1 µg de DNA de cada plasmídeo por dose. Essas imunizações empregaram os vetores pgD, pE7E6E5, pgDE7 e pgD-E7E6E5

ou pgDE7h em combinação com vetores pIL-2, pIL-12, pGM-CSF ou pcDNA3.1 (vazio).

A partir desses ensaios, foi fixado um protocolo de imunização otimizado que foi utilizado nos ensaios de respostas celulares com o vetor vacinal pgDE7 co-administrado ao plasmídeo que codifica a citocina IL-2. O protocolo empregado nesses ensaios consistiu em uma dose de 50 µg de DNA de cada plasmídeo, administrado pela via intramuscular, três dias após o desafio com $7,5 \times 10^4$ células TC-1.

3.4 Detecção de células produtoras de IFN-γ por ELISPOT

Os ensaios de ELISPOT ((Enzyme-Linked Immunosorbent Spot) foram realizados para detectar células produtoras de IFN-γ mediante estímulo com o peptídeo E7₄₉₋₅₇ MHC classe I (K^b) restrito. Este ensaio detecta citocinas secretadas individualmente por cada célula em resposta ao estímulo *in vitro*. O ensaio foi realizado segundo metodologia descrita anteriormente (MIYAHIRA et al., 1995). Duas semanas após a dose vacinal, os animais foram submetidos à eutanásia, seus baços removidos, processados conforme descrito e as células utilizadas para o ensaio. Os esplenócitos (2×10^5 células/poço) foram adicionadas em placa de 96 poços (Milipore), previamente sensibilizada com anticorpo monoclonal de captura anti-mouse IFN-γ (BD Biosciences) na concentração de 10 µg/mL. As células foram incubadas por 24 horas a 37 °C e 5% de CO₂ na ausência ou presença do estímulo (1 µg/mL de peptídeo). No dia seguinte, as células foram desprezadas, a placa lavada 3 vezes com PBS e 5 vezes com PBS-Tween e incubada com anticorpo monoclonal anti-mouse IFN-γ biotinilado (BD Biosciences) na concentração final de 2 µg/mL. Após uma noite a 4 °C, a placa foi novamente lavada e submetida à revelação com uma solução contendo diaminobenzidina por 30 minutos. Os spots foram contados com o auxílio de uma lupa. Testes estatísticos T Student foram apicados para a comparação de dados individuais.

3.5 Ensaio de marcação intracelular de IFN- γ em células CD8 $^{+}$

A marcação de IFN- γ intracelular foi realizada com células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de camundongos imunizados 14 dias após a administração da dose vacinal. As células foram tratadas por 5 minutos no gelo com Ack Lising Buffer (BioSource International) até ruptura das hemárias e então centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos. As células foram incubadas a uma concentração de 10^6 células/poço por 6 horas a 37 °C 5% CO₂ na presença de Brefeldin A (GolgiPlug; BD Biosciences) e ausência ou presença do peptídeo específico de E7 (aminoácidos 49-57; RAHYNIVTF) (FELTKAMP et al., 1993). Após este período, as células foram incubadas por 30 minutos a 4 °C com anticorpo anti-CD8 conjugado com fluoresceína (FITC) (BD Biosciences). Após permeabilização com Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) por 20 minutos a 4 °C, as células foram tratadas com anticorpo anti-IFN- γ conjugado a ficoeritrina (PE) (BD Biosciences) por 30 minutos a 4 °C. As células foram ressuspendidas em PBS e examinadas por citometria de fluxo utilizando o aparelho FACS Calibur (BD Biosciences). Os dados foram analisados com o auxílio do programas FlowJo para a determinação das porcentagens de células INF- γ $^{+}$ /CD8 $^{+}$ sobre o total de células CD8 $^{+}$. Testes estatísticos T Student foram apicados para a comparação de dados individuais.

3.6 Marcação com trâmero e avaliação de linfócitos infiltrantes no tumor

Camundongos foram desafiados com $7,5 \times 10^4$ células TC-1 ressuspendidas em 250 μ l de meio DMEM sem soro misturado a 250 μ l de BD Matrigel (BD Biosciences). As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e as células provenientes dos tumores foram isoladas 14 dias após a dose vacinal e marcadas por 30 minutos com anticorpo anti-CD8 $^{+}$ conjugado com fluoresceína (FITC) (BD Biosciences) e com tetrâmero de MHC classe I carregando o peptídeo RAHYNIVTF de E7 conjugado com aloficocianina (APC) (Proimmune). As células foram examinadas por citometria de fluxo utilizando o aparelho FACS Calibur (BD Biosciences), analisando 100.000 células. Os dados foram analisados com o auxílio do programas FlowJo para a determinação das porcentagens de células

tetrâmero⁺/CD8⁺ sobre o total de células CD8⁺ e de células CD8⁺ sobre o total de células viáveis. Testes estatísticos T *Student* foram apicados para a comparação de dados individuais.

3.7 Ensaio de citotoxicidade *in vivo*

O ensaio de citotoxicidade *in vivo* (BARBER; WHERRY; AHMED, 2003) foi realizado 14 dias após a dose vacinal. Resumidamente, cerca de 2×10^8 células de baço de camundongos não imunizados foram incubadas com 0,5 µM ou 5 µM de CSFE em PBS, por 15 minutos a 37 °C. Após a incubação, as células foram lavadas e ressuspensas em meio RPMI acrescido de 1% de soro fetal bovino (RPMI 1%). Ao tubo contendo a população de células marcadas com 5 µM de CSFE, foi adicionado 25 µM do peptídeo de E7 (RAHYNIVTF) e incubado por 40 minutos a 37 °C. Após este período, as células foram lavadas com meio RPMI acrescido de 1% de SFB e contadas. Quantidades iguais das duas populações de células marcadas foram misturadas em um tubo e centrifugadas a 1.500 rpm. O precipitado de células foi ressuspensido em RPMI sem soro fetal bovino em uma concentração de 2 a 4×10^7 células/100 µL e injetado, pela veia do plexo retro orbital, em todos os animais que receberam as vacinas e no grupo que recebeu apenas PBS. Após 24h, todos os animais foram submetidos à eutanásia, as células dos baços coletadas, ressuspensas em PBS e examinadas por citometria de fluxo para detecção de fluorescência emitida pelas duas populações celulares utilizando o aparelho FACS Calibur (BD Biosciences). Os dados foram analisados pelo programa FlowJo para a determinação das porcentagens de lise das células marcadas com 5 µM de CFSE em relação à população marcada com 0,5 µM de CFSE.

4 RESULTADOS

4.1 Capítulo I

Anti-tumor DNA vaccines based on the expression of human papillomavirus-16 E6/E7 oncoproteins genetically fused with the glycoprotein D from herpes simplex virus-1

As vacinas de DNA, por sua capacidade de indução de resposta citotóxica, despertaram grande interesse como potencial estratégia vacinal contra diversos tipos de tumores. Em relação a tumores induzidos por HPV-16, duas proteínas virais são expressas constitutivamente nas células tumorais (E6 e E7) e, portanto, são antígenos bem definidos para vacinas contra esse tipo de câncer. Entretanto, vacinas de DNA que codificam apenas para as proteínas E7 e E6 do HPV-16 não são capazes de induzir respostas celulares detectáveis, ou proteção em desafios com células capazes de formar tumores e que expressam as proteínas E6 e E7.

A estratégia vacinal elaborada pelo nosso grupo para aumentar a imunogenicidade dessas proteínas foi a construção de um plasmídeo que codifica as proteínas E7 e/ou E6 de HPV fusionadas à glicoproteína D (gD) do HSV-1. Em trabalho anterior (ALVES et al., 1999) foi observada a habilidade de gD em aumentar a resposta de anticorpos a antígenos a ela fusionados. Neste capítulo, apresentamos os resultados obtidos na investigação da capacidade dessa proteína em potencializar também respostas celulares. A vacina de DNA que codifica as proteínas E7 e E6 de HPV-16 fusionadas à gD de HSV-1 foram testadas em relação à capacidade de induzir ativação de células T CD8⁺ e promover efeitos antitumorais em camundongos desafiados com células que expressam as proteínas E6 e E7 de HPV-16 (linhagem TC-1).

Por meio do trabalho aqui apresentado foi possível validar o potencial adjuvante da gD para a indução de resposta citotóxica, reforçado pela ativação significativa de células T CD8⁺ E7-específicas, resposta protetora preventiva total, e resposta terapêutica parcial (40%) à formação de tumores induzidos por células TC-1 em camundongos imunizados. O trabalho envolveu as etapas de construção das vacinas a caracterização das respostas imunológicas induzidas. A partir dos resultados obtidos foi possível gerar a prova de conceito que norteou todo o trabalho de doutorado.



Available online at www.sciencedirect.com



Microbes and Infection 7 (2005) 1541–1550

Microbes and Infection

www.elsevier.com/locate/micinf

Original article

Anti-tumor DNA vaccines based on the expression of human papillomavirus-16 E6/E7 oncoproteins genetically fused with the glycoprotein D from herpes simplex virus-1

Marcio O. Lasaro ^{a,b}, Mariana O. Diniz ^a, Arturo Reyes-Sandoval ^{b,1},
Hildegund C. Ertl ^b, Luis C.S. Ferreira ^{a,*}

^a Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, 05508-900, Brazil

^b The Wistar Institute, Philadelphia, PA, 19104, USA

Received 7 January 2005; accepted 16 May 2005

Available online 09 September 2005

Abstract

DNA vaccines encoding the human papillomavirus type-16 (HPV-16) E6 and E7 oncoproteins genetically fused to the human herpes simplex virus type 1 (HSV-1) gD protein were tested in mice for induction of T cell-mediated immunity and protection against tumor cell challenge. Hybrid genes, generated after insertion of E6 or E7-encoding sequences into internal sites of the gD-encoding gene, were transcribed in vitro and the chimeric proteins were expressed at the surface of in vitro-transfected mammalian cells. Female C57BL/6 mice immunized with 4 intramuscular doses (100 µg of DNA/dose) of the DNA vaccines encoding E7 efficiently generated E7-specific CD8⁺ T cells. Vaccination of mice with the DNA vaccines encoding the E7, or both E6 and E7, conferred complete protection to challenges from TC-1 tumor cells and partial therapeutic effect (40%) in mice inoculated with TC-1 cells on the same day or 5 days prior to the first vaccine dose.

© 2005 Elsevier SAS. All rights reserved.

Keywords: HPV-16; E6 and E7 oncoproteins; Anti-cancer vaccines; Papillomavirus; DNA vaccines; HSV; gD

1. Introduction

Cervical cancer is a leading cause of cancer deaths in women worldwide, claiming approximately 300,000 – 400,000 lives each year [1]. Virtually all cases of cervical cancer are associated with persistent human papillomavirus (HPV) infections [2]. Over 100 genotypes of HPVs have been classified on the basis of DNA sequence homology, biological behavior and tissue tropism [3]. Mucosotropic HPVs are grouped into low- and high-risk genotypes on the basis of

association with benign or malignant disease. Although a large number of high-risk HPV genotypes (including 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, and 68) are associated with cancer, HPV-16 and HPV-18 are the two most prevalent types, as HPV-16 sequences are found in approximately 50-60% of cervical malignancies [2,4].

Cancer vaccines hold promise as non-invasive alternatives for the eradication of tumor cells without the physical and psychological trauma of surgical or chemotherapeutic interventions. Numerous studies have described the development of vaccines targeting cancers induced by HPV-16 [5]. Most anti-HPV cancer vaccines had focused on the E7 oncoprotein, although vaccines based on E6 and E5 have also been tested [5]. DNA vaccines are easy to generate, amendable to genetic modifications of the inserted sequences and induce a full spectrum of adaptive immune responses, including activation of CD8⁺ cytolytic T cells, making them appealing candidates for immunotherapy of cancer and chronic virus infections [6]. However, DNA vaccines encoding the E7 protein have been shown to induce low E7-specific CD8⁺ T cell-

Abbreviations: GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; gD, glycoprotein D; HPV, human papillomavirus; HSV, herpes simplex virus; i.m., intramuscularly; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; PBS, phosphate-buffered saline; s.c., subcutaneously.

* Corresponding author. Av. Prof. Lineu Prestes 1374, Cidade Universitária, São Paulo, SP, 05508-000, Brasil. Tel +5511 30917338; fax: +5511 3091 7354.

E-mail address: lcsf@usp.br (L.C.S. Ferreira).

¹ present address: Wellcome Trust Centre for Human Genetics, University of Oxford, Roosevelt Drive, Oxford, OX3 7BN, UK.

responses and lack of anti-tumor protective responses in murine models [7–10]. In order to enhance the immunogenicity of E7-based DNA vaccines, the encoded E7 protein were fused to different carrier proteins, such as calreticulin [9], *M. tuberculosis* HSP70 [10], lysosome-associated membrane protein 1 [11], serpinb9 [12], and the translocation domain of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A [13]. In most cases, the vaccines elicited both increased activation of E7-specific CD8⁺ T cells and conferred protective immunity, under preventive and therapeutic immunization conditions, to mice challenged with tumors cells expressing HPV-16 oncoproteins.

In a search for new proteins able to enhance the immunogenicity of HPV-16 oncoproteins encoded by DNA vaccines, we report the results obtained with vaccines designed to encode the E7 and E6 oncoproteins genetically fused to the glycoprotein D (gD) from HSV-1. The gD is a surface-exposed protein anchored to the membrane of infected cells by means of a short sequence located near the C-terminal end [14]. A recombinant gD-fused protein encoded by a DNA vaccine was previously shown to be correctly expressed and processed by transfected cells and leaded to enhanced immune responses to the heterologous antigen in vaccinated mice [15,16]. Moreover, expression of the HPV-16 oncoproteins at the extra-cellular environment would conceivably reduce the oncogenic risk of transfected cells. Here we show that DNA vaccines encoding hybrid gD genetically fused with HPV-16 oncoproteins elicited activation of E7-specific cytolytic T-cell precursors. More relevantly, mice immunized with the vaccines encoding E7 or E6/E7 oncoproteins fused with gD were protected to challenges carried out with E6/E7 expressing TC-1 tumor cells either in preventive model or in a therapeutic approach. Thus, the proposed DNA vaccine strategy represents a promising alternative both for prophylactic and therapeutic control of HPV-16-induced tumors.

2. Materials and methods

2.1. Construction of DNA vaccines

DNA vaccines encoding chimeric proteins based on the fusion of the HPV-16 E6 and/or E7 oncoproteins and the HSV-

1 gD protein were constructed in three steps (Fig. 1). Initially the E6 and E7 genes, without their respective stop codons, were amplified by PCR using the HPV-16 complete genome as a template (kindly supplied by Dr. Willy Beçak, Butantan Institute, Brazil). Amplification reactions were carried out with the following primers: E6 forward CAG CTG ATG CAC CAA AAG AGA ACT GC, E6 reverse GTC GAC CAG CTG GGT TTC TCT ACG TG, E7 forward CAG CTG GGC CCA TGC ATG GAG ATA CAC, E7 reverse CCA TGG TGG GCC CCG GTT TCT GAG. Reactions were performed in a Mastercycler gradient 5331 (Eppendorf) programmed as follows: 95 °C for 10 min, 30 cycles of 95 °C for 1 min, 58 °C for 1 min and 72 °C for 1 min, and an extension step at 72 °C for 10 min at the end of the cycle. Once purified, the DNA fragments encompassing the E6 and E7 coding genes were cleaved with *Pvu*II and *Apa*I, respectively. In the second step, the DNA fragments were cloned in the pRE4 vector, provided by Drs. G. Cohen and Roselyn Eisenberg (University of Pennsylvania, USA). The pRE4 vector contained the glycoprotein D coding gene from HSV-1, expressed under the control of the Rous Sarcoma virus (RSV) promoter region, and unique *Pvu*II and *Apa*I sites at positions corresponding to bases 157 and 803 of the gD structural gene, respectively [16]. The DNA fragment containing the E6 gene was cloned in frame into the *Pvu*II site while the E7 gene-containing fragment was cloned into the *Apa*I site at the structural region of the gD encoding gene. The resulting chimeric proteins encoded by the vectors pgDE6 and pgDE7, expressed the complete amino acid sequence of gD protein fused in frame with the sequences of E6 and E7 HPV-16 oncoproteins resulting in recombinant proteins composed of 545 and 492 amino acids, respectively. The third plasmid vector, encoding both E6 and E7 protein genetically fused to the gD protein, required a last cloning step which involved the insertion of the E7-encoding fragment into the *Apa*I site of vector pgDE6, resulting in the vector pgDE6E7, capable of encoding a hybrid protein with 643 amino acids and containing the complete E6 and E7 amino acid sequences at sites corresponding to amino acids 53 and 268 of the gD protein. The correct in frame cloning of the E6 and E7 encoding genes were confirmed after nucleotide sequencing using the dideoxy chain-termination method [17] carried out in Genetic Analyzer 3100 model sequencer

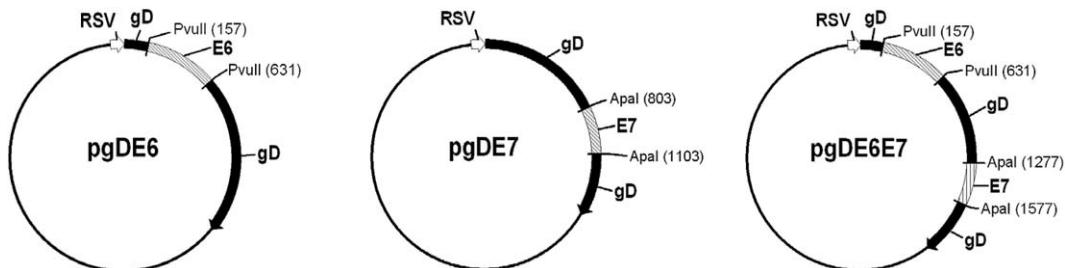


Fig. 1. Schematic representation of DNA vaccines generated in the present work. The HPV-16 E6 and E7-encoding genes without respective stop codons were amplified by PCR and cloned into the *Pvu*II (at position 157) and *Apa*I (at position 803) restriction sites of the HSV-1 gD gene, respectively. All vectors were designed in order to generate in frame fusions under control of RSV promoter. The vector with the E6 gene fused at *Pvu*II site of the gD gene was denominated pgDE6, while the vector with the E7 gene inserted at the *Apa*I was named pgDE7. The third vector, named pgDE6E7, was obtained after cloning the E7 gene at the *Apa*I site of pgDE6. The regions representing the gD-, E6-, and E7-encoding sequences are indicated in the plasmid maps as well as restriction sites used for cloning.

(Applied Biosystems). All plasmids were propagated in *Escherichia coli* K12 DH5 α strain in LB medium supplemented with ampicillin and purified after equilibrium density CsCl gradient centrifugation, repeated twice, followed by precipitation with ethanol and suspension in sterile water. The DNA contents of the samples were determined in a spectrophotometer set at 260 nm and confirmed upon visual inspection in ethidium bromide-stained 1% agarose gels using DNA fragments of known concentration (Invitrogen). Plasmids were kept at -20 °C until use when DNA concentration was adjusted to 1 μ g/ μ l in phosphate-buffered saline (PBS).

2.2. Mice used in the immunization experiments

Female BALB/c and C57Bl/6 mice at 6–8 weeks of age were used for these studies. Animals were purchased from Animal Breeding Center of the Biomedical Sciences Institute of the University of São Paulo or Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine) and housed at the Microbiology Department of the University of São Paulo or at the Animal Facility of the Wistar Institute, respectively. All procedures involving handling and sacrifice of animals were performed according to approved protocols in accordance with recommendations for the proper use and care of laboratory animals at the Biomedical Sciences Institute of the University of São Paulo and at the Wistar Institute.

2.3. Cell lines

TC-1 tumor cells, derived from C57BL/6 origin lung epithelial cells transformed with v-Ha-ras and HPV-16 E6 and E7 genes, was provided by Dr. T.C. Wu, Johns Hopkins University, Baltimore, MD, USA [18]. The t(10)1rasE7E6 cell line was derived from an immortalized embryonic BALB/c fibroblast cell line with a spontaneous mutation causing the loss of both p53 allele [19]. The cells were further transfected with a triple promoter retroviral vector encoding v-Ha-ras together with E6 and E7 encoding genes of HPV-16 [20]. TC-1, t(10)1rasE7E6 cells, and baby hamster kidney (BHK)-21 cells were propagated in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 2 mM nonessential amino acids, 10 mM HEPES buffer, 50 units/ml penicillin/streptomycin, 10% fetal bovine serum (FBS) and kept at 37 °C at 10% CO₂. On the day of tumor challenge, both TC-1 and t(10)1rasE7E6 tumor cells were harvested by trypsinization, washed twice, and suspended in serum-free media at appropriate concentrations for injection.

2.4. Immunization and tumor cell challenge of mice

Groups of 5 to 10 mice were vaccinated with the DNA vaccines or an empty control vector given 4 times intramuscularly (i.m.) in 2-week intervals. Each dose of 100 μ g of DNA was divided in two 50 μ l aliquot and applied into the tibialis anterior muscle of each hind limb. Mice were chal-

lenged subcutaneously (s.c.) with 5×10^5 TC-1 cells (in C57BL/6 mice) or 10^5 t(10)1rasE7E6 cells (in BALB/c mice), suspended in 100 μ l of serum-free media, and injected at one rear flank of the animals 2 weeks after the last immunization. To determine the therapeutic effect of post-challenge vaccination, C57Bl/6 mice were vaccinated on the day 0 or day 5 after challenge with 5×10^5 TC-1 cells. Three additional vaccine doses were given to the animals with intervals of 2 weeks between doses. Tumor growth was monitored by visual inspection and palpation three times a week after challenge. Animals were scored as tumor-bearing when tumors attained sizes of approximately 1–2 mm in diameter. Mice were euthanized once tumors exceeded a diameter of 1 cm. Unless otherwise stated, tumor growth was followed for a period of 60 days after the challenge.

2.5. Transfection of cells and immunofluorescence analysis

BHK-21 cells were cultivated in six-well culture plates at an initial concentration of 2×10^5 cells per well in 3 ml of culture media. The following day cells were transfected with 1 μ g of DNA and Lipofectin™ following instructions of the manufacturer (Invitrogen). After 48 hrs, transfected cells were harvested, washed with PBS, fixed with 2% formaldehyde and 0.2% glutaraldehyde for 5 min at room temperature, washed again three times with PBS, and, finally, incubated with a blocking solution (1% bovine serum albumin in PBS) for 15 min before being probed with primary antibodies for subsequent labeling for immunofluorescence analysis. The monoclonal antibody DL6, used at a dilution of 1:500 (kindly provided by Drs. G. Cohen and Roselyn Eisenberg University of Pennsylvania, USA), reacts specifically with amino acids 272–279 of the gD protein [16] and, thus, was not expected to be affected by insertion of the HPV-16 sequences. Polyclonal antibodies to HPV-16 E7 and E6, supplied from Drs. Andrea Balan and Maria Sbrogio-Almeida (University of São Paulo, Brazil) were used at a dilution of 1:100. These antibodies were generated after 4 s.c. inoculations (10 μ g of protein/dose) of BALB/c mice with purified recombinant E6 or E7 protein emulsified in complete (first dose) or incomplete Freund adjuvant (3 remaining doses) given in intervals of 2 week. Cells were washed twice with PBS and then incubated for 45 min with a 1:200 dilution of a FITC-labeled goat anti-mouse IgG (Sigma). Cells were washed twice with PBS, dried at room temperature for 15–20 min, and visualized with an immunofluorescence inverted microscope (Axiovert model S100, Zeiss) equipped with digital camera (Hamamatsu model C5810, Sanyo Denki).

2.6. Detection of transcripts by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and real-time PCR

Total RNA was isolated from BHK-21 cells 24 hrs after transfection using the Ultraspec RNA solution system kit (Biotex), following the manufacturer's instructions. The RNA was transcribed in vitro with RNA polymerase of the MEGA-

script transcription kit (Ambion) for 16 hrs at 37 °C. Template DNA was removed by treatment with DNase I (Ambion) for 1 h at 37 °C, following addition of 5 µl of DNase inactivation reagent (Ambion) and incubation for 5 min on ice. Samples were centrifuged at 13,000 g for 3 min and supernatants were used for reactions. Specific primers for E7, E6 and gD were used for RT-PCR reactions, as follows E7 (forward primer, GCA ACC AGA GAC AAC TGA TC; reverse primer, GGT CTT CCA AAG TAC GAA TG) with an amplicon length of 296 bp; E6 (forward primer, ACA GGA GCG ACC CAG AAG TTA C; reverse primer, CAG CTG GGT TTC TCT ACG TGT TCT TG) with an amplicon length of 476 bp; and gD (forward primer, CTC TCT CAA GAT GGC CG; reverse primer, CCA GTA CAC AAT TCC GC) with an amplicon length of 993 bp. The PCR cycling was conducted with Taq polymerase (Roche) at 94 °C (1 min), 55 °C (1 min) and 72 °C (1 min) for 30 cycles. Samples were run in an ethidium bromide-stained 1% agarose gel. To perform quantitative real-time PCR a standard curve was prepared for E6, E7 and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) sequences. E6, E7 and GAPDH genes under control of T7 promoter were in vitro transcribed with RNA polymerase of the MEGAscript transcription kit (Ambion) for 16 hrs at 37 °C. Template DNA was removed by DNase I (Ambion) for 25 min at 37 °C, following addition of 5 µl of DNase inactivation reagent (Ambion) and incubation for 5 min on ice. Samples were centrifuged at 13,000 g for 3 min and supernatants were used for RNA quantification. Total RNA concentration was measured in a spectrophotometer at 260 nm and the number of RNA copies was calculated according to the formula (6×10^{23} copies/mol × concentration in g/µl)/(molecular weight in g/mol). Standard curves consisted in serial dilutions of genes ranging from 1×10^2 to 1×10^8 copies of RNA. Total RNA from the same preparations of cells transfected with the tested vectors were used for amplification with E6, E7, and GAPDH-specific primers vectors. In addition to E6 and E7 primers listed above, GAPDH primers (forward primer, GGT GAA GGT CGG TGT GAA CGG ATT T, and reverse primer, AAT GCC AAA GTT GTC ATG GAT GAC C) were used. They yielded an amplicon with a length of 502 bp. Quantitative real-time PCR was conducted using the LightCycler-RNA amplification kit SYBR Green 1 (Boehringer Mannheim) following manufacturer's directions. Master mixes for each set of primers (E6, E7, and GAPDH) were prepared and aliquots (19 µl) of each mix and one microliter of RNA samples were transferred to precooled LightCycler capillary tubes. Quantitative real-time PCR was performed with 5 mM of Mg²⁺ concentration, Platinum DNA Taq polymerase (Invitrogen), and the primer annealing temperature was set at 60 °C for E6 and E7, and 55 °C for GAPDH, while the elongation step was set at 20 s for E6, E7, and GAPDH. The data were quantified with the software included with the LightCycler. GAPDH mRNA was used as reference and the results are presented as the number of mRNA copies (of E6 or E7) per 1,000 copies of GAPDH mRNA.

2.7. Intracellular cytokine staining

Intracellular IFN-γ staining was performed using peripheral blood mononuclear cells (PBMC) two weeks after the last vaccine dose. Blood samples were harvested by retro-orbital puncture into heparinized capillaries. Blood cells were treated for 5 min on ice with Ack lysing buffer (BioSource International) to rupture red blood cells, and then centrifuged at 1,000 g for 5 min. PBMC were treated again with the lysis buffer, centrifuged and suspended in DMEM. PBMC were cultured at concentration of 10^6 cells/well for 5 hrs at 37 °C in a 96-well round bottom microtiter plate (Costar) in 200 µl of DMEM supplemented with 2% FBS and 10^{-6} M 2-mercaptoethanol. Brefeldin A (GolgiPlug; BD PharMingen) was added at 1 µl/ml. The E7-specific RAHYNIVTF peptide, which carries the immunodominant epitope of E7 for mice of the H-2^b haplotype [21], or the V3 control peptide delineated from the sequence of the envelope protein of HIV-1 clade B (VVEDEGCTNLSGF) were used for peptide stimulation at a concentration of 3 µg/ml. After washing, cells were incubated for 30 min at 4 °C with 100 µl of a 1:100 dilution of a fluorescein (FITC)-conjugated monoclonal antibody to mouse CD8a (BD PharMingen). Cells were washed once with PBS followed by permeabilization with Cytofix/Cytoperm (BD PharMingen) for 20 min at 4 °C, washed twice with Perm/Wash buffer (BD PharMingen) and incubated in the same buffer for 30 min at 4 °C with 50 µl of a 1:100 dilution of a phycoerythrin (PE)-labeled monoclonal antibody to mouse IFN-γ (BD PharMingen). After washing, cells were suspended in PBS and examined by two-color flow cytometry using an EPICS Elite XL (Beckman Coulter). Data were analyzed by WinMDi software. The percentages of antigen specific CD8⁺ T cells that stained positive for IFN-γ over all CD8⁺ T cells were determined.

2.8. Statistical analyses

All data expressed as means ± SD are representative of at least two different experiments. Student's t-tests were employed whenever individual data points were compared.

3. Results

3.1. Construction and characterization of the DNA vaccine vectors

To ensure that the DNA vaccines expressed the expected chimeric transcripts, BHK-21 cells were transiently transfected with the expression vectors. Two days later, RNA was isolated and, upon reverse transcription and PCR amplification with primers specific for the HPV-16 oncogenes and the gD-encoding sequences, amplicons of the anticipated size were detected for both the E6 and E7 sequences (Fig. 2). Similarly, gD-specific primers annealing at sequences outside the sites into which the E6 and E7-encoding genes had been

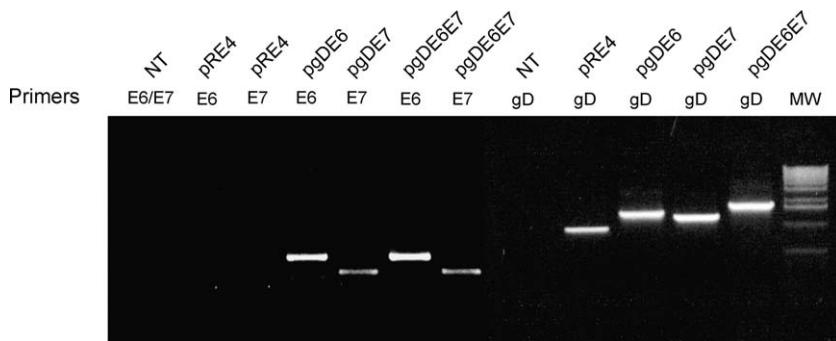


Fig. 2. Transcription of the chimeric genes encoded by the HPV-HSV DNA vaccines following transfection of BHK-21 cells. Total RNA extracted from BHK-21 cells non-transfected (NT) or transiently transfected with the different DNA vaccines were reversed transcribed and amplified by PCR with primers specific for the E6, E7 or gD-encoding genes. Amplicons were separated in a 1% agarose gel stained with ethidium bromide. The position of the 1 kb molecular weight marker (MW) is indicated. The predicted amplicon lengths are: 296 bp and 476 bp for E7- and E6-encoding sequences, respectively; 993 bp for the gD-coding sequences and 1,289 bp and 1,469 bp for the gD sequences genetically fused to E7 or E6, respectively.

inserted showed amplicons with the predicted molecular weights (Fig. 2). Antigenic load achieved by vaccine constructs is one of the parameters that determine the magnitude of the ensuing adaptive immune responses. Therefore, we measured by real-time RT-PCR the levels of transcript expression in BHK-21 cells transiently transfected with the DNA vaccines. As shown in Table 1, products of the hybrid genes encoded by pgDE6 and pgDE6E7 were detected as 1,972.2 and 3,045.7 copies per 1,000 copies of GAPDH mRNA, respectively, as detected with E6-specific primers. On the other hand, the vector encoding E7 or E6 and E7 fused with gD encoded 1,036.5 or 2,154.9 copies of mRNA per 1,000 copies of GAPDH mRNA, respectively, as demonstrated with E7-specific primers. These results confirm that all constructs were transcribed at rather high levels, in comparison to the GAPDH gene.

The HSV gD is a virus envelope glycoprotein, which is expressed on the surface of infected cells via a C-terminal-located anchor sequence [14]. To confirm expression and determine the cellular location of the hybrid polypeptides encoded by the different DNA vaccine vectors, we tested the expression of the encoded proteins on transiently transfected

BHK-21 cells by indirect immunofluorescence using antibodies to gD, E6 and E7. As shown in Fig. 3, cells transfected with the pRE4 vector failed to bind E6- or E7-specific antibodies although they stained with the MAb to gD. These antibodies also stained cells transfected with vectors expressing the gDE6 or/and gDE7 fusion proteins. Cells transfected with the pgDE7 or the pgDE6 vector stained with antibodies directed to the corresponding HPV-16 antigens while cells transfected with the pgDE6E7 vector bound antibodies specific to E6 and E7. Since the labeling experiments were carried out with non-permeabilized cells, the results indicate that the encoded hybrid proteins are located on the surface of trans-

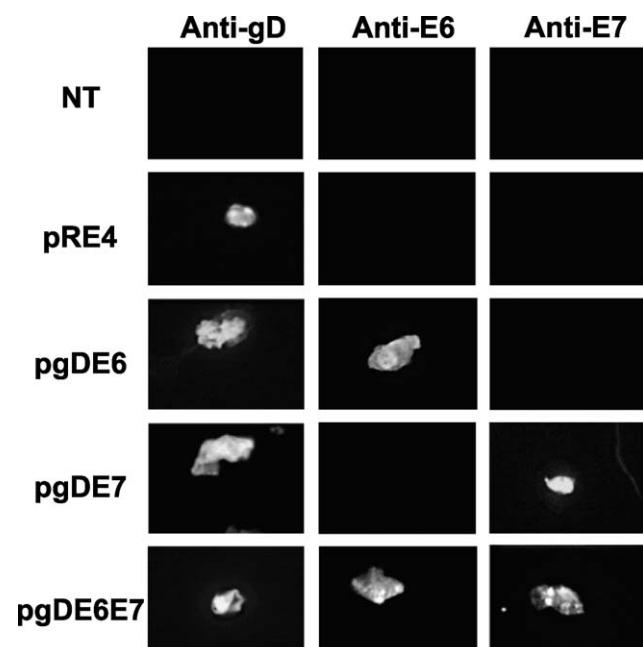


Fig. 3. Surface expression of proteins expressed by BHK-21 cells transfected with different DNA vaccine vectors. Non-permeabilized BHK-21 cells were treated with monoclonal antibodies to gD or polyclonal antibodies to E6 or E7 proteins and then stained with FITC-labeled antibody specific to mouse IgG. All cells were labeled 48 hrs after transfection with the different vectors. Non-transfected (NT) cells or cells transfected with pRE4 were used as negative controls. Labeled cells were analyzed with a Zeiss Axiovert S100 model inverted microscope at a final magnification of 40 x.

Table 1

Detection of specific mRNA copies transcribed from BHK-21 cells transfected with the different plasmid vectors after reversed transcription and amplification by real-time PCR with GAPDH and E6- or E7-specific primers

Treatment ^a	mRNA copies/1,000 of GAPDH RNA copies (\pm SD) ^b	
	E6	E7
Non-transfected	0.02 (\pm 0.025)	0.02 (\pm 0.002)
pRE4	0.02 (\pm 0.036)	0.02 (\pm 0.0001)
pgDE6	1,972.2 (\pm 9.26) ^c	ND
pgDE7	ND	1,036.5 (\pm 67.53) ^c
pgDE6E7	3,045.7 (\pm 238.84) ^c	2,154.9 (\pm 188) ^c

^a BHK-21 cells were transfected with 1 μ g of different plasmid vectors. After 48 hours, mRNA copies were isolated and submitted to the reverse transcription.

^b Data indicate numbers of E6 or E7 mRNA copies per 1,000 copies of GAPDH mRNA. SD – standard deviation. ND – non-determined.

^c The difference of E6 mRNA copies between pgDE6- and pgDE6E7-transfected cells was statistically significant ($P < 0.007961$) as well as the difference in E7 mRNA copies expressed by pgDE7- and pgDE6E7-transfected cells ($P < 0.007418$).

fected cells. Collectively, these results demonstrate that the chimeric HPV-16 oncoproteins encoded by the DNA vaccines are correctly expressed and processed by the cellular biosynthetic and sorting machinery.

3.2. Efficacy of the DNA vaccines in a murine pre-challenge tumor model

DNA vaccines were tested for induction of protective immune responses in two murine tumor models based on challenge with tumor cells expressing HPV-16 E6 and E7 oncoproteins. The TC-1 cells were derived from an embryonal lung epithelial cell line of C57BL/6 origin after transfection with vectors expressing v-Ha-ras and E6 and E7 of HPV-16 [18]. Based on this challenge model, protective anti-tumor responses primarily involve activation of E7-specific CD8⁺ T cell precursors [11–13,22]. The second challenge model, based on a BALB/c derived cell line, also relies on co-expression of HPV-16 E6, E7 and v-Ha-ras [23]. Nonetheless, in contrast to the TC-1 model, protection to tumor development is mainly attributed to the induction of E6-specific CD4⁺ T cell responses [24]. CD8⁺ T cells had previously been shown to not play a role in rejection of t(10)1rasE7E6 cells, which may in part relate to the low levels of MHC class I expression on this tumor cell line that was delivered from embryonal fibroblasts. Groups of C57BL/6 mice were vaccinated either with the pRE4 vector or with pgDE7 or pgDE6E7, expressing E7 or E6/E7, respectively. All mice injected with pRE4 vector developed tumors within 8 days after being challenged with TC-1 cells, while all mice immunized with pgDE7 and pgDE6E7 remained tumor-free over an observation period of 60 days (Fig. 4A). The DNA vaccines pgDE6 and pgDE6E7 were tested in BALB/c mice using the pRE4 vector as a negative control. As shown in Fig. 4B, all animals immunized with the control vector and 90% of those vaccinated with the pgDE6 or pgDE6E7 developed tumors with similar kinetics. Collectively together these results indicate that the DNA vaccines encoding E7 alone or E6 and E7 together fused with gD were highly effective in providing CD8⁺ T cell-mediated protection against progression of TC-1 tumor cells. In contrast, the vaccines based on the E6 alone or E6 and E7 oncoproteins were unable to elicit the appropriate immune responses and did not prevent tumor development in BALB/c mice challenged with the t(10)1rasE7E6 cells.

3.3. Induction of E7-specific CD8⁺ T cells by the DNA vaccines

In order to confirm the activation of E7-specific CD8⁺ T cell responses in mice immunized with the DNA vaccines encoding the E7-gD fusion protein, we determined the frequencies of E7-specific activated CD8⁺ T cell precursors by intracellular IFN- γ staining of PBMCs harvested from vaccinated mice (Fig. 5). Mice were bled 2 weeks after the final immunization (Fig. 5A) and 2 weeks after challenged with

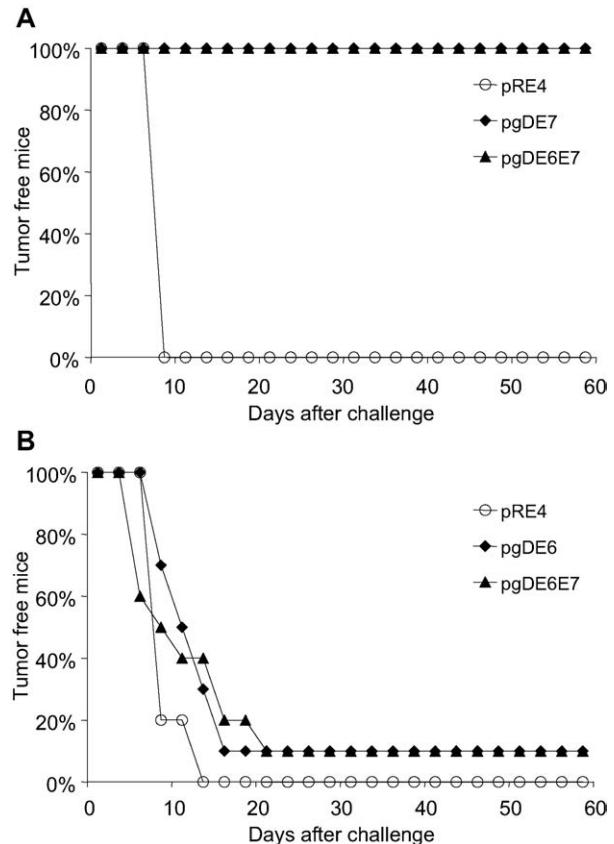


Fig. 4. Anti-tumor effects of DNA vaccines encoding HPV-16 oncoproteins fused to the gD protein in mice inoculated with neoplastic TC-1 cells or t(10)1rasE7E6. Groups of 10 female C57BL/6 (A) or BALB/c mice (B) were vaccinated with 4 i.m. doses of pRE4, pgDE6, pgDE4E6 or pgDE6E7. Two weeks after the last vaccination, mice were challenged with 5×10^5 TC-1 (A) or 10^4 t(10)1rasE7E6 (B) cells. Animals were monitored 3 times per week for evidence of tumor growth by palpation and visual inspection over a period of 60 days.

TC-1 cells (Fig. 5B). Stimulation of PBMCs for 5 hours with a peptide carrying the E7 immunodominant epitope resulted in E7-specific IFN- γ -producing CD8⁺ T-cell frequencies of 2.45% and 0.80% in mice immunized with the pgDE7 and pgDE6E7, respectively (Fig. 5A). Lymphocytes from mice vaccinated with the empty vector (pRE4) developed IFN- γ producing CD8⁺ T cells at background frequencies of 0.09% after stimulation with the E7-derived peptide. Frequencies of IFN- γ producing CD8⁺ T cells in all vaccinated groups remained below 0.20% upon stimulation of lymphocytes with a non-related control peptide or in the absence of any stimulus (data not shown). We also determined the frequencies of E7-specific IFN- γ producing CD8⁺ T cell precursors after the challenge with TC-1 cells. Two weeks after the challenge, frequencies of E7-specific CD8⁺ T cell precursors were 9.39% and 6.45% of all CD8⁺ T cells of mice immunized with pgDE7 and pgDE6E7, respectively (Fig. 5B). Frequencies of E7-specific CD8⁺ T cell precursors in mice immunized with pRE4 reached only 0.50%, while control reactions carried out with an unrelated peptide or without peptide stimulation resulted in E7-specific CD8⁺ T cell frequencies lower than 0.20% (data not shown).

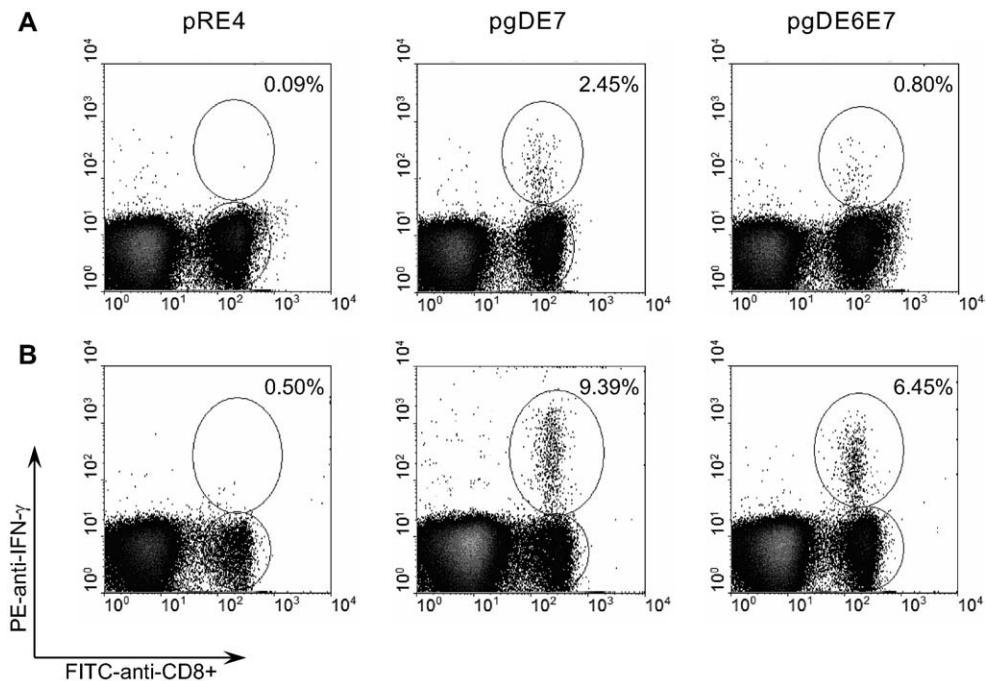


Fig. 5. Intracellular cytokine staining and flow cytometry analysis of E7-specific IFN- γ -producing CD8 $^{+}$ T cells in C57BL/6 mice immunized with pRE4, pgDE7 or pgDE6E7. Frequencies of E7-specific CD8 $^{+}$ T cells in mice were determined 2 weeks after the last immunization (A) and 2 weeks after TC-1 challenge (B). Detection of IFN- γ -producing E7-specific CD8 $^{+}$ T cells was carried out after stimulation with a MHC class I restricted E7 nonapeptide ($^{49}\text{RAHY-NIVTF}^{57}$) and cell surface staining for CD8 (FITC) and intracellular staining for IFN- γ (PE). The numbers in the right upper corners represent the frequencies of E7-specific CD8 $^{+}$ T cells, as percentages of IFN- γ -producing CD8 $^{+}$ T cells of all detected CD8 $^{+}$ T cells. IFN- γ -producing CD8 $^{+}$ cell frequencies in all groups stimulated with an unrelated control peptide (VVEDEGCTNLSGF) or the absence of stimulus were below 0.20% (data not shown).

3.4. Efficacy of the DNA vaccines in the post-challenge tumor vaccination model

We tested whether the HPV-16 DNA vaccines express a therapeutic effect in mice already bearing tumor cells at different growth stages. Female C57BL/6 mice were injected with TC-1 tumor cells and then, either the same day (Fig. 6A) or 5 days later (Fig. 6B), immunized with the first of 4 doses of pRE4, pgDE7 or pgDE6E7 given at intervals of 2 weeks. The pgDE7 and pgDE6E7 vaccines provided 40% protection to mice with growing tumors irrespective of the day on which the vaccine was first administered to the animals. Although 60% of the vaccinated mice developed tumors after injection of TC-1 cells, administration of pgDE7 or pgDE6E7 delayed tumor development, as compared to the pRE4 vector. Mice were bled 2 weeks after TC-1 challenge and frequencies of E7-specific CD8 $^{+}$ T cell precursors were determined by intracellular IFN- γ staining. Mice immunized with pgDE7 or pgDE6E7, including tumor-free and tumor-bearing mice, had E7-specific activated CD8 $^{+}$ T cells at frequencies of 3.50% or 3.04%, respectively, when first immunized on the same day of TC-1 challenge (Fig. 7A). Mice immunized for the first time 5 days after the tumor challenge developed E7-specific CD8 $^{+}$ T cell precursors at frequencies corresponding to 4.75% or 2.43% of the total detected CD8 $^{+}$ T cell precursor population, when vaccinated with pgDE7 or pgDE6E7, respectively (Fig. 7B). The mouse group vaccinated with the empty vector pRE4 on the same day of tumor challenge had E7-specific CD8 $^{+}$ T cell precursors at the frequency of 2.11%,

while all animals vaccinated 5 days after challenge were euthanized due to excessive tumor development.

4. Discussion

In the present work, we describe the development of a new vaccine approach for the control of HPV-16 associated cancer which employed DNA vaccines encoding the E6 and E7 oncoproteins genetically fused to the HSV-1 gD protein. Analysis of the anti-tumor effects of the vaccines showed that mice immunized with DNA vaccines encoding the E7 oncoprotein were protected to challenge with TC-1 cells, but not with t(10)1rasE7E6 cells. Moreover, analysis of the induced immune responses indicated that the protective effects elicited by E7-based DNA vaccines correlated with activation of E7-specific CD8 $^{+}$ T cell precursors at levels similar to or even higher than previously described DNA vaccines targeting the HPV-16 oncoprotein [24].

DNA vaccines encoding the HPV-16 E7 oncoprotein resulted in the rather inefficient activation of cytolytic responses mediated by CD8 $^{+}$ T cells and lack of anti-tumor effects in murine models [7,9,10]. However, fusion of E7 with a few selected proteins involved in cellular protein trafficking or processing resulted in increased immunogenicity to CD8 $^{+}$ T cells and higher anti-tumor effects [9–12]. Our previous observations have indicated that the HSV-1 gD protein can enhance the immunogenicity of a vaccine antigen, when expressed by a DNA vaccine as a chimeric protein [15,16].

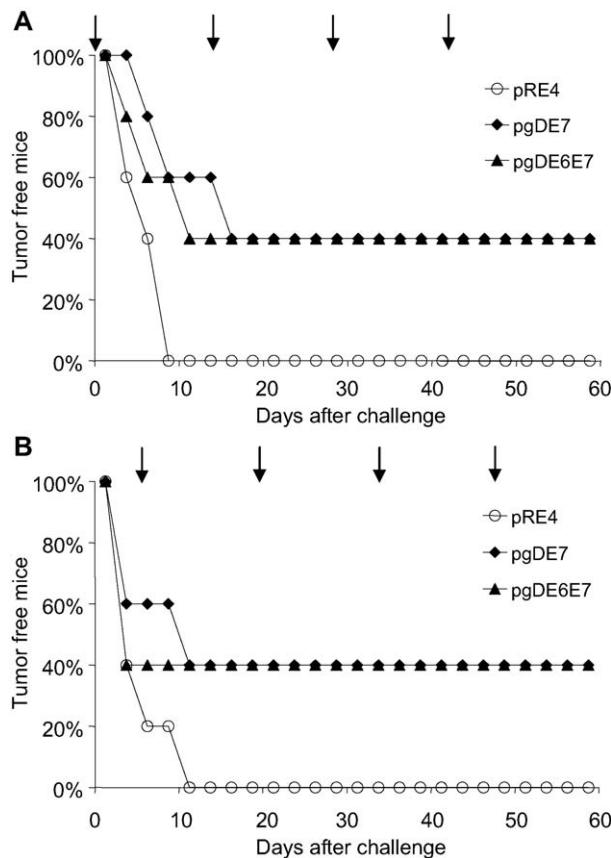


Fig. 6. Therapeutic anti-tumor effects of DNA vaccines encoding HPV-16 oncoproteins fused to the gD protein on cancerous mice previously inoculated with TC-1 cells. Groups of 25 female C57BL/6 mice were challenged with 5×10^5 TC-1 cells. Starting the same day (A) or 5 days later (B), mice were vaccinated with 4 i.m. doses of pRE4, pgDE7, or pgDE6E7, given at 2 week intervals, as indicated by arrows. Mice were monitored 3 times a week for evidence of tumor growth by palpation and visual inspection over a period of 60 days.

Moreover, since both targeting and anchoring motifs were preserved in the recombinant proteins, extracellular expression of the oncoproteins would additionally reduce the risk of deleterious interactions with p53 or pRB, host targets for the establishment of neoplasia following binding to E6 and E7, respectively [2].

Analysis of transfected BHK-21 cells confirmed that DNA vaccines encoding the HPV-16 oncoproteins genetically fused with gD expressed correct sized transcripts at rather high levels when compared with the GAPDH gene, used as a reference in quantitative analyses. The vector pgDE6E7, which encodes the double fusion protein, showed higher transcription levels with regard to cells transfected with the vector encoding E7 fused to gD, suggesting that insertion of two heterologous genes enhanced the in vitro stability of the encoded hybrid transcript. Nonetheless, mice immunized with pgDE7 elicited enhanced immune responses, as evaluated by the number of E7-specific CD8⁺ T cell precursors, when compared to animals immunized with pgDE6E7. This result suggests that differential in vitro expression of proteins encoded by the vaccine vectors, as measured by detection of the mRNA transcripts, did not correlate with in vivo immunogenicity of

the encoded peptides. In fact, previous evidences indicated that a lower half-life of encoded peptides enhance activation of cytolytic responses elicited in mice immunized with DNA vaccines [25].

Labeling of transfected BHK-21 cells with E6, E7 or gD-specific antibodies confirmed that the encoded hybrid proteins were correctly processed by the cell export machinery and inserted at the outer surface of transfected cells by means of gD anchoring motif delimited by amino acids 340 to 364 [14]. Our present results, as well as previous observations based on parasite or bacterial-derived proteins, demonstrated that the region located between the *Pvu*II and *Apa*I restriction sites at the gD-encoding sequence allows insertion of peptides with up to 300 amino acid residues without interfering with export pathway trafficking and membrane anchoring [14]. Such evidences support the use of HSV-1 gD protein as a carrier for heterologous proteins both for vaccine development and biotechnological applications requiring exposure of recombinant proteins on the surface of transfected cells.

Targeting E7 to the protein trafficking pathway has been shown to improve the adjuvant of DNA vaccines upon responses mediated by CD8⁺ T cells [10,11]. Fusion of E7 to another HSV-1 protein affecting the intercellular transport, VP22, led to similar results including enhanced activation of cytolytic responses, CD8⁺ T cell precursors and anti-tumor effects in mice [26,27]. These results suggest that immunogenicity of E7 is, at least partially, affected by targeting the encoded protein to the export pathway leading to improved immune presentation or enhanced cross-presentation after release of the protein by transfected cells. Future experiments aiming the elucidation of gD immune modulation properties should employ gD derivatives deleted of signal sequence and anchoring motif.

Both E6 and E7 proteins are regarded as prime candidates for the development of therapeutic vaccines against cervical cancer. DNA vaccines encoding chimeric proteins genetically fused to E7 proved to be particularly promising with regard to the protective effects conferred to mice inoculated with TC-1 cells either in the preventive (pre-challenge) or the therapeutic (post-challenge) model, which require activation of cytolytic CD8⁺ T lymphocytes [9,13,26,27]. In our work, activation of CD8⁺ T cell precursors was achieved in C57BL/6 mice immunized with four i.m. doses of the DNA vaccines encoding the E7 or E6/E7 oncoproteins genetically fused to gD. Moreover, administration of the DNA vaccines to female mice conferred complete (100%) and partial (40%) protection to tumor development in the pre- or post-challenge model with TC-1 cells, respectively. Such results further support that protection to HPV-16-induce tumors is closely related to activation of E7-specific CD8⁺ T cells and the presence of immunodominant E7 epitope able to associate with MHC class I determinants of the H-2b haplotype but not to the MHC class II determinants [8–10,20–22,26,28]. In contrast, DNA vaccine encoding E6 only or E6 and E7 fused to gD failed to induce protective immunity in after s.c. inoculation of t(10)1rasE7E6 cells. The absence of protective responses in

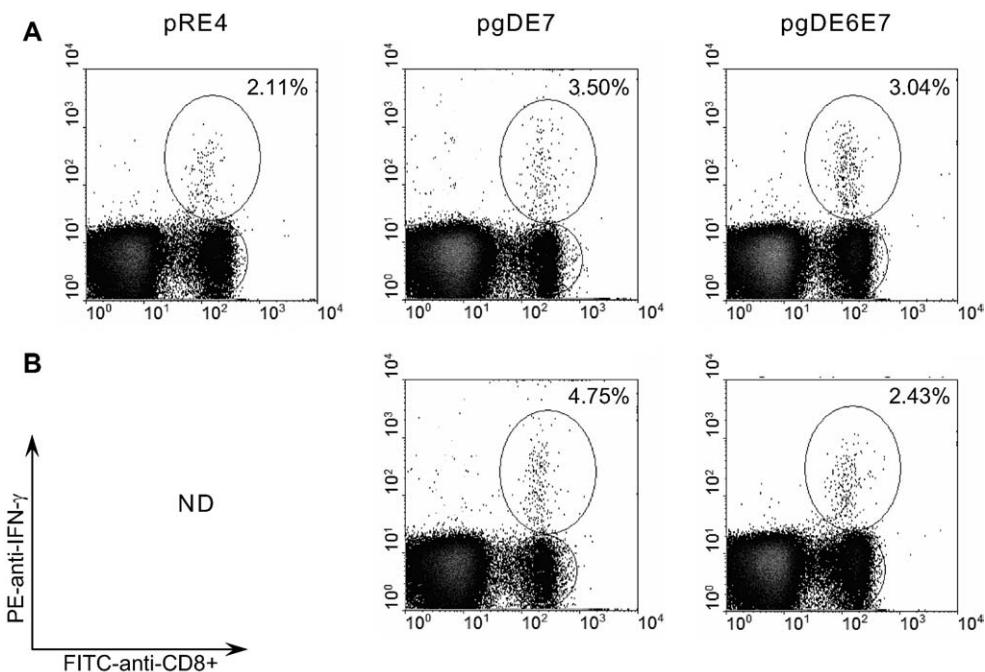


Fig. 7. Intracellular cytokine staining and flow cytometry analysis of IFN- γ -producing E7-specific CD8 $^{+}$ T cells in mice immunized with pRE4, pgDE7 or pgDE6E7 at the post-challenge tumor model. Frequencies of E7-specific CD8 $^{+}$ T cells, determined 2 weeks after the last immunization, in mice groups immunized for the first time on the same day (A) or 5 days after (B) the TC-1 challenge. The frequency of E7-specific CD8 $^{+}$ T cells of the mouse group vaccinated with pRE4 5 days after tumor challenge was not available due to the euthanize of all animals within the observation period. Detection of IFN- γ -producing E7-specific CD8 $^{+}$ T cells was carried out as described in the legend of Fig. 5.

mice immunized with E6/gD-based DNA vaccines probably reflects the lack of a E6-restricted CD8 $^{+}$ T-cell epitope for MHC-I class I determinants for either H-2d or H-2b MHC-I class I determinants but apparently carries an immunogenic MHC class II epitope for BALB/c mice, thus, supporting the essential role of E6-specific CD4 $^{+}$ T cell responses on protection to challenges carried out with t(10)1rasE7E6 line [20,24].

Pollara and colleagues reported that gD causes dendritic cell activation and induces production of type I IFN through activation of NF- κ B and p38 MAPK [29]. Thus, it is conceivable that in our studies the E7-specific T cell response reflects an immunostimulatory effect of gD. Since the N-terminal part of gD encompasses all amino acids (7-15 and 24-32) required for HVEM binding [30], the reported immune effects of E7-based DNA vaccines might be dependent on the structural integrity of the gD receptor-binding domains. The activation of E7-specific CD8 $^{+}$ T-cells promoted by pgDE7 may reflect the fact that E7 was cloned further away from the HVEM binding site at the amino acid position 244, while insertion of E6 at position 28 of the gD sequence would distorted the HVEM receptor-binding domain. Such hypothesis would also explain the lack of activation of CD4 $^{+}$ T-cell precursors immune responses in BALB/c mice immunized with E6/gD-based DNA, which are required for protection to challenges with t(10)1rasE7E6 cells [20,24]. Further experiments will clarify the positioning effects on T-cell responses and adjuvanticity to the HPV-16 oncoproteins.

Development of therapeutic DNA vaccines to HPV-16 induced tumors have relied on the fusion of E7 to proteins

able to traffic to different cellular compartments in order to enhance antigen processing and presentation, such as the *M. tuberculosis* HSP70 [10], the translocation domain of *P. aeruginosa* exotoxin A [13], and calreticulin [9]. Here we showed that fusion of HSV-1 gD with HPV-16 E7 oncoprotein expressed by DNA vaccines can abolish HPV-16-tumor development and partially prevent tumor progression through activation of E7-specific CD8 $^{+}$ T cell-mediated immune responses. Continued analysis of the adjuvant properties of the gD protein might shed light on its role in the activation and maturation of antigen presenting cells such as dendritic cells, and stimulation of CD8 $^{+}$ T cells.

Acknowledgments

This research was supported by CNPq (grant 472133/2003-9) grant. Dr. MO Lasaro was a recipient of a post-doctoral fellowship from FAPESP (grants 2001/13073-9 and 2002/08485-9). We also thank to Maria N. Oliveira for the technical assistance and Drs. Gary Cohen, Scott Hensley, Nia Tassis, and Willy Beçak for helpful discussions and suggestions.

References

- [1] P. Pisani, D.M. Parkin, J. Ferlay, Estimates of the worldwide mortality from eighteen major cancers in 1985. Implications for prevention and projections of future burden, *Int. J. Cancer* 55 (1993) 891–903.
- [2] J.M. Walboomers, M.V. Jacobs, M.M. Manos, F.X. Bosch, J.A. Kummer, K.V. Shah, P.J. Snijders, J. Peto, C.J. Meijer, N. Munoz, Human

- papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide, *J. Pathol.* 189 (1999) 12–19.
- [3] M. van Ranst, R. Tachezy, R.D. Burk, in: C. Lacey (Ed.), Papillomavirus Reviews: Current Research on Papillomaviruses, Leeds University Press, Leeds, 1996, pp. 1–19.
- [4] F.X. Bosch, M.M. Manos, N. Munoz, M. Sherman, A.M. Jansen, J. Peto, M.H. Schiffman, V. Moreno, R. Kurman, K.V. Shah, Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group, *J. Natl. Cancer Inst.* 87 (1995) 796–802.
- [5] M.O. Lasaro, H.C. Ertl, Human Papillomavirus-associated cervical cancer: Prophylactic and therapeutic vaccines, *Gene Ther. Mol. Biol.* 8 (2004) 291–306.
- [6] R.R. MacGregor, J.D. Boyer, K.E. Ugen, K.E. Lacy, S.J. Gluckman, M.L. Bagarazzi, M.A. Chattergoon, Y. Baine, T.J. Higgins, R.B. Ciccarelli, L.R. Cone, R.S. Ginsberg, D.B. Weiner, First human trial of a DNA-based vaccine for treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection: safety and host response, *J. Infect. Dis.* 178 (1998) 92–100.
- [7] M. Smahel, E. Sobotkova, V. Vonka, E. Hamsikova, R. Zak, H. Kitamoto, V. Ludvikova, DNA vaccine against oncogenic hamster cells transformed by HPV16 E6/E7 oncogenes and the activated ras oncogene, *Oncol. Rep.* 6 (1999) 211–215.
- [8] C.H. Chen, T.L. Wang, C.F. Hung, D.M. Pardoll, T.C. Wu, Boosting with recombinant vaccinia increases HPV-16 E7-specific T cell precursor frequencies of HPV-16 E7-expressing DNA vaccines, *Vaccine* 18 (2000) 2015–2022.
- [9] W.F. Cheng, C.F. Hung, C.Y. Chai, K.F. Hsu, L. He, M. Ling, T.C. Wu, Tumor-specific immunity and antiangiogenesis generated by a DNA vaccine encoding calreticulin linked to a tumor antigen, *J. Clin. Invest.* 108 (2001) 669–678.
- [10] C.H. Chen, T.L. Wang, C.F. Hung, Y. Yang, R.A. Young, D.M. Pardoll, T.C. Wu, Enhancement of DNA vaccine potency by linkage of antigen gene to an HSP70 gene, *Cancer Res.* 60 (2000) 1035–1042.
- [11] H. Ji, T.L. Wang, C.H. Chen, S.I. Pai, C.F. Hung, K.Y. Lin, R.J. Kurman, D.M. Pardoll, T.C. Wu, Targeting human papillomavirus type 16 E7 to the endosomal/lysosomal compartment enhances the antitumor immunity of DNA vaccines against murine human papillomavirus type 16 E7-expressing tumors, *Hum. Gene Ther.* 10 (1999) 2727–2740.
- [12] T.W. Kim, C.F. Hung, D.A. Boyd, L. He, C.T. Lin, D. Kaiserman, P.I. Bird, T.C. Wu, Enhancement of DNA vaccine potency by coadministration of a tumor antigen gene and DNA encoding serine protease inhibitor-6, *Cancer Res.* 64 (2004) 400–405.
- [13] C.F. Hung, W.F. Cheng, K.F. Hsu, C.Y. Chai, L. He, M. Ling, T.C. Wu, Cancer immunotherapy using a DNA vaccine encoding the translocation domain of a bacterial toxin linked to a tumor antigen, *Cancer Res.* 61 (2001) 3698–3703.
- [14] R.J. Watson, J.H. Weis, J.S. Salstrom, L.W. Enquist, Herpes simplex virus type-1 glycoprotein D gene: nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli*, *Science* 218 (1982) 381–384.
- [15] A.M. Alves, M.O. Lasaro, D.F. Almeida, L.C. Ferreira, Immunoglobulin G subclass responses in mice immunized with plasmid DNA encoding the CFA/I fimbria of enterotoxigenic *Escherichia coli*, *Immunol. Lett.* 62 (1998) 145–149. A.M. Alves, M.O. Lasaro, A.S. Pyrrho, C.R. Gattass, D.F. de Almeida, L.C. Ferreira, Antibody response in mice immunized with a plasmid DNA encoding the colonization factor antigen I of enterotoxigenic *Escherichia coli*, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 23 (1999) 321–330.
- [16] G.H. Cohen, W.C. Wilcox, D.L. Sodora, D. Long, J.Z. Levin, R.J. Eisenberg, Expression of herpes simplex virus type 1 glycoprotein D deletion mutants in mammalian cells, *J. Virol.* 62 (1988) 1932–1940.
- [17] F. Sanger, S. Nicklen, A.R. Coulson, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 5463–5467.
- [18] K.Y. Lin, F.G. Guarneri, K.F. Staveley-O'Carroll, H.I. Levitsky, J.T. August, D.M. Pardoll, T.C. Wu, Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen, *Cancer Res.* 56 (1996) 21–26.
- [19] D.M. Harvey, A.J. Levine, p53 alteration is a common event in the spontaneous immortalization of primary BALB/c murine embryo fibroblasts, *Genes Dev.* 5 (1991) 2375–2385.
- [20] Z. He, A.P. Wlazlo, D.W. Kowalczyk, J. Cheng, Z.Q. Xiang, W. Giles-Davis, H.C. Ertl, Viral recombinant vaccines to the E6 and E7 antigens of HPV-16, *Virology* 270 (2000) 146–161.
- [21] M.C. Feltkamp, H.L. Smits, M.P. Vierboom, R.P. Minnaar, B.M. de Jongh, J.W. Drijfhout, J. Ter Schegget, C.J. Melief, W.M. Kast, Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells, *Eur. J. Immunol.* 23 (1993) 2242–2249.
- [22] A. Lamikanra, Z.K. Pan, S.N. Isaacs, T.C. Wu, Y. Paterson, Regression of established human papillomavirus type 16 (HPV-16) immortalized tumors in vivo by vaccinia viruses expressing different forms of HPV-16 E7 correlates with enhanced CD8(+) T-cell responses that home to the tumor site, *J. Virol.* 75 (2001) 9654–9664.
- [23] R.W. Overell, K.E. Weisser, D. Cosman, Stably transmitted triple-promoter retroviral vectors and their use in transformation of primary mammalian cells, *Mol. Cell. Biol.* 8 (1988) 1803–1808.
- [24] A.P. Wlazlo, H. Deng, W. Giles-Davis, H.C. Ertl, DNA vaccines against the human papillomavirus type 16 E6 or E7 oncoproteins, *Cancer Gene Ther.* 11 (2004) 457–464.
- [25] F. Rodriguez, J. Zhang, J.L. Whitton, DNA immunization: ubiquitination of a viral protein enhances cytotoxic T-lymphocyte induction and antiviral protection but abrogates antibody induction, *J. Virol.* 71 (1997) 8497–8503.
- [26] N. Michel, W. Osen, L. Gissman, T.N.M. Schumacher, H. Zentgraf, M. Müller, Enhanced immunogenicity of HPV 16 E7 fusion proteins in DNA vaccination, *Virology* 294 (2002) 47–59.
- [27] C.F. Hung, W.F. Cheng, C.Y. Chai, K.F. Hsu, L. He, M. Ling, T.C. Wu, Improving vaccine potency through intercellular spreading and enhanced MHC class I presentation of antigen, *J. Immunol.* 166 (2001) 5733–5740.
- [28] M.P. Vierboom, M.C. Feltkamp, A. Neisig, J.W. Drijfhout, J. Ter Schegget, J.J. Neefjes, C.J. Melief, W.M. Kast, Peptide vaccination with an anchor-replaced CTL epitope protects against human papillomavirus type 16-induced tumors expressing the wild-type epitope, *J. Immunother.* 21 (1998) 399–408.
- [29] G. Pollara, M. Jones, M.E. Handley, M. Rajpopat, A. Kwan, R.S. Coffin, G. Foster, B. Chain, D.R. Katz, Herpes simplex virus type-1-induced activation of myeloid dendritic cells: the roles of virus cell interaction and paracrine type I IFN secretion, *J. Immunol.* 173 (2004) 4108–4119.
- [30] G. Campadelli-Fiume, F. Cocchi, L. Menotti, M. Lopez, The novel receptors that mediate the entry of herpes simplex viruses and animal alphaherpesviruses into cells, *Rev. Med. Virol.* 10 (2000) 305–319.

4.2 Capítulo II

Immune responses and therapeutic anti-tumor effects of an experimental DNA vaccine encoding the human papillomavirus type-16 (HPV-16) oncoproteins genetically fused to the herpes virus glycoprotein D (gD)

Resultados prévios publicados por nosso grupo demonstraram que a imunização com DNA plasmidial codificando o gene da proteína E7 de HPV-16 fusionado à gD de HSV-1 foi capaz de gerar ativação de células T CD8⁺ específicas para o epitopo imunodominante de E7 e promover proteção antitumoral preventiva total em camundongos desafiados com células TC-1 após quatro doses da vacina (LASARO et al., 2005). Entretanto, esse protocolo vacinal foi capaz de conferir apenas 40% de proteção terapêutica à formação de tumores em camundongos previamente inoculados com as células TC-1. A partir desses dados, desenvolvemos uma estratégia vacinal aprimorada, baseada na expressão das proteínas E7, E6 e E5 de HPV-16 fusionadas à gD de HSV-1 (pgD-E7E6E5).

Neste segundo capítulo, apresentamos resultados referentes ao uso dessa nova vacina de DNA investigando aspectos inexplorados na ativação de células T CD8⁺ específicas para os抗ígenos de HPV-16 codificados e sua habilidade em induzir resposta protetora terapêutica a tumores formados por células TC-1. Neste trabalho, caracterizamos inicialmente a relação dose/resposta e a longevidade na ativação de células T CD8⁺ E7-específicas em camundongos vacinados com pgD-E7E6E5. Além disso, determinamos os efeitos de *priming/boosting* da vacina de DNA pgD-E7E6E5 quando usada em combinação com um vetor adenovírus sorotípico 68 capaz de codificar a mesma proteína quimérica antigenica. Camundongos previamente desafiados com células TC-1 e imunizados com três doses do plasmídeo pgD-E7E6E5, apresentaram ativação de células T CD8⁺ específicas para epitopos presentes nas proteínas E7, E6 e E5 do HPV-16, detectada pela marcação intracelular de IFN-γ e CD107a e por ensaios de citotoxicidade *in vivo*. A administração de três doses da vacina pgD-E7E6E5 foi capaz de proteger 70% dos camundongos previamente desafiados com 5×10^5 células TC-1, com o protocolo vacinal tendo início até 3 dias após o desafio. A imunização combinada de pgD-E7E6E5 com plasmídeos que expressam as citocinas GM-CSF ou IL-12 aumentou

os efeitos antitumorais terapêuticos para 100% de camundongos livres de tumor. Os resultados encontrados expandem nossos conhecimentos sobre as propriedades imunomoduladoras da vacina pgD-E7E6E5 e demonstram os potentes efeitos antitumorais terapêuticos dessa vacina de DNA, contribuindo para o desenvolvimento de imunoterapias para o controle de tumores associados ao HPV-16.

Immune Responses and Therapeutic Antitumor Effects of an Experimental DNA Vaccine Encoding Human Papillomavirus Type 16 Oncoproteins Genetically Fused to Herpesvirus Glycoprotein D[▽]

Mariana O. Diniz,¹ Marcio O. Lasaro,² Hildegund C. Ertl,² and Luís C. S. Ferreira^{1*}

Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 05508-000, Brazil,¹ and The Wistar Institute, Philadelphia, Pennsylvania 19104²

Received 29 June 2010/Returned for modification 2 August 2010/Accepted 16 August 2010

Recombinant adenovirus or DNA vaccines encoding herpes simplex virus type 1 (HSV-1) glycoprotein D (gD) genetically fused to human papillomavirus type 16 (HPV-16) oncoproteins (E5, E6, and E7) induce antigen-specific CD8⁺ T-cell responses and confer preventive resistance to transplantable murine tumor cells (TC-1 cells). In the present report, we characterized some previously uncovered aspects concerning the induction of CD8⁺ T-cell responses and the therapeutic anticancer effects achieved in C57BL/6 mice immunized with pgD-E7E6E5 previously challenged with TC-1 cells. Concerning the characterization of the immune responses elicited in mice vaccinated with pgD-E7E6E5, we determined the effect of the CD4⁺ T-cell requirement, longevity, and dose-dependent activation on the E7-specific CD8⁺ T-cell responses. In addition, we determined the priming/boosting properties of pgD-E7E6E5 when used in combination with a recombinant serotype 68 adenovirus (AdC68) vector encoding the same chimeric antigen. Mice challenged with TC-1 cells and then immunized with three doses of pgD-E7E6E5 elicited CD8⁺ T-cell responses, measured by intracellular gamma interferon (IFN- γ) and CD107a accumulation, to the three HPV-16 oncoproteins and displayed *in vivo* antigen-specific cytolytic activity, as demonstrated with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE)-labeled target cells pulsed with oligopeptides corresponding to the H-2D^b-restricted immunodominant epitopes of the E7, E6, or E5 oncoprotein. Up to 70% of the mice challenged with 5×10^5 TC-1 cells and immunized with pgD-E7E6E5 controlled tumor development even after 3 days of tumor cell challenge. In addition, coadministration of pgD-E7E6E5 with DNA vectors encoding pGM-CSF or interleukin-12 (IL-12) enhanced the therapeutic antitumor effects for all mice challenged with TC-1 cells. In conclusion, the present results expand our previous knowledge on the immune modulation properties of the pgD-E7E6E5 vector and demonstrate, for the first time, the strong antitumor effects of the DNA vaccine, raising promising perspectives regarding the development of immunotherapeutic reagents for the control of HPV-16-associated tumors.

Cancers pose unique challenges to therapeutic vaccines. Tumor-associated antigens are often self-antigens to which the patient is tolerant. In the case of virus-associated tumors, the viral oncoproteins commonly lack high-avidity T-cell epitopes and thus can evade immune surveillance. Cancer patients frequently show immunological abnormalities, such as T-cell anergy, peripheral and central tolerance, regulatory T cell (Treg)-mediated immunosuppression, and functional T-cell exhaustion (9, 31, 36). Therapeutic cancer vaccines, unlike prophylactic vaccines, thus need to be formulated not only to induce T-cell responses but also to overcome immunological unresponsiveness to tumor antigens.

Cervical cancer is the second most common cause of cancer death in women, claiming approximately 400,000 to 500,000 lives each year worldwide (32). Cervical cancer affects ~1% of all women and is the most common cause of cancer death in women under the age of 50. Virtually all cases of cervical cancers are associated with human papillomavirus (HPV) infections (2, 37). Prevalence of sexually transmitted infections

with oncogenic genotypes of HPV varies from 20 to 80% of sexually active adults depending on the study population, with HPV type 16 (HPV-16) representing the most epidemiologically relevant oncogenic virus type (2, 37). Two vaccines that express the major capsid protein-inducing serotype-specific HPV neutralizing antibodies have recently become available for preventive vaccination (14). While these vaccines can prevent virus infections with the corresponding HPV genotypes, they cannot affect viral clearance in already infected women or inhibit the development of HPV-associated malignancies. In contrast, therapeutic vaccines targeting HPV oncoproteins, mainly E6 and E7, which are expressed by all transformed epithelial cells, can activate antigen-specific cytotoxic CD8⁺ T-cell responses and eradicate infected cells before or after the malignant transformation event (18, 21, 27). In contrast to the conventional vaccines, such oncoprotein-based anti-HPV vaccine formulations may be used under either preventive or therapeutic conditions regarding the establishment and uncontrolled growth of the cancer cells under both experimental or clinical conditions (18).

Although DNA vaccines have been intensively studied as a promising immunization strategy for the control of HPV-associated tumors, vectors expressing HPV-16 E7 or E6 oncoprotein alone have shown low antigen-specific CD8⁺ T-cell acti-

* Corresponding author. Mailing address: Av. Prof. Lineu Prestes 1374, Cidade Universitária, São Paulo, 05508-000, Brazil. Phone: 5511 30917338. Fax: 5511 30917354. E-mail: lcsf@usp.br.

▽ Published ahead of print on 25 August 2010.

vation and lack of protective antitumor effects in mice (5, 21, 30). Improved activation of antigen-specific CD8⁺ T-cell responses by anti-HPV DNA vaccines were achieved after genetic fusion of the E7 or E6 oncoprotein with different carrier proteins carrying cell targeting signals or mediators of immune responses (8–19). The focus of our DNA vaccines targeting HPV-induced cancers has been the augmentation of adaptive immune responses through the blockade of an immune inhibitory pathway based on the expression of hybrid proteins genetically fused with glycoprotein D (gD) of herpes simplex virus (HSV) (24,25). HSV gD binds the herpes virus entry mediator (HVEM) and competes for the same binding site as the B- and T-lymphocyte attenuator (BTLA). BTLA provides inhibitory signals to T and B cells upon binding to HVEM (7, 38). Blockade of the HVEM-BTLA pathway during activation of an adaptive immune response has been associated with increased immune responses, particularly E7-specific CD8⁺ T-cell responses, to the antigen encoded by the DNA vaccine (25).

We reported previously that expression of HPV-16 E5, E6, and E7 oncoproteins within HSV type 1 (HSV-1) gD, either by an adenovirus vector or a DNA vaccine, induces a potent CD8⁺ T-cell response that confers preventive protection to mice challenged with transplantable E6- and E7-expressing TC-1 cells (25). Herein we characterized previously unknown aspects of the antigen-specific immune responses elicited in mice immunized with the DNA vaccine and report, for the first time, the therapeutic antitumor effects of the pgD-E7E6E5 vector in mice. The results indicate that the DNA vaccine encoding chimeric oncoproteins genetically fused to the HSV-1 gD protein represents a promising approach for the therapeutic control of HPV-associated tumors.

MATERIALS AND METHODS

Mice. Female C57BL/6 mice at 6 to 8 weeks of age were used for these studies. Animals were supplied by the Animal Breeding Center of the Biomedical Sciences Institute of the University of São Paulo and Charles River Laboratories and housed at the Microbiology Department of the University of São Paulo or at the Animal Facility of The Wistar Institute, respectively. All procedures involving the handling and sacrifice of animals were performed according to approved protocols and in accordance with recommendations for the proper use and care of laboratory animals at the Biomedical Sciences Institute of the University of São Paulo or at The Wistar Institute.

Cell lines. The TC-1 cell line was most kindly provided by T. C. Wu, Johns Hopkins University, Baltimore, MD. The cells had been transfected with a triple promoter retroviral vector carrying v-HA-ras together with E6 and E7 carrying genes of HPV-16 (26). TC-1 cells were propagated in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 2 mM nonessential amino acids, 10 mM HEPES buffer, 50 units/ml penicillin-streptomycin, and 10% fetal bovine serum (FBS) and kept at 37°C in 5% CO₂. Before inoculation, TC-1 cells were harvested by trypsinization, washed twice, and suspended in serum-free media at 5 × 10⁶ cells/ml.

DNA vaccines. The generation of the DNA vaccines encoding the in tandem-fused HPV-16 E7, E6, and E5 oncoproteins (pE7E6E5) or the three oncoproteins genetically fused after amino acid 244 of the HSV-1 gD protein (pgD-E7E6E5) has been described previously (25). The correct in-frame cloning of E7, E6, and E5-encoding genes was confirmed by nucleotide sequencing. The DNA vaccine (pgD) encoding the complete nonfused HSV-1 gD has been described previously (24).

Adenovirus vectors. Vectors expressing either pE7E6E5 or pgD-E7E6E5 were constructed as described. pE7E6E5 and pgD-E7E6E5 chimeric genes were subcloned into an E1-deleted molecular clones of chimpanzee-derived adenovirus 68 (AdC68) as described previously (13). Recombinant Ad vectors were rescued and propagated on HEK 293 cells and purified by CsCl gradient centrifugation.

Immunization and tumor cell challenge. Groups of 5 to 10 mice were vaccinated intramuscularly (i.m.) with the DNA vaccines. Each dose contained 100 µg of DNA divided in two 50-µl aliquots and applied into the tibialis anterior muscle of each hind limb. Mice were i.m. immunized with 5 × 10¹⁰ virus particles (VP) of AdC68 vectors diluted in 100 µl of phosphate-buffered saline (PBS) into the tibialis anterior muscle of each hind limb. Mice were challenged subcutaneously (s.c.) with 5 × 10⁵ TC-1 cells suspended in 100 µl of serum-free media and injected into the left rear flank of the animals 2 weeks after the last vaccination. To perform the long-term protection assay, mice were immunized with one dose of the vaccine vectors and challenged 100 days later. To determine the effect of postchallenge vaccination, mice were vaccinated on the same day 8 h after challenge with 5 × 10⁵ TC-1 cells. One or two additional vaccine doses were given to the animals in weekly intervals thereafter. The postchallenge protocol was also performed with the three doses of immunization protocol starting at the following different time points: 0 (8 h later), 3, 5, 7 or 10 days after challenge. For the postchallenge experiments with coadministration of plasmids expressing cytokines, mice were immunized with 100 µg of DNA of the vaccine vectors admixed with 100 µg of DNA of the plasmid-expressing cytokine divided in two 50-µl aliquots. Tumor growth was monitored by visual inspection and palpation three times a week after challenge. Animals were scored as tumor bearing when tumors reached a size of approximately 1 to 2 mm in diameter. Mice were euthanized once tumors exceeded a diameter of 1 cm or became necrotic or burdensome to the animals. Tumor growth was otherwise followed for a period of 60 days after the challenge.

Intracellular cytokine staining. Intracellular gamma interferon (IFN-γ) staining was performed using blood samples or spleen cells treated for 5 min on ice with Ack lysis buffer (BioSource International, Camarillo, CA) to rupture red blood cells and then centrifuged at 1,000 × g for 5 min. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) or splenocytes were treated again with the lysis buffer, centrifuged, and suspended in DMEM. Cells were cultured at a concentration of 10⁶ cells/well for 5 h at 37°C in a 96-well round-bottom microtiter plate in 200 µl of DMEM supplemented with 2% FBS and 10⁻⁶ M 2-mercaptoethanol. Brefeldin A (GolgiPlug; BD Bioscience, San Jose, CA) was added at 1 µl/ml (24, 25). The E7-specific RAHYNIVTF peptide, E6-specific VYDFAFRDL peptide, E5-specific VCLLIRPLL peptide, or the V3 control peptide, delineated from the sequence of the envelope protein of HIV-1 clade B (VVEDEGCTNLSGF) (4, 12, 30, 24), were used as stimuli at concentrations of 3 µg/ml. After being washed, cells were incubated for 30 min at 4°C with 100 µl of a 1:100 dilution of a fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated monoclonal antibody to mouse CD8a (BD Bioscience, San Jose, CA). Cells were washed once with PBS, followed by permeabilization with Cytofix/Cytoperm (BD Bioscience, San Jose, CA) for 20 min at 4°C, washed twice with Perm/Wash buffer (BD Bioscience, San Jose, CA), and incubated in the same buffer for 30 min at 4°C with 50 µl of a 1:100 dilution of a phycoerythrin (PE)-labeled monoclonal antibody to mouse IFN-γ (BD Bioscience, San Jose, CA). After being washed, cells were suspended in PBS and examined by two-color flow cytometry using Epics Elite XL (Beckman Coulter, Fullerton, CA) or FACSCalibur (BD Bioscience, San Jose, CA). Data were analyzed by FlowJo software. The percentages of CD8⁺ cells that stained positive for IFN-γ over all CD8⁺ T cells were determined. Expression of the CD107a degranulation marker was evaluated as previously described (8). Spleen cells of vaccinated mice were stimulated with the E5-, E6-, or E7-specific peptide in the presence of brefeldin A (GolgiPlug; BD Bioscience, San Jose, CA), monensin (GolgiStop; BD Bioscience, San Jose, CA), and PE-conjugated monoclonal antibody to mouse CD107a (BD Bioscience, San Jose, CA). Five hours later, cells were washed and stained with PE Cy5-conjugated monoclonal antibody to mouse CD8a (BD Bioscience, San Jose, CA) and, after following fixation and permeabilization procedures, labeled with FITC-conjugated monoclonal antibody to mouse IFN-γ (BD Bioscience, San Jose, CA).

T-cell-mediated *in vivo* cell lysis. The *in vivo* cell lysis assay was carried out with splenocytes from naive mice as target cells, as previously described (3, 8). The cells were stained with 0.5 µM or 5 µM carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE; Invitrogen, Carlsbad, CA) and then, the population stained with 5 µM CFSE was pulsed for 40 min at 37°C with 1 µM peptides carrying epitopes of the HPV oncoproteins that had previously been defined as the immunodominant major histocompatibility complex class I (MHC-I) epitopes for the H-2D^b mouse haplotype, as follows: RAHYNIVTF (E7), VYDFAFRDL (E6), or VC LLIRPLL (E5) (4, 12, 30). Control cells were labeled with 0.5 µM CFSE but not pulsed with the peptides. Both peptide-pulsed and unpulsed cells were injected intravenously (i.v.) at 2 × 10⁷ cells each into mice that had previously been challenged with 5 × 10⁵ TC-1 cells and then immunized with three doses of pgD, pE7E6E5, or pgD-E7E6E5. One day after transfer of CFSE-labeled cells, splenocytes were harvested and analyzed for CFSE expression by flow cytometry in a multivariant FACScan analyzer (FACSCalibur; BD Biosciences, San Jose,

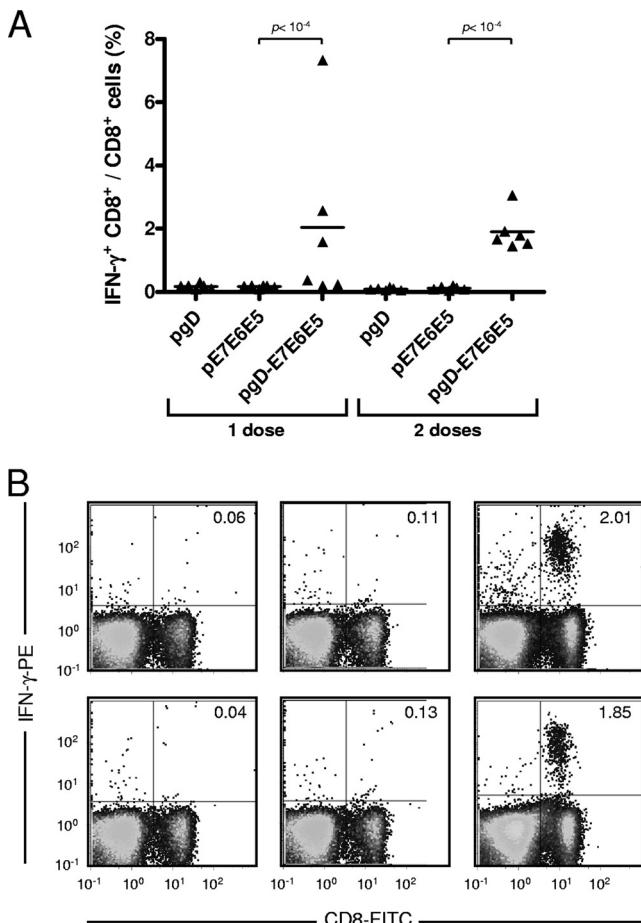


FIG. 1. Activation of E7-specific CD8⁺ T-cell precursors and preventive anticancer responses in mice immunized with pgD-E7E6E5 administered via the i.m. route. Individual (A) and pooled (B) CD8⁺ T-cell responses in mice immunized with one or two doses of pgD, pE7E6E5, or pgD-E7E6E5 delivered via the i.m. route (100 µg/dose). The level of E7-specific CD8⁺ T cells was determined 2 weeks after the last vaccine dose. Detection of IFN- γ -producing E7-specific CD8⁺ T cells was carried out with PBMC stimulated with the MHC-I-restricted E7 peptide (⁴⁹RAHYNIVTF⁵⁷) and stained for CD8 (with FITC) and intracellular IFN- γ (with PE).

CA). The percentages of target-specific cell killing were calculated as previously described (8).

Statistical analyses. All data expressed as means \pm standard deviations (SD) are representative of results from at least two independent experiments. Student's *t* tests or analyses of variance (ANOVA) were employed whenever individual data points were compared.

RESULTS

Activation of E7-specific CD8⁺ T-cell responses and protection from TC-1 cell challenge in mice immunized with pgD-E7E6E5. In the present study, we investigated the activation of E7-specific CD8⁺ T-cell responses and induction of antitumor preventive effects in mice vaccinated with one or two doses of the pgD-E7E6E5 vector. Approximately 50% of the mice immunized with one dose and all animals vaccinated with two doses of pgD-E7E6E5 developed significant amounts of E7-specific IFN- γ -producing CD8⁺ T cells (Fig. 1A and B). Mice immunized with pgD or pE7E6E5 did not develop any detect-

able IFN- γ ⁺ CD8⁺ T-cell responses. Despite the different magnitude of the E7-specific CD8⁺ T-cell responses, all animals immunized with either one or two pgD-E7E6E5 doses were protected from a subsequent challenge with TC-1 cells (25; data not shown). *In vivo* depletion of CD8⁺ T cells, but not CD4⁺ T cells, abrogated protection conferred by pgD-E7E6E5, suggesting that CD4⁺ T helper cells do not play a relevant role in the induction of protective effects in vaccinated mice (data not shown). To determine the longevity of the pgD-E7E6E5-induced protective response, mice vaccinated with one dose of pgD-E7E6E5 were analyzed for E7-specific CD8⁺ T-cell activation and preventive antitumor responses for 6 months. Mice were immunized with either pgD or pE7E6E5 as a control. Frequencies of E7-specific CD8⁺ T cells in mice immunized with pgD-E7E6E5 reached a peak 14 days after vaccination and then gradually declined (Fig. 2A). By day 100, when the E7-specific CD8⁺ T cells were barely detectable, mice were challenged with TC-1 cells. The frequencies of E7-specific CD8⁺ T cells increased sharply to levels similar to those seen at the initial response 21 days after challenge (Fig. 2B). After peaking on day 121, the numbers of E7-specific CD8⁺ T cells contracted rapidly and remained at low levels until the end of the observation period (Fig. 2A). Mice challenged 100 days after pgD-E7E6E5 administration showed only a partial protection (50%) from tumor development (Fig. 2C). No protection was recorded in mice immunized with pgD or pE7E6E5.

Priming-boosting effects of pgD-E7E6E5 on the CD8⁺ T-cell responses. The capability of pgD-E7E6E5 to prime and boost E7-specific CD8⁺ T-cell responses in heterologous immunization regimens in mice submitted to immunization regimens employing a recombinant E1-deleted chimpanzee-derived serotype 68 adenovirus (AdC68) vector encoding the same target antigen, i.e., the three HPV-16 antigens genetically fused into gD, was measured. Mice primed with one dose of the recombinant adenovirus vector and subsequently boosted 3 months later with a single dose of pgD-E7E6E5 showed, 14 days later, a slight enhancement of E7-specific IFN- γ -producing CD8⁺ T cells that gradually declined (Fig. 3). On the other hand, mice primed with the pgD-E7E6E5 vector showed a dramatic increase (47.4% of the total CD8⁺ T-cell population) in the number of IFN- γ -producing CD8⁺ T cells following a boost with a single dose of the recombinant adenovirus vector at 3 months after the priming with the DNA vaccine (Fig. 3). Both the priming effects of the DNA vaccine and the boosting effects of the adenovirus vector required fusion of the target antigens to the gD protein (Table 1). Collectively, these results indicate that the pgD-E7E6E5 vector has a remarkable priming effect on induced CD8⁺ T-cell responses when used in a heterologous priming-boosting immunization regimen and further emphasize the strong adjuvant effects of the gD protein when encoded by a DNA vaccine vector as a chimeric protein genetically fused to the target antigen.

Therapeutic antitumor effects of the pgD-E7E6E5 vaccine. We also investigated the CD8⁺ T-cell responses to the three HPV-16 oncoproteins under a scenario compatible with the therapeutic use of the pgD-E7E6E5 vector. Mice were challenged with TC-1 tumor cells and then immunized with three doses of the DNA vaccine, or control vectors, administered 1 week apart. Splenocytes were harvested 10 days after the last

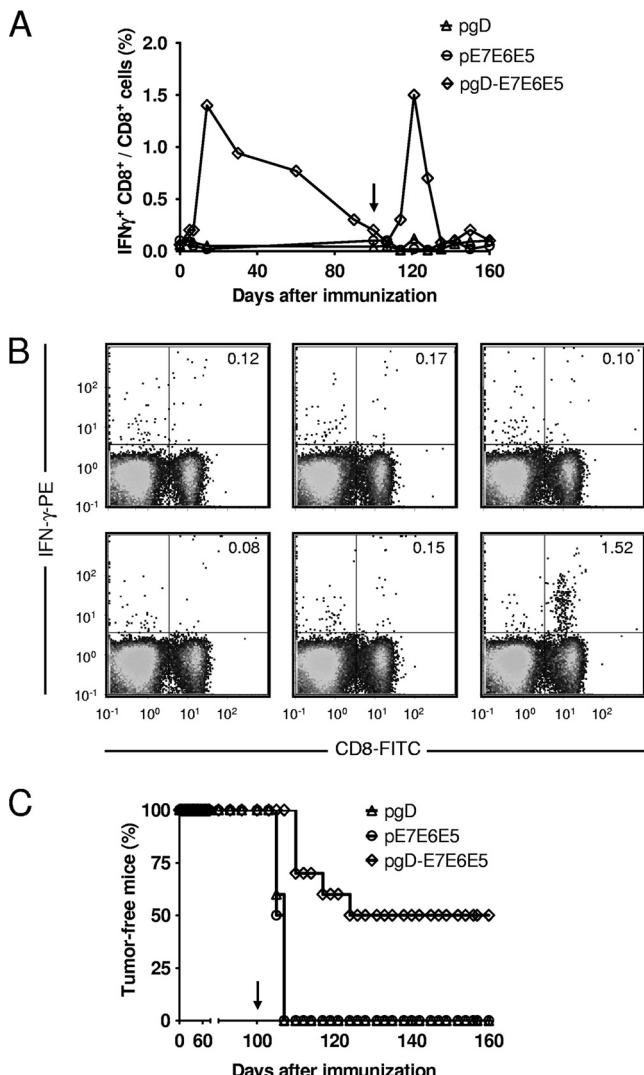


FIG. 2. E7-specific CD8⁺ T-cell response and preventive antitumor effects in pgD-E7E6E5-vaccinated mice. Mice were immunized with one dose of pgD-E7E6E5, pE7E6E5, or pgD and challenged with 5×10^5 TC-1 tumor cells 100 days after vaccine administration. Long-term (A) and time point-specific (day 121) (B) detection of IFN- γ -producing E7-specific CD8⁺ T cells in pooled PBMC. E7-specific CD8⁺ T cells were stimulated with the E7 peptide (⁴⁹RAHYNIVTF⁵⁷) and stained for CD8 (with FITC) and intracellular IFN- γ (with PE). (C) Long-term preventive antitumor responses in vaccinated mice. Tumor growth was monitored up to 60 days after challenge. The arrow indicates when the TC-1 cell challenge occurred.

vaccine dose, stimulated with peptides from E5, E6, or E7, and stained for detection of intracellular IFN- γ and CD107a, a degranulation marker of activated antigen-specific CD8⁺ T cells (1). Mice immunized with the pgD-E7E6E5 DNA vaccine showed increased frequencies of E6- and E7-specific IFN- γ -producing CD8⁺ T cells with regard to those of mice immunized with pE7E6E5 (Fig. 4A). E5-specific CD8⁺ T-cell responses were also detected in mice immunized with pgD-E7E6E5 but did not reach a statistically significant difference compared to those of mice immunized with pE7E6E5. Detection of the CD107a marker further demonstrated that

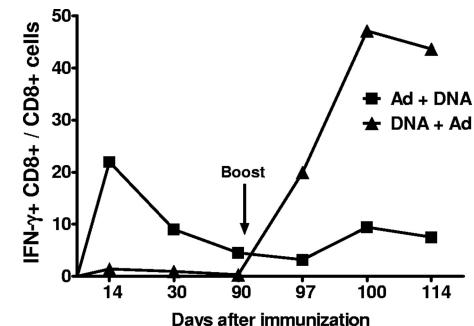


FIG. 3. Priming/boosting effects on E7-specific CD8⁺ T-cell responses in mice submitted to a heterologous prime-boost immunization regimen using pgD-E7E6E5 and a recombinant adenovirus vector encoding the same antigen. Groups of mice ($n = 5$) were primed with pgD-E7E6E5 and subsequently boosted with the recombinant adenovirus vector (AdC68gD-E7E6E5) 3 months later (▲). The same procedure was repeated in mice immunized with AdC68gD-E7E6E5 and subsequently boosted with pgD-E7E6E5 (■). Detection of IFN- γ -producing E7-specific CD8⁺ T cells was carried out with pooled PBMC stimulated with the MHC-I-restricted E7 peptide (⁴⁹RAHYNIVTF⁵⁷) and stained for CD8 (with FITC) and intracellular IFN- γ (with PE).

immunization with pgD-E7E6E5 resulted in positive responses to all three HPV-16 oncoproteins in vaccinated mice, with regard to animals immunized with pE7E6E5 (Fig. 4B). These results indicated that mice therapeutically treated with pgD-E7E6E5 manage to circumvent the immune-suppressive conditions induced by the tumor growth and develop significant CD8⁺ T-cell responses against all three HPV-16 oncoproteins encoded by the DNA vaccine.

To further demonstrate that the CD8⁺ T-cell responses developed in mice therapeutically treated with the DNA vaccine show *in vivo* cytolytic activity to cells expressing the HPV-16 oncoproteins, we conducted experiments in which CFSE-stained cells were pulsed with E5-, E6-, or E7-derived peptides representing the immunodominant H-2D^b-restricted epitopes of each oncoprotein. As in the previously described experiments, mice were challenged with TC-1 cells, vaccinated at weekly intervals with 3 doses of pgD, pE7E6E5, or pgD-E7E6E5 vector, and injected with CFSE-labeled target cells 14 days after the last vaccine dose. Peptide-pulsed cells were brightly labeled with the dye, while control cells were labeled with a 10-fold-lower dose of CFSE. Splenocytes were harvested 24 h later from individual mice and tested for loss of the brightly stained cells as a measure for the specific CD8⁺ T-cell-mediated lysis (Fig. 4C and D). *In vivo* cell lysis was not ob-

TABLE 1. Flow cytometry analyses^a

Prime	% of IFN- γ ⁺ CD8 ⁺ cells over total CD8 ⁺ cells		
	No boost	AdC68E7E6E5	AdC68gD-E7E6E5
None	>0.1	>0.1	21.9
pE7E6E5	>0.1	>0.1	21.2
pgD-E7E6E5	0.3	2.5	47.4

^a Analyses of IFN- γ -secreting E7-specific CD8⁺ T-cell precursors in mice submitted to heterologous prime-boost immunizations using the pE7E6E5 or pgD-E7E6E5 DNA vector and the AdC68E7E6E5 or AdC68gD-E7E6E5 adenovirus vector.

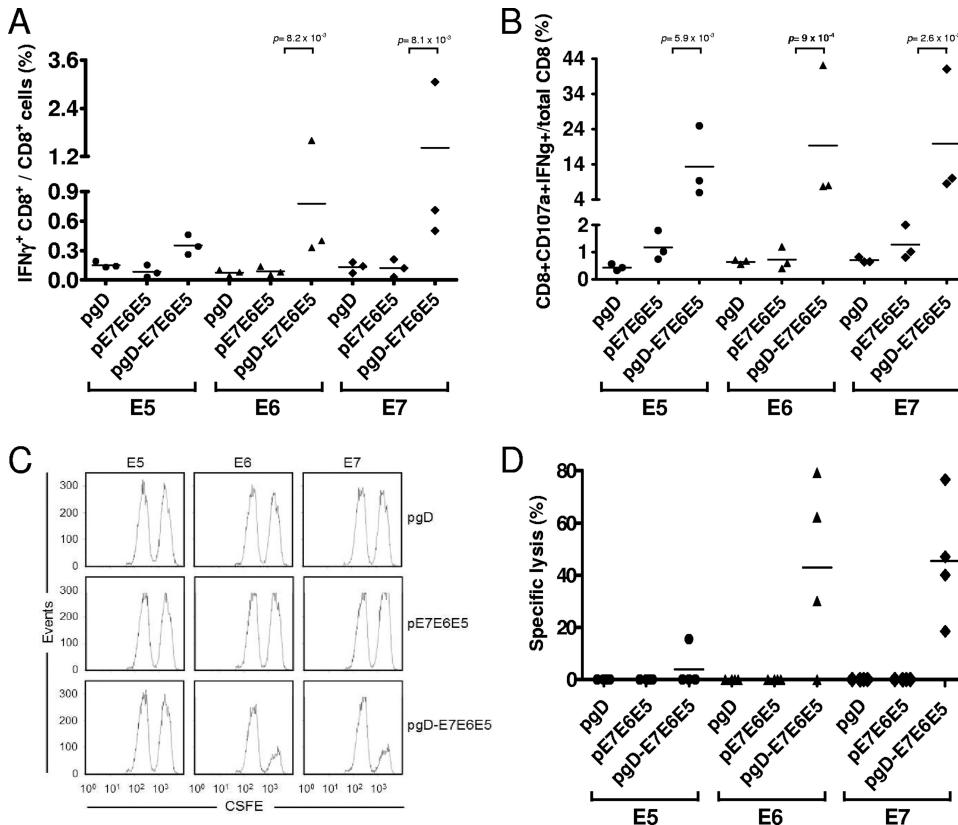


FIG. 4. Activation of antigen-specific cytotoxic CD8^+ T cells in mice immunized with pgD-E7E6E5 after challenge with TC-1 cells. (A) Frequencies of $\text{IFN}\gamma$ -producing CD8^+ T cells following *in vitro* stimulation of splenocytes harvested from mice therapeutically treated with three doses of pgD, pE7E6E5, or pgD-E7E6E5. Fourteen days after the last vaccine dose, splenocytes were stimulated with the E5, E6, or E7 peptide and stained for CD8 (with FITC) and intracellular $\text{IFN}\gamma$ (with PE). Mice were challenged with 5×10^5 TC-1 tumor cells. (B) Frequencies of CD107a-producing CD8^+ T cells following *in vitro* stimulation of splenocytes harvested from mice therapeutically treated with three doses of pgD, pE7E6E5, or pgD-E7E6E5. Stimulation with the specific E5, E6, or E7 peptide was performed in the presence of anti-CD107a (with PE), and after the incubation period, spleen cells were stained for CD8 (with PE Cy5) and intracellular $\text{IFN}\gamma$ (with FITC). Mice were challenged with 5×10^5 TC-1 tumor cells. (C) *In vivo* cytotoxic activities of antigen-specific CD8^+ T cells induced in mice immunized with different DNA vectors. Ten days after the last vaccine dose, mice received target spleen cells pulsed with E5, E6, or E7 CD8^+ T-cell-specific peptide and stained with 5 mM CSFE (right-side curves) or 0.5 mM CSFE (left-side curves) but not pulsed with the target peptides. One day later, total spleen cells were harvested and monitored by flow cytometry. Results from representative mice immunized with one of the tested DNA vectors. Reduction of the peak area corresponding to the cell population labeled with antigen-specific derived peptides (right-side curve), with regard to CSFE-labeled cells not exposed to the peptides (left-side curve), reflects the *in vivo* cytotoxic activity of antigen-specific CD8^+ T cells. (D) Individual *in vivo* cytotoxic activities detected in mice immunized with different DNA vaccine vectors. CSFE-labeled spleen cells were pulsed with MHC-I-restricted peptides derived from E5 (●), E6 (▲), and E7 (◆) oncoproteins. Values detected only in mice immunized with pgD-E7E6E5 after stimulation with E7- or E6-specific peptides showed statistically significant differences ($P < 0.0001$) with regard to mice immunized with pgD or pE7E6E5.

served in mice immunized with the pgD or pE7E6E5 vector. In contrast, mice immunized with pgD-E7E6E5 clearly showed a reduction in the number of peptide-pulsed cells, particularly those labeled with peptides derived from the E6 or E7 peptides. All pgD-E7E6E5-immunized animals had reduced numbers of E7-pulsed target cells, 3 out of 4 animals showed a reduction in the number of target cells pulsed with the E6-specific peptide, and only 1 animal developed a specific lysis response to E5-pulsed cells (Fig. 4D). Collectively, these results demonstrate that post-challenge-vaccinated mice developed functionally active CD8^+ T-cell responses to the HPV-16 oncoproteins.

We next measured the therapeutic antitumor effects of pgD-E7E6E5 in vaccinated mice previously inoculated with TC-1 cells. Mice were challenged with TC-1 cells and treated on the same day with one dose of pgD-E7E6E5 or the control vectors. Other groups received a second dose or a third dose of each

DNA vaccine given at weekly intervals. As shown in Fig. 5, one dose of the pgD-E7E6E5 vector failed to prevent tumor progression. However, administration of a second dose and a third dose conferred only 50% and 70% protection, respectively, to mice immunized with pgD-E7E6E5 (Fig. 5A). Monitoring of the E7-specific CD8^+ T-cell responses in mice immunized with pgD-E7E6E5 showed that a single dose of the DNA vaccine failed to induce a statistically significant CD8^+ T-cell response. Nonetheless, mice treated with two or three doses of pgD-E7E6E5 showed a significant increase in the number of E7-specific CD8^+ T cells, which reached maximum values 20 days after the tumor challenge (Fig. 5B). The CD8^+ T-cell responses quickly declined and reached baseline values 1 week later. Animals receiving one or two doses of the pgD or pE7E6E5 vectors did not develop measurable E7-specific CD8^+ T-cell responses (data not shown).

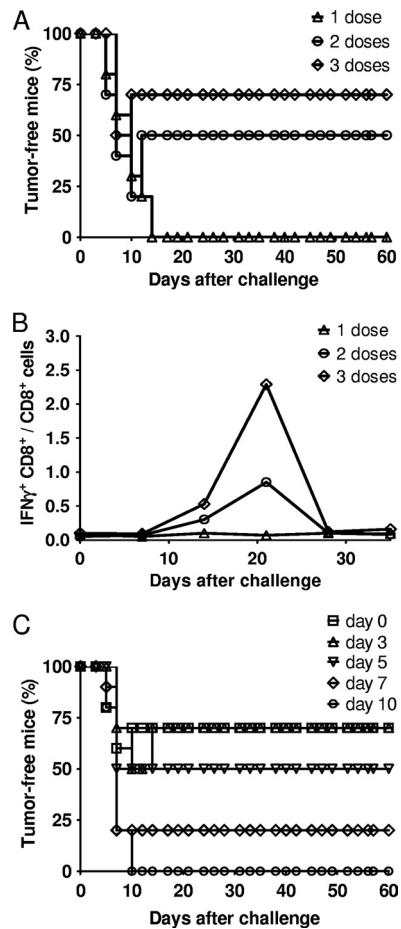


FIG. 5. Therapeutic antitumor effects and induced E7-specific CD8⁺ T-cell responses in mice immunized with pgD-E7E6E5. (A) Dose-dependent antitumor protection in mice immunized with one, two, or three i.m. doses of pgD-E7E6E5. (B) Frequencies of E7-specific IFN- γ -producing CD8⁺ T cells in mice challenged with TC-1 cells and i.m. immunized 8 h later with one, two, or three doses of pgD-E7E6E5 delivered at weekly intervals. (C) Therapeutic antitumor effects of pgD-E7E6E5 in mice challenged with TC-1 cells and subsequently immunized with three doses of the DNA vaccine on the same day (day 0) of the TC-1 challenge or 3, 5, 7, or 10 days after challenge.

We also measured the therapeutic antitumor effects of the DNA vaccine in animals challenged up to 10 days before the first vaccine dose. As shown in Fig. 5C, mice treated with three pgD-E7E6E5 doses up to 3 days after the TC-1 cell challenge showed 70% protection to tumor development. When the interval between the tumor challenge and vaccine treatment was increased to 5 or 7 days, the antitumor protection effect was observed in only 50% and 25% of the vaccinated mice, respectively. No antitumor effect in mice vaccinated 10 days after the TC-1 challenge was observed.

In an attempt to improve the therapeutic effects generated by the DNA vaccine, we combined the pgD-E7E6E5 vector with plasmids encoding interleukin-12 (IL-12) or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), known to exert adjuvant effects on immune responses induced by DNA vaccines or synthetic peptides (10, 23, 35). Mice were challenged with TC-1 cells and immunized with 3 doses of pgD-

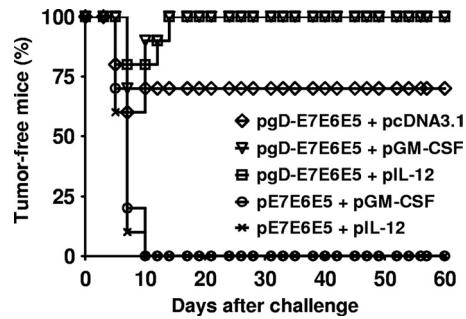


FIG. 6. Coadministration of pgD-E7E6E5 and IL-12- or GM-CSF-encoding plasmid confers full therapeutic protection to the TC-1 cell challenge. Mice were i.m. immunized with three doses (100 μ g) of pE7E6E5 or pgD-E7E6E5 admixed with 100 μ g of pcDNA3.1 (empty vector), pGM-CSF, or pIL-12 vector. The vaccines were administered 8 h after challenge with 5×10^5 TC-1 cells. Tumor growth was monitored up to 60 days after challenge. Statistically significant differences were noted ($P = 0.0023$) using the log rank test with regard to mice immunized with pgD-E7E6E5 plus pcDNA3.1 and pgD-E7E6E5 plus pIL-12 or pgD-E7E6E5 plus pGM-CSF vectors.

E7E6E5 or pE7E6E5 mixed with 100 μ g of pcDNA3.1 (empty vector), pIL-12 encoding murine IL-12, or pGM-CSF encoding murine GM-CSF. As shown in Fig. 6, mice that received pgD-E7E6E5 combined with pIL-12 or with pGM-CSF increased the antitumor response to 100%. Control groups immunized with pgD-E7E6E5 and pcDNA3.1 did not show further enhancement of the therapeutic protection observed in mice immunized only with pgD-E7E6E5. Mice immunized with pcDNA3.1, pIL-12, or pGM-CSF, in combination or not with pE7E6E5, did not show any antitumor protection (data not shown).

DISCUSSION

Our previous results demonstrated that immunization with HPV-16 oncoproteins genetically fused to the HSV-1 gD protein, encoded by a naked DNA or adenovirus vector, can induce strong anti-E7 CD8⁺ T-cell responses and elicit preventive antitumor responses in the murine model (25). In the present study, we extend our previous evidences and demonstrated that the pgD-E7E6E5 vector induces specific CD8⁺ T-cell responses to all three HPV-16 oncoproteins in mice previously challenged with TC-1 cells. In addition, we showed that the mice vaccinated with pgD-E7E6E5 elicit therapeutic antitumor responses even several days after the challenge with the tumor cells. More relevantly, our results demonstrate that the therapeutic anticancer effects of pgD-E7E6E5 can be further improved following coadministration with DNA vectors encoding GM-CSF or IL-12. All together, the present report adds new data concerning the induction of immune responses in mice vaccinated with pgD-E7E6E5 and shows that, under experimental conditions, this DNA vaccine represents a promising therapeutic approach for the control of HPV-16-associated cancer.

The reduced immunogenicity of E7, particularly when encoded by DNA vaccines, has led to the use of genetically fused carrier proteins that improve both the processing and/or presentation of the major E7-specific CD8⁺ T-cell epitope or augments positive interactions between antigen-presenting cells and effector CD8⁺ T cells, which resulted in enhanced

antitumor protection responses (5, 6, 17–19, 21–22, 24–27, 41). Our results demonstrate that immunization with one or two doses of the pgD-E7E6E5 vector resulted in full protection from subsequent tumor cell challenges, but only half of the mice vaccinated with a single dose of pgD-E7E6E5 developed measurable precursor E7-specific CD8⁺ T cells. This result suggests that even small numbers of antigen-specific CD8⁺ T cells may suffice for the control of tumor growth or that additional immune cells contribute to the eradication of the cancer cells. Another interesting observation concerning activation of T-cell responses elicited in mice immunized with the pgD-E7E6E5 was the observation that, in contrast to other previously reported vaccine formulations (16, 41), depletion of CD4⁺ T cells did not reduce the antitumor protective effects of pgD-E7E6E5, an indication that T helper cells are not required for the initial activation of antigen-specific effector CD8⁺ T cells. Nevertheless, additional experiments should be conducted in order to elucidate the contribution of CD4⁺ T cells on the induction and persistence of the antitumor responses elicited in mice immunized with the pgD-E7E6E5 vector.

No information regarding the kinetics and longevity of the E7-specific CD8⁺ T-cell responses as well as the antitumor protection elicited in mice vaccinated with pgD-E7E6E5 has been reported. Our results show that mice immunized with a single dose of pgD-E7E6E5 sustain measurable CD8⁺ T-cell responses for up to 100 days following vaccine administration. More relevantly, 50% of the mice immunized once with pgD-E7E6E5 survived the challenge with TC-1 cells at 100 days after vaccine administration. After challenge with the tumor cells, the number of E7-specific CD8⁺ T cells increased quickly but returned to background values in 2 weeks, a feature that may reflect the immunosuppressive environment generated by the growing tumor cells. Experiments addressing the specific role of the gD protein on the induction of memory responses and persistence of the antitumor protection effects in pgD-E7E6E5-vaccinated mice should contribute to further improvements of the protective immunity elicited in mice immunized with this DNA vaccine.

Heterologous prime-boost immunization regimens represent a powerful approach to increase cellular immune responses in mammalian species and have been successfully used in the development of improved vaccines for the control of viral and parasite infections (40). In the present study, we demonstrated that priming with pgD-E7E6E5 and subsequent boosting with an adenovirus vector encoding the same target antigen dramatically increased the number of activated E7-specific CD8⁺ T cells in vaccinated mice. The priming effects conferred by the pgD-E7E6E5 vector were dependent of the fusion of the target antigen with the HSV-1 gD protein, suggesting that blockage of the BTLA-mediated coinhibitory pathway contributes to a more efficient activation of antigen-presenting cells and the subsequent positive interaction with CD8⁺ T cells (25).

The recent report of a successful anticancer vaccine trial in patients suffering with cervical cancer and vulvar intraepithelial neoplasia indicates that the therapeutic antitumor vaccines are feasible and represent a real possibility in the near future (20, 39). Our data showed that the pgD-E7E6E5 vector induces not only full protective antitumor responses but also, and most relevantly, antitumor therapeutic effects that may reach up to 100% of mice with previously established tumors

derived from a high-load TC-1 cell inoculum. Our data demonstrate that a DNA vaccine encoding the three HPV-16 oncoproteins induces CD8⁺ T-cell precursors to the immunodominant *H-2D^b*-restricted epitopes of the E7, E6, and E5 proteins. The pgD-E7E6E5 vector also induced activated CD8⁺ T-cell responses, as indicated by detection of CD107a, a degranulation marker of activated CD8⁺ T cells (1). In addition, functional *in vivo* assays showed that mice therapeutically vaccinated with the pgD-E7E6E5 vector developed active cytolytic CD8⁺ T cells targeting both HPV-16 E6 and E7 oncoproteins, which are expressed by the TC-1 cells. The lower E5-specific CD8⁺ T-cell responses were expected, since this antigen is not expressed by the TC-1 cells and would not, therefore, be boosted after immunization with the DNA vaccine. The higher therapeutic antitumor effects of mice immunized with pgD-E7E6E5 with regard to previously tested DNA vectors encoding E7, E6, or both E6 and E7 may be explained, at least in part, by the more efficient activation of CD8⁺ T cells by antigen-presenting cells based on the blockage of the BTLA-mediated coinhibitory signals. As shown previously (25), insertion of larger peptides at the C-terminal part of the gD protein may result in stronger binding to the HVEM receptor and more efficient blockade of the BTLA-binding site.

Three doses of pgD-E7E6E5 partially controlled the growth of tumor cells inoculated in mice up to 5 days before the initial vaccine dose. Noticeably, the protection levels conferred by the vaccine, which ranged from 70% (mice treated up to 3 days after inoculation of the TC-1 cells) to 25% (mice treated 7 days after inoculation of the TC-1 cells), were determined under restrictive conditions that employed a large number (5×10^5 cells/mouse) of TC-1 cells that grow into solid tumors in approximately 1 week and reach large sizes (more than 1.5 cm) within 2 weeks. Under less restrictive conditions (5×10^4 cells/mouse), the therapeutic effects of the DNA vaccine can be significantly higher, reaching 100% of the treated animals (our unpublished observations). In addition, our results show that coadministration of IL-12- or GM-CSF-encoding plasmid further enhanced the antitumor protection effects even following challenges with larger TC-1 cell loads. Both IL-12 and GM-CSF have a long record of successful application in cancer treatment and, although acting through different mechanisms, promote more efficient activation of cytotoxic T cells (10, 11, 23, 28, 33, 35). Indeed, the therapeutic efficacy of these cytokines for the control of different cancer types have also been demonstrated under clinical conditions (15, 29, 34). Based on such evidences, it is possible that the combined use of pgD-E7E6E5 and cytokine-encoding plasmids represents a powerful new tool to induce tumor-protective responses under experimental conditions.

ACKNOWLEDGMENTS

We thankfully acknowledge the helpful technical assistance of J. A. Pereira, C. S. Rivas, and L. C. Silva.

This work was supported by CNPq grants.

REFERENCES

- Aktas, E. U., C. Kucuksezer, S. Bilgic, G. Erten, and G. Deniz. 2009. Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. *Cell. Immunol.* **254**:149–154.
- Bosch, F. X., M. M. Manos, N. Muñoz, M. Sherman, A. M. Jansen, J. Peto, M. H. Schiffman, V. Moreno, R. Kurman, and K. V. Shah. 1995. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J. Natl. Cancer Inst.* **87**:796–802.

3. Braga, C. J. M., L. M. Massis, M. E. Sbrogio-Almeida, B. C. G. Alencar, B. Y. Bargieri, S. B. Boscardin, M. M. Rodrigues, and L. C. S. Ferreira. 2010. CD8⁺ T cell adjuvant effects of *Salmonella* FliCd flagellin in live vaccine vectors or as purified protein. *Vaccine* **28**:1373–1382.
4. Chen, Y. F., C. W. Lin, Y. P. Tsao, and S. L. Chen. 2004. Cytotoxic-T-lymphocyte human papillomavirus type 16 E5 peptide with CpG-oligodeoxynucleotide can eliminate tumor growth in C57BL/6 mice. *J. Virol.* **78**: 1333–1343.
5. Cheng, W. F., C. F. Hung, C. Y. Chai, K. F. Hsu, L. He, M. Ling, and T. C. Wu. 2001. Tumor-specific immunity and antiangiogenesis generated by a DNA vaccine encoding calreticulin linked to a tumor antigen. *J. Clin. Invest.* **108**:669–678.
6. Chu, N. R., H. B. Wu, T. Wu, L. J. Boux, M. I. Siegel, and L. A. Mizzen. 2000. Immunotherapy of a human papillomavirus (HPV) type 16 E7-expressing tumor by administration of fusion protein comprising *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin (BCG) hsp65 and HPV16 E7. *Clin. Exp. Immunol.* **121**:216–225.
7. Compaan, D. M., L. C. Gonzalez, I. Tom, K. M. Loyet, and S. G. D. Eaton. 2005. Attenuating lymphocyte activity: the crystal structure of the BTLA-HVEM complex. *J. Biol. Chem.* **280**:39553–39561.
8. de Alencar, B. C., P. M. Persechini, F. A. Haolla, G. de Oliveira, J. C. Silverio, J. Lannes-Vieira, A. V. Machado, R. T. Gazzinelli, O. Bruna-Romero, and M. M. Rodrigues. 2009. Perforin and gamma interferon expression are required for CD4⁺ and CD8⁺ T-cell-dependent protective immunity against a human parasite, *Trypanosoma cruzi*, elicited by heterologous plasmid DNA prime-recombinant adenovirus 5 boost vaccination. *Infect. Immun.* **77**:4383–4395.
9. de Jong, A., M. I. van Poelgeest, J. M. van der Hulst, J. W. Drijfhout, G. J. Fleuren, C. J. Melief, G. Kenter, R. Offringa, and S. H. van der Burg. 2004. Human papillomavirus type 16-positive cervical cancer is associated with impaired CD4⁺ T-cell immunity against early antigens E2 and E6. *Cancer Res.* **64**:5449–5455.
10. Diaz-Montero, C. M., S. El Naggar, A. Al Khami, R. El Naggar, A. J. Montero, D. J. Cole, and M. L. Salem. 2008. Priming of naive CD8⁺ T cells in the presence of IL-12 selectively enhances the survival of CD8⁺ CD62L^{hi} cells and results in superior anti-tumor activity in a tolerogenic murine model. *Cancer Immunol. Immunother.* **57**:563–572.
11. Emtage, P. C., D. Clarke, R. Gonzalo-Daganzo, and R. P. Junghans. 2003. Generating potent Th1/Tc1 T cell adoptive immunotherapy doses using human IL-12: harnessing the immunomodulatory potential of IL-12 without the in vivo-associated toxicity. *J. Immunother.* **26**:97–106.
12. Feltkamp, M. C. W., H. L. Smits, M. P. Vierboom, R. P. Minnaar, B. M. de Jongh, J. W. Drijfhout, J. T. Schegget, C. J. M. Melief, and W. M. Kast. 1993. Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. *Eur. J. Immunol.* **23**:2242–2249.
13. Fitzgerald, J. C., G. P. Gao, A. R. Sandoval, G. N. Pavlakis, Z. Q. Xiang, A. P. Wlazlo, W. G. Davis, J. M. Wilson, and H. C. Ertl. 2003. A simian replication-defective adenoviral recombinant vaccine to HIV-1 Gag. *J. Immunol.* **170**:1416–1422.
14. Harper, D. M. 2009. Currently approved prophylactic HPV vaccines. *Expert Rev. Vaccines* **8**:1663–1679.
15. Honkoop, A. H., S. A. Luykx-de Bakker, K. Hoekman, S. Meyer, O. W. Meyer, C. J. van Groeningen, P. J. van Diest, E. Boven, E. van der Wall, G. Giaccone, J. Wagstaff, and H. M. Pinedo. 1999. Prolonged neoadjuvant chemotherapy with GM-CSF in locally advanced breast cancer. *Oncologist* **4**:106–111.
16. Hung, C. F., Y. C. Tsai, L. He, and T. C. Wu. 2007. DNA vaccines encoding L1-PADRE generates potent PADRE-specific CD4(+) T-cell immune responses and enhances vaccine potency. *Mol. Ther.* **15**:1211–1219.
17. Hung, C. F., W. F. Cheng, K. F. Hsu, C. Y. Chai, L. He, M. Ling, and T. C. Wu. 2001. Cancer immunotherapy using a DNA vaccine encoding the translocation domain of a bacterial toxin linked to a tumor antigen. *Cancer Res.* **61**:3698–3703.
18. Hung, C. F., A. Monie, R. D. Alvarez, and T. C. Wu. 2007. DNA vaccines for cervical cancer: from bench to bedside. *Exp. Mol. Med.* **39**:679–689.
19. Ji, H., T. L. Wang, C. H. Chen, S. I. Pai, C. F. Hung, K. Y. Lin, R. J. Kurman, D. M. Pardoll, and T. C. Wu. 1999. Targeting human papillomavirus type 16 E7 to the endosomal/lysosomal compartment enhances the antitumor immunity of DNA vaccines against murine human papillomavirus type 16 E7-expressing tumors. *Hum. Gene Ther.* **10**:2727–2740.
20. Kenter, G. G., M. J. P. Welters, A. R. P. M. Valentijn, M. J. G. Lowink, D. M. A. Berends-van der Meer, A. P. G. Vloon, F. Essahasah, L. M. Fathers, R. Offringa, J. W. Drijfhout, A. R. Wafelman, J. Oostendorp, G. J. Fleuren, S. H. van der Burg, and C. J. Melief. 2009. Vaccination against HPV-16 oncoproteins for vulvar intraepithelial neoplasia. *N. Engl. J. Med.* **361**:1838–1847.
21. Kim, J. W., C. F. Hung, J. Juang, L. He, T. W. Kim, D. K. Armstrong, S. I. Pai, P. J. Chen, C. T. Lin, D. A. Boyd, and T. C. Wu. 2004. Comparison of HPV DNA vaccines employing intracellular targeting strategies. *Gene Ther.* **11**:1011–1018.
22. Kim, T. W., C. F. Hung, J. W. Kim, J. Juang, P. J. Chen, L. He, D. A. Boyd, and T. C. Wu. 2004. Vaccination with a DNA vaccine encoding herpes simplex virus type 1 VP22 linked to antigen generates long-term antigen-specific CD8-positive memory T cells and protective immunity. *Hum. Gene Ther.* **15**:167–177.
23. Kusakabe, K. I., K. Q. Xin, H. Katoh, H. Sumino, E. Hagiwara, S. Kawamoto, K. Okuda, Y. Miyagi, I. Aoki, K. Nishioka, D. Klinman, and K. Okuda. 2000. The timing of GM-CSF expression plasmid administration influences the Th1/Th2 response induced by an HIV-1-specific DNA vaccine. *J. Immunol.* **164**:3102–3111.
24. Lasaro, M. O., M. O. Diniz, A. Reyes-Sandoval, H. C. Ertl, and L. C. S. Ferreira. 2005. Anti-tumor DNA vaccines based on the expression of human papillomavirus-16 E6/E7 oncoproteins genetically fused with the glycoprotein D from human herpes virus-1. *Microbes Infect.* **7**:1541–1550.
25. Lasaro, M. O., N. Tatsis, S. E. Hensley, J. C. Whitbeck, S. W. Lin, J. J. Rux, E. J. Wherry, G. H. Cohen, R. J. Eisenberg, and H. C. Ertl. 2008. Targeting of antigen to the herpesvirus entry mediator augments primary adaptive immune responses. *Nat. Med.* **14**:205–212.
26. Lin, C. T., T. C. Cheng, A. Chao, E. Dzeng, Y. K. Soong, C. F. Hung, and C. H. Lai. 2005. Enhancement of DNA vaccine potency through linkage of antigen gene to ER chaperone molecules, ER60, tapasin, and calnexin. *J. Biomed. Sci.* **12**:279–287.
27. Ling, M., M. Kanayama, R. Roden, and T. C. Wu. 2000. Preventive and therapeutic vaccines for human papillomavirus-associated cervical cancers. *J. Biomed. Sci.* **7**:341–356.
28. Macgregor, J. N., Q. Li, A. E. Chang, T. M. Braun, D. P. Hughes, and K. T. McDonagh. 2006. Ex vivo culture with interleukin (IL)-12 improves CD8(+) T-cell adoptive immunotherapy for murine leukemia independent of IL-18 or IFN-gamma but requires perforin. *Cancer Res.* **66**:4913–4921.
29. Mazzolini, G., J. Prieto, and I. Melero. 2003. Gene therapy of cancer with interleukin-12. *Curr. Pharm. Des.* **9**:1981–1991.
30. Peng, S., H. Ji, C. Trimble, L. He, Y. C. Tsai, J. Yeatermeyer, D. A. Boyd, C. F. Hung, and T. C. Wu. 2004. Development of a DNA vaccine targeting human papillomavirus type 16 oncoprotein E6. *J. Virol.* **78**:8468–8476.
31. Piersma, S. J., E. S. Jordanova, M. I. van Poelgeest, K. M. Kwappenberg, J. M. van der Hulst, J. W. Drijfhout, C. J. Melief, G. G. Kenter, G. J. Fleuren, R. Offringa, and S. H. van der Burg. 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.
32. Pisani, P., D. M. Parkin, F. Bray, and J. Ferlay. 1999. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int. J. Cancer* **83**:18–29.
33. Riezebos-Brilman, A., J. Regts, M. Chen, J. Wilschut, and T. Daemen. 2009. Augmentation of alphavirus vector-induce human papilloma virus-specific immune and anti-tumor responses by co-expression of interleukin-12. *Vaccine* **27**:701–707.
34. Spittler, L. E., M. L. Grossbard, M. S. Ernstoff, G. Silver, M. Jacobs, F. A. Hayes, and S. J. Soong. 2000. Adjuvant therapy of stage III and IV malignant melanoma using granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J. Clin. Oncol.* **18**:1614–1621.
35. Touba, A., S. Hill, M. Terabe, J. Qian, T. Floyd, R. M. Simpson, J. A. Berzofsky, and S. N. Khleif. 2007. The combination of GM-CSF and IL-2 as local adjuvant shows synergy in enhancing peptide vaccines and provides long term tumor protection. *Vaccine* **25**:5882–5891.
36. van der Burg, S. H., S. J. Piersma, A. de Jong, J. M. van der Hulst, K. M. Kwappenberg, M. van den Hende, M. J. Welters, J. J. Van Rood, G. J. Fleuren, C. J. Melief, G. G. Kenter, and R. Offringa. 2007. Association of cervical cancer with the presence of CD4⁺ regulatory T cells specific for human papillomavirus antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**:12087–12092.
37. Walboomers, J. M. M., M. V. Jacobs, M. M. Manos, F. X. Bosch, J. A. Kummer, K. V. Shah, P. J. F. Snijders, J. Peto, C. J. L. M. Meijer, and N. Munoz. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.* **189**:12–19.
38. Watanabe, N., M. Gavrieli, J. R. Sedy, J. Yang, F. Fallarino, S. K. Loftin, M. A. Hurchla, N. Zimmerman, J. Sim, X. Zang, T. L. Murphy, J. H. Russell, J. P. Allison, and K. M. Murphy. 2003. BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. *Nat. Immunol.* **4**:670–679.
39. Welters, M. J. P., G. G. Kenter, S. J. Piersma, A. P. G. Vloon, M. J. G. Lövlk, D. M. A. Berends-van der Meer, J. W. Drijfhout, A. R. P. M. Valentijn, A. R. Wafelman, J. Oostendorp, G. J. Fleuren, R. Offringa, C. J. Melief, and S. H. van der Burg. 2008. Induction of tumor-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cell immunity in cervical cancer patients by a human papillomavirus type 16 E6 and E7 long peptides vaccine. *Clin. Cancer Res.* **14**:178–181.
40. Woodland, D. L. 2004. Jump-starting the immune system: prime-boosting comes of age. *Trends Immunol.* **25**:98–104.
41. Wu, T. C., F. G. Guarneri, K. F. Staveley-O'Carroll, R. P. Viscidi, H. I. Levitsky, L. Hedrick, K. R. Cho, T. August, and D. M. Pardoll. 1995. Engineering an intracellular pathway for MHC class II presentation of HPV-16 E7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**:11671–11675.

4.3 Capítulo III

Enhanced anti-tumor effects of a gene gun delivered DNA vaccine encoding the human papillomavirus type-16 (HPV-16) oncoproteins genetically fused to the herpes virus glycoprotein D (gD)

A vacina de DNA que codifica os genes das proteínas E7, E6 e E5 de HPV-16 fusionados à gD de HSV-1 (pgD-E7E6E5), quando inoculada por via parenteral (intramuscular), demonstrou eficiência na indução de células T CD8⁺ específicas para os epítopos presentes nas proteínas E6 e E7 de HPV-16, bem como na geração de resposta protetora terapêutica antitumoral em camundongos desafiados com as células TC-1. No trabalho apresentado neste terceiro capítulo, propusemos a utilização da via intradérmica, utilizando o método da biobalística, como alternativa à via intramuscular de imunização para a entrega da vacina pgD-E7E6E5. A mudança na via de administração foi uma tentativa de obter os mesmos resultados antes encontrados com a imunização pela via intramuscular, mas com uma redução drástica na quantidade de DNA empregada por dose, uma vez que a dose pela via intramuscular requer 100 µg/dose de DNA, enquanto que via intradérmica emprega 2 µg/dose de DNA. A imunização intradérmica com o pgD-E7E6E5, entregue pelo aparelho *gene gun* em dose única, foi capaz de induzir forte ativação de células T CD8⁺ E7-específicas e total efeito protetor antitumoral preventivo em camundongos vacinados. Além disso, três doses da vacina administradas pela via intradérmica manteve 70% dos camundongos imunizados livres do desenvolvimento de tumores induzidos pelo desafio prévio com células TC-1. A co-administração de plasmídeos que codificam as citocinas IL-12 ou GM-CSF aumentou o efeito protetor antitumoral terapêutico, obtido com a inoculação de dose única da vacina pgD-E7E6E5, de 0% para 60 e 50%, respectivamente. O conjunto de resultados gerado mostra que a administração intradérmica da vacina pgD-E7E6E5 é capaz de induzir significativa ativação de células T CD8⁺ específicas e efeitos anti-tumorais expressivos, utilizando 50 vezes menos DNA que na via intramuscular, representando, portanto, uma via de administração promissora para ensaios clínicos.

Enhanced anti-tumor effects of a gene gun-delivered DNA vaccine encoding the human
papillomavirus type 16 oncoproteins genetically fused to the herpes simplex virus
glycoprotein D

Diniz, M.O.* and Ferreira L. C. S.

Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo,
São Paulo, SP, Brasil.

*Corresponding author. Mailing address: Av. Prof. Lineu Prestes 1374, Cidade Universitária,
São Paulo, SP, 05508-000, Brasil; Phone number: +5511 30917338; FAX number: +5511
30917354. modiniz@usp.br

Abstract

Anti-cancer DNA vaccines have attracted growing interest as a simple and non-invasive method for both the treatment and prevention of tumors induced by human papillomaviruses. Nonetheless, the low immunogenicity of parenterally administered vaccines, particularly regarding the activation of cytotoxic CD8⁺ T cell responses, suggests that further improvements in both vaccine composition and administration routes are still required. In this work, we reported the immune responses and anti-tumor effects of a DNA vaccine (pgD-E7E6E5) expressing three proteins (E7, E6 and E5) of the human papillomavirus type 16 genetically fused to the glycoprotein D of the human herpes simplex virus type 1, which was administered to mice through the intradermal (i.d.) route using a gene gun device. A single intradermal dose of pgD-E7E6E5 (2 g/dose) induced a strong activation of E7-specific INF- γ -producing CD8⁺ T cells and full prophylactic anti-tumor effects in the vaccinated mice. Three vaccine doses inhibited tumor growth in 70% of the mice with established tumors. In addition, a single vaccine dose of the co-administration of pgD-E7E6E5 and the vector encoding IL-12 or GM-CSF further enhanced the therapeutic anti-tumor effects and conferred protection to 60% and 50% of the vaccinated mice, respectively. In conclusion, i.d. administration of pgDE7E6E5 significantly enhanced the immunogenicity and anti-tumor effects of the DNA vaccine, representing a promising administration route for future clinical trials.

Key words: gene gun, DNA vaccine, HPV-16, anti-cancer vaccine.

Running Title: Gene gun immunization controls HPV-16-induced tumors

Introduction

Cervical cancer is the second leading cause of cancer deaths among women worldwide (1). Human papillomaviruses (HPV) are associated with virtually all cervical cancer cases; the genome of the human papillomavirus type 16 (HPV-16), the most cancer-prone HPV type, is found in at least 50% of the detected HPV-associated malignancies (2). Currently, two prophylactic anti-HPV vaccines based on virus-like particles (VLPs) are available: Gardasil (VLPs containing the L1 protein from the HPV types 6, 11, 16 and 18) and Cervarix (VLPs containing the L1 protein from the HPV types 16 and 18). Although these vaccines have been shown to be very effective in the generation of neutralizing antibodies, they cannot control existing HPV infections or HPV-associated cellular lesions. Thus, searching for other therapeutic anti-tumor vaccines is a priority that may have an immediate impact on the incidence of HPV-associated tumors.

The control of HPV-associated tumors requires an efficient induction of cellular immune responses, mostly based on antigen-specific CD8⁺ T cells. The HPV-16 E6 and E7 oncoproteins, constitutively expressed in the cervical tumor cells, are the main target antigens for anti-tumor therapeutic vaccines (3). Recently, DNA vaccines have emerged as a promising approach for inducing effective anti-cancer immunity. Although DNA vaccines may induce strong cellular and humoral responses in murine hosts, the specific immune responses observed in subjects in different clinical trials were usually meager (4). To date, various strategies to improve the immunogenicity of DNA vaccines have been tested, including alternative delivery methods and immunization routes. For instance, the intradermal (i.d.) administration route has been shown to be more efficient than the intramuscular (i.m.) administration route for DNA vaccines in terms of the DNA amount required to achieve a similar antigen-specific immune response (5).

Our group has developed different DNA vaccine vectors encoding the HPV-16 oncoproteins genetically fused with the herpes simplex virus type 1 (HSV-1) gD protein (6, 7). The i.m. administration of such DNA vaccines has shown enhanced preventive and therapeutic anti-tumor effects in mice implanted with tumor cells expressing the HPV-16 E7 and E6 oncoproteins. Recently, we reported the development of a DNA vaccine vector (pgDE7E6E5) encoding three HPV-16 oncoproteins (E7, E6 and E5) with enhanced anti-cancer effects relative to the previously reported vaccines based on one (E7) or two (E7 and E6) oncoproteins (7). This newly developed vaccine conferred up to 70% therapeutic anti-tumor protection in mice with established tumor implants after the i.m. administration of three

vaccines doses (100 μ g DNA/dose). In the present study, we evaluated the anti-tumor effects of the pgDE7E6E5 vector delivered through i.d. administration using a gene gun device. The results showed that the i.d. administration route significantly enhanced the activation of antigen-specific CD8 $^{+}$ T cell responses and the preventive and therapeutic anti-tumor effects of the DNA vaccine.

Materials and methods

Mice. Female C57BL/6 mice at six to eight weeks of age were supplied by the Animal Breeding Center of the Biomedical Sciences Institute of the University of São Paulo and were housed at the Parasitology Department of the University of São Paulo. All animal-related procedures were performed according to approved protocols and in accordance with recommendations for the proper use and care of laboratory animals at the Biomedical Sciences Institute of the University of São Paulo.

Cell lines. The TC-1 cell line was kindly provided by Dr. T.C. Wu (John Hopkins University, Baltimore, MD, USA). These cells were transformed with v-HA-ras and the E6 and E7 genes of HPV-16 (8). The TC-1 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 2 mM non-essential amino acids, 10 mM HEPES buffer, 50 units/ml penicillin/streptomycin and 10% fetal bovine serum (FBS) and were kept at 37 °C at 5% CO₂. Before inoculation, the TC-1 cells were harvested by trypsinization, washed twice, and suspended in serum-free media at 5 x 10⁶ cells/ml.

DNA vaccines. The generation of the DNA vaccines encoding the in tandem fused HPV-16 E7, E6 and E5 oncoproteins (pE7E6E5) or the three oncoproteins genetically fused after the amino acid 244 of the HSV-1 gD protein (pgD-E7E6E5) has been previously described (7). The correct in-frame cloning of E7, E6 and E5 encoding genes was confirmed by DNA sequencing. The DNA vaccine (pgD) encoding the complete non-fused HSV-1 gD has been previously described (6).

Immunization and tumor cell challenge. Groups of five to ten mice were vaccinated with the DNA vaccines by i.d. administration using a gene gun, through which DNA-coated gold particles (1 µg DNA/bullet) were delivered to the shaved abdominal region using a helium-driven device (Biomics; São Carlos/Brazil) with 400 psi charge pressure; each dose contained 2 µg of DNA. Alternatively, vaccinations were performed by i.m. administration; each dose contained 100 µg of DNA, divided into two 50-µl aliquots and delivered into the tibialis anterior muscle of each hind limb. For the tumor protection experiments, mice were challenged subcutaneously (s.c.) with 5×10^5 TC-1 cells suspended in 100 µl of serum-free media; the cells were injected into the left rear flank of the mice two weeks after the vaccination. To determine the effect of post-challenge vaccination, mice were vaccinated at the same day 8 h after being challenged with 5×10^5 TC-1 cells. One or two additional vaccine doses were applied to the animals in weekly intervals thereafter. For the post-challenge experiments with the co-administration of plasmids expressing cytokines, mice were immunized with three doses, each containing 1 µg of DNA of the vaccine vectors admixed to 1 µg of DNA of the plasmid expressing IL-12 or GM-CSF. Tumor growth was monitored by visual inspection and palpation three times a week after the challenge. Mice were scored as tumor-bearing when tumors reached a size of approximately 1 to 2 mm in diameter. Mice were euthanized once tumors exceeded a diameter of 1 cm and became necrotic or burdensome to the animals. Tumor growth was otherwise followed for a period of 60 days after the challenge.

Intracellular cytokine staining. Intracellular IFN- γ staining was performed using blood samples treated for 5 min on ice with the ACK lysing buffer (BioSource International; Camarillo, CA/USA) to rupture red blood cells and then centrifuged at 1,000 x g for 5 min. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were treated with the lysis buffer again, centrifuged and suspended in DMEM. PBMCs were cultured at the concentration of 10^6 cells/well for 5 h at 37 °C in a 96-well round bottom microtiter plate in 200 µl of DMEM supplemented with 10% FBS and 10^{-6} M β-mercaptoethanol. Brefeldin A (GolgiPlug; BD Bioscience; San Jose, CA/USA) was added at 1 µl/ml. The E7-specific RAHYNIVTF peptide, carrying the immunodominant epitope of E7 for mice of the H-2^b haplotype (9), or the V3 control peptide, delineated from the sequence of the envelope protein of HIV-1 clade B (VVEDEGVCTNLSGF), was used as stimuli at a concentration of 3 µg/ml. After washing, the cells were incubated for 30 min at 4 °C with 100 µl of a 1: 100 dilution of a fluorescein

(FITC)-conjugated monoclonal antibody to mouse CD8a (BD Bioscience; San Jose, CA/USA). The cells were washed once with PBS followed by permeabilization with Cytofix/Cytoperm (BD Bioscience; San Jose, CA/USA) for 20 min at 4 °C , washed twice with the Perm/Wash buffer (BD Bioscience; San Jose, CA/USA) and incubated in the same buffer for 30 min at 4 °C with 50 µl of a 1: 100 dilution of a phycoerythrin (PE)-labeled monoclonal antibody to mouse IFN-γ (BD Bioscience; San Jose, CA/USA). After washing, the cells were suspended in PBS and were examined by two-color flow cytometry using a FACS Calibur (BD Bioscience; San Jose, CA/USA). Data were analyzed using FlowJo software. The percentages of CD8⁺ cells positive for IFN-γ in all CD8⁺ T cells were determined.

Statistical analyses. All data expressed as means ± SD are representatives of at least two independent experiments. Student's t-tests or ANOVA was employed to compare individual data points.

Results

Activation of E7-specific CD8⁺ T cell responses and anti-tumor protective effects in mice i.d. immunized with pgD-E7E6E5

Mice i.d. immunized with one or two doses of pgD-E7E6E5 (2 µg/dose) developed significant numbers of E7-specific IFN-γ-producing CD8⁺ T cells. Half of the mice immunized with one dose of pgD-E7E6E5 developed E7-specific CD8⁺ T cell responses, whereas two doses of the vaccine induced positive responses in all vaccinated mice (Fig. 1A). Mouse groups immunized with the pgD vector or pE7E6E5 (not fused with the gD protein) did not develop any detectable E7-specific, IFN-γ-producing CD8⁺ T cell responses.

Although only half of the animals immunized with pgD-E7E6E5 developed significant anti-E7 CD8⁺ T cell responses after a single i.d. administration, all vaccinated mice developed full preventive protection to tumor growth after being implanted with TC-1 cells (Fig. 1B). The same result was obtained in mice immunized with two i.d. doses of pgD-E7E6E5 (data not shown). No anti-tumor protective effects were observed in mice i.d. immunized with one or two doses of the pgD or pE7E6E5 vectors.

Two weeks after the challenge with TC-1 cells, the number of E7-specific, IFN- γ -producing CD8 $^{+}$ T cells increased in mice immunized with one dose of pgD-E7E6E5 delivered either through the i.d. (2 μ g/dose) or i.m. (100 μ g/dose) routes (Fig. 1C). Collectively, these results demonstrated that the i.d. route significantly enhanced the immunogenicity and anti-tumor effects of the pgDE7E6E6 vaccine compared to the i.m. route, which required 50-fold more DNA to induce similar immune responses.

Therapeutic anti-tumor effects of the i.d. delivered pgD-E7E6E5 vector

We further investigated the therapeutic anti-tumor effects of pgD-E7E6E5 in mice with established tumors after i.d. administration. One dose of the pgD-E7E6E5 vector did not halt tumor progression (Fig. 2A). However, two or three doses conferred 30% and 70% protection to the mice with established tumors, respectively (Fig. 2A). As indicated in Figure 2, mice therapeutically treated with one dose of pgD-E7E6E5 failed to mount a significant E7-specific CD8 $^{+}$ T cell response in pooled PBMCs. However, mice treated with two or three doses of pgD-E7E6E5 showed a significant increase in the number of E7-specific CD8 $^{+}$ T cells in a dose-dependent manner, reaching maximum values 20 days after TC-1 cell implantation (Fig. 2B). As expected, mice immunized with one, two or three doses of the pgD or pE7E6E5 vectors did not develop anti-tumor or E7-specific CD8 $^{+}$ T cell responses (data not shown).

Co-administration of the plasmid expressing IL-12 or GM-CSF enhanced the therapeutic anti-tumor effects of i.m. delivered pgD-E7E6E5 (7). Similarly, mice immunized with a single dose of pgD-E7E6E5 and pIL-12 (Fig. 3A) or pGM-CSF (Fig. 3B) (2 μ g/dose) using the gene gun device developed 60% and 50% therapeutic protection against pre-implanted tumor cells, respectively. Under the same conditions, no anti-tumor protection was observed in mice immunized with a single dose of pgD-E7E6E5 (Fig. 3). No significant anti-tumor protection was observed in mice immunized with the pIL-12 or pGM-CSF vectors (Fig. 3).

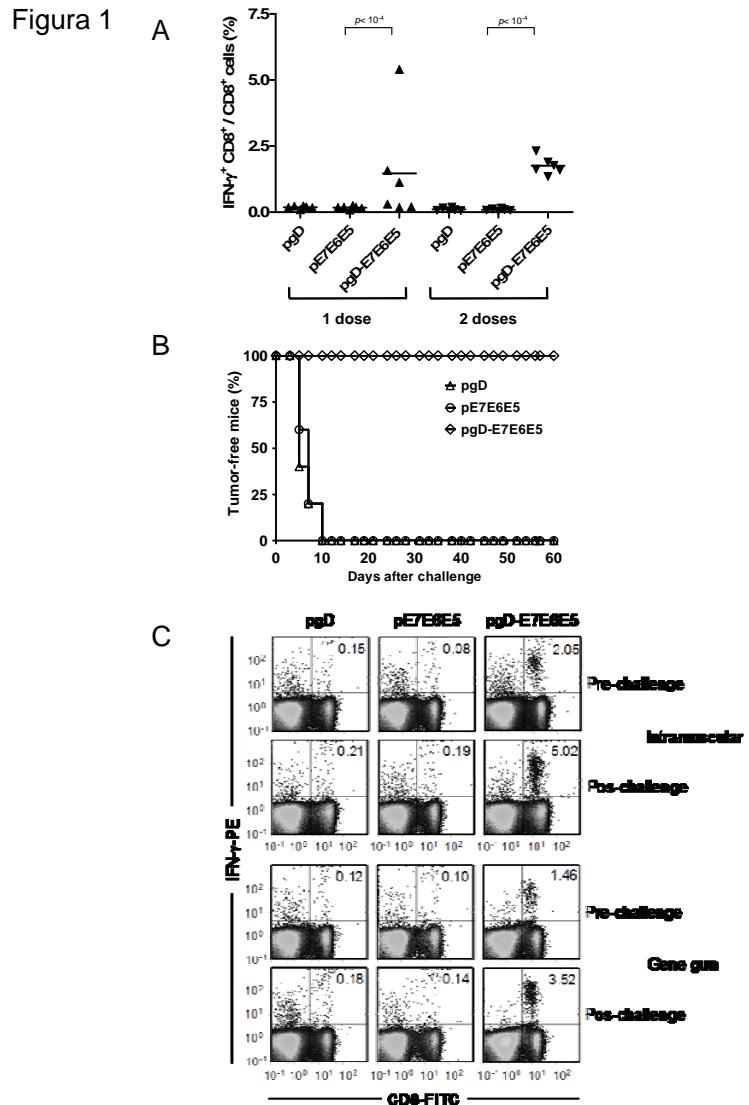


Figure 1: Induction of E7-specific, IFN- γ -producing CD8⁺ T cell precursors and preventive anti-tumor effects in mice i.d. immunized with pgD-E7E6E5. Detection of E7-specific CD8⁺ T cells was carried out with PBMCs incubated with the synthetic MHC class I-restricted E7 peptide (⁴⁹RAHYNIVTF⁵⁷) and stained for the CD8 marker (FITC) and intracellular accumulated IFN- γ (PE). (A) Individual CD8⁺ T cell responses in mice immunized with one or two doses of pgD, pE7E6E5 or pgD-E7E6E5 delivered with the gene gun device (2 μ g/dose). The number of E7-specific CD8⁺ T cells was determined two weeks after the last vaccine dose. (B) Mice immunized with one i.d. dose of pgD-E7E6E5, pE7E6E5, or pgD were challenged with $5 \cdot 10^5$ TC-1 tumor cells two weeks after the last vaccine dose. Tumor growth was followed up to 60 days after inoculation of the TC-1 cells. (C) Mice were immunized with one dose of pgD-E7E6E5, pE7E6E5, or pgD delivered via the i.d or i.m. routes, and the frequencies of E7-specific CD8⁺ T cells were determined 2 weeks after the last immunization (pre-challenge) and 2 weeks after the TC-1 challenge (pos-challenge) in pooled PBMCs. The numbers at the right upper corners represent the frequencies of E7-specific CD8⁺ T cells as a percentage of IFN- γ -producing CD8⁺ T cells of the detected CD8⁺ T cells. Statistically significant differences ($P < 0.001$) were noted with regard to mice immunized with pgD or pE7E6E5 control vectors.

Figura 2

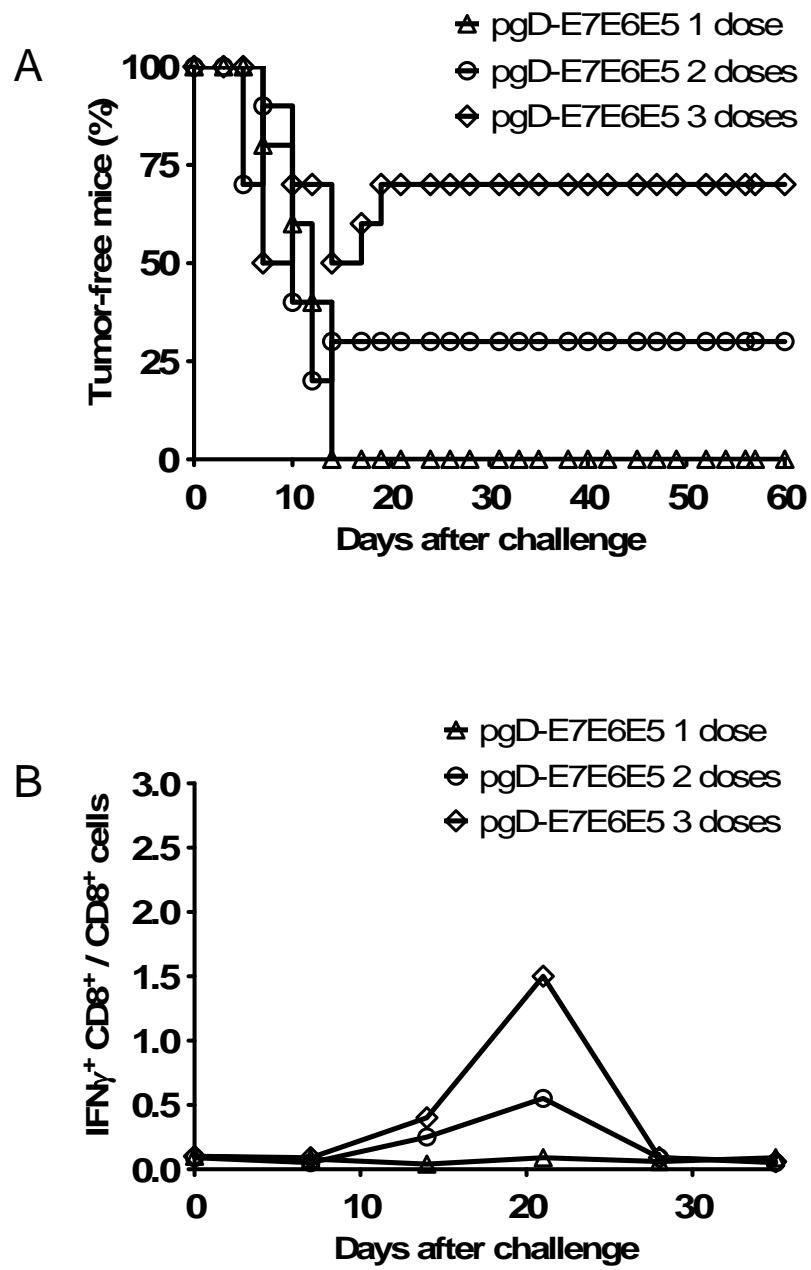


Figure 2: Therapeutic anti-tumor effects and E7-specific $CD8^+$ T cell responses in mice i.d. immunized with pgD-E7E6E5. (A) Therapeutic anti-tumor effects in mice previously inoculated with TC-1 cells and immunized with one, two or three doses of pgD-E7E6E5 administered with a gene gun device. (B) Detection of E7-specific $CD8^+$ T cells in pooled PBMCs from mice inoculated with TC-1 tumor cells and immunized with one, two or three doses of pgD-E7E6E5 delivered via the i.d. route.

Figure 3

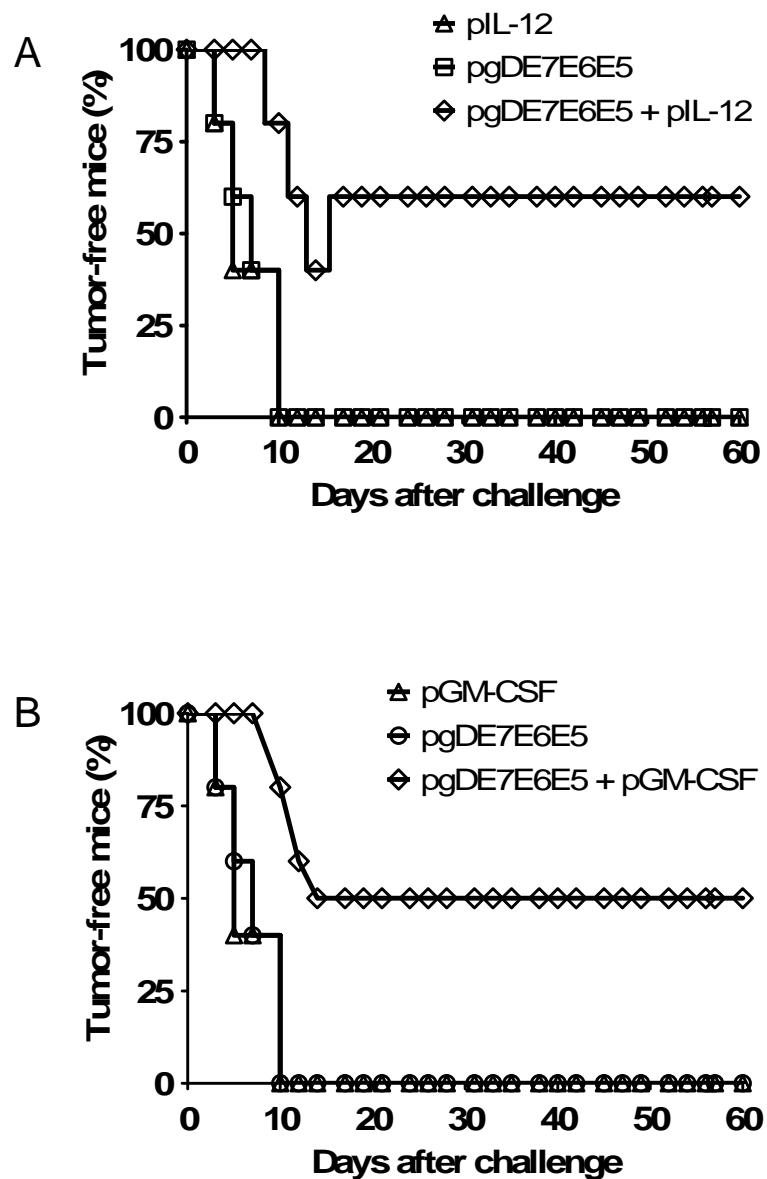


Figure 3: Co-administration of pgD-E7E6E5 and IL-12 or GM-CSF-encoding plasmids confers enhanced anti-tumor therapeutic effects. Mice were i.d. immunized with a single dose of pgD-E7E6E5 admixed with pIL-12 (A) or pGM-CSF (B) vectors (1 µg/dose of each vector). Mice immunized with a single dose of the pgD-E7E6E5, pIL-12 or pGM-CSF are also indicated. The vaccines were administered 8 h after inoculation of 5×10^5 TC-1 cells.

Discussion

The immunization route is a critical aspect to evaluate the efficacy of DNA vaccines aiming at clinical applications. In this study, we tested the i.d. immunization route using a gene gun device of a DNA vaccine expressing three HPV-16 oncoproteins. The results clearly showed that the i.d. administration route required less DNA (compared to the i.m. route) to achieve a similar antigen-specific CD8⁺ T cell response and, in particular, to achieve prophylactic and therapeutic anti-tumor effects. Specifically, the present findings showed that a 50-fold reduction in the injected DNA amount through the i.d. route preserved the same immunogenicity and anti-tumor effects observed in mice immunized through the i.m. route (7). Considering that most DNA vaccines tested under clinical conditions showed lower immunogenicity compared to that under experimental conditions, the possibility of improving the performance of DNA vaccines by changing the administration route represents a significant improvement in the development of therapeutic vaccines targeting HPV-associated tumors.

Previous studies showed that the administration route may have a significant impact, both quantitatively and qualitatively, on the immune responses elicited in vaccinated mice. In particular, DNA vaccines administered through the i.d. route have been reported to elicit Th2-biased immune responses, whereas administration through the i.m. route preferentially induces a Th1-biased immune response (10-15). In contrast to other DNA vaccines, our results demonstrated that the i.d. administration of the pgD-E7E6E5 vector did not change the pattern of immune response elicited in vaccinated mice when compared to the i.m. administration. These results indicate that the immunization route should be evaluated for each DNA vaccine construct regarding the activation of specific immune responses to the encoded antigen because features other than the administration route might affect the immunogenicity of the DNA, such as the encoded antigen itself, the animal's genetic background and the vector backbone.

A comparative study conducted by Trimble and colleagues (16) used needle i.m., biojector and gene gun immunization of a DNA vaccine expressing E7 from HPV-16 fused to *Mycobacterium tuberculosis* heat shock protein 70 (HSP70). The authors observed that gene gun immunization induced the highest number of antigen-specific CD8⁺ T cells and slightly better anti-tumor effects against TC-1 tumors. Our results showed similar findings. Although no statistically significant differences in the numbers of E7-specific IFN- γ producing CD8⁺ T cells and anti-tumor effects were detected in mice submitted to the two immunization routes,

the amount of DNA used in the gene gun immunization was 50-fold less. Taken together, these results indicate that the i.d. administration route can significantly improve the performance of DNA vaccines encoding HPV-16 oncoproteins.

The better performance of DNA vaccines delivered with a gene gun device for inducing cell-mediated immunity can be attributed to the cell types involved in antigen processing and presentation. The i.d. route preferentially favors the stimulation of epidermal keratinocytes as well as professional antigen presenting cells (APCs) such as the Langerhans cells (17, 18). The higher numbers of activated APCs in epidermal keratinocytes relative to those in the muscular tissue, where cross-priming prevails, probably at least partially contributes to the enhanced activation of MHC class I-restricted CTLs (19-21).

Cytokines or chemokines simultaneously delivered with DNA vaccines as plasmids or purified proteins have been shown to increase Ag-induced immune responses or alter the Th1:Th2 balance (22-28). Significantly higher therapeutic anti-tumor protection levels were observed after i.d. immunization of a single dose of pgD-E7E6E5 co-administered with the plasmid expressing IL-12 or GM-CSF. Treatment with IL-12 DNA has been shown to enhance antigen-specific cell-mediated immunity and to promote anti-tumor activity in different animal models (28, 29). The ability of IL-12 to augment antigen-specific immunity is related to the induction of a Th1-biased immune response, leading to the enhanced activation of CTL responses (30-32). GM-CSF has been successfully used to increase the immune responses to antigens encoded by DNA vaccines (33-34). GM-CSF has been reported to initiate the proliferation, differentiation, and activation of macrophages, neutrophils, and various APCs (35-39).

In summary, the present study demonstrates that the i.d. delivered pgD-E7E6E5 vector can generate strong antigen-specific CD8⁺ T cell responses in vaccinated mice and confer enhanced anti-tumor protection with much lower DNA loads when compared to the i.m. delivered DNA vaccine. These results will contribute to the design of therapeutic DNA vaccines against HPV-associated tumors for clinical applications.

References

1. Pisani P, Parkin DM, Bray F, Ferlay J. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int J Cancer* 1999; 83: 18-29.
2. Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 796-802.
3. Eiben GL, Da Silva DM, Fausch SC, Le Poole IC, Nishimura MI, Kast WM. Cervical cancer vaccines: recent advances in HPV research. *Viral Immunol* 2003; 16(2): 111-121.
4. Kutzler MA, Weiner DB. DNA vaccines: ready for prime time?. *Nature Reviews* 2008; 9: 77-788.
5. Donnelly JJ, Ulmer JB, Shiver JW, Liu MA. DNA vaccines. *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 17-48.
6. Lasaro MO, Diniz MO, Reyes-Sandoval A, Ertl HC, Ferreira LCS. Anti-tumor DNA vaccines based on the expression of human papillomavirus-16 E6/E7 oncoproteins genetically fused with the glycoprotein D from human herpes virus-1. *Microb Infection* 2005; 7: 1541-1550.
7. Diniz MO, Lasaro MO, Ertl HC, Ferreira LCS. Immune responses and therapeutic antitumor effects of an experimental DNA vaccine encoding human papillomavirus type 16 oncoproteins genetically fused to herpesvirus glycoprotein D. *Clin Vac Immunol* 2010; 17: 1576-1583.
8. Lin KY, Guarneri FG, Staveley-O'Carroll KF, Levintsky HI, August JT, Pardoll DM, 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.
9. Feltkamp MCW, Smits HL, Vierboom MP, Minnaar RP, de Jongh BM, Drijfhout JW, 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.
10. Gramzinski RA, Millan CLB, Obaldia N, Hoffman SL, Davis HL. Immune response to a hepatitis B DNA vaccine in rhesus monkeys: a comparison of vaccine formulation, route, and method of administration. *Mol Medicine* 1998; 4: 109-118.
11. Kasinreck W, Moonson S, Chawansuantati K. Production of antibodies by single DNA immunization: comparison of various immunization routes. *Hybridoma and Hybridomics* 2002; 21: 287-293.

12. Lima KM, Santos SA, Santos Jr RR, Brandão IT, Rodrigues Jr JM, Silva CL. Efficacy of DNA-hsp5 vaccination for tuberculosis varies with method of DNA introduction in vivo. *Vaccine* 2003; 22: 49-56.
13. Hu H, Lu X, Tao L, Bai B, Zhang Z, Chen Y, et al. Induction of specific immune responses by severe acute respiratory syndrome coronavirus spikeDNA vaccine with or without interleukin 2 immunization using different vaccination routes. *Clin Vaccine Immunol* 2007; 14(7): 894-901.
14. Pokorna D, Rubio I, Muller M. DNA-vaccination via tattooing induces stronger humoral and cellular immune responses than intramuscular delivery supported by molecular adjuvants. *Genet Vaccines Ther* 2008; 7: 6-4.
15. Hu H, Huang X, Tao L, Huang Y, Cui B, Wang H. Comparative analysis of the immunogenicity of SARS-CoV nucleocapsid DNA vaccine administrated with different routes in mouse model. *Vaccine* 2009; 27: 1758-1763.
16. Trimble C, Lin CT, Hung CF, Pai S, Juang J, He L, et al. Comparison of the CD8+ T cell response and antitumor effects generated by DNA vaccine administered through gene gun, biojector and syringe. *Vaccine* 2003; 21: 4036-4042.
17. Condon C, Watkins SC, Celluzzi CM, Thompson K, Falo LD. DNA-based immunization by in vivo transfection of dendritic cells. *Nature Med* 1996; 2:1122-1128.
18. Porgador A, Irvine KR, Iwasaki A, Barber BH, Restifo NP, Germain RN. Predominant role for directly transfected dendritic cells in antigen presentation to CD8+ T cells after gene gun immunization. *J Exp Med* 1998; 188: 1075-1082.
19. Fu TM, Ulmer JB, Caulfield MJ, Deck RR, Friedman A, Wang S, et al. Priming of cytotoxic T lymphocytes by DNA vaccines: requirement for professional antigen presenting cells and evidence for antigen transfer from myocytes. *Mol Med* 1997; 3(6): 362–371.
20. Iwasaki A, Torres CAT, Ohashi PS, Robinson HL, Barber BH. The dominant role of bone marrow-derived cells in CTL induction following plasmid DNA immunization at different sites. *J Immunol* 1997; 159:11–14.
21. Corr M, Lee DJ, Carson DA, Tighe H. Gene vaccination with naked plasmid DNA: Mechanism of CTL priming. *J Exp Med* 1996; 184: 1555-1560.
22. Calarota SA, Weiner DB. Enhancement of human immunodeficiency virus type 1-DNA vaccine potency through incorporation of T-helper 1 molecular adjuvants. *Immunol Rev* 2004; 199: 84-99.
23. Xin KQ, Hamajima K, Sasaki S, Honsho A, Tsuji T, Ishii N, et al. Intranasal administration of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) DNA vaccine with

- interleukin-2 expression plasmid enhances cell-mediated immunity against HIV-1. *Immunol* 1998; 94: 438-444.
24. Tsuji T, Hamajima K, Ishii N, Aoki I, Fukushima J, Xin KQ, et al. Immunodulatory effects of plasmid expressing B7-2 on human immunodeficiency virus-1 specific cellmediated immunity induced by plasmid-encoded the viral antigen. *Eur J Immunol* 1997; 27: 782-787.
25. Okada E, Sasaki S, Ishii N, Aoki I, Yasuda T, Nishioka K, et al. Intranasal immunization of a DNA vaccine with interleukin 12 and granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) expressing plasmids in liposomes induce strong mucosal and cell-mediated immune responses against HIV-1 antigen. *J Immunol* 1997; 159: 3638-3647.
26. Kim JJ, Bagarazzi ML, Trivedi N, Hu Y, Kazahaya K, Wilson DM, et al. Engineering of in vivo immune responses to DNA immunization via codelivery of costimulatory molecule genes. *Nat Biotechnol* 1997; 15:641-646.
27. Scott P. IL-12: initiation cytokine for cell-mediated immunity. *Science* 1993; 260: 496-497.
28. Tsuji T, Hamajima K, Fukushima J, Xin KQ, Ishii N, Aoki I, et al. Enhancement of cell-mediated immunity against HIV-1 induced by coinoculation of plasmid-encoded HIV-1 antigen with plasmid expressing interleukin-12. *J Immunol* 1997; 158: 4008-4013.
29. Mazzolini G, Prieto J, Melero I. Gene therapy of cancer with interleukin-12. *Curr Pharm Des* 2003; 9(24): 1981-1991.
30. Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 1993; 260: 547-549.
31. Manetti R, Gerosa F, Giudizi MG, Biagiotti R, Parronchi P, Piccinni MP, et al. Interleukin 12 induces stable priming for interferon gamma (IFN-gamma) production during differentiation of human T helper (Th) cells and transient IFN-gamma production in established Th2 cell clones. *J Exp Med* 1993; 179: 1273–1283.
32. Tsung K, Meko J B, Peplinski GR, Tsung YL, Norton JA. IL-12 induces T helper 1-directed antitumor response. *J Immunol* 1997; 158: 3359-3365.
33. Lee AH, Suh YS, Sung YC. DNA inoculations with HIV-1 recombinant genomes that express cytokine genes enhance HIV-1 specific immune responses. *Vaccine* 1999; 17(5): 473-479.
34. Rollman E, Hinkula J, Arteaga J, Zuber B, Kjerrström A, Liu M, et al. Multi-subtype gp160 DNA immunization induces broadly neutralizing anti-HIV antibodies. *Gene Ther* 2004; 11(14):1146-1154.

35. Kitamura T, Hayashida K, Sakamaki K, Yokota T, Arai K, Miyajima A. Reconstitution of functional receptors for human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): evidence that the protein encoded by the AIC2B cDNA is a subunit of the murine GM-CSF receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 5082-5086.
36. Wakimoto H, Abe J, Tsunoda R, Aoyagi M, Hirakawa K, Hamada H. Intensified antitumor immunity by a cancer vaccine that produces granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4. *Cancer Res* 1996; 56: 1828-1833.
37. Jager E, Ringhoffer M, Dienes HP, Arand M, Karbach J, Jager D, et al. Granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor enhances immune responses to melanoma-associated peptides in vivo. *Int J Cancer* 1996; 67: 54-62.
38. Jones T, Stern A, Lin R. Potential role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as vaccine adjuvant. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; 13: S47-S53.
39. Disis ML, Bernhard H, Shiota FM, Hand SL, Gralow JR, Huseby ES, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: an effective adjuvant for protein and peptide-based vaccines. *Blood* 1996; 88: 202-210.

4.4 Capítulo IV

Co-administração de plasmídeos que expressam as citocinas IL-2, IL-12 ou GM-CSF aos plasmídeos vacinais pgDE7 e pgD-E7E6E5 e avaliação das respostas celulares e protetora geradas

O parâmetro experimental de maior relevância em relação ao desenvolvimento de vacinas contra tumores induzidos por HPV-16 é a capacidade de indução de resposta protetora terapêutica contra tumores formados pelas células TC-1. Dados anteriores mostraram que a vacina de DNA que codifica a proteína E7 de HPV-16 fusionada à gD do HSV-1 (pgDE7; chamado pRE4E7 no artigo Lasaro et al, 2005) foi capaz de induzir 40% de proteção terapêutica após a inoculação de quatro doses da vacina em camundongos previamente desafiados com as células TC-1. Em continuidade aos nossos estudos com a vacina de DNA que codifica as proteínas E7, E6 e E5 do HPV-16 fusionadas à gD do HSV-1 (pgD-E7E6E5), obtivemos que 70% dos camundongos desafiados com as células tumorais TC-1 e tratados com 3 doses subsequentes da vacina de DNA mantiveram-se livres da formação de tumores. Esse nível de proteção terapêutica foi encontrado utilizando-se tanto a via intramuscular (100 µg DNA/dose) como a via intradérmica por biobalística (2 µg DNA/dose).

Com o objetivo de aumentar o efeito antitumoral terapêutico anteriormente obtido, utilizamos plasmídeos capazes de expressar as citocinas IL-12 ou GM-CSF co-administrados ao plasmídeo pgD-E7E6E5. Em estudos iniciais, observamos que os plasmídeos pIL-12 ou pGM-CSF, em imunização combinada com 3 doses da vacina pgD-E7E6E5, promoveu 100% de proteção terapêutica em camundongos previamente inoculados com 5×10^5 células TC-1. Neste quarto capítulo, buscamos melhor explorar os efeitos potencializadores gerados por plasmídeos que expressam as citocinas IL-2, IL-12 ou GM-CSF co-administrados aos plasmídeos vacinais pgDE7 ou pgD-E7E6E5. Primeiramente, analisamos a capacidade dos plasmídeos que expressam citocinas em elevar proteção terapêutica gerada pela administração de 3 doses da vacina pgD-E7E6E5. Posteriormente, realizamos uma série de ensaios de proteção terapêutica à formação de tumores com os vetores vacinais pgD-E7E6E5 ou pgDE7, em combinação com o vetor que expressa a citocina IL-2, para gerar um protocolo otimizado de imunização, de forma a reduzir o número de

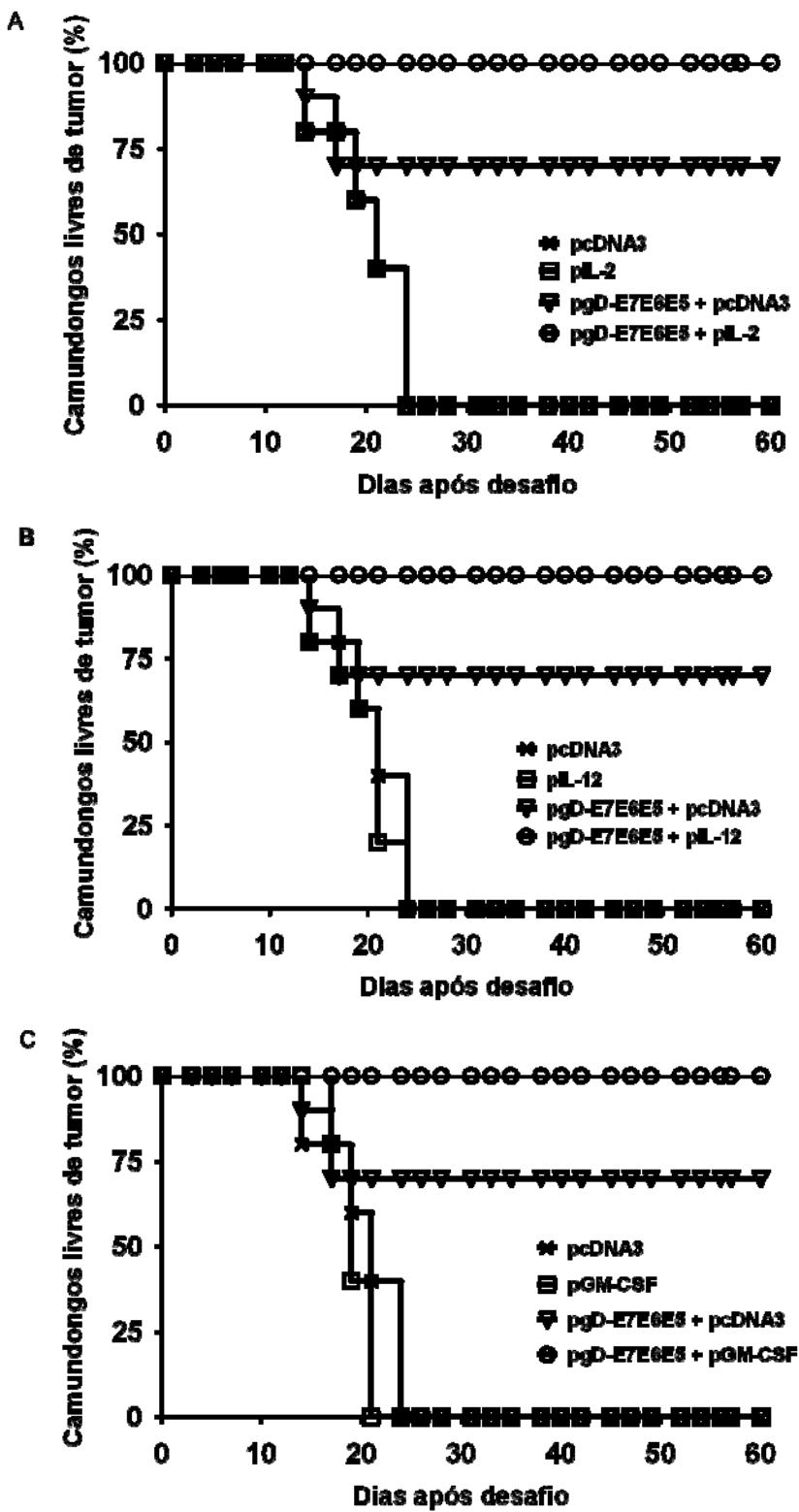
doses ou a quantidade de DNA empregada na vacinação. Além disso, realizamos estudos exploratórios da ativação de resposta de células T CD8⁺ gerada pela imunização combinada do vetor pgDE7 com o plasmídeo que expressa a IL-2. Nos ensaios realizados passamos a utilizar uma quantidade menor de células TC-1 nos desafios ($7,5 \times 10^4$), para que o tumor apresentasse um desenvolvimento mais lento em relação aos ensaios anteriores. Nessas condições camundongos não imunizados apresentam tumores palpáveis em cerca de 15 dias enquanto que animais inoculados com 5×10^5 células TC-1/animal desenvolvem tumores palpáveis em cerca de 7 dias.

4.4.1 Descrição dos resultados

Análise do efeito anti-tumoral terapêutico da vacina pgD-E7E6E5 em combinação com plasmídeos que expressam citocinas

Foram realizados ensaios de proteção terapêutica em camundongos C57BL/6 desafiados com as células tumorais TC-1 utilizando-se $7,5 \times 10^4$ células/animal. Grupos de 10 camundongos receberam três doses dos plasmídeos pgD, pE7E6E5 ou pgD-E7E6E5 (100 µg/dose) misturado ao plasmídeo pIL-2, pIL-12, pGM-CSF ou pcDNA3 (100 µg/dose), com intervalos de uma semana entre as doses pela via intramuscular. O protocolo de imunização teve início no mesmo dia do desafio com as células TC-1. Os animais que receberam as 3 doses da vacina de DNA pgD-E7E6E5 com os vetores que expressam IL-2 (Figura 4A), IL-12 (Figura 4B), ou GM-CSF (Figura 4C) apresentaram 100% de proteção terapêutica à formação de tumores induzidos por células TC-1. Camundongos imunizados com 3 doses da vacina de DNA pgD-E7E6E5 em combinação com o plasmídeo pcDNA3 vazio, mantiveram a proteção terapêutica anteriormente encontrada de 70%. As combinações entre os vetores pgD ou pE7E6E5 e os plasmídeos pIL-2, pIL-12, pGM-CSF ou pcDNA3 não foram capazes de conferir resposta protetora a tumores induzidos por células TC-1 (dados não mostrados).

Figura 4- Ensaio de proteção terapêutica em camundongos C57BL/6 desafiados com células TC-1 e imunizados com a vacina pgD-E7E6E5 co-administrada a plasmídeos que expressam citocinas. Os animais foram imunizados com três doses de 100 µg de pIL-2 (A), pIL-12 (B), pGM-CSF (C) ou pcDNA3 sozinhos ou misturados a 100 µg do vetor pgD-E7E6E5 pela via intramuscular. Os protocolos vacinais tiveram início no mesmo dia do desafio, feito através da inoculação por via subcutânea de $7,5 \times 10^4$ células TC-1 por animal.



Otimização do protocolo de imunização com a combinação vacinal pgD-E7E6E5 ou pgDE7 com o plasmídeo pIL-2

A partir do resultado obtido após imunização com 3 doses de 100 µg de DNA do vetor pgD-E7E6E5 em combinação com 3 doses de 100 µg de DNA dos vetores que expressam as citocinas IL-2, IL-12 ou GM-CSF pela via intramuscular, realizamos uma série de ensaios de proteção terapêutica à formação de tumores, buscando um protocolo de imunização otimizado. Os três plasmídeos que codificam citocinas utilizados no nosso trabalho (pIL-2, pIL-12 e pGM-CSF) foram capazes de aumentar a resposta terapêutica da vacina pgD-E7E6E5 para 100% de camundongos livres de tumor, entretanto, escolhemos o plasmídeo pIL-2 para os testes de otimização de protocolo. Os experimentos de proteção terapêutica que seguem nessa seção foram realizados utilizando-se 10 camundongos C57BL/6 por grupo, desafiados com $7,5 \times 10^4$ células TC-1/animal no mesmo dia em que teve início o regime vacinal. Além disso, em todos os experimentos foram utilizados grupos controle com camundongos não imunizados, ou imunizados com os vetores pIL-2, pE7E6E5 ou pgD, e nesses grupos, todos os camundongos apresentam tumores em cerca de 15 dias.

A possibilidade de utilizar um regime de vacinação com uma quantidade menor de doses ou utilizar uma quantidade menor de DNA/dose representa uma economia de recursos, importante para viabilizar o emprego futuro da vacina em testes clínicos. Para avaliar a possibilidade de reduzir o número de doses da combinação vacinal, imunizamos os camundongos com uma, duas ou três doses de 100 µg de DNA/animal de pgD-E7E6E5 em combinação com 100 µg de DNA/animal de pIL-2 pela via intramuscular. A proteção terapêutica de 100% obtida previamente, utilizando-se três doses da combinação vacinal, foi encontrada também para a administração de duas ou até mesmo uma dose da combinação pgD-E7E6E5 e pIL-2 (Figura 5).

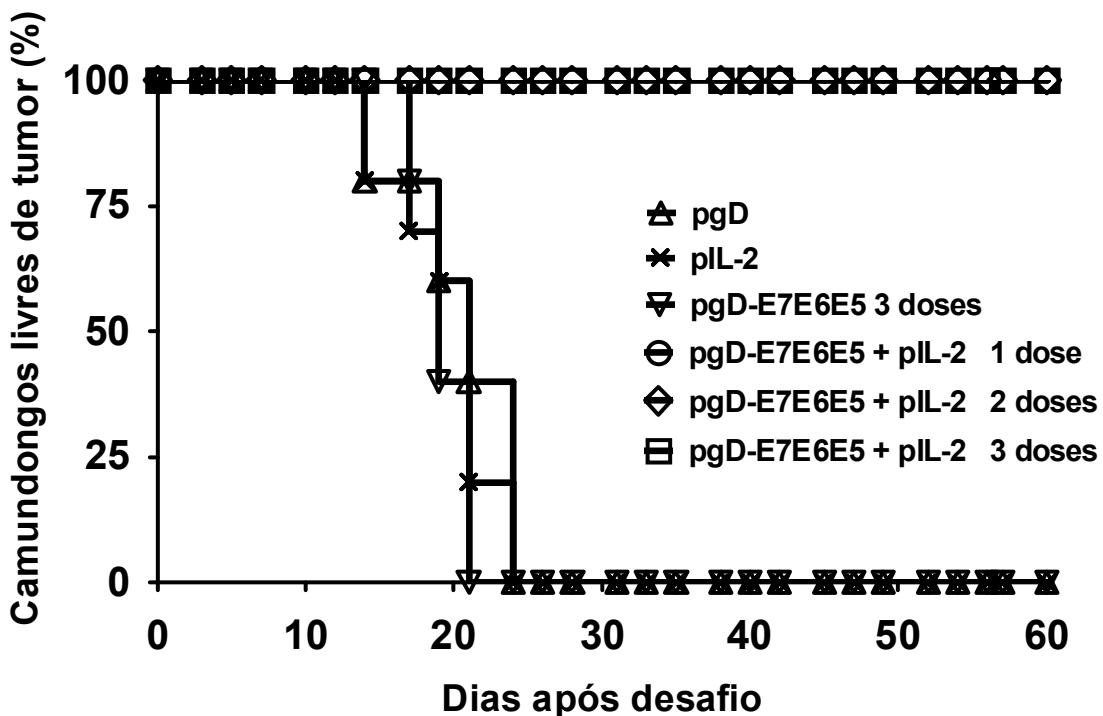


Figura 5 - Ensaio de proteção terapêutica em camundongos C57BL/6 desafiados com células TC-1 e imunizados com a vacina pgD-E7E6E5 co-administrada ao plasmídeo que expressa a citocina IL-2, utilizando diferentes números de doses. Os animais foram imunizados com três doses de 100 µg de pgD, pIL-2, ou pgD-E7E6E5, ou com 1, 2 ou 3 doses de 100 µg de pIL-2 misturado a 100 µg do vetor pgD-E7E6E5 pela via intramuscular. Os protocolos vacinais tiveram início no mesmo dia do desafio, que foi feito através da inoculação por via subcutânea de $7,5 \times 10^4$ células TC-1 por animal.

Modificando-se então o protocolo vacinal para a imunização em dose única, realizamos ensaios de proteção terapêutica tentando reduzir a quantidade de DNA empregada de 100 µg DNA/dose. Para isso, imunizamos camundongos com 10, 25, 50 ou 100 µg de DNA de cada plasmídeo da combinação vacinal pgD-E7E6E5 e pIL-2 pela via intramuscular. Camundongos inoculados com 10 µg de cada plasmídeo não foram capazes de desenvolver resposta protetora contra tumores. Grupos de camundongos imunizados com 25µg e 50µg de DNA de cada plasmídeo apresentaram, respectivamente, 70% e 100% de animais livres de tumores (Figura 6).

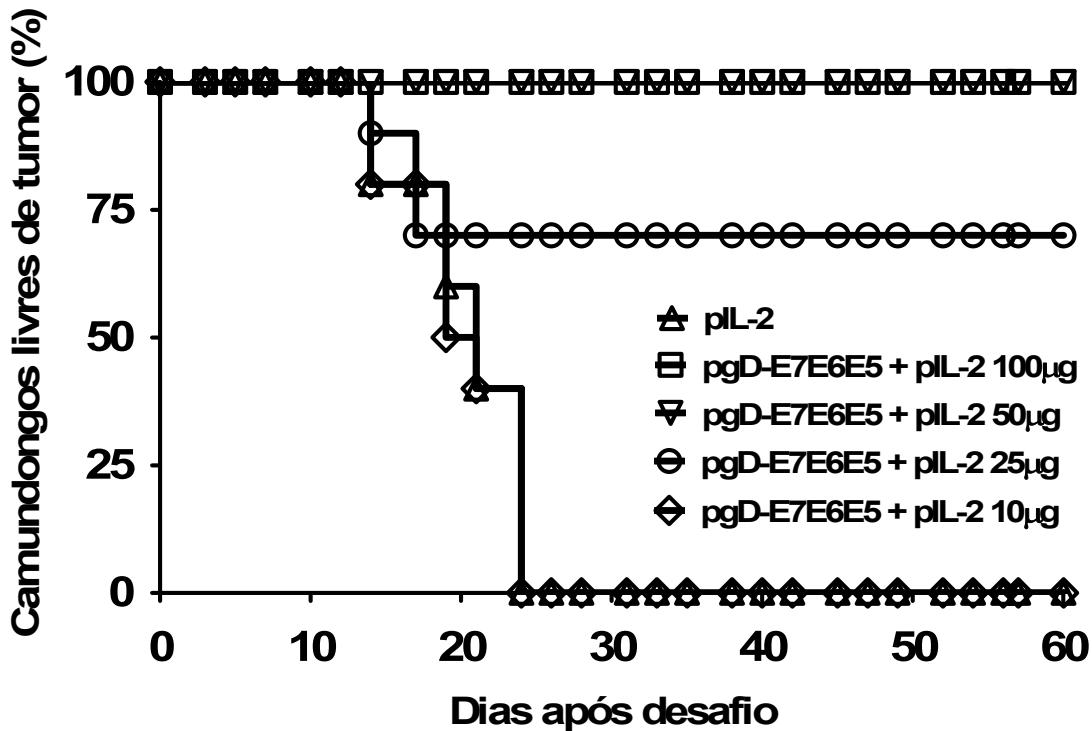


Figura 6 - Ensaio de proteção terapêutica em camundongos C57BL/6 desafiados com células TC-1 e imunizados com a vacina pgD-E7E6E5 co-administrada ao plasmídeo que expressa a citocina IL-2, utilizando diferentes quantidades de DNA por dose. Os animais foram imunizados com uma dose de 100 µg de pIL-2 ou uma dose de 100µg, 50µg, 25µg ou 10µg de pgD-E7E6E5 misturado a mesma quantidade de pIL-2 pela via intramuscular. Os protocolos vacinais tiveram início no mesmo dia do desafio, que foi feito através da inoculação por via subcutânea de $7,5 \times 10^4$ células TC-1 por animal.

Uma redução de maior impacto na quantidade de DNA/dose poderia ser atingida através da inoculação do plasmídeo vacinal pela via intradérmica de imunização, utilizando o método da biobalística. Para avaliar os efeitos dessa via de administração na inoculação da combinação vacinal pgD-E7E6E5 e pIL-2 em regime de dose única, realizamos ensaios para avaliação de efeito anti-tumoral terapêutico reduzindo a quantidade de DNA empregada na imunização para 1 µg de cada plasmídeo. No experimento realizado, a imunização pela via intradérmica com 1 µg de pgD-E7E6E5 combinado a 1 µg de pIL-2 gerou uma proteção terapêutica de 60%, que, apesar de significativa em relação à proteção gerada pela imunização

com pgD-E7E6E5 sozinho (0%), se mostrou inferior à proteção obtida pela via intramuscular, considerando-se regimes de dose única (Figura 7).

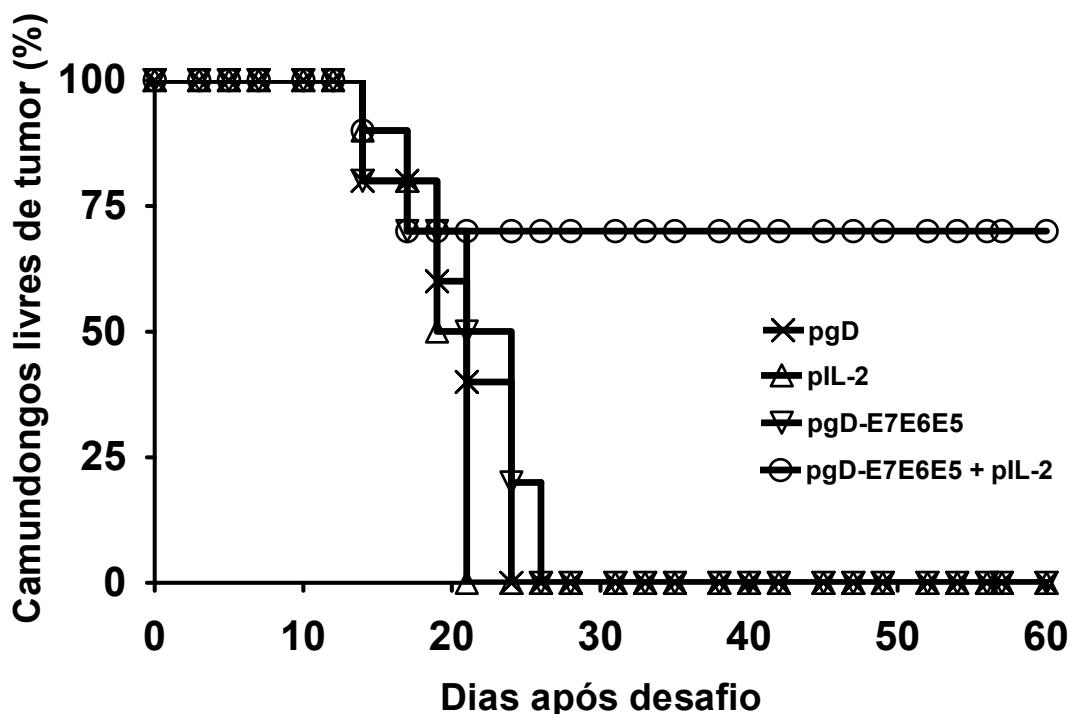


Figura 7 - Ensaio de proteção terapêutica em camundongos C57BL/6 desafiados com células TC-1 e imunizados com a vacina pgD-E7E6E5 co-administrada ao plasmídeo que expressa a citocina IL-2 pelo método da biobalística. Os animais foram imunizados com uma dose de 1 µg de pIL-2, pgDE7, pgD-E7E6E5 ou 1 µg de pIL-2 misturado a 1 µg de pgD-E7E6E5 pela via intradérmica através do uso do gene gun. Os protocolos vacinais tiveram início no mesmo dia do desafio, que foi feito através da inoculação por via subcutânea de $7,5 \times 10^4$ células TC-1 por animal.

Evidências obtidas em experimentos anteriores sugerem que o principal efeito protetor gerado pela vacina de DNA pgD-E7E6E5 ocorre, principalmente, devido a uma resposta de células T CD8⁺ específicas contra a proteína E7. Utilizamos o vetor que expressa apenas a proteína E7 do HPV-16 fusionada à gD (pgDE7) em combinação com o vetor que expressa a IL-2 para comparar os possíveis efeitos anti-tumorais gerados, com aqueles obtidos com a combinação pgD-E7E6E5 e pIL-2. Camundongos foram imunizados com 10, 25, 50 ou 100 µg de DNA de cada plasmídeo da combinação de pgDE7 e pIL-2 pela via intramuscular. Semelhante aos efeitos obtidos pela combinação vacinal pgD-E7E6E5 e pIL-2, a combinação de 10

μg de pgDE7 e pIL-2 não foi capaz de desenvolver resposta protetora contra tumores, entretanto a administração de 25 μg induziu proteção terapêutica de 80%. Quando 50 μg ou 100 μg de cada plasmídeo foram inoculados, 100% dos camundongos mantiveram-se livres de tumores (Figura 8).

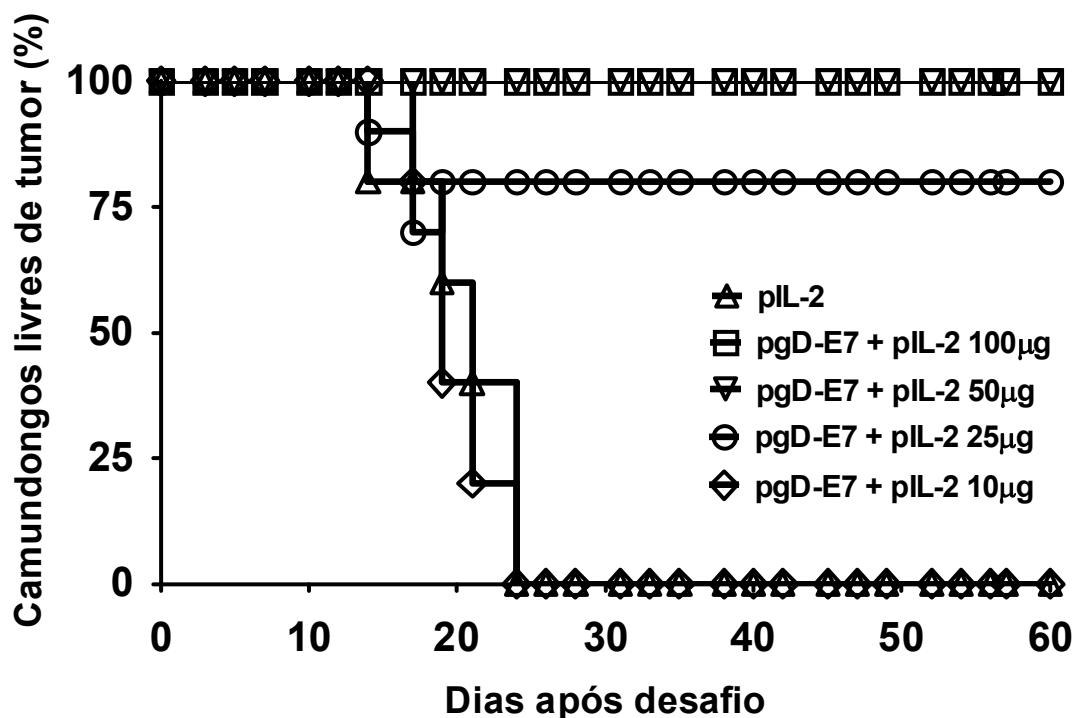


Figura 8 - Ensaio de proteção terapêutica de camundongos C57BL/6 desafiados com células TC-1 e imunizados com a vacina pgDE7 co-administrada ao plasmídeo que expressa a citocina IL-2 com diferentes quantidades de DNA por dose. Os animais foram imunizados com uma dose de 100 μg de pIL-2 ou uma dose de 100 μg , 50 μg , 25 μg ou 10 μg de pgDE7 misturado a mesma quantidade de pIL-2 pela via intramuscular. Os protocolos vacinais tiveram início no mesmo dia do desafio, que foi feito através da inoculação por via subcutânea de $7,5 \times 10^4$ células TC-1 por animal.

Por ter apresentado efeitos antitumorais semelhantes aos gerados pelo plasmídeo pgD-E7E6E5 na combinação vacinal com pIL-2, seguimos os estudos de avaliação da resposta protetora, com o vetor pgDE7 em combinação com o plasmídeo pIL-2. Além disso, através dos estudos acima descritos, estabelecemos um protocolo de imunização fixado em uma dose única de 50 μg de DNA de cada plasmídeo da combinação vacinal pgDE7 e pIL-2 administrada pela via intramuscular, representando as condições otimizadas para manter 100% de

camundongos livres de tumores no ensaio de proteção antitumoral terapêutico com a inoculação de $7,5 \times 10^4$ células TC-1 por animal.

Avaliação do espaçamento temporal entre o desafio com células TC-1 e a administração da combinação vacinal pgDE7 e pIL-2

Como tentativa de iniciar o tratamento com a combinação vacinal mais tarde apesar da inoculação das células TC-1, mas mantendo a eficácia encontrada quando o tratamento é iniciado no mesmo dia do desafio, imunizamos animais com 50 µg de cada plasmídeo da combinação vacinal pgDE7 e pIL-2, 0, 3, 7, 10 ou 14 dias após a inoculação das células TC-1. Os animais imunizados 10 e 7 dias após o desafio apresentaram proteção terapêutica de 40% e 60%, respectivamente (figura 9). Os animais que receberam a combinação vacinal 3 dias após o desafio, mantiveram-se totalmente livres de tumores, da mesma forma que os animais imunizados no mesmo dia do desafio (dia 0) (Figura 9). Os animais vacinados 14 dias após a inoculação de células TC-1 não apresentaram resposta terapêutica protetora.

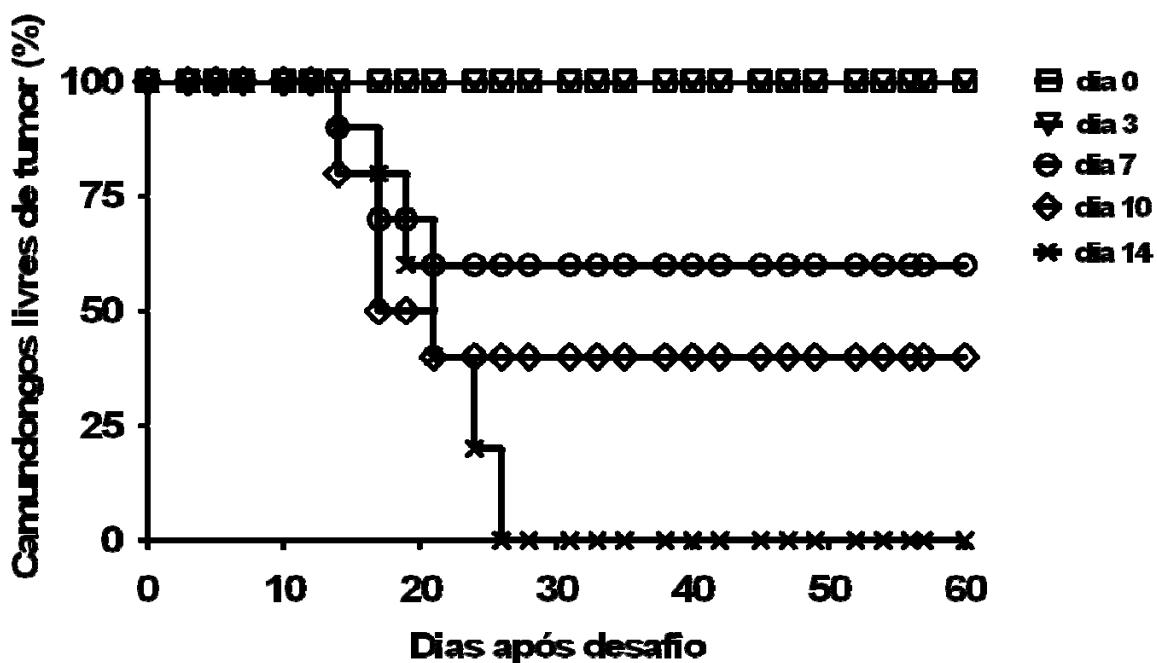


Figura 9 - Ensaio de proteção terapêutica de camundongos C57BL/6 desafiados com células TC-1 e imunizados com a vacina pgDE7 co-administrada ao plasmídeo que expressa a citocina IL-2 em diferentes períodos de tempo após o desafio. Os animais foram imunizados com uma dose de 50 µg de pIL-2 no mesmo dia do desafio ou com uma dose de 50 µg de pgDE7 misturado a 50 µg de pIL-2 pela via intramuscular no mesmo dia do desafio (dia 0), 3, 7 ou 10 dias após o desafio que foi feito através da inoculação por via subcutânea de $7,5 \times 10^4$ células TC-1 por animal.

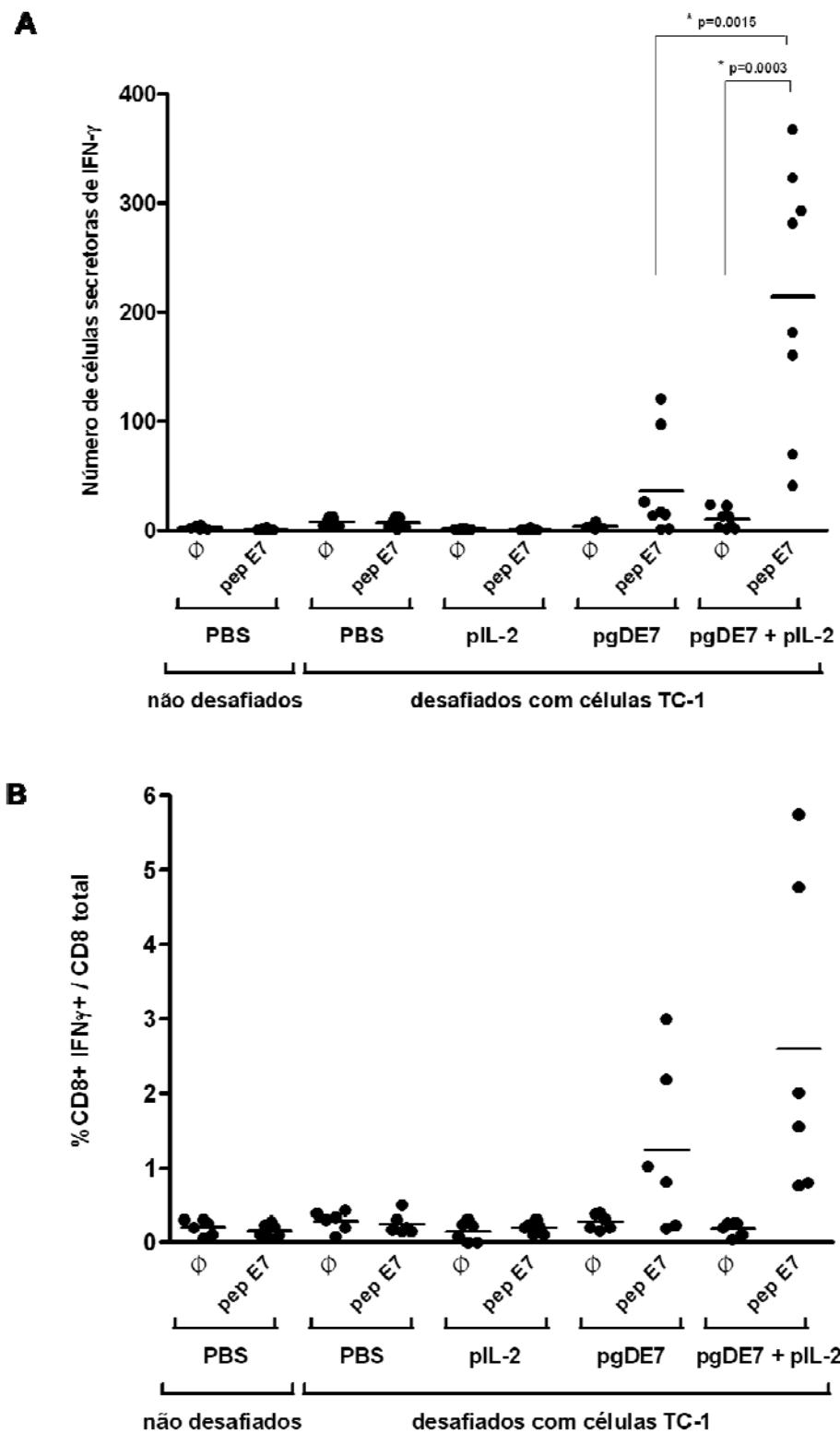
Avaliação da resposta celular gerada pela combinação vacinal pgDE7 e pIL-2

A avaliação da resposta celular gerada pela combinação vacinal foi realizada seguindo o protocolo de imunização otimizado, gerado a partir dos ensaios anteriormente apresentados. Para esses experimentos, os camundongos foram imunizados com uma dose única de 50 µg de DNA de cada plasmídeo da combinação vacinal pgDE7 e pIL-2 pela via intramuscular, misturados e distribuídos nas duas patas dos camundongos, 3 dias após o desafio com as células TC-1. As análises abaixo apresentadas foram realizadas 14 dias após a administração da combinação vacinal.

A ativação de células T CD8⁺ pode ser associada à produção de IFN-γ por estas células. A detecção da capacidade da combinação vacinal pgDE7 e pIL-2 em ativar células T CD8⁺, no contexto do modelo de desafio de proteção terapêutica, foi

confirmada por ELISPOT e por marcação intracelular de IFN- γ após estímulo *in vitro* de células do baço ou sangue dos camundongos imunizados com peptídeo de E7 MHC-I restrito (E7₄₉₋₅₇). Ambos os ensaios permitem detectar o número de células produtoras de IFN- γ . Especificamente, o ELISPOT permite detectar IFN- γ secretado pelas células após estímulo, e a marcação intracelular de IFN- γ , permite a detecção de células produtoras de IFN- γ em células CD8⁺ estimuladas com peptídeo específico que tiveram sua via de secreção bloqueada. Os resultados obtidos nesses dois ensaios demonstram que uma dose dos vetores pgDE7 e pIL-2 é capaz de gerar produção significativa de IFN- γ em camundongos previamente desafiados com as células TC-1 (Figura 10).

Figura 10 - Análise de células produtoras de IFN- γ mediante estímulo *in vitro* com peptídeo específico de E7. Camundongos C57BL/6 foram previamente desafiados com $7,5 \times 10^4$ células TC-1 por animal e imunizados, 3 dias após, com uma dose de 50 μg de pIL-2, pgDE7 ou 50 μg de pgDE7 misturado a 50 μg de pIL-2 pela via intramuscular. A análise de produção de IFN- γ foi feita 14 dias após a imunização em células de baço por ELISPOT (A) e em células de sangue por citometria de fluxo (B). As células do baço ou sangue desses camundongos foram estimuladas com um peptídeo de E7 restrito a MHC classe I (RAHYNIVTF). (*) Diferença estatística significativa ($p < 0.0001$).



O número de células T CD8⁺ capazes de reconhecer o peptídeo de E7 MHC classe I restrito foi mensurado após a marcação de células do sangue com um tetrâmero de moléculas MHC classe I conjugados com a seqüência do peptídeo de E7 e marcado com fluoróforo. A imunização com a combinação vacinal pgDE7 e pIL-2 gerou uma porcentagem maior de células T CD8⁺ E7 específicas (3,65%), estatisticamente significativa, tanto em comparação com a imunização com os vetores controle pIL-2 e pgD, como com o vetor pgDE7 sozinho (Figura 11).

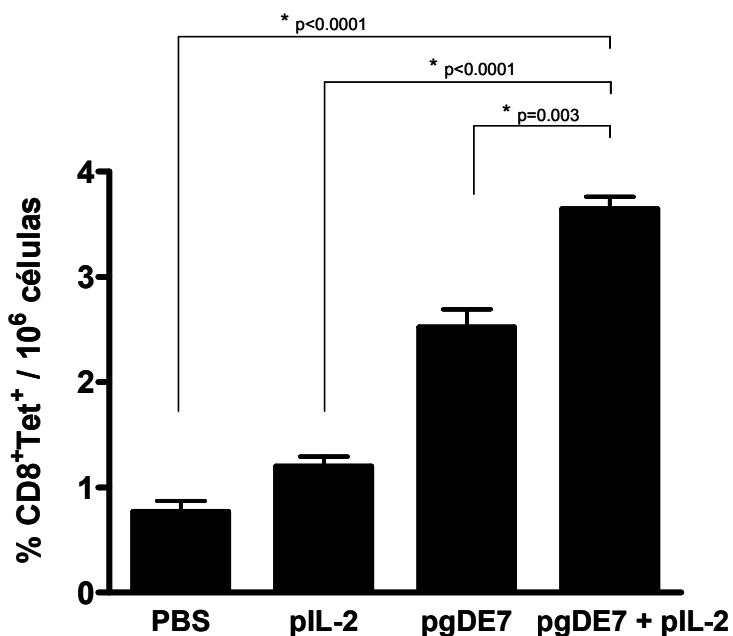


Figura 11 - Análise de células T CD8⁺ E7-específicas em camundongos imunizados. Camundongos C57BL/6 foram previamente desafiados com $7,5 \times 10^4$ células TC-1 por animal e imunizados 3 dias após com uma dose de 50 µg de pIL-2, pgDE7 ou 50µg de pgDE7 misturado a 50 µg de pIL-2 pela via intramuscular. A análise de células T CD8⁺ E7-específicas foi feita 14 dias após a imunização em células do sangue detectadas através de marcação com anticorpo anti-CD8⁺ conjugado com FITC e tetrâmero MHC classe I carregando o peptídeo de E7 RAHYNIVTF marcado com APC. (*) Diferença estatística significativa ($p < 0.0001$).

Um tratamento efetivo contra tumores deve ser capaz de promover ou aumentar a migração de linfócitos T CD8⁺ para o local do tumor. Desta forma, analisamos a presença de células T CD8⁺ totais, e capazes de reconhecer o tetrâmero marcado com peptídeo específico de E7, no tumor dos camundongos desafiados. Verificamos que a combinação vacinal pgDE7 e pIL-2 é capaz de gerar

um aumento de cerca de duas vezes em relação ao vetor vacinal pgDE7, tanto na porcentagem de células T CD8⁺ totais, como E7-específicas (Figura 12).

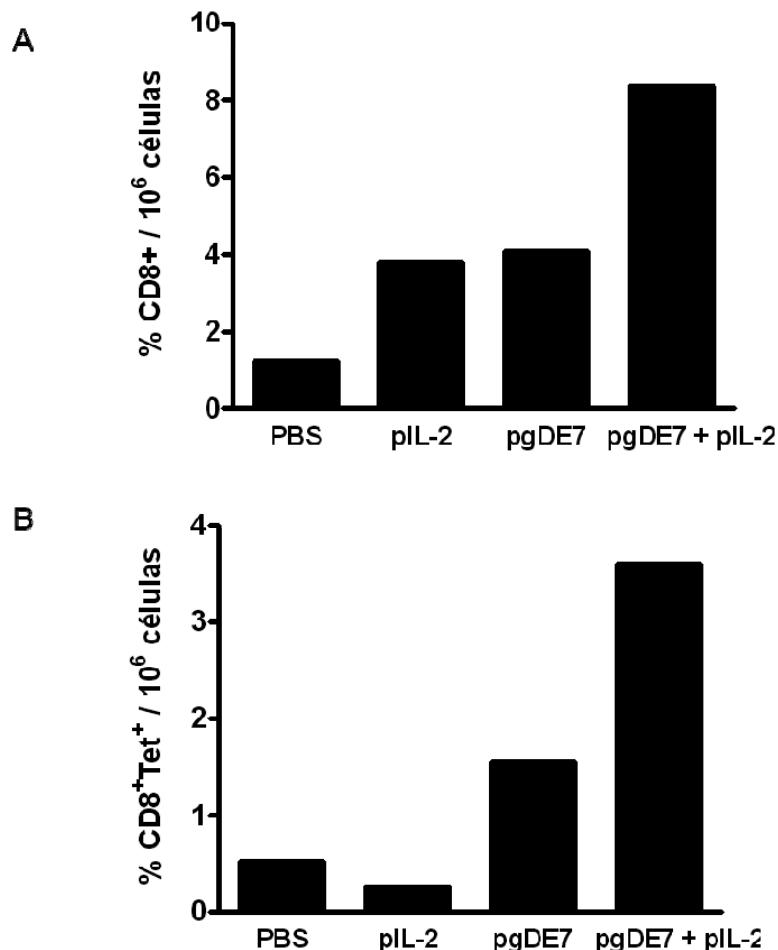


Figura 12 - Células T CD8⁺ infiltrantes em tumores formados por células TC-1 em camundongos imunizados. Os camundongos foram desafiados com $7,5 \times 10^4$ células TC-1 em 500 μL de Matrigel e imunizados 3 dias após com uma dose de 50 μg de pIL-2, pgDE7 ou 50 μg de pgDE7 misturado a 50 μg de pIL-2 pela via intramuscular. As células tumorais foram processadas 14 dias após a imunização e as células infiltrantes foram determinadas por citometria de fluxo. (A) Células T CD8⁺ infiltradas no tumor detectadas através de marcação com anticorpo anti-CD8⁺ conjugado com FITC. (B) Células T CD8⁺ E7 específicas infiltradas no tumor detectadas através de marcação com anticorpo anti-CD8⁺ conjugado com FITC T e tetrâmero MHC classe I carregando o peptídeo de E7 RAHYNIVTF.

Confirmada a ativação de células T CD8⁺ e a migração desses linfócitos para o sítio tumoral após a imunização com pgDE7 e pIL-2, avaliamos a capacidade funcional efetora dessas células em ensaio de citotoxicidade *in vivo*. Nesse experimento, 14 dias após a dose vacinal, os camundongos imunizados recebem células alvo incubadas com o peptídeo E7₄₉₋₅₇ e marcadas com uma concentração alta de CFSE e células marcadas com uma concentração menor de CFSE não pulsadas com peptídeo. No dia seguinte, os baços dos camundongos imunizados foram processados e analisados por citometria de fluxo. A diminuição da população marcada com a concentração mais alta de CFSE, em relação à população marcada com a concentração menor, indica a atividade citolítica dos linfócitos T CD8⁺ específicos a E7. Os resultados desse ensaio indicaram que a combinação vacinal pgDE7 e pIL-2 foi capaz de gerar alta atividade citolítica nos camundongos, estatisticamente significativa em relação à imunização com os vetores controles ou o vetor pgDE7 (Figura 13).

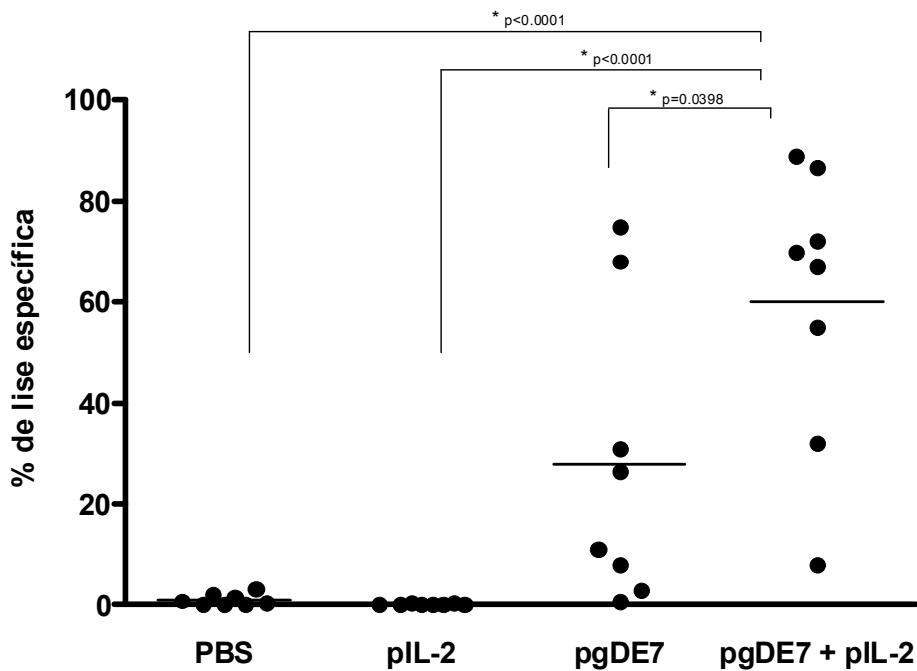


Figura 13 - Resposta de citotoxicidade *in vivo* em camundongos imunizados com pgDE7 combinado a pIL-2. Camundongos C57BL/6 foram previamente desafiados com $7,5 \times 10^4$ células TC-1 por animal e imunizados 3 dias após com uma dose de 50 µg de pIL-2, pgDE7 ou 50 µg de pgDE7 misturado a 50 µg de pIL-2 pela via intramuscular. Quatorze dias após a imunização, os camundongos vacinados receberam esplenócitos pulsados com os peptídeos específicos para células T CD8⁺ E7 e marcados com 5 µM de CSFE, além de esplenócitos marcados com 0.5 µM CSFE, mas sem exposição ao peptídeo alvo. Um dia após, os esplenócitos dos camundongos vacinados foram processados e monitorados por citometria de fluxo. (*) Diferença estatística significativa ($p < 0.0001$).

4.4.2 Discussão do capítulo IV

A utilização de vacinas de DNA em humanos se mostrou segura, porém não eficaz na indução de respostas imunes potentes. Essa dificuldade em reproduzir em ensaios clínicos, os resultados obtidos na experimentação em modelo animal, causou desapontamento em relação às vacinas de DNA, mas ao mesmo tempo, incentivou a pesquisa de estratégias que visam aumentar a imunogenecidade dessas vacinas. Neste quarto capítulo da seção de resultados, praticamos a inoculação de plasmídeos que codificam citocinas, em combinação com os vetores vacinais, como medida para aumentar o efeito protetor antitumoral terapêutico gerado pelas vacinas de DNA pgDE7 e pgD-E7E6E5.

A co-administração de plasmídeos que codificam as citocinas IL-2, IL-12 ou GM-CSF elevaram a proteção obtida com os plasmídeos pgD-E7E6E5 ou pgDE7 para 100% de camundongos livres de tumor em animais previamente desfiados com células TC-1. As três citocinas empregadas contribuíram para potencializar a indução de um efeito antitumoral terapêutico eficiente, embora por meio de mecanismos diferentes. O papel da citocina IL-12 no aumento do efeito protetor da vacina pgD-E7E6E5, pode ser relacionado à indução de produção de IFN- γ e ao favorecimento de indução de respostas Th1, mais adequadas para o controle de tumores (HSIEH et al., 1993; MANETTI et al., 1993; TRINCHIERI e GEROZA, 1996; TSUNG et al., 1997). Essa habilidade de IL-12 foi descrita em estudos de vacinas contra HIV (KIM et al., 1997; GHERARDI et al., 1999) e tumores induzidos por HPV-16 (BERMÚDEZ-HUMARÁN et al., 2005; JIN et al., 2005; RIEZEBOS-BRILMAN et al., 2009). A citocina GM-CSF favorece a ativação de APCs, com isso, em conjunto com as vacinas de DNA, pode aumentar a apresentação抗原的 (JONES; STERN; LIN, 1994; TOUBAJI et al., 2007). O potencial adjuvante de GM-CSF foi observado em diversos modelos animais (AHLERS et al., 1997; OKADA et al., 1997; KUSAKABE et al., 2000; NEMECKOVA et al., 2007; LOUDON et al., 2010).

Em nossos estudos, exploramos mais extensamente o papel da co-expressão da citocina IL-2 com nossas vacinas de DNA. A administração de pgDE7 combinada ao plasmídeo pIL-2 promoveu acentuada ativação de células T CD8 $^{+}$ E7-específicas, elevada atividade citotóxica contra epitopos de E7 e aumentou a infiltração de células T CD8 $^{+}$ totais e E7-específicas no sítio tumoral, compondo uma resposta

celular eficaz, capaz de combater tumores formados pelas células TC-1. Os efeitos mais pronunciados na resposta celular obtidos pela co-administração do plasmídeo que codifica a IL-2, condizem com os efeitos que essa citocina é capaz de induzir, entre eles a proliferação clonal de células T (WALDMANN, 2006). Resultados semelhantes foram gerados em trabalhos que utilizam plasmídeos que codificam a IL-2 como componente de uma formulação vacinal contra o herpes bovino tipo I (KUHNLE et al., 1996), Vírus de hepatite C (GEISSLER et al., 1997) e B (CHOW et al., 1998), Vírus da imunodeficiência adquirida humana (MOORE et al., 2002) e tumores que expressam o HER2/Neu (LIN et al., 2004).

Como desdobramento dos estudos de co-administração de citocinas, desenvolvemos um protocolo de imunização otimizado buscando reduzir o número de doses da combinação vacinal e da quantidade de DNA por dose, mas mantendo o efeito protetor terapêutico máximo. Nesse sentido, observamos que a administração, três dias após o desafio com células TC-1, de uma dose de 50 µg de DNA do vetor pgDE7 combinado a 50 µg de DNA do plasmídeo que codifica a citocina IL-2 foi capaz de prevenir o desenvolvimento de tumores em todos os camundongos vacinados. A redução da quantidade de DNA empregada nas imunizações tem como o objetivo, além de gerar um protocolo vacinal simplificado, reduzir os custos da vacina almejando a realização de ensaios clínicos e a viabilização da vacina como um produto acessível.

A utilização da via intradérmica de imunização, através do método da biobalística, pode contribuir de forma mais expressiva com a redução da quantidade de DNA necessária para a indução do efeito antitumoral. Anteriormente, a imunização com 3 doses de 2 µg da vacina pgD-E7E6E5, pela via intradérmica, gerou ativação de células T CD8⁺ E7-específicas e resposta terapêutica contra tumores formados por células TC-1 comparáveis aos obtidos através da imunização pela via intramuscular, utilizando 100 µg de DNA. Essa maior eficiência na geração de resposta, aumentada em cerca de 50 vezes, foi atribuída à capacidade da imunização pela via intradérmica em transfectar um maior número de APCs, presentes em maior quantidade nesse sítio de inoculação (CONDON et al., 1996; PORGADOR et al., 1998).

Considerando-se os efeitos antitumorais terapêuticos gerados pela imunização combinada das vacinas pgDE7 ou pgD-E7E6E5 com plasmídeos que

expressam citocinas, a inoculação pela via intradérmica (1 µg de cada plasmídeo) apresentou resultados inferiores aos obtidos pela via intramuscular (50 µg de cada plasmídeo), em regime de dose única. A vantagem apresentada pela via intradérmica em transfectar maior quantidade de APCs é importante para os plasmídeos codificadores de抗ígenos, mas não necessariamente para plasmídeos que codificam citocinas. Outras populações celulares podem expressar as citocinas codificadas, mas a apresentação eficiente dos抗ígenos necessariamente deve ser feita por APCs (TAKASHIMA e MORITA, 1999; KASINRERK; MOONSOM; CHAWANSUNTATI, 2002), seja por tranfecção direta, como favorecida pela via intradérmica, ou por mecanismos de apresentação cruzada (do inglês, *cross-priming*) relacionados à via intramuscular (BOYLE; KONIARAS; LEW, 1997).

A quantidade de DNA por dose não poderia ser aumentada utilizando a via intradérmica de imunização, pois utilizando o método da biobalística, a quantidade de DNA por dose é limitada pela capacidade das micropartículas de ouro presentes nas balas em ligar DNA. Outros métodos de entrega poderiam contribuir para a geração de uma resposta imune máxima, mas utilizando a menor quantidade possível de DNA, como a eletroporação *in vivo*, que é capaz de aumentar a eficiência de tranfecção de células no tecido muscular em cerca de 100 vezes (WIDERA et al., 2000; OTTEN et al., 2004, 2006). Em resumo, a utilização de plasmídeos que codificam as citocinas IL-2, IL-12 ou GM-CSF foi capaz de potencializar os efeitos terapêuticos dos plasmídeos vacinais pgDE7 e pgD-E7E6E5 e representa uma importante contribuição para o futuro uso desses plasmídeos em ensaios clínicos.

4.5 Capítulo V

4.5.1 Descrição dos resultados

Avaliação do efeito anti-tumoral terapêutico gerado por um plasmídeo que codifica para a proteína E7 do HPV-16 fusionada à proteína gD do HSV-1, com códons otimizados para o sistema de expressão humano, combinado ao plasmídeo que expressa a citocina IL-2

Diversos estudos clínicos utilizando vacinas de DNA fracassaram por não reproduzirem os efeitos imunológicos encontrados em camundongos, ou mesmo em primatas não humanos. Embora tais ensaios contribuam para a confirmação da segurança das vacinas de DNA, evidenciam que modificações devem ser feitas nas formulações para aumentar as respostas imunológicas em humanos. Além da combinação de plasmídeos que expressam citocinas com potencial adjuvante, uma forma de aumentar a imunogenicidade das vacinas de DNA envolve mudanças nos códons do gene alvo, visando um aumento na eficiência da expressão do antígeno no sistema humano. Neste último capítulo, apresentamos os primeiros resultados gerados através da imunização com um plasmídeo que codifica para a proteína E7 do HPV-16 fusionada à gD do HSV-1 contendo códons otimizados para a expressão em células humanas (pgDE7h) combinado ao plasmídeo que expressa a citocina IL-2.

Para avaliar o possível aumento na eficácia da vacina gerada pela otimização de códons, realizamos um ensaio de proteção terapêutica à formação de tumores em camundongos desafiados com $7,5 \times 10^4$ células TC-1 por animal. Três dias após o desafio, grupos de 10 camundongos foram imunizados com 50 µg de pIL-2 ou 5, 10, 25 ou 50 µg do vetor pgDE7h sozinho ou somado a quantidades iguais do plasmídeo pIL-2, em regime de dose única. Quando administrado isoladamente, o vetor pgDE7h foi capaz de proteger todos os animais inoculados com as células tumorais na concentração de 50 µg DNA (Figura 14A). Na concentração de 25 µg apenas 40% dos camundongos tratados ficaram livres de tumores. A administração de 10 ou 5 µg do plasmídeo pgDE7h não foi capaz de manter camundongos livres de tumor. Os resultados indicam que o vetor pgDE7h apresenta efeito anti-tumoral aumentado em relação ao vetor pgDE7 mesmo quando administrado sem o vetor pIL-2. A

composição imunogênica pgDE7h e pIL-2 foi capaz de proteger todos os camundongos do desenvolvimento de tumores quando administrada nas quantidades de 50, 25 e 10 µg de DNA (Figura 14B). Quando administrada na concentração de 5 µg a composição imunogênica pgDE7h e pIL-2 foi capaz de proteger 80% dos animais contra o desenvolvimento de tumores (Figura 14B).

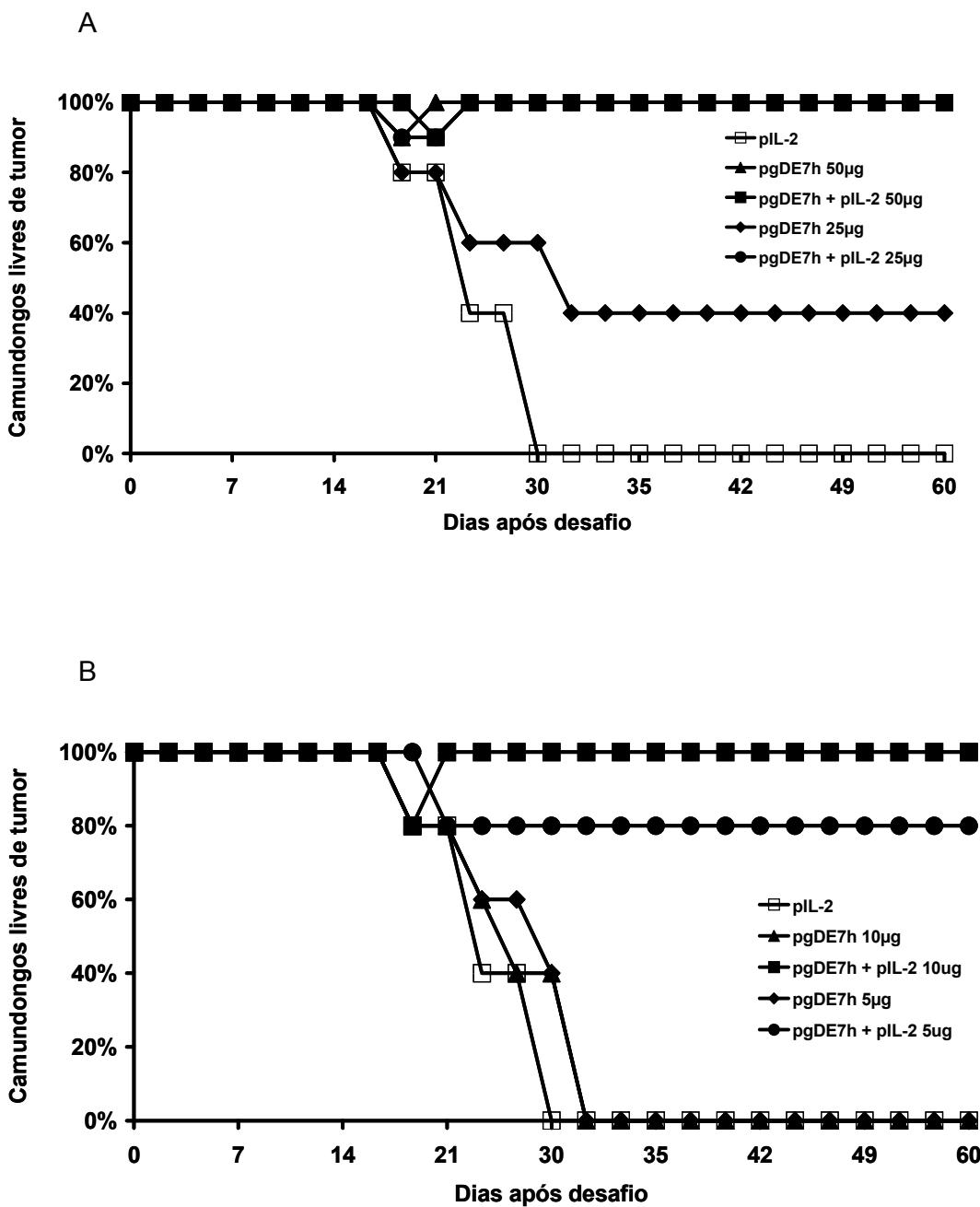


Figura 14 - Ensaio de proteção terapêutica de camundongos C57BL/6 desafiados com células TC-1 e imunizados com a vacina pgDE7h co-administrada ao plasmídeo que expressa a citocina IL-2 utilizando diferentes quantidades de DNA. Os animais foram imunizados com uma dose de 50 µg do vetor pIL-2, ou 5, 10, 25 ou 50 µg do vetor pgDE7h sozinho ou somado a quantidades iguais do plasmídeo pIL-2. A imunização em dose única foi realizada três dias após o desafio feito através da inoculação por via subcutânea de $7,5 \times 10^4$ células TC-1 por animal.

4.5.2 Discussão do capítulo V

Para aumentar a imunogenecidade da vacina de DNA em estudo, visando maiores chances de geração de respostas significativas em futuros testes clínicos, realizamos a otimização de códons da seqüência de DNA codificadora da proteína antigênica do vetor pgDE7. Essa medida mostrou-se eficiente para aumentar a expressão da proteína antigênica codificada por vacinas de DNA (GUSTAFSSON; GOVINDARAJAN; MINSHULL, 2004) e, consequentemente, a resposta imune gerada nos indivíduos vacinados (YAN et al., 2007).

Neste último capítulo da seção de resultados da tese demonstramos que a adequação de códons ao sistema de expressão humano possibilitou uma redução de 5 vezes na quantidade de DNA da combinação vacinal pgDE7 e pIL-2. A administração intramuscular de apenas 10 µg de cada plasmídeo foi capaz de gerar 100% de proteção antitumoral terapêutica. Além disso, o plasmídeo humanizado (pgDE7h) sozinho foi capaz de induzir resposta terapêutica total com a administração de 50 µg de DNA em dose única, o que não foi verificado com os plasmídeos pgDE7 e pgD-E7E6E5, mesmo após a administração intramuscular de 3 doses de 100 µg de DNA, comprovando a eficiência da estratégia de modificação dos códons para aumento de expressão em células de mamíferos. Os resultados apresentados demonstram que a otimização de códons é uma estratégia capaz de potencializar o efeito terapêutico da vacina de pgDE7, contribuindo para a viabilização da vacina para uso em ensaios clínicos.

5 DISCUSSÃO FINAL

Na presente tese de doutoramento, apresentamos a evolução de um conceito de desenvolvimento de uma nova estratégia para o controle vacinal de tumores associados ao HPV-16 que empregou vacinas de DNA que codificam proteínas do HPV-16 geneticamente fusionadas à gD do HSV-1. Os resultados mostrados englobam a concepção das formulações vacinais, prova de conceito até modificações realizadas ao longo do trabalho visando aprimorar e adequar uma formulação passível de ser submetida a ensaios clínicos. O trabalho realizado durante o período do doutoramento derivou-se de estudos anteriores realizados no nosso laboratório dos quais tive a oportunidade de participar. Desta forma, anexamos os resultados obtidos e publicados com o título “Anti-tumor DNA vaccines based on the expression of human papillomavirus-16 E6/E7 oncoproteins genetically fused with the glycoprotein D from herpes simplex virus-1” publicado em 2005.

No artigo acima mencionado, descrevemos a primeira versão da vacina de DNA contra tumores causados por HPV-16 que emprega a expressão da xinproteína E7 fusionada à porção C-terminal da proteína gD do HSV-1 (pgDE7). Camundongos C57BL/6 que receberam quatro doses da vacina pgDE7 pela via intramuscular (100 μ g de DNA/dose) mostraram uma significativa ativação de células T CD8 $^{+}$ E7-específicas, efeito protetor profilático completo e 40% de efeito antitumoral terapêutico no desafio com as células tumorais TC-1 (LASARO et al., 2005).

A estratégia vacinal desenvolvida pelo nosso grupo emprega a fusão de proteínas do HPV-16 à proteína gD do HSV-1 para ativar uma resposta imune eficaz contra tumores induzidos por HPV-16. Conhecidamente, a proteção a tumores induzidos por células TC-1 em camundongos C57BL/6 está relacionada à indução de células T CD8+ citotóxicas capazes de reconhecer um epitopo imunodominante na proteína E7 que se associa a moléculas de MHC classe I do haplótipo H-2Kb (HE et al., 2000; FELTKAMP et al., 1993; LAMIKANRA et al., 2001; MICHEL et al., 2002; VIERBOOM et al., 1998). Entretanto, vacinas de DNA baseadas apenas na expressão de proteínas do HPV-16 são ineficientes na indução de células T CD8 $^{+}$ específicas e efeito antitumoral em experimentos em modelo murino. Diante disso, diversos grupos de pesquisa desenvolvem estratégias vacinais visando elevar a imunogenecidade das oncoproteínas do HPV-16, aumentando a eficiência da apresentação dos抗ígenos via MHC de classe I ou II. Entre as estratégias experimentais em desenvolvimento, podemos citar a fusão de E7 de HPV-16 a CRT

(calreticulina) (CHENG et al., 2001), a HSP70 de *Mycobacterium tuberculosis* (CHEN et al., 2000), a toxina ETA(dII) de *Pseudomonas aeruginosa* (HUNG et al., 2001), a ubiquitina (HUNG et al., 2007), a cadeia não variável associada a MHC classe II (RODRIGUEZ et al., 1998) e a proteína LAMP-1 (proteína de membrana associada ao lisossomo) (JI et al., 1999).

Observações prévias do nosso grupo demonstraram que a incorporação de抗ígenos próximos à região C-terminal da gD aumentam a resposta de células T e B geradas pela formulação vacinal (ALVES et al., 1999; LASARO et al., 2005). O papel adjuvante da gD a抗ígenos fusionados é dependente da ligação de gD com o receptor HVEM, uma vez que esse efeito é perdido em proteínas gD com mutações que impossibilitam essa interação (LASARO et al., 2008). Evidências apontam que o aumento nas respostas de células B e T geradas pela gD pode estar relacionado ao bloqueio do mecanismo de inibição da resposta imune mediada por BTLA (atenuador de linfócitos B e T) (LASARO et al., 2008), já que a ligação da proteína gD ao receptor HVEM impede a ligação simultânea de BTLA (LASARO e ERTL, 2009). Por outro lado, a ligação de gD a HVEM não impede que LIGHT se ligue a esse receptor, e esta interação promove sinais imunomoduladores co-estimulatórios para linfócitos e células apresentadoras de抗ígenos (CROFT, 2005). Desta forma, a proteína gD estaria proporcionando indiretamente um balanço positivo de sinais co-estimulatórios desencadeados por LIGHT, uma vez que bloqueia a geração de sinais co-inibitórios por BTLA. Além disso, foi sugerido que a gD poderia estimular diretamente linfócitos e células apresentadoras de抗ígenos pela interação com HVEM levando à ativação de NF-κB (POLLARA et al., 2005; CHEUNG et al., 2009).

A presença da proteína gD nessas vacinas de DNA acarreta também na ancoragem da proteína híbrida à membrana citoplasmática das células eucarióticas transformadas (LASARO et al., 2005, 2008), uma vez que o peptídeo sinal e a região transmembrana da proteína gD são preservados nessas construções. O ancoramento da proteína híbrida à membrana das células eucarióticas expõe as proteínas do HPV-16 a células do sistema imune, além de reduzir os riscos de malignização que podem ser ocasionados por essas proteínas livres no núcleo das células. O trabalho apresentado nesta tese publicado em 2005 consolida o uso da

proteína gD como carregadora de proteínas heterólogas para o desenvolvimento de vacinas capazes de ativar resposta imune celular efetora.

Os estudos relacionados a essa primeira vacina de DNA contra tumores associados ao HPV-16 levaram à construção de uma nova versão capaz de expressar as oncoproteínas E7, E6 e E5 do vírus HPV-16 geneticamente fusionadas à proteína gD do HSV-1 (pgD-E7E6E5). Os resultados obtidos com essa construção foram reunidos no artigo apresentado na seção de resultados “*Immune responses and therapeutic anti-tumor effects of an experimental DNA vaccine encoding the human papillomavirus type-16 (HPV-16) oncoproteins genetically fused to the herpes virus glycoprotein D (gD)*” e no manuscrito intitulado “*Enhanced anti-tumor effects of a gene gun delivered DNA vaccine encoding the human papillomavirus type-16 (HPV-16) oncoproteins genetically fused to the herpes virus glycoprotein D (gD)*”. Resumidamente, demonstramos que apenas uma dose da vacina foi eficiente na geração da ativação de células T CD8⁺ E7 e induziu proteção profilática à formação de tumores gerados por células TC-1 em 100% dos camundongos. Além disso, 70% dos camundongos que receberam 3 doses da vacina foram capazes de se manter livres de tumor. Os resultados mencionados foram encontrados mediante imunizações pela via intramuscular (100 µg de DNA/dose) ou pela via intradérmica por biobalística (2 µg de DNA/dose).

Comparações entre estudos realizados com as construções pgDE7 e pgD-E7E6E5 sugerem que a construção que contém as proteínas E7, E6 e E5 ativou de forma mais eficiente células T CD8⁺ e aumentou o efeito protetor terapêutico. As evidências geradas sugerem que entre os camundongos imunizados com o plasmídeo pgD-E7E6E5 todos desenvolveram resposta citotóxica contra epitopos de E7, entretanto para epitopos de E6 e E5, respectivamente 75 e 15% dos camundongos respondem. A resposta mais sutil contra E5 deve refletir o fato desta proteína não ser expressa por células TC-1 e, desta forma, não ocorre a sensibilização dos camundongos com esse antígeno, ao contrário do que se observa em relação às proteínas E6 e E7. Por mais que as proteínas E6 e E5 exerçam efeitos diretos mais discretos sobre a ativação de células T CD8⁺ e o efeito antitumoral contra células TC-1, essas proteínas podem ser importantes para aumentar a resposta imunológica celular indiretamente, já que inserções de polipeptídeos maiores na região C-terminal da gD podem gerar alterações

conformacionais que afastam a alça formada por essa região do sítio de interação com HVEM tornando a ligação mais eficiente (LASARO et al., 2008). De forma geral, os resultados obtidos confirmam o potencial das formulações vacinais que codificam genes de HPV-16 fusionados à gD e estimulam o emprego de estratégias capazes de potencializar a imunogenecidade dessas vacinas visando futuros testes clínicos.

Mais de 20 ensaios clínicos foram conduzidos ou estão em andamento associados à pesquisa de estratégias vacinais para o controle de tumores induzidos por HPV (CID-ARREGUI, 2009). Nesses ensaios, diferentes abordagens foram aplicadas, incluindo vacinas baseadas em peptídeos (VAN DRIEL et al., 1999; MUDERSPACH et al., 2000), proteínas (GOLDSTONE et al., 2002; DE JONG et al., 2002), vetores virais ou bacterianos (KAUFMANN et al., 2002), células dendríticas (FERRARA et al., 2003; SANTIN et al., 2006) e vacinas de DNA (SHEETS et al., 2003; GARCIA et al., 2004). Apesar do grande número de estudos clínicos, nenhum candidato vacinal claro foi identificado até o momento, o que pode ser explicado pela complexidade intrínseca em se desenvolver um produto capaz de estimular o sistema imunológico a eliminar células transformadas por HPV, mas também por fatores associados à própria concepção dos testes.

A baixa correlação entre os resultados obtidos na experimentação em animais e nos ensaios clínicos ocorre provavelmente devido à maior complexidade da infecção natural, em relação aos modelos de implante tumoral. A infecção persistente por HPV de alto risco e o lento progresso através dos estágios pré-neoplásicos antes que o câncer invasivo se instale, fornecem ao vírus tempo suficiente para transpor as várias barreiras impostas pelo sistema imune do hospedeiro. Além disso, certos fatores do microambiente tumoral podem inibir a apresentação de抗ígenos e ativação de células T, e assim limitar a eficácia das vacinas terapêuticas contra tumores induzidos por HPV. Desta forma, manipular mecanismos que regulam negativamente a ativação de células T, como CTLA-4, PD-1, pode aumentar a resposta antitumoral de células T (BLANK e MACKENSEN, 2007; PEGGS et al., 2006). A estratégia vacinal desenvolvida em nosso laboratório atua também nesse sentido, já que uma das ações adjuvantes atribuídas à proteína gD é promover a inibição dos mecanismos supressores desencadeados por BTLA e CD160.

Outro fator que dificulta o sucesso em ensaios clínicos de vacinas antitumorais está relacionado ao uso das mesmas em pacientes em estágio avançado de câncer, situação mais difícil de ser controlada devido à condição imunossupressora prevalente nesses pacientes. Para a obtenção de melhores resultados com as vacinas terapêuticas, futuros ensaios clínicos devem incluir pacientes com lesões pré-cancerosas ou câncer do colo do útero em estágio precoce. Além disso, avanços podem ser atingidos na vacinação contra tumores induzidos por HPV através do uso de estratégias combinatórias, incluindo agentes imunomoduladores ou outras modalidades terapêuticas tais como a quimioradioterapia e cirurgia. Agentes quimioterápicos e radiação podem induzir a apoptose de células tumorais, promovendo a liberação de抗ígenos de HPV, que podem ser captados por APCs e então aumentar a freqüência de células T CD8 E6 e E7 específicas. Em modelo pré-clínico, baixas doses de radioterapia ou quimioterapia têm sido combinadas com vacinas de DNA para o controle de tumores capazes de expressar E6 e E7 de HPV-16 melhorando significativamente os efeitos antitumorais gerados pelas vacinas de DNA (TSENG et al., 2008, 2009).

O uso de terapias combinadas como agentes imunomoduladores, quimioterapia e radiação, contribui para o avanço das estratégias vacinais contra tumores induzidos por HPV. Dando sequência aos nossos esforços em gerar uma abordagem vacinal promissora para controlar tumores associados ao HPV, utilizamos a co-administração de plasmídeos que codificam citocinas para aumentar a eficiência dos plasmídeos vacinais e assim, torná-los mais interessantes sob a perspectiva de utilização dos mesmos em testes clínicos. Neste trabalho, a co-expressão das citocinas IL-2, IL-12 ou GM-CSF com os plasmídeos vacinais que expressam E7 ou E7, E6 e E5 de HPV-16 fusionadas à gD de HSV-1 gerou total proteção terapêutica a tumores induzidos por células TC-1. Além disso, o emprego de plasmídeos que codifica a IL-2 aumentou a resposta de células T CD8⁺ E7-específicas, bem como o efeito antitumoral. O efeito adjuvante sobre as respostas antitumorais promovidas pela co-administração de vetor que codifica IL-2 foi dependente da expressão da proteína gD na formulação, visto que o plasmídeo que expressa apenas as proteínas do HPV (pE7E6E5) não foi capaz de induzir respostas protetoras. Apesar de detectarmos diferenças na indução de células T CD8⁺ E7-específicas e efeitos tumorais em animais imunizados com os vetores pgDE7 ou

pgD-E7E6E5 sozinhos, a co-administração de plasmídeos que expressam citocinas resultou em 100% de proteção terapêutica antitumoral na combinação com as duas vacinas testadas sob as mesmas condições experimentais. Provavelmente, as diferenças de imunogenicidade dos vetores vacinais foram sobrepujadas pelo efeito adjuvante das citocinas co-expressas.

A utilização de citocinas ou plasmídeos que expressam citocinas pode ser um passo importante para a viabilização o uso clínico de vacinas de DNA. Diversas abordagens vacinais têm feito uso dessa estratégia visando aumentar a imunogenicidade das vacinas de DNA em modelos experimentais e ensaios clínicos (HEINZERLING et al., 2005; BAROUCH et al., 2002; INOUE et al., 2000; OKADA et al., 1997; XIN et al., 1998). O uso clínico de citocinas, combinado a diversos tipos de terapia, tem gerado resultados que encorajam a utilização dessas citocinas como potencializadores de respostas contra tumores em humanos (SCHEIBENBOGEN et al., 2000; YANG et al., 2003; SLINGLUFF et al., 2004; UPTON et al., 2005). O uso sistêmico de altas dosagens de citocinas pode gerar efeitos colaterais indesejáveis, mas evitar a toxicidade, preservando a efetividade desses tratamentos, pode ser conseguido com a administração de plasmídeos que expressam determinadas citocinas (CASANA; HERNANDEZ; ARANA, 2002).

Outro possível aprimoramento em vacinas de DNA, visando sua utilização em testes clínicos, é a adequação dos códons da seqüência que codifica a proteína antigênica ao sistema de expressão humano, visando otimizar a expressão da proteína nas células transfetadas (KUTZLER e WEINER, 2008). Através dessa estratégia, conseguimos aumentar a potência da vacina de DNA pgDE7 na indução de efeitos antitumorais. De fato, o plasmídeo contendo a sequência humanizada (pgDE7h) foi capaz de gerar resposta protetora terapêutica antitumoral completa, fato não observado com a vacina que transporta a seqüência nativa do gene alvo. Além disso, tal adequação resultou na redução de 5 vezes da quantidade de DNA inoculada, quando combinada com o plasmídeo que expressa IL-2.

Visando aumentar a segurança em futuros testes clínicos, mudamos o vetor de expressão utilizado na formulação vacinal, pois o mesmo possui gene que codifica resistência à ampicilina. Desta forma, substituímos os vetores inicialmente testados pelo plasmídeo pUMVC3 que contém gene de resistência à canamicina, antibiótico não utilizado no tratamento de patógenos em humanos. Além disso, outra

medida de precaução adotada foi gerar duas mutações pontuais em E7 que impedem que a mesma possa interagir com a proteína pRb. Desta forma, a proteína E7 fica impossibilitada de exercer seu potencial oncogênico sem comprometimento da antigenicidade e imunogenicidade (TRIMBLE et al., 2003). As modificações aqui apresentadas, em conjunto, contribuíram para a geração de um aumento na imunogenecidade e na segurança da nossa formulação vacinal.

Coletivamente, esses resultados demonstram que o papel da proteína gD na ativação de células T CD8⁺ específicas para os抗ígenos presentes nas proteínas de HPV-16 a ela fusionados e a co-expressão de IL-2, IL-12 ou GM-CSF apresentaram efeitos sinérgicos sobre as respostas anti-tumorais observadas. Além disso, a otimização de códons da seqüência de DNA da proteína químérica codificada pela vacina de DNA favoreceu a expressão da mesma, contribuindo ainda mais para o aumento do efeito antitumoral. Os resultados apresentados demonstram o potencial desse tratamento imunológico para o controle terapêutico de tumores induzidos por HPV e nos dão subsídios para a realização de testes clínicos com a formulação vacinal gerada.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nos permitem apontar algumas conclusões principais:

- A imunização de camundongos C57BL/6 com quatro doses da vacina de DNA pgDE7 gerou significativa ativação de células T CD8⁺ E7-específicas, proteção anti-tumoral profilática completa e 40% de proteção de proteção terapêutica a tumores formados pelas células TC-1.
- Apenas uma dose do vetor vacinal pgD-E7E6E5 foi capaz de induzir a ativação de células T CD8⁺ E7-específicas em camundongos C57BL/6 detectadas até 90 dias após a imunização, com um pico de resposta com 14 dias. Além disso, uma dose vacinal foi capaz de manter 100% dos camundongos livres do desenvolvimento de tumores no modelo de desafio profilático, no qual os animais são desafiados 14 dias após desafio. Em animais desafiados com células TC-1 100 dias após a administração de uma dose da vacina pgD-E7E6E5, verificou-se a geração de resposta anti-tumoral em 50% dos camundongos imunizados.
- Três doses da vacina pgD-E7E6E5 conferiram 70% de proteção terapêutica à formação de tumores quando inoculadas pela via intramuscular (100 µg de DNA/dose) ou pela via intradérmica (2 µg de DNA/dose). No modelo de proteção terapêutica a formação de tumores, a vacina pgD-E7E6E5 inoculada pela via intramuscular mostrou-se capaz de induzir a ativação de linfócitos T CD8⁺, degranulação e efeito citotóxico *in vivo* E6 e E7 específicos. Além disso, foi capaz de promover um aumento no número de células T CD8⁺ totais e E7 específicas infiltradas no tumor.
- Os plasmídeos que codificam as citocinas IL-2, IL-12 ou GM-CSF foram capazes de aumentar a proteção terapêutica gerada com 3 doses da vacina pgD-E7E6E5 para 100% em camundongos desafiados com $7,5 \times 10^4$ células/animal.

- Apenas uma dose da vacina pgD-E7E6E5 ou pgDE7 em combinação com pIL-2 (com 50 µg de DNA de cada plasmídeo) foi capaz de manter a proteção terapêutica de 100%. A dose vacinal pgDE7 em combinação com o vetor pIL-2 quando administrada 3 dias após o desafio com células TC-1 ainda foi capaz de manter todos os camundongos livres de tumores. A co-administração em dose única dos plasmídeos pgDE7 e pIL-2 foi capaz de gerar significativa ativação de células T CD8⁺ E7-específicas produtoras de IFN-γ alta atividade citolítica específica para o epitopo de E7 e um aumento no número de células CD8⁺ E7-específicas infiltradas no sítio tumoral.
- A imunização de camundongos C57BL/6 com plasmídeo que contém a seqüência gDE7 otimizada para o sistema de expressão humano conferiu proteção terapêutica em 100% dos camundongos previamente desafiados com células TC-1 em regime de dose única. O plasmídeo otimizado pgDE7h administrado em combinação com o plasmídeo que codifica a IL-2 foi capaz de reduzir cerca de 5 vezes a quantidade de DNA utilizada na imunização para manter 100% dos camundongos livres de tumores no modelo de proteção terapêutica.
- Como conclusão final, podemos afirmar que o trabalho realizado lançou as bases de uma nova estratégia vacinal voltada para o controle terapêutico de tumores associados ao HPV-16. A continuidade dos estudos iniciados poderá resultar na proposta de uma nova abordagem para o controle do câncer de colo de útero assim como outras formas de câncer relacionadas à infecção com HPV.

REFERÊNCIAS*

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR; 6023: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

AF GEIJERSSTAM, V.; WANG, Z.; LEWENSOHN-FUCHS, I.; EKLUND, C.; SCHILLER, J. T.; FORSGREN, M.; DILLNER, J. Trends in seroprevalence of human papillomavirus type 16 among pregnant women in Stockholm, Sweden, during 1969-1989. **Int. J. Cancer**, v. 76, p. 341-344, 1998.

AHLERS, J. D.; DUNLOP, N.; ALLING, D. W.; NARA, P. L.; BERZOF SKY, J. A. Cytokine-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.**, v. 158, p. 3947-3958, 1997.

ALVAREZ-SALAS, L. M.; DIPAOLO, J. A. Molecular approaches to cervical cancer therapy. **Curr. Drug Discov. Technol.**, v. 4, n. 3, p. 208-219, 2007.

ALVES, A. M.; LÁSARO, M. O.; PYRRHO, A. S.; GATTASS, C. R.; DE ALMEIDA, D. F.; FERREIRA, L. C. Antibody response in mice immunized with a plasmid DNA encoding the colonization factor antigen I of enterotoxigenic Escherichia coli. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 23, n. 4, p. 321-330, 1999.

BARBER, D. L.; WHERRY, E. J.; AHMED, R. Cutting Edge: Rapid In Vivo Killing by Memory CD8 T Cells. **J. Immunol.**, v. 171, p. 27-31, 2003.

BAROUCH, D. H.; SANTRA, S.; TENNER-RACZ, K.; RACZ, P.; KURODA, M. J.; SCHMITZ, J. E.; JACKSON, S. S.; LIFTON, M. A.; FREED, D. C.; PERRY, H. C.; DAVIES, M. E.; SHIVER, J. W.; LETVIN, N. L. Potent CD4 T cell responses elicited by a bicistronic HIV-1 DNA vaccine expressing gp120 and GM-CSF. **J. Immunol.**, v. 168, p. 562-568, 2002.

BARRY, M. A.; LAI, W. C.; JOHNSTON, S. A. Protection against mycoplasma infection using expression-library immunization. **Nature**, v. 377(6550), p. 632-635, 1995.

BASEMAN, J. G.; KOUTSKY, L. A. The epidemiology of human papillomavirus infections. **J. Clin. Virol.**, v. 32, p. S16-S24, 2005. Suppl 1.

BERMÚDEZ-HUMARÁN, L. G.; CORTES-PEREZ, N. G.; LEFÈVRE, F.; GUIMARÃES, V.; RABOT, S.; ALCOCER-GONZALEZ, J. M.; GRATADOUX, J. J.; RODRIGUEZ-PADILLA, C.; TAMEZ-GUERRA, R. S.; CORTIER, G.; GRUSS, A.; LANGELLA, P. A novel mucosal vaccine based on live Lactococci expressing E7 antigen and IL-12 induces systemic and mucosal immune responses and protects mice against human papillomavirus type 16-induced tumors. **J. Immunol.**, v. 175, n. 11, p. 7297-7302, 2005.

BLANK, C.; MACKENSEN, A. Contribution of the PD-L1/PD-1 pathway to T-cell exhaustion: an update on implications for chronic infections and tumor evasion. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 56, n. 5, p. 739-745, 2007.

BONTKES, H. J.; DE GRUIJL, T. D.; VAN DEN MUYSENBERG, A. J.; VERHEIJEN, R. H.; STUKART, M. J.; MEIJER, C. J.; SCHEPER, R. J.; STACEY, S. N.; DUGGAN-KEEN, M. F.; STERN, P. L.; MAN, S.; BORYSIEWICZ, L. K.; WALBOOMERS, J. M. Human papillomavirus type 16 E6/E7-specific cytotoxic T lymphocytes in women with cervical neoplasia. *Int. J. Cancer*, v. 88, p. 92-98, 2000.

BOSCH, F. X. Epidemiology of human papillomavirus infections: new options for cervical cancer prevention. *Salud Publica Mex.*, v. 45, p. S326-S339, 2003. Suppl 3.

BOSCH, F. X.; MANOS, M. M.; MUÑOZ, N.; SHERMAN, M.; JANSEN, A. M.; PETO, J.; SCHIFFMAN, M. H.; MORENO, V.; KURMAN, R.; SHAH, K. V. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 87, n. 11, p. 796-802, 1995.

BOYLE, J. S.; KONIARAS, C.; LEW, A. M. Influence of cellular location of expressed antigen on the efficacy of DNA vaccination: cytotoxic T lymphocyte and antibody responses are suboptimal when antigen is cytoplasmic after intramuscular DNA immunization. *Int. Immunol.*, v. 9, n. 12, p. 1897-1906, 1997.

BRANDSMA, J. L.; SHLYANKEVICH, M.; SU, Y.; ZELTERMAN, D.; ROSE, J. K.; BUONOCORE, L. Reversal of papilloma growth in rabbits therapeutically vaccinated against E6 with naked DNA and/or vesicular stomatitis virus vectors. *Vaccine*, (in press), 2009.

BROWN, D. R.; KJAER, S. K.; SIGURDSSON, K. et al. The impact of quadrivalent human papillomavirus (HPV; types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine on infection and disease due to oncogenic nonvaccine HPV types in generally HPV-naïve women aged 16–26 years. *J. Infect. Dis.*, v. 199, p. 926-935, 2009.

BROWN, D. R.; SHEW, M. L.; QADADRI, B.; NEPTUNE, N.; VARGAS, M.; TU, W.; JULIAR, B. E.; BREEN, T. E.; FORTENBERRY, J. D. A longitudinal study of genital human papillomavirus infection in a cohort of closely followed adolescent women. *J. Infect. Dis.*, v. 191, n. 2, p. 182-192, 2005.

BROWN, D. R.; BRYAN, J. T.; SCHROEDER, J. M.; ROBINSON, T. S.; FIFE, K. H.; WHEELER, C. M.; BARR, E.; SMITH, P. R.; CHIACCHIERINI, L.; DICELLO, A.; JANSEN, K. U. Neutralization of human papillomavirus type 11 (HPV-11) by serum from women vaccinated with yeast-derived HPV-11 L1 virus-like particles: correlation with competitive radioimmunoassay titer. *J. Infect. Dis.*, v. 184, p. 1183-1186, 2001.

CAI, G.; FREEMAN, G. J. The CD160, BTLA, LIGHT/HVEM pathway: a bidirectional switch regulating T-cell activation. *Immunol. Rev.*, v. 229, n. 1, p. 244-258, 2009.

CARTER, J. J.; KOUTSKY, L. A.; HUGHES, J. P.; LEE, S. K.; KUYPERS, J.; KIVIAT, N.; GALLOWAY, D. A. Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection. *J. Infect. Dis.*, v. 181, p. 911-919, 2000.

CARTER, J. J.; KOUTSKY, L. A.; WIPF, G. C.; CHRISTENSEN, N. D.; LEE, S. K.; KUYPERS, J.; KIVIAT, N.; GALLOWAY, D. A. The natural history of human papillomavirus type 16 capsid antibodies among a cohort of university women. *J. Infect. Dis.*, v. 174, p. 927-936, 1996.

CARTRON, G.; ZHAO-YANG, L.; BAUDARD, M. et al. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor potentiates rituximab in patients with relapsed follicular lymphoma: Results of a phase II study. *J. Clin. Oncol.*, v. 26, p. 2725-2731, 2008.

CASANA, P. H.; HERNANDEZ, H.; ARANA, M. J. Interleukin-2 inhibits proliferation of HPV-associated tumor cells and halts tumor growth in vivo. *Bioch. Bioph. Res. Com.*, v. 299, p. 818-824, 2002.

CHEN, C. H.; WANG, T. L.; HUNG, C. F.; YANG, Y.; YOUNG, R. A.; PARDOLL, D. M.; WU, T. C. Enhancement of DNA vaccine potency by linkage of antigen gene to an HSP70 gene. *Cancer Res.*, v. 60, p. 1035-1042, 2000.

CHEN, Y. F.; LIN, C. W.; TSAO, Y. P.; CHEN, S. L. Cytotoxic-T-lymphocyte human papillomavirus type 16 E5 peptide with CpG oligodeoxynucleotide can eliminate tumor growth in C57BL/6 mice. *J. Virol.*, v. 78, n. 3, p. 1333-1343, 2004.

CHENG, W. F.; HUNG, C. F.; CHAI, C. Y.; HSU, K. F.; HE, L.; LING, M.; WU, T. C. Tumor-specific immunity and antiangiogenesis generated by a DNA vaccine encoding calreticulin linked to a tumor antigen. *J. Clin. Invest.*, v. 108, p. 669-678, 2001.

CHEUNG, T. C.; STEINBERG, M. W.; OBORNE, L. M.; MACAULEY, M. G.; FUKUYAMA, S.; SANJO, H.; D'SOUZA, C.; NORRIS, P. S.; PFEFFER, K.; MURPHY, K. M.; KRONENBERG, M.; SPEAR, P. G.; WARE, C. F. Unconventional ligand activation of herpesvirus entry mediator signals cell survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 106, n. 15, p. 6244-6249, 2009.

CHEUNG, Y. K.; CHENG, S. C.; SIN, F. W.; XIE, Y. Plasmid encoding papillomavirus Type 16 (HPV16) DNA constructed with codon optimization improved the immunogenicity against HPV infection. *Vaccine*, v. 23, p. 629-638, 2004.

CHIANESE-BULLOCK, K. A.; PRESSLEY, J.; GARBEE, C.; HIBBITTS, S.; MURPHY, C.; YAMSHCHIKOV, G.; PETRONI, G. R.; BISSONETTE, E. A.; NEESE, P. Y.; GROSH, W. W.; MERRILL, P.; FINK, R.; WOODSON, E. M.; WIERNASZ, C. J.; PATTERSON, J.W.; SLINGLUFF, C. L. MAGE-A1-, MAGE-A10-, and gp100-derived peptides are immunogenic when combined with granulocytemacrophage colony-stimulating factor and montanide ISA-51 adjuvant and administered as part of a multipeptide vaccine for melanoma. *J. Immunol.*, v. 174, p. 3080-3086, 2005.

CHOW, Y. H.; CHIANG B. L.; LEE Y. L.; CHI W. K.; LIN W. C.; CHEN Y. T.; TAO, M. H. Development of Th1 and Th2 populations and the nature of immune responses to hepatitis B virus DNA vaccines can be modulated by codelivery of various cytokine genes. *J. Immunol.*, v. 160, p. 1320-1329, 1998.

CHRISTENSEN, N. D.; KREIDER, J. W. Neutralization of CRPV infectivity by monoclonal antibodies that identify conformational epitopes on intact virions. **Virus Res.**, v. 21, p. 169-179, 1991.

CHU, N. R.; WU, H. B.; WU, T. C.; BOUX, L. J.; SIEGEL, M. I.; MIZZEN, L. A. Immunotherapy of a human papillomavirus (HPV) type 16 E7-expressing tumour by administration of fusion protein comprising Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guérin (BCG) hsp65. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 121, n. 2, p. 216-225, 2000.

CID-ARREGUI, A. Therapeutic vaccines against human papillomavirus and cervical cancer. **Open Virol. J.**, v. 3, p.67-83, 2009.

CLIFFORD, G. M.; SMITH, J. S.; PLUMMER, M.; MUÑOZ, N.; FRANCESCHI, S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. **Br. J. Cancer.**, v. 88, p. 63-73, 2003.

COHEN, G. H.; WILCOX, W. C.; SODORA, D. L.; LONG, D.; LEVIN, J. Z.; EISENBERG, R. J. Expression of herpes simplex virus type 1 glycoprotein D deletion mutants in mammalian cells. **J. Virol.**, v. 62, n. 6, p. 1932-1940, 1988.

CONDON, C.; WATKINS, S. C.; CELLUZZI, C. M.; THOMPSON, K.; FALO, J. R. DNA-based immunization by in vivo transfection of dendritic cells. **Nat. Med.**, v. 2, n. 10, p. 1122–1128, 1996.

CORREALE, P.; MARSILI, S.; SABATINO, M. et al. Immunotherapy of renal cell carcinoma with granulocyte macrophage colony stimulating factor and very low dose interleukin-2. **Oncol. Rep.**, v. 13, p. 751–756, 2005.

CROFT, M. The evolving crosstalk between co-stimulatory and co-inhibitory receptors: HVEM-BTLA. **Trends Immunol.**, v. 26, n. 6, p. 292-294, 2004.

CURTSINGER, J. M.; JOHNSON, C. M.; MESCHER, M. F. CD8 T cell clonal expansion and development of eVector function require prolonged exposure to antigen, costimulation, and signal 3 cytokine. **J. Immunol.**, v. 171, p. 5165-5171, 2003.

DAFTARIAN, P. M.; MANSOUR, M.; POHAJDAK, B.; FUENTES-ORTEGA, A.; KORETS-SMITH, E.; MACDONALD, L.; WEIR, G.; BROWN, R. G.; KAST, W. M. Rejection of large HPV-16 expressing tumors in aged mice by a single immunization of VacciMax encapsulated CTL/T helper peptides. **J. Transl. Med.**, v. 5, p. 26, 2007.

DAVIS, H. L.; MCCLUSKIE, M. J. DNA vaccines for viral diseases. **Microbes Infect.**, v. 1(1), p. 7-21, 1999.

DE JONG, A.; O'NEILL, T.; KHAN, A. Y.; KWAPPENBERG, K. M.; CHISHOLM, S. E.; WHITTLE, N. R.; DOBSONM, J. A.; JACK, L. C.; ST CLAIR ROBERTS, J. A.; OFFRINGA, R.; VAN DER BURG, S. H.; HICKLING, J. K. Enhancement of human papillomavirus (HPV) type 16 E6 and E7-specific T-cell immunity in healthy volunteers through vaccination with TA-CIN, an HPV16 L2E7E6 fusion protein vaccine. **Vaccine**, v. 20, p. 3456-3464, 2002.

DE JONG, A.; VAN POELGEEST, M. I.; VAN DER HULST, J. M.; DRIJFHOUT, J. W.; FLEUREN, G. J.; MELIEF, C. J.; KENTER, G.; OFFRINGA, R.; VAN DER BURG, S. H. Human papillomavirus type 16- positive cervical cancer is associated with impaired CD4+ T-cell immunity against early antigens E2 and E6. **Cancer Res.**, v. 64, p. 5449-5455, 2004.

DE VILLIERS, E. M.; FAUQUET, C.; BROKER, T. R; BERNARD, H. U.; ZUR HAUSEN, H. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 1, p. 17-27, 2004.

DERKAY, C. S.; SMITH, R. J.; MCCLAY, J.; VAN BURIK, J. A.; WIATRAK, B. J.; ARNOLD, J.; BERGER, B.; NEEFE, J. R. HspE7 treatment of pediatric recurrent respiratory papillomatosis: final results of an open label trial. **Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.**, v. 114, n. 9, p. 730-737, 2005.

DISIS, M. L.; BERNHARD, H.; SHIOTA, F. M.; HAND, S. L.; GRALOW, J. R.; HUSEBY, E. S.; GILLIS, S.; CHEEVER, M. A. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: an effective adjuvant for protein and peptide-based vaccines. **Blood**, v. 88, p. 202-210, 1996.

DOORBAR, J. Papillomavirus life cycle organization and biomarker selection. **Dis. Markers**, v. 23, n. 4, p. 297-313, 2007.

DONNELLY, J. J.; ULMER, J. B.; SHIVER, J. W.; LIU, M. A. DNA vaccines. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 15, p. 617-648, 1997.

DYSON, N.; HOWLEY, P. M.; MUNGER, K.; HARLOW, E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. **Science**, v. 243, p. 934-937, 1989.

EBRAHIM, S. H.; MCKENNA, M. T.; MARKS, J. S. Sexual behaviour: related adverse health burden in the United States. **Sex. Transm. Infect.**, v. 81, p. 38-40, 2005.

EINSTEIN, M. H.; KADISH, A. S.; BURK, R. D.; KIM, M. Y.; WADLER, S.; STREICHER, H.; GOLDBERG, G. L.; RUNOWICZ, C. D. Heat shock fusion protein-based immunotherapy for treatment of cervical intraepithelial neoplasia III. **Gynecol. Oncol.**, v. 106, n. 3, p. 453-460, 2007.

FELTKAMP, M. C.; SMITS, H. L.; VIERBOOM, M. P.; MINNAAR, R. P.; DE JONGH, B. M.; DRIJFHOUT, J. W.; TER SCHEGGET, J.; MELIEF, C. J.; KAST, W. M. Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 23, p. 2242-2249, 1993.

FERRARA, A.; NONN, M.; SEHR, P.; SCHRECKENBERGER, C.; PAWLITA, M.; DÜRST, M.; SCHNEIDER, A.; KAUFMANN, A. M. Dendritic cell-based tumor vaccine for cervical cancer II: results of a clinical pilot study in 15 individual patients. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 129, p. 521-530, 2003.

FRANCO, E. L.; MAYRAND, M. H.; TROTTIER, H. Cervical cancer prevention. Promises and perils in a changing landscape. **Oncol. Exchange**, v. 5, p. 9-13, 2006.

FRANCO, E. L.; ROHAN, T. E.; VILLA, L. L. Epidemiologic evidence and human papillomavirus infection as a necessary cause of cervical cancer. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 91, p. 506-511, 1999.

FRATTINI, M. G.; LIM, H. B.; DOORBAR, J.; LAIMINS, L. A. Induction of human papillomavirus type 18 late gene expression and genomic amplification in organotypic cultures from transfected DNA templates. **J. Virol.**, v. 71, p. 7068-7072, 1997.

FRAZER, I. H.; QUINN, M.; NICKLIN, J. L.; TAN, J.; PERRIN, L. C.; NG, P.; O'CONNOR, V. M.; WHITE, O.; WENDT, N.; MARTIN, J.; CROWLEY, J. M.; EDWARDS, S. J.; MCKENZIE, A. W.; MITCHELL, S. V.; MAHER, D. W.; PEARSE, M. J.; BASSER, R. L. Phase I study of HPV16-specific immunotherapy with E6E7 fusion protein and ISCOMATRIX adjuvant in women with cervical intraepithelial neoplasia. **Vaccine**, v. 23, p. 172-181, 2004.

FRAZER, I. H.; TINDLE, R. W.; FERNANDO, G. J. P.; MALCOLM, K.; HERD, K.; MCFADYN, S. et al. Safety and immunogenicity of HPV16 E7/Algammulin. **Vaccines for Human Papillomavirus Infection and Anogenital Disease**. Austin Texas: RG Landes Company, 1999. p. 91-104.

FULLER, A. O.; LEE, W. C. Herpes simplex virus type 1 entry through a cascade of virus-cell interactions requires different roles of gD and gH in penetration. **J. Virol.**, v. 66, n. 8, p. 5002-5012, 1992.

GARCIA, F.; PETRY, K. U.; MUDERSPACH, L.; GOLD, M. A.; BRALY, P.; CRUM, C. P.; MAGILL, M.; SILVERMAN, M.; URBAN, R. G.; HEDLEY, M. L.; BEACH, K. J. ZYC101a for treatment of high-grade cervical intraepithelial neoplasia: a randomized controlled trial. **Obstet. Gynecol.**, v. 103, p. 317-326, 2004.

GARLAND, S. M.; STEBEN, M.; HERNANDEZ-AVILA, M.; KOUTSKY, L. A.; WHEELER, C. M.; PEREZ, G.; HARPER, D. M.; LEODOLTER, S.; TANG, G. W.; FERRIS, D. G.; ESSER, M. T.; VUOCOLO, S. C.; NELSON, M.; RAILKAR, R.; SATTLER, C.; BARR, E. Noninferiority of antibody response to human papillomavirus type 16 in subjects vaccinated with monovalent and quadrivalent L1 virus-like particle vaccines. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 14, p. 792-795, 2007.

GEISSLER, M.; GESIEN, A.; TOKUSHIGE, K.; WANDS, J. R. Enhancement of cellular and humoral immune responses to hepatitis C virus core protein using DNA-based vaccines augmented with cytokine-expressing plasmids. **J. Immunol.**, v. 158, p. 1231-1237, 1997.

GHERARDI, M. M.; RAMIREZ, J. C.; RODRÍGUEZ, D.; RODRÍGUEZ, J. R.; SANO, G.; ZAVALA, F.; ESTEBAN, M. IL-12 delivery from recombinant vaccinia virus attenuates the vector and enhances the cellular immune response against HIV-1 Env in a dose-dependent manner. **J. Immunol.**, v. 162, n. 11, p. 6724-6733, 1999.

GOLDSTONE, S. E.; PALEFSKY, J. M.; WINNETT, M. T.; NEEFE, J. R. Activity of HspE7, a novel immunotherapy, in patients with anogenital warts. **Dis. Colon Rectum**, v. 45, p. 502-507, 2002.

GOMEZ-GUTIERREZ, J. G.; ELPEK, K.G.; MONTES DE OCA-LUNA, R.; SHIRWAN, H.; SAM ZHOU, H.; MCMASTERS, K. M. Vaccination with an adenoviral vector expressing calreticulin-human papillomavirus 16 E7 fusion protein eradicates E7 expressing established tumors in mice. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 56, n. 7, p. 997-1007, 2007.

GUNN, G. R.; ZUBAIR, A.; PETERS, C.; PAN, Z. K.; WU, T. C.; PATERSON, Y. 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.**, v. 167, p. 6471-6479, 2001.

GUSTAFSSON, C.; GOVINDARAJAN, S.; MINSHULL, J. Codon bias and heterologous protein expression. **Trends Biotechnol.**, v. 22, p. 346-353, 2004.

HAGENSEE, M. E.; YAEGASHI, N.; GALLOWAY, D. A. Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins. **J. Virol.**, v. 67, p. 315-322, 1993.

HAMMES, L. S.; TEKMAL, R. R.; NAUD, P.; EDELWEISS, M. I.; KIRMA, N.; VALENTE, P. T.; SYRJÄNEN, K. J.; CUNHA-FILHO, J. S. Macrophages, inflammation and risk of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) progression clinicopathological correlation. **Gynecol. Oncol.**, v. 105, p. 157-165, 2007.

HARPER, D. M.; FRANCO, E. L.; WHEELER, C.; FERRIS, D. G.; JENKINS, D.; SCHUIND, A.; ZAHAF, T.; INNIS, B.; NAUD, P.; DE CARVALHO, N. S.; ROTELI-MARTINS, C. M.; TEIXEIRA, J.; BLATTER, M. M.; KORN, A. P.; QUINT, W.; DUBIN, G. Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. **Lancet**, v. 364, p. 1757-1765, 2004.

HARPER, D. M.; FRANCO, E. L.; WHEELER, C. M.; MOSCICKI, A. B.; ROMANOWSKI, B.; ROTELI-MARTINS, C. M.; JENKINS, D.; SCHUIND, A.; COSTA CLEMENS, S. A.; DUBIN, G. Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomized control trial. **Lancet**, v. 367, p. 1247-1255, 2006.

HASSETT, D. E.; WHITTON, J. L. DNA immunization. **Trends Microbiol.**, v. 4(8), p. 307-312, 1996.

HE, Z.; WLAZLO, A. P.; KOWALCZYK, D. W.; CHENG, J.; XIANG, Z. Q.; GILES-DAVIS, W.; ERTL H. C. Viral recombinant vaccines to the E6 and E7 antigens of HPV-16. **Virology**, v. 270, p. 146-161, 2000.

HEINZERLING, L.; BURG, G.; DUMMER, R.; MAIER, T.; OBERHOLZER, P. A.; SCHULTZ, J.; ELZAOUK, L.; PAVLOVIC, J.; MOELLING, K. Intratumoral injection of DNA encoding human interleukin 12 into patients with metastatic melanoma: clinical efficacy. **Hum. Gene Ther.**, v. 16, p. 35-48, 2005.

HINES, J. F.; GHIM, S. J.; CHRISTENSEN, N. D.; KREIDER, J. W.; BARNES, W. A.; SCHLEGEL, R.; JENSON, A. B. The expressed L1 proteins of HPV-1, HPV-6, and HPV-11 display type-specific epitopes with native conformation and reactivity with neutralizing and nonneutralizing antibodies. **Pathobiology**, v. 62, p. 165-171, 1994.

HO, G. Y.; STUDENTSOV, Y. Y.; BIERMAN, R.; BURK, R. D. Natural history of human papillomavirus type 16 virus-like particle antibodies in young women. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 13, p. 110-116, 2004.

HONKOOP, A. H.; LUYKX-DE BAKKER, S. A.; HOEKMAN, K.; MEYER, S.; MEYER, O. W.; VAN GROENINGEN, C. J.; VAN DIEST, P.J.; BOVEN, E.; VAN DER WALL, E.; GIACCONE, G.; WAGSTAFF, J.; PINEDO, H. M. Prolonged neoadjuvant chemotherapy with GM-CSF in locally advanced breast cancer. **The Oncologist**, v. 4, p. 106 –111, 1999.

HÖPFL, R.; HEIM, K.; CHRISTENSEN, N.; ZUMBACH, K.; WIELAND, U.; VOLGGER, B.; WIDSCHWENDTER, A.; HAIBUCHNER, S.; MÜLLER-HOLZNER, E.; PAWLITA, M.; PFISTER, H.; FRITSCH, P. Spontaneous regression of CIN and delayed-type hypersensitivity to HPV-16 oncoprotein E7. **Lancet**, v. 356, p. 1985–1986, 2000.

HOWLEY, P. M. Role of the human papillomaviruses in human cancer. **Cancer Res.**, v. 51, p. 5019s-5022s, 1991. Suppl 18.

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. Enhancement of vaccinia vaccine potency by linkage of tumor antigen gene to gene encoding calreticulin. **Vaccine**, v. 28, p. 3993-4001, 2004.

HUIBREGTSE, J. M.; SCHEFFNER, M.; HOWLEY, P. M. Localization of the E6-AP regions that direct human papillomavirus E6 binding, association with p53 and ubiquitination of associated proteins. **Mol. Cell. Biol.**, v. 13, p. 4918–4927, 1993.

HUNG, C. F.; CHENG, W. F.; HSU, K. F.; CHAI, C. Y.; HE, L.; LING, M.; WU, T. C. Cancer immunotherapy using a DNA vaccine encoding the translocation domain of a bacterial toxin linked to a tumor antigen. **Cancer Res.**, v. 61, n. 9, p. 3698-3703, 2001.

HUNG, C. F.; TSAI, Y. C.; HE, L.; WU, T. C. DNA vaccines encoding li-PADRE generates potent PADRE-specific CD4(+) T-cell immune responses and enhances vaccine potency. **Mol. Ther.**, v. 15, p. 1211-1219, 2007.

HWANG, E. S.; NOTTOLI, T.; DIMAIO, D. The HPV 16 E5 protein: expression, detection, and stable complex formation with transmembrane proteins in COS cells. **Virology**, v. 211, p. 227–233, 1995.

INOUE, T.; INOUE, Y.; NAKAMURA, T.; YOSHIDA, A.; TAKAHASHI, K.; INOUE, Y.; SHIMOMURA, Y.; TANO, Y.; FUJISAWA, Y.; AONO, A.; HAYASHI, K. Preventive Effect of Local Plasmid DNA Vaccine Encoding gD or gD-IL-2 on Herpetic Keratitis **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 41, p. 4209-4215, 2000.

JABBAR, I. A.; FERNANDO, G. J.; SAUNDERS, N.; ALDOVINI, A.; YOUNG, R.; MALCOLM, K.; FRAZER, I. H. Immune responses induced by BCG recombinant for human papillomavirus L1 and E7 proteins. **Vaccine**, v. 18, p. 2444–2453, 2000.

JACKSON, S.; HARWOOD, C.; THOMAS, M.; BANKS, L.; STOREY, A. Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins. **Genes Dev.**, v. 14, p. 3065–3073, 2000.

JAGER, E.; RINGHOFFER, M.; DIENES, H. P.; ARAND, M.; KARBACH, J.; JAGER D.; ILSEMANN, C.; HAGEDORN, M.; OESCH, F.; KNUTH, A. Granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor enhances immune responses to melanoma-associated peptides in vivo. **Int. J. Cancer**, v. 67, p.54-62, 1996.

JANSSEN, E. M.; LEMMENS, E. E.; WOLFE, T.; CHRISTEN, U.; VON HERRATH, M. G.; SCHOENBERGER, S. P. CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. **Nature**, v. 421, p. 852–856, 2003.

JENSON, A. B.; KURMAN, R. J.; LANCASTER, W. D. Tissue effects and host response to human papillomavirus infection. **Dermatol. Clin.**, v. 9, p. 203-209, 1991.

JI, H.; WANG, T. L.; CHEN, C. H.; PAI, S. I.; HUNG, C. F.; LIN, K. Y.; KURMAN, R. J.; PARDOLL, D. M.; WU, T. C. Targeting human papillomavirus type 16 E7 to the endosomal/lysosomal compartment enhances the antitumor immunity of DNA vaccines against murine human papillomavirus type 16 E7-expressing tumors. **Hum. Gene Ther.**, v. 10, p. 2727–2740, 1999.

JIN, H. S.; PARK, E. K.; LEE, J. M.; NAMKOONG, S. E.; KIM, D. G.; LEE, Y. J.; JUN, H. J.; HAN, B. D.; BAE, S. M.; AHN, W. S. Immunization with adenoviral vectors carrying recombinant IL-12 and E7 enhanced the antitumor immunity to human papillomavirus 16-associated tumor. **Gynecol. Oncol.**, v. 97, n. 2, p. 559–567, 2005.

JONES, T.; STERN, A.; LIN, R. Potential role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as vaccine adjuvant. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 13, p. S47, 1994. Suppl 2.

KANODIA, S.; DA SILVA, D. M.; KAST, W. M. Recent advances in strategies for immunotherapy of human papillomavirus-induced lesions. **Int. J. Cancer**, v. 122, p. 247-259, 2008.

KANODIA, S.; FAHEY, L. M.; KAST, W. M. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. **Curr. Cancer Drug Targets**, v. 7, p. 79-89, 2007.

KASINRERK, W.; MOONSOM, S.; CHAWANSUNTATI, K. Production of Antibodies by Single DNA Immunization: Comparison of Various Immunization Routes. **Hybridoma and hybridomics**, v. 21, p. 287-293 , 2002.

KAUFMANN, A. M.; STERN, P. L.; RANKIN, E. M.; SOMMER, H.; NUSSLER, V.; SCHNEIDER, A.; ADAMS, M.; ONON, T. S.; BAUKNECHT, T.; WAGNER, U.; KROON, K.; HICKLING, J.; BOSWELL, C. M.; STACEY, S. N.; KITCHENER, H. C.; GILLARD, J.; WANDERS, J.; ROBERTS, J. S.; ZWIERZINA, H. Safety and immunogenicity of TA-HPV, a recombinant vaccinia virus expressing modified human papillomavirus (HPV)-16 and HPV-18 E6 and E7 genes, in women with progressive cervical cancer. **Clin. Cancer Res.**, v. 8, p. 3676-3685, 2002.

KUHNLE, G.; COLLINS, R. A.; SCOTT, J. E.; KEIL, G. M. Bovine interleukins 2 and 4 expressed in recombinant bovine herpesvirus 1 are biologically active secreted glycoproteins. **J. Gene Virol.**, v. 77, p. 2231-2240, 1996.

KUSAKABE, K.; XIN, K. Q.; KATOH, H.; SUMINO, K.; HAGIWARA, E.; KAWAMOTO, S.; OKUDA, K.; MIYAGI, Y.; AOKI, I.; NISHIOKA, K.; KLINMAN, D.; OKUDA, K. The Timing of GM-CSF Expression Plasmid Administration Influences the Th1/Th2 Response Induced by an HIV-1-Specific DNA Vaccine. **J. Immunol.**, v. 164, p. 3102–3111, 2000.

KENTER, G. G.; WELTERS, M. J.; VALENTIJN, A. R.; LOWIK, M. J.; BERENDS-VAN DER MEER, D. M.; VLOON, A. P.; DRIJFHOUT, J. W.; WAFELMAN, A. R.; OOSTENDORP, J.; FLEUREN, G. J.; OFFRINGA, R.; VAN DER BURG, S. H.; MELIEF, C. J. Phase I immunotherapeutic trial with long peptides spanning the E6 and E7 sequences of high-risk human papillomavirus 16 in end-stage cervical cancer patients shows low toxicity and robust immunogenicity. **Clin. Cancer Res.**, v. 14, n. 1, p. 169-177, 2008.

KIM, J. J.; AYYAVOO, V.; BAGARAZZI, L.; CHATTERGOON, M. A.; DANG, K.; WANG, B.; BOYER, J. D.; WEINER, D. B. In vivo engineering of a cellular immune response by coadministration of IL-12 expression vector with a DNA immunogen. **J. Immunol.**, v. 158, p. 816, 1997.

KIM, T. W.; HUNG, C. F.; KIM, J. W.; JUANG, J.; CHEN, P. J.; HE, L.; BOYD, D. A.; WU, T. C. Vaccination with a DNA vaccine encoding herpes simplex virus type 1 VP22 linked to antigen generates long-term antigen-specific CD8-positive memory T cells and protective immunity. **Hum. Gene Ther.**, v. 15, n. 2, p. 167-177, 2004.

KIRNBAUER, R.; BOOY, F.; CHENG, N.; LOWY, D. R.; SCHILLER, J. T. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, p. 12180-12184, 1992.

KLENCKE, B.; MATIJEVIC, M.; URBAN, R. G.; LATHEY, J. L.; HEDLEY, M. L.; BERRY, M.; THATCHER, J.; WEINBERG, V.; WILSON, J.; DARRAGH, T.; JAY, N.; DA COSTA, M.; PALEFSKY, J. M. Encapsulated plasmid DNA treatment for human papillomavirus 16-associated anal dysplasia: a phase I study of ZYC101. **Clin. Cancer Res.**, v. 8, p. 1028-1037, 2002.

KUTZLER, M. A.; WEINER, D. B. DNA vaccines: ready for prime time? **Nat. Rev.**, v. 9, p. 776-788, 2008.

LAMIKANRA, A.; PAN, Z. K.; ISAACS, S. N.; WU, T. C.; PATERSON Y. Regression of established human papillomavirus type 16 (HPV-16) immortalized tumors in vivo by vaccinia viruses expressing different forms of HPV-16 E7 correlates with enhanced CD8(+) T-cell responses that home to the tumor site. **J. Virol.**, v. 75, p. 9654-9664, 2001.

LASARO, M.O.; ERTL, H.C. Potentiating vaccine immunogenicity by manipulating the HVEM/BTLA pathway and other co-stimulatory and co-inhibitory signals of the immune system. **Hum. Vaccin.**, v. 5, n. 1, p. 6-14, 2009.

LASARO, M. O.; TATSIS, N.; HENSLEY, S. E.; WHITBECK, J. C.; LIN, S. W.; RUX, J.; WHERRY, E. J.; COHEN, G. H.; EISENBERG, R. J.; ERTL, H. C. Targeting of antigen to the herpesvirus entry mediator augments primary adaptive immune responses. **Nat. Med.**, v. 14, p. 205-212, 2008.

LASARO, M. O.; DINIZ, M. O.; REYES-SANDOVAL, A.; ERTL, H. C.; FERREIRA, L. C. Anti-tumor DNA vaccines based on the expression of human papillomavirus-16 E6/E7 oncoproteins genetically fused with the glycoprotein D from human herpes virus-1. ***Microp. Infection***, v. 7, p.1541-1550, 2005.

LEE, D. W.; ANDERSON, M. E.; WU, S.; LEE, J. H. Development of an adenoviral vaccine against E6 and E7 oncoproteins to prevent growth of human papillomavirus-positive cancer. ***Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.***, v. 134, n. 12, p. 1316-1323, 2008.

LEPIQUE, A. P.; RABACHINI, T.; VILLA, L. L. HPV vaccination: the beginning of the end of cervical cancer? - A Review. ***Mem. Inst. Oswaldo Cruz***, v. 104, n. 1, p. 1-10, 2009.

LI, W. R.; NIU, B.; WANG, J. W.; FENG, Z. J.; WANG, D. X. Coexpression of interleukin-2 enhances the immunization effect of a DNA vaccine expressing herpes simplex 1 glycoprotein D. ***Acta Virol.***, v. 50, p. 251-256, 2006.

LIAO, J. B.; PUBLICOVER, J.; ROSE, J. K.; DIMAIO, D. Single-dose, therapeutic vaccination of mice with vesicular stomatitis virus expressing human papillomavirus type 16 E7 protein. ***Clin. Vaccine Immunol.***; v. 15, n. 5, p. 817-824, 2008.

LIN, C. W.; LEE, J. Y.; TSAO, Y. P.; SHEN, C. P.; LAI, H. C.; CHEN, S. L. Oral vaccination with recombinant Listeria monocytogenes expressing human papillomavirus type 16 E7 can cause tumor growth in mice to regress. ***Int. J. Cancer***, v. 102, p. 629–637, 2002.

LIN, C. C.; CHOU, C. W.; SHIAU, A. L.; TU, C. F.; KO T. M.; CHEN, Y. L.; YANG, B. C.; TAO, M. H.; LAI, M. D. Therapeutic HER2/Neu DNA vaccine inhibits mouse tumor naturally overexpressing endogenous neu. ***Molec. Therapy***, v. 10, p. 290-301, 2004.

LIN, K. Y.; GUARNIERI, F. G.; STAVELEY-O'CARRROLL, K. F.; LEVITSKY, H. I.; AUGUST, J. T.; PARDOLL, D. M.; WU, T. C. Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. ***Cancer Res.***, v. 56, n. 1, p. 21-26, 1996.

LIU, D. W.; YANG, Y. C.; LIN, H. F.; LIN, M. F.; CHENG, Y. W.; CHU, C. C.; TSAO, Y. P; CHEN, S. L. Cytotoxic T-lymphocyte responses to human papillomavirus type 16 E5 and E7 proteins and HLA-A*0201-restricted T-cell peptides in cervical cancer patients. ***J. Virol.***, v. 81, n. 6, p. 2869-2879, 2007.

LOUDON, P. T.; YAGER, E. J.; LYNCH, D. T.; NARENDRAN, A.; STAGNAR, C.; FRANCHINI, A. M.; FULLER, J. T.; WHITE, P. A.; NYUANDI, J.; WILEY, C. A.; MURPHEY-CORB, M.; FULLER, D. H. GM-CSF increases mucosal and systemic immunogenicity of an H1N1 influenza DNA vaccine administered into the epidermis of non-human primates. ***PLoS One***, v. 5, n. 6, p. e11021, 2010.

MANETTI, R.; GEROSA, F.; GIUDIZI, M. G.; BIAGIOTTI, R.; PARRONCHI, P.; PICCINNI, M. P.; SAMPOGNARO, S.; MAGGI, E.; ROMAGNANI, S.; TRINCHIERI, G.; et al. Interleukin 12 induces stable priming for interferon gamma (IFN-gamma) production during differentiation of human T helper (Th) cells and transient IFN-gamma production in established Th2 cell clones. *J. Exp. Med.*, v. 179, p. 1273–1283, 1993.

MANURI, P. R.; NEHETE, B.; NEHETE, P. N.; REISENAUER, R.; WARDELL, S.; COURTNEY, A. N.; GAMBHIRA, R.; LOMADA, D.; CHOPRA, A. K.; SASTRY, K. J. Intranasal immunization with synthetic peptides corresponding to the E6 and E7 oncoproteins of human papillomavirus type 16 induces systemic and mucosal cellular immune responses and tumor protection. *Vaccine*, v. 25, n. 17, p. 3302-3310, 2007.

MARTIN, P.; VASS, W. C.; SCHILLER, J. T.; LOWY, D. R.; VELU, T. J. The bovine papillomavirus E5 transforming protein can stimulate the transforming activity of EGF and CSF-1 receptors. *Cell*, v. 59, n. 1, p. 21-32, 1989.

MAZIBRADA, J.; RITTÀ, M.; MONDINI, M.; DE ANDREA, M.; AZZIMONTI, B.; BORGOGNA, C.; CIOTTI, M.; ORLANDO, A.; SURICO, N.; CHIUSA, L.; LANDOLFO, S.; GARIGLIO, M. Interaction between inflammation and angiogenesis during different stages of cervical carcinogenesis. *Gynecol. Oncol.*, v. 108, p. 112-120, 2008.

MAZZOLINI, G.; PRIETO, J.; MELERO, I. Gene therapy of cancer with interleukin-12. *Curr. Pharm. Des.*, v. 9, n. 24, p. 1981–1991, 2003.

MCCANCE, D. J. Human papillomaviruses and cervical cancer. *J. Med. Microbiol.*, v. 47, p. 371-373, 1998.

MCMURRAY, H. R.; NGUYEN, D.; WESTBROOK, T. F.; MCANCE, D. J. Biology of human papillomaviruses. *Int. J. Exp. Pathol.*, v. 82, p. 15-33, 2001.

MELIEF, C. J.; WELTERS, M. J.; LOWIK, M. J.; VLOON, A. P.; KENTER, G. G. Long peptide vaccine-induced migration of HPV16-specific type 1 and 2 T cells into the lesions of VIN III patients associated with complete clinical responses. *Cancer Immun.*, v. 7, p. 20, 2007. Suppl 1.

MICHEL, N.; OSEN, W.; GISSMAN, L.; SCHUMACHER, T. N. M.; ZENTGRAF, H.; MÜLLER, M. Enhanced immunogenicity of HPV 16 E7 fusion proteins in DNA vaccination. *Virology*, v. 294, p. 47–59, 2002.

MUNOZ, N., BOSCH, F. X., DE SANJOSE, S. et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 518-27.

MIYAHIRA, Y.; MURATA, K.; RODRIGUEZ, D.; RODRIGUEZ, J.R.; ESTEBAN, M.; RODRIGUES, M. M.; ZAVALA, F. Quantification of antigen specific CD8+ T cells using an ELISPOT assay. *J. Immunol. Methods*, v. 181, p. 45-54, 1995.

MOLLING, J. W.; DE GRUIJL, T. D.; GLIM, J.; MORENO, M.; ROZENDAAL, L.; MEIJER, C. J.; VAN DEN EERTWEGH, A. J.; SCHEPER, R. J.; VON BLOMBERG, M. E.; BONTKES, H. J. CD4(+)CD25hi regulatory T-cell frequency correlates with persistence of human papillomavirus type 16 and T helper cell responses in patients with cervical intraepithelial neoplasia. **Int. J. Cancer**, v. 121, p. 1749-1755, 2007.

MOORE, A. C.; KONG, W. P.; CHAKRABARTI, B. K.; GARY J. N. Effects of antigen and genetic adjuvants on immune responses to human immunodeficiency virus DNA vaccines in mice. **J. Virol.**, v. 76, p. 243-250, 2002.

MONIZ, M.; LING, M.; HUNG, C. F.; WU, T. C. HPV DNA vaccines. **Front. Biosci.**, v. 8, p. d55-68, 2003.

MOR, G.; SINGLA, M.; STEINBERG, A. D.; HOFFMAN, S. L.; OKUDA, K.; KLINMAN, D. M. Do DNA vaccines induce autoimmune disease? **Hum. Gene Ther.**, v. 8(3), p. 293-300, 1997.

MOSCICKI, A. B.; ELLENBERG, J. H.; FARHAT, S.; XU, J. Persistence of human papillomavirus infection in HIV-infected and -uninfected adolescent girls: risk factors and differences, by phylogenetic type. **J. Infect. Dis.**, v. 190, n. 1, p. 37-45, 2004.

MUDERSPACH, L.; WILCZYNSKI, S.; ROMAN, L.; BADE, L.; FELIX, J.; SMALL, L. A.; KAST, W. M.; FASCIO, G.; MARTY, V.; WEBER, J. A phase I trial of a human papillomavirus (HPV) peptide vaccine for women with high-grade cervical and vulvar intraepithelial neoplasia who are HPV 16 positive. **Clin. Cancer Res.**, v. 6, p. 3406-3416, 2000.

MÜLLER, M. Codon optimization of papillomavirus genes. **Methods Mol. Med.**, v. 119, p. 433-444, 2005.

NARUM, D. L.; KUMAR, S.; ROGERS, W. O.; FUHRMANN, S. R.; LIANG, H.; OAKLEY, M.; TAYE, A.; SIM, B. K.; HOFFMAN, S. L. Codon optimization of gene fragments encoding Plasmodium falciparum merozoite proteins enhances DNA vaccine protein expression and immunogenicity in mice. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 7250-7253, 2001.

NEAD, M. A.; BAGLIA, L. A.; ANTINORE, M. J.; LUDLOW, J. W.; MCCANCE, D. J. Rb binds c-Jun and activates transcription; **EMBO J.**, v. 17, p. 2342-2352, 1998.

NEMECKOVA, S.; SMAHEL, M.; HAINZ, P.; MACKOVA, J.; ZURKOVA, K.; GABRIEL, P.; INDROVA, M.; KUTINOVA, L. Combination of intratumoral injections of vaccinia virus MVA expressing GM-CSF and immunization with DNA vaccine prolongs the survival of mice bearing HPV16 induced tumors with downregulated expression of MHC class I molecules. **Neoplasma.**, v. 54, n. 4, p. 326-33, 2007.

NICHOLS, W. W.; LEDWITH, B. J.; MANAM, S. V.; TROILO, P. J. Potential DNA vaccine integration into host cell genome. **Ann. N Y Acad. Sci.**, v. 772, p. 30-39, 1995.

NIEDERKORN, J. Y. Emerging concepts in CD8(+) T regulatory cells. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 20, p. 327-331, 2008.

NORRILD, B. Immunochemistry of herpes simplex virus glycoproteins. **Curr. Top Microbiol. Immunol.**, v. 90, p. 67-106, 1980.

OKADA, E.; SASAKI, S.; ISHII, N.; AOKI, I.; YASUDA, T.; NISHIOKA, K.; FUKUSHIMA, J.; MIYAZAKI, J.; WAHREN, B.; OKUDA, K. Intranasal immunization of a DNA vaccine with interleukin 12 and granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) expressing plasmids in liposomes induce strong mucosal and cell-mediated immune responses against HIV-1 antigen. **J. Immunol.**, v.159, p. 3638-3647, 1997.

OLSSON, S. E.; VILLA, L. L.; COSTA, R. L.; PETTA, C. A.; ANDRADE, R. P.; MALM, C.; IVERSEN, O. E.; HØYE, J.; STEINWALL, M.; RIIS-JOHANNESSEN, G.; ANDERSSON-ELLSTROM, A.; ELFGREN, K.; VON KROGH, G.; LEHTINEN, M.; PAAVONEN, J.; TAMMS, G. M.; GIACOLETTI, K.; LUPINACCI, L.; ESSER, M. T.; VUOCOLO, S. C.; SAAH, A. J.; BARR, E. Induction of immune memory following administration of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus (HPV) types 6/11/16/18 L1 virus-like particle (VLP) vaccine. **Vaccine**, v. 25, p. 4931-4939, 2007.

OTTEN, G.; SCHAEFER, M.; DOE, B.; LIU, H.; SRIVASTAVA, I.; ZUR MEGEDE, J.; O'HAGAN, D.; DONNELLY, J.; WIDERA, G.; RABUSSAY, D.; LEWIS, M. G.; BARNETT, S.; ULMER, J. B. Enhancement of DNA vaccine potency in rhesus macaques by electroporation. **Vaccine**, v. 22, n. 19, p. 2489-2493, 2004.

OTTEN, G. R.; SCHAEFER, M.; DOE, B.; LIU, H.; MEGEDE, J. Z.; DONNELLY, J.; RABUSSAY, D.; BARNETT, S.; ULMER, J. B. Potent immunogenicity of an HIV1 gagpol fusion DNA vaccine delivered by in vivo electroporation. **Vaccine**, v. 24, n. 21, p. 4503-4509, 2006.

PAAVONEN, J.; JENKINS, D.; BOSCH, F. X.; NAUD, P.; SALMERON, J.; WHEELER, C. M.; CHOW, S. N.; APTER, D. L.; KITCHENER, H. C.; CASTELLSAGUE, X.; DE CARVALHO, N. S.; SKINNER, S. R.; HARPER, D. M.; HEDRICK, J. A.; JAISAMRARN, U.; LIMSON, G. A.; DIONNE, M.; QUINT, W.; SPIESSENS, B.; PEETERS, P.; STRUYF, F.; WIETING, S. L.; LEHTINEN, M.O.; DUBIN, G.; Efficacy of a prophylactic adjuvanted bivalent L1 virus-like-particle vaccine against infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: an interim analysis of a phase III double-blind, randomised controlled trial. **Lancet**, v. 369, p. 2161-2170, 2007a.

PAAVONEN, J. Human papillomavirus infection and the development of cervical cancer and related genital neoplasias. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 2, p. S3-9, 2007b. Suppl.

PALEFSKY, J. M.; BERRY, J. M.; JAY, N.; KROGSTAD, M.; DA COSTA, M.; DARRAGH, T. M.; LEE, J. Y. A trial of SGN-00101 (HspE7) to treat high-grade anal intraepithelial neoplasia in HIV positive individuals. **AIDS**, v. 20, n. 8, p. 1151-1155, 2006.

PEGGS, K. S.; QUEZADA, S. A.; KORMAN, A. J.; ALLISON, J. P. Principles and use of anti-CTLA4 antibody in human cancer immunotherapy. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 18, n. 2, p. 206-213, 2006.

PHELPS, W. C.; HOWLEY, P. M. Transcriptional trans-activation by the human papillomavirus type 16 E2 gene product. **J. Virol.**, v. 61, p. 1630-1638, 1987.

PISANI, P.; PARKIN, D. M.; BRAY, F.; FERLAY, J. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. **Int. J. Cancer**, v. 83, p. 18-29, 1999.

POGGI, A.; ZOCCHI, M. R. Role of bone marrow stromal cells in the generation of human CD8+ regulatory T cells. **Hum. Immunol.**, v. 69, p. 755-759, 2008.

POLLARA, G.; JONES, M.; HANDLEY, M. E.; RAJPOPAT, M.; KWAN, A.; COFFIN, R.S.; FOSTER, G.; CHAIN, B.; KATZ, D. R. Herpes simplex virus type-1-induced activation of myeloid dendritic cells: the roles of virus cell interaction and paracrine type I IFN secretion. **J. Immunol.**, v. 173, p. 4108-4119, 2004.

PORGADOR, A.; IRVINE, K. R.; IWASAKI, A.; BARBER, B. H.; RESTIFO, N. P.; GERMAIN, R. N. Predominant role for directly transfected dendritic cells in antigen presentation to CD8+ T cells after gene gun immunization. **J. Exp. Med.**, v. 188, n. 6, p. 1075-1082, 1998.

RAMAKRISHNA, L.; ANAND, K. K.; MOHANKUMAR, K. M.; RANGA, U. Codon optimization of the tat antigen of human immunodeficiency virus type 1 generates strong immune responses in mice following genetic immunization. **J. Virol.**; v. 78, p. 9174-9189, 2004.

RESSING, M. E., VAN DRIEL, W. J.; BRANDT, R. M.; KENTER, G. G.; DE JONG, J. H.; BAUKNECHT, T.; FLEUREN, G. J.; HOOGERHOUT, P.; OFFRINGA, R.; SETTE, A.; CELIS, E.; GREY, H.; TRIMBOS, B. J.; KAST, W. M.; MELIEF, C. J. Detection of T helper responses, but not of human papillomavirus-specific cytotoxic T lymphocyte responses, after peptide vaccination of patients with cervical carcinoma. **J. Immunother.**, v. 23, n. 2, p. 255-266, 2000.

RIEZEBOS-BRILMAN, A.; REGTS, J.; CHEN, M.; WILSCHUT, J.; DAEMEN, T. Augmentation of alphavirus vector-induced human papilloma virus-specific immune and anti-tumour responses by co-expression of interleukin-12. **Vaccine**, v. 27, p. 701-707, 2009.

RITZ, U.; MOMBURG, F.; PILCH, H.; HUBER, C.; MAEURER, M. J.; SELIGER, B. Deficient expression of components of the MHC class I antigen processing machinery in human cervical carcinoma. **Int. J. Oncol.**, v. 19, p. 1211-1220, 2001.

RODRIGUEZ, F.; AN, L. L.; HARKINS, S.; ZHANG, J.; YOKOYAMA, M.; WIDEREA, G.; FULLER, J. T.; KINCAID, C.; CAMPBELL, I. L.; WHITTON, J. L. DNA immunization with minigenes: low frequency of memory cytotoxic T lymphocytes and inefficient antiviral protection are rectified by ubiquitination. **J. Virol.**, v. 72, n. 6, p. 5174-5181, 1998.

ROMAN, L. D.; WILCZYNSKI, S.; MUDERSPACH, L. I.; BURNETT, A. F.; O'MEARA, A.; BRINKMAN, J. A.; KAST, W. M.; FACIO, G.; FELIX, J. C.; ALDANA, M.; WEBER, J. S. A phase II study of Hsp-7 (SGN-00101) in women with high-grade cervical intraepithelial neoplasia. **Gynecol. Oncol.**, v. 106, n. 3, p. 558-566, 2007.

ROSENBERG, S. A.; YANG, J. C.; TOPALIAN, S. L.; SCHWARTZENTRUBER, D. J.; WEBER, J. S.; PARKINSON, D. R.; SEIPP, C. A.; EINHORN, J. H.; WHITE, D. E. Treatment of 283 consecutive patients with metastatic melanoma or renal cell cancer using high-dose bolus interleukin 2. **JAMA**, v. 271, n. 12, p. 907-913, 1994.

SANTIN, A. D.; BELLONE, S.; PALMIERI, M.; RAVAGGI, A.; ROMANI, C.; TASSI, R.; ROMAN, J. J.; BURNETT, A.; CORELLI, S.; CANNON, M. J. HPV16/18 E7-pulsed dendritic cell vaccination in cervical cancer patients with recurrent disease refractory to standard treatment modalities. **Gynecol. Oncol.**, v. 100, p. 469-478, 2006.

SCHEIBENBOGEN, C.; SCHMITTEL, A.; KEILHOLZ, U.; ALLGÄUER, T.; HOFMANN, U.; MAX, R.; THIEL, E.; SCHADENDORF, D. Phase 2 trial of vaccination with tyrosinase peptides and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with metastatic melanoma. **J. Immunother.**, v. 23, n. 2, p. 275-281, 2000.

SCHIFFMAN, M. H.; BAUER, H. M.; HOOVER, R. N.; GLASS, A. G.; CADELL, D. M.; RUSH, B. B.; SCOTT, D. R.; SHERMAN, M. E.; KURMAN, R. J.; WACHOLDER, S. et al. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 85, p. 958-964, 1993.

SEO, S. H.; JIN, H. T.; PARK, S. H.; YOUN, J. I.; SUNG, Y. C. Optimal induction of HPV DNA vaccine-induced CD8 T cell responses and therapeutic antitumor effect by antigen engineering and electroporation. **Vaccine**, v. 27, p. 5906-5912, 2009.

SHARMA, R. K.; ELPEK, K. G.; YOLCU, E. S.; SCHABOWSKY, R. H.; ZHAO, H.; BANDURA-MORGAN, L.; SHIRWAN, H. Costimulation as a platform for the development of vaccines: a peptide-based vaccine containing a novel form of 4-1BB ligand eradicates established tumors. **Cancer Res.**, v. 69, n. 10, p. 4319-4326, 2009.

SHEDLOCK, D.J.; WEINER, D.B. DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity. **J. Leukoc. Biol.**, v. 68, p.793-806, 2000.

SHEETS, E. E.; URBAN, R. G.; CRUM, C. P.; HEDLEY, M. L.; POLITCH, J. A.; GOLD, M. A.; MUDERSPACH, L. I.; COLE, G. A.; CROWLEY-NOWICK, P. A. Immunotherapy of human cervical high-grade cervical intraepithelial neoplasia with microparticle-delivered human papillomavirus 16 E7 plasmid DNA. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 188, p. 916-926, 2003.

SLINGLUFF, C. L. JR.; PETRONI, G. R.; YAMSHCHIKOV, G. V.; HIBBITTS, S.; GROSH, W. W.; CHIANESE-BULLOCK, K. A.; BISSONETTE, E. A.; BARND, D. L.; DEACON, D. H.; PATTERSON, J. W.; PAREKH, J.; NEESE, P. Y.; WOODSON, E. M.; WIERNASZ, C. J.; MERRILL, P. Immunologic and clinical outcomes of vaccination with a multiepitope melanoma peptide vaccine plus lowdose interleukin-2 administered either concurrently or on a delayed schedule. **J. Clin. Oncol.**, v. 22, n. 22, p. 4474-4485, 2004.

SPENCE, A.; FRANCO, E.; FERENCZY, A. The role of human papillomaviruses in cancer: evidence to date. **Am. J. Cancer**, v. 4, p. 49-64, 2005.

SPITLER, L. E.; GROSSBARD, M. L.; ERNSTOFF, M. S.; SILVER, G.; JACOBS, M.; HAYES, F. A.; SOONG, S. J. Adjuvant therapy of stage III and IV malignant melanoma using granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. **J. Clin. Oncol.**, v. 18, p. 1614-1621, 2000.

TAKASHIMA, A.; MORITA, A. Dendritic cells in genetic immunization. **J. Leukoc. Biol.**, v. 66, p. 350-356, 1999.

TIGHE, H.; CORR, M.; ROMAN, M.; RAZ, E. Gene vaccination: plasmid DNA is more than just a blueprint. **Immunol. Today.**, v. 19(2), p. 89-97, 1998.

TINDLE, R. W. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v. 2, p. 59-65, 2002.

TOUBAJI, A.; HILL, S.; TERABE, M.; QIAN, J.; FLOYD, T.; SIMPSON, M. R.; BERZOFSKY J. A.; KHLEIF, S. N. The combination of GM-CSF and IL-2 as local adjuvant shows synergy in enhancing peptide vaccines and provides long term tumor protection. **Vaccine**, v. 25, p. 5882-5891, 2007.

TRIMBLE, C.; LIN, C. T.; HUNG, C. F.; PAI, S.; JUANG, J.; HE, L.; GILLISON, M.; PARDOLL, D.; WU, L.; WU, T. C. Comparison of the CD8+ T cell responses and antitumor effects generated by DNA vaccine administered through gene gun, biojector, and syringe. **Vaccine**, v. 21, n. 25-26, p. 4036-4042, 2003.

TRINCHIERI, G.; GEROSA, F. Immunoregulation by interleukin-12. **J. Leukoc. Biol.**, v. 59, n. 4, p. 505–511, 1996.

TSENG, C. W.; HUNG, C. F.; ALVAREZ, R. D.; TRIMBLE, C.; HUH, W. K.; KIM, D.; CHUANG, C. M.; LIN, C. T.; TSAI, Y. C.; HE, L.; MONIE, A.; WU, T. C. Pretreatment with cisplatin enhances E7-specific CD8+ T-Cell-mediated antitumor immunity induced by DNA vaccination. **Clin. Cancer Res.**, v. 14, n. 10, p. 3185-3192, 2008.

TSENG, C.W.; TRIMBLE, C.; ZENG, Q.; MONIE, A.; ALVAREZ, R.D.; HUH, W.K.; HOORY, T.; WANG, M.C.; HUNG, C.F.; WU, T.C. Low-dose radiation enhances therapeutic HPV DNA vaccination in tumor-bearing hosts. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 58(5), p. 737-748, 2009.

TSUNG, K.; MEKO, J. B.; PEPLINSKI, G. R.; TSUNG, Y. L.; NORTON, J. A. IL-12 induces T helper 1-directed antitumor response. **J. Immunol.**, v. 158, p. 3359-3365, 1997.

UPTON, M. P.; PARKER, R. A.; YOUNMANS, A.; MCDERMOTT, D. F.; ATKINS, M. B. Histologic predictors of renal cell carcinoma response to interleukin-2 based therapy. **J. Immunother.**, v. 28, n. 5, p. 488–495, 2005.

VALENZUELA, J.; SCHMIDT, C.; MESCHER, M. The roles of IL-12 in providing a third signal for clonal expansion of naive CD8 T cells. **J. Immunol.**, v. 169, p. 6842-6849, 2002.

VALENZUELA, J. O.; HAMMERBECK. C. D.; MESCHER, M. F. Cutting edge: Bcl-3 up-regulation by signal 3 cytokine (IL-12) prolongs survival of antigen-activated CD8 T cells. **J. Immunol.**, v. 174, p. 600-604, 2005.

VAN DER BURG, S. H.; PIERSMA, S. J.; DE JONG, A.; VAN DER HULST, J. M.; KWAPPENBERG, K. M.; VAN DEN HENDE, M.; WELTERS, M. J.; VAN ROOD, J. J.; FLEUREN, G. J.; MELIEF, C. J.; KENTER, G. G.; OFFRINGA, R. Association of cervical cancer with the presence of CD4+ regulatory T cells specific for human papillomavirus antigens. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 104, p. 12087-12092, 2007.

VAN DOORSLAER, K.; REIMERS, L. L.; STUDENTSOV, Y. Y.; EINSTEIN, M. H.; BURK, R. D. Serological response to an HPV16 E7 based therapeutic vaccine in women with high-grade cervical dysplasia. **Gynecol. Oncol.**, v. 166, p. 208-212, 2009.

VAN DRIEL, W. J.; RESSING, M. E.; KENTER, G. G.; BRANDT, R. M.; KRUL, E. J.; VAN ROSSUM, A. B.; SCHUURING, E., OFFRINGA, R.; BAUKNECHT, T.; TAMM-HERMELINK, A.; VAN DAM, P. A.; FLEUREN, G. J.; KAST, W. M.; MELIEF, C. J.; TRIMBOS, J. B. Vaccination with HPV16 peptides of patients with advanced cervical carcinoma: clinical evaluation of a phase I-II trial. **Eur. J. Cancer**, v. 35, n. 6, p. 946-952, 1999.

VELDMAN, T.; HORIKAWA, I.; BARRETT, J. C.; SCHLEGEL, R. Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. **J. Virol.**, v. 75, p. 4467–4472, 2001.

VIERBOOM, M. P.; FELTKAMP, M. C.; NEISIG, A.; DRIJFHOUT, J. W.; TER SCHEGGET, J.; NEEFJES, J. J.; MELIEF, C. J.; KAST, W. M. Peptide vaccination with an anchor-replaced CTL epitope protects against human papillomavirus type 16-induced tumors expressing the wild-type epitope. **J. Immunother.**, v. 21, p. 399–408, 1998.

VILLA, L. L.; AULT, K. A.; GIULIANO, A. R.; COSTA, R. L.; PETTA, C. A.; ANDRADE, R. P.; BROWN, D. R.; FERENCZY, A.; HARPER, D. M.; KOUTSKY, L. A.; KURMAN, R. J.; LEHTINEN, M.; MALM, C.; OLSSON, S. E.; RONNETT, B. M.; SKJELDESTAD, F. E.; STEINWALL, M.; STOLER, M. H.; WHEELER, C. M.; TADDEO, F. J.; YU, J.; LUPINACCI, L.; RAILKAR, R.; MARCHESE, R.; ESSER, M. T.; BRYAN, J.; JANSEN, K. U.; SINGS, H. L.; TAMMS, G. M.; SAAH, A. J.; BARR, E. Immunologic responses following administration of a vaccine targeting human papillomavirus types 6, 11, 16, and 18. **Vaccine**, v. 24, p. 5571-5583, 2006.

VISCIDI, R. P.; SCHIFFMAN, M.; HILDESHEIM, A.; HERRERO, R.; CASTLE, P. E.; BRATTI, M. C.; RODRIGUEZ, A. C.; SHERMAN, M. E.; WANG, S.; CLAYMAN, B.; BURK, R. D. Seroreactivity to human papillomavirus (HPV) types 16, 18 or 31 and risk of subsequent HPV infection: results from a population-based study in Costa Rica. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 13, p. 324–327, 2004.

VOGEL, F. R.; SARVER, N. Nucleic acid vaccines. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 8(3), p. 406-410, 1995.

VON KNEBEL DOEBERITZ, M.; RITTMÜLLER, C.; AENGENEYNDT, F.; JANSEN-DÜRR, P.; SPITKOVSKY, D. Reversible repression of papillomavirus oncogene expression in cervical carcinoma cells: consequences for the phenotype and E6-p53 and E7-pRB interactions. **J. Virol.**, v. 68, n. 5, p. 2811-2821, 1994.

WAKIMOTO, H.; ABE, J.; TSUNODA, R.; AOYAGI, M.; HIRAKAWA, K.; HAMADA, H. Intensified antitumor immunity by a cancer vaccine that produces granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4. **Cancer Res.**, v. 56, p. 1828-1833, 1996.

WALBOOMERS, J. M.; JACOBS, M. V.; MANOS, M. M.; BOSCH, F. X.; KUMMER, J. A.; SHAH, K. V.; SNIJDERS, P. J.; PETO, J.; MEIJER, C. J.; MUÑOZ, N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **J. Pathol.**, v. 198, p. 12-19, 1999.

WALDMANN, T. A. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 6, p. 595-601, 2006.

WAN, Y. Y.; FLAVELL, R. A. TGF-beta and regulatory T cell in immunity and autoimmunity. *J. Clin. Immunol.*, v. 28, p. 647-659, 2008.

WATFORD, W. T.; MORIGUCHI, M.; MORINOBU, A.; O'SHEA, J. J. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev.*, v. 14, p. 361-368, 2003.

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. Granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor added to a multipeptide vaccine for resected Stage II melanoma. *Cancer*, v. 97, p. 186-200, 2003.

WEINER, D.B.; KENNEDY, R.C. Genetic vaccines. *Sci. Am.*, v. 281(1), p. 50-57, 1999.

WEISS, J. M.; SUBLESKI, J. J.; WIGGINTON, J. M.; WILTROUT, R. H. Immunotherapy of cancer by IL-12-based cytokine combinations. *Expert Opin. Biol. Ther.*, v. 7, p. 1705-1721, 2007.

WERNESS, B. A.; LEVINE, A. J.; HOWLEY, P. M. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*, v. 248, p. 76-79, 1990.

WHEELER, C. M.; KJAER, S. K.; SIGURDSSON, K.; IVERSEN, O. E.; HERNANDEZ-AVILA, M.; PEREZ, G.; BROWN, D. R.; KOUTSKY, L. A.; TAY, E. H.; GARCIA, P. et al. The impact of quadrivalent human papillomavirus (HPV; types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine on infection and disease due to oncogenic nonvaccine HPV types in sexually active women aged 16–26 years. *J. Infect. Dis.*, v. 199, p. 936-94, 2009.

WIDERA, G.; AUSTIN, M.; RABUSSAY, D.; GOLDBECK, C.; BARNETT, S. W.; CHEN, M.; LEUNG, L.; OTTEN, G. R.; THUDIUM, K.; SELBY, M. J.; ULMER, J. B. Increased DNA vaccine delivery and immunogenicity by electroporation in vivo. *J. Immunol.*, v. 164, n. 9, p. 4635-4640, 2000.

WOODMAN, C. B.; COLLINS, S. I.; YOUNG, L. S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat. Rev. Cancer*, v. 7, n. 1, p. 11-22, 2007.

XIN, K. Q.; HAMAJIMA, K.; SASAKI, S.; HONSHO, A.; TSUJI T.; ISHII, N.; CAO, X. R.; LU, Y.; FUKUSHIMA, J.; SHAPSHAK, P.; KAWAMOTO, S.; OKUDA, K.; Intranasal administration of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) DNA vaccine with interleukin-2 expression plasmid enhances cell-mediated immunity against HIV-1. *J. Immunol.*, v. 94, p. 438-444, 1998.

YADAVA, A.; OCKENHOUSE, C. F. Effect of codon optimization on expression levels of a functionally folded malaria vaccine candidate in prokaryotic and eukaryotic expression systems. *Infect. Immun.*, v. 71, p. 4961-4969, 2003.

YAN, J.; HARRIS, K.; KHAN, A. S.; DRAGHIA-AKLI, R.; SEWELL, D.; WEINER, D.B. Cellular immunity induced by a novel HPV18 DNA vaccine encoding an E6/E7 fusion consensus protein in mice and rhesus macaques. **Vaccine**, v. 26, p. 5210-5215, 2008.

YAN, J.; YOON, H.; KUMAR, S.; RAMANATHAN, M. P.; CORBITT, N.; KUTZLER, M.; DAI, A.; BOYER, J. D.; WEINER, D. B. Enhanced cellular immune responses elicited by an engineered HIV-1 subtype B consensus-based envelope DNA vaccine. **Mol. Ther.**, v. 15, p. 411-421, 2007.

YANG, J. C.; SHERRY, R. M.; STEINBERG, S. M.; TOPALIAN, S. L.; SCHWARTZENTRUBER, D. J.; HWU, P.; SEIPP, C. A.; ROGERS-FREEZER, L.; MORTON, K. E.; WHITE, D. E.; LIEWEHR, D. J.; MERINO, M. J.; ROSENBERG, S. A. Randomized study of high-dose and low-dose interleukin-2 in patients with metastatic renal cancer. **J. Clin. Oncol.**, v. 21, n. 16, p. 3127-3132, 2003.

ZERFASS, K.; SCHULZE, A.; SPITKOVSKY, D.; FRIEDMAN, V.; HENGLEIN, B.; JANSEN-DÜRR, P. Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation. **J. Virol.**, v. 69, p. 6389-6399, 1995.

ZHANG, B.; SPANDAU, D. F.; ROMAN, A. S. E5 protein of human papillomavirus type 16 protects human foreskin keratinocytes from UV B-irradiation-induced apoptosis. **J. Virol.**, v. 76, p. 220-231, 2002.

ZHOU, L.; ZHU, T.; YE, X. et al. Long-term protection against HPV E7-positive tumor by a single vaccination of AAV vectors encoding a fusion protein of inactivated E7 of HPV 16/18 and heat shock protein 70. **Hum. Gene Ther.**, v. 21, n. 1, p. 109-119, 2009.

ZUR HAUSEN, H. Papillomavirus infections – a major cause of human cancers. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1288, p. 55-78, 1996.

ZUR HAUSEN, H. Perspectives of contemporary papillomavirus research. **Vaccine**, v. 24, p. S3/iii-iv, 2006.

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.**, v. 21, n. 5, p. 1335-1343, 2009.

ZWAVELING, S.; MOTA, S. C. F.; NOUTA, J.; JOHNSON, M.; LIPFORD, G. B.; OFFRINGA, R.; VAN DER BURG, S. H.; MELIEF, C. J. M. Established human papillomavirus type 16-expressing tumors are effectively eradicated following vaccination with long peptides. **J. Immunol.**, v. 169, p. 350-358, 2002.

ANEXOS

ANEXO A - Súmula Curricular

1 – Formação:

DOUTORAMENTO

Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia

Instituto de Ciências Biomédicas

Universidade de São Paulo

(Fev/2006-presente data)

GRADUAÇÃO

Ciências Biológicas – Bacharelado e Licenciatura

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade de São Paulo

(Fev/2001-Dez/2005)

2 – Produção Científica:

DINIZ, M.O.; FERREIRA, L.C. Biotecnologia e o desenvolvimento de vacinas. Estudos Avançados, no prelo.

DINIZ, M.O.; FERREIRA, L.C. Enhanced anti-tumor effects of a gene gun delivered DNA vaccine encoding the human papillomavirus type-16 (HPV-16) oncoproteins genetically fused to the herpes virus glycoprotein D (gD), manuscrito submetido para publicação.

DINIZ, M.O.; LASARO, M.O.; ERTL, H.C.; FERREIRA, L.C. Immune responses and therapeutic antitumor effects of an experimental DNA vaccine encoding human papillomavirus type 16 oncoproteins genetically fused to herpesvirus glycoprotein D. Clin. Vaccine Immunol., v. 17, n. 10, p. 1576-1583, 2010.

LASARO, M. O.; **DINIZ, M. O.**; REYES-SANDOVAL, A.; ERTL, H. C.; FERREIRA, L. C. Anti-tumor DNA vaccines based on the expression of human papillomavirus-16 E6/E7 oncoproteins genetically fused with the glycoprotein D from human herpes virus-1. Microb. Infection, v. 7, p.1541-1550, 2005.

3- Depósito de patentes:

DINIZ, M.O.; FERREIRA, L.C. Seqüência de ácido nucléico isolada, vetor de expressão, composição imunogênica sinérgica que compreende um vetor de expressão que codifica a proteína E7 do vírus do papiloma humano (HPV) fusionada a proteína gD do vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) e um vetor de expressão que codifica uma citocina e seus usos. Número do depósito no PCT: PCT/BR2010/000290; steembro, 2010.

DINIZ, M.O.; SILVA, C. L.; FERREIRA, L.C. Composição farmacêutica contendo um plasmídeos que expressa a oncoproteína E7 de HPV-16 fusionada a gD do HSV-1 co-administrado com um plasmídeo que expressa IL-2 e seu uso no controle de tumores induzidos pelo HPV-16. Número do depósito no INPI: PI0904880 – 4; setembro, 2009.

4 – Participações em Congressos:

Comunicações em congressos: 10 nacionais e 3 internacionais.

Apresentação oral em congressos: 2 nacionais 1 internacional.

5 – Palestras e Aulas:

Desenvolvimento de uma vacina de DNA contra tumores associados a HPV-16. Disciplina de graduação do Departamento de Microbiologia; Curso de Farmácia; Coordenador: Dr. Luis Carlos de Souza Ferreira; outubro de 2010.

Vacinas de DNA. Curso de vacinas; Coordenador: Dr. Luis Carlos de Souza Ferreira e Dr Maurício Martins Rodrigues; setembro 2010.

Vacinas de Terceira Geração. Disciplina de pós graduação do Departamento de Microbiologia; Curso de vacinas; Coordenador: Dr. Luis Carlos de Souza Ferreira; novembro de 2008.

Vacinas para HPV e câncer cervical. Vacina no Brasil: Produção e Perspectivas. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP. 05 de junho de 2008.

Therapeutic vaccines against tumors induced by Human Papillomavirus type 16 (HPV-16). XVIII Encontro Nacional de Virologia. Búzios, RJ. Outubro, 2007.

Estratégias vacinais utilizadas no controle terapêutico de tumores induzidos pelo HPV-16. XXII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental. Águas de Lindóia, SP. Agosto, 2007.

6– Estágios

Estágio de Doutorado no Exterior (sanduíche) realizado no Instituto Wistar na Universidade da Pennsylvania na Philadelphia (Estados Unidos), sob a supervisão da Prof. Dr. Hildegund C. Ertl. Período de junho/2006-outubro/2006.

Iniciação Científica realizada no Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas no Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas sob a supervisão do Prof. Dr. Luis Carlos de Souza Ferreira. Período de julho2002-dezembro/2005).

7– Prêmios:

1º Colocado Nacional no Prêmio Santander de Empreendedorismo 2009; título do projeto: “G-VAX: um novo tratamento imunoterápico para tumores induzidos por HPV”; novembro/2009.

Menção Honrosa de pós graduação no XXXIII Congress of the Brazilian Society for Immunology – II Extra Section of Clinical Immunology. 18 a 22 de Outubro, 2008. Ribeirão Preto, SP. título do trabalho: “DNA vaccine expressing the HPV oncoproteins E5, E6 and E7 confers prophylactic and therapeutic antitumor effects in mice challenged with TC-1 tumor cells”.

Menção Honrosa de iniciação científica na área de Genética de Microorganismos; 50o Congresso Brasileiro de Genética, título do trabalho: “Propriedades imunológicas e efeito profilático e terapêutico de vacinas genéticas bivalentes contra os vírus do papiloma humano e herpes simplex humano”; Sociedade Brasileira de Genética; Florianópolis, Santa Catarina.

Menção Honrosa de iniciação científica no 12º Simpósio internacional de iniciação científica da USP- Ciências Biológicas e da Saúde; título do trabalho: “Desenvolvimento de uma vacina de DNA bivalente para os vírus do papiloma humano-16 e herpes simplex-1”; Ribeirão Preto, SP

ANEXO B - Artigo no prelo

DINIZ, M. O.; FERREIRA, L. C. S. Biotecnologia e o desenvolvimento de vacinas. Estudos Avançados, 2010. No prelo.

Biotecnologia e o desenvolvimento de vacinas

Mariana de Oliveira Diniz e Luís Carlos de Souza Ferreira

Departamento de Microbiologia,
Instituto de Ciências Biomédicas,
Universidade de São Paulo

Resumo

As vacinas representam a estratégia de intervenção com a melhor relação custo-benefício até hoje aplicada em saúde pública. Avanços biotecnológicos em diversas áreas de pesquisa têm contribuído para o desenvolvimento de formulações mais seguras e eficazes. Além disso, a aplicação de ferramentas biotecnológicas no desenvolvimento de vacinas tem provocado mudanças na maneira como pensamos e produzimos esses reagentes tanto para uso em humanos como em animais. Essas tecnologias trazem perspectivas que, em futuro próximo, vacinas para o controle de doenças infecciosas e degenerativas ainda não passíveis de prevenção possam estar disponíveis. Em particular, vacinas com efeitos terapêuticos, embora representem um enorme desafio a ser vencido, tornam-se cada vez próximas da realidade e, certamente, terão um impacto enorme no tratamento de diversas doenças, como em algumas formas de câncer.

Título de cabeçalho: Biotecnologia e vacinas

Palavras chave: vacinas, biotecnologia, HPV, câncer, vacinas terapêuticas.

Abstract

Biotechnology and vaccine development

Vaccines represent the intervention strategy with the best cost-benefit ratio so far applied in public health. Biotechnological advances in various areas of vaccine research have contributed to the development of safer and more effective formulations. Moreover, application of biotechnology tools to vaccine development has caused changes in the way we think and produce these reagents both for use in humans and animals. Such technologies bring renewed perspectives that, in the near future, vaccines for the control of several non-preventable infectious and degenerative diseases will be available. In particular, the development of vaccines with therapeutic effects, although representing a huge challenge, are getting closer to reality and will have a tremendous impact in the treatment of several diseases such as some cancer forms .

Key words: vaccines, biotechnology, HPV, cancer, therapeutic vaccines.

Biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de vacinas

Um dos impactos causados pela revolução biotecnológica moderna foi uma mudança significativa na maneira como pensamos e desenvolvemos novas vacinas. Tais mudanças refletem avanços na descoberta de novos抗ígenos, adjuvantes, vetores ou sistemas de entrega. Embora boa parte das vacinas atualmente administradas em crianças e adultos ainda seja fruto de metodologias desenvolvidas em meados do século passado, espera-se que os próximos anos tragam um número cada vez maior de novas vacinas mais seguras e eficazes geradas a partir de técnicas de manipulação genética e produção de proteínas recombinantes em sistemas heterólogos. Neste breve relato, discutiremos alguns aspectos dessa mudança de práticas e conhecimentos aplicados ao desenvolvimento de vacinas. Em particular, enfatizaremos pesquisas voltadas para geração vacinas terapêuticas para o controle de tumores e sua aplicação em tumores induzidos pelos vírus do papiloma humano.

A história das vacinas e sua aplicação na prevenção de doenças infecciosas acumulam mais de 200 anos de dedicação e muito trabalho. Iniciada pela genialidade e empirismo direcionados de médicos e pesquisadores, como Edward Jenner e Louis Pasteur, observa-se nessa área um belo exemplo do reducionismo aplicado à prática médica. Desde as primeiras vacinas baseadas em patógenos, sejam eles bactérias ou vírus, atenuados ou inativados, muito reativos e, em alguns casos, pouco eficientes, a pesquisa vacinal moveu-se na direção de empregar frações cada vez menores desses patógenos na busca de aumentar a segurança sem comprometimento da eficácia. Desta forma, é comum classificarmos as vacinas em três grandes grupos (ou gerações) em função das estratégias ou conceitos utilizados na preparação do princípio ativo, os抗ígenos vacinais. As vacinas de primeira geração representam aquelas que empregam na sua composição o agente patogênico na sua constituição completa, mas submetido a tratamentos que levam à inativação ou à atenuação dos microrganismos. Nessa categoria também deve ser destacada a estratégia em que microrganismos não patogênicos derivados de outros hospedeiros são utilizados como抗ígenos para vacinas voltadas para o controle de doenças causadas por patógenos assemelhados. Essa abordagem é bem exemplificada pelas vacinas da varíola, baseada em vírus vaccinia isolados de bovinos, e da vacina contra a tuberculose que também emprega uma bactéria originalmente obtida em bovinos, o *Mycobacterium bovis* (BCG). Nesse grupo destacam-se também as vacinas voltadas para a prevenção da coqueluche ou pertussis (vacinal celular), as vacinas contra varíola, poliomielite, sarampo, rubéola, adenovírus entre outras.

A segunda geração surgiu com a noção de que, em alguns patógenos, a proteção vacinal pode ser obtida após a indução de anticorpos voltados para um único alvo, como uma toxina, responsável pelos sintomas da doença, ou açúcares de superfície que permitem ao sistema imune do hospedeiro neutralizar e eliminar bactérias que de outra forma se propagariam rapidamente antes de serem notadas por nossas principais linhas de defesa imunológica. Nesse grupo, destacam vacinas acelulares que empregam toxoides (toxinas purificadas e inativadas por tratamento químico), proteínas e polissacarídeos purificados, como as anti-tetânica, anti-diftérica, hepatite B e as vacinas voltadas para o controle da meningite meningocócica e da pneumonia.

Por fim, a terceira e mais recente geração de vacinas, parte de um conceito inovador que a diferencia de uma forma radical das outras gerações vacinais. Nessas vacinas empregase a informação genética do patógeno responsável pela codificação de proteínas que representem antígenos relevantes para a proteção. Em geral chamadas de vacinas de DNA ou vacinas gênicas, as vacinas de terceira geração foram descobertas de forma empírica no começo da década de 90 em testes inicialmente voltados para a pesquisa de terapias genéticas no qual se introduz no hospedeiro genes que substituirão a informação genética defeituosa originalmente presente no indivíduo. O conceito vacinal surgiu da observação de que animais inoculados com plasmídeos que transportam genes que são expressos em células tranfectadas, ou seja, células em que o DNA injetado conseguiu penetrar as membranas citoplasmática e nuclear e utilizar o maquinário enzimático necessário à transcrição e tradução, produzem o antígeno, que irá desencadear uma série de respostas imunológicas como anticorpos, fundamentais para garantir a proteção contra patógenos que circulam na corrente sanguínea, células citotóxicas, com potencial de identificar e destruir células infectadas mesmo na ausência de patógenos circulantes, e memória, fundamental para um efeito profilático duradouro. Embora as perspectivas iniciais depositadas nas vacinas de DNA tenham sido frustradas pela baixa imunogenicidade de diversas vacinas submetidas a testes clínicos, os resultados indicam que essas vacinas podem ser instrumentos excelentes para a ativação de respostas imunológicas citotóxicas e, consequentemente, controle de patógenos de replicação intracelular como os vírus, algumas bactérias e certos tipos de câncer.

O advento da biotecnologia moderna, em particular, a disseminação das técnicas de manipulação genética, alterou de diferentes maneiras a pesquisa e o desenvolvimento de vacinas sejam elas de primeira, segunda ou terceira geração. Por meio de estratégias de clonagem gênica e mutagênese podemos gerar microrganismos atenuados (vírus e bactérias)

de forma precisa e com mais segurança. Patógenos atenuados empregados nas vacinas de primeira geração podem reverter ao estado nativo virulento. Como, em muitos casos, não se conhece a natureza da alteração genética sofrida pelo microrganismo durante a atenuação, a possibilidade de reversão à virulência, embora pouco provável, é uma realidade. As técnicas atualmente disponíveis para manipulação genética permitem obter, com relativa facilidade, mutantes atenuados nos quais genes envolvidos com a patogenicidade ou metabolismo primário são inativados de forma a não comprometer a viabilidade do organismo, mas torná-lo incapaz de causar doença. No entanto, os custos elevados envolvidos nos testes clínicos e o uso consagrado de determinadas formulações, como os vírus da poliomielite, sarampo, febre amarela e a bactéria *Mycobacterium tuberculosis*, entre outros, diminuem o interesse de indústrias e laboratórios em investir nessas novas formulações vacinais (Tabela 1).

A biotecnologia revolucionou as vacinas de segunda geração. Em uma fase inicial, essas vacinas se restringiam à utilização de toxinas inativadas, como na vacina para o tétano e a difteria, e em um segundo momento, polissacarídeos purificados. A utilização de proteínas purificadas a partir de vírus ou bactérias se limitava a situações em que era possível cultivar e purificar抗ígenos específicos, como algumas toxinas, ou obtê-los a partir do soro de pacientes infectados, como no caso do vírus da hepatite B. Com o aprimoramento das técnicas de produção de proteínas recombinantes por meio de sistemas de expressão heteróloga, bactérias, leveduras, células de mamíferos e insetos são usadas como fonte para os抗ígenos a serem incorporados nas formulações vacinais. De fato, a fronteira da vacinologia que hoje recebe mais investimentos e desperta interesses tanto pela segurança de uso como no retorno financeiro, está calcada na geração de vacinas de subunidades que utilizam抗ígenos recombinantes. A vacina voltada para o controle da hepatite B e, mais recentemente, a vacina preventiva para infecções com vírus do papiloma humano (HPV) (Tabela 1).

As vacinas de DNA surgiram como resultado dos avanços biotecnológicos em DNA recombinante. A informação genética, responsável pela codificação de抗ígenos com aplicação vacinal, é clonada e propagada em linhagens de *Escherichia coli*, um habitante inofensivo de nossa microbiota intestinal. O procedimento de produção é relativamente simples e menos oneroso do que aquele envolvido na obtenção de proteínas recombinantes. Além disto, algumas características de modulação de resposta imune das vacinas de DNA tornaram-nas um instrumento valioso para o desenvolvimento de vacinas com características terapêuticas. Sem dúvida, mais do que uma vacina específica, as vacinas DNA representam

uma forma alternativa de desenvolver imunoterapias viabilizadas graças à introdução das técnicas de DNA recombinante à pesquisa vacinal (Tabela 1).

Vacinas com propriedades terapêuticas

Vacinas terapêuticas têm como objetivo controlar infecções crônicas ou doenças degenerativas instaladas no indivíduo a ser tratado. Neste aspecto a definição de vacina terapêutica se confunde com o conceito de terapia gênica, particularmente, quando se lança mão de vacinas de DNA ou vetores vivos que, em última instância, introduzem informação genética nas células do hospedeiro que se encarregarão de produzir as proteínas que irão desencadear uma resposta imunológica capaz de reverter o quadro infeccioso ou degenerativo instalado. A base de qualquer vacina terapêutica é, portanto, reverter situações nas quais o sistema imunológico do indivíduo não foi capaz de ativar uma resposta imune na intensidade ou na qualidade adequada o que, em geral, resulta na instalação de um quadro de tolerância imunológica. Evidentemente, a relevância do conceito vacinal terapêutico traz sentido apenas nos casos onde não existam alternativas terapêuticas disponíveis mais eficientes. Além disso, para que uma vacina terapêutica possa ter sucesso, deve haver evidências de que a doença e, consequentemente, o patógeno que a causou, possam ser controlados pelo sistema imunológico do indivíduo, uma vez que ativado corretamente, como no caso de doenças crônicas como aquelas causadas pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), o vírus herpes humano (HSV), o vírus da hepatite B (HBV) e o vírus do papiloma humano (HPV).

Avanços no conhecimento dos mecanismos da imunidade permitiram estabelecer parâmetros importantes para uma vacina com propriedades terapêuticas. Particularmente, a caracterização do papel funcional de linfócitos T citotóxicos, assim como de outras células minoritárias do sistema imunológico com funções semelhantes, representou um passo importante para o avanço de pesquisas voltadas para o desenvolvimento de vacinas terapêuticas. Ao reconhecer e destruir células infectadas ou alteradas na sua composição antigênica, linfócitos CD8+ T citotóxicos representam uma formidável barreira contra patógenos que evadem outros mecanismos de defesa imunológica, como os anticorpos e o complemento, ao penetrarem e se multiplicarem no interior de células do hospedeiro.

Nos últimos anos, diversos grupos de pesquisa têm se dedicado à busca de formulações vacinais capazes de ativar de forma eficiente e duradoura linfócitos T CD8+ citotóxicos, capazes de reconhecer e destruir células que expressem na sua superfície

fragmentos de抗ígenos derivados de patógenos virais, bacterianos ou parasitários que se multiplicam em seu interior. De forma semelhante, vacinas com propriedades anti-câncer tem sido investigadas há várias décadas na esperança de se encontrar alternativas mais eficazes e menos invasivas para o tratamento de alguns tipos de câncer. Em alguns casos, o tratamento de alguns tipos de câncer se torna mais propício para uma abordagem vacinal terapêutica em função de uma origem infecciosa, como por exemplo tumores associados à infecção com os vírus HBV e HPV. Nos dois casos, a disponibilidade de vacinas com características profiláticas voltadas para o controle da infecção pelos vírus torna a questão da viabilidade e relevância das vacinas terapêuticas mais complexa e, em determinadas situações, geram polêmicas interessantes sobre o papel de cada uma no controle de determinadas doenças. Neste aspecto, a recente comercialização de vacinas profiláticas para o controle do HPV e a busca de uma alternativa vacinal com características terapêuticas para tumores associados à infecção por esse vírus representa um exemplo que merece ser analisado.

A busca de uma vacina terapêutica para o controle de tumores associados ao HPV-16

Atualmente, está bem estabelecido que o vírus do papiloma humano (HPV) é o principal agente etiológico do câncer cervical, além de outros tipos de câncer como tumores anogenitais e de cabeça e pescoço. Em relação ao câncer cervical, o vírus HPV está associado a praticamente todos os casos observados. Este tipo de câncer apresenta grande relevância epidemiológica, representando a segunda causa de morte por câncer em mulheres no mundo, causando, aproximadamente, 270.000 mortes por ano, e cerca de 500.000 novos casos são diagnosticados anualmente (ZUR HAUSEN , 2009).

Mais de 100 tipos de HPV foram descritos e podem ser classificados de acordo com seu potencial oncogênico. Alguns tipos de HPV podem causar verrugas genitais e lesões benignas de baixo grau, sendo chamados de genótipos de baixo risco, sendo os HPV-6 e HPV-11, os mais prevalentes. Os tipos de HPV associados ao desenvolvimento de tumores do colo do útero são chamados de alto risco e os mais frequentemente encontrados são os HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33 e HPV-45. Os vírus HPV-16 e HPV-18 são os tipos mais comumente associados ao câncer cervical, somando 75% da incidência dos casos desse tipo de câncer, sendo o HPV-16 o mais prevalente no Brasil e na maioria dos países (BOSCH *et al*, 1995). Consequentemente, esses dois tipos de HPV, particularmente o HPV-16, têm sido

usados como modelo para o desenvolvimento de estratégias vacinais, sejam elas profiláticas ou terapêuticas.

Compreender a biologia molecular do vírus HPV é essencial ao desenvolvimento de vacinas. Os HPVs não são envelopados e seu genoma é representado por uma dupla fita de DNA. O genoma desse vírus codifica para duas proteínas de expressão tardia, L1 e L2 (L, do inglês *late*), que compõem o capsídeo viral, e seis proteínas com funções reguladoras: E1, E2, E4, E5, E6 e E7 (E, do inglês *early*). Em particular, as proteínas E6 e E7 dos HPVs de alto risco atuam na malignização celular por ligação ou inativação dos produtos de genes supressores de tumores, as proteínas p53 e pRb, respectivamente (DYSON, 1998). Desta forma, células infectadas por HPVs de alto-risco podem desenvolver instabilidade genômica e replicação descontrolada que podem progredir para um câncer.

Como o câncer cervical é causado por um tipo de infecção viral, seria esperado que uma vacina capaz de gerar anticorpos neutralizantes dirigidos contra as proteínas do capsídeo viral L1 e/ou L2 bloqueiem a entrada do vírus, e com isto, reduzam a incidência de câncer em longo prazo. Duas vacinas profiláticas baseadas em VLPs (Virus like particles) formados pelas proteínas L1 de HPV-6, -11, -16 e 18 (Gardasil) ou HPV-16 e -18 (Cervarix) estão disponíveis no mercado. Essas vacinas têm se mostrado extremamente eficientes na indução de anticorpos neutralizantes para os vírus. Espera-se, portanto, que indivíduos imunizados com essas vacinas estejam protegidos contra a infecção pelos tipos virais usados no preparo das VLPs e, consequentemente, não venham a desenvolver câncer de colo uterino no futuro. No entanto, em função da grande variabilidade natural a imunidade é específica para os vírus utilizados para gerar as VLPs.

Mulheres que possuem lesões de alto grau ou tumores induzidos por HPV, não geram partículas virais e, portanto, não seriam beneficiadas pela estratégia vacinal baseada em VLPs. Ao penetrar na célula epitelial, o vírus se integra ao genoma celular e deixa de se replicar. A síntese das proteínas L é totalmente bloqueada, mas a síntese de algumas proteínas reguladoras, particularmente, as oncoproteínas E6 e E7 permanece inalterada. Para esses casos, se mostra necessário a busca de vacinas voltadas para o controle das lesões induzidas pelo HPV. Tais vacinas com características terapêuticas devem privilegiar a indução de respostas citotóxicas, de forma a levar ao reconhecimento e à morte de células infectadas. Os principais alvos para esse tipo de vacina são as proteínas E6 e E7, expressas constitutivamente nas células do carcinoma cervical.

Ainda não existem vacinas terapêuticas para tumores induzidos por HPV disponíveis no mercado, mas diversas formulações são investigadas em modelo animal e algumas já se encontram na fase de testes clínicos. Diversas abordagens foram empregadas para o desenvolvimento de uma vacina com tais características, como aquelas baseadas em peptídeos sintéticos, proteínas purificadas, vetores virais ou bacterianos, e mesmo células dendríticas ou tumorais, entre outras. Nesse contexto, as vacinas de DNA surgem como uma estratégia interessante para a geração de respostas imunes antígeno-específicas que, por sua capacidade de indução de respostas citotóxicas, atuariam somente sobre as células tumorais evitando efeitos colaterais como observados nos tratamento de radio e quimioterapia atualmente empregados.

Alguns grupos que pesquisam vacinas de DNA para o controle de tumores induzidos por HPV buscam estratégias que aumentem a imunogenicidade das formulações vacinais. Neste contexto, o uso de adjuvantes ou construções que expressem proteínas híbridas em que as oncoproteínas de HPV são fusionadas a antígenos que aumentem a imunogenicidade para respostas citotóxicas tem recebido particular atenção. Uma alternativa promissora é representada por vacinas de DNA que codificam proteínas de HPV geneticamente fusionadas à glicoproteína D (gD) do vírus Herpes simplex tipo I (HSV). A proteína gD possui uma região transmembrana e, desta forma, as oncoproteínas do HPV-16 a ela fusionadas são direcionadas à membrana das células transfetadas, reduzindo drasticamente os riscos de interação com proteínas de ciclo celular e as expondo ao sistema imunológico de forma mais eficiente.

Outros papéis adjuvantes atribuídos à proteína gD foram descritos e estão associados à capacidade de ligar-se ao receptor HVEM (Herpes vírus entry mediator), pertencente a família dos receptores de fatores de necrose tumoral (TNFR). Pela interação com esse receptor foi demonstrado que a proteína gD gera sinais de estímulo para células do sistema imune por meio da ativação de um fator transacional, o NF-κB (CHEUNG *et al.*, 2009). Além disso, a proteína gD aumenta a imunogenecidade de proteínas a ela fusionadas por exercer uma competição com outra proteína de membrana denominadas BTLA (B and T lymphocyte attenuator), uma fator inibidor que suprime a ativação de linfócitos B e T por células apresentadoras de antígeno, para um mesmo sítio de ligação que as duas proteínas possuem em um outro receptor celular denominado HVEM (Herpes vírus entry mediator). Como resultado final, células que expressam a proteína gD na superfície reduzem os efeitos

inibitórios de BTLA e promovem uma ativação mais eficiente de linfócitos B e T (LASARO *et al.*, 2008).

O uso de vacinas de DNA que codificam para oncoproteínas do HPV-16 fusionadas à proteína gD do HSV-1 foi proposto pelo nosso grupo como estratégia para o controle de tumores induzidos pelo HPV-16 (LASARO et al, 2005). Essas vacinas foram testadas em camundongos frente à sua capacidade de ativar células T CD8⁺ antígeno-específicas e proteção à formação de tumores após o implante de células epiteliais modificadas para expressar as proteínas E6 e E7 de HPV-16, chamadas de células TC-1. Os animais imunizados com essas vacinas apresentaram indução de células CD8⁺ E7 específicas e 40% de efeito anti-tumoral terapêutico à formação de tumores após receber quatro doses das vacinas. Nesses ensaios as células tumorais são implantadas no animal e, algum tempo depois, inicia-se o tratamento com a vacina de DNA caracterizando, desta forma, o efeito vacinal terapêutico.

A estratégia vacinal contra os tumores causados por HPV-16 foi aprimorada com a construção de uma nova vacina de DNA que expressa as oncoproteínas E5, E6 e E7 do HPV-16 fusionadas à gD do HSV-1 (DINIZ et al, 2010). Os ensaios para verificação da ativação de células T CD8⁺ específicas para as oncoproteínas do HPV-16 mostraram que apenas uma dose da vacina foi suficiente para gerar ativação significativa de células CD8⁺ específicas para E6 e E7- (Fig 1A). A vacina foi capaz de gerar 100% de proteção contra tumores em animais que primeiramente foram imunizados e, subsequentemente, desafiados com as células TC-1. O efeito anti-tumoral da vacina foi associado à participação de células T CD8⁺, mas não o de células T CD4⁺, em ensaios nos quais essas populações celulares foram removidas diferencialmente com anticorpos (Fig 1B). Além disso, com esse vetor foi possível obter 70% de proteção em camundongos desafiados com células TC-1 e, posteriormente, imunizados com três doses da vacina.

Citocinas relacionadas à ativação ou proliferação de células do sistema imune podem ser empregadas como estratégia alternativa para aumentar a resposta induzida por uma vacina de DNA. Tomando por base estudos anteriores, desenvolvemos uma terceira versão das vacinas de DNA para tumores induzidos por HPV-16, que emprega a co-administração de plasmídeos que expressam as citocinas IL-12 ou GM-CSF em combinação com os plasmídeos que expressam a E7 ou E7E6E5 de HPV-16 fusionados à gD de HSV-1. Utilizando esse sistema de imunização combinado, foi possível obter um efeito protetor terapêutico máximo,

ou seja, 100% de camundongos livres de tumor, com a co-administração tanto do plasmídeo que expressa IL-12 ou GM-CSF com o plasmídeo que expressa o antígeno alvo(Fig 2). De forma, marcante o aumento do efeito anti-tumoral da vacina permitiu a redução do número de doses da vacina necessária à eliminação completa dos tumores e com apenas uma dose foi possível conferir proteção terapêutica a todos os animais implantados com células tumorais.

As evidências geradas por esses estudos demonstram que a estratégia vacinal proposta se mostra muito promissora como uma alternativa imunológica para o controle de tumores induzidos por HPV-16, com resultados superiores aos publicados na literatura para outras formulações testadas em modelo animal. Estudos adicionais estão sendo realizados no sentido viabilizar o teste das as formulações em condições clínicas. Para isso, modificações adicionais serão necessárias de forma a permitir aumento de imunogenicidade em seres humanos e redução de reações inflamatórias pelo uso de material obtido em condições de boas práticas de produção.

Considerações finais

A biotecnologia tem contribuído de forma decisiva para o aprimoramento de processos relacionados ao desenvolvimento e à produção de novas vacinas ou ao aprimoramento de vacinas já existentes para que se tornem mais seguras e eficazes. A disponibilização de vacinas profiláticas e a perspectiva de desenvolvimento de vacinas com efeito terapêutico para tumores associados ao HPV ilustram de forma clara o impacto que a biotecnologia moderna traz para o campo da pesquisa vacinal. Dados epidemiológicos divulgados pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) revelam que no Brasil a cada 100 mil mulheres cerca de 20 desenvolvem câncer de colo uterino. Ao todo são diagnosticados 20 mil novos casos por ano, uma incidência duas vezes maior do que a registrada em países mais desenvolvidos. Esses dados destacam o impacto que vacinas voltadas para o controle de tumores associados ao HPV podem ter no país.

A disponibilização de vacinas profiláticas para a infecção com dois tipos de HPV criou uma grande expectativa sobre uma futura redução no número de vidas perdidas para a doença e na redução do custo econômico associado ao tratamento de pessoas com lesões em estágios mais avançados do câncer. A realidade, no entanto, demonstra que o maior impacto das formulações vacinais lançadas no mercado tem sido econômico, mas para as companhias farmacêuticas que as produzem. O custo elevado da vacina (aproximadamente U\$1.000,00)

por pessoa tem permitido aos fabricantes obter lucros superiores a 3 bilhões de dólares anuais, fato que tem despertado o interesse de muitos laboratórios em investir em vacinas capazes de conferir retornos financeiros elevados. Por outro lado, a real contribuição dessas vacinas para a redução do impacto da doença no mundo é ainda uma dúvida, pois as pessoas atendidas são as menos propensas a sentir os desdobramentos mais sérios da doença.

O desenvolvimento de uma vacina com propriedades terapêuticas para controle do câncer associado à infecção pelo HPV traz perspectivas interessantes em relação ao real benefício em termos de controle da doença. Ao contrário das vacinas profiláticas, espera-se que as vacinas terapêuticas confirmem proteção a diversos tipos de HPV e previnam o surgimento de tumores em indivíduos já infectados. A disponibilização do tratamento, assim que comprovada sua eficácia terapêutica em ensaios clínicos, para o sistema público de saúde poderá ter um impacto imediato na redução no número de mortes associadas à doença além de reduzir drasticamente o custo e os traumas associados ao tratamento de tumores em estágios avançados de crescimento. No entanto, como toda pesquisa em estágio inicial de desenvolvimento, o aporte de recursos necessários à comprovação dos efeitos clínicos é fundamental para que tais perspectivas possam ser concretizadas.

Referências

- Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. (1995). Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. **J Natl Cancer Inst;**87:796-802.
- Cheung, TC, Steinberg, MW, Oborne, LM, Macauley, MG, Fukuyama, S, Sanjo, H, D'Souza, C, Norris, PS, Pfeffer, K, Murphy, KM, Kronenberg, M, Spear, PG, Ware, CF (2009). Unconventional ligand activation of herpesvirus entry mediator signals cell survival. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, 106: 6244-6249.,
- Croft, M. (2004). The evolving crosstalk between co-stimulatory and co-inhibitory receptors: HVEM-BTLA. **Trends Immunol.**, 26:292-294.,
- Diniz MO, Lasaro MO, Ertl HC, Ferreira LCS. (2010). Immune responses and therapeutic antitumor effects of an experimental DNA vaccine encoding human papillomavirus type 16 oncoproteins genetically fused to herpesvirus glycoprotein D. **Clin Vac Immunol**, 17: 1576-1583.
- Dyson, N. (1998). The regulation of E2F by pRB-family proteins. **Genes Dev.**, v. 12(15), p. 2245-22462.,
- Lasaro MO, Diniz MO, Reyes-Sandoval A, Ertl HC, Ferreira LC. (2005). Anti-tumor DNA vaccines based on the expression of human papillomavirus-16 E6/E7 oncoproteins genetically fused with the glycoprotein D from human herpes virus-1. **Microb Infection;**7:1541-1550.
- Lasaro MO, Tatsis N, Hensley SE, Whitbeck JC, Lin SW, Rux JJ, et al. (2008). Targeting of antigen to the herpesvirus entry mediator augments primary adaptive immune responses. **Nat Med;**14:205-212.
- zur Hausen, H. (2009). Papillomaviruses in the causation of human cancers – a brief historical account. **Virology**, 384:260-265.

Tabela 1: Principais contribuições da biotecnologia no desenvolvimento de vacinas.

Tipo vacinal	Estratégia biotecnológica	Vacinas
Vacinas de subunidades	Produção de proteínas recombinantes em sistemas heterólogos	Hepatite B, pertussis acelular, HPV
Patógenos atenuados bivalentes	Manipulação genética para inserção de genes que codifiquem抗ígenos	Dengue*, BCG*, <i>Salmonella</i> Typhi* Adenovirus*
Vacinas de DNA	Imunização com plasmídeos recombinantes	Vacina contra melanoma#

*, vacinas ainda não disponíveis para uso em humanos;

#, vacina para uso em cães.

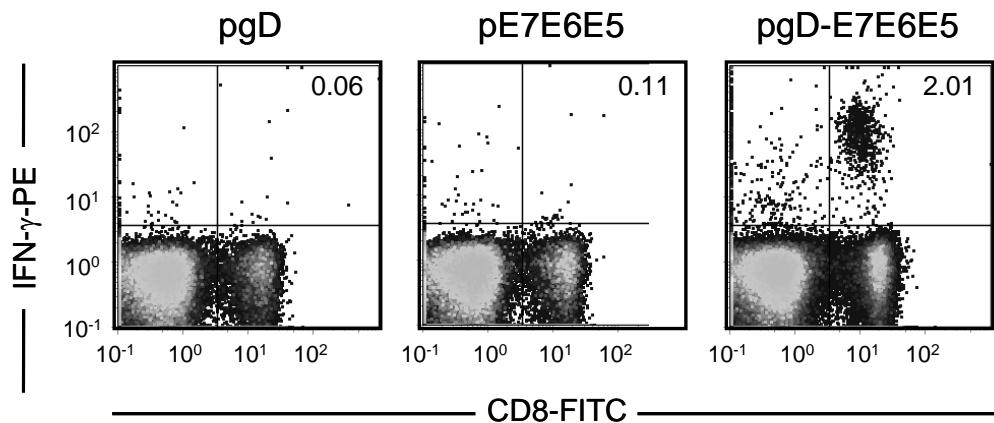
Legendas das figuras

Figura 1: Ativação de precursores de células T CD8⁺ E7-específicas e proteção preventiva contra tumores formados por células TC-1 em camundongos imunizados por via parenteral (intramuscular) com o vetor pgD-E7E6E5. (A) Ativação de precursores de células T CD8⁺ em camundongos imunizados com uma dose dos vetores pgD, pE7E6E5 ou pgD-E7E6E5 pela via i.m. (100 µg/dose). As porcentagens de células CD8⁺ IFN-γ⁺ / CD8⁺ total foram determinadas duas semanas após a última dose da vacina. A detecção de células T CD8⁺ E7-específicos foi feita com PBMCs estimuladas com peptídeo sintético derivado da proteína E7 (49RAHYNIVTF₅₇) específico para MHC-I e marcadas com anticorpos anti-CD8 (FITC) e IFN-γ intracelular (PE). (B) Proteção vacinal preventiva para o desenvolvimento de tumores em camundongos imunizados com uma dose do pgDE7E6E5, com depleção de células CD4 ou CD8 através da inoculação de anticorpos específicos. Os camundongos foram desafiados com 5 x 10⁵ células TC-1 tumorais duas semanas após a administração da vacina.

Figura 2: Co-administração do vetor pgDE7 e plasmídeos que codificam para IL-12 ou GM-CSF confere proteção terapêutica a desafios de células TC-1. Os camundongos foram imunizados com três doses (100µg) pgDE7 combinado com 100µg de pcDNA3.1 (vetor vazio), os vetores pGM-CSF ou pIL-12. As vacinas foram administradas 8h após o desafio com 5 x 10⁵ células TC-1. O crescimento tumoral foi monitorado até 60 dias após o desafio.

Figura 1

A



B

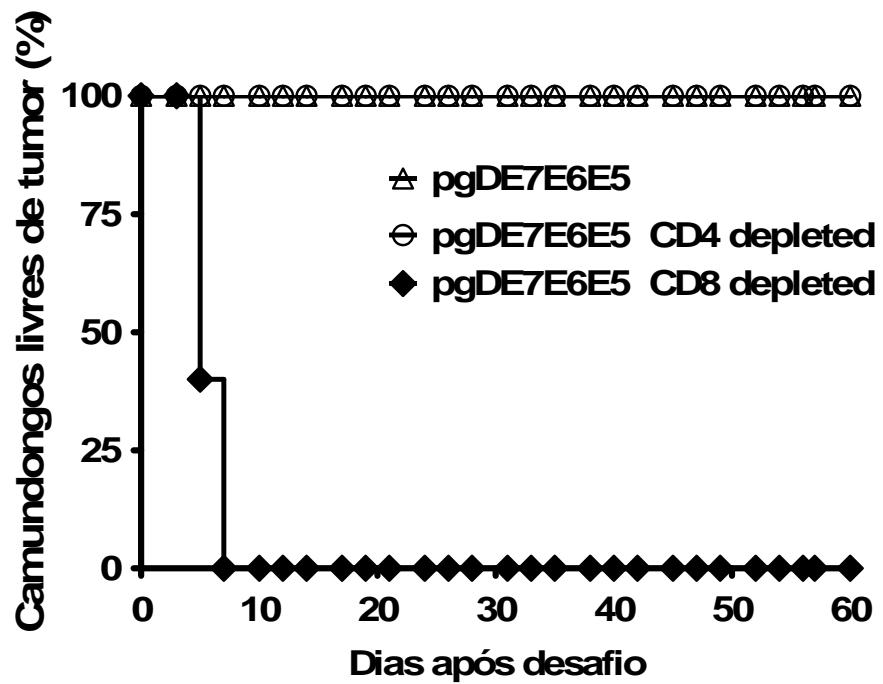


Figura 2