MARIÂNGELA DE OLIVEIRA SILVA

DIRECIONAMENTO DE ANTÍGENOS PARA CÉLULAS DENDRÍTICAS COMO ESTRATÉGIA IMUNOTERAPÊUTICA PARA O CONTROLE DE TUMORES INDUZIDOS POR HPV

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências

São Paulo 2021

MARIÂNGELA DE OLIVEIRA SILVA

DIRECIONAMENTO DE ANTÍGENOS PARA CÉLULAS DENDRÍTICAS COMO ESTRATÉGIA IMUNOTERAPÊUTICA PARA O CONTROLE DE TUMORES INDUZIDOS POR HPV

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Luís Carlos de Souza Ferreira

Co-orientação: Silvia Beatriz Boscardin

Versão Original

São Paulo 2021

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Silva, Mariângela de Oliveira Direcionamento de antígenos para células dendríticas como estratégia imunoterapêutica para o controle de tumores induzidos por HPV / Mariângela de Oliveira Silva; orientador Luís Carlos de Souza Ferreira; coorientadora Silvia Beatriz Boscardin. --São Paulo, 2021. 147 p. Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas. 1. imunoterapia. 2. HPV. 3. Células dendríticas. 4. receptor DEC205. I. Ferreira, Luís Carlos de Souza, orientador. II. Boscardin, Silvia Beatriz, coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Mariângela de Oliveira Silva

Título da Tese: Direcionamento de antígenos para células dendríticas como estratégia imunoterapêutica para o controle de tumores induzidos por HPV

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...., considerou o(a) candidato(a):

() Aprovado(a) () Reprovado(a)

Examinador(a)

| | Assinatura: |
|----------------|--------------|
| | Nome: |
| | Instituição: |
| Examinador(a): | |
| | Assinatura: |
| | Nome: |
| | Instituição: |
| Examinador(a): | |
| | Assinatura: |
| | Nome: |
| | Instituição: |
| Presidente: | |
| | Assinatura: |
| | Nome: |
| | Instituição: |



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000 CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "DIRECIONAMENTO DE ANTÍGENOS PARA CÉLULAS DENTRÍTICAS COMO ESTRATÉGIA IMUNOTERAPÊUTICA PARA O CONTROLE DE TUMORES INDUZIDOS POR HPV", registrado sob o protocolo nº **80/2016**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **11/10/2016** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: Dr.(a.) Luis Carlos de Souza Ferreira

- Departamento: Microbiologia

- Membros da Equipe: Jamile Ramos da Silva (Pós-graduando), Mariana de Oliveira Diniz (Pós-doutorando), Natiely Silva Sales (Pós-graduando), Mariângela de Oliveira Silva (Pós-graduando)

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico <u>www.icb.usp.br/ceua</u>. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "ANTIGENS OF TARGETING FOR DENDRITIC CELLS AS IMMUNOTHERAPEUTIC STRATEGY FOR TUMORS CONTROL HPV-INDUCED", protocol nº 80/2016, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on 10/11/2016 by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for 4 year(s) from the date of approval.

- Principal Investigator: Dr.(a.) Luis Carlos de Souza Ferreira

- Team members: Jamile Ramos da Silva (Graduate Student), Mariana de Oliveira Diniz (Postdoctoral Researcher), Natiely Silva Sales (Graduate Student), Mariângela de Oliveira Silva (Graduate Student).

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

| Espécie/Species | Linhagem/Strain | Sexo/Gender | Idade-Peso/ Age-Weight | Total |
|-----------------|-----------------|--------------|------------------------|-------|
| Mus musculus | C57BL/6 | Fêmea/female | 20 g | 400 |

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes Coordenador CEUA-ICB/USP São Paulo, 14 de outubro de 2016.

Eliane gone

Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento Secretária CEUA-ICB/USP





Uso de animais para experimentação

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que

Mariângela de Oliveira Silva

participou do Curso "Uso de Animais em Experimentação" com carga horária total de 10 horas, em formato ensino a distância, realizado pela Comissão de Biotérios do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

São Paulo, 2 janeiro 2019 Comissão de Biotérios ICB USP

Instituto de Ciências Biomédicas | USP Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 • Cidade Universitária "Armando Salles Oliveira" • Butantã – São Paulo – SP • CEP 05508-900 Declaração de participação do curso Biossegurança e Boas Práticas de Laboratório do ICB



Declaramos para os devidos fins que

Mariângela de Oliveira Silva

participou do Curso "Biossegurança e Boas Práticas de Laboratório do ICB", realizado pela Comissão Interna de Biossegurança do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com carga horária total de 6 horas.

São Paulo, 2 janeiro 2019 Comissão Interna de Biossegurança ICB USP

Instituto de Ciências Biomédicas | USP Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 • Cidade Universitária "Armando Salles Oliveira" • Butantã – São Paulo – SP • CEP 05508-900





Declaro, para os devidos fins, que

Mariângela de Oliveira Silva

concluiu o Curso "Armazenamento, Manuseio e Descarte de Produtos Químicos", realizado no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

São Paulo, 2 janeiro 2019 (Declaração válida por 5 anos)

Profa. Dra. Katiucia Batista da Silva Paiva Presidente da Comissão de Resíduos Químicos

()

Prof. Dr. Luis Carlos de Souza Ferreira Diretor do ICB

Instituto de Ciências Biomédicas | USP Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 • Cidade Universitária "Armando Salles Oliveira" • Butantã – São Paulo – SP • CEP 05508-900

Dedico este trabalho A Deus, meu refúgio e fortaleza,

Aos meus pais, Maria Nilza e Uilson, Á minha irmã, Marciele E ao Gabriel, Por todo amor e zelo.

AGRADECIMENTOS

Como dizia Isaac Newton: "Se cheguei até aqui foi porque me apoiei no ombro dos gigantes". Durante essa trajetória, não foram poucos os gigantes de conhecimento, de amor, de apoio e de alma que eu encontrei. Por isso, quero aqui, verbalizar toda a minha gratidão aos que estiveram ao meu lado.

À Deus, meu refúgio e fortaleza, por me dar a chance de alcançar (esse) meus sonhos e por ter me dado força para seguir a diante mesmo quando tudo não parecia ir bem.

Ao meu orientador, Prof. Luís Carlos de Souza Ferreira, pela oportunidade de desenvolver este trabalho, pela competência e sobretudo por contribuir imensuravelmente com o meu desenvolvimento científico. Expresso aqui todo meu orgulho, gratidão, carinho e admiração.

À minha co-orientadora, Profa. Silvia Beatriz Boscardin, a qual prezo muito, pela ajuda essencial nesse trabalho. Obrigada pela orientação, pelos conselhos científicos ou não, e pela oportunidade de aprender sempre mais a cada reunião.

À Mari Diniz, por ter me ajudado a "dar os primeiros passos" dentro do laboratório. Obrigada pela dedicação, compromisso, conselhos e exemplo de pesquisadora. Eu sou extremamente grata pelos seus ensinamentos!

À Profa. Rita de Cássia Café, pelo acolhimento no laboratório e pelos momentos de alegria!

Às HPVetes, Ana Carolina (Carol), Bruna (Bru), Luana (Lu), Jamile (Mile), Karine (Ká), Natiely (Naty), as que não estão mais no laboratório: Patrícia (Pati), Tácita (Tatá), Carina, Laís e Roberta, e ao Guilherme (Gui). Obrigada pelo companheirismo, amizade, pela imensa ajuda na elaboração e execução de experimentos, pelas discussões científicas e principalmente por dar significado a palavra grupo! Tive o privilégio de participar desse grupo e tenho muito orgulho em dizer que, de diferentes maneiras, cada um(a) contribuiu com meu amadurecimento científico e tornando possível esse projeto!

Aos amigos, colegas e ex-colegas do LDV (Aléxia, Maria Fernanda, Rubens, Lennon, Samuel Nayara, Lucas, Fagner, Mônica, Marianna Favaro, Eric, Samantha, Robert, Helic, Dalva, Denicar, Juliana e Sara) pelos momentos de descontração, pelos cafés, por todos os ensinamentos e discussões científicas. Obrigada pelo acolhimento e pela oportunidade de aprender com cada um!

À toda a equipe do Laboratório de direcionamento de antígenos, em especial, a Bianca, Marcio e Fernando, que me ajudaram nas clonagens, expressão dos anticorpos e na citometria de fluxo. Vocês foram muito importantes para o desenvolvimento deste trabalho.

À Maria Fernanda, querida Fê, que com cuidado e afago, deixaram os meus dias mais calorosos e felizes.

Aos meus amigos baianos ou não, conquistados durante esses anos: Aléxia, Bia, Naty, Sam, Lennon, Pati, Tatá, Jamile e Karine (e Greg) que me acolheram como uma família, me dando suporte emocional e fazendo dessa jornada mais leve e divertida. Amo vocês!

Ao Eduardo Gimenez (Edu), responsável técnico do laboratório, por toda imensurável ajuda durante esse período e por ter tanto contribuído com avanço deste e de outros trabalhos do LDV. Obrigada por tudo, Edu!

À Gisele, secretária da Pós-graduação do Departamento de Microbiologia, que esteve solícita durante todos esses anos. Obrigada por toda ajuda!

Aos funcionários dos biotérios dos Departamentos de Parasitologia e Microbiologia, pela atenção e competência no manejo dos camundongos.

Às agências de financiamento FAPESP, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

Aos meus pais, Maria Nilza e Uilson e a minha irmã, Marciele, por todo amor, compreensão e paciência. Painho e mainha, obrigada por todo o apoio e incentivo, por sempre prezarem pela educação das suas filhas, sem medir esforços. Sem dúvida, foi por vocês e pensando em vocês que eu cheguei até aqui. Obrigada pelas orações e estímulos diários, que me deram força pra seguir a diante. E obrigada a toda minha família que mesmo a distância, sempre me apoiaram, se orgulharam e torceram pelo meu melhor.

Ao Gabriel, meu namorado e companheiro, pela paciência, amor, compreensão e por sempre acreditar no meu potencial!

A todos que colaboraram, direta ou indiretamente, para a conclusão deste trabalho, meus sinceros agradecimentos!

Este trabalho foi realizado sob orientação do Professor Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira, no Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas, nos Departamentos de Microbiologia e Parasitologia, do Instituto de Ciências Biomédicas II, da Universidade de São Paulo, e contou com o apoio das agências financiadoras Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), sob os processos FAPESP/CAPES n° 1625877, 2016/11397-7 e 2018/07629-5

"Que os nossos esforços desafiem as impossibilidades. Lembrai-vos de que as grandes proezas da história foram conquistadas do que parecia impossível". - CHARLES CHAPLIN.

RESUMO

SILVA, M. O. Direcionamento de antígenos para células dendríticas como estratégia imunoterapêutica para o controle de tumores induzidos por HPV. 147 f. Tese (Doutorado em Microbiologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

As doencas causadas por infeccões persistentes por HPV, como o câncer cervical, representam um grave problema de saúde pública no mundo e correspondem a um dos maiores causadores de mortes relacionadas a tumores em mulheres. Neste sentido, a busca por novas abordagens terapêuticas para esse tipo de câncer é uma prioridade. A geração de vacinas anticâncer bem-sucedidas depende da capacidade de induzir respostas imunes contra antígenos tumorais. Neste cenário, o direcionamento de antígenos para as células dendríticas (DCs) representa uma abordagem promissora, capaz de aumentar a eficiência de imunoterapias antitumorais. No presente estudo, utilizamos anticorpos monoclonais (mAbs) capazes de direcionar antígenos para uma população específicas de DCs, as DCs CD8α⁺ DEC205⁺. Para isso, anticorpos monoclonais aDEC205 foram fusionados geneticamente à oncoproteína E7 do HPV-16 afim de criar uma vacina capaz de tratar tumores associados ao HPV. A eficácia terapêutica dos mAbs αDEC205-E7 foi avaliada utilizando o modelo de células TC-1 implantadas em três sítios anatômicos distintos (subcutâneo, cavidade oral e intravaginal). O regime de imunização compreendeu duas doses do mAb aDEC205-E7 coadministrado com o adjuvante Poly (I:C). A formulação vacinal produziu efeitos antitumorais robustos nos modelos de implante subcutâneo e ortotópicos, estimulando a regressão rápida do tumor e a sobrevivência a longo prazo. Esses resultados foram relacionados à ativação de células T CD8⁺ citotóxicas E7-específicas sistêmicas e em tecidos linfoides. Além disso, o tratamento foi capaz de induzir imunidade de longa duração e controlar recidivas tumorais. Em virtude dos resultados promissores obtidos em modelo murino, um mAb específico para DEC205 humano fusionado à proteína E7 (αDEC205-E7 hu) foi também construído e purificado. O mAb aDEC205-E7 hu manteve sua integridade preservada e mostrou-se capaz de ligar-se a DCs derivadas de monócitos (moDCs) e a monócitos humanos. Em ensaios de ativação de DCs in vitro, os mAbs sozinhos não foram capazes de ativar moDCs pelo aumento da expressão das moléculas coestimuladoras CD83 e CD86. Os dados obtidos no presente estudo demostram a importância do direcionamento de antígenos para DCs e a eficiência terapêutica da estratégia proposta. Dessa forma, a utilização do mAb αDEC205-E7 é uma abordagem promissora para o desenvolvimento de imunoterapias contra tumores induzidos por HPV.

Palavras chaves: HPV, receptor DEC205, Células dendríticas, imunoterapia.

ABSTRACT

SILVA, M.O. **Targeting of antigens to dendritic cells as an immunotherapeutic strategy to control HPV-induced tumors.** 147 f.Thesis (Microbiology). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Diseases caused by persistent HPV infections, such as cervical cancer, represent a serious public health problem in the world and are one of the biggest causes of tumorrelated deaths in women. In this context, the search for new therapeutic approaches for this type of cancer is a priority. The generation of successful anticancer vaccines depends on the ability to induce immune responses against tumor antigens. In this scenario, antigen targeting to dendritic cells (DCs) represents a promising approach, capable of increasing the efficiency of antitumor immunotherapies. In the present study, we used monoclonal antibodies (mAbs) capable of targeting antigens to a specific population of DCs, the CD8a⁺ DEC205⁺ DCs. For this, aDEC205 mAbs were genetically fused to the HPV-16 oncoprotein E7 to create a vaccine capable of treating HPV-associated tumors. The therapeutic efficacy of aDEC205-E7 mAbs was evaluated using the TC-1 cell model implanted in three distinct anatomical sites (subcutaneous, oral cavity and intravaginal). The immunization regimen comprised two doses of the aDEC205-E7 mAbs coadministered with Poly(I:C), as adjuvant. The vaccine formulation produced robust antitumor effects in subcutaneous and orthotopic implant models, stimulating rapid tumor regression and long-term survival. These outcomes were related to the activation of E7-specific cytotoxic CD8⁺ T cells in systemic and lymphoid tissues. Furthermore, the treatment was able to induce longlasting immunity and control tumor recurrences. Due to the promising results obtained in a murine model, a mAb specific for human DEC205 fused to E7 protein (aDEC205-E7 hu) was also constructed and purified. The αDEC205-E7hu mAb maintained its integrity preserved and was able to bind monocyte-derived DCs (moDCs) and human monocytes. In in vitro DC activation assays, mAbs alone were not able to activate moDCs by increasing the expression of the costimulatory molecules CD83 and CD86. The data obtained in this study highlighted the importance of targeting antigens to DCs and the therapeutic efficiency of the proposed strategy. Thus, the use of mAb αDEC205-E7 is a promising approach for the development of immunotherapies against HPV-induced tumors.

Key words: HPV, DEC205 receptor, Dendritic cells, immunotherapy.

LISTA DE FIGURAS

| Figura 1. Ciclo de vida do HPV e desenvolvimento de tumores cervicais27 |
|--|
| Figura 2. Direcionamento de antígeno para célula dendrítica por meio de anticorpos |
| monoclonais anti DEC205 |
| Figura 3. Esquema de produção de anticorpos recombinantes |
| Figura 4. Clonagem do fragmento de DNA codificador da sequência da proteína E7 |
| fusionada à cadeia pesada que codifica os mAbs $\alpha DEC205$ e Isotipo controle59 |
| Figura 5. Análise da expressão e integridade dos mAbs murinos produzidos61 |
| Figura 6. Ensaio de ligação dos mAbs ao receptor DEC20562 |
| Figura 7. Estratégia de <i>gating</i> utilizada para seleção de DCs63 |
| Figura 8. Ensaio de ligação do mAb αDEC205-E7 a DCs provenientes do baço de |
| camundongos64 |
| Figura 9. Representação esquemática do delineamento experimental65 |
| Figura 10. Efeito antitumoral terapêutico de diferentes quantidades de mAb quimérico |
| αDEC205-E7 em combinação com o adjuvante poly (I:C) em modelo de tumor |
| subcutâneo |
| Figura 11. Análise da resposta imunológica mediada por linfócitos T CD8+ E7- |
| específicos gerada sete e quatorze dias após a imunização com o mAb αDEC205-E7 |
| em combinação com o adjuvante poly (I:C)68 |
| Figura 12. Efeito citotóxico <i>in vivo</i> gerado pela imunização com o mAb αDEC205-E7 |
| coadministrado ao poly (I:C) pela via s.c ou i.p |
| Figura 13. Efeito antitumoral da imunização com o mAb αDEC205-E7 + poly (I:C) pela |
| via s.c em tumores de crescimento lento71 |
| Figura 14. Ativação de linfócitos T CD8 ⁺ E7-específicos presentes no baço, no sangue |
| e nos linfonodos inguinais drenantes do tumor após imunização com o mAb $\alpha DEC205$ - |
| E7+ poly (I:C) |
| Figura 15. Detecção de citocinas secretadas por esplenócitos estimulados com o |
| peptídeo E774 |
| Figura 16. Efeito antitumoral da imunização com o mAb αDEC205-E7 + poly (I:C) em |
| animais BAFT3 KO75 |
| Figura 17. Avaliação do efeito antitumoral terapêutico do mAb αDEC205-E7 em |
| combinação com a proteína gDE778 |

| Figura 18. Representação esquemática do delineamento experimental80 |
|---|
| Figura 19. Efeito antitumoral dos mAbs α DEC205-E7 em combinação com o |
| adjuvante poly (I:C) em modelo de tumor intravaginal81 |
| Figura 20. Resposta imunológica celular E7-específica após imunização com o mAb |
| αDEC205-E7+ poly (I:C) no modelo de tumor intravaginal82 |
| Figura 21. Efeito antitumoral do mAb αDEC205-E7 em combinação com o adjuvante |
| poly (I:C) em modelo de tumor na língua |
| Figura 22. Ensaio de redesafio na língua de camundongos imunizados com o |
| αDEC205-E7 + poly (I:C) no modelo de tumor na cavidade oral85 |
| Figura 23. Análise da resposta de memória efetora no sangue de animais imunizados |
| com o mAb α DEC205-E7 + poly (I:C) no modelo de tumor na cavidade oral |
| Figura 24. Construção dos vetores p αDEC205-E7hu e pISO-E7hu88 |
| Figura 25. Análise da expressão e integridade dos mAbs aDEC205-E7 e ISO-E7 |
| humanos |
| Figura 26. Ensaio de ligação dos mAbs quiméricos humanos a moDCs e |
| monócitosTHP-191 |
| Figura 27. Estratégia de gate utilizadas para imunofenotipagem de moDCs |
| diferenciadas <i>in vitro</i> 92 |
| Figura 28. Expressão das moléculas de superfície de moDCs ativadas com os mAbs |
| quiméricos humanos |

LISTA DE TABELAS

| Tabela 1. Principais exemplos de vacinas terapêuticas em ensaio clínico | .32 |
|---|-----|
| Tabela 2. Painel de anticorpos de citometria utilizado para imunofenotipagem e | |
| ensaio de ligação a cDC1 do baço de camundongos | .47 |
| Tabela 3. Painel de anticorpos de citometria de fluxo utilizados para caracterizaçã | 0 |
| da resposta celular | .51 |

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| CK A | A <i>mmonium-Chloride-Potassium</i> (Amônio-Coreto-Potássio) |
|------------------|---|
| PC A | Allophycocyanin (Aloficocianina) |
| PCs A | Antigen presenting cell (célula apresentadora de antígeno) |
| ATF3 <i>E</i> | Basic Leucine Zipper Transcription Factor, ATF-Like 3 |
| BA (| Cytometric beads array |
| с С | Cluster of differentiation (grupo de diferenciação) |
| FSE (| Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester |
| S C | Carcinoma <i>in situ</i> |
| D ₂ E | Dióxido de carbono |
| RLs (| C-Type Lectin Receptors (receptores de lectina do tipo C) |
| AMPs <i>L</i> | Damage-associated molecular patterns (padrões moleculares |
| а | associados aos danos) |
| Cs L | Dendritic cells (células dendríticas) |
| MEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| NA <i>L</i> | Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucléico) |
| Ε | Early protein (proteína de expressão precoce) |
| DTA E | Ethylenediaminitetraacetic acid (Ácido etileno diamino tetra acético) |
| TC F | Fluorescein |
| SC F | Forward scatter |
| F | ⁻ orça centrifuga relativa (RCF) ou força gravitacional |
| c c | Centros Germinativos |
|) (| Glicoproteína D |
| M-CSF (| Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (Fator estimulador |
| C | de colônias de macrófagos e granulócitos) |
| ŀ | Hora(s) |
| EK P | Human Embryonic Kidney |
| _A / | Human Leukocyte Antigen (antígeno leucocitário humano) |
| PV P | <i>Human Papilloma Virus</i> (vírus do papiloma humano) |
| /EM <i>F</i> | Herpes vírus entry mediator (Mediador da entrada de herpes vírus) |
| S I | Intracellular cytokine staining (marcação intracelular de citocinas) |
| - | |

| IFN-γ | Interferon-gama |
|------------|--|
| lgG | Imunoglobulina G |
| IL | Interleucina |
| kDa | Kilodalton |
| КО | Knockout - nocaute |
| L | Late protein (proteína de expressão tardia) |
| L | Litro |
| LB | Meio Luria-Bertani |
| М | Molar |
| MFI | Median Fluorescence Intensity |
| mg | Miligramas |
| MHC | Major Histocompatibility Complex (complexo principal de |
| | histocompatibilidade) |
| NaCl | Cloreto de Sódio |
| NIC | Neoplasia intraepitelial cervical |
| NK | Natural killer cells |
| p/s | photons per seconds (fótons por segundos) |
| PAMPs | Pathogen-associated Molecular Patterns (Padrões moleculares |
| | associados a patógenos) |
| pb | Pares de base |
| PBMC | Peripheral Blood Mononuclear Cells (células mononucleares do |
| | sangue periférico) |
| PBS | Phosphate buffered saline (tampão salina-fosfato) |
| PCR | Polymerase chain reaction (reação de polimerase em cadeia) |
| PE | Phycoerythrin (Ficoeritrina) |
| Poly (I:C) | Polyinosinic:polycytidylic acid |
| pRb | proteína retinoblastoma |
| PRRs | Pattern recognition receptor |
| rpm | Rotações por minuto |
| RPMI | Meio Roswell Park Memorial Institute |

| SDS- | Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis |
|-------|--|
| PAGE | (separaçãoeletroforética em gel de poliacrilamida contendo dodecil |
| | sulfato de sódio) |
| SFB | Soro fetal bovino |
| SSC | Side scatter |
| T.A | Temperatura Ambiente |
| TLR – | Toll-like receptor (Receptor do tipo Toll) |
| TNF | Tumor Necrosis Factor (fator de necrose tumoral) |
| VLPs | Virus Like Particles |
| | |

µL Microlitro

LISTA DE SÍMBOLOS

- % Porcentagem
- ® Marca registrada
- °C Graus Celsius
- γ Gama
- α Alfa
- < Menor
- > Maior
- μ Micro

| | | | , | | |
|---|---|-----|---|---|--------------|
| C | | ΝЛ | Λ | D | \mathbf{n} |
| Э | U | IVI | А | R | IU |
| - | - | | | | - |

| | SUMÁRIO | | | | |
|---|--------------------|--|----------|--|--|
| 1 | INTRO | DUÇÃO | 26 | | |
| | 1.1 HP | V E O CÂNCER | 26 | | |
| | 1.2 ES ASSOCIA | TRATÉGIAS PREVENTIVAS E TRATAMENTOS DE DOENÇAS ADAS AO HPV | 28 | | |
| | 1.3 VA | CINAS TERAPÊUTICAS CONTRA CÂNCER INDUZIDO POR HPV | 30 | | |
| | 1.4 CÉ | LULAS DENDRÍTICAS | 33 | | |
| | 1.5 SU | BTIPOS DE CÉLULAS DENDRÍTICAS | 34 | | |
| | 1.6 O F | PAPEL DAS DCs NA IMUNOTERAPIA DO CÂNCER | 35 | | |
| | 1.7 DIF RECEPT | RECIONAMENTO DE ANTÍGENOS PARA DCs POR MEIO DO OR DEC205 | 36 | | |
| 2 | OBJET | | 41 | | |
| 3 | MATE | RIAL E MÉTODOS | 43 | | |
| | 3.1 CC E7 MURI | NSTRUÇÃO, PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO mAb αDEC205 NO E SEU RESPECTIVO CONTROLE | ;- 43 | | |
| | 3.1.1 pesada | Clonagem da proteína E7 fusionada à sequência que codifica a cade dos mAbs αDEC205 e isotipo controle de camundongo | ia 43 | | |
| | 3.1.2 | Expressão e purificação dos mAbs quiméricos murinos | 43 | | |
| | 3.1.3 | Análise da integridade dos mAbs quiméricos murinos fusionados à E | 745 | | |
| | 3.1.4 | Ensaio de ligação ao receptor DEC205 | 46 | | |
| | 3.1.5 | Ensaio de ligação a DCs provenientes do baço de camundongos | 46 | | |
| | 3.2 DE FRENTE | TERMINAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DO mAb MURINO AOS MODELOS DE TUMOR SUBCUTÂNEO E DE MUCOSA | 47 | | |
| | 3.2.1 | Animais | 47 | | |
| | 3.2.2 | Cultivo e preparo de linhagens celulares tumorais | 47 | | |
| | 3.2.3 | Implantação de tumores | 48 | | |
| | 3.2.4 | Protocolo de imunização | 49 | | |
| | 3.2.5 drenan | Obtenção e processamento de sangue, baço e linfonodos inguinais tes do tumor | 50 | | |
| | 3.2.6 | Ensaio de marcação intracelular de IFN-γ | 50 | | |
| | 3.2.7 | Ensaio de citotoxicidade in vivo | 51 | | |
| | 3.2.8 | Cytokine Beads Array (CBA) | 52 | | |
| | 3.2.9 | Análise estatística | 52 | | |
| | 3.3 CC E7 E ISO | NSTRUÇÃO, PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE mAbs αDEC20 TIPO-E7 HUMANO | 5- 53 | | |

| | 3.3.1 mAbs h | Clonagem da sequência da proteína E7 em fusão à cadeia pesadas dos umanos αDEC205 e Isotipo controle53 |
|--------|----------------------------|---|
| | 3.3.2 | Produção e purificação dos mAbs humano53 |
| | 3.3.3 | Análise da integridade dos mAbs quiméricos humanos fusionados à E7 54 |
| | 3.3.4 | Amostras de sangue periférico humano54 |
| | 3.3.5 (moDC: | Diferenciação de células dendríticas derivadas de monócitos humanos s) in vitro |
| | 3.3.6 | Ensaio de ligação dos anticorpos humanos a moDCs55 |
| | 3.3.7 | Ensaio de ligação a células THP-155 |
| | 3.3.8 doadore | Ativação in vitro de moDCs provenientes do sangue periférico de es saudáveis |
| | 3.3.9 | Análise estatística56 |
| 4 | RESUL | TADOS |
| 4 E | .1 CO 7 e ISO | NSTRUÇÃO, PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO mAbs αDEC205- TIPO-E7 MURINO58 |
| | 4.1.1 murino | Clonagem da proteína E7 fusionada ao mAb αDEC205 e Isotipo controle 58 |
| | 4.1.2 | Expressão, purificação e análise dos mAbs murinos59 |
| | 4.1.3 transgê | Ensaio de ligação dos mAbs αDEC205-E7 murino a células CHO nicas61 |
| | 4.1.4 camuno | Ensaio de ligação dos mAbs murinos a DCs provenientes do baço de dongos62 |
| 4 | .2 PO | TENCIAL TERAPÊUTICO DOS mAbs FRENTE A TUMORES HPV-16 ⁺ 65 |
| | 4.2.1 CD8+ E combine | Efeito antitumoral terapêutico e ativação de respostas de linfócitos T 7-específicos mediadas pela administração do mAb αDEC205-E7 em ação com o adjuvante poly (I:C)65 |
| | 4.2.2 induzide | Avaliação da atividade citotóxica dos linfócitos T CD8+ E7-específicos os pela imunização com αDEC205-E769 |
| | 4.2.3 pela via | Avaliação do efeito antitumoral terapêutico dos mAbs administrados a s.c em tumores de crescimento mais lento70 |
| | 4.2.4 aDEC2 BATF3 | Contribuição das cDC1 na proteção antitumoral mediada pelos mAbs 05-E7 coadministrados ao poly (I:C) utilizando animais deficientes de 74 |
| | 4.2.5 E7 com | Avaliação do potencial da combinação dos mAbs quiméricos αDEC205- a proteína gDE775 |
| 4 T | .3 EFI UMORE | CÁCIA ANTITUMORAL TERAPÊUTICA DOS mAbs αDEC205-E7 EM S DE MUCOSA |
| | 4.3.1 | Modelo tumoral intravaginal79 |

| | 4.3.2 | Modelo tumoral na cavidade oral | . 82 | | |
|-----------------------|--------------------------|--|----------|--|--|
| 4 a | .4 CO DEC205 | NSTRUÇÃO, PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS mAbs -E7 E ISOTIPO-E7 HUMANO | 87 | | |
| | 4.4.1 controle | Clonagem da proteína E7 fusionada ao mAb αDEC205 e ao Isotipo e humano | 87 | | |
| | 4.4.2 | Análise da integridade dos mAbs humanos quiméricos | 88 | | |
| | 4.4.3 monócia | Ligação dos anticorpos humanos a células dendríticas derivadas de tos (moDCs) e a monócitos THP-1 | 90 | | |
| | 4.4.4 | Capacidade de ativação de moDCs in vitro | 91 | | |
| 5 | DISCUS | SSÃO | 95 | | |
| 6 | CONCL | .USÕES | 104 | | |
| RE | REFERÊNCIAS | | | | |
| APÊNDICES E ANEXOS125 | | | | | |
| A | PÊNDIC | E A-Súmula curricular | 126 | | |
| ∧ n | PÊNDIC nomento | E B-Artigos científicos de primeira autoria e co-autoria publicado até o | ว 131 | | |

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 HPV E O CÂNCER

Os papilomavírus humanos (HPVs) são agentes causadores da infecção viral mais comum que acomete o trato reprodutivo (WHO, 2020). Pertencentes a família Papillomaviridae, os HPVs são vírus epiteliotrópicos, não envelopados e com capsídeo de simetria icosaédrica. Seu genoma de DNA dupla fita possui cerca de 8.000 pares de bases e é composto por genes que codificam as proteínas de expressão precoce (E1, E2, E4, E5, E6 e E7), que são expressas nas primeiras etapas do ciclo celular, e duas proteínas de expressão tardia (L1 e L2), que codificam proteínas estruturais para formação do capsídeo (HEBNER; LAIMINS, 2006; DOORBAR et al., 2015). Mais de 220 genótipos de HPV já foram descritos até o momento e são categorizados de acordo com o tipo de células epiteliais infectadas e capacidade de transformação celular (EGAWA al.. 2015: pela et PAVE: PAPILLOMAVIRUS EPISTEME, 2021). Aproximadamente 40 tipos de HPV pertencentes ao gênero Alphapapillomavirus infectam o epitélio e mucosa do trato anogenital e podem ser classificados como de baixo ou alto risco de acordo com sua capacidade de induzir câncer (MUÑOZ et al., 2003; BOCCARDO; LEPIQUE; VILLA, 2010). Os genótipos de baixo risco estão relacionados com o surgimento de lesões benignas, enquanto os de alto risco estão relacionados ao desenvolvimento de lesões malignas. O dois vírus de baixo risco mais comuns que causam verrugas nas regiões anogenitais são o HPV-6 e -11. Por outro lado, os genótipos de HPV-16 e HPV-18 são de alto risco e responsáveis por aproximadamente 70% dos casos de câncer de colo de útero e de lesões cervicais pré-malignas (WHO, 2020).

A relação entre o HPV e o câncer cervical foi reportada pela primeira vez no início da década de 1970 por Harold Zur Hausen (ZUR HAUSEN; DE VILLIERS; GISSMANN, 1981; ZUR HAUSEN, 2009). Hoje, já se sabe que o HPV está associado a quase a totalidade dos casos de câncer de colo de útero. Mundialmente, esse tipo de câncer representa o quarto tipo de câncer mais frequente e a quarta causa de morte por câncer em mulheres, com estimativa de mais de 600 mil novos casos e mais de 340 mil mortes relatadas em 2020. Destes, só no Brasil, foram registrados 16.710 novos casos e 6.596 mortes(GLOBAL CANCER OBSERVATORY, 2021; INCA, 2021). Além da relação com câncer de colo de útero, o HPV é também capaz de causar

outros tumores anogenitais e de cabeça e pescoço. No mundo, aproximadamente 88% dos casos de câncer anal e 30% de câncer de orofaringe tem relação com a infecção por HPV, atingindo tanto mulheres como homens (BOSCH et al., 2013; DE MARTEL et al., 2017).

A infecção produtiva do HPV se inicia por meio de microabrasões ou microlesões no tecido, que permitem a infecção das células basais do epitélio. À medida que as células infectadas se diferenciam, o ciclo de vida produtivo é ativado e por meio do descamamento das células, partículas virais são eventualmente liberadas na superfície do epitélio (WOODMAN; COLLINS; YOUNG, 2007). Grande parte das infecções causadas por HPV são de caráter transiente, ou seja, são eliminadas em até 2 anos sem qualquer intervenção (RODRÍGUEZ et al., 2008). Porém, quando infecções causadas por genótipos de alto risco persistem, podem levar ao desenvolvimento de lesões pré-malignas, denominadas de lesões intraepiteliais cervicais (NIC), classificadas em 3 grupos em função da proporção do epitélio acometido: NIC 1, NIC 2 e NIC 3 (**Figura 1**). Se não forem tratadas, essas lesões podem evoluir para lesões de alto grau e atingir todas as camadas do epitélio cervical, progredindo para um carcinoma *in situ* (CIS)(WOODMAN; COLLINS; YOUNG, 2007; BOSCH et al., 2008; STEENBERGEN et al., 2014).



Figura 1.Ciclo de vida do HPV e desenvolvimento de tumores cervicais. O HPV infecta as camadas basais do epitélio através de microlesões no epitélio cervical. Seguido da

infecção, ocorre a síntese das proteínas de expressão precoce E1, E2, E4, E5, E6 e E7 e replicação do genoma viral a partir do DNA viral. Os genomas virais se mantem na forma epissomal e são expressos a medida que essas células infectadas avançam até a superfície. Nas camadas superiores ocorre a expressão das proteínas E4, L1 e L2, e o encapsulamento dos genomas virais. Posteriormente, as partículas virais são liberadas com o descamamento dos queratinócitos da superfície do epitélio. As lesões intraepiteliais de baixo grau correlacionam com infecções virais produtivas. As lesões de alto grau representam uma infecção abortiva, na qual há a integração do genoma do HPV ao genoma do hospedeiro e superexpressão das proteínas E6 e E7. Adaptado de Woodman et al., 2007 (WOODMAN; COLLINS; YOUNG, 2007)

O desenvolvimento de tumores após uma infecção persistente por genótipos de alto risco envolve a integração do genoma viral no genoma da célula hospedeira, com a expressão constitutiva das oncoproteínas E6 e E7, que leva à imortalização das células. A proteína E7 se liga e degrada a proteína do retinoblastoma (pRb) uma das principais proteínas supressoras de tumor. Por outro lado, a proteína E6 promove a degradação da proteína supressora de tumor (p53) e ativação da expressão e atividade da telomerase (SCHEFFNER et al., 1990; MCLAUGHLIN-DRUBIN; MÜNGER, 2009; BOCCARDO, 2010; SCHIFFMAN et al., 2016). A expressão de ambas as proteínas é essencial para manutenção do estado transformado, porém, acredita-se que a instabilidade genômica causada por elas permita que as células acumulem aberrações genômicas adicionais necessárias promover para transformação celular (BUTZ et al., 2003; TOMMASINO, 2014).

1.2 ESTRATÉGIAS PREVENTIVAS E TRATAMENTOS DE DOENÇAS ASSOCIADAS AO HPV

Dado os altos índices de infecção e lesões causadas por HPV, vacinas profiláticas foram desenvolvidas para induzir proteção contra a infecção pelos genótipos mais comuns de HPV de alto e baixo risco. Atualmente, existem três vacinas profiláticas contra HPVs, de alto e baixo risco, comercialmente disponíveis. Todas elas são compostas por partículas virais recombinantes não infecciosas denominadas *vírus-like particles* (VLPs), majoritariamente formadas pela proteína L1 que compõe o capsídeo viral. A Cervarix®, uma vacina bivalente produzida pela GlaxoSmithKline (GSK), protege contra os HPVs 16 e 18. A Gardasil®, uma vacina quadrilavalente, produzida pela Merck compreende VLPs dos genótipos de HPV de alto risco (16 e 18) e também VLPs dos HPVs 6 e 11, que causam aproximadamente 90% das verrugas genitais tanto em homens como em mulheres (GARLAND et al., 2009; SCHILLER;

CASTELLSAGUÉ; GARLAND, 2012). Mais recentemente, a Merck licenciou uma nova versão da Gardasil (Gardasil 9®) que abrange 9 genótipos de HPV (6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58). Todas as três vacinas previnem a infecção por HPV por meio da indução de anticorpos neutralizantes que se ligam ao vírus e bloqueiam sua entrada na célula hospedeira (HARPER et al., 2004; VILLA et al., 2005; JOURA et al., 2015). No ano de 2014, o Ministério da Saúde do Brasil incluiu a Gardasil no Programa Nacional de Imunização com o intuito de diminuir o número de casos de câncer cervical induzidos pelos HPV-16 e 18 a longo prazo no país.

Embora as vacinas profiláticas possam eficientemente prevenir infecções causadas pelos genótipos de HPV incluídos na vacina, as lesões relacionadas ao HPV permanecem um problema de saúde pública em todo o mundo. O custo elevado e a dificuldade de acesso a populações de baixa renda têm impedido a distribuição das vacinas em larga escala. Apenas 8 % dos países de baixa e média renda introduziram programas de vacinação contra o HPV (GARBUGLIA et al., 2020) e para que o número de casos de câncer de colo de útero seja impactado, precisariam ser amplamente utilizadas por muitos anos para reduzir o número de câncer cervical associado ao HPV (LIN et al., 2010). Além disso, as vacinas profiláticas não eliminam infecções já estabelecidas e não montam respostas imunes celulares baseadas em células T CD4⁺ e CD8⁺ que são primoridiais para combater lesões pré-cancerosas ou cancerosas. Diante disso, as infecções por HPV e o subsequente desenvolvimento de malignidades associadas ao HPV continuarão a ser um problema de saúde pública nas próximas décadas.

As intervenções atualmente disponíveis para as lesões ou tumores causados por HPV variam de acordo com o estágio da doença, mas são baseados principalmente em cirurgia, quimioterapia e radioterapia ou a combinação desses (KOKKA et al., 2015; BOUSSIOS et al., 2016; CHUANG et al., 2016; TSUDA; WATARI; USHIJIMA, 2016). Todavia, a alta morbidade, o comprometimento da qualidade de vida das pacientes e o alto custo desses tratamentos representam sérios problemas. Além disso, os tumores podem tornar-se resistentes à quimioterapia e as chances de recidivas são consideráveis. Portanto, o desenvolvimento de vacinas antitumorais com ação terapêutica é um passo importante para a diminuição da morbidade e mortalidade associada ao câncer cervical (WHANG; FILIPPOVA; DUERKSEN-HUGHES, 2015).

29

1.3 VACINAS TERAPÊUTICAS CONTRA CÂNCER INDUZIDO POR HPV

As vacinas terapêuticas surgem com o objetivo de controlar ou impedir o crescimento de tumores induzidos por HPV a partir da indução de respostas imunes mediadas por células T. Já foi observado que a eliminação espontânea e a progressão lenta das lesões por HPV estão associadas a uma forte resposta imune mediada por células T auxiliares e células T CD4⁺ e CD8⁺ citotóxicas. Dessa forma, as vacinas terapêuticas devem privilegiar a indução de uma resposta citotóxica capaz de reconhecer e matar especificamente as células transformadas pelo vírus (KANODIA; DA SILVA; KAST, 2008).

Uma característica única das lesões associadas ao HPV é a expressão constitutiva das proteínas E6 e E7 em níveis elevados e específicos nas células tumorais e não em outras células saudáveis (BAKER; PLOTKIN, 1978). Além disso, essa expressão é responsável pela malignização celular e necessária para a manutenção do estado transformado (SANTIN et al., 1998; WANG; CHUNG; HUANG, 2003). Isso torna as proteínas E6 e E7 alvos ideias para vacinas terapêuticas, que são projetadas para induzir uma resposta antitumoral específica visando células que expressam apenas os antígenos, minimizando o risco de ataque acidental a tecidos saudáveis.

Nos últimos anos, grandes esforços foram feitos na busca de uma vacina terapêutica capaz de tratar lesões e câncer induzidos por HPV. A maioria das estratégias vacinais desenvolvidas até o momento usaram E6 e E7 ou a combinação de ambos como antígenos alvos, dentro de diferentes plataformas vacinais, que incluem vacinas baseadas em vetores vivos, vacinas baseadas em DNA, proteína, peptídeos e vacinas baseadas em células, como as células CAR T (FAKHR; MODIC; CID-ARREGUI, 2021). Muitas das vacinas terapêuticas em desenvolvimento buscaram aumentar a imunogenicidade dos antígenos por meio de fusão com outras proteínas ou associação a adjuvantes (LI et al., 2017; PORCHIA et al., 2017). Como exemplo, temos a vacina terapêutica desenvolvida pelo Laboratório de Desenvolvimento de vacinas (ICB/USP) que é baseada em uma proteína híbrida resultante da fusão genética da glicoproteína D (gD) do Herpes simplex virus-1 (HSV-1) com a oncoproteína E7 do HPV-16. Essa vacina foi desenvolvida tanto na plataforma de DNA (pgDE7h) como na de proteína recombinante (gDE7). Ambas as plataformas vacinais foram capazes de ativar células T CD8⁺ E7-específicas e gerar efeito antitumoral terapêutico em camundongos transplantados com células TC-1 (DINIZ et al., 2016; PORCHIA et al., 2017). Nessa estratégia vacinal, a proteína gD atua como adjuvante graças à capacidade de interação com receptor HVEM (do inglês *Herpes Vírus Entry Mediator*) que promove ativação de células do sistema imunológico de modo direto pela indução da produção de NF-kB e bloqueia sinais co-inibitórios mediados pelos receptores BTLA e CD160 (SCIORTINO et al., 2008; STEINBERG; CHEUNG; WARE, 2011). Atualmente, a vacina na versão de proteína recombinante se encontra na busca de uma prova de conceito clínica em pacientes diagnosticadas com neoplasias de alto grau (NIC2/3) no colo do útero por meio do uso de DCs autólogas estimuladas com a proteína.

Vários ensaios clínicos de vacinas terapêuticas contra tumores induzidos por HPV já foram ou estão sendo realizados. A tabela 1 apresenta os principais tipos de vacinais terapêuticas baseadas em diferentes plataformas que estão atualmente em andamento ou que já foram finalizados. Em testes mais avançados se encontra uma vacina baseada em DNA, a VGX-3100, e uma vacina baseada em vetor bacteriano, a ADXS11-001. A vacina VGX3100 codifica regiões consenso das proteínas E6 e E7 dos HPV-16 e 18 e é associada à eletroporação in vivo como método de administração (TRIMBLE et al., 2015). Em ensaios clínicos, a vacina de DNA se mostrou capaz de realizar o clearance viral dos HPVs 16 e 18 e induzir regressão histológica (BHUYAN et al., 2021). ADXS11-001 é baseada na Listeria monocytogenes (LM) listeriolisina O (LLO) viva e atenuada geneticamente manipulada para secretar uma proteína de fusão antígeno-adjuvante que consiste em um fragmento truncado e não hemolítico de LLO fundido com a proteína E7 do HPV-16 (tLLO-HPV-16 E7). A monoterapia ADXS11-001 ou associação com cisplatina mostrou resultados promissores em termos de segurança e aumentada sobrevivência, demonstrando potencial de benefício clínico a longo prazo (BASU et al., 2018)

Os ensaios clínicos têm mostrado progresso no desenvolvimento de uma vacina contra tumores induzidos por HPV. As vacinas VGX-3100 e a ADXS11-001, ambas em ensaios clínicos de fase III, mostram que há promessa de uma vacina em um futuro próximo.

31

| Agente | Тіро | HPV | Fase clínica | Referência |
|--|---|----------------------------------|--------------|-------------|
| | | alvo | | |
| ADXS11-001 /placebo | Vetor bacteriano | HPV16 E7 | III | NCT02853604 |
| ADXS 11-001 | Vetor bacteriano | HPV16 E7 | II | NCT02002182 |
| TA-HPV /pNGVL4a- Sig/E7 (detox)/HSP70 /imiquimod | Vetor viral /Vacina de DNA /modificador de resposta imune | HPV16/ 18 E6/E7 | Ι | NCT00788164 |
| PRGN-2009 /M7824 | Vetor viral /anticorpo biespecífico TGF-b and PD-L1 | HPV16 E6/E7 | 1/11 | NCT04432597 |
| DPX-E7 | Vacina peptídica | HPV16- E7(₁₁₋₁₉) | I/II | NCT02865135 |
| ISA 101 /Nivolumab | Peptide vaccine/anti-PD-1 | HPV-16 E6/E7 | II | NCT02426892 |
| PepCan | Vacina peptídica | HPV-16 E6 | II | NCT02481414 |
| Hespecta | Vacina peptídica | HPV16 E6 | Ι | NCT02821494 |
| HPV16 E7 peptídeo, sintético HPV16 E6 peptídeo | Vacina peptídica | HPV16 E6/E7 | Ι | NCT00019110 |
| TA-CIN | Vacina peptídica | HPV16 L2/ E6/ E7 | I | NCT02405221 |
| TVGV-1 | Vacina de proteína | HPV16 E7 | II | NCT02576561 |
| GX-118E | Vacina de DNA | HPV16/18 E6/E7 | I | NCT02139267 |
| VGX-3100 /placebo | Vacina de DNA | HPV16/18 E6/E7 | III | NCT03185013 |
| VB10.16 | Vacina de DNA | HPV16 E6 | I/II | NCT02529930 |
| pnGVL4a-CRT/E7 (Detox) | Vacina de DNA | HPV16 E7 | Ι | NCT00988559 |
| Células T TCR | Células T TCR-E7 específicas | HPV16 E7 | II | NCT03937791 |
| BVAC-C | Células (monócitos/células B) | E6/E7 HPV 16 | 1/11 | NCT02866006 |
| <u> </u> | | | | |

Tabela 1- Principais exemplos de vacinas terapêuticas em ensaio clínico

Adaptada de Fakhr et al., 2021.

1.4 CÉLULAS DENDRÍTICAS

Descobertas na década de 70 pelos pesquisadores Cohn e Steinman, as Células Dendríticas (DCs, do inglês *Dendritic cells*) são as principais células apresentadoras de antígenos do sistema imune (APCs, do inglês *antigen presenting cells*). Elas são capazes de iniciar e regular a resposta imune adaptativa (PULENDRAN; PALUCKA; BANCHEREAU, 2001; STEINMAN, 2008), exercendo um papel central na estimulação de linfócitos T e na indução de respostas imunes tolerogênicas (PROBST; MUTH; SCHILD, 2014a). As DCs são células migratórias que se diferenciam através de precursores da medula óssea e migram para diferentes tecidos, podendo ser encontradas principalmente em pele, mucosas e orgãos linfoides (STEINMAN, 2008). Sua principal função é capturar antígenos na periferia, processar e apresentá-los para linfócitos T nos órgãos linfoides via complexos de histocompatibilidade MHC de classe I e de classe II. Além disso, elas são capazes de secretar uma ampla variedade de citocinas e fatores de crescimento que são responsáveis por atrair e interagir com outras células do sistema imune (EISENBARTH, 2019).

Em seu estado imaturo, as DCs residem principalmente em tecidos linfoides e periféricos onde reconhecem e capturam antígenos. Após o reconhecimento de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs, do inglês, *Pathogen associated Molecular Patterns*) ou a danos (DAMPs, do inglês *Damage associated Molecular Patterns*) pelo receptores PRRs (do inglês *Pattern Recognition Receptors),* as DCs são ativadas e se tornam altamente móveis, sendo capazes de migrar para os órgãos linfoides secundários onde fazem a apresentação de antígenos para os linfócitos T (TAKEDA; KAISHO; AKIRA, 2003). A maturação das DCs leva ao aumento da expressão do complexo MHCII e de moléculas coestimuladoras, como CD40, CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2), bem como à produção de citocinas importantes na ativação de linfócitos. Porém, a resposta imune induzida pelas DCs depende do ambiente em que o antígeno é capturado. Na falta de sinais inflamatórios, as DCs são tolerogênicas (PROBST; MUTH; SCHILD, 2014b).

1.5 SUBTIPOS DE CÉLULAS DENDRÍTICAS

As DCs não são uma população homogênea, mas uma rede complexa de subpopulações que se diferem de acordo com sua ontogenia e funções (MILDNER; JUNG, 2014). Elas podem ser classificadas em DCs plasmocitoides (pDCs) ou DCs convencionais/clássicas (cDCs). As pDCS são responsáveis pela produção de interferon tipo I, respondendo rápida e eficientemente a infecções virais (COLONNA; TRINCHIERI; LIU, 2004). Já as cDCs são caracterizadas por expressarem as moléculas CD11c e MHC II e são subdividas em cDC1 e cDC2, que se diferenciam pela expressão dos fatores de transcrição IRF8/Batf3 e IRF4/Notch2, respectivamente (GUILLIAMS et al., 2016)

No baço de camundongos, as cDC1 são originalmente identificadas pela expressão da molécula CD8 α^+ (em órgãos linfoides) ou CD103⁺ (órgãos não linfoides) (STEINMAN, 2003; EDELSON et al., 2010). As cDCs CD8 α^+ estão localizadas na zona de células T de órgãos linfoides como baço e linfonodos. Elas são capazes de apresentar antígenos exógenos e especializadas na apresentação cruzada de antígenos endógenos. As cDCs CD8 α^+ são importantes na proteção contra patógenos intracelulares e altamente eficientes na apresentação cruzada de antígenos exógenos via MHC II (SHORTMAN; HEATH, 2010). As cDC1 são conhecidas por produzirem mais IL-12 que as cDC2 e são as únicas a expressarem o receptor TLR3 (do inglês *Toll-like receptor 3*).

As cDC2 são comumente diferenciadas das cDC1 pela expressão das moléculas CD11b e CD172 e por não expressarem a molécula CD8α em camundongo. As cDC2s são capazes de induzir células T foliculares auxiliares que estimulam a formação dos centros germinativos (GC), a diferenciação das células plasmáticas e a produção de anticorpos (CHAPPELL et al., 2012). As cDC2 apresentam apenas antígenos exógenos e se localizam na zona marginal dos órgãos linfoides (DUDZIAK et al., 2007).

Em humanos, as cDC1 são definidas pela expressão de CD141⁺(BDCA-3⁺) XCR1⁺BTLA^{hi} e as cDC2s definidas como CD1c⁺CD172a⁺CD11b⁺. As DCs plasmocitoides expressam BDCA-2⁺ CD303⁺ CD123⁺ (COLONNA; TRINCHIERI; LIU, 2004; SHI et al., 2008; JONGBLOED et al., 2010; HANIFFA et al., 2012)

34

1.6 O PAPEL DAS DCs NA IMUNOTERAPIA DO CÂNCER

A potente habilidade em iniciar e regular a resposta imune adaptativa tem feito das DCs uma importante ferramenta para o desenvolvimento de imunoterapias antitumorais. Diferentes imunoterapias têm como alvo essa população e incluem desde a administração de antígenos e adjuvantes como imunomoduladores que mobilizam e ativam DCs endógenas, bem como a geração de vacinas de células baseadas em DCs. Essa última estratégia propõe a reativação do sistema imune e faz uso das próprias DCs dos pacientes para gerar vacinas terapêuticas. Nesse caso, as DCs autólogas do paciente são colhidas e maturadas ex vivo por diferentes métodos, incluindo antígenos associados ao tumor, lisado tumoral e eletroporação com mRNA que codifica antígenos tumorais (PULENDRAN; PALUCKA; BANCHEREAU, 2001; SVANE et al., 2003; PALUCKA et al., 2007). Depois disso, as DCs são injetadas de volta nos pacientes afim de estimular respostas imunológicas antitumorais. Uma vez que são encontradas pequenas quantidades de DCs na circulação sanguínea, células denríticas derivadas de monócitos (moDCs) são freguentemente utilizadas. As moDCs são geradas in vitro a partir de monócitos purificados do sangue periférico e cultivados com o fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) e interleucina (IL)-4 (SALLUSTO; LANZAVECCHIA, 1994). Embora vários ensaios clínicos tenham demostrado que vacinação com DCs é segura e capaz de induzir respostas de células T duráveis em diferentes tipos de tumores, esta estratégia enfrenta vários desafios (BOL et al., 2016; FU et al., 2020). O processo de preparo das DCs in vitro é complexo e dispendioso. Além disso, precisa ser individualmente preparado, o que limita sua aplicação clínica em larga escala (TACKEN; FIGDOR, 2011)

Uma abordagem mais simples e promissora que supera as deficiências das vacinas baseadas em DCs é representada pelo direcionamento de antígenos para receptores de superfície das DCs (KELER et al., 2007). Nessa estratégia, os antígenos são complexados quimicamente ou fusionados geneticamente a anticorpos monoclonais (mAbs) ligantes de receptores endocíticos expressos pelas DCs. Esses anticorpos são internalizados, processados e degradados nas vias endocíticas como peptídeos antigênicos e então carregados em moléculas de MHCI e/ou MHCII (BONIFAZ et al., 2002). Estudos pioneiros realizados por Steinman e colaboradores

35
mostraram que respostas imunes específicas poderiam ser induzidas utilizando mAbs directionadores para DCs fusionados a diferentes antígenos (BONIFAZ et al., 2002; IDOYAGA et al., 2008). Na superfície das DCs existem diversos receptores capazes de mediar a captação de antígenos que incluem: o receptor de manose, DC-SIGN, DEC205. Langerina, Clec9, receptores Fc е receptores Toll-like (APOSTOLOPOULOS et al., 2013) Em particular, o papel do DEC205 no direcionamento de antígenos tumorais para DCs atraiu um interesse significativo no campo da imunologia tumoral uma vez que o DEC205 é expresso em níveis relativamente altos em DCs mieloides (KATO et al., 2006).

1.7 DIRECIONAMENTO DE ANTÍGENOS PARA DCs POR MEIO DO RECEPTOR DEC205

O primeiro mAb recombinante que foi projetado para entregar especificamente um antígeno para as DCs teve como o alvo o receptor DEC205 (HAWIGER et al., 2001a). O receptor DEC205, também conhecido como CD205, é uma proteína transmembrana de 205 kDa, que possui um domínio rico em cisteínas, um domínio de fibronectina tipo II e 10 domínios de lectina do tipo C (JIANG et al., 1995; FIGDOR; VAN KOOYK; ADEMA, 2002). Também conhecido como um receptor endocítico de processamento e captura de antígenos, o DEC205 pertence à família dos receptores de lectina do tipo C (CRLs, do inglês *C-Type Lectin Receptors*) e é homólogo ao receptor de manose de macrófagos (JIANG et al., 1995). Embora seu ligante natural não esteja bem elucidado, alguns estudos sugerem células mortas, componentes bacterianos e CPG como seus ligantes (FIGDOR; VAN KOOYK; ADEMA, 2002; SHRIMPTON et al., 2009; LAHOUD et al., 2012).

Em camundongos, o DEC205 é exclusivamente expresso em células epiteliais tímicas e DCs, mais especificamente na subpopulação CD8α+DEC205+, que é especializada em realizar apresentação cruzada de antígenos Em humanos, o DEC205 é mais amplamente expresso, sendo encontrado em células circulantes como linfócitos T e B, células NK, macrófagos e monócitos, porém a maior expressão é observada em DCs (BUTLER et al., 2006; KATO et al., 2006).

O receptor DEC205 realiza endocitose pela via dos endossomos tardios, o que favorece mais ainda a apresentação cruzada de antígenos. Ele é internalizado e

reciclado pelos endossomos tardios ou lisossomos ricos em moléculas de MHCII, em vez de endossomos precoces. Esse tráfego intracelular faz com que os antígenos sejam endocitados e processados resultando em uma estimulação de células T até 500 vezes melhor do que antígenos absorvidos por pinocitose ou por outros receptores (MAHNKE et al., 2000). Antígenos direcionados para o receptor DEC205 podem ser apresentados tanto no contexto de MHCI como de MHCII, levando a uma eficiente apresentação cruzada para células T CD8⁺ e à ativação de células T CD4⁺ (Figura 2).

Os primeiros trabalhos que demonstraram que era possível utilizar o anticorpo monoclonal (mAb) anti-DEC205 acoplado a um antígeno como estratégia para direcionar antígenos especificamente para DCs se iniciaram há duas décadas por pesquisadores da Universidade de Rockefeller (EUA). Nestes estudos, Hawiger e colaboradores complexaram o mAb anti-DEC205 à lisozima de ovo (HEL) de galinha e Bonifaz e colaboradores conjugaram o mAb à proteína ovalbumina. A administração desses mAbs quiméricos (anti-DEC205-HEL e anti-DEC205-OVA e) foi capaz de direcionar os antígenos à subpopulação de DCs DEC205⁺ *in vivo* e induzir uma resposta específica de células T. Contudo, na ausência de um adjuvante ou inflamação, esse tipo de direcionamento de antígenos resultou na indução de tolerância periférica (HAWIGER et al., 2001a; BONIFAZ et al., 2002).

Depois disso, mAbs recombinantes anti-DEC205 fusionados a diferentes antígenos tem sido desenvolvidos como abordagem vacinal promissora para indução de respostas imunológicas contra diferentes doenças infecciosas (IDOYAGA et al., 2011; HENRIQUES et al., 2013; SILVA-SÁNCHEZ et al., 2015), bem como, para indução de tolerância, conforme desejado em diferentes doenças autoimunes (STERN et al., 2010; MAHNKE; RING; ENK, 2016). Essa estratégia permitiu direcionar diferentes antígenos ao subtipo de cDCs CD8⁺ *in vivo e* mostrou-se capaz de induzir células T CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de IFN-γ e potentes respostas mediadas por anticorpos (HAWIGER et al., 2001b; BONIFAZ et al., 2002; BOSCARDIN et al., 2006; BOZZACCO et al., 2007; HENRIQUES et al., 2013).

No contexto de câncer, o direcionamento de antígenos tem sido aplicado em diferentes modelos tumorais, particularmente para melanoma e câncer de mama (JOHNSON et al., 2008; WANG et al., 2012; NEUBERT et al., 2014). Mahnke e colaboradores (2005) demonstraram que a imunização com o mAb anti-DEC205

conjugado à TRP-2 (proteína 2 relacionada a tirosinase) curou 70% dos camundongos com tumores pré-existentes e induziu células T CD4⁺ e CD8⁺ TRP2-específicas. O antígeno HER2/neu associado a tumores de mama também foi fundido a um fragmento variável de cadeia simples (scFv) direcionado ao receptor DEC205. A administração da proteína de fusão promoveu respostas celular e humoral mais elevadas e induziu maior efeito antitumoral em comparação ao antígeno não fusionado (WANG et al., 2012). Resultados promissores também já foram obtidos com o mAb anti-DEC205 humano. *In vitro*, o mAb anti-DEC205 humano foi utilizado como direcionador da proteína gag p24 do HIV para moDCs humanas e resultou na apresentação de diferentes peptídeos restritos ao MHCI (BOZZACCO et al., 2007). Além disso, o direcionamento do antígeno EBNA1 do vírus Epstein-Barr ao DEC205 humano desencadeou uma resposta imunológica baseada em células T secretoras de IFN-γ específicas para EBNA1 e produção de anticorpos anti-EBNA1 em camundongos humanizados (GURER et al., 2018).

A ampla utilização do direcionamento para o receptor DEC205 em modelo murino tem encorajado a sua aplicação na clínica. Atualmente, a empresa Celdex Therapeutics avalia a eficácia de uma vacina que direciona antígenos para DCs em ensaios clínicos de Fase I/II para o tratamento de vários tipos de câncer, como melanoma, câncer de pulmão, câncer de ovário, entre outros (NCT02129075; NCT02413827; NCT03206047). A vacina denominada CDX 1401 é um mAb anti-DEC205 totalmente humanizado conjugado ao antígeno tumoral NY-ESO-1. Os protocolos de vacinação são baseados na combinação com inibidores de checkpoint imunológico e adjuvantes como poly-ICLC e resiquimode. O tratamento em combinação com diferentes adjuvantes foi capaz de induzir imunidade humoral e celular em pacientes portadores de tumores que expressavam o antígeno NY-ESO-1 (DHODAPKAR et al., 2014). O mAb anti-DEC205-NY-ESO-1 é o primeiro mAb anti-DEC205 humano que se encontra em ensaios clínicos como uma vacina terapêutica para o tratamento de tumores



Figura 2- Direcionamento de antígeno para célula dendrítica por meio de anticorpos monoclonais anti-DEC205.

Uma das grandes vantagens de se utilizar mAbs na vacinação é o direcionamento do antígeno para células envolvidas na montagem da resposta imune adaptativa. Além disso, esta abordagem permite a customização da vacina por meio da utilização como alvo de receptores específicos expressos por subconjuntos de DCs especializadas (MACRI et al., 2016). Buscando explorar essa abordagem, em relação a um antígeno tumoral, o presente estudo foi voltado para a utilização de um mAb anti-DEC205 fusionado à proteína E7 do HPV-16.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivo central a construção de mAbs αDEC205 murino e humano fusionados à proteína E7 do HPV-16 para o controle de tumores induzidos pelo HPV-16. De forma mais específica, as metas do trabalho foram:

- Construir, produzir e caracterizar a atividade biológica dos anticorpos αDEC205-E7 murino e humano;
- Determinar o potencial terapêutico dos mAbs murino frente aos modelos de tumores de mucosa (intravaginal e cavidade oral) e subcutâneo;
- Analisar a capacidade do mAb murino em ativar respostas de células T E7específicas;
- Avaliar o efeito do mAb αDEC205-E7 humano sobre o fenótipo de células moDCs humanas e sua capacidade de estimular moDCs *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CONSTRUÇÃO, PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO mAb αDEC205-E7 MURINO E SEU RESPECTIVO CONTROLE

3.1.1 Clonagem da proteína E7 fusionada à sequência que codifica a cadeia pesada dos mAbs αDEC205 e isotipo controle de camundongo

A sequência codificadora da proteína E7 foi amplificada por PCR tendo como molde o plasmídeo pRE4E7 (LASARO et al., 2005) e utilizando os iniciadores E7 senso: 5'-GCTCGAGGAGTTCGGTAGGTTCATGCACGGCACACCTA' e E7 antisenso: 5'-GGCGGCCGCTTAGGGGCTTCTGGCTACAAATTG'. Posteriormente, o produto da amplificação foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 0,8% no qual a banda, de aproximadamente 300 pares de bases, foi excisada e purificada utilizando o kit Ilustra[™] GFXTM PCR and Gel Band Purification (GE Healthcare), conforme instruções do fabricante. O gene da E7 foi clonado em fusão com a sequência carboxi-terminal da cadeia pesada do mAb αDEC205 e do Isotipo controle de camundongo (cedidos gentilmente pelo Dr. Michel C. Nussenzweig, Universidade Rockefeller, EUA). Para a reação de ligação foi utilizada a razão molar de 3:1 inserto/vetor. Os produtos de ligação foram transformados em linhagens de Escherichia coli DH5a e plaqueadas em meio LB sólido contendo 100µg/mL de ampicilina para a obtenção de colônias isoladas. O rastreamento dos plasmídeos recombinantes foi feito pela reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação do gene E7. Em seguida, dois clones positivos no PCR de cada construção foram escolhidos para extração de DNA pelo método de lise alcalina e submetidos ao tratamento com as endonucleases de restrição Notl e Xhol (Thermo Fisher Scientific). A confirmação final da subclonagem foi realizada por sequenciamento.

3.1.2 Expressão e purificação dos mAbs quiméricos murinos

O plasmídeo que codifica a cadeia pesada do αDEC205 de camundongo fusionado à proteína E7 (pDEC205-E7) e o plasmídeo codificador da cadeia leve (pDEC205 kappa) foram propagados em linhagem *E. coli* DH5α. O DNA plasmidial foi purificado em grande escala com as colunas QIAGEN Mega Prep (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante.

Para expressão dos mAbs, inicialmente foi realizado o cultivo de células embrionárias de rim humano (HEK) 293T (ATCC NºCRL -11268) em meio DMEM high glucose® (Gibco), acrescido de 2mM de L-glutamina, 10U/L estreptomicina/penicilina, 1mM de piruvato de sódio e 5% de soro fetal bovino com baixa concentração de IgG (Gibco). Após as células atingirem uma confluência de 70%, o meio da cultura foi trocado por DMEM com 2mM de L-glutamina, 10 U/L de estreptomicina/penicilina, 1mM de piruvato de sódio e 2% de soro fetal bovino com baixa concentração de IgG (Gibco). Dez microgramas de cada plasmídeo foram adicionados para o volume final de 1 mL em solução de NaCl (150mM) contendo 4,5 µg de polietilenimina (PEI) por µg de DNA. Essas misturas foram homogeneizadas (10 seg), incubadas por 5 min (T.A) e distribuídas sobre as placas uniformemente. A cultura de células transfectadas foi mantida na estufa a 37 °C com 5% de CO2 durante 7 dias. Após 7 dias de incubação, o sobrenadante das culturas foi coletado, filtrado e precipitado com 60% de sulfato de amônio (Sigma) a 4 °C por cerca de 16-18 horas. O precipitado foi adquirido por centrifugação, redissolvido em tampão fosfato-salina (PBS- phosphate buffered saline) 1x gelado e dialisado duas vezes por um período de 3 h cada. A purificação dos mAbs quiméricos foi feita com esferas de proteína G (GE Healthcare), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. Os mAbs foram então eluídos das esferas em 100 mM de glicina (pH= 3,0) e o pH neutralizado com tampão Tris (1M, pH 8,0) (Figura 3). Em seguida, os mAbs foram dialisados em PBS 1x. Após a quantificação pelo método do ácido bicinconínico (BCA) (MALLIA et al., 1985), os mAbs foram então aliquotados e estocados a -20 °C até o uso.



Produção de anticorpos recombinantes

Figura 3- Esquema de produção de anticorpos quiméricos.

3.1.3 Análise da integridade dos mAbs quiméricos murinos fusionados à E7

A integridade dos mAbs produzidos foi avaliada em gel de SDS-PAGE 12,5% em condições redutoras (aquecimento a 96 °C por 10 min na presença de DTT), seguido de coloração com Coomassie Blue. Avaliamos também a integridade da proteína E7 fusionada aos mAbs por meio de ensaio de *Western Blot*. Para isso, as amostras proteicas (αDEC205 vazio como controle negativo, αDEC205-E7 e E7) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5% (SDS-PAGE) e transferidas para membrana de nitrocelulose (GE Healthcare Life Sciences). O bloqueio da membrana foi realizado em solução de PBS-Tween 0,05% com 3% de leite por 2 h, a temperatura ambiente. A marcação primária foi realizada por incubação (1h) com o soro obtidos de camundongos imunizados com a proteína E7 e o adjuvante Poly (I:C). Esses anticorpos reconhecem especificamente a proteína E7, na diluição de 1:250, diluídos em tampão de bloqueio. Anticorpos anti-IgG de camundongos conjugados com a enzima peroxidase (Sigma) (diluição 1:10.000) foram usados como anticorpos secundários. As bandas reativas foram identificadas pela exposição das membranas à solução de luminol-peróxido de hidrogênio, de acordo com as

indicações do fabricante (Sigma). Como controles positivos e negativos dos ensaios foram utilizadas, respectivamente, 0,2 μg da proteína E7 e 2 μg do mAb αDEC205vazio.

3.1.4 Ensaio de ligação ao receptor DEC205

A capacidade dos mAbs αDEC205-E7 reconhecerem e se ligarem ao receptor DEC205 foi determinada em testes de ligação a células de ovário de hamster chinês (CHO) transgênicas que expressam os receptores DEC205 murino ou humano (gentilmente cedidas pelo Dr. Michel Nussenzweig, Universidade Rockefeller, EUA). Para esse ensaio, 10⁵ células foram incubadas com 10, 1 e 0,1 µg/mL dos mAbs, αDEC205-E7 ou αDEC205 por 30 min no gelo. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com tampão FACS (PBS +2% Soro Fetal Bovino (SFB) (540 xg por 5 minutos) e adicionou-se o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo marcado com AlexaFluor 488 na diluição de 1:4000 (Life Technologies). Após incubação por 20 min no gelo e no escuro, as células foram lavadas novamente por 3 vezes nas mesmas condições descritas anteriormente. As amostras foram lidas em citômetro de fluxo LSRFortessa[™] (BD Bioscience) e analisadas com o software FlowJo.

3.1.5 Ensaio de ligação a DCs provenientes do baço de camundongos

Além disso, avaliamos a capacidade dos mAbs se ligarem a DCs provenientes do baço de camundongos naive. Para isso, camundongos C57BL/6 naive foram eutanasiados e tiveram os baços retirados. As células foram obtidas após maceração do órgão e tratamento com tampão hemolítico ACK (NH₄Cl 0,15 M; KHCO₃ 1mM; Na₂EDTA 0,1mM). Inicialmente foram plaqueados 10⁶ esplenócitos por poço, em placas de 96 poços. Os receptores Fcγ foram bloqueados com anticorpos anti-CD16/CD32 (FcBlock – BD Biosciences) durante 15 min em gelo, e posteriormente, os mAbs foram incubados na concentração de 1 µg/mL. Após 30 min de incubação, as células foram lavadas com tampão FACS (PBS 1x + 2% SFB) e incubadas com o anticorpo secundário anti-mouse IgG marcado com Alexa Fluor 488 (Life Technologies). Após incubação por 20 min no gelo e no escuro, as células foram lavadas novamente por 3 vezes. Posteriormente, as células foram marcadas com os anticorpos anti-CD19, anti-MHCII, anti-CD3, anti-CD49b, anti-CD11c e anti-CD8a (**Tabela 2**). Após 30 min de incubação, as células foram novamente lavadas com tampão de FACS e as amostras foram lidas em citômetro de fluxo LSRFortessa[™] (BD Bioscience) e analisadas com o software FlowJo (Tree Star).

Tabela 2. Painel de anticorpos de citometria utilizado para imunofenotipagem e ensaio de ligação a cDC1 do baço de camundongos.

| Anticorpo | | | |
|----------------|------------------|-------------|-----------------------|
| monoclonal | Clone/Referencia | Fluorocromo | Fabricante |
| αCD19 | HIB19 | Biotina | BD Biosciences |
| αCD3 | 145-2C11 | Biotina | BD Biosciences |
| αΜΗϹΙΙ | M5/144.15.2 | BV421 | BD Biosciences |
| αCD49b | DX5 | Biotina | BD Biosciences |
| αCD11c | H13 | PE | BD Biosciences |
| αCD8 | 53-6.8 | APC | Biolegend |
| Estreptavidina | 551419 | PerCp-Cy5.5 | BD Biosciences |
| αlgG mouse | A11001 | Alexa 488 | Life Technologies |

3.2 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DO mAb MURINO FRENTE AOS MODELOS DE TUMOR SUBCUTÂNEO E DE MUCOSA

3.2.1 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 fêmeas com idade entre 6 a 8 semanas, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo-FMUSP. Todos os experimentos utilizando animais de experimentação foram realizados no Biotério do Departamento de Microbiologia, seguindo as normas e recomendações do Comitê de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), sob o protocolo de número 80/2016.

3.2.2 Cultivo e preparo de linhagens celulares tumorais

A linhagem celular TC-1 é derivada de células primárias do epitélio pulmonar de camundongos C57BL/6 transformadas com V-Has-ras e os genes de E6 e E7 do HPV-16 (LIN, et al, 1996). A partir dessa, a linhagem TC-1 luc foi gerada por transfecção utilizando um retrovírus contendo o gene da luciferase, conforme descrito previamente por Kim e colaboradores (KIM; HUNG; WU, 2007). Ambas foram gentilmente cedidas pelo Dr. T.C. Wu (Universidade Johns Hopkins, EUA). As células TC-1 foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 10% de SFB, na presença de G418 (Geneticina, 400µg/mL) e mantidas a 37°C e 5% de CO₂. Para os experimentos de inoculação tumoral, as células foram retiradas das garrafas com a ajuda de Tripsina EDTA (Vitrocel), lavadas duas vezes com PBS 1x e suspensas em meio sem soro. Em seguida, as células foram contadas em câmara de Neubauer e avaliadas quanto a viabilidade celular pelo método de exclusão pela coloração com Trypan Blue (Thermo Fisher Scientific) para identificação de células viáveis. Para a inoculação, foram consideradas apropriadas para uso apenas as culturas que apresentaram uma viabilidade celular igual ou maior que 90% pelo método de coloração acima descrito.

3.2.3 Implantação de tumores

Para avaliação da eficácia dos mAbs frente ao modelo de tumor subcutâneo HPV-16⁺ foram utilizadas 2,5x10⁵ ou 10⁵ células TC-1/animal ressuspensas em 100µL de meio sem soro, inoculadas pela via subcutânea (s.c) na região dorsolateral direta do animal. O acompanhamento da evolução dos tumores foi feito duas vezes a cada semana com auxílio de um paquímetro e a sobrevivência foi avaliada por um período mínimo de 60 dias. Os animais foram eutanasiados quando apresentavam tumores iguais ou maiores que 200 mm².

Além disso, avaliamos o potencial terapêutico dos mAbs em dois modelos de tumores de mucosa: tumor intravaginal (localizado na mucosa vaginal) e o tumor na cavidade oral (localizado na língua). Para o modelo de tumor intravaginal, os animais receberam 3 mg/100 µL de DepoProvera (acetato de medroxiprogesterona, 150 mg/mL) pela via s.c, quatro dias antes da inoculação das células tumorais, para sincronização do ciclo estral. A implantação dos tumores foi realizada por meio da injeção de 10⁵ células TC-1 luc/animal/20 µL na mucosa vaginal. Para explorar o

modelo de tumor na cavidade oral, já descrito por Sandoval e colaboradores (SANDOVAL et al., 2013), os animais receberam a inoculação de 5x10⁴ células/20µL na língua. Em ambos os modelos, a implantação das células tumorais foi precedida por anestesia com ketamina (75mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) pela via intraperitoneal (i.p).

O monitoramento do crescimento dos tumores na mucosa foi feito uma vez por semana por meio da emissão de bioluminescência utilizando o equipamento IVIS Spectrum no Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa (CEFAP, ICBIV, USP). Para quantificação da bioluminescência, a D-luciferina (Promega) foi inoculada intraperitonealmente na concentração de 150mg/kg de peso corpóreo em 100µL de PBS 1x. A captura das imagens e dados foi feita após 5 min da inoculação da luciferina. As imagens de bioluminescência foram exibidas no modo "fótons" e analisadas posteriormente para obtenção dos valores de radiância (p/s/cm²/sr), que se refere ao número de fótons por segundo por área de tecido em um ângulo sólido ("stearadian", "sr"). Os animais foram eutanasiados quando a bioluminescência alcançou 10⁹-10¹⁰ fótons/segundos, ou após perda significativa do peso corpóreo (mais de 30%).

3.2.4 Protocolo de imunização

A imunização foi baseada em duas doses, tendo início três dias após a implantação dos tumores e com intervalo de 7 dias entre elas. Inicialmente, os mAbs foram administrados pela via i.p ou pela via s.c em diferentes concentrações (2.5 µg, 5 µg e 10 µg) na presença do adjuvante Poly (I:C) (50 µg) diluídos em 100 µL de PBS. Dessa forma, os animais foram divididos em seis grupos:1. Poly (I:C) i.p; 2. α DEC205 (10 µg) i.p; 3. α DEC205-E7 (2.5 µg) i.p; 4 α DEC205-E7 (5 µg) i.p; 5. α DEC205-E7(10 µg) i.p; 6. α DEC205-E7 (10 µg) s.c.

Para os experimentos de combinação dos mAbs α DEC205-E7 com a proteína gDE7, os animais foram imunizados com 30 µg da proteína gDE7 e com 10 µg de α DEC205-E7 coadministrado ao poly (I:C), em um esquema de *prime/boost.* Os animais foram divididos em quatro grupos de acordo com o tratamento realizado: 1. α DEC205-E7 (*prime*) e gDE7 (*boost*); 2. gDE7 (*prime*) e α DEC205-E7 (*boost*); 3. gDE7 (2 doses). 4.poly (I:C).

Para avaliação nos modelos de mucosa, dois grupos experimentais foram utilizados: 1. poly (I:C) e 2. αDEC205-E7+ poly (I:C). Da mesma forma, os mAbs foram administrados em duas doses de 10 µg juntamente com poly (I:C), três e dez dias após a inoculação dos tumores.

3.2.5 Obtenção e processamento de sangue, baço e linfonodos inguinais drenantes do tumor

A coleta de amostras de sangue periférico foi realizada em tubos contendo 30 μ L de solução anticoagulante, heparina (20 U/ μ L). As amostras foram tratadas com tampão de lise de hemácias ACK (0.15 mM NH₄CL; 1Mm KHCO₃; 0.1 mM EDTA) por 5 min em T.A. Em seguida, as células foram lavadas por 2x com meio RPMI 2% SFB e centrifugadas a 1800 rpm por 5 min. As células foram ressuspensas em meio completo (RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB, 2 mM L-glutamina, 1 mM piruvato de sódio (Gibco), 1% v/v solução de aminoácidos não essenciais (Gibco) 1% v/v solução de aminoácidos essenciais (Gibco), 1% v/v solução de vitaminas (Gibco), 55 μ M 2 β - mercaptoetanol (Gibco)).

Para obtenção dos baços e linfonodos inguinais drenantes do tumor, os animais foram eutanasiados e posteriormente foi realizada a coleta asséptica dos órgãos. Os mesmos foram acondicionados em placa de 12 poços contendo 2 mL de meio RPMI suplementado com 10% SFB (R10) e macerados individualmente com o auxílio de um êmbolo de seringa e posteriormente filtrados (filtro com poro de 70 µm – Easy Strainer Greiner BioOne). Após centrifugação das amostras a 1800 rpm por 5 min, o sobrenadante foi descartado. Para as amostras de baços, o sedimento celular foi tratado com tampão de lise ACK por 5 min no gelo para completa ruptura das hemácias. Após este período, as células foram lavadas com R10 e centrifugadas duas vezes, sendo ressuspensas em meio completo. A viabilidade das células foi avaliada usando o corante de exclusão azul de Tripan 0,4%. A concentração celular foi estimada em uma câmara de Neubauer e ajustada para os ensaios imunológicos.

3.2.6 Ensaio de marcação intracelular de IFN-y

Amostras do sangue, baço e linfonodos foram coletados 7 ou 14 dias após a segunda dose da imunização para avaliar a ativação de células T CD8⁺ por meio da produção de IFN-y. As suspensões de células (1,5x10⁶células/poço) foram plaqueadas em placa de fundo côncavo de 96 poços (Corning) em 200 µL de meio RPMI completo na presença de 10µg/mL de Brefeldina A (GolgiPlug; BD Biosciences, USA), 2 µg/mL de anti-CD28 (BD Biosciences,USA) e 1,5 µg/mL (300ng/poco) do peptídeo específico de E7 (RAHYNIVTF), que corresponde ao epítopo CD8+ imunodominante em animais C57BL/6 (FELTKAMP et al., 1993). Após incubação por 12 h a 37°C, as células foram marcadas com o reagente Live/Dead Fixable Agua vitality dye e anticorpos anti-CD3 e anti-CD8. Para os ensaios de memória, as células foram marcadas com anticorpos anti-CD44 e anti-CD62L por 30 min a 4°C. Em seguida, as células foram lavadas e centrifugadas duas vezes a 1800 rpm por 5 min com PBS 2% e fixadas com tampão Cytofix/Cytoperm (kit BD Cytofix/CytopermTM Plus, BD Biosciences) por 15 min a 4 °C. Posteriormente, as células foram permeabilizadas com solução Perm/Wash (BD Biosciences), e foram incubadas neste mesmo tampão com anti-IFN-y por 30 min a 4 °C. Após as lavagens, as células foram suspensas em 200µL de PBS 2% SFB e avaliadas por citometria de fluxo (BD LSRFortessa). Os dados foram analisados com o auxílio do programa FlowJo.

| Anticorpo | | | |
|------------|----------|-------------|-----------------------|
| monoclonal | Clone | Fluorocromo | Fabricante |
| αCD3 | 145-2C11 | APC-Cy7 | BD Biosciences |
| αCD8 | 53-6.7 | PE-Cy7 | BD Biosciences |
| αCD44 | IM7 | PE | BD Biosciences |
| αCD62L | MEL-14 | FITC | BD Biosciences |
| αΙΕΝγ | XMG1.2 | BV421 | BD Biosciences |

Tabela 3. Painel de anticorpos de citometria de fluxo utilizados para caracterização da resposta celular

3.2.7 Ensaio de citotoxicidade in vivo

O ensaio de citotoxicidade *in vivo* foi realizado para verificar a presença de células T CD8⁺ citotóxicas específicas para o antígeno E7 em animais imunizados, de

acordo com metodologia descrita por Barber, Wherrey e Ahmed (2003) (BARBER; WHERRY; AHMED, 2003). Dez dias após a última dose, um grupo de animais não imunizados foi submetido à eutanásia, os baços foram retirados e processados como já descrito no item 3.2.5. As células foram marcadas com 0.7 µM ou 7 µM de carboxyfluorescin succinimidyl ester (CFSE) (Invitrogen) em PBS 1x, por 15 min a 37 °C. Após a incubação, as células foram lavadas e ressuspendidas em meio RPMI acrescido de 5% de SFB. A população de células marcadas com 7 µM de CFSE também foi pulsada com 2,5 µg/mL do peptídeo CD8-específico da proteína E7 por 40 min a 37 °C. Após esse período, as células foram lavadas com meio RPMI suplementado com 5% SFB para a remoção do excesso do peptídeo e, em seguida, contadas. Quantidades iguais das duas populações de células marcadas foram misturadas e centrifugadas a 1.500 rpm. O sedimento de células foi ressuspendido em RPMI sem soro de modo a conter 2x10⁷ células/100 µL e injetado nos animais imunizados pela via do plexo retro orbital. No dia seguinte (18 h após), todos os animais foram submetidos à eutanásia e as células do baço foram coletadas. As células do baço foram lavadas e ressuspendidas em 400 µL de PBS 2% SFB e examinadas por citometria de fluxo. As porcentagens de lise específica das célulasalvo foram calculadas como descrito anteriormente (DE ALENCAR et al., 2009).

3.2.8 Cytokine Beads Array (CBA)

As células do baço dos camundongos imunizados (1,5x10⁶ células/poço) foram estimulados *in vitro* em meio completo com 1,5 µg/ml do peptídeo E7 por um período de 12 h. A dosagem de citocinas do sobrenadante da cultura foi realizada com o *kit* Th1/Th2/Th17 (BD Biosciences), de acordo com as instruções do fabricante.

3.2.9 Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas utilizando o programa GraphPad-Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA-USA). Foram empregados os testes paramétricos de Log-rank e One/Two Way ANOVA seguindo do teste múltiplo de comparação Bonferroni. Valores com p<0.05 foram considerados estatisticamente significativos com um intervalo de confiança de 95%.

3.3 CONSTRUÇÃO, PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE mAbs αDEC205-E7 E ISOTIPO-E7 HUMANO

3.3.1 Clonagem da sequência da proteína E7 em fusão à cadeia pesadas dos mAbs humanos αDEC205 e Isotipo controle

Para construção de mAbs humanos fusionados à proteína E7, utilizamos plasmídeos codificadores das cadeias pesadas dos mAbs humanos αDEC205 (pDEC hu) e o Isotipo controle (IgG) (pISO hu), gentilmente cedidos pelo Dr. Michel Nussenzweig da Universidade Rockefeller (EUA). Inicialmente, o plasmídeo pDEC205-E7 de camundongo, construído anteriormente neste trabalho, foi submetido a uma digestão enzimática utilizando as endonucleases Notl e Xhol (Thermo Fisher Scientific), que permitiu a liberação do inserto do gene E7. Posteriormente, o produto da digestão foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 0,8%, no qual a banda contendo o fragmento de interesse foi excisada e purificada utilizando o Kit ilustraTM GFXTM PCR and Gel Band Purification (GE Healthcare) conforme instruções do fabricante. O gene da E7 foi subclonado em fusão com a seguência carboxil-terminal da cadeia pesada dos mAbs αDEC205 e Isotipo controle humano. Para a reação de ligação foi utilizada a razão molar de 3:1 inserto/vetor. Os produtos de ligação foram transformados em linhagens de Escherichia coli DH5a e plaqueadas em meio LB sólido contendo 100µg/mL de ampicilina para a obtenção de colônias isoladas. Uma colônia de cada plasmídeo foi escolhida para purificação de DNA pelo método de lise alcalina e o DNA purificado foi submetido ao tratamento com as endonucleases de restrição Notl e Xhol. A confirmação final da subclonagem foi realizada por sequenciamento de Sanger.

3.3.2 Produção e purificação dos mAbs humano

A produção dos mAbs foi realizada por transfecção em células HEK293T utilizando os plasmídeos codificadores para as cadeias pesadas (pDEC205-E7 Hu e pISO-E7 Hu) e leves (pDEC205 lambda e pISO lambda) dos mAbs humanos, sendo todo o processo de produção e purificação semelhante ao realizado para o mAb murino, como descrito nos itens 3.1.2 e 3.1.3.

3.3.3 Análise da integridade dos mAbs quiméricos humanos fusionados à E7

Os mAbs quiméricos humanos foram avaliados analisando sua integridade em gel de SDS-PAGE 12% em condições redutoras, seguido de coloração por Coomassie blue. Também foi avaliada a integridade da proteína E7 fusionada aos mAbs por meio de sua detecção em ensaio de *Western blot*. Para isso, amostras das proteínas aDEC205-E7 hu, ISO-E7 hu e E7 foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5% (SDS-PAGE) e transferidas para membrana de nitrocelulose (GE Healthcare Life Sciences). A técnica foi realizada como descrito no item.3.1.3.

Além disso, buscamos também observar a integridade das cadeias pesadas dos mAbs. Para isso, a membrana foi previamente bloqueada e incubada com um anti-IgG humano (Sigma), na diluição de 1:10.000. As bandas reativas, em ambos os casos, foram identificadas pela exposição das membranas à solução de luminol-peróxido de hidrogênio, de acordo com as indicações do fabricante (Sigma).

3.3.4 Amostras de sangue periférico humano

As amostras de sangue humano utilizadas e todos os procedimentos envolvendo células humanas foram previamente aprovadas por submissão via plataforma Brasil para o Comitê de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, sob protocolo de número CAAE 40231820.1.0000.5467.

3.3.5 Diferenciação de células dendríticas derivadas de monócitos humanos (moDCs) in vitro

As moDCs foram obtidas a partir de células mononucleares do sangue periférico de doadores saudáveis como subproduto da doação de plaquetas por aferese no banco de sangue do Hospital Alemão Oswaldo Cruz na cidade de São Paulo. Inicialmente, as amostras de sangue foram diluídas 1:2 em PBS 1x e as células mononucleares (PBMCs) foram separadas por gradiente de separação utilizando Ficoll-Hypaque (Amersham Pharmacia Biotech), de acordo com as instruções do fabricante. Após várias lavagens com PBS 1x, os monócitos foram separados de outras células mononucleares (prevalentemente linfócitos) por adesão à superfície

plástica. Assim, 5x10⁶ células/poço foram ressuspendidas em meio de cultura AIM-V (Gibco), distribuídas em placas de 12 poços e incubadas a 37 °C e 5% de CO₂ por 2 horas. As células não aderentes foram retiradas com 3 lavagens com PBS 1x e os monócitos aderentes foram em seguida cultivados por 5 dias em meio AIM-V acrescido de GM-CSF (50 ng/mL; R&D Systems) e IL-4 (50 ng/mL; R&D Systems) para obtenção de monócitos diferenciados em DCs.

3.3.6 Ensaio de ligação dos anticorpos humanos a moDCs

Após as etapas de diferenciação e ativação das moDCs, 5x10⁵ células foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas no gelo por 15 mim com o reagente FcBlock (BD Biosciences) para bloqueio dos receptores Fcγ. Em seguida, as células foram incubadas com 10 µg/mL dos anticorpos αDEC205-E7 hu e ISO-E7 hu por 30 min no gelo. Após lavagens com tampão FACS, as células foram incubadas com anticorpo anti-IgG humano conjugado a FITC por 30 min em gelo, com subsequente marcação com anticorpos anti-CD11c FITC (clone:B-ly6; BD Biosciences) e anti-HLA-DR V500 (clone: 646-6; BD Bioscience) para fenotipagem das células. As células foram analisadas em SSC-A/FSC-A, seguido de exclusão de doublets e células CD11c⁺/HLA-DR⁺. Em seguida, a capacidade de ligação dos mAbs αDEC205-E7 hu e ISO-E7 hu foi avaliada pela fluorescência de FITC nas populações de DCs CD11c⁺/HLA-DR⁺. Os dados estão apresentados como Mediana da Intensidade de Fluorescência (MFI) do FITC.

3.3.7 Ensaio de ligação a células THP-1

A atividade biológica do mAb α DEC205/E7 e ISO-E7 humano também foi testada em ensaio de ligação a células THP-1, uma linhagem de monócitos humanos. Para isso, 2x10⁵ células foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas no gelo por 15 mim com o reagente FcBlock para bloqueio dos receptores Fc γ . Em seguida, as células foram incubadas com 10 µg/mL dos anticorpos α DEC205-E7 hu e ISO-E7 hu por 30 min no gelo. Após lavagens com tampão FACS, as células foram incubadas com anticorpo anti-IgG humano conjugado a APC por 30 min em gelo. Após 2 lavagens, as amostras foram adquiridas e analisadas por citometria de fluxo.

3.3.8 Ativação in vitro de moDCs provenientes do sangue periférico de doadores saudáveis

Para avaliar a capacidade de ativação de moDCs pelo αDEC205-E7 hu, 5 dias após a diferenciação, as moDCs imaturas provenientes de doadores saudáveis foram estimuladas com 10 µg/mL de cada mAb, isoladamente ou em combinação com 10 µg/mL de poly (I:C). Como controles, as células foram estimuladas com 3µg/mL da proteína E7 e com 10µg/mL de poly (I:C). Após 48 h de estímulo, as células foram marcadas com anticorpos anti-HLA-DR V500 (clone: 646-6; BD Bioscience), anti-CD11c FITC (clone:B-ly6; BD Bioscience), anti-CD83 PE (clone: HB15e) e anti-CD86 APC (clone: 2331 (FUN-1); BD Bioscience). As células foram analisadas por citometria de fluxo LSRFortessa (BD Biosciences) e os dados foram tratados utilizando o software FlowJo.

3.3.9 Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas utilizando o programa GraphPad-Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA-USA). Foi empregado o teste- t e o teste ANOVA seguindo do teste múltiplo de comparação Bonferroni. Os valores para p<0.05 foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 CONSTRUÇÃO, PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO mAbs αDEC205-E7 e ISOTIPO-E7 MURINO

4.1.1 Clonagem da proteína E7 fusionada ao mAb αDEC205 e Isotipo controle murino

Os plasmídeos que codificam as cadeias pesada dos mAbs αDEC205 (pDEC205) e Isotipo controle (pISO) foram gentilmente cedidos pelo Dr. Michel Nussenzweig (Universidade Rockefeller, EUA). As sequências variáveis das cadeias pesadas e leve do mAb αDEC205 gerado em rato (clone NLDC145) foram clonadas em fusão com sequências constantes de IgG1 de camundongo, a fim de minimizar a geração de resposta imune contra o próprio anticorpo. A **Figura 4 A** mostra a estrutura do mAb anti receptor DEC205, denominado αDEC205-E7. Como mostrado, o antígeno E7 foi clonado na porção C-terminal da cadeia pesada dos mAbs, sendo o sítio reconhecido pelo receptor Fc mutado, para evitar ligação do mesmo aos receptores Fc das células do sistema imune. Ainda é possível observar a existência de uma sequência *linker* que confere certa flexibilidade à molécula e possui um sítio de clivagem de hidrolases que favorece sua degradação no fagossomo das DCs.

Para construção dos mAbs, a sequência da proteína E7 do HPV-16 foi clonada nos plasmídeos codificadores da cadeia pesada de cada mAb. Para isso, foi feita a amplificação do inserto codificador da proteína E7 por PCR (E7 com aproximadamente 300 pares de bases) (**Figura 4 B**) e, posteriormente, clonado nos plasmídeos pDEC205 e pISO. Dois clones positivos para cada plasmídeo foram escolhidos para extração de DNA e digestão enzimática com *Notl* e *Xhol*, e subsequente liberação dos fragmentos esperados (vetor de aproximadamente 6000 pares de base, **Figura 4 C**). Os clones foram sequenciados, tendo suas sequências confirmadas (dados não mostrados).



Figura 4. Clonagem do fragmento de DNA codificador da sequência da proteína E7 fusionada à cadeia pesada que codifica os mAbs α**DEC205 e Isotipo controle.** (A) Estrutura do mAb αDEC205-E7; (B) Amplificação do gene da proteína E7 com aproximadamente 300 pares de bases; (C) Digestão dos plasmídeos com as enzimas de restrição *Xhol* e *Notl*; M- marcador de peso molecular; 1 e 2 –Plasmídeos pDEC205-E7; 3 e 4-Plasmídeos pISO-E7. Os fragmentos foram separados por gel de agarose a 0,8%.

4.1.2 Expressão, purificação e análise dos mAbs murinos

O mAb αDEC205-E7 e o controle αDEC205 foram produzidos e purificados a partir de transfecção transiente em células HEK293T transfectadas. Apenas o mAb αDEC205-E7 foi adequadamente expresso, enquanto que o mAb ISO-E7, após

diversas tentativas, não foi passível de expressão. Os mAbs produzidos foram quantificados pelo método de BCA e tiveram sua integridade confirmada por SDS-PAGE. A **Figura 5 A** mostra um gel de SDS-PAGE 12,5% em condições redutoras, corado com coomassie blue, no qual é possível observar as cadeias leves e pesadas dos mAbs αDEC205-E7 e αDEC205, em perfis eletroforéticos compatíveis com o esperado. As cadeias leves apresentam uma massa molecular de aproximadamente 25 kDa, enquanto que as cadeias pesadas, variam de tamanho, de acordo com a proteína fusionada. Neste caso, 50 kDa para αDEC205 e 70 kDa para αDEC205-E7.

Os mAbs foram analisados em ensaios de *Western blot* revelados com anticorpos anti-E7 e anti-IgG de camundongo. Quando os mAbs foram incubados com o anticorpo policional anti-IgG de camundongo, as cadeias leves e pesadas dos mAbs foram marcadas, porém, a proteína E7 não foi reconhecida (**Figura 5 B**, coluna 3). Como esperado, somente a cadeia pesada dos mAbs quiméricos (que contém a proteína E7 fusionada) e a proteína E7, utilizada como controle positivo, reagiram quando incubados com anticorpo policional anti-E7 (**Figura 5 B**, coluna 2 e 3). Em conjunto, esses dados demonstram que os mAbs foram produzidos adequadamente, conservando sua estrutura e antigenicidade da proteína E7 fusionada.



Figura 5. Análise da expressão e integridade dos mAbs murinos produzidos. Quantidades equimolares dos anticorpos foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5% (SDS-PAGE) em condições desnaturantes (A) e ensaios de *Western blot* empregando anti-IgG de camundongo e anticorpo policional anti-E7 (B). M: Marcador molecular; 1: αDEC205; 2: αDEC205-E7; 3: E7.

4.1.3 Ensaio de ligação dos mAbs αDEC205-E7 murino a células CHO transgênicas

A afinidade ao receptor DEC205 dos mAbs murinos produzidos foi avaliada por meio da sua capacidade de reconhecimento e ligação ao receptor DEC205 em células CHO transgênicas. Inicialmente, utilizamos células CHO que expressam constitutivamente o receptor DEC205 de camundongos e de humano. As células foram incubadas com três diferentes concentrações (10, 1 e 0,1 μ g/mL) dos anticorpos α DEC205 e α DEC205-E7. Como demonstra a **Figura 6**, os anticorpos quiméricos ligaram-se ao receptor DEC205 de camundongo, mas não ao receptor DEC205 humano. Essa ligação foi observada em todas as concentrações testadas mostrando-se dose dependente.



Figura 6. Ensaio de ligação dos mAbs ao receptor DEC205. Células CHO que expressam o receptor DEC205 de camundongo e de humano foram incubadas com 10, 1 e 0,1 μ g/mL dos mAbs α DEC205 e α DEC205-E7 e, posteriormente, incubadas com anticorpo secundário (α IgG de camundongo-Alexa 488). As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo LSRFortessaTM e analisadas com o programa Flow Jo.

4.1.4 Ensaio de ligação dos mAbs murinos a DCs provenientes do baço de camundongos

Para complementar os resultados obtidos anteriormente, avaliamos também se os mAbs eram capazes de se ligar diretamente a DCs CD8α⁺ provenientes do baço de camundongos que expressam o receptor DEC205. Para isso, esplenócitos de camundongos naive foram processados e marcados para análise por citometria de fluxo. A análise foi baseada na marcação de células CD3⁻CD19⁻DX49b⁻MHCII⁺ e, posteriormente, marcadas para CD11c⁺CD8α⁺. Dessa forma, selecionamos as células, que consideramos DCs convencionais, e subdividimos essas em duas populações, de acordo com a expressão da cadeia alfa da molécula de CD8, como mostra a **Figura 7**.



Figura 7. Estratégia de gating utilizada para seleção de DCs.

Observamos neste experimento que os mAbs foram capazes de se ligar com maior afinidade à população de DCs CD8α⁺ nas duas concentrações testadas (**Figura 8 A**). Como não houve diferença entre as concentrações de mAbs testadas, a **Figura 8 B** ilustra a capacidade de ligação dos mAbs utilizando a menor concentração (0,3 µg/mL). Portanto, os mAbs produzidos foram capazes de se ligar especificamente ao receptor DEC205, tanto em células CHO transgênicas como em DCs de

camundongos, em todas as concentrações testadas. Esses dados evidenciam que os mAbs produzidos estavam adequados para os ensaios subsequentes de imunização, como demonstrado por meio da sua capacidade de se ligar ao receptor DEC205, especialmente em DCs CD11c⁺CD8α⁺ que expressam naturalmente o receptor DEC205.



Figura 8. Ensaio de ligação do mAb α DEC205-E7 a DCs provenientes do baço de camundongos. Esplenócitos de camundongos naive foram purificados e incubados com 0,3 e 3 µg/mL de α DEC205 e α DEC205-E7 por poço durante 30 min. Após incubação, as células foram marcadas com anticorpo anti-IgG de camundongo como secundário e posteriormente com α CD3, anti-CD19, anti-MHCII, anti-CD49b, anti-CD11c e anti-CD8; (A) Histogramas representativos; (B) Determinação da MFI da ligação dos mAbs na concentração de 0,3 µg/mL às populações de DCs de interesse a partir da utilização de um anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado ao Alexa 488. Os dados representam a média de triplicatas \pm desvio padrão.

4.2 POTENCIAL TERAPÊUTICO DOS mAbs FRENTE A TUMORES HPV-16+

Após a validação e caracterização dos mAbs αDEC205-E7 *in vitro*, o próximo passo foi avaliar o potencial terapêutico desses mAbs frente a tumores HPV 16⁺ subcutâneos e ortotópicos. Para isso, utilizamos células tumorais da linhagem TC-1 capazes de expressar as oncoproteínas E6 e E7 do HPV-16, principal modelo préclínico para estudo de tumores associados ao HPV.

4.2.1 Efeito antitumoral terapêutico e ativação de respostas de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos mediadas pela administração do mAb αDEC205-E7 em combinação com o adjuvante poly (I:C)

Os primeiros experimentos *in vivo* buscaram investigar qual seria a melhor dose e a melhor via de administração dos mAbs capazes de apresentar um efeito antitumoral em modelo de células TC-1. Para isso, camundongos C57BL/6 foram transplantados com $2,5x10^5$ células TC-1 pela via s.c na região dorsolateral direita. Três dias depois, os animais foram imunizados com diferentes quantidades dos mAbs: $2,5 \ \mu g$, $5 \ \mu g$ e 10 μg . Em todo o trabalho, o mAb α DEC205-E7 foi sempre coadministrado com o adjuvante poly (I:C), utilizado como estímulo de maturação para DCs. Como grupos controles, os animais foram imunizados com o mAb α DEC205 sem fusão a nenhum antígeno com poly (I:C) ou imunizados apenas com poly (I:C). O protocolo de imunização foi baseado em duas doses, iniciado três dias após o implante das células tumorais, sendo os mAbs administrados pela via i.p ou pela via s.c (**Figura 9**).



Figura 8. Representação esquemática do delineamento experimental.

De uma forma geral, a imunização com o mAb α DEC205-E7 + poly (I:C) foi capaz de controlar ou retardar o crescimento dos tumores, independente da via ou da quantidade administrada (**Figura 10 A**). Porém, a imunização com 10 µg de α DEC205-E7 pela via s.c. se mostrou o tratamento mais promissor e capaz de melhor controlar o crescimento tumoral, conferindo 20% de proteção terapêutica (**Figura 10 B**). Além disso, esse grupo apresentou 70% de animais vivos até o fim do experimento (**Figura 10 C**). Embora os animais que receberam 2,5 µg, 5 µg e 10 µg dos mAbs pela via i.p. tenham apresentado um retardo considerável do crescimento dos tumores, não foi observada proteção antitumoral entre eles, ou seja, não houve animais livres de tumor ao final do experimento. Como esperado, a imunização apenas com o poly (I:C) ou com o α DEC205 não foi capaz de controlar o crescimento dos tumores e todos os animais morreram antes do dia 30 de observação (**Figura 10 C**).



Figura 9. Efeito antitumoral terapêutico de diferentes quantidades do mAb quimérico αDEC205-E7 em combinação com o adjuvante poly (I:C) em modelo de tumor subcutâneo. Camundongos fêmeas C57BL/6 foram desafiados com 2,5x10⁵ células TC-1 pela via s.c e imunizados três dias depois com três doses diferentes do mAb αDEC205-E7: 2,5 µg, 5 µg e 10 µg. Os anticorpos foram combinados com 50 µg de poly (I:C) (por animal) e administrados pela via i.p. ou s.c., em um regime vacinal de duas doses com intervalo de 7 dias. (A) Área tumoral em mm². (B) Porcentagem de animais livres de tumores ao longo do

período de acompanhamento. (C) Porcentagem de sobrevivência. (ANOVA, post test: Bonferroni). (n=5). (*) p<0.05, (**) p<0.01.

Adicionalmente, nós buscamos avaliar a resposta de linfócitos T CD8⁺ E7específicos circulantes, a partir de amostras de sangue periférico dos animais imunizados com os mAbs, uma vez que a proteção contra tumores induzidos pela linhagem TC-1 se correlaciona estritamente com a ativação de linfócitos T CD8⁺ efetores (CHENG et al., 2003; CHEN; NI; LIU, 2011). Para isso, o sangue dos animais foi coletado sete e quatorze dias após a última imunização para a realização de ensaios de marcação intracelular de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos capazes de secretar IFN-γ. Os resultados mostram que a imunização com αDEC205-E7 + poly (I:C) foi capaz de induzir a ativação de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos produtores de IFN-γ nos dois tempos analisados, sendo essa resposta mais acentuada sete dias após a segunda dose, embora sem diferença estatística **(Figura 11**). Além disso, a administração dos mAbs pela via s.c promoveu uma maior ativação de células T CD8⁺ produtoras de IFN-γ, em relação aos grupos que receberam 2,5 μg, 5 μg e 10 μg, pela via intraperitoneal, embora também não tenha apresentado diferença estatística.



Figura 10. Análise da resposta imunológica mediada por linfócitos T CD8⁺ E7específicos gerada sete e quatorze dias após a imunização com o mAb αDEC205-E7 em combinação com o adjuvante poly (I:C). Camundongos fêmeas C57BL/6 foram desafiados com 2,5x10⁵ células TC-1 pela via s.c e imunizados três dias depois com três quantidades diferentes do mAb αDEC205-E7: 2,5 µg, 5 µg e 10 µg. Os mAbs foram combinados com 50 µg de poly (I:C) (por animal) e administrados pela via i.p. ou s.c., em um regime vacinal de duas doses, com intervalo de 7 dias. Sete e quatorze dias após a última dose foi coletado o sangue periférico dos animais e estimulado *in vitro* com o peptídeo E7 específico (peptídeo MHC classe I restrito) ou sem estímulo (S/E). (A) Dot plots representativos de 1 animal por grupo, mostrando as células T CD8⁺ IFN-γ⁺. (B) Porcentagem de linfócitos T CD8⁺ E7específicos produtores de IFN-γ mensurados sete dias e quatorze dias após a última dose. (ANOVA, post test: Bonferroni), (n=5). (**) p<0,01.

4.2.2 Avaliação da atividade citotóxica dos linfócitos T CD8+ E7-específicos induzidos pela imunização com αDEC205-E7

A função efetora dos linfócitos T CD8⁺ E7-específicos induzidos pela imunização com α DEC205-E7 + poly (I:C) foi avaliada por meio do ensaio de citotoxicidade *in vivo*. Para isto, camundongos foram desafiados com 2,5x10⁵ células TC-1 e imunizados com 10 µg de α DEC205-E7 + poly (I:C) pela via s.c. ou i.p. A escolha dos grupos de imunização foi baseada nos resultados anteriores, que mostraram uma maior ativação de linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ detectada quando os animais receberam essa dose.

Para este ensaio, células provenientes de camundongos não imunizados foram marcadas com concentrações distintas do corante CFSE (7 µM e 0,7 µM). A população marcada com a maior concentração (7 µM) de CFSE também foi pulsada com o peptídeo CD8- específico da proteína E7, tornando-as células-alvo para lise mediada por linfócitos T CD8⁺ citotóxicos. Células fracamente coradas com CFSE (0,7 µM), e que não foram pulsadas com o peptídeo CD8-específico da proteína E7, foram utilizadas como células-controle. Quatorze dias após a última imunização, os animais imunizados receberam pela via intravenosa uma mistura de células-alvo e células-controle. Esplenócitos dos camundongos imunizados foram colhidos 18 h após a injeção das células e testados para a diminuição da frequência das células-alvo, como medida indireta da atividade efetora de linfócitos T CD8⁺ E7- específicos.

Como mostrado na **Figura 12 A**, houve uma redução significativa na frequência das células-alvo nos camundongos imunizados com o mAb αDEC205-E7 coadministrado ao poly (I:C), resultado da forte atividade citotóxica dos linfócitos T CD8⁺ E7-específicos induzidos por esta formulação. Em concordância com os resultados anteriores, foi observado que a administração da formulação pela via s.c. leva a uma maior indução de linfócitos com perfil citotóxico em relação à via i.p (**Figura 12 B**). Vale destacar também que pouca ou nenhuma atividade citotóxica foi observada no grupo não tratado.



Figura 11. Efeito citotóxico *in vivo* gerado pela imunização com o mAb α DEC205-E7 coadministrado ao poly (I:C) pela via s.c ou i.p. (A) Histogramas representativos da atividade citotóxica *in vivo* de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos de camundongos desafiados com 2,5x 10⁵ células TC-1 e imunizados com duas doses (dias 3 e 10 após o desafio) de 10 µg de α DEC205-E7 coadministrado ao poly (I:C) administrado pelas vias s.c. ou i.p. O lado esquerdo dos painéis indica as células-controles marcadas com 0,7 µM CFSE. O lado direito dos painéis indica as células-alvo marcadas com 7 µM CFSE e pulsadas com o peptídeo CD8-específico da proteína E7. A redução da área dos histogramas de células-alvo em relação às células controle indica a atividade citotóxica *in vivo* dos linfócitos T CD8⁺ E7 específicos. (B) Percentual de lise específica mediada pelos linfócitos T CD8⁺ E7-específicos em um total de 10⁷ células-alvo. * p < 0,05 (ANOVA, pós teste: Bonferroni).

4.2.3 Avaliação do efeito antitumoral terapêutico dos mAbs administrados pela via s.c em tumores de crescimento mais lento

A quantidade de 2,5x10⁵ células da linhagem TC-1 é considerada alta e leva ao crescimento dos tumores de forma rápida e agressiva, algo que pode ter limitado

o efeito terapêutico dos mAbs. Guiados por essa hipótese, a etapa seguinte buscou alcançar um nível de proteção antitumoral maior, por meio da diminuição do número de células TC-1 implantadas nos animais. Para esse experimento, os animais foram desafiados com 10⁵ células TC-1 e imunizados com 10 μg de αDEC205-E7 coadministrado ao poly (I:C) pela via s.c, a condição mais promissora encontrada nos experimentos anteriores.

Quando diminuímos a quantidade de células tumorais implantadas nos animais, a imunização com os mAbs conferiu uma proteção terapêutica maior do que aquela observada em experimentos anteriores. Conforme demonstrado na **Figura 13**, a administração de 10µg dos mAbs + poly (I:C) pela via s.c conferiu 80% de animais livres de tumor e quase 100% de animais vivos ao final de 60 dias de acompanhamento.



Figura 12. Efeito antitumoral da imunização com o mAb αDEC205-E7 + poly (I:C) pela via s.c em tumores de crescimento lento. Camundongos C57BL/6 foram desafiados com 10⁵ células TC-1 pela via s.c e imunizados três dias depois com 10µg de αDEC205-E7 coadminstrado ao poly (I:C) em um regime vacinal de duas doses com intervalo de 7 dias. Os
camundongos foram acompanhados por 60 dias após o desafio para análise do crescimento tumoral. (A) Acompanhamento da área tumoral (mm²). (B) Porcentagem de animais livres de tumores. (C) Porcentagem de sobrevivência. (ANOVA, pós teste: Bonferroni);(log-rank–Mantel–Cox). **** p < 0,001 (n=18-23)

Além disso, por meio de marcação intracelular de IFN-γ, foi avaliada a indução de respostas celulares E7-específicas no sangue, no baço e nos linfonodos drenantes do tumor, sete dias após a última dose. Conforme mostra a **Figura 14**, foi possível observar que a imunização foi capaz de ativar células T-CD8⁺ E7 específicas produtoras de IFN-γ em todos os órgãos analisados, sendo essa resposta mais proeminente no baço. Em contrapartida, a administração de poly (I:C) não foi capaz de induzir ativação.



Figura 13. Ativação de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos presentes no baço, no sangue e nos linfonodos inguinais drenantes do tumor após imunização com o mAb αDEC205-E7+ poly (I:C). Camundongos C57BL/6 foram desafiados com 10⁵ células TC-1 e imunizados três dias depois com 10 μ g de αDEC205-E7 coadministrado ao poly (I:C), em um regime vacinal de duas doses com intervalo de 7 dias pela via s.c. Amostras de sangue, baço e linfonodos inguinais drenantes do tumor foram coletadas 7 dias após a segunda dose para ensaio de marcação intracelular para IFN- γ e análise por citometria de fluxo. (A) *Dot plots* representativos. (B) Frequência de linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ E7-específicos. As porcentagens foram mensuradas a partir de células de sangue periférico após estimulação *in vitro* com o peptídeo E7(49-57) MHCI restrito. (ANOVA, pos-teste Bonferroni). **** p < 0,001; ns: não significativo.

Conforme demonstrado na **Figura 15**, foi também avaliado, pela metodologia de CBA, o perfil de citocinas produzidas pelos esplenócitos dos animais imunizados com αDEC205-E7+ poly (I:C), após estímulo com o peptídeo E7 imunodominante. Corroborando com os achados anteriores, a imunização com os mAbs foi capaz de

induzir a secreção de altos níveis de IFN-γ, principalmente, e também TNF-α, IL-2 e IL-6 quando comparado com o grupo que recebeu apenas poly (I:C).



Figura 14. Detecção de citocinas secretadas por esplenócitos estimulados com o peptídeo E7. Esplenócitos foram coletados 7 dias após a última imunização e incubados por 12 horas com o peptídeo E7. A secreção de citocinas foi determinada por *Cytometric Bead Array* (CBA). As análises foram realizadas usando o programa FCAP array. (n=9).

4.2.4 Contribuição das cDC1 na proteção antitumoral mediada pelos mAbs αDEC205-E7 coadministrados ao poly (I:C) utilizando animais deficientes de BATF3

Camundongos deficientes em BATF3 são amplamente usados para estudar o papel do cDC1 no contexto de tumores e infecções. Em camundongos, as cDC1s dependentes de BAFT3 nos linfonodos são caracterizadas pela expressão de CD8α⁺. Por isso, avaliamos o impacto das cDC1s (DCs CD8α⁺) na proteção antitumoral

induzida pelo mAb α DEC205-E7 utilizando animais deficientes para esse fator de transcrição. Para isso, animais *knockout*s (KO) para o BAFT3 foram inoculados com 10⁵ células TC-1 e imunizados com 10 µg de α DEC205-E7+ poly (I:C) de acordo com o protocolo da **Figura 9**.

Como demonstrado na **Figura 16**, nenhuma proteção antitumoral terapêutica foi observada nos camundongos C57BL/6 BAFT3 KO imunizados com α DEC205-E7+ poly (I:C). Além disso, nenhuma resposta de linfócitos T CD8⁺ foi detectada (dados não mostrados). Portanto, estes resultados apontam que as DCs CD8 α^+ tem papel fundamental na resposta antitumoral induzida pelos mAbs, uma vez que são as células alvos que expressam o receptor DEC205.



Figura 15. Efeito antitumoral da imunização com o mAb αDEC205-E7 + poly (I:C) em animais BAFT3 KO. Camundongos C57BL/6 BAFT3 KO foram desafiados com 10⁵ células TC-1 pela via s.c e imunizados três dias depois com 10 μg de αDEC205-E7 coadministrados ao poly (I:C) em um regime vacinal de duas doses com intervalo de 7 dias. Os camundongos foram acompanhados por 60 dias após o desafio para análise do crescimento tumoral. (A) Acompanhamento da área tumoral (mm²). (B) Porcentagem de sobrevivência.

4.2.5 Avaliação do potencial da combinação dos mAbs quiméricos αDEC205-E7 com a proteína gDE7

Em detrimento da baixa imunogenicidade da proteína E7, sobretudo em promover a ativação de linfócitos T CD8⁺ citotóxicos (KHALLOUF; GRABOWSKA; RIEMER, 2014), trabalhos têm mostrado a fusão da proteína E7 do HPV a outras

proteínas imunomoduladoras visando favorecer a entrega desse antígeno para as APCs. Nesse sentido, nosso grupo de pesquisa desenvolveu há mais de 10 anos uma estratégia vacinal baseada em uma proteína híbrida, resultante da fusão da proteína E7 do HPV-16 com glicoproteína D (gD) do Herpes Simplex Vírus -1 (HSV-1). Em trabalhos anteriores, o grupo publicou que a imunização com duas doses de gDE7 (30µg) coadministrada ao poly (I:C) é capaz de proteger 100% dos animais desafiados com 7,5x10⁴ células TC-1 e de ativar células T CD8⁺ E7-específicas (PORCHIA et al., 2017).

Dessa forma, buscamos avaliar o potencial terapêutico da combinação do mAb α DEC205-E7 com a gDE7, em regime de *prime* e *boost* heterólogo, no tratamento de tumores HPV16⁺. Para tanto, camundongos foram inoculados com 10⁵ células TC-1 pela via s.c, uma quantidade maior de células do que usualmente empregado em pesquisas anteriores com a gDE7 (PORCHIA et al., 2017). Os tratamentos iniciaram 3 dias após a inoculação das células tumorais, e consistiram em duas doses, com intervalo de sete dias. Na primeira (*prime*) e segunda dose (*boost*) foram administrados 10 µg de α DEC205-E7 ou 30 µg de gDE7 coadministrados ao poly (I:C) (50 µg). Avaliamos também o impacto da ordem da administração das duas estratégias. Assim, os animais foram divididos nos seguintes grupos: α DEC205-E7 (*prime*) + gDE7 (*boost*); gDE7 (*prime*) + α DEC205-E7 (*boost*); gDE7 (2 doses); Poly (I:C).

O uso do protocolo de *prime-boost* heterólogo possibilitou o controle do crescimento tumoral, independente da ordem de administração. Entretanto, os dados demonstram que não houve aumento na proteção antitumoral utilizando a combinação com a gDE7 em relação aos dados anteriores (**Figura 17 A e B**), uma vez que 2 doses do mAb protegem 80% dos animais. Quando o mAb α DEC205-E7 foi administrado como *prime* e a gDE7 como *boost*, uma maior proteção foi observada comparada ao grupo que recebeu gDE7 (*prime*) + α DEC205-E7 (*boost*), porém sem diferença estatística. O grupo que recebeu duas doses da gDE7 apresentou apenas 50% de animais livres de tumor (**Figura 17 C**). É importante destacar que a combinação com α DEC205-E7 aumentou a proteção antitumoral conferida pela gDE7. Quando avaliamos a resposta celular, todas as combinações foram capazes de ativar linfócitos T CD8⁺ E7-específicos, sendo estatisticamente diferente apenas com o grupo controle (poly (I:C) (**Figura 17D**).

Os dados de proteção obtidos no nosso estudo com duas doses dessa proteína, apesar de inferiores aos demonstrados por Porchia *et al.* (2017), enfatizam a importância do número de células utilizadas no modelo tumoral e seu impacto sobre o efeito antitumoral da imunização. A implicação do número de células utilizadas pode ser vista quando imunizamos animais implantados com 2,5 x10⁵ células TC-1 com duas doses dos mAbs quiméricos e obtivemos 20% de proteção (Figura 10 B). Em contraste, quando os animais foram receberam 10⁵ células TC-1 observamos 80% (Figura 13 B) de animais livres de tumores.



Figura 16. Avaliação do efeito antitumoral terapêutico do mAb α DEC205-E7 em combinação com a proteína gDE7. Camundongos fêmeas C57BL/6 foram desafiados com 1x10⁵ células TC-1 pela via s.c. e imunizados 3 dias depois com 10 µg do mAb α DEC205-E7 ou 30 µg de gDE7 coadministrados com 50 µg de poly (I:C), em regime vacinal de duas doses (*prime/boost*), com intervalo de 7 dias. (A) Acompanhamento da área tumoral (mm²). (B) Porcentagem de sobrevivência. (C) Porcentagem de animais livres de tumores ao longo do período de acompanhamento. (D) Porcentagem de linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ . (*) vs α DEC205-E7 (*prime*) + gDE7 (*boost*). (ANOVA Two Way; log-rank–Mantel–Cox) (*) p<0,05 (***) p<0,001), (****) p<0,0001). Os dados correspondem a combinação de dois experimentos independentes (n=10).

4.3 EFICÁCIA ANTITUMORAL TERAPÊUTICA DOS mAbs αDEC205-E7 EM TUMORES DE MUCOSA

Apesar de muitos dos tumores humanos estarem localizados em sítios de mucosa, em geral, vacinas para tratamento de câncer são testadas em tumores subcutâneos em modelos pré-clínicos, um possível motivo pela falta de correspondência dos resultados encontrados com os testes clínicos feitos posteriormente. Dessa forma, movidos pelo interesse de empregar condições experimentais mais próximas àquelas encontradas em testes com pacientes, avaliamos o potencial antitumoral do αDEC205-E7 frente a dois modelos ortotópicos de implante de células tumorais: mucosa intravaginal e na cavidade oral. Para ambos os modelos, camundongos foram inoculados na língua ou na região vaginal com células TC-1 luc que expressam a enzima luciferase (além das oncoproteínas E6 e E7), com intuito de simular tumores de cabeça e pescoço e de colo de útero, respectivamente.

4.3.1 Modelo tumoral intravaginal

Em nosso estudo, avaliamos o efeito do mAb aDEC205-E7 em modelo de tumor intravaginal como um modelo pré-clínico que mimetiza a localização dos tumores na região vaginal/cervical de pacientes. Para tanto, guatro dias antes da inoculação das células tumorais. animais receberam os acetato de medroxiprogesterona para sincronização do ciclo estral e, posteriormente, foi realizada a implantação de 10⁵ células TC-1 luc na mucosa vaginal. Três dias depois, os animais foram inoculados com luciferina pela via i.p para aquisição de imagens e monitoramento das células inoculadas pelo equipamento IVIS Spectrum. No mesmo dia, os animais que apresentaram bioluminescência na região do implante tumoral, comprovando a presença das células no local, foram separados em dois grupos: um grupo foi imunizado com 10 μg de αDEC205-E7+ poly (I:C) e o outro com apenas poly (I:C) pela via s.c (Figura 18). O monitoramento do crescimento tumoral foi feito 1x por semana durante 60 dias, por meio da inoculação de luciferina e captação de bioluminescência no equipamento IVIS Spectrum.



Figura 17- Representação esquemática do delineamento experimental.

Imagens da emissão de bioluminescência obtidas para animais representativos de cada grupo foram captadas 5 minutos após a inoculação da luciferina e mostram a atividade da luciferase 3 e 24 dias após a inoculação das células TC-1 luc (Figura 19 A). No dia 3, a deteccão de bioluminescência em todos os animais comprova a presença das células tumorais na mucosa vaginal. Porém, no dia 24, a bioluminescência não foi mais detectada em aproximadamente 60% dos animais imunizados com os mAbs, indicativo de animais livres de tumor. Corroborando com as imagens, os dados de quantificação da bioluminescência emitida são representados pela unidade fótons-segundo (f/s) e ilustram de forma evidente que o grupo imunizado com os mAbs α DEC205-E7 + poly (I:C) foi capaz de controlar eficientemente o crescimento tumoral comparado aos demais grupos (Figura 19 B). Consequentemente, 80% dos animais imunizados ficaram vivos e livres de tumor até o final do período avaliado (Figura 19 C). Em contraste, 40% dos animais tratados somente com poly (I:C) sobreviveram até o fim do tempo de observação. Todos os animais do grupo não tratado desenvolveram tumor e foram eutanasiados ao final do experimento.



Figura 18. Efeito antitumoral dos mAbs αDEC205-E7 em combinação com o adjuvante poly (I:C) em modelo de tumor intravaginal. Células da linhagem TC-1 Luc (10⁵/animal) foram injetadas na mucosa vaginal de camundongos C57BL/6. Em seguida, os animais foram imunizados com duas doses (dias 3 e 10 após a inoculação das células) de 10 µg de αDEC205-E7 coadministrado ao poly (I:C) pela via s.c. (A) Imagens da emissão de bioluminescência obtidas de animais tratados com os mAbs após inoculação de células TC-1 luc. (B) Quantificação da emissão de luminescência apresentada como fluxo total (fótons/segundos), da média dos grupos experimentais. (C) Porcentagem de sobrevivência. (ANOVA Two Way, post test: Bonferroni) * p<0,05. **** p<0,0001 (n=14).

Em relação à resposta imune específica induzida no modelo intravaginal, buscamos avaliar a indução de células T CD8⁺ produtoras de IFN-γ, sete dias após a segunda dose, com base nos dados obtidos no modelo subcutâneo, tempo no qual foi observada maior ativação celular. Similar ao que foi observado no modelo subcutâneo, a administração do mAb αDEC205-E7 + poly (I:C) induziu forte ativação de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos no sangue (**Figura** 20). No entanto, em contraste

com os resultados gerados no modelo subcutâneo, camundongos tratados apenas com poly (I:C) mostraram um número ligeiramente aumentado de células CD8⁺ T produtoras de IFN-γ.



Figura 19. Resposta imunológica celular E7-específica após imunização com o mAb αDEC205-E7+ poly (I:C) no modelo de tumor intravaginal. Células da linhagem TC-1 Luc (10⁵/animal) foram injetadas na mucosa vaginal de camundongos C57BL/6. Em seguida, os animais foram imunizados com duas doses (dias 3 e 10 após a inoculação das células) de 10µg de αDEC205-E7 coadministrado ao poly (I:C) pela via s.c. Amostras de sangue foram coletadas 7 dias após a segunda dose para ensaio de marcação intracelular para IFN-γ e análise por citometria de fluxo. (A) Dot plots representativos. (B) Frequência de linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN-γ E7-específicos. (ANOVA, post test: Bonferroni) * p < 0,05; ** p < 0,01.

4.3.2 Modelo tumoral na cavidade oral

O modelo de tumor na cavidade oral, com o implante de células TC-1 luc na língua dos camundongos, foi utilizado a fim de mimetizar tumores de cabeça e

pescoço. Assim, 5x10⁴ células TC-1 luc foram inoculadas na língua e, seguindo o mesmo regime vacinal anterior, avaliamos a proteção antitumoral por 60 dias. Da mesma forma que no modelo intravaginal, três dias após o implante das células tumorais na língua dos camundongos foi avaliada a atividade da luciferase por meio da inoculação de luciferina. A avaliação da emissão de bioluminescência, representada qualitativamente tanto pelas imagens (**Figura 21 A**) quanto quantitativamente pelo fluxo total (f/s) (**Figura 21 B**), confirma a presença das células tumorais na língua de todos os camundongos. Adicionalmente, é possível observar que a imunização com o mAb αDEC205-E7 + poly (I:C) induziu proteção antitumoral completa nesse modelo, impedindo o crescimento de tumores na língua em 100% do animais. Além disso, possibilitou a sobrevivência de 100% dos animais por todo o período de acompanhamento. Curiosamente, os animais que receberam apenas poly (I:C) apresentaram 75% de proteção antitumoral e 75% de sobrevivência até o dia 60 pós inoculação das células TC-1. (**Figura 21 C e D**).



Figura 20. Efeito antitumoral do mAb α DEC205-E7 em combinação com o adjuvante poly (I:C) em modelo de tumor na língua. Células da linhagem TC-1 luc (5x10⁴ /20µL/animal) foram injetadas na língua de camundongos C57BL/6. Em seguida, os animais foram imunizados com duas doses (dias 3 e 10 após a inoculação das células) de 10 µg de α DEC205-E7 coadministrado ao poly (I:C) administrados pela via s.c. A emissão de bioluminescência foi monitorada no equipamento IVIS Spectrum, periodicamente. (A) Imagens da emissão de luminescência. (B) Quantificação da emissão de luminescência apresentada como fluxo total (fótons/segundos) obtidas e representadas individualmente. (C) Porcentagem de sobrevivência. (D) Porcentagem de animais livres de tumor. (log-rank–Mantel–Cox). ** p<0,01.

84

Uma vez que não observamos diferença estatística na proteção antitumoral entre os grupos que receberam α DEC205-E7 + poly (I:C) (100%) ou poly (I:C) (75%), decidimos investigar a resposta de memória induzida pelos tratamentos. Para isto, reimplantamos 10x (5x10⁵) mais células tumorais TC-1 luc na língua dos animais, a fim de simular um episódio de recidivas e avaliar a resposta imune de memória induzida pela imunização. Desta forma, 60 dias após o acompanhamento tumoral, todos os animais livres de tumor foram redesafiados com 5x10⁵ células TC-1 luc na língua e os animais foram acompanhados por mais 60 dias. Conforme mostra a **Figura 22 A**, todos os animais imunizados com α DEC205-E7 + poly (I:C) rejeitaram o tumor e se mantiveram livres de tumor até o final do experimento (total de 120 dias). Em contrapartida, apenas 14% dos animais imunizados com poly (I:C) apresentaram proteção tumoral e sobrevivência (**Figura 22 B**).



Figura 21. Ensaio de redesafio na língua de camundongos imunizados com o α DEC205-E7 + poly (I:C) no modelo de tumor na cavidade oral. Células da linhagem TC-1 Luc (5x10⁴ /10µL/animal) foram injetadas na língua de camundongos C57BL/6. Em seguida, os animais foram imunizados com duas doses (dias 3 e 10 após a inoculação das células) de 10µg de α DEC205-E7 + poly (I:C) administrados pela via s.c. Após 60 dias de acompanhamento do crescimento tumoral, os animais livres de tumor foram redesafiados com 5x10⁵ células TC-1 luc. O crescimento dos tumores foi avaliado por mais 60 dias. (A) Porcentagem de animais livres de tumor. (B) Porcentagem de sobrevivência. (Log-rank–Mantel–Cox). ** p<0.01.

Por fim, determinamos se a imunização foi capaz de induzir células T de memória efetora no sangue dos animais coletado sete dias após o reimplante das células TC-1 luc na língua. Por meio de citometria de fluxo, notamos a presença de

células T CD8⁺ de memória efetora produtoras de IFN-γ após estímulo com o peptídeo E7. Conforme mostra a **Figura 23 B**, os animais imunizados com o mAb αDEC205-E7+ poly (I: C) montaram uma resposta de células T CD8⁺ de memória efetora contra o antígeno tumoral, fenotipicamente identificada como CD8⁺CD44^{high}CD62L⁻ (**Figura 23 A**). Por outro lado, os animais tratados com poly (I: C) não apresentaram essas células circulantes. Esses resultados indicam que imunização com o mAb αDEC205-E7 + poly (I:C) confere memória imunológica e foi capaz de controlar recidivas do tumor no mesmo sítio do tumor primário.



Figura 22. Análise da resposta de memória efetora no sangue de animais imunizados com o mAb α DEC205-E7 + poly (I:C) no modelo de tumor na cavidade oral. Células da linhagem TC-1 Luc (5x10⁴/20µL/animal) foram injetadas na língua de camundongos C57BL/6. Em seguida, os animais foram imunizados com duas doses (dias 3 e 10 após a inoculação das células) de 10 µg de α DEC205-E7 coadministrado ao poly (I:C) pela via s.c. Após 60 dias

de acompanhamento do crescimento tumoral, os animais livres de tumor foram redesafiados com 5×10^5 células TC-1 luc. Amostras de sangue foram coletadas 7 dias após o redesafio e estimuladas *in vitro* com o peptídeo E7. (A) Estratégia de gate utilizada. (B) *Dot plots* representativos. (C) Porcentagem de células T CD8⁺ de memória efetora (CD8⁺CD44⁺CD62L⁻) produtoras de IFN- γ . (Student's t-test) (n = 5-7). **p < 0,001, ****p < 0,0001.

4.4 CONSTRUÇÃO, PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS mAbs αDEC205-E7E ISOTIPO-E7 HUMANO

O efeito terapêutico do mAb αDEC205-E7 frente a tumores, tanto subcutâneos como de mucosa, mostrado na seção anterior, nos levaram a construir um mAb específico para DEC205 humano (αDEC205-E7hu) capaz de se ligar a DCs humanas. Como controle negativo, foi construído também um mAb para servir de isotipo controle (ISO-E7 hu), com estrutura idêntica ao mAb αDEC205-E7, porém, não sendo esse capaz de se ligar ao receptor DEC205 humano.

4.4.1 Clonagem da proteína E7 fusionada ao mAb αDEC205 e ao Isotipo controle humano.

Para construção dos plasmídeos que codificam os mAbs αDEC205-E7hu e ISO-E7 hu, o gene da proteína E7 (inserto) foi obtido mediante digestão enzimática do plasmídeo pDEC205-E7 de camundongo com as endonucleases *Notl* e *Xhol*, gerando um fragmento de aproximadamente 300 pares de bases (bp). Em seguida, o inserto foi subclonado em fusão com a sequência codificadora da cadeia pesada dos anticorpos humanos anti-DEC205 e Isotipo. Os clones selecionados foram sequenciados e submetidos à digestão enzimática para confirmação das construções e subsequente liberação dos fragmentos esperados (**Figura 24**).



Figura 23. Construção dos vetores pDEC205-E7hu e pISO-E7hu. Eletroforese em gel de agarose 0,8% mostrando os produtos da digestão dos plasmídeos com as enzimas *Notl* e *Xhol. PM*- Marcador de peso molecular. Amostras: 1- αDEC205-E7hu digerido (liberando o fragmento de aproximadamente 300bp); 2- αDEC205-E7hu não digerido; 3-pISO-E7hu digerido (liberando o fragmento de aproximadamente 300bp); 4- pISO-E7 hu não digerido.

4.4.2 Análise da integridade dos mAbs humanos quiméricos

Após o processo de expressão e purificação, os anticorpos recombinantes αDEC205-E7 hu e ISO-E7 hu foram quantificados pelo método de BCA e tiveram sua integridade confirmada por SDS-PAGE e ensaio de *Western blot*. A **Figura 25 A** mostra um gel de poliacrilamida a 12,5% em condições redutoras, onde pode-se observar as cadeias leves e pesadas referentes aos mAbs αDEC205E7 hu (coluna 1) e ISO-E7 hu (coluna 2). Ambos os mAbs apresentam o mesmo tamanho, não sendo possível diferenciá-los no gel.



Figura 24. Análise da expressão e integridade dos mAbs α DEC205-E7 e ISO-E7 humanos. (A) Quantidades equimolares dos anticorpos foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5% em condições redutoras. (B) Ensaio de *Western blot* empregando anticorpo policional anti-E7 e anti-IgG humano. M: Marcador molecular; 1: α DEC205-E7 hu; 2: ISO-E7 hu; 3: E7

Em ensaio de *Western blot* utilizando anticorpos policionais contra a proteína E7 foi detectada reatividade contra as cadeias pesadas onde o antígeno se encontra fusionado, mostrando que, após a fusão ao anticorpo, a proteína tem sua antigenicidade preservada (**Figura 25 B**). Além disso, para melhor caracterização, os mAbs foram submetidos ao um ensaio de *Western blot* que permitiu visualizar a integridade das cadeias pesadas dos mAbs por meio do uso de um anticorpo anti-IgG humano com especificidade para a porção Fc. Desta forma, demonstramos que os

anticorpos foram produzidos preservando-se a integridade e a antigenicidade dos mesmos.

4.4.3 Ligação dos anticorpos humanos a células dendríticas derivadas de monócitos (moDCs) e a monócitos THP-1

Uma vez confirmada a integridade dos mAbs humanos, foram realizados ensaios para avaliar sua capacidade de ligação ao receptor DEC205 humano. Os mAbs αDEC205-E7hu e ISO-E7hu não apresentam diferenças detectadas em SDS-PAGE, apenas diferem pela sua capacidade de se ligar ou não ao receptor DEC205 humano. Para observar esse fenômeno, foi realizado um ensaio de ligação dos mAbs a moDCs humanas e a monócitos THP-1.

Para o processo de diferenciação de monócitos em DCs foram utilizadas células obtidas a partir do sangue de doadores saudáveis provenientes do Hospital Alemão Oswaldo Cruz em São Paulo. Para obtenção das moDCs, os monócitos foram separados por gradiente de densidade e diferenciados com o uso das citocinas GM-CSF e IL-4. Como esperado, observamos ligação do mAb αDEC205-E7hu às moDCs, selecionadas como as células CD11c⁺HLA⁻DR⁺. Em contrapartida, para o mAb Isotipo controle, não foi observada ligação, sendo igual ao controle utilizando apenas o anticorpo secundário (**Figura 26 A)**.

Com intuito de complementar a caracterização dos mAbs, realizamos também ensaio de ligação em células THP-1, uma linhagem de monócitos humanos, uma vez que o receptor DEC205 humano é expresso também em monócitos. Como pode ser observado na **Figura 26 B**, o mAb αDEC205-E7hu ligou-se à superfície dessas células, sendo essa ligação estatisticamente diferente do grupo controle. Em conjunto, esses dados demonstram mais uma vez que o mAb αDEC205-E7hu produzido mantém afinidade conservada ao receptor DEC205.



Figura 25. Ensaio de ligação dos mAbs quiméricos humanos a moDCs e monócitosTHP-1. (A) Mediana de Intensidade de fluorescência do FITC e histogramas representativos da ligação dos mAbs às moDCs. (B) Mediana de intensidade de fluorescência do APC e histogramas representativos da ligação dos mAbs às células THP-1. A análise foi feita utilizando o programa FlowJo (Tree Star). (teste-t). (**) p<0,01 (***) p<0,001.

4.4.4 Capacidade de ativação de moDCs in vitro

Estratégias imunoterapêuticas capazes de ativar DCs *in vitro* são consideradas potencialmente promissoras pois podem tornar possível a restauração das funções do sistema imune e a indução de respostas antitumorais. O reconhecimento do antígeno pelas DCs desencadeia o aumento da expressão de moléculas coestimulatórias, como CD80, CD86, CD83 e CD40, que resultam em modificações morfológicas essenciais para a aquisição de um fenótipo imunoestimulador. Com intuito de avaliar se o mAb αDEC205-E7hu é capaz de induzir um estado de ativação em moDCs consideradas aqui como as células CD11c⁺HLA-DR⁺ (**Figura 27**), foi avaliado o perfil fenotípico dessas células a partir da avaliação da expressão de marcadores de ativação: CD83 e CD86.



Figura 26. Estratégia de *gating* utilizada para imunofenotipagem de moDCs diferenciadas *in vitro.*

Cinco dias após a diferenciação, as moDCs foram colocadas em contato com os mAbs na presença ou não do adjuvante poly (I:C). Aqui, usamos como controle o estímulo com a proteína E7 não direcionada. Como podemos observar na **Figura 28 A e B**, a porcentagem de células positivas para os marcadores CD83 e CD86 não mudou após o contato com os diferentes estímulos utilizados. Desta forma, foram também avaliadas as medianas da intensidade de fluorescência (MFI) dos marcadores CD86 (**Figura 28 C**) e CD83 (**Figura 28 D**) dentro da população positiva para cada molécula. O estímulo com o mAbs αDEC205-E7hu não foi capaz de induzir um aumento da expressão dos marcadores CD83 e CD86. Em contrapartida, quando o adjuvante poly (I:C) foi utilizado, observamos um aumento expressivo das moléculas coestimulatórias. Porém, esse efeito pode ser considerado apenas do poly (I:C), uma vez que não há diferença entre poly (I:C) sozinho ou combinado aos mAbs. Esses resultados revelam que o mAb αDEC205-E7hu não é capaz de ativar moDCs *in vitro* e que é necessária a presença de um estímulo de maturação para que isso ocorra.



Figura 27. Expressão das moléculas de superfície de moDCs ativadas com os mAbs quiméricos humanos. Células mononucleares do sangue periférico de doadores saudáveis foram diferenciadas em mo-DCs *in vitro* por cinco dias. Após a diferenciação, foram estimuladas com os mAbs αDEC205-E7hu, Iso-E7, com a proteína E7 e com o poly (I:C) por 48 horas. (A) Porcentagem de células CD11c⁺HLA-DR⁺CD86⁺. (B) Porcentagem de células CD11c⁺HLA-DR⁺CD86⁺. (B) Porcentagem de células CD86 (C) e CD83 (D).

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A melhor compreensão sobre a biologia das DCs e o conhecimento sobre receptores da sua superfície têm sido fundamental para o desenho racional de estratégias para câncer, doenças inflamatórias (incluindo doenças autoimunes) e infecções. Dos vários receptores expressos na superfície das DCs, os receptores do tipo lectina C têm recebido particular atenção. Alguns deles, como o DEC205, são conhecidos por seu importante papel na indução de respostas imunológicas robustas. A entrega direcionada de antígenos tumorais para DCs por meio de mAbs anti-DEC205 têm sido uma abordagem promissora no desenvolvimento de imunoterapias. A presente tese de doutoramento avaliou o efeito antitumoral terapêutico conferido pelo direcionamento da proteína E7 do HPV-16 para DCs por meio de um mAb quimérico anti-receptor DEC205. Os resultados incluem a construção, produção e caracterização de mAbs αDEC205-E7, nas versões murina e humana. O efeito antitumoral foi avaliado com o modelo pré-clínico baseado em células TC-1 implantadas em diferentes sítios anatômicos: subcutâneo, cavidade oral e intravaginal. Nossos resultados demonstraram que a entrega da proteína E7 via o receptor DEC205 gerou uma potente ativação de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos com capacidade citotóxica, assim como linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN-y, e promoveu proteção terapêutica frente a todos os modelos tumorais utilizados. Além disto, a imunoterapia foi capaz de induzir células T de memória efetora que resultou em proteção antitumoral de longa duração e prevenção de recidivas tumorais.

O direcionamento de proteínas do HPV para DCs por meio do receptor DEC205 foi explorada em trabalhos anteriores. Z. Liu e colaboradores direcionaram a proteína E7 do HPV por meio de fragmentos variáveis de cadeia simples (scFv) anti-DEC205 em um protocolo profilático e terapêutico (LIU et al., 2016). Recentemente, Badillo-Godinez e colaboradores também relataram o direcionamento da proteína E5 de HPV16 utilizando mAbs anti-DEC205 com um protocolo terapêutico de vacinação contra tumores induzidos por HPV em modelo pré-clínico. Em ambos os trabalhos, o direcionamento das proteínas do HPV por meio do receptor DEC205 induziu forte proteção contra células tumorais e ativação de células T antígeno específicas (BADILLO-GODINEZ et al., 2021). Todavia, a completa proteção só foi vista quando as estratégias foram combinadas com inibidores de checkpoint imunológico. Apesar dos promissores resultados que ajudam a validar o potencial da estratégia frente a tumores induzidos por HPV, todos eles mostram o efeito antitumoral apenas no modelo subcutâneo. Em nosso estudo, a formulação baseada no mAb αDEC205-E7+ poly (I:C) foi capaz de levar à completa proteção antitumoral. Além disso, nosso estudo foi o primeiro a demonstrar o impacto dessa abordagem em tumores presentes em diferentes sítios anatômicos, visto que, em condições clínicas, tumores causados por HPV ocorrem em sítios de mucosa, cujos mecanismos de indução de resposta imune efetora podem ser consideravelmente distintos daqueles observados no controle de tumores presentes em outros sítios anatômicos ou órgãos (NIZARD et al., 2017)

O mAb aDEC205 é um vetor molecular para entrega eficiente de antígenos para um subconjunto específico de DCs que expressam o receptor DEC205. Muitos outros mAbs estão sendo usados em imunoterapias para tratar câncer e outras doenças (POSTOW; CALLAHAN; WOLCHOK, 2015). No entanto, em contraste com mAbs inibidores de checkpoint imunológico, o mAb αDEC205-E7 não apresenta efeitos colaterais. Embora não se questione a relevância clínica dos mAbs inibidores de checkpoint como uma terapia de câncer, os efeitos de toxicidade e surgimento de resistência adquirida, em conjunto com o custo elevado, representam desafios reais que limitam o uso generalizado dessas terapias (POSTOW; CALLAHAN; WOLCHOK, 2015). Outro fator importante a ser destacado é a característica inerente ao tipo de imunoterapia. No presente estudo, empregamos uma estratégia de imunoterapia ativa, um mAb capaz de gerar uma resposta imune específica, ao levar o antígeno alvo fusionado geneticamente e estimular, concomitantemente, a ativação de linfócitos T citotóxicos antígeno-específicos. Em contrapartida, o conceito de imunoterapia passiva, que inclui o uso de inibidores de checkpoints imunológicos e terapias baseadas em células T, não permite o desenvolvimento de memória imunológica de longa duração, uma característica essencial para a prevenção de recidivas (POSTOW; CALLAHAN; WOLCHOK, 2015; RUELLA et al., 2018; XU et al., 2019). Tais características explicam, em parte, a falha dessas terapias na prevenção de recidivas em pacientes tratados com os mAbs anti-CTLA-4 e / ou anti-PD-1/L1 ou mesmo células CAR T. As vacinas anticâncer baseadas em mAbs aDEC205 quiméricos fornecem uma nova visão sobre a terapia tumoral com efeitos antitumorais mais robustos e passíveis de serem combinadas com a imunoterapia passiva, particularmente para tratamento de tumores em estágio de crescimento mais avançados.

Ativar o sistema imunológico para desencadear uma resposta mediada por células T é um grande desafio no desenvolvimento de vacinas terapêuticas contra patógenos e câncer. A habilidade de ativação de DCs de forma mais efetiva é uma alternativa importante para promover efeitos adjuvantes e melhorar o desenho de vacinas de um modo geral. No presente estudo, a imunização com aDEC205-E7+ poly (I:C) mostrou altas taxas de indução de linfócitos T CD8⁺ citotóxicos E7-específicos. Além disso, levou à ativação sistêmica de linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN-y. Em concordância com nossos dados, foi relatado que o direcionamento de antígenos, via mAb DEC205, resulta em indução de forte imunidade mediada por células T CD8⁺ e à ativação de imunidade protetora sistêmica e em mucosas (BONIFAZ et al., 2004b). Outros estudos também demonstram que o uso de mAbs anti-DEC205 fusionados a diferentes antígenos é capaz de promover a ativação de linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺ a partir da apresentação de antígenos via MHCI ou MHCII, respectivamente (GUO et al., 2000; BOSCARDIN et al., 2006; TRUMPFHELLER et al., 2008; TSUJI et al., 2011). Porém, no nosso trabalho não detectamos resposta de linfócitos T CD4⁺ gerados após imunização com o mAb (dados não mostrados).

Trabalhos utilizando diferentes abordagens também demonstraram o papel das células T CD8⁺ na proteção de tumores gerados após o transplante de células TC-1 e que a proteção antitumoral induzida foi exclusivamente dependente de células T CD8⁺ (PORCHIA et al., 2017; RAMOS DA SILVA et al., 2021). Por outro lado, BONIFAZ (2004) descreveu a ausência de CTLs em animais CD8 KO, mas não em animais CD4 KO, após imunização com αDEC205-OVA (BONIFAZ et al., 2004a). Nós hipotetizamos que a proteção antitumoral induzida pelos mAbs αDEC205-E7 seja dependente de células T CD8⁺. Porém, estudos adicionais são necessários para investigar esse mecanismo, utilizando de ensaios de depleção de células T CD8⁺ e T CD4⁺.

A proteína E7 representa um dos principais alvos no desenvolvimento de imunoterapias contra câncer induzido por HPV. Porém, a imunização com o antígeno sozinho induz baixa imunogenicidade e é incapaz de induzir uma eficiente resposta de células T. Em trabalhos anteriores, demonstrou-se que a imunização com a proteína E7 purificada, com ou sem a adição de adjuvantes, não foi capaz de controlar o crescimento de tumores em camundongos transplantados com células TC-1 em modelo subcutâneo (CHU et al., 2000; PORCHIA et al., 2017). No presente estudo,

97

demonstramos que a fusão da E7 com o mAb αDEC205 foi capaz de aumentar a imunogenicidade do antígeno e levar à ativação de linfócitos citotóxicos T CD8⁺ E7específicos sistêmicos. Além disso, a imunização com o mAb αDEC205-E7 induziu elevada proteção antitumoral em camundongos com tumores após implante ortotópico (língua e vagina). Portanto, a partir dos dados gerados, podemos afirmar que a proteção antitumoral alcançada em nossos resultados é resultante do direcionamento mediado pelo receptor DEC205 com impactos positivos na indução de imunidade protetora antitumora, l tanto em compartimentos sistêmicos como em sítios de mucosa.

Estudos anteriores mostraram que a eficácia de vacinas terapêuticas antitumorais pode diferir dependendo da via de imunização e do tipo de tumor (ÇUBURU et al., 2019). No caso de tumores epiteliais, como os induzidos por HPV, a indução da imunidade da mucosa é geralmente bastante relevante para o desenvolvimento de uma imunidade antitumoral eficaz (SANDOVAL et al., 2013; NIZARD et al., 2017). A imunização pela via intranasal (i.n), por exemplo, tem sido particularmente eficiente para induzir respostas imunológicas de mucosa e proteção para câncer de pulmão (NIZARD et al., 2017). No entanto, outros estudos demonstram que a imunização parenteral pode levar a uma imunidade antitumoral mais eficiente (DECRAUSAZ et al., 2011). Em nossas condições experimentais, a imunização com o mAb αDEC205-E7+ poly (I:C) pela via s.c foi a mais eficiente para induzir respostas de linfócitos citotóxicos capazes de erradicar tantos tumores subcutâneos como aqueles implantados em mucosas (genital e lingual). Estes resultados corroboram com estudos recentes que demonstraram que a administração de uma vacina terapêutica bivalente pela via s.c. foi superior àquelas administradas pela via intratumoral na regressão total de tumores TC-1 em camundongos com tumores genitais (ARRIBILLAGA et al., 2020). De fato, tentativas para entregar o mAb αDEC205-E7 pela via de mucosa (i.n.) falharam na indução de proteção antitumoral em modelo subcutâneo (dados não mostrados).

Adjuvantes são importantes fatores que contribuem para a indução de respostas imunológicas geradas por vacinas direcionadas a cDC1s e cDC2s. O direcionamento para Clec9, um receptor presente em cDC1, é relatado como imunogênico, mesmo na ausência de adjuvantes (LAHOUD et al., 2011). Porém, vários estudos mostraram que o direcionamento de antígenos para DCs DEC205⁺, na ausência de um estímulo de maturação, é insuficiente para estimular uma resposta

imunológica adaptativa robusta. А combinação adicional sinais com imunoestimuladores ou adjuvantes se faz necessária para promover proteção antitumoral (HAWIGER et al., 2001a; BONIFAZ et al., 2004b). Por esse motivo não imunizamos camundongos com o mAb aDEC205-E7 sem a incorporação de um imunomodulador. Os protocolos de imunização usados neste estudo incluíram o uso do poly (I:C) como adjuvante, uma vez que ele tem se mostrado o mais potente ativador imunológico de DCs no contexto de imunização com o mAb aDEC205 (BOSCARDIN et al., 2006; MEYLAN; TSCHOPP; KARIN, 2006; TEWARI et al., 2010). Nossos resultados mostraram que a administração do adjuvante poly (I:C) levou à proteção antitumoral em aproximadamente 50% e 75% dos animais quando testados nos modelos de tumores intravaginal e na cavidade oral, respectivamente. Tais resultados podem ser explicados pela conhecida atividade antitumoral do poly (I:C), que se liga para TLR3 e leva à ativação de NF-kB e produção de interferons tipo I por diferentes células (ALEXOPOULOU, 2001). Além disso, o poly (I:C) pode mediar a apoptose de células tumorais e ativar células NK (CHENG; XU, 2010; GAMBARA et al., 2015). Seu uso em uma terapia combinada contra tumores induzidos por HPV em modelo pré-clínico, mostrou que sua aplicação na região tumoral, induz o recrutamento linfócitos T CD8⁺ (DOMINGOS-PEREIRA et al., 2013). Atualmente, ligantes de TLR3 estão sendo testados, isoladamente ou em combinação com quimioterápicos ou imunoterapêuticos, em vários ensaios de imunoterapia contra o câncer. No entanto, esses ligantes ainda não foram aprovados para aplicação clínica. Com base em suas habilidades para ativar o sistema imunológico, outros agonistas de TLR foram testados para o tratamento de câncer, como o imiquimode (ligante de TLR7), eficiente no tratamento neoplasias induzidas por HPV (SCHULZE et al., 2005; ONDO et al., 2006).

No presente estudo, o poly (I:C) foi capaz de induzir efeitos antitumorais parciais em camundongos desafiados com células TC-1luc em sítios de mucosa mas não apresentou os mesmos efeitos em modelo de tumor subcutâneo, baseado em células TC-1 convencionais e não modificadas para a expressão da luciferase. No entanto, embora o poly (I:C) tenha protegido animais de tumores primários desencadeados após o implante de células TC-1luc, ele não foi capaz de gerar imunidade protetora de longa duração e nem conferiu indução de respostas imunológicas de memória. Essa linhagem celular foi descrita previamente como sendo

mais sensível que a linhagem TC-1 convencional após a administração de uma vacina peptídica combinada ao poly (I:C) (ARRIBILLAGA et al., 2020). Esse fato pode explicar as diferenças observadas no nosso estudo sobre os efeitos antitumorais induzidos pelo poly (I:C) em animais transplantados com as diferentes linhagens de células tumorais. Contudo, acreditamos que novos estudos voltados para a avaliação dos efeitos sinérgicos de diferentes derivados poly (I:C) em combinação com vacinas antitumorais devem ser realizados para que possamos extrair informações relevantes sobre o uso dessas linhagens celulares como modelo para o desenvolvimento de imunoterapias para tumores.

Estudos recentes têm revelado um papel importante das DCs dependentes de BATF3 na imunidade antitumoral e nas respostas a imunoterapias (SÁNCHEZ-PAULETE et al., 2016; SPRANGER et al., 2017). O BATF3 (do inglês, Basic Leucine Zipper Transcription Factor, ATF-Like 3) é um fator de transcrição altamente expresso em cDCs e seletivamente necessário para o desenvolvimento de DCs CD8 α^+ de tecidos linfoides, células essas que coexpressam o receptor DEC205 e são necessárias para a apresentação cruzada de antígenos tumorais (HILDNER et al., 2008). Na falta de BAFT3, inibidores de checkpoints imunológicos e vacinas terapêuticas respondem fracamente contra tumores (SÁNCHEZ-PAULETE et al., 2016). No nosso estudo, nós avaliamos a proteção antitumoral do mAb em animais BAFT3^{-/-}, descritos por terem uma deficiência drástica na quantidade de DCs CD8α⁺ (EDELSON et al., 2010; CHANDRA et al., 2017). Nesse modelo animal, demonstramos uma perda completa da proteção antitumoral nos animais KO tratados com o aDEC205-E7 + poly (I:C), confirmada por meio do crescimento rápido dos tumores e 100% de mortalidade. Em contraste, quando imunizamos camundongos selvagens, obtivemos proteção antitumoral e observamos uma forte ativação de linfócitos T CD8⁺. Coletivamente, nossos resultados demonstram que o BATF3 desempenha um papel importante no efeito antitumoral dos mAbs, uma vez que ele está envolvido no desenvolvimento das cDCs CD8α⁺, a principal população celular alvo do mAb αDEC205-E7.

O uso de terapias combinadas deve ser uma tendência no avanço de estratégias vacinais contra tumores induzidos por HPV. Dando sequência aos nossos esforços em gerar uma abordagem vacinal promissora para controlar tumores associados ao HPV, exploramos a combinação entre os mAbs αDEC205-E7 e a

proteína gDE7, baseado na estratégia de *prime/boost* heterólogo. A gDE7 é uma proteína híbrida, resultante da fusão entre a glicoproteína D do Herpes Simplex Virus tipo 1 (HSV-1) com a proteína E7 do HPV-16. Além disso, a gDE7 têm mostrado resultados positivos quando aplicada em combinação com quimioterápicos (APS; PORCHIA, 2021-aceito para publicação). Em nosso estudo, a combinação dos mAbs com a gDE7 em um protocolo de *prime* e *boost* foi superior ao uso homólogo da gDE7 em duas doses. Apesar da imunização com gDE7 conter cerca de 7 vezes mais antígenos que o mAb αDEC205-E7, a utilização do mAb quimérico, tanto como sensibilização (*prime*) ou reforço (*boost*) potencializou de forma significativa a resposta antitumoral. Outros trabalhos descreveram que antígenos entregues pelo DEC205 são até 100 vezes mais potentes que outros métodos de entrega comumente usados para alcançar a apresentação de epítopos (BIRKHOLZ et al., 2010). Coletivamente, esses achados evidenciam a potencialidade do uso de mAbs αDEC205-E7.

Como parte do desenvolvimento pré-clínico da imunoterapia baseada no mAb αDEC205-E7, adaptamos a construção para um futuro uso clínico. Desta forma, foi construído um mAb αDEC205-E7hu capaz de se ligar ao DEC205 humano. Como controle negativo, construímos também o ISO-E7hu como um isotipo controle. Este último tem uma estrutura idêntica ao mAb αDEC205-E7hu, porém não se liga ao receptor DEC205 humano. O DEC205 é expresso em monócitos circulantes, células B, células NK e células T e DCs em seres humanos (BUTLER et al., 2006; KATO et al., 2006). Além disso, a expressão do receptor DEC205 foi demonstrada em moDCs diferenciadas a partir do sangue periférico, maturadas ou não *in vitro* (HANLON et al., 2014).

Dessa forma, realizamos experimentos *in vitro* para confirmar a capacidade e afinidade do mAb αDEC205-E7hu na ligação ao receptor DEC205 presente em moDCs e monócitos humanos. Em todos eles, o mAb αDEC205-E7hu mostrou ligação superior ao ISO-E7hu. Adicionalmente, experimentos de ativação de moDCs avaliaram a capacidade dos mAbs mudarem o fenótipo dessas células *in vitro*. Nossos resultados mostraram que o mAb αDEC205-E7hu, incubado com moDCs, não foi capaz de ativar essas células, fato ilustrado pela falta de mudança na expressão das moléculas coestimuladoras CD83 e CD86. Embora os dados indiquem que o mAb αDEC205-E7hu não estimule moDCs *in vitro*, ele mantém a capacidade de

apresentação de antígenos de forma eficiente para DCs DEC205⁺. Experimentos futuros devem ser conduzidos para explorar a capacidade de apresentação de antígenos e ativação de linfócitos T via mAbs humanos, seja a partir de modelos empregando camundongos humanizados ou linfócitos E7-específicos de pacientes com lesões/câncer induzidos por HPV.

Nos últimos anos, resultados clínicos encorajadores de uma vacina baseada em um mAb αDEC205 humano fundido com NY-ESO-1 relataram ser bem tolerada e capaz de induzir respostas imunes celular e humoral contra tumores que expressam o NY-ESO-1 (DHODAPKAR et al., 2014). Assim, a abordagem imunoterapêutica baseada no conceito de direcionamento de antígenos para DCs mostra-se como uma alternativa viável para diferentes tipos de tumores. Coletivamente, nossos resultados ilustram o potencial de direcionamento de antígeno para DCs DEC205⁺ como estratégia promissora para o controle do HPV associado tumores.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Este trabalho de tese trouxe avanços importantes na elucidação dos efeitos antitumorais induzidos pelo mAb anti-DEC205 fusionado à proteína E7 do HPV-16. Demonstramos que os mAbs anti-DEC205 murino e humano mantiveram a integridade e antigenicidade da proteína fusionada. O direcionamento da proteína E7 do HPV16 para DCs DEC205⁺ induziu forte ativação de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos com capacidade citotóxica. A imunização com o mAb quimérico αDEC205-E7 foi capaz de impedir o crescimento tumoral em diferentes sítios anatômicos, tanto tumores subcutâneos, como na língua e intravaginal, protegendo quase a totalidade dos animais tratados. Nossos resultados indicam ainda que a estratégia de imunoterapia ativa possui alto potencial de aplicação clínica e representa uma abordagem promissora para o tratamento de tumores associados ao HPV.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ALEXOPOULOU, L. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- k B by Tolllike receptor 3. v. 77, n. 1985, 2001.

APOSTOLOPOULOS, V.; THALHAMMER, T.; TZAKOS, A. G.; STOJANOVSKA, L. Targeting Antigens to Dendritic Cell Receptors for Vaccine Development. **Journal of Drug Delivery**, v. 2013, p. 1–22, 8 out. 2013. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/jdd/2013/869718/>.

ARRIBILLAGA, L.; ECHEVERRIA, I.; BELSUE, V.; GOMEZ, T.; LOZANO, T.; CASARES, N.; VILLANUEVA, L.; DOMINGOS-PEREIRA, S.; ROMERO, P. J.; NARDELLI-HAEFLIGER, D.; HERVÁS-STUBBS, S.; SAROBE, P.; RODRIGUEZ, M. J.; CARRASCOSA, J. L.; ZÜRCHER, T.; LASARTE, J. J. Bivalent therapeutic vaccine against HPV16/18 genotypes consisting of a fusion protein between the extra domain A from human fibronectin and HPV16/18 E7 viral antigens. Journal for ImmunoTherapy of Cancer, v. 8, n. 1, p. e000704, 24 jun. 2020. Disponível em: https://jitc.bmj.com/lookup/doi/10.1136/jitc-2020-000704>.

BADILLO-GODINEZ, O.; PEDROZA-SAAVEDRA, A.; VALVERDE-GARDUÑO, V.; BERMUDEZ-MORALES, V.; MALDONADO-GAMA, M.; LEON-LETELIER, R.; BONIFAZ, L. C.; ESQUIVEL-GUADARRAMA, F.; GUTIERREZ-XICOTENCATL, L. Induction of Therapeutic Protection in an HPV16-Associated Mouse Tumor Model Through Targeting the Human Papillomavirus-16 E5 Protein to Dendritic Cells. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 25 fev. 2021. Disponível em: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.593161/full.

BAKER, D. A.; PLOTKIN, S. A. Enhancement of Vaginal Infection in Mice by Herpes Simplex Virus Type II with Progesterone. **Experimental Biology and Medicine**, v. 158, n. 2, p. 131–134, 1 jun. 1978. Disponível em: http://ebm.sagepub.com/lookup/doi/10.3181/00379727-158-40156>.

BARBER, D. L.; WHERRY, E. J.; AHMED, R. Cutting edge: rapid in vivo killing by memory CD8 T cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 171, n. 1, p. 27–31, jul. 2003.

BASU, P.; MEHTA, A.; JAIN, M.; GUPTA, S.; NAGARKAR, R. V.; JOHN, S.; PETIT, R. A Randomized Phase 2 Study of ADXS11-001 Listeria monocytogenes–Listeriolysin O Immunotherapy With or Without Cisplatin in Treatment of Advanced Cervical Cancer. **International Journal of Gynecologic Cancer**, v. 28, n. 4, p. 764–772, 1 maio 2018. Disponível em: https://ijgc.bmj.com/lookup/doi/10.1097/IGC.000000000001235>. BHUYAN, P. K.; DALLAS, M.; KRAYNYAK, K.; HERRING, T.; MORROW, M.; BOYER, J.;
DUFF, S.; KIM, J.; WEINER, D. B. Durability of response to VGX-3100 treatment of HPV16/18
positive cervical HSIL. Human Vaccines & Immunotherapeutics, v. 17, n. 5, p. 1288–1293,
4 maio 2021. Disponível em:
https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21645515.2020.1823778>.

BIRKHOLZ, K.; SCHWENKERT, M.; KELLNER, C.; GROSS, S.; FEY, G.; SCHULER-THURNER, B.; SCHULER, G.; SCHAFT, N.; DÖRRIE, J. Targeting of DEC-205 on human dendritic cells results in efficient MHC class II–restricted antigen presentation. **Blood**, v. 116, n. 13, p. 2277–2285, 30 set. 2010. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article/116/13/2277/27558/Targeting-of-DEC205-onhuman-dendritic-cells>.

BOCCARDO, E. HPV-Mediated Genome Instability : At the Roots of Cervical Carcinogenesis. p. 57–65, 2010.

BOCCARDO, E.; LEPIQUE, A. P.; VILLA, L. L. The role of inflammation in HPV carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 11, p. 1905–1912, 1 nov. 2010. Disponível em: https://academic.oup.com/carcin/article-lookup/doi/10.1093/carcin/bgq176>.

BOL, K. F.; SCHREIBELT, G.; GERRITSEN, W. R.; DE VRIES, I. J. M.; FIGDOR, C. G. Dendritic Cell–Based Immunotherapy: State of the Art and Beyond. **Clinical Cancer Research**, v. 22, n. 8, p. 1897–1906, 15 abr. 2016. Disponível em: http://clincancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1078-0432.CCR-15-1399>.

BONIFAZ, L.; BONNYAY, D.; MAHNKE, K.; RIVERA, M.; NUSSENZWEIG, M. C.; STEINMAN, R. M. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. **Journal of Experimental Medicine**, v. 196, n. 12, p. 1627–1638, 2002.

BONIFAZ, L. C.; BONNYAY, D. P.; CHARALAMBOUS, A.; DARGUSTE, D. I.; FUJII, S.-I.; SOARES, H.; BRIMNES, M. K.; MOLTEDO, B.; MORAN, T. M.; STEINMAN, R. M. In Vivo Targeting of Antigens to Maturing Dendritic Cells via the DEC-205 Receptor Improves T Cell Vaccination. **The Journal of Experimental Medicine J. Exp. Med**, v. 038151000, n. 6, p. 815–824, 2004a. Disponível em: http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20032220>.

BONIFAZ, L. C.; BONNYAY, D. P.; CHARALAMBOUS, A.; DARGUSTE, D. I.; FUJII, S. I.; SOARES, H.; BRIMNES, M. K.; MOLTEDO, B.; MORAN, T. M.; STEINMAN, R. M. In Vivo
Targeting of Antigens to Maturing Dendritic Cells via the DEC-205 Receptor Improves T Cell Vaccination. **Journal of Experimental Medicine**, v. 199, n. 6, p. 815–824, 2004b.

BOSCARDIN, S. B.; HAFALLA, J. C. R.; MASILAMANI, R. F.; KAMPHORST, A. O.; ZEBROSKI, H. A.; RAI, U.; MORROT, A.; ZAVALA, F.; STEINMAN, R. M.; NUSSENZWEIG, R. S.; NUSSENZWEIG, M. C. Antigen targeting to dendritic cells elicits long-lived T cell help for antibody responses. **The Journal of experimental medicine**, v. 203, n. 3, p. 599–606, 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16505139%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/arti clerender.fcgi?artid=PMC2118236>.

BOSCH, F. X.; BROKER, T. R.; FORMAN, D.; MOSCICKI, A.-B.; GILLISON, M. L.; DOORBAR, J.; STERN, P. L.; STANLEY, M.; ARBYN, M.; POLJAK, M.; CUZICK, J.; CASTLE, P. E.; SCHILLER, J. T.; MARKOWITZ, L. E.; FISHER, W. A.; CANFELL, K.; DENNY, L. A.; FRANCO, E. L.; STEBEN, M.; KANE, M. A.; SCHIFFMAN, M.; MEIJER, C. J. L. M.; SANKARANARAYANAN, R.; CASTELLSAGUÉ, X.; KIM, J. J.; BROTONS, M.; ALEMANY, L.; ALBERO, G.; DIAZ, M.; SANJOSÉ, S. de. Comprehensive Control of Human Papillomavirus Infections and Related Diseases. **Vaccine**, v. 31, p. H1–H31, dez. 2013. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X13013467>.

BOSCH, F. X.; BURCHELL, A. N.; SCHIFFMAN, M.; GIULIANO, A. R.; DE SANJOSE, S.; BRUNI, L.; TORTOLERO-LUNA, G.; KJAER, S. K.; MUÑOZ, N. Epidemiology and Natural History of Human Papillomavirus Infections and Type-Specific Implications in Cervical Neoplasia. **Vaccine**, v. 26, p. K1–K16, ago. 2008. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X08006749>.

BOUSSIOS, S.; SERAJ, E.; ZARKAVELIS, G.; PETRAKIS, D.; KOLLAS, A.; KAFANTARI, A.; ASSI, A.; TATSI, K.; PAVLIDIS, N.; PENTHEROUDAKIS, G. Management of patients with recurrent/advanced cervical cancer beyond first line platinum regimens: Where do we stand? A literature review. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 108, p. 164–174, dez. 2016. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1040842816303213>.

BOZZACCO, L.; TRUMPFHELLER, C.; SIEGAL, F. P.; MEHANDRU, S.; MARKOWITZ, M.; CARRINGTON, M.; NUSSENZWEIG, M. C.; PIPERNO, A. G.; STEINMAN, R. M. DEC-205 receptor on dendritic cells mediates presentation of HIV gag protein to CD8+ T cells in a spectrum of human MHC I haplotypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 4, p. 1289–1294, 2007.

BUTLER, M.; MOREL, A.; JORDAN, W. J.; EREN, E.; HUE, S.; SHRIMPTON, R. E.; RITTER, 108

M. A. Altered expression and endocytic function of CD 205 in human dendritic cells , and detection of a CD 205 – DCL- 1 fusion protein upon dendritic cell maturation. p. 362–371, 2006.

BUTZ, K.; RISTRIANI, T.; HENGSTERMANN, A.; DENK, C.; SCHEFFNER, M.; HOPPE-SEYLER, F. siRNA targeting of the viral E6 oncogene efficiently kills human papillomavirus-positive cancer cells. **Oncogene**, v. 22, n. 38, p. 5938–5945, 4 set. 2003. Disponível em: http://www.nature.com/articles/1206894>.

CHANDRA, J.; KUO, P. T. Y.; HAHN, A. M.; BELZ, G. T.; FRAZER, I. H. Batf3 selectively determines acquisition of CD8 + dendritic cell phenotype and function. **Immunology & Cell Biology**, v. 95, n. 2, p. 215–223, fev. 2017. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1038/icb.2016.83>.

CHAPPELL, C. P.; DRAVES, K. E.; GILTIAY, N. V.; CLARK, E. A. Extrafollicular B cell activation by marginal zone dendritic cells drives T cell–dependent antibody responses. **Journal of Experimental Medicine**, v. 209, n. 10, p. 1825–1840, 24 set. 2012. Disponível em: https://rupress.org/jem/article/209/10/1825/41218/Extrafollicular-B-cell-activation-by-marginal-zone>.

CHEN, J.; NI, G.; LIU, X. S. Papillomavirus virus like particle-based therapeutic vaccine against human papillomavirus infection related diseases: Immunological problems and future directions. **Cellular Immunology**, v. 269, n. 1, p. 5–9, jan. 2011. Disponível em: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008874911000505>.

CHENG, W. F.; HUNG, C. F.; LIN, K. Y.; LING, M.; JUANG, J.; HE, L.; LIN, C. T.; WU, T.-C. CD8+ T cells, NK cells and IFN-γ are important for control of tumor with downregulated MHC class I expression by DNA vaccination. **Gene Therapy**, v. 10, n. 16, p. 1311–1320, ago. 2003. Disponível em: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/sj.gt.3301982>.

CHENG, Y. S.; XU, F. Anticancer function of polyinosinic-polycytidylic acid. **Cancer Biology and Therapy**, v. 10, n. 12, p. 1219–1223, 2010.

CHU, N. R.; WU, H. B.; WU, T. C.; BOUX, L. J.; MIZZEN, L. A.; SIEGEL, M. I. Immunotherapy of a human papillomavirus type 16 E7-expressing tumor by administration of fusion protein comprised of Mycobacterium bovis BCG Hsp65 and HPV16 E7. **Cell Stress and Chaperones**, v. 5, n. 5, p. 401–405, 2000.

CHUANG, L. T.; TEMIN, S.; CAMACHO, R.; DUEÑAS-GONZALEZ, A.; FELDMAN, S.; GULTEKIN, M.; GUPTA, V.; HORTON, S.; JACOB, G.; KIDD, E. A.; LISHIMPI, K.; NAKISIGE,

C.; NAM, J.-H.; NGAN, H. Y. S.; SMALL, W.; THOMAS, G.; BEREK, J. S. Management and Care of Women With Invasive Cervical Cancer: American Society of Clinical Oncology Resource-Stratified Clinical Practice Guideline. **Journal of Global Oncology**, v. 2, n. 5, p. 311–340, out. 2016. Disponível em: https://ascopubs.org/doi/10.1200/JGO.2016.003954>.

COLONNA, M.; TRINCHIERI, G.; LIU, Y.-J. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. **Nature Immunology**, v. 5, n. 12, p. 1219–1226, 17 dez. 2004. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/ni1141>.

ÇUBURU, N.; KIM, R.; GUITTARD, G. C.; THOMPSON, C. D.; DAY, P. M.; HAMM, D. E.; PANG, Y.-Y. S.; GRAHAM, B. S.; LOWY, D. R.; SCHILLER, J. T. A Prime-Pull-Amplify Vaccination Strategy To Maximize Induction of Circulating and Genital-Resident Intraepithelial CD8 + Memory T Cells . **The Journal of Immunology**, v. 202, n. 4, p. 1250–1264, 2019.

DE ALENCAR, B. C. G.; PERSECHINI, P. M.; HAOLLA, F. A.; DE OLIVEIRA, G.; SILVERIO, J. C.; LANNES-VIEIRA, J.; MACHADO, A. V.; GAZZINELLI, R. T.; BRUNA-ROMERO, O.; RODRIGUES, M. M. 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. Infection and Immunity, v. 77, n. 10, p. 4383–4395, out. 2009. Disponível em: https://journals.asm.org/doi/10.1128/IAI.01459-08>.

DE MARTEL, C.; PLUMMER, M.; VIGNAT, J.; FRANCESCHI, S. Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. **International Journal of Cancer**, v. 141, n. 4, p. 664–670, 15 ago. 2017. Disponível em: http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.30716>.

DECRAUSAZ, L.; DOMINGOS-PEREIRA, S.; DUC, M.; BOBST, M.; ROMERO, P.; SCHILLER, J. T.; JICHLINSKI, P.; NARDELLI-HAEFLIGER, D. Parenteral is more efficient than mucosal immunization to induce regression of human papillomavirus-associated genital tumors. **International Journal of Cancer**, v. 129, n. 3, p. 762–772, 2011.

DHODAPKAR, M. V; SZNOL, M.; ZHAO, B.; WANG, D.; CARVAJAL, R. D.; KEOHAN, M. L.; CHUANG, E.; SANBORN, R. E.; LUTZKY, J.; POWDERLY, J.; KLUGER, H.; TEJWANI, S.; GREEN, J.; RAMAKRISHNA, V.; CROCKER, A.; VITALE, L.; YELLIN, M.; DAVIS, T.; KELER, T. Induction of antigen-specific immunity with a vaccine targeting NY-ESO-1 to the dendritic cell receptor DEC-205. **Science translational medicine**, v. 6, n. 232, p. 232ra51, 2014. Disponível em: http://stm.sciencemag.org/content/6/232/232ra51.full.

DINIZ, M. O.; SALES, N. S.; SILVA, J. R.; FERREIRA, L. C. S. Protection against HPV-16 -

Associated Tumors Requires the Activation of CD8 b Effector Memory T Cells and the Control of Myeloid-Derived Suppressor Cells. v. 15, n. August, p. 1920–1931, 2016.

DOMINGOS-PEREIRA, S.; DECRAUSAZ, L.; DERRÉ, L.; BOBST, M.; ROMERO, P.; SCHILLER, J. T.; JICHLINSKI, P.; NARDELLI-HAEFLIGER, D. Intravaginal TLR agonists increase local vaccine-specific CD8 T cells and human papillomavirus-associated genital-tumor regression in mice. **Mucosal Immunology**, v. 6, n. 2, p. 393–404, 12 mar. 2013. Disponível em: http://www.nature.com/articles/mi201283>.

DOORBAR, J.; EGAWA, N.; GRIFFIN, H.; KRANJEC, C.; MURAKAMI, I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. **Reviews in Medical Virology**, v. 25, n. S1, p. 2–23, 6 mar. 2015. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/rmv.1822>.

DUDZIAK, D.; KAMPHORST, A. O.; HEIDKAMP, G. F.; BUCHHOLZ, V. R.; TRUMPFHELLER, C.; YAMAZAKI, S.; CHEONG, C.; LIU, K.; LEE, H.-W.; PARK, C. G.; STEINMAN, R. M.; NUSSENZWEIG, M. C. Differential Antigen Processing by Dendritic Cell Subsets in Vivo. **Science**, v. 315, n. 5808, p. 107–111, 5 jan. 2007. Disponível em: http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1136080>.

EDELSON, B. T.; KC, W.; JUANG, R.; KOHYAMA, M.; BENOIT, L. A.; KLEKOTKA, P. A.; MOON, C.; ALBRING, J. C.; ISE, W.; MICHAEL, D. G.; BHATTACHARYA, D.; STAPPENBECK, T. S.; HOLTZMAN, M. J.; SUNG, S.-S. J.; MURPHY, T. L.; HILDNER, K.; MURPHY, K. M. Peripheral CD103+ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8α+ conventional dendritic cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 207, n. 4, p. 823–836, 12 abr. 2010. Disponível em: <https://rupress.org/jem/article/207/4/823/40681/Peripheral-CD103-dendritic-cells-form-aunified>.

EGAWA, N.; EGAWA, K.; GRIFFIN, H.; DOORBAR, J. Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. **Viruses**, v. 7, n. 7, p. 3863–3890, 16 jul. 2015. Disponível em: http://www.mdpi.com/1999-4915/7/7/2802>.

EISENBARTH, S. C. Dendritic cell subsets in T cell programming: location dictates function. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, n. 2, p. 89–103, 21 fev. 2019. Disponível em: http://www.nature.com/articles/s41577-018-0088-1>.

FAKHR, E.; MODIC, Ž.; CID-ARREGUI, A. Recent developments in immunotherapy of cancers caused by human papillomaviruses. **Immunology**, v. 163, n. 1, p. 33–45, maio 2021.

FELTKAMP, M. C. W.; SMITS, H. L.; VIERBOOM, M. P. M.; MINNAAR, R. P.; DE JONGH, B. M.; DRIJFHOUT, J. W.; SCHEGGET, J. Ter; MELIEF, C. J. M.; KAST, W. M. Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. **European Journal of Immunology**, v. 23, n. 9, p. 2242–2249, set. 1993. Disponível em: http://doi.wiley.com/10.1002/eji.1830230929>.

FIGDOR, C. G.; VAN KOOYK, Y.; ADEMA, G. J. C-type lectin receptors on dendritic cells and langerhans cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 2, p. 77–84, 1 fev. 2002. Disponível em: http://www.nature.com/articles/nri723>.

FU, C.; ZHOU, L.; MI, Q.-S.; JIANG, A. DC-Based Vaccines for Cancer Immunotherapy. **Vaccines**, v. 8, n. 4, 26 nov. 2020. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33255895>.

GAMBARA, G.; DESIDERI, M.; STOPPACCIARO, A.; PADULA, F.; CESARIS, P. De; STARACE, D.; TUBARO, A.; FILIPPINI, A.; ZIPARO, E.; RICCIOLI, A. TLR3 engagement induces IRF-3-dependent apoptosis in androgen-sensitive prostate cancer cells and inhibits tumour growth in vivo. v. 19, n. 2, p. 327–339, 2015.

GARBUGLIA, A. R.; LAPA, D.; SIAS, C.; CAPOBIANCHI, M. R.; DEL PORTO, P. The Use of Both Therapeutic and Prophylactic Vaccines in the Therapy of Papillomavirus Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 18 fev. 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2020.00188/full>.

GARLAND, S. M.; STEBEN, M.; SINGS, H. L.; JAMES, M.; LU, S.; RAILKAR, R.; BARR, E.; HAUPT, R. M.; JOURA, E. a. Natural history of genital warts: analysis of the placebo arm of 2 randomized phase III trials of a quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) vaccine. **The Journal of infectious diseases**, v. 199, n. 6, p. 805–814, 2009.

GLOBAL CANCER OBSERVATORY. No Title.

GUILLIAMS, M.; DUTERTRE, C.-A.; SCOTT, C. L.; MCGOVERN, N.; SICHIEN, D.; CHAKAROV, S.; VAN GASSEN, S.; CHEN, J.; POIDINGER, M.; DE PRIJCK, S.; TAVERNIER, S. J.; LOW, I.; IRAC, S. E.; MATTAR, C. N.; SUMATOH, H. R.; LOW, G. H. L.; CHUNG, T. J. K.; CHAN, D. K. H.; TAN, K. K.; HON, T. L. K.; FOSSUM, E.; BOGEN, B.; CHOOLANI, M.; CHAN, J. K. Y.; LARBI, A.; LUCHE, H.; HENRI, S.; SAEYS, Y.; NEWELL, E. W.; LAMBRECHT, B. N.; MALISSEN, B.; GINHOUX, F. Unsupervised High-Dimensional Analysis Aligns Dendritic Cells across Tissues and Species. **Immunity**, v. 45, n. 3, p. 669–684, set. 2016. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761316303399>. GUO, M.; GONG, S.; MARIC, S.; MISULOVIN, Z.; PACK, M.; MAHNKE, K.; NUSSENZWEIG, M. C.; STEINMAN, R. M. A monoclonal antibody to the DEC-205 endocytosis receptor on human dendritic cells. **Hum Immunol**, v. 61, n. 8, p. 729–738, 2000. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10980384>.

GURER, C.; STROWIG, T.; BRILOT, F.; PACK, M.; TRUMPFHELLER, C.; ARREY, F.; PARK, C. G.; STEINMAN, R. M.; MU, C. Targeting the nuclear antigen 1 of Epstein-Barr virus to the human endocytic receptor DEC-205 stimulates protective T-cell responses. v. 112, n. 4, p. 1231–1240, 2018.

HANIFFA, M.; SHIN, A.; BIGLEY, V.; MCGOVERN, N.; TEO, P.; SEE, P.; WASAN, P. S.; WANG, X.-N.; MALINARICH, F.; MALLERET, B.; LARBI, A.; TAN, P.; ZHAO, H.; POIDINGER, M.; PAGAN, S.; COOKSON, S.; DICKINSON, R.; DIMMICK, I.; JARRETT, R. F.; RENIA, L.; TAM, J.; SONG, C.; CONNOLLY, J.; CHAN, J. K. Y.; GEHRING, A.; BERTOLETTI, A.; COLLIN, M.; GINHOUX, F. Human Tissues Contain CD141hi Cross-Presenting Dendritic Cells with Functional Homology to Mouse CD103+ Nonlymphoid Dendritic Cells. **Immunity**, v. 37, n. 1, p. 60–73, jul. 2012. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761312002798>.

HANLON, D.; SALUJA, S.; SHARP, F.; HONG, E.; KHALIL, D.; TIGELAAR, R.; FAHMY, T.; EDELSON, R.; ROBINSON, E. Targeting human dendritic cells via DEC-205 using PLGA nanoparticles leads to enhanced cross-presentation of a melanoma-associated antigen. **International Journal of Nanomedicine**, p. 5231, nov. 2014. Disponível em: ">http://www.dovepress.com/targeting-human-dendritic-cells-via-dec-205-using-plga-nanoparticles-l-peer-reviewed-article-IJN>">http://www.dovepress.com/targeting-human-dendritic-cells-via-dec-205-using-plga-nanoparticles-l-peer-reviewed-article-IJN>">http://www.dovepress.com/targeting-human-dendritic-cells-via-dec-205-using-plga-nanoparticles-l-peer-reviewed-article-IJN>">http://www.dovepress.com/targeting-human-dendritic-cells-via-dec-205-using-plga-nanoparticles-l-peer-reviewed-article-IJN>">http://www.dovepress.com/targeting-human-dendritic-cells-via-dec-205-using-plga-nanoparticles-l-peer-reviewed-article-IJN>">http://www.dovepress.com/targeting-human-dendritic-cells-via-dec-205-using-plga-nanoparticles-l-peer-reviewed-article-IJN>">http://www.dovepress.com/targeting-human-dendritic-cells-via-dec-205-using-plga-nanoparticles-l-peer-reviewed-article-IJN>">http://www.dovepress.com/targeting-human-dendritic-cells-via-dec-205-using-plga-nanoparticles-l-peer-reviewed-article-IJN>">http://www.dovepress.com/targeting-human-dendritic-cells-via-dec-205-using-plga-nanoparticles-l-peer-reviewed-article-IJN>">http://www.dovepress.com/targeting-human-dendritic-cells-via-dec-205-using-plga-nanoparticles-l-peer-reviewed-article-IJN>">http://www.dovepress.com/targeting-human-dendritic-cells-via-dec-205-using-plga-nanoparticles-l-peer-reviewed-article-IJN>">http://www.dovepress.com/targeting-human-dendritic-cells-via-dec-205-using-plga-nanoparticles-l-peer-reviewed-article-IJN>">http://www.dovepress.com/targeting-human-dendritic-cells-via-dec-205-using-plga-nanoparticles-l-peer-

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, n. 9447, p. 1757–1765, 2004.

HAWIGER, D.; INABA, K.; DORSETT, Y.; GUO, M.; MAHNKE, K.; RIVERA, M.; RAVETCH, J. V; STEINMAN, R. M.; NUSSENZWEIG, M. C. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. **The Journal of experimental medicine**, v. 194, n. 6, p. 769–779, 2001a.

HAWIGER, D.; INABA, K.; DORSETT, Y.; GUO, M.; MAHNKE, K.; RIVERA, M.; RAVETCH, 113

J. V; STEINMAN, R. M.; NUSSENZWEIG, M. C. Dendritic Cells Induce Peripheral T Cell Unresponsiveness Under Steady State Conditions In Vivo. v. 194, n. 6, 2001b.

HEBNER, C. M.; LAIMINS, L. A. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. **Reviews in Medical Virology**, v. 16, n. 2, p. 83–97, mar. 2006. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/rmv.488>.

HENRIQUES, H. R.; RAMPAZO, E. V; GONC, A. J. S.; VICENTIN, E. C. M.; ALVES, A. M. B.; BOSCARDIN, S. B. Targeting the Non-structural Protein 1 from Dengue Virus to a Dendritic Cell Population Confers Protective Immunity to Lethal Virus Challenge. v. 7, n. 7, 2013.

HILDNER, K.; EDELSON, B. T.; PURTHA, W. E.; DIAMOND, M.; MATSUSHITA, H.; KOHYAMA, M.; CALDERON, B.; SCHRAML, B. U.; UNANUE, E. R.; DIAMOND, M. S.; SCHREIBER, R. D.; MURPHY, T. L.; MURPHY, K. M. Batf3 Deficiency Reveals a Critical Role for CD8α + Dendritic Cells in Cytotoxic T Cell Immunity. **Science**, v. 322, n. 5904, p. 1097–1100, 14 nov. 2008. Disponível em: https://www.science.org/doi/10.1126/science.1164206>.

IDOYAGA, J.; CHEONG, C.; SUDA, K.; SUDA, N.; KIM, J. Y.; LEE, H.; PARK, C. G.; STEINMAN, R. M. Cutting Edge: Langerin/CD207 Receptor on Dendritic Cells Mediates Efficient Antigen Presentation on MHC I and II Products In Vivo. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 6, p. 3647–3650, 15 mar. 2008. Disponível em: http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.180.6.3647>.

IDOYAGA, J.; LUBKIN, A.; FIORESE, C.; LAHOUD, M. H.; CAMINSCHI, I.; HUANG, Y.; RODRIGUEZ, A.; CLAUSEN, B. E.; PARK, C. G.; TRUMPFHELLER, C.; STEINMAN, R. M. Comparable T helper 1 (Th1) and CD8 T-cell immunity by targeting HIV gag p24 to CD8 dendritic cells within antibodies to Langerin, DEC205, and Clec9A. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 6, p. 2384–9, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21262813%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/arti

clerender.fcgi?artid=PMC3038758>.

INCA. **No Title**. Disponível em: ">https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-colo-do-utero>">https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-colo-do-utero>">https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-colo-do-utero>">https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-colo-do-utero>">https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-colo-do-utero>">https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-colo-do-utero>">https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-colo-do-utero>">https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-colo-do-utero>">https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-colo-do-utero>">https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-colo-do-utero>">https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-colo-do-utero>">https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-colo-do-utero>">https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-colo-do-utero>">https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-colo-do-utero>">https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-colo-do-utero>">https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-colo-do-utero>">https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-colo-do-utero>">https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-colo-do-utero>">https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-colo-do-utero>">https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-colo-do-utero>">https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-colo-do-utero>">https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-colo-do-utero>">https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer/cancer-do-colo-do-utero>">https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer/cancer-do-colo-do-utero>">https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-cancer/cancer-do-colo-do-utero>">https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-colo-do-utero>">https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-colo-do-utero>">https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-colo-do-utero>">https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer-do-colo-do-utero>">

JIANG, W.; SWIGGARD, W. J.; HEUFLER, C.; PENG, M.; MIRZA, A.; STEINMAN, R. M.; NUSSENZWEIG, M. C. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing.Nature, 1995. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7753172%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1038/375151a0%5C

nhttp://dx.doi.org/10.1038/375151a0>.

JOHNSON, T. S.; MAHNKE, K.; STORN, V.; SCHÖNFELD, K.; RING, S.; NETTELBECK, D. M.; HAISMA, H. J.; LE GALL, F.; KONTERMANN, R. E.; ENK, A. H. Inhibition of melanoma growth by targeting of antigen to dendritic cells via an anti-DEC-205 single-chain fragment variable molecule. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 24, p. 8169–8177, 2008.

JONGBLOED, S. L.; KASSIANOS, A. J.; MCDONALD, K. J.; CLARK, G. J.; JU, X.; ANGEL, C. E.; CHEN, C.-J. J.; DUNBAR, P. R.; WADLEY, R. B.; JEET, V.; VULINK, A. J. E.; HART, D. N. J.; RADFORD, K. J. Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. Journal of Experimental Medicine. v. 207, n. 6. p. 1247-1260, 7 jun. 2010. Disponível em: https://rupress.org/jem/article/207/6/1247/40924/Human-CD141-BDCA3-dendritic-cells- DCs-represent-a>.

JOURA, E. A.; GIULIANO, A. R.; IVERSEN, O.-E.; BOUCHARD, C.; MAO, C.; MEHLSEN, J.; MOREIRA, E. D.; NGAN, Y.; PETERSEN, L. K.; LAZCANO-PONCE, E.; PITISUTTITHUM, P.; RESTREPO, J. A.; STUART, G.; WOELBER, L.; YANG, Y. C.; CUZICK, J.; GARLAND, S. M.; HUH, W.; KJAER, S. K.; BAUTISTA, O. M.; CHAN, I. S. F.; CHEN, J.; GESSER, R.; MOELLER, E.; RITTER, M.; VUOCOLO, S.; LUXEMBOURG, A. A 9-Valent HPV Vaccine against Infection and Intraepithelial Neoplasia in Women. New England Journal of Medicine, 711–723, 19 2015. V. 372, n. 8. p. fev. Disponível em: http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1405044>.

KANODIA, S.; DA SILVA, D. M.; KAST, W. M. Recent advances in strategies for immunotherapy of human papillomavirus-induced lesions. **International Journal of Cancer**, v. 122, n. 2, p. 247–259, 15 jan. 2008. Disponível em: http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.23252>.

KATO, M.; MCDONALD, K. J.; KHAN, S.; ROSS, I. L.; VUCKOVIC, S.; CHEN, K.; MUNSTER, D.; MACDONALD, K. P.; HART, D. N. Expression of human DEC-205 (CD205) multilectin receptor on leukocytes. **International Immunology**, v. 18, n. 6, p. 857–869, 1 jun. 2006. Disponível em: http://academic.oup.com/intimm/article/18/6/857/2950948>.

KELER, T.; HE, L.; RAMAKRISHNA, V.; CHAMPION, B. Antibody-targeted vaccines. **Oncogene**, v. 26, n. 25, p. 3758–3767, 2007.

KHALLOUF, H.; GRABOWSKA, A.; RIEMER, A. Therapeutic Vaccine Strategies against Human Papillomavirus. **Vaccines**, v. 2, n. 2, p. 422–462, 2014. Disponível em: <http://www.mdpi.com/2076-393X/2/2/422/>.

KIM, D.; HUNG, C.-F.; WU, T.-C. Monitoring the Trafficking of Adoptively Transferred Antigen-Specific CD8-Positive T Cells In Vivo, Using Noninvasive Luminescence Imaging. **Human Gene Therapy**, v. 18, n. 7, p. 575–588, jul. 2007. Disponível em: http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/hum.2007.038>.

KOKKA, F.; BRYANT, A.; BROCKBANK, E.; POWELL, M.; ORAM, D. Hysterectomy with radiotherapy or chemotherapy or both for women with locally advanced cervical cancer. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, 7 abr. 2015. Disponível em: https://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD010260.pub2>.

LAHOUD, M. H.; AHMET, F.; KITSOULIS, S.; WAN, S. S.; VREMEC, D.; LEE, C.-N.; PHIPSON, B.; SHI, W.; SMYTH, G. K.; LEW, A. M.; KATO, Y.; MUELLER, S. N.; DAVEY, G. M.; HEATH, W. R.; SHORTMAN, K.; CAMINSCHI, I. Targeting Antigen to Mouse Dendritic Cells via Clec9A Induces Potent CD4 T Cell Responses Biased toward a Follicular Helper Phenotype. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 2, p. 842–850, 15 jul. 2011. Disponível em: http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1101176>.

LAHOUD, M. H.; AHMET, F.; ZHANG, J.; MEUTER, S.; POLICHENI, A. N. DEC-205 is a cell surface receptor for CpG oligonucleotides. 2012.

LASARO, M. O.; DINIZ, M. O.; REYES-SANDOVAL, A.; ERTL, H. C.; FERREIRA, L. C. S. 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. **Microbes and Infection**, v. 7, n. 15, p. 1541–1550, dez. 2005. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1286457905002443>.

LI, J.; CHEN, S.; GE, J.; LU, F.; REN, S.; ZHAO, Z.; PU, X.; CHEN, X.; SUN, J.; GU, Y. A novel therapeutic vaccine composed of a rearranged human papillomavirus type 16 E6/E7 fusion protein and Fms-like tyrosine kinase-3 ligand induces CD8+ T cell responses and antitumor effect. **Vaccine**, v. 35, n. 47, p. 6459–6467, nov. 2017. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X17312033>.

LIN, K.; ROOSINOVICH, E.; MA, B.; HUNG, C.-F.; WU, T.-C. Therapeutic HPV DNA vaccines. Immunologic Research, v. 47, n. 1–3, p. 86–112, 12 jul. 2010. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/s12026-009-8141-6>.

LIU, Z.; ZHOU, H.; WANG, W.; FU, Y.; ZHU, M. ORIGINAL RESEARCH A novel dendritic cell

targeting HPV16 E7 synthetic vaccine in combination with PD-L1 blockade elicits therapeutic antitumor immunity in mice. **Oncolmmunology**, v. 5, n. 6, p. 1–9, 2016. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1080/2162402X.2016.1147641>.

MACRI, C.; DUMONT, C.; JOHNSTON, A. P. R.; MINTERN, J. D. Targeting dendritic cells: a promising strategy to improve vaccine effectiveness. **Clin Trans Immunol**, v. 5, n. 3, p. e66, 2016. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/cti.2016.6%5Cn10.1038/cti.2016.6>.

MAHNKE, K.; GUO, M.; LEE, S.; SEPULVEDA, H.; SWAIN, S. L.; NUSSENZWEIG, M.; STEINMAN, R. M. The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. **Journal of Cell Biology**, v. 151, n. 3, p. 673–683, 2000.

MAHNKE, K.; RING, S.; ENK, A. H. Antibody targeting of "steady-state" dendritic cells induces tolerance mediated by regulatory T cells. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. FEB, 2016.

MALLIA, A. K.; FROVENZANO, M. D.; FUJIMOTO, E. K.; OLSON, B. J.; KLENK, D. C.; COMPANY, P. C. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid '. v. 85, p. 76–85, 1985.

MCLAUGHLIN-DRUBIN, M. E.; MÜNGER, K. The human papillomavirus E7 oncoprotein. **Virology**, v. 384, n. 2, p. 335–344, fev. 2009. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682208006594>.

MEYLAN, E.; TSCHOPP, J.; KARIN, M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. **Nature**, v. 442, n. 7098, p. 39–44, 6 jul. 2006. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16823444>.

MILDNER, A.; JUNG, S. Development and function of dendritic cell subsets. **Immunity**, v. 40, n. 5, p. 642–656, 2014. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2014.04.016>.

MUÑOZ, N.; BOSCH, F. X.; DE SANJOSÉ, S.; HERRERO, R.; CASTELLSAGUÉ, X.; SHAH, K. V.; SNIJDERS, P. J. F.; MEIJER, C. J. L. M. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 6, p. 518–527, 6 fev. 2003. Disponível em: http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa021641.

NEUBERT, K.; LEHMANN, C. H. K.; HEGER, L.; BARANSKA, A.; STAEDTLER, A. M.; BUCHHOLZ, V. R.; YAMAZAKI, S.; HEIDKAMP, G. F.; EISSING, N.; ZEBROSKI, H.; NUSSENZWEIG, M. C.; NIMMERJAHN, F.; DUDZIAK, D. Antigen Delivery to CD11c+CD8-Dendritic Cells Induces Protective Immune Responses against Experimental Melanoma in Mice In Vivo. Journal of Immunology, v. 192, n. 12, 2014.

NIZARD, M.; ROUSSEL, H.; DINIZ, M. O.; KARAKI, S.; TRAN, T.; VORON, T.; DRANSART, E.; SANDOVAL, F.; RIQUET, M.; RANCE, B.; MARCHETEAU, E.; FABRE, E.; MANDAVIT, M.; TERME, M.; BLANC, C.; ESCUDIE, J.-B.; GIBAULT, L.; BARTHES, F. L. P.; GRANIER, C.; FERREIRA, L. C. S.; BADOUAL, C.; JOHANNES, L.; TARTOUR, E. Induction of resident memory T cells enhances the efficacy of cancer vaccine. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 15221, 24 ago. 2017. Disponível em: http://www.nature.com/articles/ncomms15221>.

ONDO, A. L.; MINGS, S. M.; PESTAK, R. M.; SHANLER, S. D. Topical combination therapy for cutaneous squamous cell carcinoma in situ with 5-fluorouracil cream and imiquimod cream in patients who have failed topical monotherapy. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 55, n. 6, p. 1092–1094, dez. 2006. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0190962206018354>.

PALUCKA, A. K.; UENO, H.; FAY, J. W.; BANCHEREAU, J. Taming cancer by inducing immunity via dendritic cells. **Immunological Reviews**, v. 220, n. 1, p. 129–150, dez. 2007. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-065X.2007.00575.x.

PAVE:PAPILLOMAVIRUS EPISTEME. **Search Database**. Disponível em: https://pave.niaid.nih.gov/#search/search_database/kw?dbNamespace=Genomes&include NR=false&refCloneOnly=false&sort=Locus_ID&sortType=true&page=600&start=1&showTabl e=1&Host Species=Homo sapiens&>.

PORCHIA, B. F. M. M.; MORENO, A. C. R.; RAMOS, R. N.; DINIZ, M. O.; DE ANDRADE, L. H. T. M.; ROSA, D. S.; BARBUTO, J. A. M.; BOSCARDIN, S. B.; FERREIRA, L. C. S. Herpes simplex virus glycoprotein D targets a specific dendritic cell subset and improves the performance of vaccines to human papillomavirus-associated tumors. **Molecular Cancer Therapeutics**, p. molcanther.0071.2017, 2017. Disponível em: http://mct.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1535-7163.MCT-17-0071.

POSTOW, M. A.; CALLAHAN, M. K.; WOLCHOK, J. D. Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. **Journal of Clinical Oncology**, v. 33, n. 17, p. 1974–1982, 10 jun. 2015. Disponível em: http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2014.59.4358>.

PROBST, H. C.; MUTH, S.; SCHILD, H. Regulation of the tolerogenic function of steady-state DCs. **European Journal of Immunology**, v. 44, n. 4, p. 927–933, abr. 2014a. Disponível em: http://doi.wiley.com/10.1002/eji.201343862>.

PROBST, H. C.; MUTH, S.; SCHILD, H. Regulation of the tolerogenic function of steady-state DCs. **European Journal of Immunology**, v. 44, n. 4, p. 927–933, abr. 2014b. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/eji.201343862>.

PULENDRAN, B.; PALUCKA, K.; BANCHEREAU, J. Sensing pathogens and tuning immune responses. **Science (New York, N.Y.)**, v. 293, n. 5528, p. 253–6, 13 jul. 2001. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11452116>.

RAMOS DA SILVA, J.; RAMOS MORENO, A. C.; SILVA SALES, N.; DE OLIVEIRA SILVA, M.; APS, L. R. M. M.; PORCHIA, B. F. M. M.; BITENCOURT RODRIGUES, K.; CESTARI MORENO, N.; VENCESLAU-CARVALHO, A. A.; MENCK, C. F. M.; DE OLIVEIRA DINIZ, M.; DE SOUZA FERREIRA, L. C. A therapeutic DNA vaccine and gemcitabine act synergistically to eradicate HPV-associated tumors in a preclinical model. **Oncolmmunology**, v. 10, n. 1, p. 1949896, 1 jan. 2021. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/2162402X.2021.1949896>.

RUELLA, M.; XU, J.; BARRETT, D. M.; FRAIETTA, J. A.; REICH, T. J.; AMBROSE, D. E.; KLICHINSKY, M.; SHESTOVA, O.; PATEL, P. R.; KULIKOVSKAYA, I.; NAZIMUDDIN, F.; BHOJ, V. G.; ORLANDO, E. J.; FRY, T. J.; BITTER, H.; MAUDE, S. L.; LEVINE, B. L.; NOBLES, C. L.; BUSHMAN, F. D.; YOUNG, R. M.; SCHOLLER, J.; GILL, S. I.; JUNE, C. H.; GRUPP, S. A.; LACEY, S. F.; MELENHORST, J. J. Induction of resistance to chimeric antigen receptor T cell therapy by transduction of a single leukemic B cell. **Nature Medicine**, v. 24, n. 10, p. 1499–1503, 1 out. 2018. Disponível em: http://www.nature.com/articles/s41591-018-0201-9>.

SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. Journal of Experimental Medicine, 179, n. 4, 1109–1118, 1 abr. 1994. Disponível ٧. р. em: https://rupress.org/jem/article/179/4/1109/25035/Efficient-presentation-of-soluble-antigen- by>.

SÁNCHEZ-PAULETE, A. R.; CUETO, F. J.; MARTÍNEZ-LÓPEZ, M.; LABIANO, S.; MORALES-KASTRESANA, A.; RODRÍGUEZ-RUIZ, M. E.; JURE-KUNKEL, M.; AZPILIKUETA, A.; AZNAR, M. A.; QUETGLAS, J. I.; SANCHO, D.; MELERO, I. Cancer Immunotherapy with Immunomodulatory Anti-CD137 and Anti–PD-1 Monoclonal Antibodies Requires BATF3-Dependent Dendritic Cells. **Cancer Discovery**, v. 6, n. 1, p. 71–79, jan. 2016. Disponível em: http://cancerdiscovery.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/2159-8290.CD 15-0510>.

SANDOVAL, F.; SANDOVAL, F.; TERME, M.; NIZARD, M.; BADOUAL, C.; BUREAU, M.; FREYBURGER, L.; CLEMENT, O.; MARCHETEAU, E.; TRAN, T.; QUINTIN-COLONNA, F.; AUTRET, G.; THIEBAUD, M. Mucosal Imprinting of Vaccine-Induced CD8 + T Cells Is Crucial to Inhibit the Growth of Mucosal Tumors. v. 20, 2013.

SANTIN, A. D.; HERMONAT, P. L.; RAVAGGI, A.; CHIRIVA-INTERNATI, M.; PECORELLI, S.; PARHAM, G. P. Radiation-enhanced expression of E6/E7 transforming oncogenes of human papillomavirus-16 in human cervical carcinoma. **Cancer**, v. 83, n. 11, p. 2346–2352, 1998.

SCHEFFNER, M.; WERNESS, B. A.; HUIBREGTSE, J. M.; LEVINE, A. J.; HOWLEY, P. M. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. **Cell**, v. 63, n. 6, p. 1129–1136, dez. 1990. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0092867490904098>.

SCHIFFMAN, M.; DOORBAR, J.; WENTZENSEN, N.; MONK, B. J.; STANLEY, M. A.; FRANCESCHI, S. Carcinogenic human papillomavirus infection. 2016.

SCHILLER, J. T.; CASTELLSAGUÉ, X.; GARLAND, S. M. A review of clinical trials of human papillomavirus prophylactic vaccines. **Vaccine**, v. 30, n. SUPPL.5, p. F123–F138, 2012.

SCHULZE, H. J.; CRIBIER, B.; REQUENA, L.; REIFENBERGER, J.; FERRANDIZ, C.; GARCIA DIEZ, A.; TEBBS, V.; MCRAE, S. Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: results from a randomized vehicle-controlled phase III study in Europe. **British Journal of Dermatology**, v. 152, n. 5, p. 939–947, maio 2005. Disponível em: ">http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2133.2005.06486.x>.

SCIORTINO, M. T.; MEDICI, M. A.; MARINO-MERLO, F.; ZACCARIA, D.; GIUFFRÈ-CUCULLETTO, M.; VENUTI, A.; GRELLI, S.; MASTINO, A. Involvement of HVEM receptor in activation of nuclear factor κB by herpes simplex virus 1 glycoprotein D. **Cellular Microbiology**, v. 10, n. 11, p. 2297–2311, nov. 2008. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1462-5822.2008.01212.x>.

SHI, J.; IKEDA, K.; MAEDA, Y.; SHINAGAWA, K.; OHTSUKA, A.; YAMAMURA, H.; TANIMOTO, M. Identification of CD123+ myeloid dendritic cells as an early-stage immature subset with strong tumoristatic potential. **Cancer Letters**, v. 270, n. 1, p. 19–29, out. 2008. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383508003352>.

SHORTMAN, K.; HEATH, W. R. The CD8 + dendritic cell subset. **Immunological Reviews**, v. 234, n. 1, p. 18–31, mar. 2010. Disponível em: ">https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.0105-2896.2009.00870.x>.

SHRIMPTON, R. E.; BUTLER, M.; MOREL, A.-S.; EREN, E.; HUE, S. S.; RITTER, M. A. CD205 (DEC-205): A recognition receptor for apoptotic and necrotic self. **Molecular Immunology**, v. 46, n. 6, p. 1229–1239, mar. 2009. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161589008007645>.

SILVA-SÁNCHEZ, A.; MEZA-PÉREZ, S.; FLORES-LANGARICA, A.; DONIS-MATURANO, L.; ESTRADA-GARCÍA, I.; CALDERÓN-AMADOR, J.; HERNÁNDEZ-PANDO, R.; IDOYAGA, J.; STEINMAN, R. M.; FLORES-ROMO, L. ESAT-6 Targeting to DEC205+ Antigen Presenting Cells Induces Specific-T Cell Responses against ESAT-6 and Reduces Pulmonary Infection with Virulent Mycobacterium tuberculosis. **PLOS ONE**, v. 10, n. 4, p. e0124828, 27 abr. 2015. Disponível em: https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0124828>.

SPRANGER, S.; DAI, D.; HORTON, B.; GAJEWSKI, T. F. Tumor-Residing Batf3 Dendritic Cells Are Required for Effector T Cell Trafficking and Adoptive T Cell Therapy. **Cancer Cell**, v. 31, n. 5, p. 711- 723.e4, maio 2017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535610817301587>.

STEENBERGEN, R. D. M.; SNIJDERS, P. J. F.; HEIDEMAN, D. A. M.; MEIJER, C. J. L. M. Clinical implications of (epi)genetic changes in HPV-induced cervical precancerous lesions. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 6, p. 395–405, 23 jun. 2014. Disponível em: http://www.nature.com/articles/nrc3728>.

STEINBERG, M. W.; CHEUNG, T. C.; WARE, C. F. The signaling networks of the herpesvirus entry mediator (TNFRSF14) in immune regulation. **Immunological Reviews**, v. 244, n. 1, p. 169–187, nov. 2011. Disponível em: ">https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-065X.2011.01064.x>.

STEINMAN, R. M. Some interfaces of dendritic cell biology. **APMIS**, v. 111, n. 7–8, p. 675–697, ago. 2003. Disponível em: ">http://doi.wiley.com/10.1034/j.1600-0463.2003.11107802.x>.

STEINMAN, R. M. Dendritic Cells In Vivo: A Key Target for a New Vaccine Science. **Immunity**, v. 29, n. 3, p. 319–324, set. 2008. Disponível em: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761308003671.

STERN, J. N. H.; KESKIN, D. B.; KATO, Z.; WALDNER, H.; SCHALLENBERG, S.;

121

ANDERSON, A.; VON BOEHMER, H.; KRETSCHMER, K.; STROMINGER, J. L. Promoting tolerance to proteolipid protein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis through targeting dendritic cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 40, p. 17280–17285, 5 out. 2010. Disponível em: http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1010263107>.

SVANE, I. M.; SOOT, M. L.; BUUS, S.; JOHNSEN, H. E. Clinical application of dendritic cells in cancer vaccination therapy. **APMIS**, v. 111, n. 7–8, p. 818–834, ago. 2003. Disponível em: ">http://doi.wiley.com/10.1034/j.1600-0463.2003.11107813.x>.

TACKEN, P. J.; FIGDOR, C. G. Targeted antigen delivery and activation of dendritic cells in vivo: Steps towards cost effective vaccines. **Seminars in Immunology**, v. 23, n. 1, p. 12–20, fev. 2011. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1044532311000029>.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-Like Receptors. Annual Review of Immunology,v.21,n.1,p.335–376,abr.2003.Disponívelem:<https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141126>.

TEWARI, K.; FLYNN, B. J.; BOSCARDIN, S. B.; KASTENMUELLER, K.; SALAZAR, A. M.; ANDERSON, C. A.; SOUNDARAPANDIAN, V.; AHUMADA, A.; KELER, T.; HOFFMAN, S. L.; NUSSENZWEIG, M. C.; STEINMAN, R. M.; SEDER, R. A. Poly (I: C) is an effective adjuvant for antibody and multi-functional CD4 + T cell responses to Plasmodium falciparum circumsporozoite protein (CSP) and _ DEC-CSP in non human primates. **Vaccine**, v. 28, n. 45, p. 7256–7266, 2010. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.08.098>.

TOMMASINO, M. The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis. **Seminars** in **Cancer Biology**, v. 26, p. 13–21, jun. 2014. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1044579X13001235.

TRIMBLE, C. L.; MORROW, M. P.; KRAYNYAK, K. A.; SHEN, X.; DALLAS, M.; YAN, J.; EDWARDS, L.; PARKER, R. L.; DENNY, L.; GIFFEAR, M.; BROWN, A. S.; MARCOZZI-PIERCE, K.; SHAH, D.; SLAGER, A. M.; SYLVESTER, A. J.; KHAN, A.; BRODERICK, K. E.; JUBA, R. J.; HERRING, T. A.; BOYER, J.; LEE, J.; SARDESAI, N. Y.; WEINER, D. B.; BAGARAZZI, M. L. Safety, efficacy, and immunogenicity of VGX-3100, a therapeutic synthetic DNA vaccine targeting human papillomavirus 16 and 18 E6 and E7 proteins for cervical intraepithelial neoplasia 2/3: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2b trial. **The Lancet**, v. 386, n. 10008, p. 2078–2088, nov. 2015. Disponível em: ">https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673615002391>. TRUMPFHELLER, C.; CASKEY, M.; NCHINDA, G.; LONGHI, M. P.; MIZENINA, O.; HUANG, Y.; SCHLESINGER, S. J.; COLONNA, M.; STEINMAN, R. M. The microbial mimic poly IC induces durable and protective CD4+ T cell immunity together with a dendritic cell targeted vaccine. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 7, p. 2574–2579, 19 fev. 2008. Disponível em: http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0711976105>.

TSUDA, N.; WATARI, H.; USHIJIMA, K. Chemotherapy and molecular targeting therapy for recurrent cervical cancer. **Chinese Journal of Cancer Research**, v. 28, n. 2, p. 241–253, 2016. Disponível em: http://www.cjcrcn.org/article/html_9648.html.

TSUJI, T.; MATSUZAKI, J.; KELLY, M. P.; RAMAKRISHNA, V.; VITALE, L.; HE, L.-Z.; KELER, T.; ODUNSI, K.; OLD, L. J.; RITTER, G.; GNJATIC, S. Antibody-targeted NY-ESO-1 to mannose receptor or DEC-205 in vitro elicits dual human CD8+ and CD4+ T cell responses with broad antigen specificity. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 186, n. 2, p. 1218–27, 2011. Disponível em: http://www.jimmunol.org/content/186/2/1218.full.

VILLA, L. L.; COSTA, R. L. R.; PETTA, C. A.; ANDRADE, R. P.; AULT, K. A.; GIULIANO, A. R.; WHEELER, C. M.; KOUTSKY, L. A.; MALM, C.; LEHTINEN, M.; SKJELDESTAD, F. E.; OLSSON, S. E.; STEINWALL, M.; BROWN, D. R.; KURMAN, R. J.; RONNETT, B. M.; STOLER, M. H.; FERENCZY, A.; HARPER, D. M.; TAMMS, G. M.; YU, J.; LUPINACCI, L.; RAILKAR, R.; TADDEO, F. J.; JANSEN, K. U.; ESSER, M. T.; SINGS, H. L.; SAAH, A. J.; BARR, E. Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: A randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. Lancet Oncology, v. 6, n. 5, p. 271–278, 2005.

WANG, B.; ZAIDI, N.; HE, L.-Z.; ZHANG, L.; KUROIWA, J. M.; KELER, T.; STEINMAN, R. M. Targeting of the non-mutated tumor antigen HER2/neu to mature dendritic cells induces an integrated immune response that protects against breast cancer in mice. **Breast Cancer Research**, v. 14, n. 2, p. R39, 7 abr. 2012. Disponível em: http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr3135>.

WANG, W.; CHUNG, M.; HUANG, S. Regulation of nuclear receptor activities by two human papillomavirus type 18 oncoproteins, E6 and E7. v. 303, p. 932–939, 2003.

WHANG, S. N.; FILIPPOVA, M.; DUERKSEN-HUGHES, P. Recent progress in therapeutic treatments and screening strategies for the prevention and treatment of HPV-associated head and neck cancer. **Viruses**, v. 7, n. 9, p. 5040–5065, 2015.

WHO. Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer. Disponível em:

<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-(hpv)-and-cervical-cancer>.

WOODMAN, C. B. J.; COLLINS, S. I.; YOUNG, L. S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 1, p. 11–22, jan. 2007. Disponível em: http://www.nature.com/articles/nrc2050>.

XU, X.; SUN, Q.; LIANG, X.; CHEN, Z.; ZHANG, X.; ZHOU, X.; LI, M.; TU, H.; LIU, Y.; TU, S.; LI, Y. Mechanisms of Relapse After CD19 CAR T-Cell Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia and Its Prevention and Treatment Strategies. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 12 nov. 2019. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2019.02664/full>.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses in the causation of human cancers — a brief historical account. **Virology**, v. 384, n. 2, p. 260–265, fev. 2009. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682208007721.

ZUR HAUSEN, H.; DE VILLIERS, E. M.; GISSMANN, L. Papillomavirus infections and human genital cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 12, n. 2 PART 1, p. 124–128, 1981.

APÊNDICES E ANEXOS

APÊNDICE A-Súmula curricular

APÊNDICE A – Súmula Curricular

1 Formação

| Ano | Título ou atividade | Instituição |
|------|---------------------|---------------------------------------|
| 2016 | Graduação | Universidade Federal da Bahia (UFBA) |
| 2021 | Doutorado | Instituto de Ciências Biomédicas -USP |

2 Histórico Profissional

• Pós-graduação em Ciências na modalidade de Doutorado Direto no Laboratório De Desenvolvimento de Vacinas/ Instituto de Ciências Biomédicas II – Universidade de São Paulo. Título: Direcionamento de antígenos para células dendríticas como estratégia imunoterapêutica para o controle de tumores induzidos por HPV. Projeto Fapesp. Orientador: Luís Carlos de Souza Ferreira. 2016-2021.

• Monitoria no Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) Disciplina: Microbiologia básica (Odontologia)- Instituto de Ciências Biomédicas – 120 horas.2017

• Monitoria no Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) Disciplina: Microbiologia básica (Farmácia)- Instituto de Ciências Biomédicas – 120 horas. 2019.

• Estágio de Iniciação Científica no Laboratório De Desenvolvimento de Vacinas/ Instituto de Ciências Biomédicas II – Universidade de São Paulo (2015 a e 2016). Título: Construção e teste de eficácia de uma vacina de DNA contra tumores associados ao HPV baseadas na expressão das oncoproteínas virais E6 e E7. Projeto PIBIC. Orientador: Luís Carlos de Souza Ferreira e Mariana de Oliveira Diniz. **480 horas.**

• Estágio de Iniciação Científica no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal da Bahia (2012/2015). Título: "Avaliação do papel do estrógeno na patogênese do *Mycoplasma genitalium.*". PIBIC/CNPq Orientador: Prof. Dr. Lucas Miranda Marques Vitória da Conquista, Bahia.

3 Resultados Científicos

3.1 Artigos Publicados

1. <u>MARIÂNGELA O. SILVA</u>, BIANCA S. ALMEIDA, NATIELY S. SALES, MARIANA O. DINIZ, LUANA R.M.M. APS, KARINE B. RODRIGUES, JAMILE R. SILVA, ANA C. R. MORENO, BRUNA F.M.M. PORCHIA, FERNANDO B. SULCZEWSKI, SILVIA B. BOSCARDIN, LUÍS C. S. FERREIRA. Antigen Delivery to DEC205⁺ Dendritic Cells Induces Immunological Memory and Protective Antitumor Effects Against HPV-Associated Tumors at Different Anatomical Sites. Int. J. Biol. Sci. 2021; doi:10.7150/ijbs.57038. 2. JAMILE R. SILVA, ANA C. R. MORENO, NATIELY S. SALES, MARIÂNGELA O. SILVA, LUANA R. M. M. APS, BRUNA F.M.M. PORCHIA, KARINE B. RODRIGUES, NATÁLIA C. MORENO, ALÉXIA A. VENCESLAU-CARVALHO, CARLOS F. M. MENCK, MARIANA O. DINIZ, LUÍS C. S. FERREIRA. A therapeutic DNA vaccine and gemcitabine act synergistically to eradicate HPV-associated tumours in a preclinical model. Oncoimmunology,2021. doi: 10.1080/2162402X.2021.1949896.

3. SOUZA CLSE, OLIVEIRA HBM, SANTOS JÚNIOR MN, <u>SILVA MO</u>, COQUEIRO IL, SILVA ÍBSD, CAMPOS GB, SILVA RAAD, SOARES TJ, OLIVEIRA MV, TIMENETSKY J, MARQUES LM. Ovarian hormones influence immune response to Staphylococcus aureus infection. Braz J Infect Dis. 2020 Nov-Dec;24(6):534-544. doi: 10.1016/j.bjid.2020.10.004. Epub 2020 Nov 10. PMID: 33186580.

4. SILVA, J. R.; SALES, N. S.; **SILVA, M. O**.; APS, L. R. M. M.; MORENO, A. C. R.; RODRIGUES, E. G.; FERREIRA, L. C. S.; DINIZ, M. O. Expression of a soluble IL-10 receptor enhances the therapeutic effects of a Papillomavirus-associated antitumor vaccine. Cancer Immunology Immunotherapy, 68(5):753-763, 2019. Number of citations – 2

5. NATIELY S. SALES, JAMILE R. SILVA, LUANA R.M.M. APS, BRUNA F.M.M. PORCHIA, **MARIÂNGELA O. SILVA**, LUÍS CARLOS S. FERREIRA AND MARIANA O. DINIZ. In vivo electroporation enhances vaccine-mediated therapeutic control of human papilloma virus-associated tumors by the activation of multifunctional and effector memory CD8+ T cells. *Vaccine*. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.11.011. 2017.

6. BRUNA F. M. M. PORCHIA, LUANA R. DE M. M. APS, ANA CAROLINA R. MORENO, JAMILE R. DA SILVA, <u>MARIÂNGELA O. SILVA</u>, NATIELY S. SALES, RUBENS P. S. ALVES, CLARISSA R. R. ROCHA, MATHEUS M. SILVA, KARINE B. RODRIGUES, TÁCITA B. BARROS, ROBERTA L.PAGNI, PATRÍCIA C. SOUZA, MARIANA O. DINIZ LUIS CARLOS S. FERREIRA. Active immunization combined with cisplatin confers enhanced therapeutic protection and prevents relapse of HPVinduced tumors at different anatomical sites. *Int. J. Biol. Sci.* Aceito para publicação

6.2 Artigos submetidos

1. ROBERT ANDREATA-SANTOS, RAFAEL R.L G. MACHADO, RÚBENS P. S. ALVES, NATIELY S. SALES, CAMILA P. SOARES, KARINE B.T RODRIGUES, <u>MARIÂNGELA O. SILVA</u>, MARIANNA FAVARO, MÔNICA J. R.S JESUS, MARCIO M. YAMAMOTO, JULIANA B. ANDRADE, RICARDO A. FOCK, PAULO F. R.MARGARIDO, CRISTIANE R. G. CARVALHO, SILVIA B. BOSCARDIN, EDISON L. DURIGON,LUÍS CARLOS S. FERREIRA. Validation of serological methods for COVID-19 and retrospective screening of health employees and visitors to the São Paulo University Hospital, Brazil. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2. JAMILE R. DA SILVA, KARINE B. RODRIGUES, NATIELY S. SALES, HIROMI M. ,<u>MARIÂNGELA DE O. SILVA</u>, BRUNA F.M.M. PORCHIA, ANA CAROLINA R. MORENO, LUANA R.M.M. APS, ALÉXIA A. VENCESLAU-CARVALHO, ISTVÁN TOMBÁCZ, WESLEY L. FOTORAN 5, BARBARA L. MUI, YING K. TAM, KATALIN KARIKÓ, MARIANA DE OLIVEIRA DINIZ, NORBERT PARDI,LUÍS CARLOS S. FERREIRA. Comparative evaluation of self-amplifying and non-replicating mRNA vaccine platforms in an HPV-associated mouse tumor model. Science Translacional Medicine.

3. <u>MARIÂNGELA O. SILVA</u>, ELAINE N. BARBOSA, ELLUNNY C. QUEIROZ, CLARISSA L. SILVA E SOUZA, CAMILA D. BARBOSA, HANNA IZADORA; LAIS N. COELHO, IGOR L. COQUEIRO, ÍCARO B. S. SILVA, DEBORAH C. SANTOS; RAFAELA S. BITTENCOURT, GUILHERME B. CAMPOS, JORGE TIMENETSKY, LUCAS M. MARQUES.Ovariectomy and 17β-oestradiol regulate expression of proinflammatory cytokines in Mycoplasma genitalium infection. *BMC Immunology*.

3.3 Artigos em redação

1. Roberta Liberato Pagni, Patrícia da Cruz Souza, Rafael Pegoraro, Bruna Felício Milazzotto Maldonado Porchia, Jamile Ramos da Silva, Luana Raposo de Melo Moraes Aps, <u>Mariângela de Oliveira</u> Silva, Karine Bitencourt Rodrigues, Natiely Silva Sales, Luís Carlos de Souza Ferreira, Ana Carolina Ramos Moreno*. Interleukin-6 and indoleamine-2,3-dioxygenase as a combined therapeutic target to enhance cancer vaccine efficacy to treat Human Papillomavirus (HPV)-related tumors

2. Patrícia da Cruz Souza, Roberta Liberato Pagni, Rafael Pegoraro, Bruna Felício Milazzotto Maldonado Porchia, Jamile Ramos da Silva, <u>Mariângela de</u> <u>Oliveira Silva</u>, Luana Raposo de Melo Moraes Aps, Karine Bitencourt Rodrigues, Natiely Silva Sales, Robert Andreata Santos, Russel J. Reiter, Luís Carlos de Souza Ferreira1, Ana Carolina Ramos Moreno. Oral administration of melatonin displays synergistic immunotherapeutic effects with a DNA vaccine to treat HPV-16-associated tumors in a pre-clinical model.

3. Karine B. Rodrigues, Natiely S. Sales, <u>Mariângela O. Silva</u>, Jamile R. da Silva, Maria Fernanda C. Amarante, Luana R. M. M. Aps, Ana Carolina R. Moreno, Robert A. Santos, Rúbens P. S.Alves, Elizabeth Alexandra Flatow, Jose Alexandre M. Barbuto,, Luís Carlos S. Ferreira, Bruna F. M. M. Porchia. Active immunotherapy based on dendritic cells induces a robust T cell response and tumor regression in a pre-clinical HPV-16 tumor model.

4 Lista de financiamentos à pesquisa vigentes

Projeto de Doutorado do curso de Pós-Graduação em Microbiologia

Título: "Direcionamento de antígenos para células dendríticas como estratégia imunoterapêutica para o controle de tumores induzidos por HPV", financiado pela FAPESP (Processo Nº 2018/07629-5)

Instituição: Universidade de São Paulo, 2018-atual

5 Lista de orientações em andamento, com bolsas.

Nada a declarar

6 Indicadores quantitativos.

- 1) livros publicados: 0
- 2) publicações em periódicos com seletiva política editorial: 6
- 3) capítulos de livros: 0
- 4) teses de mestrado orientadas e já defendidas: 0
- 5) teses de doutorado orientadas e já defendidas: 0
- 6) Quantidade de citações recebidas na literatura científica internacional, segundo
- o ISI, Scopus

ou Google Scholar: 17

7 Links para páginas da web

ORCID: 0000-0002-0975-7187

APÊNDICE B-Artigos científicos de primeira autoria e co-autoria publicado até o momento

2944

Int. J. Biol. Sci. 2021, Vol. 17

IVYSPRING INTERNATIONAL PUBLISHER

Research Paper

International Journal of Biological Sciences 2021; 17(11): 2944-2956. doi: 10.7150/ijbs.57038

Antigen Delivery to DEC205⁺ Dendritic Cells Induces Immunological Memory and Protective Therapeutic Effects against HPV-Associated Tumors at Different Anatomical Sites

Mariângela O. Silva¹, Bianca S. Almeida², Natiely S. Sales¹, Mariana O. Diniz^{1#}, Luana R.M.M. Aps¹, Karine B. Rodrigues¹, Jamile R. Silva¹, Ana C. R. Moreno¹, Bruna F.M.M. Porchia¹, Fernando B. Sulczewski², Silvia B. Boscardin², Luís C. S. Ferreira^{1[∞]}

Vaccine Development Laboratory, Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil
 Laboratory of Antigen Targeting to Dendritic Cells, Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences University of São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil

*Present address: Division of Infection and Immunity, University College London, 5 University St, Bloomsbury WC1E 6JF, London.

Corresponding author: Av. Prof Lineu Prestes, 1374, São Paulo-SP, Brazil, Zip code: 05508-000; Phone: +55 1130917356. Email address: lcsf@usp.br (L.C.S.Ferreira).

© The author(s). This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). See http://ivyspring.com/terms for full terms and conditions.

Received: 2020.12.11; Accepted: 2021.05.02; Published: 2021.07.13

Abstract

The generation of successful anticancer vaccines relies on the ability to induce efficient and long-lasting immune responses to tumor antigens. In this scenario, dendritic cells (DCs) are essential cellular components in the generation of antitumor immune responses. Thus, delivery of tumor antigens to specific DC populations represents a promising approach to enhance the efficiency of antitumor immunotherapies. In the present study, we employed antibody-antigen conjugates targeting a specific DC C-type lectin receptor. For that purpose, we genetically fused the anti-DEC205 monoclonal antibody to the type 16 human papillomavirus (HPV-16) E7 oncoprotein to create a therapeutic vaccine to treat HPV-associated tumors in syngeneic mouse tumor models. The therapeutic efficacy of the α DEC205-E7 mAb was investigated in three distinct anatomical tumor models (subcutaneous, lingual and intravaginal). The immunization regimen comprised two doses of the $\alpha DEC205$ -E7 mAb coadministered with a DC maturation stimulus (Polyinosinic:polycytidylic acid, poly (I:C)) as an adjuvant. The combined immunotherapy produced robust antitumor effects on both the subcutaneous and orthotopic tumor models, stimulating rapid tumor regression and long-term survival. These outcomes were related to the activation of tumor antigen-specific CD8⁺ T cells in both systemic compartments and lymphoid tissues. The aDEC205-E7 antibody plus poly (I:C) administration induced long-lasting immunity and controlled tumor relapses. Our results highlight that the delivery of HPV tumor antigens to DCs, particularly via the DEC205 surface receptor, is a promising therapeutic approach, providing new opportunities for the development of alternative immunotherapies for patients with HPV-associated tumors at different anatomical sites.

Key words: DEC205 receptor, cancer immunotherapy, dendritic cells, HPV

Introduction

The immune system has long been studied as a key element in the fight against cancer. Years of research have been devoted to trying to understand how to modify the immune system for the benefit of patients. Currently, the use of immunotherapy represents a pivotal advance in oncology through different strategies that stimulate and amplify the immune response, promoting the elimination of tumor cells [1,2]. In this landscape, the activation of dendritic cells (DCs) is an important feature in cancer

treatment [3]. In particular, DCs are crucial in the induction and regulation of innate and adaptive immune responses and have an exceptional capacity to induce cytotoxic T lymphocyte responses, which are essential for tumor control [4]. Therefore, exploiting the immunomodulatory function of DCs is currently a crucial strategy to improve immunotherapies against cancer.

The important role of DCs in antigen presentation is aided by several surface receptors that efficiently interact with different ligands and participate in epitope presentation [5]. DCs capture antigens in peripheral tissues and then migrate to the secondary lymphoid organs to present the antigens in the context of major histocompatibility complex (MHC) I and MHC II to activate CD8+ T cells and CD4⁺ T cells, respectively [6,7]. This feature provides immunomodulatory cell-cell contact signals, favoring the release of cytokines that boost immune responses. It is important to take into account that in the context of cancer, there is systemic immunosuppression and a local immunosuppressive microenvironment that impair the effector activities of immune cells [8,9]. Facing this obstacle, cancer immunotherapy research may explore different approaches, such as targeting/delivering antigens more specifically to DCs and combining immunotherapies with adjuvants capable of synergistic effects to limit tumor immune escape. Thus, DC targeting is an attractive strategy to increase endogenous antitumor responses and promote cancer eradication. In vivo DC targeting has been shown to be a promising platform capable of improving the immune response [10-12]. This approach is based on an antibody-antigen fusion strategy that delivers different target antigens directly to DC subtypes in vivo through different DC receptors, including Fc and C-type lectin receptors [13].

Among numerous surface molecules, the DEC205 receptor is one of the most widely studied for DC targeting strategies. DEC205 (CD205) is a C-type lectin endocytic receptor expressed on thymic epithelial cells and on cDC1s [14,15]. cDC1s reside in the T cell areas of the lymphoid organs and have a high capacity to cross-present antigens to CD8+T cells [16]. Other approaches to deliver antigens to cDC1s, such as Clec9A, Xcr1 and STxB-based vaccines are known to induce strong antigen-specific B and T cell responses, even in the absence of an adjuvant [16,17]. Nonetheless, targeting antigens to DEC205+ DCs is usually not sufficient to activate strong antigen-specific immune responses, requiring the use of an additional innate immunity stimulus for cell activation and maturation [18,19].

Immunizations based on anti-DEC205 chimeric

mAbs have been effective in generating immune responses against different antigens, such as Her2/neu, HIV gag, the melanoma antigen protein tyrosinase-related (TRP)-2, DENV2 non-structural protein 1 and the Plasmodium yoelii circumsporozoite protein [10,20-23]. Additionally, selectively targeting DEC205 reduces the amount of antigen required for the generation of T cell immunity and improves antigen presentation almost 100-fold, generating protective T cell immunity [24]. Indeed, despite the availability of different DCs-targeting strategies, only DEC-205-targeted vaccines have been evaluated in clinical trials [25].

Human papillomavirus (HPV) is the most common sexually transmitted pathogen worldwide and is associated with nearly all cervical cancer cases and significant numbers of anogenital and head and neck cancers [26]. The HPV-16 and HPV-18 strains cause more than 70% of the cases of cervical cancer, which is the fourth most common cancer in women and the fourth most common cause of cancer-related death among women worldwide [27,28]. The E7 and E6 oncoproteins are constitutively expressed in HPV-associated tumors and represent clear targets for the development of antigen-specific immunotherapeutic approaches for this type of cancer [29,30]. approaches have Several therapeutic been investigated to control tumor growth in both preclinical studies and clinical studies [31-33]. However, to date, none of these strategies have yielded strong enough results to justify clinical applications.

In this study, we evaluated a therapeutic immunization strategy against HPV-associated tumors based on an α DEC205 mAb genetically fused to the HPV16-E7 oncoprotein (α DEC205-E7). After characterization of the chimeric antibodies, we evaluated the antitumoral efficacy of the α DEC205-E7 mAb coadministered with poly (I:C) using mice transplanted with TC-1 cells at different anatomical sites. DC targeting by the α DEC205-E7 mAb efficiently induced antitumor cytotoxic T cells (CTLs) and produced strong therapeutic antitumor responses. In addition, targeting the E7 antigen to DEC205+ DCs induced long-term immunological memory and prevented tumor relapses.

Materials and methods

Construction, expression, and characterization of chimeric antibodies. cDNA encoding the E7 sequence was obtained from the plasmid pRE4E7 [34] and cloned in-frame with the carboxyl terminus of the heavy chain of a mouse aDEC205 mAb (NLDC145 clone) (kindly provided by Dr Michel C. Nussenzweig, The Rockefeller University) between

http://www.ijbs.com

2945

the 5' XhoI and 3' NotI sites. Plasmids encoding the heavy chain and light chain of the mouse aDEC205 mAb were used to transfect human embryonic kidney (HEK) 293T cells (ATCC), and the recombinant mAbs were produced and purified exactly as previously described [10]. As a control, the aDEC205 mAb was also produced without any fused antigen. After purification using protein G beads (GE Healthcare), the integrity and specificity of the aDEC205-E7 fusion mAb were determined by SDS-PAGE and Western blotting using anti-mouse IgG-peroxidase (IgG-HRP) (Sigma) and anti-E7 polyclonal antibodies (produced in-house).

Binding assay. CHO cells expressing mouse and human DEC205 receptors (CHOmDEC) (kindly provided by Dr Michel Nussenzweig, The Rockefeller University) were used to perform the binding assay. Each purified antibody (10, 1, or 0.1 (g/mL) was incubated with CHOmDEC cells for 40 min on ice. Next, the cells were washed with FACS buffer (2% fetal bovine serum in PBS) and incubated with an Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG mAb (Invitrogen, USA) for 30 min at 4°C. After two washes, the cells were run on an LSRFortessa® flow cytometer (BD Bioscience, USA) and analyzed with FlowJo software.

Animal studies. C57BL/6 mice (female, 6-to-8 weeks old) were purchased from the Facility for SPF (Specific-Pathogen Free) Mouse Production at University of São Paulo Medical School and housed in the Microbiology Department of the University of São Paulo. All the procedures involving animal handling were performed according to protocols approved by the ethics committee for animal experimentation (CEUA 80/2016) and followed the standard rules approved by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA).

Cell lines. TC-1 cells express the HPV16- E6 and E7 oncoproteins and c-Ha-ras [29]. A TC-1-luc cell line was generated by transduction of TC-1 cells with a luciferase-expressing lentiviral vector, as previously described by Kim and collaborators [35]. Both cell lines were kindly provided by Dr. T.C. Wu (Johns Hopkins University, USA). Cells were cultured as previously described [32].

In vivo tumor challenge. Subcutaneous (s.c) tumors were established by injection of 10^5 or 2.5×10^5 TC-1 cells/100 µL/animal into the right mouse flank. Tumor sizes were measured twice per week using a caliper, and survival was followed for at least 60 days. Mice were euthanized when the tumor area reached 200 mm². For an intravaginal tumor model, female C57BL/6 mice were treated with 3 mg of medroxyprogesterone acetate per mouse via s.c injection for diestrus synchronization as previously

described [28]. Four days later, the mice were intravaginally administered 105 TC-1-luc cells/20 µL/animal. Intravaginal tumor growth was monitored by assessing bioluminescence 5 min after intraperitoneal injection of D-luciferin (Promega, 150 μ g/kg of body weight) using the IVIS Imaging System (Caliper, England). Bioluminescence images were analyzed to obtain the total flux values, which refer to the number of photons per second (p/s). To induce an oral tumor model, 5 x 10⁴ TC-1-luc cells/20 µL/animal were injected into the tongue. Tumor growth was monitored by bioluminescence. After 60 days, the mice were reinjected with 10-fold more TC-1 cells. For orthotopic models, mice were euthanized when the number of photons per second (p/s) reached 109-1010 or based on the health of the each animal

Immunization protocol. Mice were immunized with two doses of 10 μ g of α DEC205-E7 or α DEC205 mAbs with 50 μ g of poly (I:C) via the s.c or i.p. routes on days 3 and 10 after tumor cell grafting. In some experiments, an additional mouse group was immunized with 30 μ g of the recombinant E7 protein [31] in the presence, or absence, of 50 μ g of poly (I:C). Each dose of treatment was administered on both mice flanks. As controls, animals were left untreated or immunized with 50 μ g of poly (I:C) alone.

In vivo cytotoxicity. Splenocytes from naive mice were stained with 0.7 μ M and 7.0 μ M carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE; Invitrogen). The cells stained with 7 μ M CFSE were pulsed with 2.5 μ g/mL HPV-16 E7 peptide (RAHYNIVTF) for 40 min at 37°C. Equal amounts of the peptide-pulsed (target) and nonpulsed (control) cells were mixed and injected intravenously (2–4 x 107 cells/mouse) 14 days after the last immunization. After 18 h, splenocytes were harvested and analyzed for CFSE staining by flow cytometry on a FACS LSRFortessa (BD Biosciences, USA).

Flow cytometry analysis. The blood, spleen and tumor-draining lymph nodes were collected 7 or 14 days after the last immunization. Cells were incubated at a concentration of 1.5 x 106 cells per well and stimulated overnight at 37°C in the presence of 10 µg/mL brefeldin A (GolgiPlug; BD Biosciences, USA) and 2 µg/mL anti-CD28 antibody (BD Biosciences, USA) with 1.5 µg/mL E7-specific RAHYNIVTF peptide (amino acids 49-57) at a final concentration of 300 ng/well. After the incubation, cells were stained with the Live/Dead Fixable Aqua vitality dye, an APC-Cy7-conjugated anti-CD3 antibody, and a PE-Cy7-conjugated anti-CD8 antibody (BD Biosciences, USA). For memory phenotyping assays, blood cells were also stained with PE-conjugated anti-CD44 and FITC-conjugated anti-CD62L

antibodies (BD Biosciences, USA) for 30 min at 4°C. Cells were fixed, permeabilized (Cytofix/Cytoperm) and stained with a BV421-conjugated anti-IFN- γ antibody for 30 minutes at 4°C. All samples were run on an LSRFortessa® flow cytometer (BD Bioscience, USA) and analyzed with FlowJo software.

Data analysis. A t-test or ANOVA followed by the Bonferroni posttest were performed when groups were compared. Log-rank tests were performed whenever survival curves were compared. All p values < 0.05 were considered statistically significant.

Results

The chimeric α DEC205-E7 mAb retains its ability to bind to the DEC205 receptor

To build a therapeutic vaccine capable of specifically targeting the HPV-16 E7 oncoprotein to a subset of DCs, we cloned an E7-encoding sequence in-frame with a sequence encoding the murine α DEC205 heavy chain. As a control, we also produced

the aDEC205 mAb without any fused antigen. The construction of the aDEC205-E7 mAb produced a chimeric heavy chain fused with the E7 sequence with an expected molecular weight of approximately 75 kDa (Figure S1). An E7-specific polyclonal antibody recognized the aDEC205-E7 heavy chain but not that of unfused aDEC205, which can be seen in a Western blot probed with an anti-IgG antibody (Figure 1A).

To confirm the specificity of the binding between the aDEC205-E7 mAb and DEC205, we incubated the aDEC205-E7 mAb to CHO cells expressing the DEC205 mouse receptor (CHOmDEC205) and labeled the cells with an Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG mAb. As shown in Figure 1B, the aDEC205-E7 mAb specifically bound CHO cells expressing the murine DEC205 receptor (Figure 1B), even at low concentrations. These results demonstrate that the aDEC205-E7 mAb retained the capacity to bind specifically to the murine DEC205 receptor.



Figure 1. The aDEC205-E7 mAb binds to the murine DEC205 receptor. (A) The mouse aDEC205 mAb (line 1), aDEC205-E7 mAb (line 2) and recombinant E7 protein (line 3) were separated on a 12% polyacrylamide gel (shown in Figure S1) and evaluated by immunoblotting with a peroxidase-labeled goat anti-mouse IgG antibody (gel on the right). (B) CHO cells expressing the mouse DEC205 receptor were incubated with 0.1, 1, or 10 µg/ml aDEC205-E7 mAb (dot plot on the left) or aDEC205 mAb (dot plot on the right). Binding was detected by flow cytometry using an Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse IgG mAb.



Figure 2. Induction of E7-specific CD8⁺ T cell IFN- γ^+ production and in vivo cytotoxic effects elicited in C57BL/6 mice immunized with the aDEC205-E7 mAb via the s.c. or i.p. route. C57BL/6 mice were engrafted with 2.5 x 10⁺TC-1 cells (day 0) and immunized on days 3 and 10 with 10 µg of aDEC205-E7 mAb admixed with 50 µg of poly (I:C) via either the ip. or s.c route, as indicated. Mice were also immunized with two doses of the aDEC205 mAb admixed with poly (I:C) or only poly (I:C) via either the ip. or s.c route, as indicated. Mice were also immunized with two doses of the aDEC205 mAb admixed with poly (I:C) or only poly (I:C) of the IPN-16 E7 K⁺ MHC dass I-restricted immunodominant epitope. (A) Dot plots on the left side of the figure are a representative for gated CD8⁺ IFN- γ^+ cells. The graph on the right side shows the percentage of CD8⁺ IFN- γ^+ cells determined after subtracting the values obtained with unstimulated cells. (B) Fourteen days after the last immunization, mice were injected with CFSE-labeled splenocytes pulsed with or without the E7-derived peptide. On the left side of the ganel, representative histograms of the in vivo cytotoxicity assay are shown. The graph to the right shows the in vivo cytotoxic activity represented by the percentage of target-cell lysis (n=5). Experiments were repeated twice. Statistical significance: "p < 0.05, ^{sep} \leq 0.01, (ns) non-significant difference.

Immunization of tumor-bearing mice with the α DEC205-E7 mAb induced a robust antitumor response with generation of IFN- γ -producing cytotoxic CD8⁺ T cells

After validating the αDEC205-E7 mAb in vitro, our next step was to test two in vivo immunization routes to assess the best strategy for induction of HPV-16 E7-specific CD8+ T cell responses. Mice were initially grafted with 2.5 x 105 TC-1 cells s.c and subsequently immunized with two doses of the aDEC205-E7 mAb coadministered with poly (I:C) either via the intraperitoneal (i.p) or s.c route (Figure 2). As a control, mice were immunized with two i.p. doses of the aDEC205 mAb or poly (I:C) adjuvant only. Mice immunized with aDEC205-E7 mAb + poly (I:C), via either the i.p or s.c route, exhibited increased numbers of IFN- $\gamma\text{-}producing \ CD8^+$ T cells when probed on days 7 and 14 after the last immunization (Figure 2A). Furthermore, mice immunized by the s.c route exhibited stronger cytotoxic responses than the i.p-immunized mice (Figure 2B). In addition, the mice s.c immunized with the α DEC205-E7 mAb showed enhanced tumor growth control compared with the i.p-immunized mice (Figure S2A-C). Thus, the s.c administration route was chosen for subsequent experiments.

Targeting E7 to DCs via the DEC205 receptor induces antitumor protection in mice s.c transplanted with tumor cells expressing HPV-16 oncoproteins

Next, we investigated whether the DEC205-based DC-targeting approach would induce therapeutic antitumor effects on TC-1 cells s.c transplanted into C57BL/6 mice. Mice were immunized with two doses of 10 μ g of aDEC205-E7 mAb + poly (I:C) on days 3 and 10 after tumor cell transplantation. When the immunization protocol starts 3 days after tumor cell engraftment, the tumor mass cannot be detected yet. We can observe the palpable tumor around 10 days post-TC-1 cells

inoculation (Figure 3). As control groups, mice were inoculated only with the poly (I:C) adjuvant (Figure 3A), E7 or E7 plus poly (I:C) (Figure S3A-B). One week after the last immunization, splenocytes, blood and tumor-draining lymph nodes were collected, and cells were cultured in the presence of a synthetic peptide corresponding to the immunodominant MHC class I-restricted E7 epitope. Analysis of intracellular IFN-y production showed that immunization with the αDEC205-E7 mAb + poly (I:C) induced a peak IFN-γ response 7 days after immunization (Figure 3B). Activation of IFN-y-producing CD8+ T cells was detected in the splenocytes, blood and tumor-draining lymph nodes of the mice immunized with the aDEC205-E7 mAb, with the highest CD8+ T cell responses observed in the blood. The secretion of IFN- γ by splenocytes upon stimulation with the immunodominant peptide was also observed by Cytometric Bead Array (CBA) in the aDEC205-E7 immunized group (Figure S4). Corroborating the data, activation the cellular tumor SIZES (tumor-bearing mice) of mice immunized with the aDEC205-E7 mAb + poly (I:C) were significantly smaller than those of mice immunized with poly (I:C) (Figure 3C). In addition, 80% (18 of 23) of the mice immunized with the aDEC205-E7 mAb + poly (I:C) survived until the end of the follow-up period (Figure 3D). Notably, administration of the aDEC205-E7 mAb + poly (I:C) conferred approximately 80% (18 of 23) tumor protection (tumor-free animals). Importantly, even when the treatment started with tumors still undetectable, immunization with poly (I:C) alone, recombinant E7, or E7 + poly (I:C) did not control the tumor mass as efficiently as did the administration of poly (I:C) combined with anti-DEC205-E7 (Figure 3E and Figure S3A). As the tumor microenvironment is already installed, if the immunotherapy is not properly efficient, the tumor is likely to grow. Taken together, these results indicate that s.c immunization with the aDEC205-E7 mAb + poly (I:C) activates systemic E7-specific CD8+ T cell responses and efficiently confers therapeutic antitumor effects.

Immunization with the α DEC205-E7 mAb confers therapeutic antitumor protection in two orthotopic tumor models

We next evaluated whether immunotherapy confers antitumor protection using two orthotopic tumor models (the vaginal epithelium and tongue) that more closely resemble the usual clinical conditions. For the intravaginal and tongue models, mice were engrafted with luciferase-expressing TC-1 cells and treated with the same vaccination regimen (Figures 4A and 5A, respectively). We measured luciferase activity 3 days after tumor cell engraftment and followed tumor growth for 60 days. In accordance with the previous results, immunization with the

2949

with the previous results, immunization with the aDEC205-E7 mAb + poly (I:C) induced activation of E7-specific IFN-y-producing CD8+T cell responses in the blood of mice transplanted intravaginally with TC-1-luc cells (Figure 4B). However, in contrast to the results generated in mice s.c. transplanted with TC-1 cells, mice treated with only poly (I:C) showed a slightly increased number of IFN-y-producing CD8+ T cells (Figure 4B). Regarding intravaginal tumor development, mice immunized with the aDEC205-E7 mAb + poly (I:C) controlled intravaginal tumor growth more efficiently than the mice treated with only poly (I:C) or left untreated (Figures 4C-D and S5). Mice immunized with aDEC205-E7 mAb + poly (I:C) showed approximately 80% survival at the end of the observation period. In contrast, only 40% of the mice treated with poly (I:C), and no mice left untreated, survived until the end of the observation period (Figure 4E).

Similar experiments were carried out with mice engrafted with TC-1-luc cells in the tongue (Figure 5). Following the same immunization protocols and follow-up periods (Figure 5A), mice immunized with the aDEC205-E7 mAb + poly (I:C) showed complete tumor protection. Unexpectedly, 75% of the mice treated with poly (I:C) alone exhibited tumor growth control (Figures 5B-C and S6). These results highlight the specific features of the immune responses associated with this mucosal site.

Immunization with the α DEC205-E7 mAb prevents tumor recurrence and promotes activation of an effector memory CD8⁺ T cell response.

Since we did not observe a significant difference between the antitumor protection of aDEC205-E7 mAb + poly (I:C) and poly (I:C) alone in the tongue tumor model, we decided to investigate whether the combined immunotherapy would induce long-lasting immune protection. To assess long-lasting protection, we investigated the impact of aDEC205-E7 mAb + poly (I:C) immunization on the incidence of tumor relapse in the tongue tumor model. For these experiments, mice that were tumor-free after immunization with the aDEC205-E7 mAb + poly (I:C) or poly (I:C) alone were rechallenged with TC-1 luc cells at a dose 10-fold higher than that used for the initial tumor challenge. TC-1 cell grafts were inoculated in the tongue 60 days after the first tumor challenge. All mice immunized with the aDEC205-E7 mAb remained protected following rechallenge (Figure 5D) and survived for an additional period of 60 days (total observation period of 120 days) (Figure 5E). Under this experimental condition, although

capable of controlling the primary tumors, the mice against tumor growth at the end of the observation treated with poly (I:C) showed only 14% protection period (Figure 5D-E).



Figure 3. Immunization with the dDEC205-E7 mAb induces E7-specific CD8* T cell responses and confers efficient therapeutic antitumor effects. C57BL6 mice were engrafted in the right flank with 10⁵ TC-1 cells (day 0) and s.c. immunized at days 3 and 10 with 10 µg of tDEC205-E7 mAb admixed with poly (I:C). An additional mouse group was immunized with only poly (I:C). Splenocytes, PBHCs, and tumor-draining lymph nodes cells were collected 7 days after the last immunization and stimulated with a synthetic peptide corresponding to the MHC class 1-respective polyce overright. The cells were subsequently labeled with fluorophore-conjugated anti-CD3, anti-CD8, and anti-IFN-Y mAbs for flow cytometry analysis. Tumor growth was monitored 2-3 times per week for 60 days. (A) Experimental design. (B) Representative dot plots (left) and percentages (right) of CDB⁴ IFN-Y⁺T cells determined after subtracting the values obtained with unstimulated cells. (C) tumor size over time (two-way AHOVA). (D) Survival percentage (log-rank-Matel-Cox). (E) Percentage of tumor-free mice over time. Data are expressed as the mean ± SD from three experiments with similar results (n= 21-23 mice/group). Statistical significance^{###} of 0.001, ^{####} of 0.001, (ns) non-significant.



Figure 4. Immunization with the dDEC205-E7 mAb induces E7-specific CD8* T cell responses and therapeutic antitumor effects in mice transplanted with TC-1 cells at different mucosal sites. Female C57BL/6 mice received medroxyprogesterone acetate (3 mg/mouse) and, 4 days later, were engrafted with 10⁵ TC-1-luc cells in the genital mucosa. Three and 10 days later, the animals were s.c immunized with 10 gr 0C-205-E7 mAb admixed with poly (IcC). Intravaginal tumor growth was monitored once a week. Blood samples were collected 7 days after the last immunization, and cells were stimulated overnight with a poptide corresponding to the immunodominant K^a MHC class I-restricted HPV-16 E7-specific epitope. (A) Experimental design. (B) Representative dot plots (left) and the percentage of IFN-Y-secreting CD8* T cells (right), which was determined after subtracting the values recorded for unstimulated cells. (C) Representative images of the luciferase activity in mice measured 5 min after Incident in Ituation. (D) Commission (B00-VA) (E) Survival percentage (log-rank-Mantel-Cox) (n = 14). Experiments were reproduced two times. Statistical significance: ^{*}p < 0.01, ^{**}p < 0.01, ^{**}p < 0.01, see nonsignificant.

Finally, to determine whether memory T cells are induced after immunization, we determined if memory effector CD8⁺ T cells were present by incubating blood cells with the E7₃₉₋₄₇ peptide one week after reinjection of TC-1-luc cells into the tongue. The results demonstrated that mice immunized with the aDEC205-E7 mAb + poly (I:C) efficiently mounted an IFN- γ -producing effector memory CD8⁺ T cell response (CD8⁺CD44^{hugh}CD62L⁻, Figure S7), while animals treated with poly (I:C) alone did not (Figure 5F). These results indicate that immunization with the aDEC205-E7 mAb + poly (I:C) induced antitumor immunity and conferred immunological memory capable of controlling tumor relapses.

Discussion

In the current study, we investigated the therapeutic antitumor effects conferred by targeting the HPV16 E7 oncoprotein to DCs with the aDEC205 mAb. The antitumor effects were measured using TC-1 cells, which were used to generate solid tumors at different anatomical sites. In addition to s.c. implantation, injection at two different mucosal sites, the tongue and vagina, was performed with TC-1 cells expressing luciferase (TC-1 luc cells). Our results demonstrated that targeting the HPV-16 E7 oncoprotein to DCs with the aDEC205 mAb generated efficient activation of an E7-specific CD8+T cell response and promoted enhanced therapeutic antitumor effects on TC cells in all three tumor models. More importantly, immunotherapy induced long-term immunological memory and prevented tumor relapse in rechallenged mice.

E7 targeting to DCs through the DEC205 receptor has been explored previously [36]. Z. Liu et al. showed the efficacy of delivering E7 to the DEC205 receptor with a DEC205-specific single-chain variable fragment in a prophylactic setting, protecting mice s.c. challenged with TC-1 cells. However, an efficient DEC205-targeting HPV E7 vaccine based on a full chimeric antibody has not been reported. In addition, the present study is the first to demonstrate the impact of this approach on tumors at three different anatomical sites using both non-orthotopic and orthotopic tumor models. In a therapeutic setting, administration of the aDEC205-E7 mAb plus poly (I:C) protected mice from tumor growth at all sites analyzed.

The E7 oncoprotein represents the most appropriate antigen for the development of HPV immunotherapies. However, immunization with this antigen alone exhibits low immunogenicity and is unable to induce an efficient T cell response [31,37]. Additionally, in the present and previous studies, we reported that immunization with the E7 protein alone or co-administered with adjuvants is not capable of controlling tumor growth in TC-1 cell-transplanted mice [31]. In this study, our data showed that E7 fused to the $\alpha DEC205$ mAb was capable of reversing immune tolerance to E7 and activating cytotoxic T lymphocytes, generating high frequencies of systemic E7-specific CD8+ T cells. Furthermore, immunization with the aDEC205-E7 mAb elicited complete or almost complete therapeutic antitumor protection in mice engrafted with TC-1 tumor cells at different anatomical sites. Our findings indicate that the DEC205-targeting vaccination platform can efficiently overcome the low endogenous immunogenicity of the E7 protein and induce strong antitumor immunity. Moreover, targeting antigens to DCs by means of the DEC205 receptor proved to be a more potent therapeutic approach than conventional non-DC targeting protein-based vaccines.

Several studies have shown that targeting antigens to DEC205+ DCs without providing a maturation stimulus is insufficient to stimulate an immune response; additional combination with immunostimulatory signals or adjuvants is required to promote antitumor immune responses [38,39]. In this regard, the immunization protocols used in this study included the use of poly (I:C) as an adjuvant, as poly (I:C) has been shown to be the most potent immune activator of DCs in the context of aDEC205 mAb administration [22,23,40]. The administration of poly (I:C) alone was capable of controlling approximately 50% and 75% of tumors in the intravaginal and oral tumor models, respectively. We reasoned that these results may be explained by the reported antitumor activity of poly (I:C), which binds to TLR3 and leads to the activation of NF-kB and production of type I interferons by different cells [41]. Furthermore, poly (I:C) can mediate tumor cell apoptosis and activate NK cells [42,43] Currently, TLR3 ligands are being tested either alone or in combination with chemotherapeutics or immunotherapeutics in several cancer immunotherapy trials. However, these ligands are not yet approved for clinical application. Based on their abilities to activate the immune system, other TLR agonists have been tested for the treatment of cancer, such as the TLR7 ligand imiquimod, which is efficient in treating HPV-induced neoplasias [44,45]. Thus, in vivo targeting of DCs with TLR agonists has produced promising results in both preclinical studies and clinical trials.

In the present study we observed that, despite the lack of effects on s.c. transplanted tumor cells, poly (I:C) alone was capable of inducing partial antitumor effects in mice challenged with TC-1-luc

http://www.ijbs.com

2953

cells at orthotopic mucosal sites. Nonetheless, administration of poly (I:C) does not generate long lived protective immunity neither in these tumor models nor confers immunological memory responses regarding the anti-tumor effects. One point to consider is the observed anti-tumor effects of poly (I:C) in orthotopic tumor models based on TC-1-luc cells. This cell lineage has been previously reported to be more easily treated than conventional TC-1 cell strain after treatment of mice with a peptide-based vaccine in combination with poly (I:C) [46]. However, we believe that further studies aimed to evaluate the synergic effects of different poly (I:C) derivatives in combination with anti-tumor vaccines may bring relevant information regarding translation into clinical conditions.

Previous reports have shown that the efficacy of therapeutic anti-tumor vaccines may differ depending on the immunization route and tumor types [47]. In the case of epithelial tumors, such as those induced by HPV, induction of mucosal immunity is usually quite relevant for development of an effective anti-tumor immunity [48,49]. For example, intranasal (i.n.) vaccination has been particularly efficient to induce mucosal immune responses and protection to head and neck or lung cancers [48]. Nonetheless, other studies demonstrate that parenteral immunization may lead to more efficient anti-tumor immunity [50]. In our study, administration of aDEC205-E7 mAb by the s.c route was efficient to induce immune responses capable to eradicate both mucosal (genital and lingual) and subcutaneous tumors. These results corroborate recent studies demonstrating that the s.c. administration of a bivalent therapeutic vaccine induced full tumor regression in mice bearing orthotopic genital HPV tumors [46]. Indeed, attempts to deliver aDEC205-E7 mAb via the i.n. route failed to induce significant antitumor protection (unpublished observation). These results suggest that mucosal delivery of recombinant DC-targeting mAbs will require additional adaptations in order to cross the epidermal barrier and promote efficient immune responses against HPV-associated tumors.

The $\alpha DEC205$ mAb is a molecular vector for efficient delivery of antigens to a specific subset of DCs that express the DEC205 receptor. Several other mAbs are presently being used as immunotherapies to treat cancer and other illnesses [51]. Nonetheless, in contrast to immune checkpoint inhibitor mAbs, the $\alpha DEC205$ -E7 mAb showed no side effects. Although there is no doubt about the effectiveness of immune checkpoint inhibitors as a cancer therapy, valid concerns about the risks of immune-mediated toxic effects and acquired resistance as well as the high cost of this type of therapy represent real challenges

limiting the widespread use of this technology [51]. Another important fact to be highlighted is the inherent feature of passive immunotherapy, which includes the use of immune checkpoint mAb-based therapies and even T cell-based therapies; in both cases, long-lasting immune memory cells are not activated [51-53]. This feature could partially explain the failure of these therapies in preventing tumor relapses in patients treated with anti-CTLA-4 and/or anti-PD-1/L1 mAbs or CAR T cells. In contrast, anticancer vaccines, such as those based on the aDEC205-E7 mAb, provide new insight into tumor therapy.

Active immunotherapies are capable of stimulating antitumor T cells and generating long-term immunity. In this study, immunization with the αDEC205-E7 mAb induced strong activation of E7-specific CD8+ T memory cells and prevented tumor relapse in mice rechallenged with TC-1 cells in the tongue. Our data demonstrate the high efficiency of this approach in controlling primary tumors and preventing tumor relapse via active stimulation of tumor-specific immune responses, including immunological memory. Regarding the clinical use of aDEC205 mAbs, a trial based on an anti-human DEC205 antibody fused to NY-ESO-1 reported that the vaccine was well-tolerated and induced cellular immune responses against NY-ESO-1-expressing tumors [25]. Thus, the immunization approach based on the concept of targeting antigens to DCs may be applicable for different kinds of tumors.

Collectively, our observations illustrate the potential of antigen targeting to DCs as a platform for the development of therapeutic antitumor vaccines. Our data provide preclinical evidence that delivery of the E7 oncoprotein to DEC205⁺ DCs represents a promising strategy for the control of HPV-associated tumors. Ongoing research expanding this approach holds promise for continued substantive contributions to the field of cancer immunotherapy.

Abbreviations

ATCC: american type culture collection; CAPES: coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior; CEUA: ethics committee on the use of animals in experimentation; CONCEA: national council for control of animal experimentation; c-Ha-ras: harvey rat sarcoma viral oncogene homolog; CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; E6: early protein 6; E7: early protein; FAPESP: fundação de amparo à pesquisa do estado de São Paulo; USP: university of São Paulo.

http://www.ijbs.com

2954

2955

Int. J. Biol. Sci. 2021, Vol. 17

Supplementary Material

Supplementary materials and methods, figures. http://www.ijbs.com/v17p2944s1.pdf

Acknowledgments

The authors thankfully acknowledge the technical support of Eduardo Gimenes Martins and Marcio Massao Yamamoto. This research was supported by FAPESP (grant numbers 2018/07629-5, 2016/00708-1, 2018/26515-0, 2018/07142-9, 2015/ 16505-0), CNPq (grant number 472509/2011-0), and CAPES (Finance Code 001).

Author Contributions

Conception and design: Mariângela de Oliveira Silva, Mariana Oliveira Diniz, Silvia Beatriz Boscardin and Luís Carlos Souza Ferreira. Development of methodology: Mariângela de Oliveira Silva and Mariana Oliveira Diniz. Acquisition of data: Mariângela de Oliveira Silva, Bianca Silva de Almeida, Natiely Silva Sales, Luana Raposo de Melo Moraes Aps, Karine Bittencourt Rodrigues and Fernando Bandeira Sulczewski. Analysis and interpretation of data: Mariângela de Oliveira Silva, Natiely Silva Sales, Luana Raposo de Melo Moraes Aps, Karine Bittencourt Rodrigues, Jamile Ramos da Silva, Ana Carolina Ramos Moreno and Bruna Felício Milazzoto Maldonado Porchia. Writing, review, and/or revision of the manuscript: Mariângela de Oliveira Silva, Bianca Silva de Almeida, Mariana Oliveira Diniz, Jamile Ramos da Silva, Ana Carolina de Ramos Moreno, Silvia Beatriz Boscardin and Luís Carlos de Souza Ferreira. Supervision: Silvia Beatriz Boscardin and Luís Carlos de Souza Ferreira.

Competing Interests

The authors have declared that no competing interest exists.

References

- Blattman JN. Cancer Immunotherapy: A Treatment for the Masses. Science 1 2004: 305: 200-5
- Yaddanapudi K, Mitchell RA, Eaton JW. Cancer vaccines. Oncoimmunology 2013; 2: e23403. 2
- Data, J. 2023BO. Palucka K, Banchereau J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. Nat Rev Cancer. 2012; 12: 265-77. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. Nature. 1998; 392: 245-52. 3. 4.
- Sabado RL, Balan S, Bhardwaj N. Dendritic cell-based immunotherapy. Cell 5.
- Res 2017-27-74-95 6.
- 7.
- Res. 2017; 27: 74–95. Segura E, Villadangos JA. Antigen presentation by dendritic cells in vivo. Curr Opin Immunol. 2009; 21: 105–10. Mempel TR, Henrickson SE, von Andrian UH. T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. Nature. 2004; 227: 154–9. Mantovani A, Romero P, Palucka AK, Marincola FM. Tumour immunity: Construction of the interference and the interference matter 2008. 8. effector response to tumour and role of the microenvironment. Lancet. 2008; 371: 771-83.
- 9.
- 6.1.71-60. Gonzalez H, Hagerling C, Werb Z. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. Genes Dev. 2018; 32: 1267-84. Herriques HR, Rampazo E V, Gonc A/S, Vicentin ECM, Alves AMB, Boscardin SB. Targeting the Non-structural Protein 1 from Dengue Virus to a 10.

- Dendritic Cell Population Confers Protective Immunity to Lethal Virus Challenge, 2013;7:e2330.
- 11.
- Challenge. 2013/7e/2330. Mahnke K, Qian Y, Fondel S, Brueck J, Becker C, Enk AH. Targeting of antigens to activated dendritic cells in vivo cures metastatic melanoma in mice. Cancer Res. 2003; 65:7007-12. Neubert K, Lehmann CHK, Heger L, et al. Antigen Delivery to CD11c+CD8-Dendritic Cells Induces Protective Immune Responses against Experimental Melanoma in Mice In Vivo. J Immunol. 2014; 192:5830-8 Hossain MK, Wall KA. Use of dendritic cell receptors as targets for enhancing anti-cancer immune responses. Cancers. 2019; 11:418 Guo M, Gong S, Maric S, et al. A monoclonal antibody to the DEC-205 endocytosis receptor on human dendritic cells. Hum Immunol. 2000; 61: 729-38. 12 13.
- 14.
- Jiang W, Swiggard WJ, Heufler C, et al. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. Nature. 1995, 375.
- 16.
- 17
- 18.
- 19
- dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. Nature. 1995, 375.
 Fossum E, Tesfaye DY, Bobic S, et al. Targeting Antigens to Different Recoptes on Conventional Type 1 Dendritic Cells Impacts the Immune Response. J Immunol. 2000; 305:661-73.
 Vingert B, Adotevi O, Patin D, et al. The Shiga toxin B-subunit targets antigenin vivo to dendritic cells and elicits anti-tumor immunity. Eur J Immunol. 2006; 36:1124-35.
 Hawager D, Inaba K, Donsett Y, et al. Dendritic Cells Induce Peripheral T Cell Unresponsiveness Under Steady State Conditions In Vivo. 2001; 194:769-79.
 Bonifaz L, Bonnya D, Mahuke K, Rivera M, Nussenzweig MC, Steinman RM. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic Cells encoptomed belowed and the state state state state to the dendritic Cells and complex class I products and peripheral T Cell Unresponsiveness Under Steady State Conditions In Vivo. 2001; 194:769-79.
 Bonifaz L, Bonnya D, Mahuke K, Rivera M, Nussenzweig MC, Steinman RM. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic Cells receptor DEC-200 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral T Cell Unresponsiveness Under Steady State Local CD8+ T Cell tolerance. JExpMed J 2002; 196:1627-38.
 Mahuke K, Quan Y, Fondel S, Brueck I, Becker C, Enk AH. Cures Metastatic Melanoma in Mice. Cancer Rescancer Res. 2005; 67:707-12
 Idoyaga J, Lubkin A, Fiorese C, et al. Comparable T helper 1 (Thi) and CD8 Treell immunity by targeting HU aga 204 to CB dendritic Cells within antibodies to Langerin, DEC205, and Clec?A. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011; 108:234-9.
 Boscardin SB, Hafalla JCR, Masilamani RF, et al. Antigen targeting to endritic cells to Vivo. 2016; 208: 204: colls then from the class for endritic cells and the labels for endritic dimensional conversional conversional conversional conversional conversional conversional conversional conversional conversi
- 21
- 108: 2384–9. Boscardin SB, Hafalla JCR, Masilamani RF, et al. Antigen targeting to dendritic cells elicits long-lived T cell help for antibody responses. J Exp Med. 2006; 203: 22. 599-606
- cells elicits long-lived T cell help for antibody responses. J Exp Med. 2006; 203: 599–606.
 Tewari K, Flynn BJ, Boscardin SB, et al. Poly (1: C) is an effective adjuvant for antibody and multi-functional CD4 + T cell responses to Plasmodium indicinary incumsporcoate protein (CSP) and & DEC-CSP in non human primates. Vaccine. 2010; 28: 725–66.
 Trumpheller C, Finke JS, López CB, et al. Intensified and protective CD4+ T cell immunity in muce with anti-dendritic cell HIV gag fusion antibody vaccine. JExp Med. 2006; 200: 607–77.
 Dhodapkar M V, Sznol M, Zhao B, et al. Induction of antigen-specific immunity with a vaccine targeting NY-ESO-1 to the dendritic cell receptor DEC-205. En Transl Med. 2014; 6: 232–851.
 Schüfman M, Doorbar J, Wentzensen N, Monk BJ, Starley MA, Franceschi S, Carcinogeric human papillomavirus inferion. 2016; 2: 16066.
 Arbyn M, Weiderpass E, Bruns L, et al. Articles Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a vacel-vaddwide andysis. 2020; 191–203.
 Franceschi S, Plammer M, Mun N, Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldvide: a meta-analysis. 2003; 63–73.
 Lin KY, Guarrien FG, Straveley-O'Carroll KF, et al. Treatment of established tumors with a novel vaccune that enhances major bistocompatibility class II presentation. Nat Publ. 21–6.
 Mody CA, Laimins LA, Human papillomavirus orcoproteins : pathways to transformation. Nat Publ. 2: 2016; 60–60. 23.
- 24.
- 25.
- 26
- 27.
- 28. 29.
- 30.
- transformation. Nat Publ Gr. 2010, 10: 550-60. Porchia BFMM, Moreno ACR, Ramos RN, et al. Herpes simplex virus glycoprotein D targets a specific dendritic cell subset and improves the performance of vaccines to human papillomarinus-associated tumors. Mol Cancer Ther. 2017, 16: 1922-1933 Silva JR, Sales NS, Silva MO, Aps LRMM, Moreno ACR, Paulo S. Expression of a soluble IL-10 receiptor enhances the therapeutic effects of a papillomavirus-associated antitumor vaccine in a murine model. Cancer frammentation 2010, 66: 075 723. 31
- 32. munol Immunother, 2019: 68: 753-763.
- 33.
- Papilionavruis-associated antitumor väccine in a murne model. Cancer Immunol Immunother. 2019, 68: 733-763.
 Zeng Q, Peng S, Monie A, et al. Control of Cervicovaginal HPV-16 G7-Expressing Tumors by the Combination of Therapeutic HPV Vaccination and Vascular Disrupting Agents. Hum Gene Ther. 2011, 22: 809-19.
 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 herpes simplex virus-1. Microbes Infect. 2005; 71: 514-50.
 Kim D, Hung C-F, Wu T-C. Monitoring the Trafficking of Adoptively Transferred Antigen-Specific CD8-Positive T Cells In Vivo. Using Noninvasive Luminescence Imaging, Hum Gene Ther. 2007; 18: 575-88.
 Liu Z, Zhou H, Wang W, Fu Y, Zhu M. ORIGINAL RESEARCH A novel dendritic cell targeting HEV16 E7 synthetic vaccine in combination with PD-L1 blockade elicits therapeutic antitumor immunuty in mice. Oncoimmunology. 2016; 5: 1-9.
 Chu NR, Wu HB, Wu TC, Boux LJ, Mizzen LA, Siegel MI. Immunotherapy of a human papillomavirus type 16 E7-expressing tumor by administration of
- 35.
- 37.

sion protein comprised of Mycobacterium bovis BCG Hsp65 and HPV16 E7.

- Musion protein comprised of Mycobacterium boxs BCG Hapb5 and HPV16 E7. Cell Stress Chaperones. 2000; 5: 401–5.
 Bonifaz LC, Bonnyay DP, Charalambous A, et al. In Vivo Targeting of Antigens to Maturing Dendritic Cells via the DEC-205 Receptor Improves T Cell Vaccination. J Exp Med. 2004; 199: 815–24.
 Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, et al. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. J Exp Med. 2001; 194: 769–79.

- Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, et al. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. J Exp Med. 2001; 194: 769-79.
 Meylan E, Tschopp J, Karin M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. Nature 2006; 442: 39-44.
 Alexopoulou L, Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- k B by Toll-like receptor 3. 2001; 413: 732-8.
 Cheng YS, Xu F, Anticancer function of polyinosinic-polycytidylic acid. Cancer Biol Ther. 2010; 10: 1219-23.
 Gambara G, Desideri M, Stoppacciaro A, et al. TLR3 engagement induces IRF-3-dependent apoptosis in androgen-senative prostate cancer cells and inhubits tumour growth in vivo. 2015; 19: 327-39.
 Schulze HJ, Criber B, Requena L, et al. Imiquimod 5% cream for the treatment of superfixed basal cell carcinoma results from a randomized vehicle-controlled phase III study in Europe. Br J Dematol. 2005; 152: 899-47.
 Ondo AL, Mings SM, Pestak RM, Shanler SD. Topical combination therapy for cutaneous squamous cell carcinoma in situ with 5-flucoroural cream and minguimod cream in patients who have failed topical monotherapy. J Am Acad Dermatol. 2006; 55: 1092-4.
 Arribillaga L, Echeverria L, Belsue V, et al. Bivalent therapeutic vaccine against HPV16/18 growtypes consisting of a fusion protein between the extra domain a fix with S-flucoroural cutarence 2029; 8: e00704.
 Guburn N, Kum R, Cutitard CC, et al. A Prime-Pull-Amplify Vaccination Intragenthelial CO8 + Homory T Cells. J Immunother Cancer. 2020; 8: e00704.
 Shandoval F, Sandoval F, Terne M, et al. Miccoal Imprinting of Vaccine-Induced CD8 + T Cells Is Crucial to Inhubit the Growth of Muccoal Tumor 2013; 5:1272-0.
 Dendaval F, Sandoval F, Carne M, et al. Maccoal Imprinting of Vaccine-Induced CD8 + T Cells Is Crucial to Inhubit the Growth of Muccoal Tumor 2013; 5:1272.
 Postow MA, Callahan MK, Wolchok JD. Immune Ched

2956
ARTICLE IN PRESS

Vaccine xxx (2017) xxx-xxx



In vivo electroporation enhances vaccine-mediated therapeutic control of human papilloma virus-associated tumors by the activation of multifunctional and effector memory CD8⁺ T cells

Natiely S. Sales, Jamile R. Silva, Luana R.M.M. Aps, Mariângela O. Silva, Bruna F.M.M. Porchia, Luís Carlos S. Ferreira * , Mariana O. Diniz 1

Vaccine Development Laboratory, Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history: Received 2 August 2017 Received in revised form 1 November 2017 Accepted 7 November 2017 Available online xxxx

Keywords: HPV-induced tumors DNA vaccine Therapeutic vaccine In vivo electroporation Cytotoxic T cells Tumor protection

ABSTRACT

In vivo electroporation (EP) has reignited the clinical interest on DNA vaccines as immunotherapeutic approaches to control different types of cancer. EP has been associated with increased immune response potency, but its capacity in influencing immunomodulation remains unclear. Here we evaluated the impact of *in vivo* EP on the induction of cellular immune responses and therapeutic effects of a DNA vaccine targeting human papillomavirus-induced tumors. Our results demonstrate that association of EP with the conventional intramuscular administration route promoted a more efficient activation of multifunctional and effector memory CD8⁺ T cells with enhanced cytotoxic activity. Furthermore, EP increased tumor infiltration of CD8⁺ T cells and avoided tumor recurrences. Finally, our results demonstrate that EP promotes local migration of antigen presenting cells that enhances with vaccine co-delivery. Altogether the present evidences shed further light on the *in vivo* electroporation action and its impact on the immunogenicity of DNA vaccines.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

DNA vaccines represent a simple and safe alternative to activate cellular and humoral immune responses [1,2]. Although these vaccines demonstrated insufficient immunogenicity in the first clinical studies, different strategies were established to increase their potency in humans, including codon usage optimization, incorporation of adjuvants and more efficient gene delivery methods [3 6]. In this context, in vivo electroporation (EP) employs electrical pulses that generate transient pores in the cell membrane and promote DNA displacement [7-10]. The greater transfection efficiency related to this technique was shown to increase 10 to 100-fold the amount of antigen produced after plasmid administration by the intramuscular or intradermal routes associated with EP [11-15]. EP also promotes the recruitment of pro-inflammatory cells to the inoculation site and induces the local secretion of cytokines and chemokines, which can amplify the vaccine-induced immune responses [16-18]. In vivo EP has been evaluated in clinical studies

* Corresponding author at: Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, São Paulo, SP 05508-000, Brazil.

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

¹ Present Address: Division of Infection and Immunity, University College London, 5 University St, Bloomsbury WC1E 6JF, London.

https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.11.011 0264-410X/© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved to deliver DNA vaccines against infections, such as those caused by HIV [19] and hepatitis C [20]. The immunization with *in vivo* EP has been well tolerated and its capacity to activate robust cellular immune responses has directed this vaccine delivery technology toward the search of therapeutic vaccines against different types of cancer, including prostate [21], melanoma (ClinicalTrials NCT00471133) and HPV-induced cervical tumors [22,23].

Cervical cancer is the fourth cause of cancer death among women worldwide [24]. Persistent infections with high-risk HPVs are the causative agent of nearly all cervical cancer cases and significant numbers of other anogenital and oropharyngeal tumors [25–27]. HPV-16 and 18 are the virus types most commonly related to cancer induction and are responsible for 50 and 35% of the cervical cancer cases, respectively [28]. The viral oncoproteins E6 and E7, which are constitutively expressed by the tumor cells, promote cell transformation and maintenance of the malignant state, and therefore, represent potential targets for the development of therapeutic vaccine formulations against HPV-associated tumors [29].

Recently, intramuscular (i.m.) immunization with *in vivo* electroporation has been employed to deliver DNA vaccines to patients with Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN 2 or 3) associated to HPV-16 or 18. In the GX-188E phase I study, seven out of nine

Please cite this article in press as: Sales NS et al. In vivo electroporation enhances vaccine-mediated therapeutic control of human papilloma virus-associated tumors by the activation of multifunctional and effector memory CD8* T cells. Vaccine (2017), https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.11.011 Cancer Immunology, Immunotherapy https://doi.org/10.1007/s00262-018-02297-2

ORIGINAL ARTICLE



Expression of a soluble IL-10 receptor enhances the therapeutic effects of a papillomavirus-associated antitumor vaccine in a murine model

Jamile R. Silva¹ · Natiely S. Sales¹ · Mariângela O. Silva¹ · Luana R. M. M. Aps¹ · Ana C. R. Moreno¹ · Elaine G. Rodrigues² · Luís C. S. Ferreira¹ · Mariana O. Diniz^{1,3}

Received: 22 May 2018 / Accepted: 28 December 2018 © Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

The presence of IL-10, produced either by tumor cells or immunosuppressive cells, is frequently associated with a poor prognosis for cancer progression. It may also negatively impact anticancer treatments, such as immunotherapies, that otherwise would promote the activation of cytotoxic T cells capable of detecting and destroying malignant cells. In the present study, we evaluated a new adjuvant approach for anticancer immunotherapy using a plasmid vector encoding a soluble form of the IL-10 receptor (pIL-10R), pIL-10R was coadministered to mice with a DNA vaccine encoding the type 16 human papillomavirus (HPV-16) E7 oncoprotein genetically fused with glycoprotein D of herpes simplex virus (HSV) (pgDE7h). Immunization regimens based on the coadministration of pIL-10R and pgDE7h enhanced the antitumor immunity elicited in mice injected with TC-1 cells, which express HPV-16 oncoproteins. The administration of the DNA vaccines by in vivo electroporation further enhanced the anticancer effects of the vaccines, leading to the activation of tumor-infiltrating polyfunctional E7-specific cytotoxic CD8⁺ T cells and control of the expansion of immunosuppressive cells. In addition, the combination of immunotherapy and pIL-10R allowed the control of tumors in more advanced growth stages that otherwise would not be treatable by the pgDE7h vaccine. In conclusion, the proposed treatment involving the expression of IL-10R enhanced the antitumor protective immunity induced by pgDE7h administration and may contribute to the development of more efficient clinical interventions against HPV-induced tumors.

Keywords Cancer · DNA vaccine · IL-10 · gDE7 · TC-1 cells · Cancer immunotherapy

| Abbreviations | | CEUA | Ethics Committee on the Use of Animals in |
|---|--|-------------|---|
| ATCC | American Type Culture Collection | | Experimentation |
| CAPES | Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior | c-Ha-Ras | v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog |
| | | CNPq | Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico |
| | | CONCEA | National Council for Control of Animal |
| Parts of the present study have been presented as a poster presentation at the 3rd International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB) workshop: Human papillomavirus and associated malignancies: biology, prevention and therapy. The poster was entitled " <i>In vivo</i> neutralization of IL-10 enhances the antitumor effects of a therapeutic vaccine to HPV-associated tumor", and the meeting was held in São Paulo, Brazil, on September 2nd, 2017. | | | Experimentation |
| | | E6 | Early protein 6 |
| | | E7 | Early protein 7 |
| | | EP | Electroporation |
| | | FAPESP | Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo |
| | | FSC | Forward scatter |
| Electronic supplementary material The online version of this article (https://doi.org/10.1007/s00262-018-02297-2) contains supplementary material, which is available to authorized users. | | gD | Glycoprotein D |
| | | ICGEB | International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology |
| Luís C. S. Ferreira lcsf@usp.br | | mAb PBMC | Monoclonal antibodies Peripheral blood mononuclear cell |
| Extended au | thor information available on the last page of the article | | |

Published online: 26 February 2019

D Springer



- Clarissa Leal Silva e Souza^a, Hellen Braga Martins Oliveira^{a,b},
- Manoel N. Santos Júnior^{a,b}, Mariângela de Oliveira Silva^{a,c},
- Igor Lopes Coqueiro^a, Ícaro Bonyek Santos da Silva^{a,d}, Guilherme Barreto Campos^{a,c},
- Robson Amaro Augusto da Silva^a, Telma de Jesus Soares^a,
- Márcio Vasconcelos de Oliveira^a, Jorge Timenetsky^c, Lucas Miranda Marques 💿 ^{a,b,c,*}
- ^a Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, BA, Brazil
- ^b Universidade Estadual de Santa Cruz, Bahia, BA, Brazil
- ^c Universidade de São Paulo, Brasil, Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo, SP, Brazil 11
- 12 Q1 ^d Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Muniz, Salvador, BA, Brazil

ARTICLE INFO 14 15

ABSTRACT

Article history 16

13

- Received 22 July 2020 17
- Accepted 9 October 2020 18 Available online xxx
- 19
- Keywords: 21
- Staphylococcus aureus 22
- Ovariectomy 23
- Pro-inflammatory cytokines 24
- Ovarian hormones

Objective: Staphylococcus aureus infections remain associated with considerable morbidity and mortality in both hospitals and the community. There is little information regarding the role of ovarian hormones in infections caused by S. aureus. The aim of this study was to evaluate the effects of ovariectomy in the immune response induced by S. aureus.

Methods: Female mice BALB/c were ovariectomized (OVX) to significantly reduce the level of ovarian hormones. We also used sham-operated animals. The mice were inoculated intraperitoneally with S. aureus. Blood samples were collected for leukocyte count and bacterial quantification. The uterus and spleen were removed and weighed to calculate the uterine and splenic indexes. Lungs were removed and fractionated for immunohistochemical analysis for macrophage detection (anti-CD68) and relative gene expression of IL-6, IL-1β and TNF- a by RT-PCR.

Results: Ovariectomy enlarged spleen size and generally increased circulating lymphocytes. OVX females experienced a continuation of the initial reduction of lymphocytes and a monocyte and neutrophil late response compared to shams (p \ge 0.05). Moreover, OVX females showed neutropenia after 168 h of infection (p \geq 0.05). Macrophage response in the lungs were less pronounced in OVX females in the initial hours of infection ($p \ge 0.01$). OVX females showed a higher relative gene expression of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in the lung at the beginning of the infection compared to sham females (p \ge 0.01). Among the uninfected females, the OVX control females showed a higher expression of IL-6 in the lung compared

Corresponding author at: Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, BA, Brazil. E-mail address: lucasm@ufba.br (L.M. Marques).

https://doi.org/10.1016/j.bjid.2020.10.004

1413-8670/© 2020 Published by Elsevier España, S.L.U. on behalf of Sociedade Brasileira de Infectologia. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Please cite this article in press as: Souza CL, et al. Ovarian hormones influence immune response to Staphylococcus aureus infection. Braz J Infect Dis. 2020. https://doi.org/10.1016/j.bjid.2020.10.004

ONCOLMMUNOLOGY 2021, VOL. 10, NO. 1, e1949896 (13 pages) https://doi.org/10.1080/2162402X.2021.1949896



ORIGINAL RESEARCH

OPEN ACCESS

A therapeutic DNA vaccine and gemcitabine act synergistically to eradicate HPVassociated tumors in a preclinical model

Jamile Ramos da Silva^a, Ana Carolina Ramos Moreno^a, Natiely Silva Sales^a, Mariângela de Oliveira Silva^a, Luana R. M. M. Aps^a, Bruna F.M.M. Porchia^{a,b}, Karine Bitencourt Rodrigues^a, Natália Cestari Moreno^{cd}, Aléxia Adrianne Venceslau-Carvalho^a, Carlos Frederico M. Menck^c, Mariana de Oliveira Diniz^{a,e}, and Luís Carlos de Souza Ferreiraª

^aVaccine Development Laboratory, Department of Microbiology, Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; ^bLaboratory of Tumor Immunology, Department of Immunology, Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; ^cDNA Repair Laboratory, Department of Microbiology, Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; ^cDNA Repair Laboratory, Department of Microbiology, Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; ^cDNA Repair Laboratory, Department of Microbiology, Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; ^cDNA Repair Laboratory, Department of Microbiology, Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; ^cDNA Repair Laboratory, Department of Microbiology, Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; ^cDNA Repair Laboratory, Department of Microbiology, Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; ^cDNA Repair Laboratory, Department of Microbiology, Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; ^cMitochondrial Genetics Lab. Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; "Division of Infection and Immunity, University College London, 5 University St, Bloomsbury, London, UK

ABSTRACT

Although active immunotherapies are effective strategies to induce activation of CD8⁺ T cells, advanced stage tumors require further improvements for efficient control. Concerning the burden of cancer-related to Human papillomavirus (HPV), particularly the high incidence and mortality of cervical cancer, our group developed an approach based on a DNA vaccine targeting the HPV-16 E7 oncoprotein (pgDE7h). This immunotherapy is capable of inducing an antitumour CD8⁺ T cell response but show only partial control of tumors in more advanced growth stages. Here, we combined a chemotherapeutic agent (gemcitabine-Gem) with pgDE7h to overcome immunosuppression and improve antitumour responses in a preclinical mouse tumor model. Our results demonstrated that administration of Gem had synergistic antitumor effects when combined with pgDE7h leading to eradication of both early-stages and established tumors. Overall, the antiproliferative effects of Gem observed in vitro and in vivo provided an optimal window for immunotherapy. In addition, the enhanced antitumour responses induced by the combined therapeutic regimen included enhanced frequencies of antigen-presenting cells (APCs), E7-specific IFN-y-producing CD8⁺ T cells, and cytotoxic CD8⁺ T cells and, concomitantly, less pronounced accumulation of immunosuppressive myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) and regulatory T cells (Tregs). These findings demonstrated that the combination of Gem and an active immunotherapy strategy show increased effectiveness, leading to a reduced need for multiple drug doses and, therefore, decreased deleterious side effects avoiding resistance and tumor relapses. Altogether, our results provide evidence for a new and feasible chemoimmunotherapeutic strategy that supports future clinical translation.



ARTICLE HISTORY Received 30 April 2021 Revised 24 June 2021 Accepted 24 June 2021

KEYWORDS Cancer; HPV-16; immunotherapy; chemotherapy; immunosuppression

CONTACT Luís Carlos de Souza Ferreira 😂 lcsf@usp.br 😋 Vaccine Development Laboratory, Department of Microbiology, Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, São Paulo - SP, São Paulo 05508-000, Brazil 🚯 Supplemental data for this article can be accessed on the publisher's website

MDSCs

our erradicatio

© 2021 The Author(s). Published with license by Taylor & Francis Group, LLC. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/), which permits

unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.