

**Natiely Silva Sales**

**Controle de tumores induzidos por HPV por imunoterapia baseada na associação de anticorpos monoclonais de bloqueio de vias imunossupressoras a uma vacina terapêutica capaz de ativar linfócitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro.

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira

Versão corrigida. Versão original encontra-se na unidade que aloja o Programa de Pós-Graduação.

São Paulo 2021

## RESUMO

SALES, N. S. **Controle de tumores induzidos por HPV por imunoterapia baseada na associação de anticorpos monoclonais de bloqueio de vias imunossupressoras e a uma vacina terapêutica capaz de ativar linfócitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos.** [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, 2021. 127 f.

O câncer cervical é um grave problema de saúde pública e representa o quarto tipo de câncer mais frequente em mulheres. As pacientes diagnosticadas com câncer cervical podem ser tratadas com cirurgia, radio e/ou quimioterapia, que apresentam eficiência reduzida em casos mais avançados da doença e, além disto, estão associados à indução de efeitos adversos severos. Estudos buscam desenvolver novas terapias contra câncer associado à infecção por HPV, como a combinação de estratégias quimioterápicas e imunoterapêuticas que atuam em diferentes mecanismos (morte celular, imunossupressão, indução de resposta antígeno-específica). Nesse sentido, nosso grupo desenvolveu uma vacina de DNA contra tumores induzidos por HPV baseada na expressão de uma proteína híbrida resultado da fusão gênica da glicoproteína D (gD) do HSV-1 à oncoproteína E7 do HPV-16 (pgDE7h). O objetivo desse trabalho foi avaliar a eficácia antitumoral de estratégias imunoterapêuticas baseadas na combinação da vacina pgDE7h e anticorpos monoclonais (mAb) de bloqueio de *checkpoint* (anti-PD-1, anti-PD-L1 e anti-CTLA-4), ou a combinação da vacina pgDE7h com aptâmeros antagonistas das moléculas PD-1 e PD-L1 (aptPD-1 e aptPD-L1), frente ao modelo experimental baseado no implante de células da linhagem TC-1, capaz de expressar as oncoproteínas E6 e E7 do HPV-16. A associação de pgDE7h com os mAbs anti-PD-1 ou com anti-PD-L1 foi capaz de promover resposta terapêutica parcial. No entanto, ao combinarmos ambos os mAbs anti-PD-1 e anti-PD-L1 com a vacina pgDE7h não observamos aumento adicional da resposta antitumoral. Por outro lado, a associação da vacina pgDE7h com o mAb anti-CTLA-4 foi capaz de promover um aumento da resposta terapêutica antitumoral e sobrevivência dos animais observados em relação aos animais que receberam apenas um dos tratamentos. Em relação à combinação de pgDE7h e o aptPD-L1, observamos resposta terapêutica antitumoral prejudicada, porém, quando associamos a vacina ao aptPD-1, notamos um aumento discreto da resposta antitumoral. Em resumo, esses dados obtidos durante a presente tese demonstram que a associação de pgDE7h e o mAb anti-CTLA-4 mostra-se como uma estratégia terapêutica promissora contra tumores induzidos por HPV.

**Palavras-chaves:** Câncer cervical, imunoterapia, vacinas de DNA, anti-PD-L1, anti-PD-1, anti-CTLA-4 mAbs, aptâmeros.

## ABSTRACT

SALES, N. S. **Control of HPV-induced tumours by immunotherapy based on the association of monoclonal antibodies blocking immunosuppressive pathways and a therapeutic vaccine capable of activating cytotoxic CD8<sup>+</sup> T lymphocytes.** [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, 2021. 127 p.

Cervical cancer is a serious public health problem and represents the fourth most common type of cancer in women. Patients diagnosed with cervical cancer may be treated with surgery, radio and/or chemotherapy, which have reduced efficiency in more advanced cases of the disease and, in addition, are associated with the induction of severe adverse effects. Studies seek to develop new therapies against cancer associated with HPV infection, such as the combination of chemotherapy and immunotherapeutic strategies that act on different mechanisms (cell death, immunosuppression, induction of an antigen-specific response). In this sense, our group developed a DNA vaccine against HPV-induced tumours based on the expression of a hybrid protein resulting from the fusion of genes encoding the glycoprotein D (gD) of HSV-1 and the oncoprotein E7 of HPV-16 (pgDE7h). The aim of this work was to evaluate the antitumor efficacy of the immunotherapeutic strategies based on the combination of the pgDE7h vaccine and checkpoint blocking monoclonal antibodies (mAb) (anti-PD-1, anti-PD-L1 and anti-CTLA-4), or the combination of the pgDE7h vaccine with antagonist aptamers of the PD-1 and PD-L1 molecules (aptPD-1 and aptPD-L1), using the experimental model based on the implantation of TC-1 cell lineage, capable of expressing the E6 and E7 oncoproteins of the HPV-16. The association of pgDE7h with anti-PD-1 or anti-PD-L1 mAbs was capable to promote a partial therapeutic protective response. However, when we combined both anti-PD-1 and anti-PD-L1 mAbs with the pgDE7h vaccine, we did not observe further increase in the antitumor responses. On the other hand, the association of the pgDE7h vaccine with the anti-CTLA-4 mAb promoted an increase in the antitumor therapeutic response and survival of the animals in relation to animals that received only one of the treatments. Regarding the combination of pgDE7h and aptPD-L1, we observed an impaired antitumor therapeutic response, however, when we combined the vaccine with aptPD-1, we noticed a slight increase in the antitumor response. In summary, these data obtained during the present thesis demonstrate that the association of pgDE7h and the anti-CTLA-4 mAb shows itself as a promising therapeutic strategy against HPV-induced tumours.

**Key words:** Cervical cancer, immunotherapy, DNA vaccines, anti-PD-L1, anti-PD-1 and anti-CTLA-4 mAb, aptamers.



## 1. INTRODUÇÃO

Tumores associados ao papilomavírus humano (HPV) representam um grande problema de saúde pública que perdura décadas. Especificamente, o câncer cervical representa o quarto tipo de câncer mais comum em mulheres no mundo (Bray et al., 2018; Jayshree, R.S., 2021). De acordo com os dados divulgados pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), tais tumores representam a quarta causa de mortes por câncer em mulheres no Brasil. Em 2020, foram reportados 16.590 novos casos deste tipo de câncer no Brasil e 6.596 óbitos no ano de 2019 (INCA, 2021). Estudos prévios mostram que todos casos de câncer de colo de útero estão associados a infecções persistentes pelo vírus do papiloma humano com potencial oncogênico (Parkin et al., 2005; Zhou et al., 2019).

O papilomavírus, pertencente à família *Papillomaviridae*, é um vírus não envelopado, de DNA circular dupla fita, e com simetria icosaédrica (Doorbar et al., 2016; Estevão et al., 2019; Jayshree, R.S., 2021). Os papilomavírus apresentam alta heterogeneidade e mais de 300 genótipos foram identificados. Aproximadamente 200 deles são capazes de infectar humanos e apresentam tropismo por diferentes sítios anatômicos sendo categorizados em 5 grandes grupos: alfa, beta, gama, mu e nu-papilomavírus (Serrano et al., 2018; Estevão et al., 2019; Doorbar et al., 2019). O grupo alfa-papilomavírus está diretamente relacionado aos casos de tumores anogenitais e podem causar câncer em diversos sítios anatômicos, como: colo de útero, anal, pênis, vulva e vagina (Brianti et al., 2017; Zhou et al., 2019). De acordo com a capacidade de causar câncer, esses vírus foram divididos em dois grupos: os de baixo risco (HPV-6 e 11), principais causadores de verrugas genitais e lesões benignas, e os de alto risco (HPV-16 e 18), principais causadores de lesões celulares de alto grau e câncer (Van Doorslaer, 2013; Zhou et al., 2019).

O genoma dos HPV é composto por aproximadamente 8.000 pares de bases, que formam 8 a 9 regiões de “fase de leitura aberta” (ORF, do inglês Open Reading Frame), incluindo os genes de expressão tardia (L, do inglês late) e os genes de expressão precoce (E, do inglês early). (Serrano et al., 2018; Hoppe-Seyler et al., 2018; Zhou e Rossi, 2019). Genes expressos tardiamente codificam as proteínas virais L1 e L2, produzidas durante estágios mais tardios da infecção celular. Essas proteínas são responsáveis pela formação do capsídeo viral e, portanto, permitem a entrada do vírus na célula (Doorbar et al., 2015; Zhou e Rossi, 2019; Estevão et al., 2019). Em contraste, genes precoces codificam a expressão das proteínas E1, E2, E4, E5, E6 e E7, que possuem importantes funções na replicação viral, interferência no

ciclo celular, liberação de partículas virais e evasão do sistema imune (Doorbar et al., 2015; Zhou e Rossi, 2019; Estevão et al., 2019).

Especificamente, as proteínas E6 e E7 interagem com diversas proteínas celulares, contribuindo para o processo de malignização celular. Entre outras ações já descritas, a proteína E7 interage com a proteína pRb liberando o fator de transcrição E2F, e a proteína E6 promove a degradação de p53, promovendo proliferação celular e bloqueio de apoptose, respectivamente (WERNES; LEVINE; HOWLEY, 1990). As oncoproteínas virais E6 e E7 são constitutivamente expressas em células de carcinoma cervical e estão relacionadas à transformação celular e manutenção deste estado. Portanto, essas proteínas representam alvos importantes para o desenvolvimento de imunoterapias contra tumores relacionados ao HPV (Frazer, 2004; Hoop-Seyler et al., 2018).

Visando evitar a infecção viral, e conseqüentemente a ocorrência do câncer em longo prazo, foram desenvolvidas vacinas preventivas para os HPV. A proteína L1, sozinha ou associada à L2, forma partículas que se assemelham ao vírus, conhecidas como VLPs (do inglês Viral-Like Particles) (Kirnbauer et al., 1992; De Villiers et al., 2004; Pils e Joura, 2015). As VLPs mostraram-se altamente imunogênicas e induzem respostas de anticorpos neutralizantes capazes de evitar infecções pelo vírus em humanos (Brown et al., 2001). Atualmente, temos 3 vacinas profiláticas disponíveis e licenciadas para uso em humanos: Cervarix<sup>®</sup>, uma vacina bivalente contra os tipos virais HPV-16 e 18, produzida pela GlaxoSmithKline (GSK, Filadélfia, PA, USA); a vacina Gardasil<sup>®</sup> quadrivalente compreende VLPs dos tipos virais de HPV (-6, HPV-11, HPV-16 e -18) - (Merck & CO. Whitehouse Station, NJ, USA), e a Gardasil<sup>®</sup> nonavalente que abrange 9 tipos virais de HPV (6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58). Essas vacinas são compostas pela proteína L1 do capsídeo viral, induzem a produção de anticorpos neutralizantes e conferem proteção contra a infecção pelos tipos virais cobertos pela vacina. Entretanto, as vacinas profiláticas não protegem indivíduos com tumores associados a HPV, uma vez que as proteínas do capsídeo não são expressas por células transformadas pela presença do HPV integrado ao genoma das células epiteliais (Frazer, 2004; Pils e Joura, 2015). Além disso, o custo elevado e a dificuldade de acesso a populações de baixa renda têm impedido a distribuição em larga escala, particularmente em países como o Brasil, o que seria necessário para que o número de casos de câncer de colo de útero fosse impactado em um período de tempo que varia entre 5 a 20 anos após a administração das vacinas (Lin et al., 2010). Portanto, torna-se necessário o desenvolvimento de abordagens terapêuticas contra lesões estabelecidas ou câncer.

O tratamento de tumores induzidos por HPV atualmente disponíveis na clínica envolvem cirurgia, radioterapia e quimioterapia, correspondendo a intervenções invasivas, agressivas e que não agem especificamente sobre as células tumorais. Apesar de representarem estratégias terapêuticas importantes para a redução da mortalidade associada à doença, esses tratamentos podem induzir efeitos adversos graves, permitem recidivas, e não apresentam boa eficácia no controle de tumores em estágios avançados (Kenter et al., 2009). Conseqüentemente, essas evidências reforçam a necessidade de se buscar por novas abordagens terapêuticas capazes de induzir efeitos colaterais menos agressivos e, se possível, induzir respostas imunológicas voltadas para o tumor de forma a impedir recidivas pós-tratamento (da Silva Cordeiro, et al., 2014).

Nos últimos anos, importantes avanços no tratamento de diferentes tipos de câncer foram alcançados por meio do desenvolvimento de imunoterapias antitumorais. A imunoterapia vem se tornando um adjuvante eficiente, e representa uma ferramenta importante no tratamento de diversos tumores, inclusive em tumores em estágio avançado. Abordagens imunoterapêuticas são capazes de aumentar resposta imune contra o câncer, e pode ser feita por diferentes abordagens (Naumann et al., 2020). Especificamente, para o tratamento de tumores associados ao HPV, atualmente diversos tipos de imunoterapias encontram-se em estudo, tais como: vacinas terapêuticas baseadas em diferentes plataformas (DNA, RNA, peptídeos, proteínas, vetores vacinais) e associadas a diferentes adjuvantes. Além disso, outra alternativa interessante são as terapias baseadas na transferência adotiva de células, dentre essas abordagens, destaca-se a estratégia denominada “CAR T cells”, receptor de antígeno quimérico. Essa abordagem utiliza linfócitos T modificados *in vitro*, expressando fragmento variável de cadeia curta do inglês *single-chain fragmente variable* (scfv) ou outras moléculas coestimulatórias, que são capazes de reconhecer antígenos tumorais (Fakhr et al., 2021).

Entre as estratégias imunoterapêuticas voltadas ao controle de câncer, destacam-se os tratamentos com anticorpos monoclonais, sobretudo aqueles que têm como alvo moléculas envolvidas na regulação de respostas imunológicas (*checkpoints*). Particularmente, o bloqueio de vias inibitórias de ativação de células T, como o antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico (CTLA-4), o programador celular de morte 1 (PD-1) e o ligante do programador de morte 1 (PDL-1) (Ott; Hodi; Robert, 2013), tem demonstrado capacidade em potencializar a resposta imune celular e aumentar o tempo de sobrevida de pacientes em alguns tipos de câncer (O’day; Hamid; Urba, 2007).

O receptor CTLA-4 é encontrado em células T CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> ativadas, e também em células T regulatórias. (Collins et al, 2002; Kvistborg et al, 2014). Esse receptor atua como regulador negativo em linfócitos T ativados por vários mecanismos, incluindo a competição com o CD28 pela ligação ao B7 em células apresentadoras de antígenos (APCs), promovendo o bloqueio de células T (Chikuma, 2016; Bour-Jordan et al, 2011; Qureshi et al, 2011; Schneider et al, 2006). Após a descoberta do papel do CTLA-4 na regulação negativa do sistema imune, esse receptor tornou-se um alvo importante no estudo da imunidade antitumoral (Mansh, 2011; Van Elsas; Huvitz; Allison, 1999; Leach; Krummel; Allison, 1996). Em pacientes com melanoma avançado tratados com anti-CTLA-4 foi observado aumento de atividade antitumoral e aumento de sobrevida (Robert et al, 2011; Hodi et al, 2010).

O receptor PD-1 ou programador celular de morte 1, é expresso durante a fase de ativação de células T regulando de forma negativa a resposta imune efetora. Esse regulador interage com dois receptores denominados PDL-1 e PDL-2 (Keir et al, 2006; Freeman et al, 2000; Ishida et al, 1992). Trabalhos demonstram que o bloqueio da interação do PD-1 com seu ligante, PDL-1, pode aumentar a ativação de células T CD8<sup>+</sup> antígenos-específicas no microambiente tumoral (Nomi et al, 2007; Hamanishi et al, 2007; Konishi et al, 2004), promover uma diminuição na frequência de células T regulatórias no modelo de desafio tumoral com células TC-1 (Mkrtichyan et al, 2011) e induzir respostas celulares de memória imunológica (Postow et al, 2015). Em modelo animal, foi possível observar o aumento do efeito antitumoral e ativação de células antígeno-específica no tumor, quando bloqueadores de PD-1 foram associados a uma vacina voltada para o controle de em carcinoma hepático (Sawada et al, 2015). Além disto, o uso de bloqueadores da interação PD-1/PDL-1 também promoveu efeito antitumoral em pacientes com melanoma, cânceres hematológicos, além de outros tipos de câncer, atualmente em estudos de fase clínica 1 (Topalian et al, 2012; Brahmer et al, 2012; Berger et al, 2008).

Diante dos resultados animadores com o uso de anticorpos monoclonais, eles se tornaram terapias bastante promissoras no tratamento de tumores, incluindo aqueles em estágio avançado. No contexto de tumores induzidos por HPV, atualmente, diversos estudos estão sendo realizados, combinados ou não a outras terapias (**Tabela 1**).



**Tabela 1:** Estudos clínicos utilizando anticorpos monoclonais bloqueadores de checkpoints para o tratamento de tumores induzidos por HPV.

Agente Terapêutico	Tipo	Fase clínica
Nivolumabe	anti-PD-1	II
Nivolumabe/cisplatina/radioterapia	anti-PD-1 e quimioterapia	I/II*
Pembrolizumabe	anti-PD-1	II*
Pembrolizumabe/paclitaxel/cisplatina/carboplatina/bevacizumabe	anti-PD-1/ quimioterapia e agentes angiogênicos	III*
Durvalamabe	anti-PD-L1/ imunoterapia celular	II
M7824	anticorpo bifuncional anti- TGF- $\beta$ e PD-L1	II*
Tezolimumabe/cisplatina/paclitaxel/bevacizumabe	anti-PD-L1 /quimioterapia e agentes angiogênicos	III*
Impilimumabe	anti-CTLA-4	II*
Ipilimumabe/nivolumabe/radioterapia	anti-CTLA-4 /anti-PD-1	II
Tremelimumabe/durvalamabe/vinorelbina	anti-CTLA-4 /anti-PD-L1 /quimioterapia	I/II

\*estudos clínicos não finalizados. Adaptado de Fakhr et al., 2021

Atualmente diferentes mAbs estão disponíveis para comercialização após estudos pré-clínicos e clínicos para investigar seus benefícios terapêuticos (Gravbrot et al., 2019; Naumann et al., 2020; Zhang et al., 2021). Especificamente, para o tratamento de câncer cervical recorrente ou metastático encontram-se disponíveis mAbs direcionados aos domínios extracelulares dos receptores da tirosina quinase (receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e receptor do fator de crescimento semelhante à insulina (IGFR), denominado bevacizumabe (Tewari et al., 2017). Recentemente, o pembrolizumabe foi aprovado pelo United States Food and Drug Administration (US FDA) para pacientes com câncer cervical recorrente ou metastático, ou após quimioterapia para tumores que expressam PD-L1. Os inibidores de checkpoint apresentam alto potencial terapêutico como demonstrado em vários estudos clínicos, além disso, podem ser combinados a outras terapias na busca de um tratamento efetivo no controle de tumores associados ao HPV (Fakhr et al., 2021). Dessa forma, a combinação de inibidores de checkpoints a estratégias antígeno-específicas podem ser uma alternativa eficiente no tratamento desses tumores.

As oncoproteínas E6 e E7 são as únicas proteínas expressas em células transformadas após infecção por HPV de alto risco, e estão diretamente relacionadas com o processo de carcinogênese. Desta forma, tornam-se potenciais alvos para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas voltadas para o tratamento de tumores causados pelo vírus. Dentre as novas abordagens terapêuticas em estudo para o tratamento de tumores induzidos por HPV, destacam-se vacinas que levem à ativação de resposta celular citotóxica, mediadas por

linfócitos T CD8+, capazes de promover o reconhecimento e a destruição das células tumorais que expressam as oncoproteínas E6 e E7 (Frazer, 2004; Lin et al., 2010). Desta forma, tais estratégias ampliam a perspectiva de aplicação da vacina permitindo sua utilização por pessoas previamente infectadas por HPV, ou mesmo por pessoas portadoras de lesões pré-malignas ou tumores em diferentes estágios de crescimento (Wu, 2007).

Vários estudos clínicos com vacinas terapêuticas voltadas para o tratamento de tumores induzidos por HPV estão sendo conduzidos, ou foram finalizados. A **tabela 2** apresenta estratégias vacinais terapêuticas baseadas em diferentes plataformas como vetores virais, peptídeo, proteínas, RNA e DNA; com ou sem associação a outras terapias adjuvantes como: quimioterapia, imunomoduladores (imi-quimode), plasmídeo codificando citocinas, e anticorpos monoclonais de bloqueio de checkpoint (anti-PD-1, anti-PD-L1, anti-TGF- $\beta$ ), ou inibidores de angiogênese.

**Tabela 2:** Estudos clínicos utilizando diferentes plataformas vacinais terapêuticas voltadas para o tratamento de tumores induzidos por HPV.

Estratégia terapêutica	Plataforma	Antígeno-alvo	Fase clínica
ADSX11-001/ 5-fluourouracil mitomicina	vetor bacteriano/ quimioterapia	E7 (HPV-16)	I/II
ADSX11-001/durvalamabe	vetor bacteriano/anti-PD-L1	E7 (HPV-16)	I/II
ADSX11-001	vetor bacteriano	E7(HPV-16)	III
TA-HPV /pNGVL4a-Sig/E7 (detoxificada)/HSP70 /imi-quimod	vetor viral/vacina de DNA/imunomodulador	E6/E7 (HPV-16/18)	I *
TG4001/avelumab	vetor viral/ quimioterapia	E6/E7 (HPV-16)	I/II *
PRGN-2009 /M7824	vetor viral/anticorpo bifuncional TGF- $\beta$ e anti-PD-L1	E6/E7 (HPV-16)	I/II*
peptídeo sintético E6 e E7	vacina de peptídeo	E6/E7 (HPV-16)	I
ISA101/carboplatina /paclitaxel/bevacizumabe	vacina de peptídeo/quimioterapia/ antiangiogênico	E6/E7 (HPV-16)	I/II
ISA101/Nivolumabe	vacina de peptídeo/anti-PD-1	E6/E7 (HPV-16)	II
TA-CIN	vacina de proteína	L2/E6/E7 (HPV-16)	I*
TVGV	vacina proteína	E7 (HPV-16)	II
Vvax 001	vacina de RNA replicante	E6/E7 (HPV-16)	I
pnGVL4a-CRT/E7 (detoxificada)/ciclofosfamida	vacina de DNA/quimioterapia	E7 (HPV-16)	I
pnGVL4a-CRT/E7 (detoxificada)	vacina de DNA	E7 (HPV-16)	I
GX188E	vacina de DNA	E6/E7 (HPV-16)	II

		16/18)	
GX-118E/GX-I7/imiquimode	vacina de DNA/IL-7 /imunomodulador	E6/E7 (HPV-16/18)	II
VB10.16	vacina de DNA	E6 (HPV-16)	I/II
VGX-3100 /INO-9012	vacina de DNA/vacina de DNA expressando IL-2	E6/E7 (HPV-16/18)	I/IIa
VGX-3100 /placebo	vacina de DNA	E6/E7 (HPV-16/18)	III

\*estudos clínicos não finalizados. Adaptada de Fakhr et al., 2021

Entre as vacinas terapêuticas, formulações vacinais que empregam DNA plasmidial representam uma estratégia em potencial na indução de resposta imune antígeno-específica (Donnelly; Wahren; Liu, 2005). Essa abordagem vacinal apresenta várias vantagens em relação às vacinas tradicionais baseadas em vetores vivos, pois são seguras, estáveis, de fácil fabricação em larga escala e capacidade de induzir respostas imunológicas celulares (Trimble et al., 2003).

Em relação às vacinas de DNA contra tumores induzidos por HPV, plasmídeos que codificam apenas as oncoproteínas de HPV apresentam baixa imunogenicidade, exigindo o desenvolvimento de abordagens capazes de intensificar a ativação de células T CD8<sup>+</sup> antígeno-específicas. Para tal finalidade, diversas estratégias foram empregadas, como a fusão com genes que codificam proteínas imunogênicas e carregadores, otimização de códons, administração de adjuvantes e a busca de métodos de entrega mais eficientes capazes de transfectar um maior número de células ou direcionar o DNA plasmidial para APCs (Kutzler; Weiner, 2008; Trimble et al., 2003). A utilização de abordagens como as acima mencionadas, permitiu a indução de respostas mediadas por células T CD8<sup>+</sup> funcionais específicas contra epítomos de E6 e E7 e capazes de conferir algum grau de proteção terapêutica a desafios com células tumorais transformadas pelo HPV-16 (Chen et al., 2000).

No Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas (LDV) foi desenvolvida uma formulação vacinal terapêutica contra tumores induzidos por HPV baseada na expressão de E7 de HPV-16 fusionada à glicoproteína D (gD) do HSV-1 (Lasaro et al., 2005). Nessa construção vacinal, a proteína gD confere um efeito 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-κB (Sciortino et al., 2008) ou, de modo indiretamente, pelo bloqueio da ligação de BTLA e

CD160 a este receptor que resultaria em sinais co-inibidores (Steinberg; Cheung; Ware, 2011).

Em modelo murino, essa vacina mostrou-se capaz de ativar células T CD8<sup>+</sup> E7-específicas e gerar proteção antitumoral terapêutica em 40% dos camundongos tratados após implante da linhagem tumoral TC-1, que expressa as proteínas E6 e E7 do HPV-16. Visando potencializar a formulação vacinal desenvolvida, algumas estratégias foram testadas como a otimização dos códons que codificam a proteína híbrida, a co-administração de plasmídeos que codificam citocinas e a imunização pela via intradérmica utilizando a biobalística (*gene gun*) resultando, em todos os casos, em um aumento expressivo do efeito terapêutico antitumoral (Diniz et al., 2010, Diniz; Ferreira, 2011 e dados não publicados). Durante a execução do projeto de mestrado da aluna, foi utilizado o método de eletroporação *in vivo* para a entrega da vacina, apresentando aumento marcante da eficácia no controle de tumores em modelo murino (Sales et al., 2017).

Em relação ao desenvolvimento de novas terapias voltadas ao combate de diversos tipos de câncer, a combinação de estratégias quimioterápicas e imunoterapêuticas, que atuam em diferentes mecanismos (morte celular, imunossupressão, indução de respostas imunológicas antígeno-específica), representa uma tendência na área. Nessa linha de associação de terapias, a associação do mAb anti-PD-1 com o quimioterápico ciclofosfamida e uma vacina antitumoral levou a maior eficácia no tratamento de tumores que expressam as oncoproteínas do HPV-16 em modelo murino (Mkrtichyan et al, 2011). Em outro estudo, células dendríticas (DCs) expressando os antígenos E6 e E7 de HPV-16 fusionados à sequência do anticorpo anti-PD-1 foram utilizados para ativar linfócitos T CD8<sup>+</sup> (Garci-Bates et al, 2016). Posteriormente, esses linfócitos foram incubados com células de carcinoma de cabeça e pescoço induzidos por HPV-16 e levaram a um maior efeito antitumoral pelo aumento da atividade citotóxica (Garci-Bates et al, 2016).

Uma abordagem alternativa que pode ser aplicada ao bloqueio de moléculas relacionadas a vias inibitórias são aptâmeros (apt) que consistem de pequenas moléculas de DNA ou RNA, com capacidade de formar estruturas tridimensionais com alta afinidade e especificidade para um ligante alvo (Baird, 2010; Flanagan et al., 2021; Zhou & Rossi, 2017). Os aptâmeros foram mencionados pela primeira vez há mais de 30 anos (Ellington & Szostak, 1990; Tuerk & Gold, 1990), e desde então, essa estratégia passou por várias otimizações, tornando o processo mais eficiente e com menor custo, viabilizando sua aplicação em

pesquisa e diagnóstico. Além disso, aptâmeros também têm sido utilizados como terapias contra diversos tipos de doenças, inclusive câncer. Tais abordagens apresentam resultados satisfatórios e, em alguns casos, superiores aos tratamentos com mAbs (Huang et al., 2017; Prodeus et al., 2015; Zhou & Rossi, 2017; Darmostuk et al., 2015).

Em um estudo pré-clínico, animais tratados com aptâmero antagonista de CTLA-4 apresentaram redução do volume tumoral, aumento da quantidade de células T CD8<sup>+</sup> infiltradas no tumor e, conseqüentemente, maior eficácia do tratamento (Huang et al., 2017). Em outro trabalho, animais desafiados com células de carcinoma de cólon, e tratados com um aptâmero antagonista do receptor PD-1 apresentaram inibição da supressão da citocina IL-2 e diminuição de nódulos tumorais (Prodeus et al., 2015). Dessa forma, a utilização dos aptâmeros surge como uma ferramenta alternativa ao uso de mAbs preservando a alta especificidade e capacidade de penetração nos tecidos. Além disso, aptâmetros apresentam baixos efeitos colaterais em relação a mAbs, são de fácil fabricação, apresentam baixa imunogenicidade (Keefe et al., 2010; Prodeus et al., 2015), melhor especificidade e alta afinidade pela molécula alvo (Mayer et al., 2010; Wu et al., 2017).

Tendo em vista as diferentes abordagens terapêuticas apresentadas anteriormente e os efeitos promissores de consórcios terapêuticos para o tratamento de tumores, antitumorais, em particular o tratamento de tumores induzidos por HPV, a presente tese de doutoramento propôs conduzir estudos baseados em uma vacina de DNA, desenvolvida previamente no Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas da USP, combinada ao uso de mAbs e aptâmeros voltados para o bloqueio de checkpoints imunológicos específicos.



#### 4. CONCLUSÃO

O presente estudo explorou o potencial de utilização de uma imunoterapia ativa combinada a estratégias de imunoterapia passiva para o controle de tumores induzidos por HPV em condições experimentais. Por meio da combinação de uma vacina genética (pgDE7h) e mAbs ou aptâmeros voltados para a inibição de “checkpoints” imunológicos (anti-PD1, anti-PDL-1, anti-CTLA-4) avaliamos possíveis efeitos de sinergismo terapêutico em camundongos transplantados com a linhagem TC-1. Parte dos resultados obtidos revelaram diferenças em relação ao observado por outros grupos ao não confirmar efeitos antitumorais sinérgicos ou aditivos, algo que pode ser atribuído à estratégia vacinal utilizada ou à natureza dos animais utilizados nos experimentos. No entanto, resultados promissores foram observados quando a vacina de DNA foi aplicada em combinação com o mAb anti-CTLA-4. Estudos subsequentes devem ser conduzidos para a confirmação de efeitos sinérgicos e os mecanismos de imunomodulação observados com a associação da vacina genética pgDE7h e os mAbs anti-CTLA-4.

---

## **REFERÊNCIAS\***

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



## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BADOUAL, Cécile et al. PD-1–expressing tumor-infiltrating T cells are a favorable prognostic biomarker in HPV-associated head and neck cancer. **Cancer research**, v. 73, n. 1, p. 128-138, 2013.
2. BAIRD, Nathan J.; FERRÉ-D'AMARÉ, Adrian R. Idiosyncratically tuned switching behavior of riboswitch aptamer domains revealed by comparative small-angle X-ray scattering analysis. **Rna**, v. 16, n. 3, p. 598-609, 2010.
3. BARDHAN, Kankana; ANAGNOSTOU, Theodora; BOUSSIOTIS, Vassiliki A. The PD1: PD-L1/2 pathway from discovery to clinical implementation. **Frontiers in immunology**, v. 7, p. 550, 2016.
4. BERGER, Raanan et al. Phase I safety and pharmacokinetic study of CT-011, a humanized antibody interacting with PD-1, in patients with advanced hematologic malignancies. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 10, p. 3044-3051, 2008.
5. BLANK, Christian; MACKENSEN, Andreas. Contribution of the PD-L1/PD-1 pathway to T-cell exhaustion: an update on implications for chronic infections and tumor evasion. **Cancer immunology, immunotherapy**, v. 56, n. 5, p. 739-745, 2007.
6. BOUR-JORDAN, Hélène et al. Intrinsic and extrinsic control of peripheral T-cell tolerance by costimulatory molecules of the CD28/B7 family. **Immunological reviews**, v. 241, n. 1, p. 180-205, 2011.
7. BRADBURY, Penelope A. et al. A rapid outcomes ascertainment system improves the quality of prognostic and pharmacogenetic outcomes from observational studies. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 17, n. 1, p. 204-211, 2008.
8. BRAHMER, Julie R. et al. Safety and activity of anti–PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 26, p. 2455-2465, 2012.
9. BRAY, Freddie et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.

10. BRIANTI, Pina; DE FLAMMINEIS, Eduardo; MERCURI, Santo Raffaele. Review of HPV-related diseases and cancers. **New Microbiol**, v. 40, n. 2, p. 80-85, 2017.
11. CEPPI, Francesco et al. Safety and efficacy of intrathecal rituximab in children with B cell lymphoid CD20+ malignancies: an international retrospective study. **American journal of hematology**, v. 91, n. 5, p. 486-491, 2016.
12. CHEN, Chien-Hung et al. Enhancement of DNA vaccine potency by linkage of antigen gene to an HSP70 gene. **Cancer research**, v. 60, n. 4, p. 1035-1042, 2000.
13. CHIKUMA, Shunsuke. Basics of PD-1 in self-tolerance, infection, and cancer immunity. **International journal of clinical oncology**, v. 21, n. 3, p. 448-455, 2016.
14. CHUNG HC, Ros W, Delord JP, et al. Efficacy and safety of pembrolizumab in previously treated advanced cervical cancer: Results from the phase II KEYNOTE-158 study. **J Clin Oncol**. 2019; 37: 1470–8.
15. COLLINS, Alison V. et al. The interaction properties of costimulatory molecules revisited. **Immunity**, v. 17, n. 2, p. 201-210, 2002.
16. CURRAN, Michael A. et al. PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 9, p. 4275-4280, 2010.
17. DA SILVA CORDEIRO, Maria Lúcia et al. Anticorpos monoclonais: implicações terapêuticas no câncer. **Revista Saúde & Ciência Online**, v. 3, n. 3, p. 253-265, 2014
18. DARMOSTUK, Mariia et al. Current approaches in SELEX: An update to aptamer selection technology. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 6, p. 1141-1161, 2015.
19. DAVAR, Diwakar et al. Fecal microbiota transplant overcomes resistance to anti-PD-1 therapy in melanoma patients. **Science**, v. 371, n. 6529, p. 595-602, 2021.
20. DEROSA, Lisa et al. Microbiota-Centered Interventions: The Next Breakthrough in Immuno-Oncology?. **Cancer Discovery**, 2021.
21. DINIZ, M. O.; FERREIRA, L. C. S. Enhanced anti-tumor effect of a gene gun-delivered DNA vaccine encoding the human papillomavirus type 16 oncoproteins

- genetically fused to the herpes simplex virus glycoprotein D. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, p. 421-427, 2011.
22. DINIZ, Mariana O. et al. Enhanced therapeutic effects conferred by an experimental DNA vaccine targeting human papillomavirus-induced tumors. **Human gene therapy**, v. 24, n. 10, p. 861-870, 2013.
  23. DINIZ, Mariana O. et al. Immune responses and therapeutic antitumor effects of an experimental DNA vaccine encoding human papillomavirus type 16 oncoproteins genetically fused to herpesvirus glycoprotein D. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, n. 10, p. 1576-1583, 2010.
  24. DONNELLY, John J.; WAHREN, Britta; LIU, Margaret A. DNA vaccines: progress and challenges. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 2, p. 633-639, 2005.
  25. DOORBAR, John et al. Human papillomavirus molecular biology and disease association. **Reviews in medical virology**, v. 25, p. 2-23, 2015.
  26. EGEN, Jackson G.; KUHNS, Michael S.; ALLISON, James P. CTLA-4: new insights into its biological function and use in tumor immunotherapy. **Nature immunology**, v. 3, n. 7, p. 611-618, 2002.
  27. ELLINGTON, Andrew D.; SZOSTAK, Jack W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. **nature**, v. 346, n. 6287, p. 818-822, 1990.
  28. ESTÊVÃO, Diogo et al. Hallmarks of HPV carcinogenesis: The role of E6, E7 and E5 oncoproteins in cellular malignancy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1862, n. 2, p. 153-162, 2019.
  29. FAKHR, Elham; MODIC, Živa; CID-ARREGUI, Angel. Recent developments in immunotherapy of cancers caused by human papillomaviruses. **Immunology**, v. 163, n. 1, p. 33-45, 2021.
  30. FELTKAMP, Mariet CW et al. 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, 1993.
  31. FINLAY, B. Brett et al. Can we harness the microbiota to enhance the efficacy of cancer immunotherapy?. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 9, p. 522-528, 2020.

32. FLANAGAN, Shane Patrick et al. Nonspecific nuclear uptake of anti-MUC1 aptamers by dead cells: the role of cell viability monitoring in aptamer targeting of membrane-bound protein cancer biomarkers. **Analytical Methods**, v. 13, n. 9, p. 1191-1203, 2021.
33. FRAZER, Ian H. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 1, p. 46-55, 2004.
34. FREEMAN, Gordon J. et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. **The Journal of experimental medicine**, v. 192, n. 7, p. 1027-1034, 2000.
35. GARCIA-BATES, Tatiana M. et al. Enhanced Cytotoxic CD8 T Cell Priming Using Dendritic Cell-Expressing Human Papillomavirus-16 E6/E7-p16INK4 Fusion Protein with Sequenced Anti-Programmed Death-1. **The Journal of Immunology**, v. 196, n. 6, p. 2870-2878, 2016.
36. GÉRARD, Catherine; DEBRUYNE, Channa. Immunotherapy in the landscape of new targeted treatments for non-small cell lung cancer. **Molecular oncology**, v. 3, n. 5-6, p. 409-424, 2009.
37. GHEBEH, Hazem et al. The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with important high-risk prognostic factors. **Neoplasia**, v. 8, n. 3, p. 190-198, 2006.
38. GRAVBROT, Nicholas et al. Therapeutic monoclonal antibodies targeting immune checkpoints for the treatment of solid tumors. **Antibodies**, v. 8, n. 4, p. 51, 2019.
39. HAMANISHI, Junzo et al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 9, p. 3360-3365, 2007.
40. HAMANISHI, Junzo et al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 9, p. 3360-3365, 2007.

41. HARDEN, Mallory E.; MUNGER, Karl. Human papillomavirus molecular biology. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 772, p. 3-12, 2017.
42. HARDING, Fiona A. et al. The immunogenicity of humanized and fully human antibodies: residual immunogenicity resides in the CDR regions. In: **MAbs**. Taylor & Francis, 2010. p. 256-265.
43. HODI, F. Stephen et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 8, p. 711-723, 2010.
44. HOPPE-SEYLER, Karin et al. The HPV E6/E7 oncogenes: key factors for viral carcinogenesis and therapeutic targets. **Trends in microbiology**, v. 26, n. 2, p. 158-168, 2018.
45. HUANG, Bo-Tsang et al. A CTLA-4 antagonizing DNA aptamer with antitumor effect. **Molecular Therapy-Nucleic Acids**, v. 8, p. 520-528, 2017.
46. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Tipos de câncer. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-colo-do-utero>; Acesso em: 02 Jun 2021.
47. ISHIDA, Yasumasa et al. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. **The EMBO journal**, v. 11, n. 11, p. 3887-3895, 1992.
48. JAYSHREE, R. S. The Immune Microenvironment in Human Papilloma Virus-Induced Cervical Lesions—Evidence for Estrogen as an Immunomodulator. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, 2021.
49. KEEFE, Anthony D.; PAI, Supriya; ELLINGTON, Andrew. Aptamers as therapeutics. **Nature reviews Drug discovery**, v. 9, n. 7, p. 537-550, 2010.
50. KEIR, Mary E. et al. Programmed death-1 (PD-1): PD-ligand 1 interactions inhibit TCR-mediated positive selection of thymocytes. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 11, p. 7372-7379, 2005.
51. KEIR, Mary E. et al. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. **Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 4, p. 883-895, 2006.

52. KENTER, Gemma G. et al. Vaccination against HPV-16 oncoproteins for vulvar intraepithelial neoplasia. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 19, p. 1838-1847, 2009.
53. KONISHI, Jun et al. B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression. **Clinical cancer research**, v. 10, n. 15, p. 5094-5100, 2004.
54. KUTZLER, Michele A.; WEINER, David B. DNA vaccines: ready for prime time?. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, n. 10, p. 776-788, 2008.
55. KVISTBORG, Pia et al. Anti-CTLA-4 therapy broadens the melanoma-reactive CD8+ T cell response. **Science translational medicine**, v. 6, n. 254, p. 254ra128-254ra128, 2014.
56. LASARO, Marcio O. et al. 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, 2005.
57. LASARO, Marcio O. et al. 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, 2005.
58. LEACH, Dana R.; KRUMMEL, Matthew F.; ALLISON, James P. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. **Science**, v. 271, n. 5256, p. 1734-1736, 1996.
59. LIN, Ken et al. Therapeutic hpv DNA vaccines. **Immunologic research**, v. 47, n. 1-3, p. 86-112, 2010.
60. LIN, Ken-Yu et al. Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. **Cancer research**, v. 56, n. 1, p. 21-26, 1996.
61. MANSHE, Matthew. Ipilimumab and cancer immunotherapy: a new hope for advanced stage melanoma. **The Yale journal of biology and medicine**, v. 84, n. 4, p. 381, 2011.
62. MAYER, Günter et al. Fluorescence-activated cell sorting for aptamer SELEX with cell mixtures. **Nature protocols**, v. 5, n. 12, p. 1993-2004, 2010.

63. MKRTICHYAN, Mikayel et al. Anti-PD-1 antibody significantly increases therapeutic efficacy of *Listeria monocytogenes* (Lm)-LLO immunotherapy. **Journal for immunotherapy of cancer**, v. 1, n. 1, p. 1-9, 2013.
64. MKRTICHYAN, Mikayel et al. Anti-PD-1 synergizes with cyclophosphamide to induce potent anti-tumor vaccine effects through novel mechanisms. **European journal of immunology**, v. 41, n. 10, p. 2977-2986, 2011.
65. NAUMANN, R. Wendel; LEATH III, Charles A. Advances in immunotherapy for cervical cancer. **Current Opinion in Oncology**, v. 32, n. 5, p. 481-487, 2020.
66. NELSON, Aaron L.; DHIMOLEA, Eugen; REICHERT, Janice M. Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. **Nature reviews drug discovery**, v. 9, n. 10, p. 767-774, 2010.
67. NOMI, Takeo et al. Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer. **Clinical cancer research**, v. 13, n. 7, p. 2151-2157, 2007.
68. O'DAY, Steven J.; HAMID, Omid; URBA, Walter J. Targeting cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) A novel strategy for the treatment of melanoma and other malignancies. **Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society**, v. 110, n. 12, p. 2614-2627, 2007.
69. OHIGASHI, Yuichiro et al. Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer. **Clinical cancer research**, v. 11, n. 8, p. 2947-2953, 2005.
70. OSADA, Takuya et al. CEA/CD3-bispecific T cell-engaging (BiTE) antibody-mediated T lymphocyte cytotoxicity maximized by inhibition of both PD1 and PD-L1. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 64, n. 6, p. 677-688, 2015.
71. OTT, Patrick A.; HODI, F. Stephen; ROBERT, Caroline. CTLA-4 and PD-1/PD-L1 blockade: new immunotherapeutic modalities with durable clinical benefit in melanoma patients. **Clinical cancer research**, v. 19, n. 19, p. 5300-5309, 2013.
72. PARDOLL, Drew M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 4, p. 252-264, 2012.
73. PASARE, Chandrashekhar; MEDZHITOV, Ruslan. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. **Mechanisms of lymphocyte activation and immune regulation X**, p. 11-18, 2005.

74. PILS, S.; JOURA, E. A. From the monovalent to the nine-valent HPV vaccine. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 9, p. 827-833, 2015.
75. PORCHIA, Bruna FMM et al. 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**, v. 16, n. 9, p. 1922-1933, 2017.
76. POSTOW, Michael A.; CALLAHAN, Margaret K.; WOLCHOK, Jedd D. Immune checkpoint blockade in cancer therapy. **Journal of clinical oncology**, v. 33, n. 17, p. 1974, 2015.
77. PRODEUS, Aaron et al. Targeting the PD-1/PD-L1 immune evasion axis with DNA aptamers as a novel therapeutic strategy for the treatment of disseminated cancers. **Molecular Therapy-Nucleic Acids**, v. 4, p. e237, 2015.
78. QURESHI, Omar S. et al. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. **Science**, v. 332, n. 6029, p. 600-603, 2011.
79. ROBERT, Caroline et al. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 26, p. 2517-2526, 2011.
80. RUMFIELD, Claire Smalley; SCHLOM, Jeffrey; JOCHEMS, Caroline. Combination Therapies for HPV-Associated Malignancies. **Journal of clinical & cellular immunology**, v. 12, n. 1, 2021.
81. SALES, Natiely S. 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<sup>+</sup> T cells. **Vaccine**, v. 35, n. 52, p. 7240-7249, 2017.
82. SAWADA, Y. U. et al. Programmed death-1 blockade enhances the antitumor effects of peptide vaccine-induced peptide-specific cytotoxic T lymphocytes. **International journal of oncology**, v. 46, n. 1, p. 28-36, 2015.
83. SCHNEIDER, Helga et al. Reversal of the TCR stop signal by CTLA-4. **science**, v. 313, n. 5795, p. 1972-1975, 2006.
84. SCIORTINO, Maria Teresa et al. Involvement of HVEM receptor in activation of nuclear factor  $\kappa$ B by herpes simplex virus 1 glycoprotein D. **Cellular microbiology**, v. 10, n. 11, p. 2297-2311, 2008.



85. SERRANO, Beatriz et al. Epidemiology and burden of HPV-related disease. **Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology**, v. 47, p. 14-26, 2018.
86. SILVA, Jamile R. et al. Expression of a soluble IL-10 receptor enhances the therapeutic effects of a papillomavirus-associated antitumor vaccine in a murine model. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 68, n. 5, p. 753-763, 2019.
87. STEINBERG, Marcos W.; CHEUNG, Timothy C.; WARE, Carl F. The signaling networks of the herpesvirus entry mediator (TNFRSF14) in immune regulation. **Immunological reviews**, v. 244, n. 1, p. 169-187, 2011.
88. TATA, Angela et al. Combination blockade of KLRG1 and PD-1 promotes immune control of local and disseminated cancers. **OncImmunity**, v. 10, n. 1, p. 1933808, 2021.
89. TEWARI, Krishnansu S. et al. Bevacizumab for advanced cervical cancer: final overall survival and adverse event analysis of a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial (Gynecologic Oncology Group 240). **The Lancet**, v. 390, n. 10103, p. 1654-1663, 2017.
90. TEWARI, Krishnansu S. et al. Chemotherapy-induced neutropenia as a biomarker of survival in advanced ovarian carcinoma: an exploratory study of the gynecologic oncology group. **Gynecologic oncology**, v. 133, n. 3, p. 439-445, 2014.
91. THOMPSON, R. Houston et al. Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients: Indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 49, p. 17174-17179, 2004.
92. THOMPSON, R. Houston et al. Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up. **Cancer research**, v. 66, n. 7, p. 3381-3385, 2006.
93. TOPALIAN, Suzanne L. et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 26, p. 2443-2454, 2012.
94. TRIMBLE, Cornelia et al. Comparison of the CD8+ T cell responses and antitumor effects generated by DNA vaccine administered through gene gun, biojector, and syringe. **Vaccine**, v. 21, n. 25-26, p. 4036-4042, 2003.

95. TSUSHIMA, Fumihiko et al. Predominant expression of B7-H1 and its immunoregulatory roles in oral squamous cell carcinoma. **Oral oncology**, v. 42, n. 3, p. 268-274, 2006.
96. TUERK, Craig; GOLD, Larry. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. **science**, v. 249, n. 4968, p. 505-510, 1990.
97. VAN DOORSLAER, Koenraad. Evolution of the papillomaviridae. **Virology**, v. 445, n. 1-2, p. 11-20, 2013.
98. VAN ELSAS, Andrea; HURWITZ, Arthur A.; ALLISON, James P. Combination immunotherapy of B16 melanoma using anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-producing vaccines induces rejection of subcutaneous and metastatic tumors accompanied by autoimmune depigmentation. **Journal of Experimental Medicine**, v. 190, n. 3, p. 355-366, 1999.
99. WAN, Changxin et al. Enhanced Efficacy of Simultaneous PD-1 and PD-L1 Immune Checkpoint Blockade in High-Grade Serous Ovarian Cancer. **Cancer research**, v. 81, n. 1, p. 158-173, 2021.
100. WU, T.-C. Therapeutic human papillomavirus DNA vaccination strategies to control cervical cancer. **European Journal of immunology**, v. 37, n. 2, p. 310-314, 2007.
101. ZHANG, Hao et al. Regulatory mechanisms of immune checkpoints PD-L1 and CTLA-4 in cancer. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 40, n. 1, p. 1-22, 2021.
102. ZHOU, Chenhao; TUONG, Zewen Kelvin; FRAZER, Ian Hector. Papillomavirus immune evasion strategies target the infected cell and the local immune system. **Frontiers in oncology**, v. 9, p. 682, 2019.
103. ZHOU, Jiehua; ROSSI, John. Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges. **Nature reviews Drug discovery**, v. 16, n. 3, p. 181-202, 2017.
104. ZHOU, Jiehua; ROSSI, John. Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges. **Nature reviews Drug discovery**, v. 16, n. 3, p. 181-202, 2017.

