



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA MOLECOLARE

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOMEDICINA
CICLO XXVI

**Valutazione delle risposte immunitarie umorali e
cellulari di tipo B in soggetti vaccinati con *Gardasil* o *Cervarix***

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Riccardo Manganelli

Supervisor: Ch.mo Prof. Giorgio Palù e Ch.ma Prof.ssa Antonella Caputo

Dottoranda: Dott.ssa Barbara Mantelli

INDICE

RIASSUNTO	pag. 5
ABSTRACT	pag. 7
1. INTRODUZIONE	pag. 9
1.1 Classificazione dei Papillomavirus	pag. 9
1.2 Struttura dei Papillomavirus, organizzazione genomica e ruolo delle proteine virali	pag. 11
1.3 Ciclo replicativo dei Papillomavirus	pag. 20
1.4 Trasmissione dei Papillomavirus e lesioni da essi indotte	pag. 23
1.5 Infezione naturale da HPV delle mucose genitali femminili e meccanismi di immuno-evasione	pag. 27
1.6 HPV e carcinoma della cervice uterina	pag. 32
1.7 Epidemiologia del carcinoma della cervice uterina	pag. 34
1.8 Vaccini profilattici	pag. 36
1.8.1 Efficacia dei vaccini profilattici <i>Gardasil</i> e <i>Cervarix</i>	pag. 38
1.8.2 Risposte immuni indotte dai vaccini <i>Gardasil</i> e <i>Cervarix</i>	pag. 42
1.9 Scopo del lavoro	pag. 44
2. MATERIALI E METODI	pag. 46
2.1 Produzione dei plasmidi contenenti i geni L1 e L2 di alcuni genotipi di HPV (HPV6, 11, 16,18)	pag. 46
2.1.1 Plasmidi	pag. 46
2.1.2 Ceppi batterici e terreni di coltura	pag. 49
2.1.3 Trasformazione batterica	pag. 49
2.1.4 Estrazione del DNA plasmidico su piccola (miniprep) e larga (maxiprep) scala	pag. 50
2.1.5 Digestione del DNA plasmidico con enzimi di restrizione	pag. 52
2.2 Produzione e purificazione su larga scala di virus-like particles	pag. 54
2.2.1 Linee cellulari	pag. 54
2.2.2 Produzione e purificazione di virus-like particles (VLP)	pag. 54
2.2.3 Valutazione della qualità delle VLP purificate mediante	

colorazione all'argento e western blot	pag. 57
2.3 Valutazione delle risposte immunitarie in individui vaccinati con <i>Gardasil</i> o <i>Cervarix</i>	pag. 60
2.3.1 Separazione del plasma e purificazione delle cellule mononucleate da sangue periferico	pag. 60
2.3.2 Congelamento e scongelamento dei PBMC	pag. 61
2.3.3 Saggio di proliferazione cellulare (MTT)	pag. 62
2.3.4 Stimolazione policlonale dei linfociti B memoria	pag. 62
2.3.5 Saggio B-cell Elispot per la ricerca di cellule secernenti IgG	pag. 64
2.3.6 Saggio ELISA	pag. 66
2.3.7 Disegno dello studio	pag. 67
3. RISULTATI	pag. 69
3.1 Produzione e caratterizzazione dei plasmidi p6sheLLr+, p11L1h, p16sheLL e p18sheLL	pag. 71
3.2 Produzione di VLP di HPV6, 11, 16 e 18	pag. 72
3.2.1 Ottimizzazione delle condizioni di purificazione delle VLP	pag. 72
3.3 Ottimizzazione del saggio B-cell Elispot	pag. 79
3.3.1 Scelta del siero fetale bovino	pag. 79
3.3.2 Ottimizzazione delle condizioni di crescita e di stimolazione dei PBMC per differenziare i linfociti B in plasmacellule	pag. 81
3.3.3 Determinazione del numero ottimale di plasmacellule da seminare per quantificare i cloni B reattivi che producono IgG totali	pag. 83
3.3.4 Confronto dei risultati del saggio B-cell Elispot per la ricerca di linfociti B secernenti IgG totali eseguiti su PBMC freschi e dopo un ciclo di congelamento/scongelamento	pag. 85
3.3.5 Determinazione del numero ottimale di cellule B secernenti IgG totali e anticorpi antigene-specifici per l'esecuzione del saggio B-cell Elispot	pag. 89
3.3.6 Determinazione del cutoff per i saggi B-cell Elispot ed ELISA	pag. 90
3.4 Valutazione dell'immunità B antigene-specifica in soggetti vaccinati con <i>Gardasil</i> o <i>Cervarix</i>	pag. 91
3.4.1 Analisi del numero di soggetti, vaccinati con <i>Gardasil</i> , con	

valori superiori al cutoff (% di responders) di cellule B memoria e dei titoli anticorpali	pag. 91
3.4.2 Frequenza delle cellule B della memoria in adolescenti e donne vaccinate con <i>Gardasil</i>	pag. 94
3.4.3 Titoli anticorpali in adolescenti e donne vaccinate con <i>Gardasil</i>	pag. 98
3.4.4 Confronto delle risposte immunitarie indotte dai vaccini <i>Gardasil</i> e <i>Cervarix</i> in adolescenti dopo 1-6 mesi dalla vaccinazione	pag. 101
4. DISCUSSIONE	pag. 103
5. BIBLIOGRAFIA	pag. 110

RIASSUNTO

Il carcinoma della cervice uterina rappresenta la seconda causa di morte per tumore tra le giovani donne fra i 15 e i 44 anni, dopo il tumore al seno. Si stimano infatti a livello mondiale 530.000 nuovi casi di tumore cervicale all'anno e circa 275.000 decessi. Lo sviluppo del tumore alla cervice uterina è imputabile all'infezione persistente, sessualmente trasmessa, di alcuni genotipi ad alto rischio di Papillomavirus (HPV); in particolare più del 70% di tutti i tumori cervicali è correlato con la presenza di HPV16 e 18 mentre il rimanente 25% è legato all'infezione causata da altri genotipi di HPV come 31, 33, 45 e 58.

Le donne immunocompetenti sono in grado di eliminare spontaneamente le infezioni dei genotipi ad alto rischio in 12-18 mesi. La seroconversione che deriva dall'infezione non avviene in tutte le donne e, laddove succede, i titoli degli anticorpi neutralizzanti sono molto bassi e non proteggono da successive reinfezioni. Inoltre, il 10% delle donne non è in grado di eliminare il virus e l'infezione persistente a livello della mucosa cervicale, è il punto di partenza di una serie di eventi molecolari che portano allo sviluppo di lesioni neoplastiche.

Nel 2006-2007 sono stati approvati e commercializzati due vaccini profilattici anti-HPV costituiti dalle proteine L1 del capsido virale, assemblate a formare degli pseudovirioni (VLP) tridimensionalmente identici alle particelle virali native ma non infettivi: *Cervarix* (GSK) contenente le VLP di HPV16 e 18 e *Gardasil* (Merck) contenente le VLP di HPV6, 11, 16 e 18, quindi protettivo anche nei confronti di infezioni genitali di tipo benigno come i condilomi.

Gli studi clinici hanno dimostrato che entrambi i vaccini sono sicuri, capaci di indurre elevati livelli di anticorpi neutralizzanti contro la proteina L1 ed efficaci nel proteggere dall'infezione da parte dei genotipi di HPV presenti nel vaccino. Tuttavia, i vaccini sono in commercio solo da pochi anni e sono necessari ulteriori studi per correlare l'efficacia di protezione con l'entità delle risposte immunitarie indotte. Per studiare l'immunità a lungo termine, la determinazione dei titoli anticorpali (neutralizzanti e non) è uno strumento utile ma non sufficiente, ed è necessario quindi quantificare i linfociti B memoria antigene-specifici. Inoltre, sono ancora pochi i dati disponibili in letteratura sull'induzione delle risposte

immunitarie in funzione dell'età di somministrazione del vaccino e soprattutto la maggior parte dei dati di efficacia e di risposte immunitarie indotte da *Gardasil* e *Cervarix* provengono dalle aziende che commercializzano i vaccini.

In questo contesto, lo studio indipendente da noi eseguito aveva tre obiettivi: 1) sviluppare e standardizzare una metodica di B-cell Elispot per la quantificazione dei linfociti B memoria HPV genotipo-specifici; 2) quantificare i linfociti B memoria e i titoli anticorpali, specifici per ciascun antigene vaccinale, in una popolazione di adolescenti (12 anni) e di donne (20-45 anni) vaccinate con *Gardasil* o *Cervarix*, arruolate 1-6 mesi o 4 anni dopo la vaccinazione; 3) comparare l'immunogenicità dei due vaccini anti-HPV. In particolare, ad oggi sono state arruolate 283 volontarie di cui per il vaccino *Gardasil* n=121 per il gruppo 12 anni, n=112 per il gruppo 20-45 anni e per il vaccino *Cervarix* n=60 per il gruppo 12 anni. L'arruolamento dei soggetti vaccinati con *Cervarix* è ancora in corso e lo studio verrà completato nei prossimi 6 mesi.

I risultati dello studio hanno dimostrato che le frequenze dei linfociti B memoria HPV genotipo-specifiche indotte dal *Gardasil* sono elevate 1-6 mesi dopo la vaccinazione in entrambe le coorti di età e, nonostante diminuiscano nel corso del tempo, dopo 4 anni continuano ad essere significativamente elevate indipendentemente dall'età di somministrazione del vaccino. Al contrario, i titoli anticorpali sono influenzati dall'età di somministrazione del vaccino. Infatti, i titoli anticorpali misurati nella coorte di adolescenti sono sempre significativamente superiori rispetto a quelli misurati nella coorte delle donne, sia 1-6 mesi sia 4 anni dopo la vaccinazione. In aggiunta, la percentuale di individui i cui titoli anticorpali non sono più misurabili, dopo 4 anni dalla vaccinazione, è significativamente superiore nelle donne rispetto alle adolescenti.

Relativamente alla comparazione delle risposte immunitarie indotte dai due vaccini anti-HPV, i risultati preliminari ottenuti in un gruppo di adolescenti vaccinate con *Cervarix* dimostrano che 1-6 mesi dopo la vaccinazione il *Cervarix* induce titoli anticorpali e frequenze di linfociti B memoria anti-HPV16 e 18 significativamente superiori rispetto ad adolescenti vaccinate con *Gardasil*.

I risultati ottenuti potranno essere un utile ausilio per il Ministero della Salute per tracciare le linee guida di prevenzione primaria del tumore alla cervice uterina.

ABSTRACT

The family of human papillomaviruses comprises over 120 different types that infect cutaneous and mucosal tissues, and among them high-risk genotypes (HPV16, 18, 31, 33, 45, 51, 58 and others) are strongly associated with different cancer in the genital tract in men and women. Low-risk genotypes (HPV6, 11, 40, 43 and others) are found in genital epithelial lesions but rarely detected in malignancies.

Cervical cancer is the third most common cancer in women world-wide associated with persistent infection of sexually transmitted high-risk HPV genotypes. In particular, HPV16 and 18 cause more than 70% of invasive cervix cancer in women. Immunocompetent women are able to clear high-risk HPV genotypes infections in 12-18 months. This is accompanied or closely followed by seroconversion against the major coat protein L1. The antibody titres developed during natural infection are low and don't protect against HPV reinfection, moreover, not all women seroconvert. Approximately 10% of women fail to clear HPV infection resulting in long-term persistent infection that leads to progressive disease.

In 2006-2007 two prophylactic vaccines were licenced based on virus-like particles technology: a bivalent HPV16/18 L1 VLP vaccine (*Cervarix*, GSK) and a tetravalent HPV 6/11/16/18 L1 VLP vaccine (*Gardasil*, MSD). Both vaccines showed almost 100% efficacy against CIN 2/3 against vaccine-related HPV types in naïve women. The efficacy is considerably lower against HPV types not included in vaccine formulation, and also in women with evidence of previous or current infections of vaccine-related genotypes. Furthermore, both vaccines are safe, and induce high titres of type-specific neutralizing antibodies against both linear and conformational epitopes on capsid protein L1 (4 years follow up of phase III clinical trials) preventing both high risk HPV16 and 18 infection and lesion development in the cervix. In addition, the quadrivalent vaccine is protective against occurrence of external genital warts.

Despite this success, several key issues are still open. In fact, reports from phase III studies suggest that the two HPV vaccines may induce different antigen-

specific immune responses in terms of intensity and persistence. The generation of memory B-cells and their responses to recall antigens are crucial factors for the long-term efficacy of vaccine induced humoral protection and up to now standardized assays are not commercially available to measure HPV immunity. Moreover, the efficacy in pre- and early adolescents, the primary targets for vaccination, has not been demonstrated. Furthermore, at present, the majority of data available on the two HPV vaccines comes from studies performed by the manufacturers.

In this contest, an independent study was designed by enrolling HPV vaccinated women in Veneto and Emilia Romagna Regions to a) set up standardized B-cell elispot assays to measure the frequency of memory B-cells specific to HPV6, 11, 16 and 18 VLPs; b) screen a cohort of HPV vaccinees stratified by age (12 years old vs 20-45 years old) and by time after the 3rd dose of vaccine (1-6 months vs 4 years); c) compare the immune responses of *Cervarix* and *Gardasil* HPV vaccines.

This study demonstrates that *Gardasil* induces high and sustained number of memory B-cells against the HPV types included in the vaccine formulation. With regard to the frequency of memory B-cells the vaccine was not influenced by the age of vaccine administration and was similar among the age groups at 1-6 months and 4 years after vaccination. Furthermore, *Gardasil* induces high antigen-specific IgG titres in both age groups that decrease significantly 4 years after vaccination but remains still detectable. However, the IgG titres were significantly lower in the 20-45 years old group compared to the 12 years old group both both 1-6 months and 4 years after vaccination, and the percentage of vaccinees whom IgG levels were still detectable were significantly lower in the 20-45 years old group compared to the 12 years old group 4 years after the vaccination.

Cervarix induces higher B-cell responses (both frequency of memory B-cells and antigen-specific IgG titres) compared to *Gardasil* in 12 years old vaccinees, tested 1-6 months after vaccination. Evaluation of immune responses in 12-years old *Cervarix* recipients 4 years after vaccination as well as in 20-45 years old (both 1-6 months and 4 years after vaccination) is in progress.

1. INTRODUZIONE

1.1 CLASSIFICAZIONE DEI PAPILOMAVIRUS

I papillomavirus appartengono alla famiglia *Papillomaviridae* e rappresentano un diversificato e ampio gruppo di virus a DNA con tropismo epiteliale che infettano mammiferi, rettili e uccelli, [de Villiers EM et al., 2004]. I papillomavirus umani o HPV (acronimo di Human Papilloma Virus) rivestono particolare importanza nella patologia umana in quanto possiedono uno spiccato tropismo per le cellule epiteliali della cute e delle mucose.

Sono stati identificati fino ad oggi più di 130 differenti genotipi di papillomavirus umani, classificati in 5 *genera*, denominati Alpha, Beta, Gamma, Mu e Nu (**Figura 1**), sulla base dell'omologia di sequenza del loro DNA [Doorbar J et al., 2012]. Gli HPV possono, inoltre, essere distinti in cutanei o mucosali sulla base della loro tessuto-specificità. I virus cutanei hanno un tropismo per le cellule epiteliali cheratinizzate, mentre i virus mucosali per gli epiteli delle superfici mucose, quali le superfici del cavo orale, della laringe, del tratto respiratorio, del tratto urinario e dell'epitelio ano-genitale [Burd EM, 2003].

I papillomavirus umani dei *genera* Beta, Gamma, Mu e Nu infettano solo cellule della cute causando lesioni benigne, come papillomi e verruche, ad eccezione dei Beta-papillomavirus che, in individui immunocompromessi o affetti da epidermodisplasia verruciforme, possono causare il tumore cutaneo non-melanoma [Nindl I, 2007].

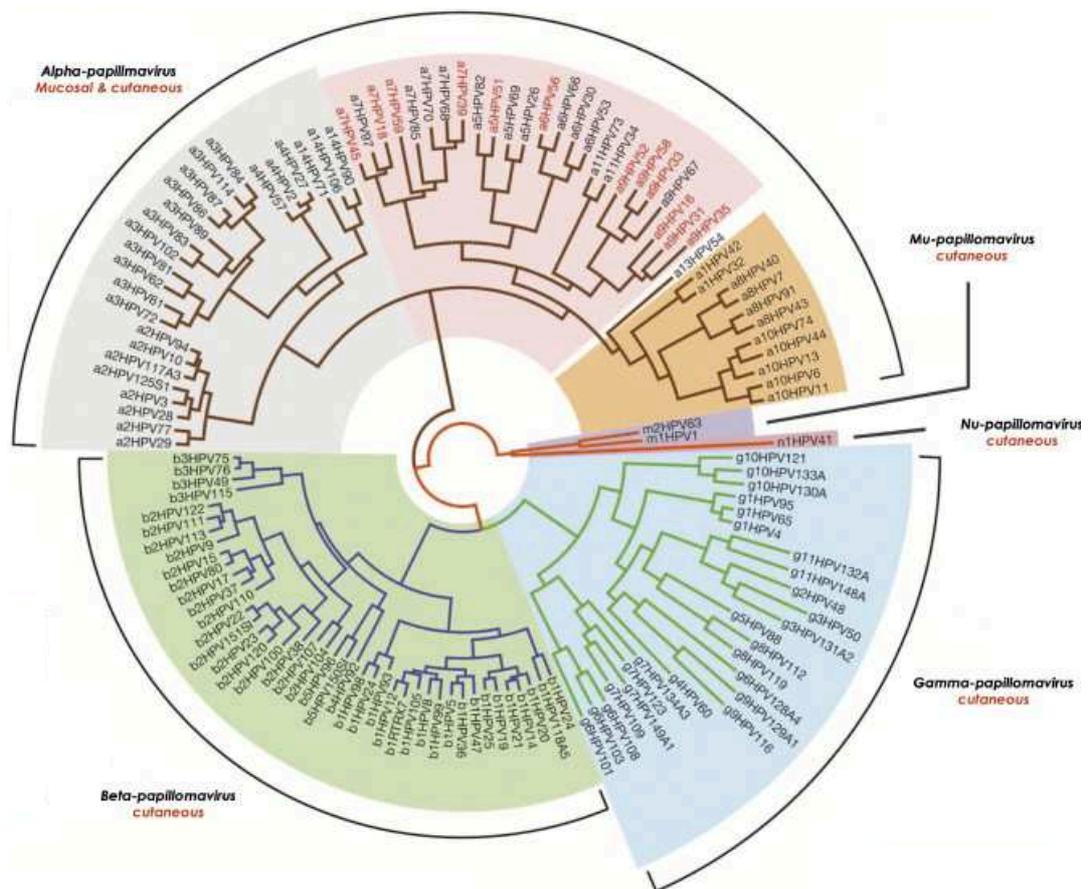


Figura 1. Albero filogenetico della famiglia dei papillomavirus umani. La suddivisione in *genera* e specie è stata determinata sulla base dell'omologia di sequenza della proteina L1 del capside [Crow JM, 2012].

Il *genus* più numeroso è costituito dagli Alpha papillomavirus, composto da 15 specie differenti, che posseggono un tropismo cutaneo e mucosale. Gli HPV mucosali, 35-40 genotipi identificati, possono essere ulteriormente suddivisi in genotipi a “basso o alto rischio oncogeno” (**Tabella 1**). L’infezione da parte dei genotipi a basso rischio (ad esempio dei genotipi 6 e 11) è associata, quasi esclusivamente, a lesioni benigne, come i condilomi ano-genitali e i papillomi orali e congiuntivali. Al contrario, le infezioni con HPV ad alto rischio oncogeno sono in grado di progredire verso forme cliniche maligne, tra cui il carcinoma del tratto respiratorio e della cavità orale, il carcinoma verrucoso di *Brusche-Löwenstein*, la neoplasia intraepiteliale vulvare (VIN) e vaginale (VAIN), il

carcinoma vaginale (VC) e cervicale e il cancro anale e penile [zur Hausen H, 2009].

I genotipi ad alto rischio mucosali-genitali sono ulteriormente divisibili in tre sottogruppi, come stabilito nel 2011 dall' Agenzia Internazionale della Ricerca sul Cancro (IARC, *International Agency for Research on Cancer*). La nuova classificazione considera non solo il grado di lesione predisponente allo sviluppo del tumore maligno, ma anche l' omologia genica fra i diversi genotipi di HPV (**Tabella 1**) [IARC work group, 2011].

Tabella 1. Principali genotipi ad alto e basso rischio.

Classificazione IARC			
Alto rischio	Gruppo 1	Cancerogeni per l'uomo	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59
	Gruppo 2A	Probabilmente cancerogeni per l'uomo	68
	Gruppo 2B	Possibilmente cancerogeni per l'uomo	26, 30, 34, 53, 66, 67, 69, 70, 73, 82, 85, 97
Basso rischio	Gruppo 3	Non cancerogeni per l'uomo	6, 11, 28, 32, 40, 42, 43, 44, 54, 55, 57, 61, 62, 71, 72, 74, 81, 83, 84, 86, 87, 89

1.2 STRUTTURA DEI PAPILOMAVIRUS, ORGANIZZAZIONE GENOMICA E RUOLO DELLE PROTEINE VIRALI

Gli HPV sono virus nudi con un capsidico proteico a geometria icosaedrica di diametro di 50-55 nm (**Figura 2**), costituito da 360 monomeri della proteina L1 (proteina maggiore) e da 12 monomeri della proteina L2 (proteina minore).

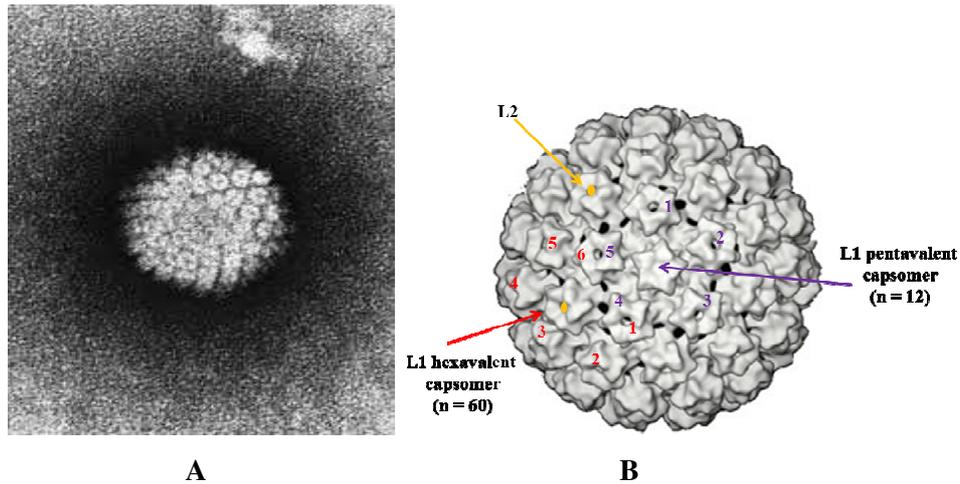


Figura 2. Microfotografia in microscopia elettronica a trasmissione (Figura A) e modello del capside dei Papillomavirus (Figura B).

Il genoma degli HPV è costituito da una singola molecola di DNA a doppia elica circolare di circa 8 Kb ed è possibile individuare almeno 8 *Open Reading Frames* (ORF) (**Figura 3**).

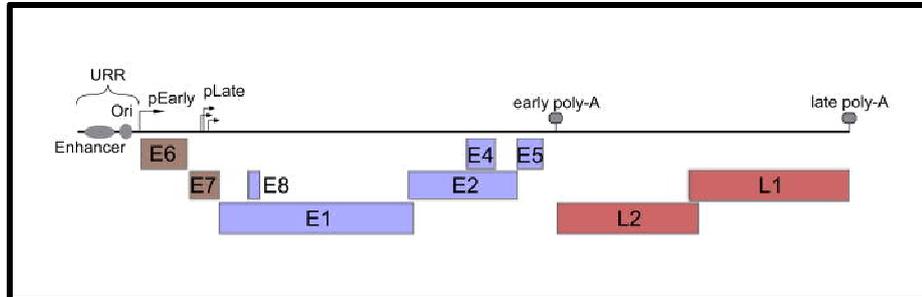


Figura 3. Organizzazione genomica dei papillomavirus umani [Bodily J et al., 2011]. Il genoma circolare di HPV è mostrato in forma lineare. L'origine di replicazione (ori) e gli elementi regolatori sono localizzati nella regione URR (*Upstream Regulatory Region*). Il promotore precoce, il promotore tardivo (la cui attivazione è dipendente dal differenziamento cellulare) e due siti di poliadenilazione (*early poly A*, *late poly A*) definiscono tre gruppi generali di geni virali (evidenziati dai diversi colori) che sono espressi in modo coordinato durante la differenziazione della cellula ospite. I geni E5, E6 ed E7 sono importanti per la proliferazione cellulare; E1, E2, E4, E5 e E8 sono coinvolti nella replicazione del DNA virale, nel controllo della trascrizione e in altre funzioni più tardive. L1 e L2 codificano le proteine capsidiche.

Nel genoma di tutti i tipi di HPV si possono distinguere tre regioni:

1) Una regione non codificante di circa 1 Kb, chiamata LCR (*Long Control Region*) o URR (*Upstream Regulatory Region*), contenente gli elementi regolatori necessari per la trascrizione dei geni virali e la replicazione del DNA virale [Longworth MS et al., 2005].

2) La regione precoce, detta *Early region*, di circa 4 Kb, che codifica le proteine virali precoci non strutturali, denominate da E1 ad E7. Queste proteine sono implicate nella replicazione e nella trascrizione dei geni virali, nella regolazione del ciclo cellulare dell'ospite e, per i ceppi ad alto rischio, nella trasformazione maligna delle cellule infettate. Nella regione precoce risiede, quindi, il potenziale trasformante e immortalizzante dei Papillomavirus.

La proteina **E1** è un'elicasi ATP-dipendente in grado di catalizzare lo svolgimento della doppia elica del genoma virale e di legare il complesso della DNA polimerasi α -primasi a livello della sequenza ori, promuovendo la replicazione del DNA virale in associazione con la proteina E2 [Masterson PJ et al., 1998]. Il prodotto del gene **E2** è un importante regolatore della trascrizione e della replicazione virale durante l'infezione produttiva da HPV. E2, tramite il dominio al C-terminale, si associa ad E1 e le permette di legare ad alta affinità l'origine di replicazione [Mohr IJ et al., 1990]. Inoltre, E2 svolge un ruolo importante nel controllo del numero di copie di genoma virale e nella segregazione dei genomi virali durante la divisione delle cellule, ancorando il DNA virale episomale ai cromosomi mitotici [You J et al., 2004]. Infine, E2 è un transattivatore dei geni virali. A basse concentrazioni, E2 si lega a specifiche sequenze di riconoscimento localizzate nella regione LCR e attiva la trascrizione dei geni precoci, inclusi gli oncogeni E6 ed E7, le due principali proteine virali coinvolte nell'oncogenesi. Invece, a concentrazioni elevate agisce come repressore della trascrizione [Hebner CM et al., 2006]. La proteina E2 è attiva quando il genoma virale è in forma episomale, mentre l'integrazione del DNA virale nel genoma della cellula provoca l'inattivazione del gene E2 e questo rappresenta l'evento chiave nei processi di carcinogenesi HPV-indotti.

La proteina **E3** esiste soltanto in alcuni tipi di Papillomavirus (HPV1, 11, 16, 31 e 33) e la sua funzione non è ancora stata chiarita.

La proteina **E4** è sotto il controllo di un promotore tardivo e il suo ruolo è legato all'infezione produttiva. Infatti, la proteina E4 è espressa nelle cellule infettate solo quando il processo di differenziamento cellulare è già avanzato (cellule dello strato spinoso) ed in coincidenza con gli eventi tardivi del ciclo replicativo virale. Questa proteina è in grado di legarsi alle proteine del citoscheletro rendendole meccanicamente instabili e facilitando il rilascio delle particelle virali dalla cellula infettata [Doorbar J et al., 1991]. La proteina E4 a livelli elevati di espressione è in grado di arrestare il ciclo cellulare nella fase G2, interferendo con la localizzazione del complesso cdk1/ciclina B1 e impedendo la progressione verso la mitosi [Davy CE et al., 2005]. Inoltre, E4 sembra avere un ruolo anche controllo post-trascrizionale dei geni virali poiché è in grado di associarsi ad una RNA elicasi chiamata E4-DBP (dead box protein) [Doorbar J et al., 2006].

La proteina **E5** è idrofobica e si localizza a livello dell'apparato del Golgi, del reticolo endoplasmico e della membrana nucleare (Conrad M et al., 1993). Sono note le funzioni della proteina E5 soprattutto per il genotipo HPV16: E5 interferisce con l'actina del citoscheletro provocando il blocco dell'endocitosi (Thomsen P et al., 2000); si comporta come un'oncoproteina poiché è in grado di modulare diversi *pathway* cellulari attraverso l'attivazione del recettore EGFR (*epidermal growth factor receptor*) (Tomakidi P et al., 2000, Straight S et al., 1993); coopera con le proteine E6 ed E7 nell'indurre la progressione verso il fenotipo maligno (Bouvard V et al., 1994, Valle GF et al., 1995); favorisce l'elusione della sorveglianza immunitaria poiché riduce l'espressione del complesso maggiore d'istocompatibilità (MHC) di classe I e II sulla superficie della cellula infettata (Ashrafi GH, et al., 2005). E5, inoltre, reprime l'espressione della proteina p21 - un inibitore di chinasi ciclina-dipendenti che blocca il ciclo cellulare e induce apoptosi - favorendo la sopravvivenza della cellula infettata (Tsao YP, et al., 1996).

Le proteine virali **E6** ed **E7** interferiscono con la normale progressione del ciclo cellulare, ma solo nel caso dei genotipi ad alto rischio, come HPV16 o 18, favorendo la trasformazione in senso neoplastico delle cellule infettate. In **Tabella 2** sono riassunte le differenze funzionali delle proteine E6 ed E7 dei genotipi di HPV a basso e alto rischio, mentre in **Figura 4** sono schematicamente

rappresentate le proteine con le quali E6 ed E7 interagiscono e i meccanismi molecolari che portano alla trasformazione maligna di una cellula.

La proteina **E6** dei genotipi ad alto rischio forma un complesso trimerico con la proteina p53 e l'ubiquitina ligasi E6AP (*E6-associated protein*) causando la degradazione proteasomica di p53 [Huibregtse JM et al., 1993]. In condizioni fisiologiche p53 si comporta da sentinella dello stato di salute della cellula. In presenza di danni, soprattutto a carico del DNA, conseguenti ad agenti fisici o ad un'infezione virale, p53 induce la trascrizione di alcuni geni, che in prima istanza arrestano la proliferazione cellulare e successivamente, nel caso in cui i danni siano irripetibili, promuovono l'apoptosi. La proteolisi di p53 indotta da E6 provoca la sopravvivenza e una maggiore proliferazione delle cellule infettate che possono così accumulare ulteriori mutazioni a carico del genoma e progredire verso l'immortalizzazione. Anche la proteina E6 dei genotipi a basso rischio è in grado di legare direttamente p53, interferendo con la sua attività di fattore trascrizionale, e anche di reclutare la proteina E6AP, senza però indurre la degradazione [Moody C et al., 2010]. Ciò suggerisce che altri fattori cellulari siano il bersaglio del complesso E6-E6AP dei genotipi a basso rischio. La proteina E6 inoltre inibisce l'apoptosi non solo indirettamente tramite p53 ma anche direttamente interferendo con alcune molecole che legano e trasducono i segnali pro-apoptotici come il TNFR1 (*Tumor Necrosis Factor- α Receptor 1*), e FADD (*FAS-associated protein with death domain*) [Filippova M et al., 2002 e 2004].

Tabella 2. Differenze funzionali tra le proteine E6 ed E7 nei genotipi a basso e alto rischio [Doorbar J et al., 2012].

	High-risk genotype	Low-risk genotype
E6	Encodes E6 products	No E6 products
	Binding and degradation of: <ul style="list-style-type: none"> • p53 • specific PDZ-domain proteins 	Weaker bindg (no degradation of): <ul style="list-style-type: none"> • p53 • no binding of PDZ-domanin proteins
	Interact with E6AP ubiquitin ligase Inhibition of p53 transactivation and acetylation	
	Inhibition of apoptosis	unknown
	bypass growth arrest following DNA damage	Normal growth arrest following DNA damage
	Inhibition of keratinocyte differentiation	unknown
	Inhibition of interferon response	Weaker inhibition of interferon response
	Activation of signaling pathways: Akt Wnt Notch mTORC1	unknown
	Telomerase activation	No activation
	c-myc activation	No activation
	E7	Binding and degradation of: <ul style="list-style-type: none"> • pRb • p107 • p130
Binding (no degradation) of: <ul style="list-style-type: none"> • E2F1 • Cullin2 • HDAC 		Binding of: <ul style="list-style-type: none"> • P130
Binding of regulatory proteins including E2F6, p600, HAT, PP2A Induction of cell cycle entry and DNA synthesis Role in genome amplification		
Induction of genome instability		No stimulation of instability
Suppression of STAT-1 function		No suppression
Immortalization and transformation		No such functions
Activation of signaling pathways: Akt		unknown

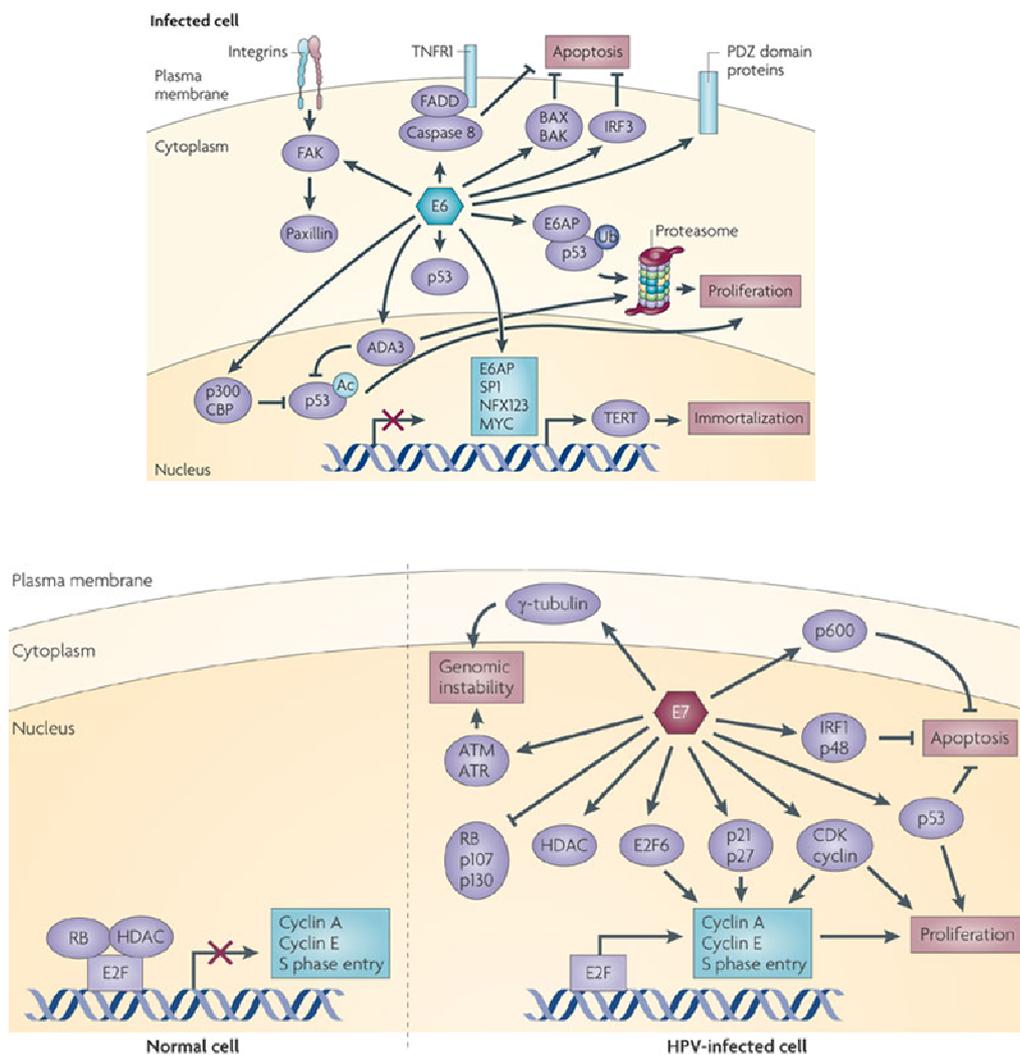


Figura 4. Meccanismi molecolari attraverso i quali le proteine virali E6 ed E7, cooperano per alterare la normale progressione del ciclo cellulare.

Le proteine E6 (pannello superiore) ed E7 (pannello inferiore) inducono la deregolazione della proliferazione cellulare, la resistenza ai segnali pro-apoptotici provenienti dall'esterno della cellula, l'instabilità genomica (riarrangiamenti cromosomici, aneuploidia) e, l'immortalizzazione mediante riattivazione della telomerasi. Tutti questi eventi portano alla trasformazione neoplastica delle cellule infette da HPV con progressione verso il fenotipo maligno [modificato da Doorbar *J et al.*, 2012].

Le cellule epiteliali, in condizioni fisiologiche, sono strettamente associate tra loro tramite giunzioni (necessarie per il passaggio di informazioni cellula-cellula), sono ancorate alla membrana basale tramite la matrice extracellulare e posseggono una polarità (basale-apicale), caratteristiche indispensabili per garantire l'integrità e la funzionalità dell'epitelio stesso. E6 lega le proteine Paxillina e

Fibulina-1 distruggendo i legami tra citoscheletro e matrice extracellulare [Tong X et al., 1997, Du M et al., 2002] e induce la degradazione di proteine definite PDZ (*protein domain Z*), necessarie per la struttura delle giunzioni strette, sovvertendo l'architettura del tessuto epiteliale e inducendo l'iperplasia degli strati soprabasali dell'epitelio [Massimi P et al., 2004]. Un altro bersaglio di E6 è hTERT (*human telomerase reverse transcriptase*), la subunità catalitica del complesso della telomerasi. Tale proteina è espressa fisiologicamente solo in alcuni tipi cellulari, quali le cellule staminali. La proteina E6 induce la trascrizione di hTERT favorendo l'immortalizzazione della cellula infetta da HPV [Klingelhutz AJ et al., 1996]. Infine, la proteina E6 è in grado di favorire la persistenza dell'infezione da HPV eludendo la sorveglianza immunitaria. Le molecole di Interferone di tipo I rappresentano la prima linea di difesa nei confronti delle infezioni virali e inducono l'attivazione del fattore trascrizione IRF-3 (*Interferon regulatory Factor 3*) che promuove la trascrizione di un centinaio di geni necessari per l'eliminazione delle cellule infettate. E6 impedisce al fattore trascrizionale IRF-3 di svolgere la sua funzione transattivante [Ronco L et al., 1998].

La proteina virale **E7** contribuisce all'immortalizzazione delle cellule infettate da HPV, legandosi ad alcune proteine che hanno un ruolo chiave nella progressione del ciclo cellulare impedendone la loro attività fisiologica. Tra queste, l'oncosoppressore pRb (proteina Retinoblastoma) e altri due membri della stessa famiglia, p107 e p130, che controllano la transizione G1-S. In assenza di stimoli mitotici esterni oppure in presenza di danni a carico del DNA, pRb in forma ipofosforilata lega alcuni fattori trascrizionali della famiglia E2F impedendo loro di trascrivere i geni necessari per entrare nella fase di sintesi del DNA (fase S), come quelli codificanti per le cicline A ed E [Dyson N, 1998], le quali sono necessarie per reclutare il complesso di enzimi deputato alla replicazione del DNA. In presenza di stimoli mitogeni esterni, l'enzima kinasi ciclina-dipendente (CDK) iperfosforila pRb che, in questo stato, perde affinità per E2F. La proteina E7 dei genotipi ad alto rischio distrugge il complesso pRb-E2F [Chellappan S et al., 1992] consentendo, quindi, alla cellula ospite di procedere nel ciclo replicativo anche in assenza di stimoli mitogeni esterni.

Un altro gruppo di proteine legate da E7 sono le istone deacetilasi (HDAC), proteine espresse in tutti i tessuti che favoriscono la condensazione della cromatina, impedendo quindi l'accesso al DNA sia dei fattori trascrizionali sia del complesso della DNA polimerasi. Il complesso E7-Rb-HDAC è essenziale per mantenere le cellule soprabasali in fase di attiva proliferazione, per consentire al genoma virale di essere costantemente amplificato [Longworth MS et al., 2004].

E' stato, inoltre, osservato che la proteina E7 è in grado di associarsi ad alcuni inibitori degli enzimi CDK, come p21 e p27, che inducono l'arresto della crescita cellulare a favore del differenziamento delle cellule soprabasali dell'epitelio [Shin M et al., 2009].

Inoltre, E7 si associa, inattivandolo, al fattore trascrizionale IRF1 (*interferon regulatory factor 1*), implicato nella risposta immunitaria contro le infezioni virali favorendo lo stabilirsi di un'infezione persistente [Park JS et al., 2000].

Concludendo, anche la proteina E7, come E6, dei genotipi di HPV ad alto rischio è in grado di indurre instabilità genomica. E' stato dimostrato che E6 ed E7 sono in grado di aumentare la frequenza di integrazione di DNA estraneo nel genoma della cellula ospite [Kesis TD et al., 1996]. E7 sovverte i meccanismi che regolano la transizione G2-M, tra i quali l'induzione di un'aberrante sintesi del centrosoma, promuovendo l'asimetrica segregazione dei cromosomi durante la mitosi con conseguente formazione di cellule aneuploidi [Hashida T et al., 1991]. Molti tipi di tumore positivi per Papillomavirus contengono diverse aneuploidie, cioè una variazione nel numero dei cromosomi, eventi molto importanti per la progressione tumorale.

Infine, **E8** è una proteina la cui funzione è ancora poco conosciuta. Recenti studi indicano che il gene E8 possa essere espresso sotto forma di proteina di fusione con la porzione c-terminale della proteina E2 (E8-E2) (**Figura 5**). Questa proteina di fusione eserciterebbe un ruolo di repressione della replicazione del DNA [Zobel T et al., 2003].

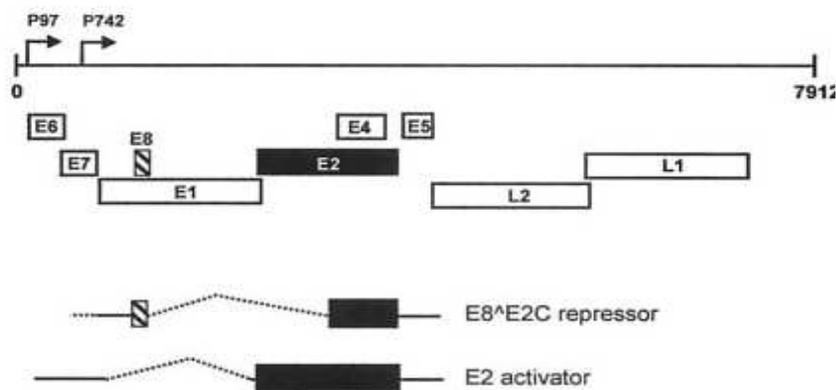


Figura 5. Rappresentazione schematica dell'espressione di E2 e E8-E2 da parte di mRNA derivati da splicing alternativo dello stesso pre-mRNA [Zobel T et al., 2003].

3) La regione tardiva, detta *Late region*, di circa 3 Kb, codifica le proteine virali strutturali, L1 e L2. Il capsid di HPV è composto da 360 monomeri della proteina L1 e da 12 monomeri di L2 assemblati a formare 72 capsomeri pentamerici [Finnen RL et al., 2003].

L1 ha un peso molecolare di 55-60 KDa, costituisce l'80% delle proteine virali di HPV e rappresenta la principale proteina del capsid, è scarsamente fosforilata e può essere glicosilata. La proteina L1, dopo essere stata sintetizzata, migra nel nucleo per impacchettare il DNA virale e generare virioni maturi [Nelson LM et al., 2002]. L1 è fortemente immunogenica e induce la produzione di anticorpi neutralizzanti durante l'infezione naturale da HPV [Christensen ND et al., 1992].

La proteina **L2** ha un peso molecolare di 70 KDa. Oltre a formare il capsid, migra nel nucleo per incorporare il genoma virale e generare virioni maturi e, a livello dell'interfaccia tra la lamina basale e lo strato basale delle cellule epiteliali, media l'ingresso del virione infettivo nei cheratinociti [Richards RM et al., 2006].

1.3 CICLO REPLICATIVO DEI PAPPILLOMAVIRUS

La cellula bersaglio dell'infezione da HPV è la cellula epiteliale degli epiteli squamosi pluristratificati della cute e delle mucose. Negli epiteli stratificati normali le uniche cellule in attiva replicazione sono le cellule degli strati basale e parabasale, adiacente alla membrana basale, che consistono rispettivamente di

cellule staminali e di cellule con vita più limitata, definite cellule amplificate di transito. Quando una cellula basale normale si divide, una delle due cellule figlie mantiene le caratteristiche di staminalità, resta nello strato basale e costituisce una riserva di cellule per la continua rigenerazione del tessuto, mentre l'altra migra nello strato soprabasale e inizia il percorso differenziativo. La cellula che inizia a differenziarsi esce dal ciclo cellulare e subisce una serie di cambiamenti nel profilo di espressione genica che culminano con la morte e la desquamazione della cellula [Madison KC, 2003].

Il ciclo replicativo di HPV, e la conseguente espressione delle proteine virali, dipende strettamente sia dall'apparato trascrizionale della cellula ospite sia dallo stadio di differenziamento della cellula epiteliale [Moody CA et al., 2010]. Il virus accede alle cellule basali degli epiteli attraverso piccole lesioni della cute o delle mucose (**Figura 6**). L'iniziale adesione del virus alla cellula ospite avviene tramite l'interazione tra il virione e i gruppi eparansolfato di alcuni proteoglicani [Shafti-Keramat S et al., 2003]. Come per altri virus, è necessaria la presenza di un recettore secondario per un'efficiente internalizzazione delle particelle virali, e alcuni autori ritengono che sia l'integrina $\alpha 6\beta 4$ a svolgere questa funzione [Evander M et al., 1997], anche se la precisa natura dei recettori necessari per l'ingresso nella cellula ospite è ancora oggetto di dibattito. Altri studi hanno dimostrato che l'internalizzazione delle particelle virali possa avvenire attraverso l'endocitosi di vescicole rivestite di clatrina [Day PM et al., 2003].

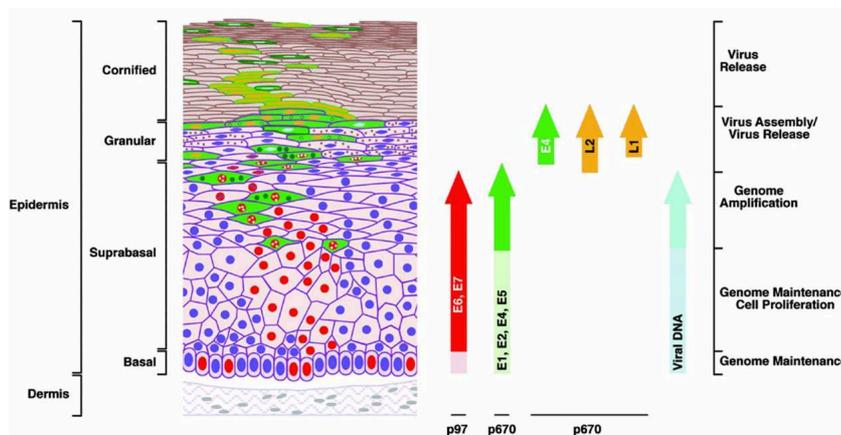


Figura 6. Ciclo replicativo dei papillomavirus [Doorbar J et al., 2012].

All'interno delle vescicole endosomiali i virioni vengono disassemblati: il complesso L2-DNA migra verso il nucleo della cellula ospite, mentre la proteina L1 viene degradata attraverso il lisosoma. I geni precoci E1, E2, E3, E5, E6, E7 sono i primi ad essere espressi nel nucleo della cellula basale dove il DNA virale si replica in forma episomiale [Moody CA *et al.*, 2010]. Dopo che il virus ha stabilito l'infezione, poiché le cellule dello strato basale sono attivamente proliferanti, la replicazione del DNA virale avviene in modo coordinato con quello del DNA cellulare e i genomi virali sono segregati in modo uguale nelle due cellule figlie, assieme al DNA cromosomico. Il DNA virale è mantenuto nei nuclei delle cellule infettate, sia in quelle basali sia in quelle che si muovono verso la superficie dell'epitelio, in un basso ma stabile numero di copie (50-100 copie genomiche/cellula), e ciò è strettamente regolato dalla proteina E2 [Bodily J *et al.*, 2011].

Dopo la divisione di una cellula basale infettata, una delle due cellule figlie rimane nello strato basale, mentre l'altra migra negli strati sovrastanti, per seguire il suo percorso differenziativo che la porta a cessare di dividersi e frequentemente anche a perdere il nucleo [Madison KC, 2003]. Le proteine di E5, E6 ed E7 di HPV si sono evolute in modo da forzare le cellule ospiti a mantenere le capacità proliferative anche se differenziate. Il risultato di questa strategia è un epitelio infettato contenente una popolazione più ampia di cellule nucleate e in attiva divisione in tutti gli strati [Burns JE *et al.*, 2005]. La conseguenza dell'aumento del numero di cellule indotto dal virus causa un ispessimento dello strato basale e dello strato spinoso, con formazione di una tipica lesione cutanea e/o mucosale, definita verruca o condiloma.

Il ciclo replicativo degli HPV è strettamente dipendente dal programma differenziativo cellulare. Infatti, man mano che le cellule infettate si differenziano e migrano verso la superficie, i fattori trascrizionali della cellula ospite espressi nei diversi strati cellulari di cute e di mucosa favoriscono la trascrizione di geni virali differenti e l'amplificazione del genoma. In particolare, negli strati intermedi e superficiali degli epiteli, il genoma replica generando un elevato numero di copie (100-1000 copie genomiche/cellula), mentre i geni tardivi L1 e L2, che codificano le proteine strutturali, e il gene E4, importante per il rilascio

dei virioni di nuova sintesi dalle cellule superficiali, sono espressi soltanto nello strato spinoso già differenziato in senso terminale, dove il virus si assembla [Bodily J et al., 2011]. L1 e L2 formano il capside e incorporano il DNA virale nel nucleo delle cellule per formare nuovi virioni. Quindi, mentre la cellula infettata matura e arriva alla superficie, anche il virus matura, per essere poi liberato dalle cellule dello strato superficiale. I nuovi virioni rilasciati esternamente possono infettare nuove cellule basali. Le proteine virali restano sequestrate all'interno delle cellule infette fino al momento di rilasciare i virioni maturi all'esterno (superficie della mucosa o dell'epitelio), e questo consente al virus di eludere la sorveglianza immunitaria e dare origine ad un'infezione persistente, soprattutto nel caso dei genotipi di HPV ad alto rischio [Frazer IH, 2009]. Le lesioni epiteliali che non regrediscono possono evolvere in lesioni pre-neoplastiche, caratterizzate ancora da replicazione virale produttiva, le quali possono ulteriormente evolvere in lesioni neoplastiche e, se non opportunamente trattate o rimosse, trasformarsi in carcinomi invasivi. Nelle lesioni tumorali non si osserva più un'infezione produttiva virale, ma il DNA di HPV è integrato nel genoma della cellula [Klaes R, 1999]. L'integrazione avviene in maniera casuale sul genoma cellulare, anche se esistono alcuni siti più predisposti chiamati "common fragile site" (CFS) [Thorland EC, 2003]. Inoltre, l'integrazione avviene sempre all'interno del gene E2 di HPV, causando la perdita dell'espressione di E2 stesso e il conseguente drastico aumento dell'espressione di E6 ed E7 [Burd EM et al., 2003; Hebner CM et al.; 2006; zur Hausen H et al., 2009].

1.4 TRASMISSIONE DEI PAPILLOMAVIRUS E LESIONI DA ESSI INDOTTE

La trasmissione di HPV avviene, prevalentemente, per contatto diretto (sessuale, orale, cutaneo) [Giles S et al., 2003].

I papillomavirus sono molto resistenti al calore e all'essiccamento, cosicché il contagio si può realizzare anche attraverso l'esposizione prolungata a tessuti o abiti contaminati che abbiano assorbito e trattenuto il virus, o per mezzo di strumenti medici contaminati [Burd EM et al., 2003]. Ci può essere, inoltre,

trasmissione verticale dalla madre al figlio durante la gravidanza o durante il parto [Syrianen S et al., 2000]. La principale malattia causata da HPV espressa clinicamente alla nascita è la papillomatosi respiratoria imputabile ai genotipi HPV 6 e 11 [Sinal SH et al., 2005].

Le manifestazioni cliniche dell'infezione virale da HPV dipendono dalla sede della lesione e dal genotipo infettante (**Tabella 3**).

Tabella 3. Associazione tra genotipo e manifestazione cliniche

Tipo di lesione	Genotipi di papillomavirus
Lesioni cutanee	
Verruche volgari, piane palmari	1, 2, 3, 10, 27, 28, 29, 41, 57, 77, 78, 94, 117
Verruche in soggetti con Epidermodisplasia verruciforme (EV)	5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 5, 36, 38, 47, 50
Carcinomi cutanei in soggetti con EV	5, 8, 14, 17, 20, 47
Lesioni mucose	
Papillomi delle vie respiratorie Papillomi congiuntivali	6, 11
Lesioni della mucosa orale	
Lesioni sulle labbra	2
Iperplasia focale epiteliale	13, 32
Carcinoma oro-faringeo	16, 33
Lesioni mucose ano-genitali	
Condilomi acuminati e piani	6, 11, 42, 43, 44, 54, 55
Condiloma gigante	6, 11, 16
Carcinomi della cervice uterina	16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,66,68
Cancro anale e vulvare	16, 18, 33
Cancro del pene	16, 18

Le **lesioni cutanee** sono generalmente benigne e associate a genotipi di HPV a basso rischio oncogeno [Aubin F et al., 2006], e tra queste possiamo ricordare:

- le verruche comuni o volgari sono le forme più diffuse, ben riconoscibili e caratterizzate da una superficie ruvida e spesso crespata, con localizzazione prevalente a livello delle mani e dei piedi;
- le verruche piane hanno forma di papule rossastre e si trovano prevalentemente a livello del viso;
- le verruche plantari compaiono sulla pianta del piede e nel palmo della mano. Le verruche di questo genere tendono ad essere più morbide, piatte, ricoperte da callosità e dolorose, a causa della pressione esercitata durante la deambulazione.

I genotipi di Papillomavirus più frequentemente riscontrati in questo tipo di lesioni sono i tipi 1, 2, 3, 4 e 7. Altri genotipi (**Tabella 3**), in percentuale minore, sono correlati a patologie maligne come il tumore della cute non-melanoma in soggetti immunocompromessi o affetti da epidermodisplasia verruciforme [Nindl I et al., 2007, Dubina M et al., 2009].

Le **lesioni mucose benigne** sono rappresentate dai condilomi acuminati e dai condilomi piani che insorgono a livello del pene, dei genitali femminili, dell'area perianale e del retto. Le lesioni alle mucose si manifestano con masse verrucose di consistenza molle (condilomi acuminati) o modestamente rilevate (condilomi piani) di colorito rossastro.

Questo tipo di lesioni è generalmente associato ai genotipi 6 e 11 di HPV (a basso rischio) e non evolve quasi mai in cancro [Burd EM et al., 2003], ma più spesso si risolve spontaneamente nel giro di qualche mese.

Altre sedi mucosali di lesioni benigne di tipo papillomatoso associate all'infezione da HPV sono a livello dell'apparato respiratorio, congiuntivale e orale (**Tabella 3**).

Le **lesioni mucose maligne** sono associate ai genotipi ad alto rischio implicati nella carcinogenesi dei tumori del collo dell'utero, del tratto ano-genitale (vulva, vagina, ano e pene) e, più recentemente, nel distretto testa-collo [Termine N et al., 2008]. In particolare, le lesioni a livello della cervice uterina (**Figura 7**) sono classificabili secondo una nomenclatura definita *The Bethesda System* [Solomon D et al., 2002] che include al suo interno la precedente classificazione istopatologica

stabilita dall'Organizzazione Mondiale della Sanità: le lesioni intraepiteliali squamose “di basso grado” (*Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion, LSIL*) includono la CIN 1 e le lesioni condilomatose, mentre le lesioni “di alto grado” (*Highgrade Squamous Intraepithelial Lesion, HSIL*), includono lesioni precedentemente classificate come CIN2 e CIN3.

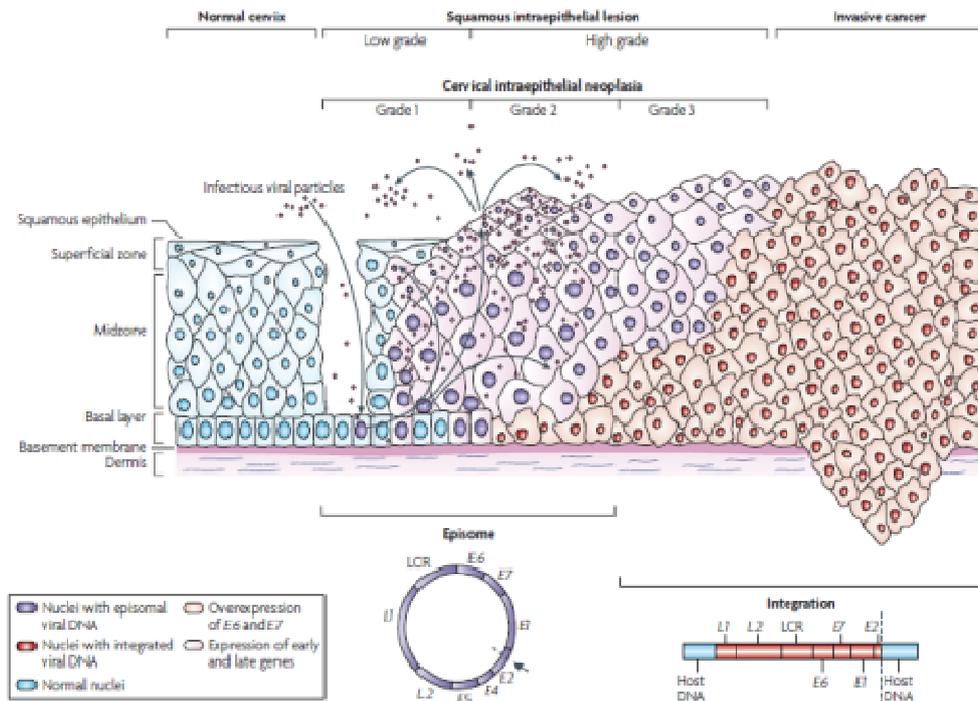


Figura 7. Modificazioni della mucosa genitale femminile a seguito dell'infezione persistente causata da papillomavirus [Woodman CB et al., 2007]. Le neoplasie intraepiteliali cervicali (*Cervical Intraepithelial Neoplasia, CIN*), secondo il sistema di classificazione istopatologica dell'OMS sono caratterizzate da alterazioni che vanno dalla displasia lieve (CIN 1) alla displasia moderata (CIN 2) alla displasia severa e al carcinoma *in situ* (CIS) (entrambe definite CIN 3).

1.5 INFEZIONE NATURALE DA HPV DELLE MUCOSE GENITALI FEMMINILI E MECCANISMI DI IMMUNO-EVASIONE

L'equilibrio che si instaura tra la risposta immunologica dell'ospite e l'agente infettante è in grado di influenzare l'instaurarsi stesso dell'infezione, la sua durata e la sua risoluzione.

Circa il 90% delle infezioni causate da HPV guariscono spontaneamente entro i tre anni dall'infezione, grazie allo sviluppo di un'efficace risposta immune dell'ospite, soprattutto cellulo-mediata, verso le proteine precoci E2 ed E6, accompagnata più tardivamente da sierconversione verso la proteina L1. La risposta anticorpale anti-L1 è, tuttavia, caratterizzata da titoli anticorpali bassi. Il periodo medio di regressione dell'infezione varia tra 2 e 18 mesi [Stanley MA, 2009; Bulkman et al., 2007] (**Figura 8**). Generalmente le lesioni associate ad HPV a basso rischio regrediscono più rapidamente (2-8 mesi) rispetto a quelle causate da HPV ad altro rischio (fino a 18-24 mesi).

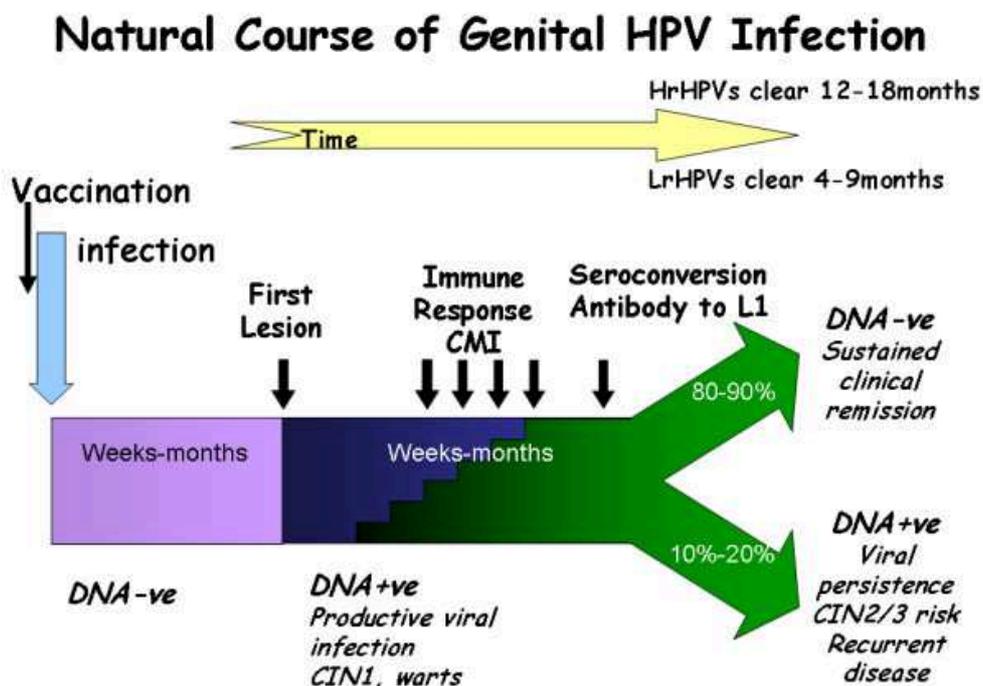


Figura 8. Storia dell'infezione naturale causata da HPV [Stanley M, 2010].

Durante l'infezione produttiva, le proteine virali sono espresse a bassi livelli e in maniera compartimentalizzata nelle cellule epiteliali, non esiste viremia, la replicazione virale non induce la morte della cellula infettata e il rilascio dei virioni maturi non è associato a un processo infiammatorio [Stanley MA, 2012]. Queste strategie messe in atto dal virus possono favorire l'evasione dalle risposte immuni. In effetti, il 10 % dei soggetti non elimina completamente il virus e sviluppa un'infezione persistente e solo una piccola percentuale (<1%) di donne che hanno acquisito un'infezione persistente sviluppa il tumore [Bhat P et al., 2011].

I genotipi di HPV ad alto rischio hanno una maggiore probabilità di causare infezioni persistenti [Stanley M et al., 2010], aumentando il rischio di integrazione del DNA di HPV nel genoma della cellula [Doorbar J et al., 2012]. La persistenza dell'infezione rappresenta il nodo cruciale che porta verso la progressione maligna, poiché il virus impiega un numero molto elevato di anni (10-20 anni) per indurre la trasformazione neoplastica della cellula infettata. Il fattore "tempo" gioca quindi a favore delle strategie di prevenzione.

La risposta immunitaria indotta dall'infezione causata da HPV comprende quella innata, che coinvolge macrofagi, neutrofili, cellule NK (Natural Killer) e citochine e, quell'adattativa, sia di tipo umorale sia cellulo-mediata, entrambe necessarie per l'eliminazione del virus e per proteggere l'individuo da successive reinfezioni (**Figura 9**).

La risposta immunitaria innata rappresenta la prima linea di difesa nei confronti di un'infezione da HPV. I cheratinociti posseggono sulla loro superficie e a livello endosomiale alcuni recettori in grado di riconoscere molecole di origine batterica e virale (TLR, Toll-like Receptor) dando origine alla cascata di reazioni che attiva la risposta innata. Di questi "sensori molecolari", il TLR-9 riconosce il DNA a doppia elica di origine virale (quale quello degli HPV) [Brennan K et al., 2010], e induce la secrezione di chemochine come MCP-1 (Monocyte chemotactic protein-1) e MIP-3 α (Macrophage inflammatory protein 3- α) che attraggono, macrofagi e precursori delle cellule di Langerhans (grazie alla presenza sulla superficie di tali cellule del recettore CCR6) nel sito dell'infezione [Sasagawa T et al., 2012]. Inoltre, gli stessi cheratinociti infettati da HPV sono in grado di secernere

chemioattraenti per macrofagi. I macrofagi, raggiunto il sito dell'infezione, si attivano attraverso il riconoscimento di antigeni virali mediato dai TLR e conseguentemente producono citochine pro-infiammatorie (TNF- α , IL-1, IFN- α/β , IL-6, IL-12) con azione antivirale, inclusa la repressione della trascrizione dei geni virali precoci, l'uccisione dei cheratinociti infetti e il reclutamento di cellule dell'immunità adattativa [Routes JM et al., 2005, Kyo S et al., 1994].

Le cellule di Langerhans, che normalmente si trovano a livello epiteliale, quindi anche nella cervice uterina, sono APC (Antigen-Presenting Cell) specializzate, che internalizzano e processano gli antigeni virali e, successivamente, migrano verso i linfonodi, dove cross-presentano l'antigene ai linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ naive, attivando l'immunità adattativa antigene-specifica [Stanley MA, 2012]. Dopo il riconoscimento dell'antigene, i linfociti T CD4⁺ si differenziano in Th1, secernenti citochine pro-infiammatorie (IL-2, IL-12 e IFN- γ) necessarie a sostenere la proliferazione e l'attività citolitica dei CD8⁺, e Th2 che stimolano i linfociti B a produrre anticorpi HPV-specifici; mentre i linfociti CD8⁺ si trasformano in effettori capaci di uccidere le cellule esprimenti gli antigeni di HPV mediante il rilascio di perforina e granzimi B [Sasagawa T et al., 2012] (Figura 9).

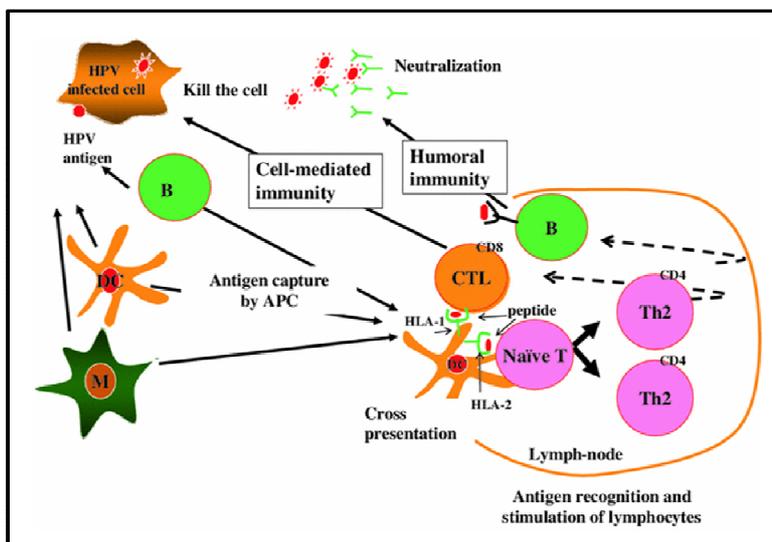


Figura 9. Modello di eventi rappresentante l'immunità locale associata all'infezione da HPV [Sasagawa T et al., 2012].

Durante l'infezione naturale, la regressione delle lesioni indotte da HPV è sempre associata alla presenza di un infiltrato di linfociti T CD4⁺ di tipo Th1 e CD8⁺ citotossici diretti prevalentemente contro le proteine precoci E2 ed E6, mentre l'immunità umorale (anticorpi neutralizzanti) consente di prevenire la diffusione del virus extracellulare ad altre sedi e riduce il rischio di reinfezioni da parte degli stessi tipi di HPV [de Gruijl TD et al., 1998; van der Burg SH et al., 2007].

La risposta immunitaria umorale compare tardivamente circa 8 mesi dall'inizio dell'infezione, ed è principalmente diretta contro epitopi conformazionali presenti nella proteina capsidica L1, esposti sulla superficie esterna del virione. Gli anticorpi contro L1 sono neutralizzanti, in quanto sono in grado di prevenire l'infezione da HPV in diversi modelli sperimentali *in vitro* ed *in vivo* [Kreider JM et al., 1981].

Come detto, il titolo degli anticorpi anti-HPV neutralizzanti nel siero, sviluppato in seguito ad un'infezione naturale, è in genere basso e, inoltre, il 30-50% delle donne con un'infezione persistente non sieroconverte [Wikstrom A et al., 1995; Dillner J, 1999]. Ciò è imputabile alla scarsa esposizione del virus al sistema immunitario, dovuta al ciclo replicativo esclusivamente intra-epiteliale, alla bassa espressione degli antigeni virali e allo scarso effetto citopatico di HPV. Anticorpi della classe IgG e IgA secretorie si trovano, a basso titolo, anche nel muco cervicale [Rocha-Zavaleta L et al., 2003; Passmore J-AS et al., 2007].

Non è ben noto quale sia il grado di protezione né la durata dell'immunità indotta dall'infezione naturale, ma sembra che alcune donne non sviluppino un'efficace risposta anticorpale e rimangano suscettibili alla reinfezione da parte dello stesso tipo di HPV [Carter JJ et al., 2000; Insigna RP et al., 2010].

Molti tipi di HPV, in particolare quelli ad alto rischio oncogenico, hanno sviluppato una serie di strategie per eludere la risposta immunitaria innata e adattativa dell'ospite e instaurare un'infezione persistente [Bodily et al., 2011]:

- le proteine E5, E6 ed E7 riducono l'espressione delle molecole del complesso maggiore d'istocompatibilità di classe I (MHCI) attraverso l'inibizione del fattore trascrizionale Stat-1. Inoltre E7 riduce l'espressione superficiale delle molecole MHCI mediante internalizzazione [Bottley G et al., 2008] e riduce l'espressione della molecola TAP (*transporter*

associated with antigen processing) necessaria per trasportare i peptidi derivati dalla processazione dell'antigene [Ghittoni R et al., 2010];

- la proteina L2 di HPV sopprime la migrazione, la maturazione e la secrezione di citochine delle cellule di Langerhans [Fahey LM et al., 2009];
- le proteine E6 ed E7 inibiscono la secrezione di chemochine (MCP-1, MIP-3 α) da parte dei cheratinociti infetti, impedendo il reclutamento di macrofagi e di precursori delle cellule di Langerhans nel sito dell'infezione [Hacke K et al., 2010, Guess JC et al., 2005];
- le proteine E6 ed E7 interferiscono con la cascata di segnali legata all'Interferone di tipo I. In particolare, la proteina E6 blocca l'azione di IRF-3, mentre E7 interferisce con IRF-1 [Park JS et al., 2000, Um SJ et al., 2002];
- le proteine E6 ed E7 riducono l'espressione dei TLR, in particolare del TLR-9 espresso a livello endosomiale nei cheratinociti e superficiale nei macrofagi infiltranti l'epitelio [Bodily J et al., 2011];
- La proteina E7 induce la secrezione di citochine anti-infiammatorie come IL-10 e TGF- β da parte delle cellule dendritiche infiltranti la cervice uterina favorendo così il differenziamento dei linfociti T regolatori. I T regolatori inibiscono i linfociti CD8⁺ citotossici e gli impediscono di uccidere i cheratinociti infetti [Bhat P et al., 2011];
- La proteina E5 riduce l'espressione del recettore CD1d necessario per svolgere l'attività citotossica delle cellule NK a livello di cheratinociti infettati [Miura S et al., 2010]; inoltre riduce l'espressione delle molecole MHC di classe I sulla superficie dei cheratinociti infetti, che in tal modo non vengono riconosciuti dai linfociti DC8⁺ citotossici [Campo MS et al., 2010];

1.6 HPV E CARCINOMA DELLA CERVICE UTERINA

Il DNA di HPV è individuato nella quasi totalità dei tumori della cervice uterina. In particolare, HPV16 rappresenta il tipo virale più comunemente riscontrato in essi (circa nel 54,4%), seguito da HPV18 (16,5%), da HPV 58 (5,1%), da HPV33 (4,7%) e da HPV45 (4,4%) [Crow JM, 2012]. La restante parte di tumori cervicali contiene generalmente uno (o più di uno) degli altri tipi di HPV ad alto rischio (Figura 10).

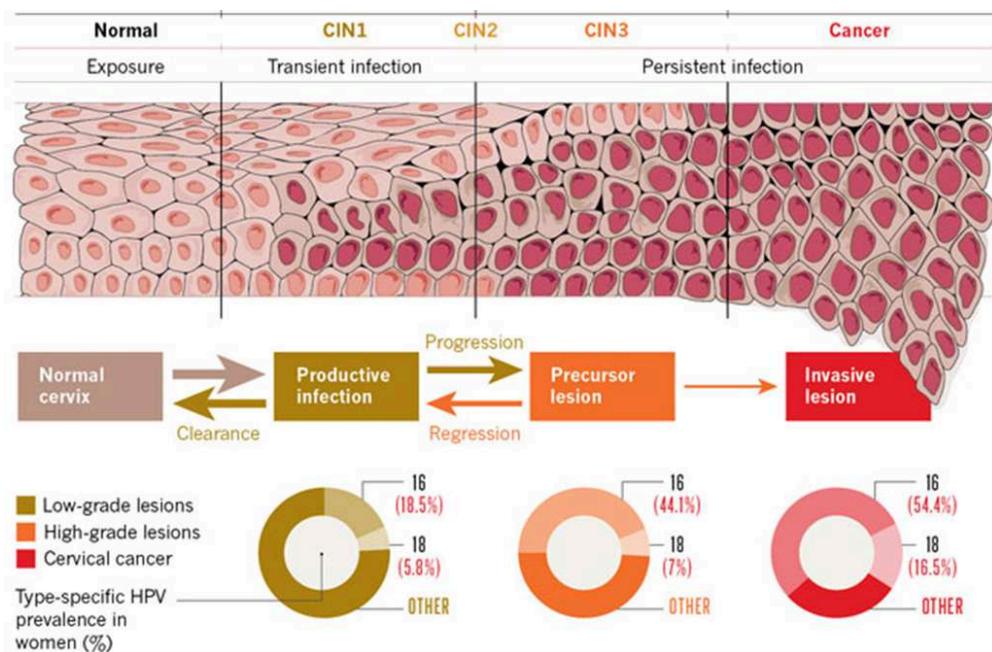


Figura 10. Prevalenza dei genotipi di HPV nelle lesioni della cervice uterina [Crow JM, 2012].

L'instaurarsi dell'infezione persistente causata da HPV è un fattore necessario, anche se non sufficiente, per lo sviluppo del carcinoma [Burd EM et al., 2003]. L'integrazione del DNA virale nel genoma della cellula ospite, l'induzione di instabilità genomica con grossi danni a carico dei cromosomi, l'elusione della risposta immunitaria, l'immortalizzazione e l'incapacità delle cellule infette di andare incontro ad apoptosi concorrono allo sviluppo del carcinoma invasivo. Diversi fattori possono contribuire ad aumentare il rischio di sviluppo di carcinoma della cervice uterina, quali condizioni d'immunodepressione, come nel

caso d'infezione da HIV, predisposizione genetica, l'utilizzo a lungo termine (più di 5 anni) di contraccettivi orali (progesterone ed estrogeni), il fumo di sigaretta e gravidanze multiple (5, 7 o più bambini) [Munoz N et al., 2006]. Inoltre, la co-infezione con altri virus a trasmissione sessuale può indirettamente modificare le barriere dell'epitelio e intervenire nel processo d'infiammazione cervicale. Recenti studi hanno anche dimostrato che alcuni alimenti possono avere un ruolo protettivo nello sviluppo dell'infezione come l'acido folico, le vitamine B, C, E e B12 e il carotene [Munoz N et al., 2006].

La degenerazione neoplastica dell'infezione si verifica, generalmente, in un periodo di 10/20 anni, anche se in alcuni evolve più rapidamente, in 1 o 2 anni [Burd EM et al., 2003]. I cambiamenti iniziali dell'epitelio cervicale, prima della vera e propria degenerazione neoplastica, sono classificati istologicamente (sulla base di una morfologia atipica delle cellule) come neoplasie cervicali intraepiteliali (CIN), caratterizzate da modificazioni displastiche, ossia dalla sostituzione di parte dell'epitelio con cellule indifferenziate.

Le CIN sono ulteriormente classificate in CIN1 (displasie di entità moderata), ovvero LSIL (lesioni squamose intraepiteliali di lieve entità), associate ad una replicazione virale ininterrotta e da un continuo rilascio di virioni, e CIN2 o CIN3, ovvero HSIL (lesioni squamose intraepiteliali severe), che rappresentano le vere e proprie lesioni che precedono il cancro cervicale.

Nella **CIN 1** i due terzi della stratificazione dell'epitelio mostra una sostanziale differenziazione, sebbene possano essere presenti nuclei atipici nello spessore dell'epitelio. Le alterazioni cellulari sono simili all'infezione da HPV o al condiloma piatto.

Nella **CIN 2** solo la metà dell'epitelio mostra differenziazione e maturazione, le anomalie nucleari sono più pronunciate rispetto alla CIN 1 sia quantitativamente che qualitativamente, con irregolarità della membrana nucleare.

Nella **CIN 3** è assente ogni differenziazione maturativa in quasi tutto lo strato dell'epitelio e se presente è limitata agli strati più superficiali. I nuclei sono marcatamente ingranditi. Inoltre, la CIN3 è caratterizzata da aneuploidia cromosomica che fa evolvere le lesioni verso forme maligne [Ramanakumar AV et al., 2010; Stanley M et al., 2003].

I tumori della cervice uterina sono classificati in base alle cellule da cui prendono origine e sono prevalentemente di due tipi: il carcinoma a cellule squamose (80% dei tumori della cervice) e l'adenocarcinoma (circa il 15%).

Si parla di carcinoma a cellule squamose quando il tumore deriva dalle cellule che ricoprono la superficie dell'esocervice e di adenocarcinoma quando, invece, il cancro parte dalle cellule ghiandolari dell'endocervice. Infine, anche se meno comuni (3-5% dei tumori cervicali), esistono tumori della cervice che presentano un'origine mista e sono per questo definiti carcinomi adenosquamosi.

1.7 EPIDEMIOLOGIA DEL CARCINOMA DELLA CERVICE UTERINA

Il carcinoma della cervice uterina continua a rappresentare un importante problema di salute pubblica, e rappresenta una delle cause di malattie trasmesse per via sessuale più diffusa. Come anticipato nelle sezioni precedenti, a livello mondiale è il secondo tumore maligno della donna. Circa il 75-80% delle donne sessualmente attive va incontro ad una infezione causata da HPV almeno una volta nel corso della vita. Ogni anno a livello mondiale si riscontrano più di 530.000 casi di cancro e circa 275.000 decessi, principalmente nei Paesi in via di sviluppo [Bhat P et al., 2011; Longworth MS et al., 2005].

La prevalenza d'infezione alla cervice uterina si manifesta in donne di età compresa tra i 18 e i 30 anni, all'inizio dell'attività sessuale (**Figura 11**).

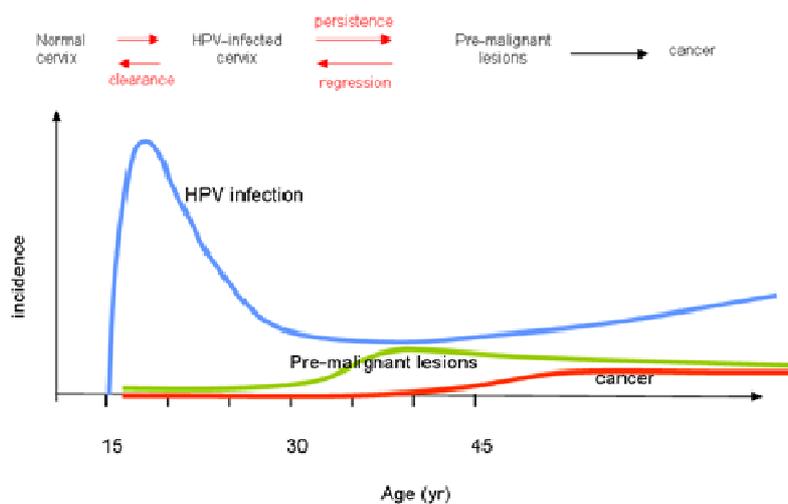


Figura 11. Relazione tra infezione da HPV ed età media di sviluppo del carcinoma alla cervice uterina [Schiffmann M et al., 2005].

Esistono, inoltre, rilevanti differenze geografiche d'incidenza del carcinoma cervicale, legate soprattutto alla diversa diffusione di programmi di screening organizzati per la sua prevenzione. L'80% dei casi d'infezione e l'85% delle morti per tumori della cervice uterina avvengono nei Paesi poveri e in via di sviluppo, dove lo screening e la prevenzione sono insufficienti o addirittura inesistenti [Franco EL et al., 2007; Stanley M et al., 2010].

Uno dei principali ostacoli allo sviluppo di metodi di prevenzione è il costo delle metodiche di screening citologico e, soprattutto, della vaccinazione a cui si associano anche ostacoli di tipo culturale per la somministrazione dei vaccini a ragazze adolescenti [Stanley M et al., 2010].

La maggiore incidenza di sviluppo di cancro è registrata in America del Sud e Caraibi, in Asia e nell'Africa sudorientale (**Figura 12**).

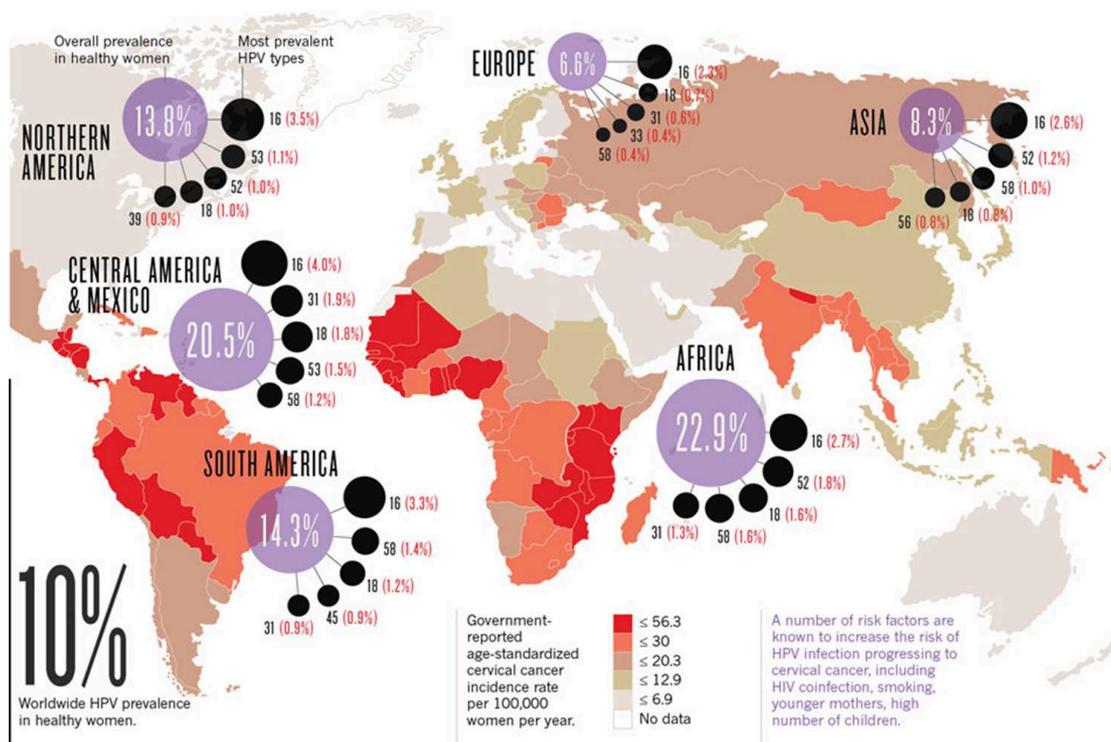


Figura 12. Incidenza del cancro alla cervice nel mondo [Crow JM, 2012].

Le Nazioni che hanno avviato programmi di screening citologico basati sull'offerta del Pap-test alle donne di età compresa tra i 25 ed i 64 anni hanno assistito, nelle ultime decadi, ad un importante decremento di questa neoplasia. L'introduzione del Pap-test ha permesso, infatti, di ridurre del 50-70% l'incidenza

di questa patologia e la mortalità ad essa associata. Le differenze d'incidenza nei paesi industrializzati sono dovute alla forza dei programmi di screening, all'educazione sanitaria e sessuale nelle scuole e alla capacità persuasiva delle campagne pubblicitarie.

1.8 VACCINI PROFILATTICI

La finalità della vaccinazione è di prevenire le patologie correlate alle infezioni causate dagli HPV, principalmente il tumore del collo uterino e le relative lesioni precancerose, nonché di ridurre l'incidenza di altri tumori, lesioni precancerose e altre lesioni benigne, quali i condilomi acuminati. La scoperta cruciale per lo sviluppo di vaccini contro l'infezione causata da HPV fu l'osservazione che le proteine del capsido virale (L1 da sola o L1 + L2), espresse in certi microrganismi, possono assemblarsi in particelle simil-virali (*virus-like particles*, VLP) del tutto analoghe dal punto di vista geometrico e antigenico ai virioni nativi (**Figura 13**) [Kirnbauer R et al., 1992], col vantaggio di non essere infettive né oncogeniche essendo prive del genoma virale [Stanley M et al., 2007].

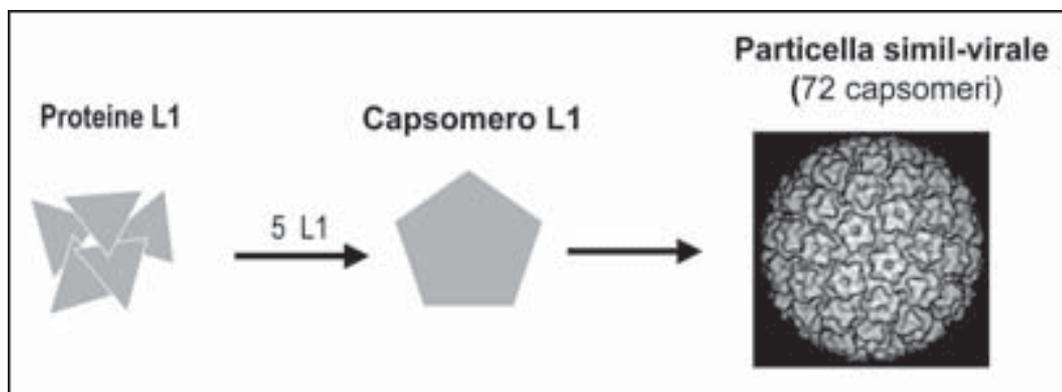


Figura 13. Rappresentazione della modalità di autoassemblamento della proteina capsidica L1 [Frazer et al., 2011].

Furono gli esperimenti pre-clinici di vaccinazione in modelli animali (cane, mucca e coniglio) a dimostrare che le VLP inducono elevati titoli di anticorpi neutralizzanti [Kirnbauer R et al., 1996, Jansen KU et al., 1995, Suzich JA et al., 1995, Christensen ND et al., 1996] capaci di proteggere per lungo tempo l'animale dall'infezione da parte dello stesso tipo di papillomavirus contenuto nel

vaccino. Inoltre, le IgG purificate da animali vaccinati con VLP e somministrate ad altri animali sani conferivano loro un'immunità passiva nei confronti dello stesso papillomavirus vaccinale [Breitburd F et al., 1995, Suzich JA et al., 1995]. Ulteriori esperimenti dimostrarono che solo gli animali vaccinati con le VLP intatte e non denaturate risultavano protetti dall'infezione [Chen Y et al., 1998, Breitburd F et al., 1995].

Gli anticorpi neutralizzanti indotti dalla vaccinazione con VLP non sono prodotti localmente nella mucosa cervicale, ma trasudano o essudano dal siero al muco cervicale [Parr EL, et al., 1997, Nardelli-Haeffliger D et al., 2003]. Il processo di trasudazione è un trasferimento di IgG dai vasi sanguigni alla mucosa genitale mediante un processo di ultrafiltrazione determinato da uno sbilanciamento della forza idrostatica a cavallo dell'endotelio dei vasi. L'essudazione è una lenta fuoriuscita di liquido dal torrente circolatorio verso la mucosa genitale, causato da un microtrauma delle pareti dell'endotelio dei vasi sanguigni (**Figura 14**).

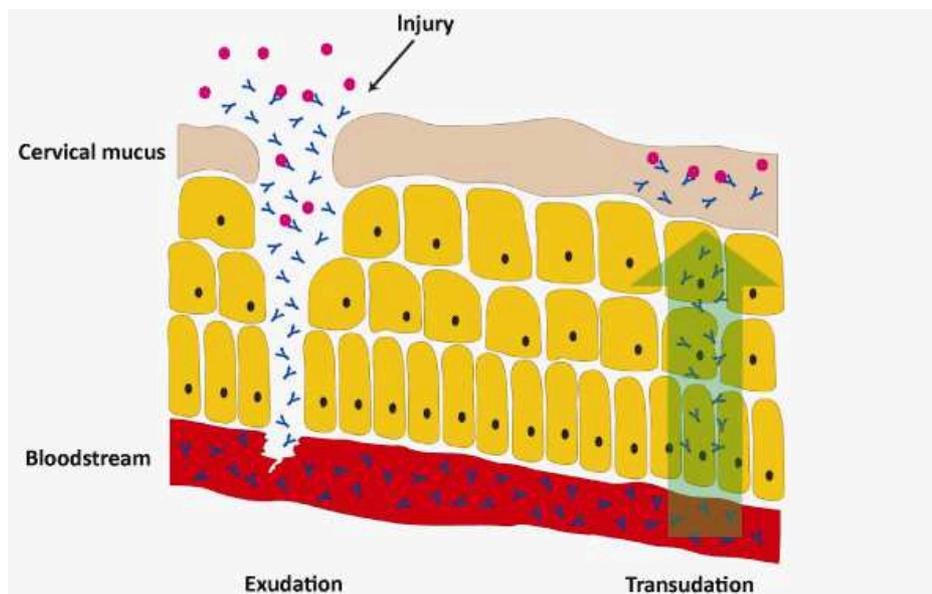


Figura 14. Rappresentazione schematica dei meccanismi di trasudazione ed essudazione degli anticorpi anti-HPV dal sangue periferico al muco cervicale [Garçon N et al., 2012]. Anche nell'uomo numerosi trial clinici di fase II e III hanno dimostrato che la vaccinazione con VLP induce elevati titoli di anticorpi neutralizzanti anti-HPV genotipo-specifici [Schiller JT et al., 2012] e questo, secondo una pubblicazione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, rappresenta il meccanismo principale di protezione dei due vaccini profilattici anti HPV sviluppati fino ad ora.

1.8.1 Efficacia dei vaccini profilattici *Gardasil* e *Cervarix*

Ad oggi sono stati sviluppati due vaccini profilattici in grado di prevenire l'infezione da HPV: 1) *Cervarix* della GlaxoSmithKline (GSK), e 2) *Gardasil* della Merck Sharpe & Dohme [Schiller JT et al., 2012]. Le caratteristiche di entrambi i vaccini sono riassunte nella **Tabella 4**.

Tabella 4. Caratteristiche dei vaccini Cervarix e Gardasil [Schiller JT et al., 2012].

	Cervarix	Gardasil
Azienda produttrice	GlaxoSmithKline	Merck
VLP contenute	HPV 16 e 18	HPV 6, 11, 16 e 18
µg di proteina L1	20/20	20/40/40/20
Cellule produttrici	<i>Trichoplusia ni</i> (Hi 5) Linea cellulare di insetto infettata con Baculovirus esprimente la proteina L1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Cellule di lievito esprimenti la proteina L1
Adiuvante	225 µg alluminio idrossi-fosfato solfato amorfo	500 µg alluminio idrossido 50 µg MPL
Somministrazione	0, 1, 6 mesi	0, 2, 6 mesi
Via di somministrazione	Intramuscolare	Intramuscolare

Cervarix e *Gardasil* hanno ottenuto l'autorizzazione alla commercializzazione in oltre 120 paesi, tra i quali i Paesi dell'Unione Europea e negli USA, rispettivamente, da parte di EMEA (*European Medicines Agency*) e di FDA (*Food and Drug Administration*).

Entrambi i vaccini contengono le VLP dei genotipi ad alto rischio HPV 16 e 18 e prevengono lo sviluppo del tumore alla cervice uterina associato all'infezione persistente di questi due genotipi. Il vaccino *Gardasil*[®], inoltre, contiene le VLP dei genotipi a basso rischio HPV 6 e 11 proteggendo i soggetti vaccinati dallo sviluppo di lesioni benigne ad essi associate, come i condilomi.

In particolare, il vaccino bivalente *Cervarix* contiene le VLP di HPV 16 e 18, prodotte separatamente in cellule d'insetto Hi5, usando come vettore il *Baculovirus*, e poi unite all'adiuvante AS04 (idrossido d'alluminio e monofosforil-lipide A, MPL). Questo vaccino si somministra per via intramuscolare, e necessita di 2 richiami (dopo un mese e dopo 6 mesi dalla prima

inoculazione). *Cervarix* è stato approvato dall'EMA per la commercializzazione nell'UE nel settembre 2007.

Il vaccino quadrivalente *Gardasil*, conosciuto anche con il nome *Silgard*, contiene le VLP di HPV 6, 11, 16 e 18, prodotte separatamente in *Saccharomyces cerevisiae* e unite all'adiuvante alluminio idrossifosfato solfato amorfo. Questo vaccino si somministra per via intramuscolare e, anch'esso, necessita di 2 richiami dopo 2 e 6 mesi dalla prima inoculazione. *Gardasil* è stato approvato dalla FDA nel 2006 negli USA, in Australia, in Canada, in Nuova Zelanda, in Togo, in Messico, in Brasile, in Svizzera. Inoltre, è stato autorizzato dall'EMA per la commercializzazione nell'UE nel settembre 2006 [Markowitz LE et al., 2012].

In tutto il territorio italiano, a partire dal mese di marzo 2008, per le bambine di 11-12 anni di età è partita la campagna gratuita di vaccinazione anti-HPV. Alcune regioni hanno offerto la vaccinazione gratuita anche alle adolescenti e alle donne di età compresa tra 12 e 25 anni. Inoltre, da un anno circa è cominciata anche la campagna di vaccinazione per i ragazzi d'età compresa tra 16 e 25 anni.

I trial clinici hanno dimostrato che entrambi i vaccini sono sicuri, con moderati sintomi di dolore nel sito di iniezione, comunque comparabili nel gruppo dei vaccinati e in quello di controllo [Garland SM et al., 2007, *FUTURE II Study Group*, 2007, Descamps D et al., 2009, Lu B et al., 2011]. I soggetti vaccinati con *Cervarix*, nel 92,9% dei casi lamentano dolore nel sito di iniezione rispetto al 71,6% dei soggetti vaccinati con *Gardasil*. Tale differenza si pensa sia imputabile alla presenza di MPL nel *Cervarix*. Questa molecola, uno dei due costituenti dell'adiuvante, è la porzione detossificata del lipopolisaccaride, un composto in grado di innescare una reazione infiammatoria. Mal di testa e senso di affaticamento sono riportati nel 50-60% dei partecipanti agli studi in entrambi i gruppi (vaccinati e controllo). Tutti i sintomi riportati sono comunque transienti e risolti spontaneamente e non aumentano con la somministrazione delle dosi successive alla prima. Il numero di eventi avversi associati alla somministrazione dei vaccini è risultato estremamente basso e paragonabile a quello del gruppo di controllo [Schiller JT et al., 2012]. Inoltre, la Commissione sulla sicurezza dei vaccini dell'Organizzazione Mondiale della Sanità e l'Istituto di Medicina hanno recentemente pubblicato una revisione di tutti i dati fino ad ora disponibili su

Gardasil e *Cervarix*, basati su oltre 60 milioni di dosi distribuite nel mondo, che dimostra evidenze cumulative sulla sicurezza di questi vaccini [WHO, 2012, Institute of Medicine, 2012].

Oltre alla sicurezza, l'immunogenicità e l'efficacia di entrambi i vaccini sono state valutate in tre grossi studi clinici (controllati, randomizzati in doppio cieco) di fase III: FUTURE I e II, studi sponsorizzati dalla Merck [Garland SM et al., 2007, FUTURE II Study Group, 2007], PATRICIA, sponsorizzato dalla GlaxoSmithKline [Paavonen J et al., 2007] e CVT (Costa Rica HPV Vaccine Trial) pagato dal governo americano [Herrero R et al., 2008]. Gli studi sponsorizzati dalle aziende produttrici i vaccini sono multicentrici, hanno coinvolto oltre 90 Paesi tra Europa, Nord e Sud America, Asia e Australia, con quasi 40.000 adolescenti e donne arruolate, di età compresa tra i 16 e i 26 anni.

Dai dati pubblicati, fino a 4 anni dall'arruolamento negli studi di fase III entrambi i vaccini hanno dimostrato un'efficacia superiore al 95% nel proteggere le ragazze vaccinate dalle lesioni cervicali di grado II e III e dall'adenocarcinoma *in situ*, associate ai genotipi 16 e 18 di HPV. Inoltre, entrambi i vaccini si sono dimostrati in grado di prevenire la neoplasia di alto grado della vulva (VIN 2/3) e della vagina (VaIN 2/3) causati da HPV 16 e 18 [Schiller JT et al., 2012]. Tale efficacia è estremamente elevata solo se si considera la coorte di individui che al momento dell'arruolamento e per la durata del periodo di somministrazione del vaccino non abbiano contratto l'infezione da HPV 16 o 18 (assenza di anticorpi HPV 16 e 18-specifici, assenza di HPV DNA nell'esame citologico). Il vaccino *Gardasil* è risultato, inoltre, in grado di prevenire le lesioni genitali benigne, come i condilomi acuminati, indotte da HPV 6 e 11 [Garland SM et al., 2007, Ault KA et al., 2007].

L'efficacia di entrambi i vaccini nel proteggere dall'insorgenza di lesioni cervicali di grado II e III e di lesioni neoplastiche della vulva e della vagina è risultata inferiore al 50% nel caso in cui i soggetti arruolati negli studi di fase III avessero già contratto un'infezione da HPV 16 o 18 precedentemente alla somministrazione del vaccino. Inoltre, nel caso di individui con un'infezione in corso da HPV 16 o 18, la somministrazione di *Gardasil* o *Cervarix* non favoriva la regressione dell'infezione cervicovaginale e neppure rallentava la progressione

delle lesioni neoplastiche cervicali di grado superiore al II [*Haupt R et al., 2011, Lehtinen M et al., 2012*].

Negli studi di fase III PATRICIA e FUTURE I e II sono state arruolate anche donne di età compresa tra i 24 e i 45 anni (circa 4000 donne). Le analisi dei risultati sono ancora in corso, ma è stato dimostrato fino ad ora che il *Gardasil* ha un'efficacia dell'88,7% nel prevenire le infezioni causate dagli HPV vaccinali e le relative lesioni neoplastiche nel caso in cui non ci sia stata un'esposizione ai virus precedente la somministrazione del vaccino; in caso contrario l'efficacia si riduceva al 22,4% nell'impedire l'insorgenza di lesioni cervicali di grado superiore al II e all'8,5% nel prevenire l'insorgenza di lesioni genitali esterne [*Castellsaguè X et al., 2011*].

Poiché il 25-30% dei tumori cervicali nel mondo è associata a genotipi ad alto rischio di HPV diversi dal 16 e dal 18, è importante sapere se *Gardasil* e *Cervarix* siano in grado di proteggere gli individui vaccinati anche da altri genotipi di HPV, non inclusi nella formulazione vaccinale. Gli studi di fase III non sono stati specificamente disegnati per valutare questo obiettivo, ma comunque i risultati fino ad ora ottenuti dimostrano che *Cervarix* è in grado di prevenire l'infezione da HPV45, filogeneticamente simile ad HPV18 (efficacia del 79% studio PATRICIA e del 73% studio CVT), mentre *Gardasil* fallisce in questo senso (efficacia del 7,8% studio FUTURE I/II). Entrambi i vaccini si dimostrano efficaci nel proteggere anche da alcuni genotipi filogeneticamente simili ad HPV16, come HPV31 e 33 (efficacia del 46,2% per *Gardasil* e del 77,1% per *Cervarix*) [*Brown DR et al., 2009, Wheeler CM et al., 2012*]. In ogni caso, mentre la capacità di entrambi i vaccini di proteggere dall'insorgere delle infezioni dei genotipi di HPV vaccinali rimane superiore al 90% anche dopo 6,4 anni dopo la vaccinazione, la protezione nei confronti dei genotipi non vaccinali non è duratura nel tempo, poiché dopo tre anni dalla somministrazione del vaccino l'incidenza delle infezioni da HPV31 e 45 aumenta considerevolmente [*Schiller JT et al., 2012*].

Riassumendo, è possibile affermare che i vaccini *Gardasil* e *Cervarix* hanno un'efficacia massima se vengono somministrati prima che insorgano le infezioni vaccino-correlate, cioè in età prepuberale prima dei primi rapporti sessuali. Non sembrano possedere attività terapeutiche e anche la capacità di proteggere

dall'insorgenza di infezioni causate da HPV ad alto rischio non inclusi nel vaccino sembra sia limitata ad alcuni genotipi e comunque non sia di lunga durata.

Attualmente, negli Stati Uniti, in Australia e in Canada, *Gardasil* è stato approvato anche per l'uso nei ragazzi e negli uomini di età compresa tra 9 e 26 anni per la prevenzione del tumore dell'ano causato dai tipi HPV 16 e 18 e per la prevenzione delle displasie anali e delle lesioni precancerose causate dai tipi HPV 6, HPV 11, HPV 16 e HPV 18 e per la prevenzione dei condilomi genitali causati dai tipi di HPV 6 e 11 [CDC, 2011].

1.8.2 Risposte immuni indotte dai vaccini *Gardasil* e *Cervarix*

La sorveglianza immunologica della popolazione che ha ricevuto la vaccinazione anti-HPV è estremamente importante, poiché i dati che si accumuleranno nel corso degli anni saranno utili per stabilire la correlazione tra l'efficacia di protezione e la tipologia di risposte immunitarie indotte dai vaccini, e capire se e quando sarà necessaria una dose di richiamo del vaccino. Conoscere quali risposte immunitarie e di che entità, in termini di intensità e durata, può fornire indicazioni per poter estendere la vaccinazione anche a fasce di popolazione che non sono state incluse negli studi clinici di fase III, come i preadolescenti, e capire se offrono una copertura anche nei confronti di altri genotipi ad alto rischio associati a patologie neoplastiche. Inoltre, tali informazioni sono utili per sviluppare nuovi vaccini profilattici, basati su altre molecole antigeniche oppure vaccini terapeutici. Confrontare i risultati di immunogenicità non è stato semplice, poiché non esiste una metodica standard ufficialmente riconosciuta a livello mondiale per misurare le risposte umorali e cellulari indotte dai vaccini anti-HPV [Schiller JT et al., 2009]. I saggi più frequentemente utilizzati sono il saggio ELISA e il saggio di neutralizzazione. Il primo misura la totalità degli anticorpi policlonali genotipo-specifici diretti contro tutti gli epitopi presenti sul capsido virale (conformazionali, lineari, di superficie o interni); mentre il secondo quantifica gli anticorpi policlonali neutralizzanti genotipo-specifici, cioè quegli anticorpi che legano porzioni specifiche della superficie del virione impedendo ad esso di infettare la cellula bersaglio. Altri saggi utilizzati sono il cLIA (*Competitive Luminex Immunoassay*) in grado di quantificare la presenza di alcuni anticorpi monoclonali

neutralizzanti anti-HPV e il saggio B-cell Elispot che consente di quantificare la sorgente degli anticorpi, cioè il numero di plasmacellule e di linfociti B della memoria specifici per gli antigeni vaccinali (e questo verrà dettagliatamente descritto nei capitoli successivi).

Gardasil e *Cervarix* stimolano la produzione di anticorpi neutralizzanti genotipo-specifici verso la proteina del capsido L1 con titoli anticorpali 80-100 volte superiori a quelli misurati dopo l'infezione naturale sia in adolescenti sia in donne (16-45 anni studio FUTURE I/II, 15-55 anni studio PATRICIA) [Carter JJ et al., 2000]. La sierconversione indotta dai vaccini anti-HPV, dopo 1 mese dalla somministrazione dell'ultima dose, è del 100% per ciascuno degli antigeni vaccinali [Romanowski B et al., 2009, Brown DR et al., 2011], mentre in seguito all'infezione naturale solo nel 50-70% delle donne si riscontra la presenza di anticorpi anti-L1. I titoli anticorpali, sia totali sia neutralizzanti, raggiungono il loro picco 1 mese dopo l'ultima dose di vaccino e decrescono lentamente nel corso dei successivi 2 anni per poi stabilizzarsi. I titoli anticorpali decrescono più velocemente nelle donne adulte rispetto alle adolescenti per entrambi i vaccini, ma anche dopo 4 anni dalla vaccinazione, in tutte le fasce d'età, la percentuale di sierconversione rimane superiore al 91,5% per HPV16 per entrambi i vaccini; tale valore è superiore al 90% per HPV18 nei soggetti vaccinati con *Cervarix*, mentre scende al 47,9% nei soggetti vaccinati con *Gardasil* [Castellsagué X et al., 2009, Schwarz TF et al., 2009].

Dai risultati disponibili in letteratura, è emerso che entrambi i vaccini stimolano la produzione di anticorpi, anche neutralizzanti, diretti contro altri genotipi di HPV, in particolare HPV31 e 45. I titoli anticorpali misurati sono comparabili tra *Cervarix* e *Gardasil*, ma rappresentano meno dell'1% delle risposte umorali indotte nei confronti degli antigeni vaccinali [Einstein MH et al., 2011].

Ad oggi solo due studi sono stati eseguiti per comparare direttamente le risposte immunitarie di *Gardasil* e *Cervarix* in coorti di età differenti: 12-15 anni [Draper E et al., 2013] e 18-45 anni [Einstein MH et al., 2009]. Da tali studi è emerso che il vaccino *Cervarix* stimola una produzione di anticorpi totali e neutralizzanti superiore rispetto a quelli indotti dal *Gardasil*, con titoli 2,3-4,8 volte superiori per HPV16 e 6,8-9,1 volte superiori per HPV18 in funzione dell'età di

somministrazione del vaccino. Entrambi i vaccini stimolano, inoltre, la generazione di linfociti T CD4⁺ helper specifici contro la proteina L1 delle VLP vaccinali e di cellule B memoria HPV genotipo-specifiche, ma le percentuali dei cloni reattivi di linfociti T e B indotti dal *Cervarix* sono superiori rispetto a quelle indotte dal *Gardasil* [Einstein MH et al., 2009].

1.9 SCOPO DEL LAVORO

Studi clinici randomizzati controllati nelle donne tra 16 e 26 hanno dimostrato l'immunogenicità e la notevole efficacia dei vaccini profilattici *Gardasil* e *Cervarix*. Ad oggi, però, ci sono ancora molti quesiti aperti, in particolare non esiste alcuno studio in grado di fornire dati sulla durata a lungo termine dell'immunità umorale e cellulare indotta dai vaccini anti-HPV e, quindi, non è possibile affermare se e quando sarà necessaria una dose di richiamo del vaccino o se un ciclo vaccinale di sole due dosi conferisca una protezione identica al ciclo attualmente in uso di tre dosi.

La maggior parte dei dati di efficacia e di risposte immuni indotte dai vaccini anti-HPV provengono dalle aziende produttrici dei vaccini stessi, e sono risultati importanti e robusti dal punto di vista statistico grazie all'elevata numerosità degli individui arruolati. Tuttavia, è fondamentale che studi indipendenti forniscano ulteriori risultati per confermare ciò che è stato fino ad ora pubblicato in letteratura e per generare nuovi dati per le domande ancora prive di risposta. In particolare, molti studi, sponsorizzati dalle aziende e indipendenti, si sono concentrati soprattutto sulla misurazione degli anticorpi neutralizzanti, mediante il saggio *in vitro* con pseudovirioni o degli anticorpi totali con il saggio ELISA. I titoli degli anticorpi anti-HPV dopo un picco iniziale diminuiscono e possono non essere più misurabili a distanza di numerosi anni dalla vaccinazione, ma questo non significa che la protezione conferita dal vaccino si sia esaurita. Proprio per questo motivo, per poter valutare la durata a lungo termine delle risposte umorali indotte dai vaccini anti-HPV è indispensabile quantificare i linfociti B memoria circolanti che sono la sorgente immediata degli anticorpi in caso di infezione.

In questo contesto si inserisce il mio progetto di Dottorato, svolto presso il Dipartimento di Medicina Molecolare dell'Università di Padova, con i seguenti obiettivi:

- Sviluppare saggi B-cell Elispot (*Enzyme Linked Immuno-Spot*) per identificare e quantificare *ex-vivo*, in modo specifico e sensibile in un campione di sangue periferico, il numero totale dei linfociti B secernenti anticorpi, e tra questi il numero di cellule B memoria secernenti anticorpi specifici contro la proteina L1 di HPV6, 11, 16 ed 18;
- quantificare la frequenza dei linfociti B memoria, i titoli anticorpali e l'avidità anticorpale anti-HPV 6, 11, 16 e 18 in soggetti italiani vaccinati con *Gardasil* (Regione Veneto) o *Cervarix* (Regione Emilia Romagna), stratificati: a) in due coorti di età, 12 anni e 20-45 anni, per valutare se l'entità delle risposte immunitarie varia in funzione dell'età di somministrazione del vaccino, b) in due coorti per tempo trascorso dalla vaccinazione, 1-6 mesi e 4 anni, per misurare la durata delle risposte immunitarie di tipo umorali.

I dati generati da questo studio potranno essere utili alla sanità pubblica per creare un sistema di sorveglianza immunologica della popolazione che ha ricevuto la vaccinazione anti-HPV in Italia e soprattutto per pianificare nuove campagne vaccinali.

2. MATERIALI E METODI

2.1 PRODUZIONE DEI PLASMIDI CONTENENTI I GENI L1 E L2 DI ALCUNI GENOTIPI DI HPV (HPV6, 11, 16, 18)

2.1.1 Plasmidi

I plasmidi p6sheLLr+, p16sheLL e p18sheLL utilizzati in questo studio derivano dal plasmide pBR322 mentre il plasmide p11L1h deriva dal plasmide pcDNA3.1. Essi contengono 1) i geni L1 e/o L2 dei genotipi 6, 11, 16 e 18 di HPV sotto il controllo trascrizionale del promotore di CMV e del segnale di poliadenilazione del gene della beta globina umana, in modo da potere essere espressi in cellule umane; inoltre, i geni L1 e L2 sono separati dalla sequenza IRES (*internal ribosomal entry site*) di poliovirus che consente un'efficiente espressione proteica; 2) l'origine di replicazione di SV40 che ne consente l'amplificazione nelle cellule 293TT; 3) il gene per la resistenza all'ampicillina che permette la selezione e l'isolamento delle cellule batteriche trasformate.

I plasmidi p6sheLLr+ (**Figura 15**), p16sheLL (**Figura 16**) e p18sheLL (**Figura 16**) sono stati donati dal Dott. JT Schiller del National Institute of Health (NIH, Bethesda, MD) (<http://home.ccr.cancer.gov/lco/>). Il plasmide p11L1h (**Figura 15**) è stato donato dal Dott. Martin Muller del German Cancer Research of Heidelberg.

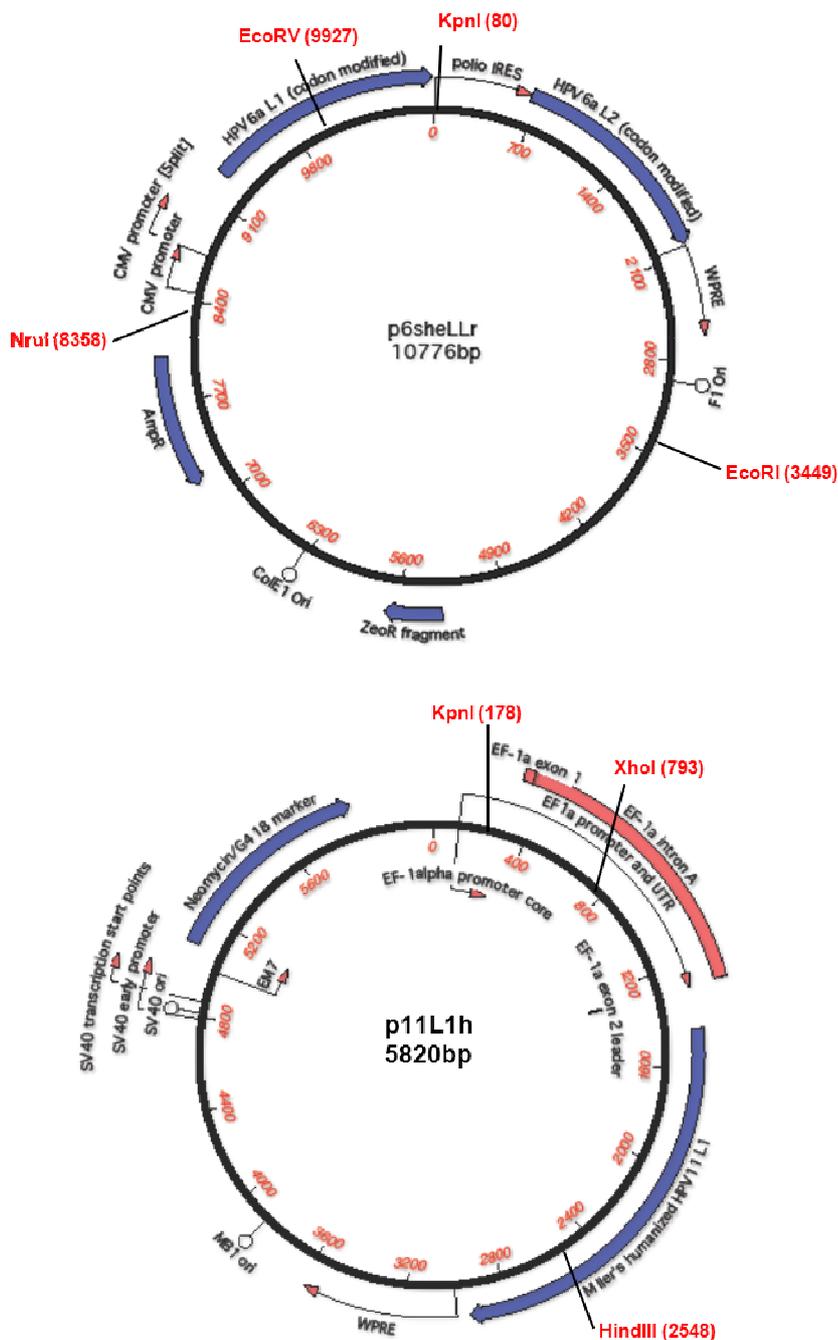


Figura 15. Mappa linearizzata dei plasmidi p6sheLLr+ (pannello superiore) e p11L1h (pannello inferiore). I plasmidi contengono (in senso orario) i geni L1 (p6sheLLr+ e p11L1h) e L2 (p6sheLLr+) posti sotto il controllo del promotore di CMV (in posizione 5' rispetto al gene L1) e il segnale di poliadenilazione del gene della beta globina umana (in posizione 3' rispetto al gene L2). Entrambi i plasmidi contengono, inoltre, il gene che conferisce resistenza batterica all'ampicillina. Le sequenze dei plasmidi sono state scaricate dal sito <http://home.ccr.cancer.gov/lco/> per il plasmide p6sheLLr+ e fornita dal Dott. Muller per il plasmide p11L1h e successivamente rielaborate sul sito <http://www.addgene.org>.

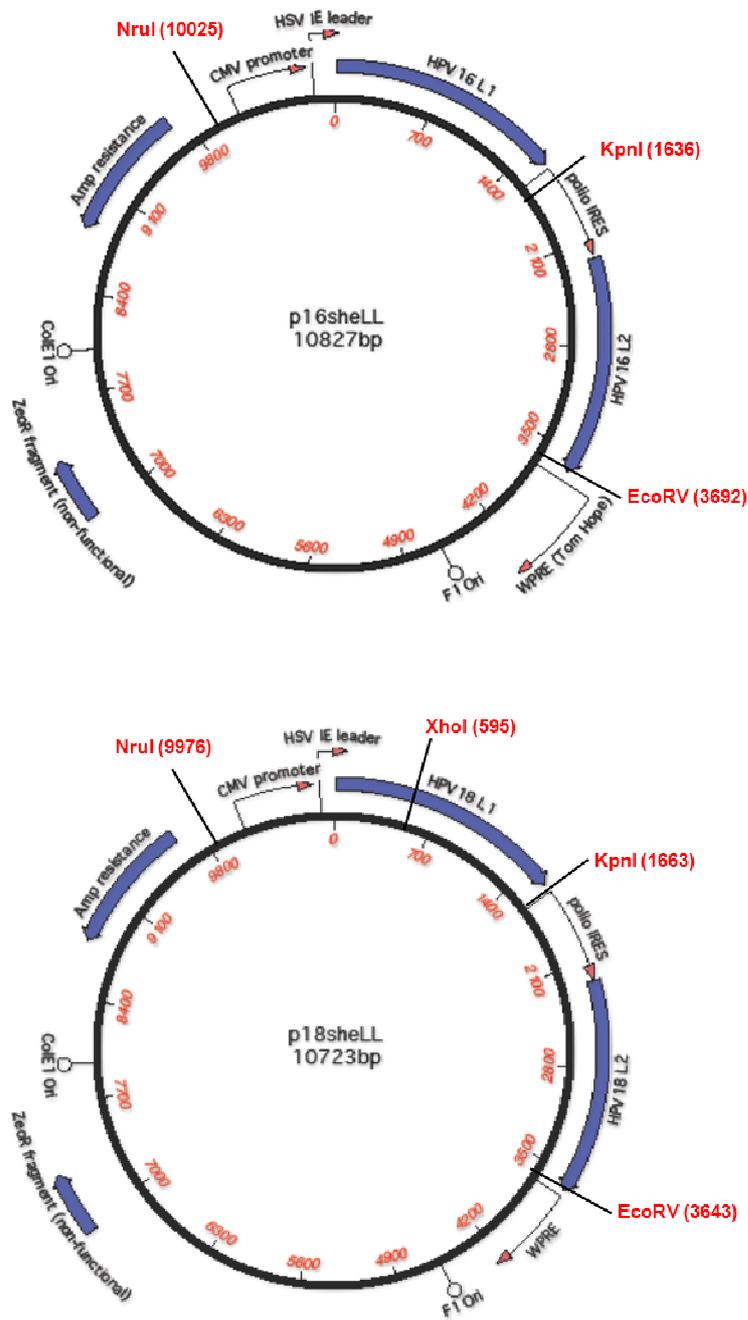


Figura 16. Mappa grafica dei plasmidi p16sheLL (pannello superiore) e p18sheLL (pannello inferiore). I plasmidi contengono (in senso orario) i geni L1 e L2 posti sotto il controllo del promotore di CMV (in posizione 5' rispetto al gene L1) e il segnale di poliadenilazione del gene della beta globina umana (in posizione 3' rispetto al gene L2). Entrambi i plasmidi contengono, inoltre, il gene che conferisce resistenza batterica all'ampicillina. Le sequenze dei plasmidi sono state scaricate dal sito <http://home.ccr.cancer.gov/lco/> e successivamente rielaborata sul sito <http://www.addgene.org>.

2.1.2 Ceppi batterici e terreni di coltura

I plasmidi sono stati utilizzati per trasformare il ceppo di batteri competenti XL-10 Gold[®] Ultracompetent Cells (Stratagene). Tali cellule batteriche posseggono un fenotipo Hte (Highest possible Transformation Efficiencies) che consente la trasformazione efficiente di molecole di DNA di grandi dimensioni. Inoltre, l'assenza di geni codificanti per endonucleasi e ricombinasi (rispettivamente *endA* e *recA*) assicura una migliore qualità del DNA plasmidico estratto e una maggiore stabilità del gene inserito nel plasmide. I batteri XL-10 Gold[®] Ultracompetent Cells sono stati conservati a -80 °C fino al momento del loro utilizzo.

I terreni liquidi utilizzati per la trasformazione e la successiva crescita dei batteri sono rispettivamente i terreni SOC (*Super Optimal broth with Catabolite repression*) e LB (*Luria Broth*) nei quali i batteri crescono in sospensione.

La loro composizione è la seguente:

- 1) il terreno SOC è composto dai seguenti reagenti disciolti in 1 litro di H₂O distillata: 20 g di Triptone, 5 g di estratto di lievito, 2 ml di NaCl 5 M, 2,5 ml di KCl 1M, 10 ml di MgCl₂ 1M, 10 ml MgSO₄ 1M, 20 ml di glucosio;
- 2) il terreno LB è composto dai seguenti reagenti disciolti in 1 litro H₂O distillata: 5 g di NaCl, 10 g di triptone e 5 g di estratto di lievito per litro.

Per isolare, invece, singole colonie batteriche è stato utilizzato il terreno LBA (*Luria Broth Agar*), un terreno solido che si ottiene mediante aggiunta di agar (15 g/litro) al terreno liquido LB.

A tutti i terreni, liquidi e solidi, successivamente alla sterilizzazione mediante autoclavatura, è stata aggiunta l'ampicillina alla concentrazione finale di 100 µg/ml. I terreni sono stati conservati a 4 °C fino al momento dell'utilizzo.

L'ampicillina (Sigma-Aldrich) è stata precedentemente risospesa in acqua distillata alla concentrazione di 100 mg/ml, aliquotata e conservata a -20 °C.

2.1.3 Trasformazione batterica

I batteri competenti XL-10 Gold[®] Ultracompetent Cells sono stati trasformati con i plasmidi di HPV seguendo le istruzioni della Ditta. Brevemente, le cellule sono state scongelate in ghiaccio, aliquotate (100 µl/tubo) in tubi da 14 ml con il fondo a U, precedentemente raffreddati a 4 °C, in presenza di 4 µl di β-mercaptoetanololo,

e incubate per 10 minuti in ghiaccio. Successivamente, le cellule sono state incubate con 100 pg di DNA plasmidico in ghiaccio per 30 minuti. Dopo l'incubazione con il DNA, le cellule sono state sottoposte a *shock* termico per 30 secondi a 42 °C e nuovamente incubate in ghiaccio per 2 minuti. Infine, 900 µl di terreno SOC (preriscaldato a 42 °C) sono stati aggiunti alle cellule che sono state poi incubate a 37 °C per 1 ora in agitazione. La sospensione batterica è stata infine seminata (50 o 200 µl) in piastre di LB agar, contenenti ampicillina, e incubate a 37 °C per 16-20 ore.

Per ciascun DNA plasmidico sono state individuate sulla piastra di agar 3 colonie, che sono state prelevate e seminate in un piccolo volume di LB addizionato di ampicillina e incubate a 37 °C per 16-20 ore. La sospensione batterica ottenuta è stata utilizzata per l'estrazione del DNA plasmidico, come descritto nel successivo paragrafo e, dopo gli opportuni controlli, per generare degli *stock* di batteri. In particolare, i ceppi batterici trasformati con i plasmidi desiderati sono stati conservati in aliquote da 1 ml a -80 °C dopo avere mescolato un uguale volume di coltura batterica e di glicerolo.

2.1.4 Estrazione del DNA plasmidico su piccola (miniprep) e larga (maxiprep) scala

L'estrazione del DNA plasmidico prevede tre fasi operative principali: 1) la lisi cellulare mediante l'aggiunta di una soluzione alcalina al pellet batterico, che induce la denaturazione del DNA e delle proteine; 2) la neutralizzazione, che prevede l'aggiunta di una soluzione contenente sodio acetato e determina la precipitazione delle grosse molecole cellulari, incluse le proteine e il DNA cromosomico, ma non del DNA plasmidico che in queste condizioni si rinatura e rimane in soluzione; 3) la purificazione del DNA plasmidico mediante l'uso di colonne contenenti resine equilibrate con tamponi a bassa concentrazione salina, in grado di trattenere solo le molecole di DNA plasmidico che, successivamente, sono eluite mediante utilizzo di tamponi ad elevata concentrazione salina.

A partire da 3 colonie batteriche, selezionate dopo la trasformazione su piastra di LB agar, sono state allestite 3 colture liquide (mini-inoculo) di 5 ml ciascuna di terreno LB contenente ampicillina (100 µg/ml). Dopo incubazione a 37 °C in

agitazione per 16-20 ore, le cellule sono state raccolte mediante centrifugazione a 4000 rpm per 5 minuti (Centrifuge 5418R, eppendorf) e il DNA plasmidico è stato purificato su piccola scala (miniprep) utilizzando il kit commerciale “*High Pure Plasmid Isolation*” (Roche) seguendo le istruzioni della Ditta. Il pellet di DNA plasmidico ottenuto è stato risospeso in 100 µl di 10 mM Tris-HCl, pH 8.5, e conservato a -20 °C fino al momento dell’utilizzo. La concentrazione di ciascun DNA plasmidico è stata determinata mediante lettura dell’assorbanza di un’aliquota di DNA (2 µl) allo spettrofotometro Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific). L’assorbanza è stata letta alle lunghezze d’onda 260 nm (picco di assorbimento del DNA) e 280 nm (picco di assorbimento delle proteine). Il rapporto tra A260/A280 è stato calcolato per valutare la purezza del DNA plasmidico estratto.

Ciascuna aliquota di DNA plasmidico è stata quindi caratterizzata mediante digestione con enzimi di restrizione (vedasi paragrafo successivo). Infine, le colonie batteriche, contenenti il DNA plasmidico con le dimensioni e le caratteristiche attese, sono state utilizzate per allestire nuove colture liquide per la produzione e la purificazione su larga scala di ciascun DNA plasmidico.

Brevemente, 2,5 ml di mini-inoculo sono stati aggiunti a 500 ml di terreno LB addizionato di ampicillina (100 µg/ml) e la coltura batterica è stata incubata in agitazione a 37 °C. Per massimizzare la replicazione del DNA plasmidico, quando la densità ottica OD₆₀₀ della coltura batterica ha raggiunto un valore di 0,4-0,5 (dopo 10-12 ore di incubazione), è stato aggiunto cloramfenicolo ad una concentrazione finale di 170 µg/ml e la coltura è stata incubata in agitazione per ulteriori 12-16 ore a 37 °C in agitazione. Il cloramfenicolo utilizzato (Sigma-Aldrich) è stato precedentemente sciolto in etanolo 96% e conservato a -20 °C. Al termine dell’incubazione, le cellule sono state raccolte mediante centrifugazione e il DNA plasmidico (maxiprep) è stato estratto con il kit commerciale QIAGEN® *Plasmid MAXI Kit* (QIAGEN).

Al termine della purificazione, il DNA plasmidico è stato raccolto mediante precipitazione con isopropanolo e lavato con etanolo al 70% (v/v), per rimuovere i sali usati nella fase di lisi e neutralizzazione. Il pellet di DNA è stato poi risospeso in 500 µl di soluzione acquosa contenente 10 mM Tris-HCl e 1 mM

EDTA a pH 7,5, letto allo spettrofotometro per determinare la sua concentrazione ed analizzato mediante digestione con enzimi di restrizione. Il DNA plasmidico, ottenuto dalle maxiprep, con le caratteristiche desiderate è stato diluito ad una concentrazione di 1 µg/µl, aliquotato (50 µl/vial) e conservato a -20 °C fino al momento dell'utilizzo.

2.1.5 Digestione del DNA plasmidico con enzimi di restrizione

Ogni DNA plasmidico è stato digerito con opportuni enzimi di restrizione, scelti sulla base della sequenza nucleotidica del plasmide mediante il programma *Nebcutter* (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>).

Le digestioni sono state effettuate in un volume finale di 20 µl in H₂O distillata, utilizzando 0,5 µg di DNA plasmidico, 1U del relativo enzima di restrizione (New England Biolabs) e un *buffer* (specifico per ciascun enzima, New England Biolabs) ad una concentrazione finale 1X. Le reazioni di digestione sono state eseguite alla temperatura di 37 °C per due ore. Per ciascun plasmide si è analizzata anche un'aliquota (0,5 µg) di DNA non digerito risospesa in 20 µl di H₂O distillata.

Per ciascuna digestione, gli enzimi di restrizione utilizzati e le dimensioni dei frammenti attesi per ogni plasmide sono indicati nella **Tabella 5** di seguito riportata.

Tabella 5. Schema delle digestioni dei plasmidi di HPV

PLASMIDE	ENZIMI DI RESTRIZIONE	FRAMMENTI ATTESI
p6sheLLr+	Non digerito	10776 bp
	KpnI + EcoRI	3369 bp + 7407 bp
	KpnI + NruI	2498 bp + 8278 bp
	EcoRV	10776 bp (lineare)
p11L1h	Non digerito	5820 bp
	HindIII + XhoI	1755 bp + 4065 bp
	BamHI	1575 bp + 4245 bp
	KpnI	5820 bp (lineare)
p16sheLL	Non digerito	10827 bp
	KpnI + NruI	2438 bp + 8389 bp
	KpnI + EcoRV	2056 bp + 8771 bp
p18sheLL	Non digerito	10723 bp
	KpnI + EcoRV	1980 bp + 8743 bp
	KpnI + NruI	2419 bp + 8313 bp
	XhoI	10723 bp (lineare)

Terminata la digestione, a ciascun campione di DNA plasmidico, digerito e non digerito, sono stati aggiunti 4 µl di tampone di caricamento 6X (soluzione contenente 30% di glicerolo e 0,25% di Blu di bromofenolo) e sono stati caricati, insieme ad un marcatore di pesi molecolari (λDNA/HindIII fragment, Invitrogen) su gel di agarosio 0,8% contenente GelRed™ (Biotium). Il gel è stato corso per due ore a 80V in tampone TBE 1X (9 mM Tris-borato, 1 mM EDTA pH 8,0). Terminata la migrazione, i gel sono stati visualizzati e fotografati con il transilluminatore a UV (Gel-Doc 1000, Bio-Rad).

2.2 PRODUZIONE E PURIFICAZIONE SU LARGA SCALA DI VIRUS-LIKE PARTICLES (VLP)

2.2.1 Linee cellulari

Le cellule 293TT sono una linea di cellule embrionali umane esprimenti in modo stabile la proteina E1A di Adenovirus di tipo 5 e alti livelli dell'antigene T di SV40 [Graham *et al.*, 1977]. Esse costituiscono un contesto cellulare molto favorevole per un'efficiente replicazione di plasmidi esogeni contenenti l'origine di replicazione di SV40 e sono ampiamente utilizzate per produrre *stock* ad alto titolo di virus ricombinanti e di pseudovirioni.

Le cellule 293TT, gentilmente donate dal Dott. J. Schiller del National Institute of Health (NIH, Bethesda, MD) sono state mantenute in coltura in un terreno Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco Life Technologies) contenente siero fetale bovino al 10% (FBS, Lonza), 1% di soluzione antibiotica-antimicotica (Gibco Life Technologies), 1% di Glutamax (Gibco Life Technologies), 1% di aminoacidi non essenziali (MEM NEAA 100X, Gibco Life Technologies) e 250 µg/ml di igromicina B (Sigma-Aldrich). Le cellule sono state cresciute in incubatore umidificato a 37 °C e CO₂ al 5%. Le colture cellulari a confluenza sono state regolarmente disgregate con una soluzione contenente Tripsina/EDTA (Gibco Life Technologies), diluite opportunamente e seminate in nuove fiasche.

Per gli esperimenti di trasfezione le cellule sono state invece coltivate in DMEM contenente il 10% di FBS, l'1% di aminoacidi non essenziali e l'1% di Glutamax, in assenza di antibiotici.

Alcune aliquote di cellule 293TT ($3-4 \times 10^6$ cellule/tubo) sono state risospese in 1 ml di soluzione congelante costituita da FBS contenente il 9% di dimetilsolfossido (DMSO, Sigma-Aldrich) e conservate in azoto liquido.

2.2.2 Produzione e purificazione di virus-like particles (VLP)

La produzione e purificazione delle "virus like particles" (VLP) di HPV è stata eseguita secondo il protocollo descritto da Buck *et al.* (2004) e riportato in dettaglio nel sito <http://home.ccr.cancer.gov/lco/>. Le cellule 293TT (7×10^6 ,

contate con utilizzo del colorante Trypan Blue) sono state seminate in fiasche da 75 cm² in DMEM contenente il 10% di FBS, l'1% di aminoacidi essenziali e l'1% di Glutamax ed incubate 16-18 ore a 37 °C per ottenere un monostrato cellulare con una confluenza non superiore al 50%. Raggiunto il livello di confluenza desiderato, le cellule sono state trasfettate usando il metodo della lipofezione. A questo scopo sono state preparate due soluzioni, una contenente 20 µg di DNA plasmidico e 2 ml di Optimem-I (Sigma-Aldrich), e l'altra 85 µl di *Lipofectamina 2000* (Invitrogen) e 2 ml di Optimem-I. Queste due sospensioni sono state incubate a temperatura ambiente per 20 minuti, successivamente unite e la sospensione ottenuta incubata altri 20 minuti a temperatura ambiente per consentire la formazione dei liposomi contenenti il DNA.

Il complesso DNA-Liposomi è stato aggiunto delicatamente alle cellule e dopo 5 ore di incubazione a 37 °C il terreno è stato sostituito con terreno fresco.

Dopo 48 ore dalla trasfezione le cellule sono state raccolte, il surnatante eliminato, lavate con 1 ml di *Dulbecco-Phosphate Buffered Saline* (D-PBS: CaCl₂ 0,9 mM, MgCl₂ 0,49 mM, KCl 2,66 mM, KH₂PO₄ 1,47 mM, NaCl 137,93 mM, Na₂HPO₄ 8,05 mM, Invitrogen) addizionato di MgCl₂ ad una concentrazione finale di 9,5 mM e trasferite in eppendorf siliconate (StarLab), provette a bassa ritenzione proteica, e centrifugate a 2000 rpm per 7 minuti (Centrifuge 5418R, eppendorf). Il surnatante è stato eliminato e le cellule sono state risospese ad una concentrazione elevata (>100 milioni/ml) in una soluzione che favorisce la maturazione e la fuoriscita delle VLP. Brevemente, al pellet cellulare è stato aggiunto un volume di D-PBS pari a 1,5 volte il suo volume, le cellule sono state risospese delicatamente e poi sono stati aggiunti 1/20 di volume di Triton X-100 (Sigma-Aldrich), 0,1% Benzonase (Sigma-Aldrich), 0,1% Plasmid Safe (Epicentre) e 1/40 di volume di ammonio solfato 1 M pH 9. La sospensione cellulare è stata quindi incubata per 24 ore a 37 °C. Il lisato cellulare maturo è stato raffreddato per 5 minuti in ghiaccio, aggiunti addizionato poi di 0,17 volumi di NaCl 5M e incubato nuovamente per 20 minuti in ghiaccio. Infine, il lisato cellulare maturo è stato centrifugato a 10.000 rpm per 10 minuti in una centrifuga eppendorf refrigerata e, infine, il surnatante chiarificato è stato trasferito in un tubo eppendorf siliconato e conservato in ghiaccio per circa 2 ore.

Quindi, le VLP, formatesi nel lisato cellulare, sono state purificate mediante gradiente di iodixanolo (Optiprep Density Gradient Medium, Sigma-Aldrich). A questo scopo sono state preparate le seguenti soluzioni:

- 1X DPBS/0,8 M (per 50 ml di soluzione)

H2O distillata	38,3 ml
10X PBS	5 ml
5 M NaCl	6,25 ml
2 M CaCl ₂	22,5 µl
2 M MgCl ₂	12,5 µl
1 M KCl	105 µl
- 46% Optiprep in DPBS/0,8 M (nello schema di seguito sono riportati i volumi in base al numero di tubi che vengono alloggiati nell'ultracentrifuga)

	<i>6 tubi</i>	<i>4 tubi</i>	<i>2 tubi</i>
60% Optiprep	19,1 ml	12,7 ml	9,57 ml
10X PBS	2,5 ml	1,6 ml	1,25 ml
5 M NaCl	3,25 ml	2,2 ml	1,6 ml
2 M CaCl ₂	11,5 µl	7,6 µl	5,7 µl
2 M MgCl ₂	6,5 µl	4,3 µl	3,3 µl
1 M KCl	50 µl	33,3 µl	25 µl

Le soluzioni appena descritte devono essere preparate il giorno stesso della purificazione e sono state miscelate, tra di loro, per ottenere le soluzioni di Optiprep al 39%, 33% e 27% da stratificare nei tubi da ultracentrifuga per generare il gradiente, secondo lo schema riportato di seguito:

	<i>6 tubi</i>		<i>4 tubi</i>		<i>2 tubi</i>	
	46% Optiprep	D-PBS 0,8 M	46% Optiprep	D-PBS 0,8 M	46% Optiprep	D-PBS 0,8 M
27%	6,6 ml	4,65 ml	4,4 ml	3,1 ml	3,3 ml	2,3 ml
33%	8,05 ml	3,2 ml	5,4 ml	2,1 ml	4 ml	1,6 ml
39%	9,5 ml	1,7 ml	6,3 ml	1,1ml	4,75 ml	850 µl

Il gradiente è stato preparato in tubi di poliallometere per ultracentrifuga (Beckman Coulter) stratificando delicatamente 1,5 ml di soluzione al 39%, al 33% e infine al 27%, e lasciato equilibrare 2 ore a temperatura ambiente. Infine, il lisato maturo (circa 120-150 μ l) è stato stratificato sul gradiente e centrifugato in ultracentrifuga (rotore SW55ti, Beckman Coulter) per 3,5 ore a 50.000 rpm disinserendo il freno. Al termine della centrifugazione, le provette sono state bucate sul fondo con un ago di diametro 26 gauge e le frazioni sono state raccolte in tubi eppendorf siliconati (StarLab) e conservate a -80 °C fino al momento dell'utilizzo. La concentrazione proteica di ciascuna frazione è stata determinata subito dopo la raccolta delle frazioni mediante il metodo dell'acido bicinconinico (BCA), utilizzando i reagenti e seguendo le istruzioni contenute nel kit per la misurazione in micropiastre (BCA protein assay kit, Pierce).

2.2.3 Valutazione della qualità delle VLP purificate mediante colorazione all'argento e western blot

Le frazioni raccolte dopo ultracentrifugazione sono state analizzate mediante elettroforesi verticale in gel di poliacrilammide-SDS, secondo il metodo di Laemmli [Laemmli *et al.*, 1970].

Lo *stacking gel* è composto da una soluzione acquosa contenente 5% di acrilammide/bisacrilammide 29:1 al 30% (Biorad), Tris 125 mM pH 6,8, 0,1% di SDS, 0,1% di ammonio persolfato (APS, Sigma-Aldrich) e 0,01% di N,N,N',N'-tetrametilenediamina (TEMED, Sigma-Aldrich).

Il *running gel* è composto da una soluzione acquosa contenente 10% di acrilammide/bisacrilammide 29:1 al 30%, Tris 375 mM pH 8,8, 0,1% di SDS, 0,1% di APS e 0,04% di TEMED.

I gel sono stati assemblati e migrati utilizzando una camera di separazione Mini-Protean II (Biorad).

Come marcatore di pesi molecolari è stata usata una miscela commerciale di proteine a peso molecolare noto, compreso tra 8 e 220 kDa (*ColorBurst*, Sigma-Aldrich).

I campioni sono stati diluiti con il tampone di caricamento 4X (Tris-HCl 200 mM, β -mercaptoetanolo 200 mM, SDS 8%, glicerolo 40%, Blue di bromofenolo 0,4%)

al fine di ottenere una concentrazione finale 1X, bolliti a 100 °C per 5 minuti e caricati (25 µl) nei pozzetti. La migrazione elettroforetica è avvenuta a temperatura ambiente in presenza di tampone acquoso costituito da glicina 250 mM, Tris 25 mM e SDS 0,1 % applicando una differenza di potenziale di 60 V per 30 minuti, al fine di favorire l'impacchettamento delle proteine nello *stacking gel* e, successivamente, di 100 V per circa 1 ora e 30 minuti, per separare le proteine nel *running gel*.

Ciascun campione è stato caricato contemporaneamente su due gel, per poter eseguire sia la colorazione all'argento sia il western blot.

Colorazione all'argento – La colorazione all'argento (Silver stain kit, Pierce) consente di visualizzare sul gel di acrilammide tutte le proteine presenti con una sensibilità 50 volte superiore alla classica colorazione con blue di Coomassie. Questa metodica è stata utilizzata per valutare l'eventuale presenza di impurità nelle frazioni raccolte dopo la purificazione delle VLP su gradiente. La colorazione all'argento del gel è stata eseguita utilizzando i reagenti e seguendo le istruzioni fornite nel kit.

Western blot – Al termine della corsa le proteine separate sul gel di poliacrilammide sono state trasferite su una membrana di PVDF (Biorad) mediante una cella *Mini-Trans-Blot Cell* (BioRad) contenente il tampone di trasferimento (glicina 39 mM, Tris 48 mM, SDS 0,037 %, metanolo 20 %) applicando un'amperaggio costante di 200 mA per 2 ore a 4°C. L'avvenuto trasferimento delle proteine dal gel alla membrana è stato verificato mediante colorazione della stessa con una soluzione allo 0,1% di rosso Ponceau in acido acetico al 5% (Sigma-Aldrich) per 2-3 minuti. Dopo la visualizzazione delle bande la membrana è stata decolorata con una soluzione di NaOH 0,1 M.

La membrana è stata perciò incubata per 1 ora in agitazione a temperatura ambiente con una soluzione bloccante, contenente il 5% di latte in polvere (Membrane blocking agent, GE Healthcare) disciolto in TBS (Tris buffer, Tris HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4). In seguito la membrana è stata incubata 16-18 ore a 4 °C in agitazione con anticorpi specifici per l'identificazione della proteina L1 di HPV6, 11, 16 e 18. Le caratteristiche degli anticorpi primari utilizzati sono riassunte nella **Tabella 6**.

Tabella 6. Anticorpi primari diretti contro L1 di HPV6, 11, 16 e 18

Anticorpo primario	Ditta	Diluizione finale
Mouse anti-L1 di HPV6/11	Antibodies-online (cod. ABIN284669)	1:500
Mouse anti-L1 di HPV16	Santacruz (cod. Sc-47669)	1:1000
Mouse anti-L1 di HPV18	Abcam (cod. Ab31492)	1:7500

Dopo l'incubazione, la membrana è stata lavata 6 volte per 5 minuti in TBS-T (TBS addizionato di 0,05% di Tween-20, Sigma-Aldrich), ed è stata incubata per 1 ora a temperatura ambiente in agitazione con un anticorpo secondario di capra diretto contro le immunoglobuline di topo coniugato con l'enzima perossidasi di rafano (HRP, Abcam), diluito 1:5000 in TBS contenente il 5% di latte in polvere.

Dopo l'incubazione, la membrana è stata lavata 6 volte, come indicato sopra, e incubata per 3 minuti a temperatura ambiente con 1 ml soluzione contenente il substrato per l'enzima perossidasi (LiteAblot Plus, Euroclone). L'eccesso di substrato è stato rimosso dalla membrana e la presenza della proteina ricercata è stata evidenziata mediante sovrapposizione alla membrana di una lastra fotografica (Biomax light film, Kodak). Il tempo di esposizione necessario per impressionare la lastra, nel caso delle VLP prodotte, è di pochi secondi. La lastra è stata poi sviluppata in uno sviluppatore per lastre autoradiografiche (Hyper processor, Amersham-Biosciences).

Tutte le frazioni positive per la presenza della proteina L1 e prive di impurità sono state unite in modo da formare un unico *stock*, la cui concentrazione proteica è stata determinata nuovamente mediante il metodo BCA. Lo *stock*, infine, è stato suddiviso in aliquote monouso di 25 µg ciascuna in eppendorf siliconate conservate a -80 °C fino al momento dell'utilizzo.

2.3 VALUTAZIONE DELLE RISPOSTE IMMUNITARIE IN INDIVIDUI VACCINATI CON *GARDASIL* O *CERVARIX*

2.3.1 Separazione del plasma e purificazione delle cellule mononucleate da sangue periferico

Le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*) sono state purificate da 12-13 ml di sangue intero (in presenza di sodio citrato come anticoagulante) prelevato da donatori, vaccinati e non vaccinati, mediante un gradiente di Ficoll (densità del gradiente: 1077 g/ml) che consente la separazione dei diversi tipi cellulari a seconda della propria densità. I PBMC si stratificano all'interfaccia tra Ficoll e plasma, dove formano un anello biancastro ben visibile.

Brevemente, il sangue intero è stato diluito con un uguale volume di D-PBS senza Ca^{++} e Mg^{++} (*Dulbecco's Phosphate buffered saline*, Gibco), stratificato su 10 ml di *Ficoll-Paque* (*Ficoll-Paque™ Plus*, GE Healthcare) e centrifugato per 20 minuti a 1800 rpm senza freno (Megafuge 1.0R, Heraeus). L'anello di PBMC è stato prelevato con una pipetta Pasteur, trasferito in un nuovo tubo e centrifugato a 1600 rpm per 10 minuti, per eliminare il Ficoll eventualmente raccolto insieme alle cellule. Il pellet è stato risospeso in 0,5 ml di soluzione di lisi per globuli rossi (*Red blood cells lysis buffer*, Sigma-Aldrich) e incubato a temperatura ambiente per 3 minuti per consentire la lisi degli eritrociti contaminanti; dopo l'incubazione la soluzione lisante è stata tamponata con l'aggiunta di 8-10 ml di D-PBS senza Ca^{++} e Mg^{++} e il tubo centrifugato a 1200 rpm per 8 minuti. Il pellet è stato nuovamente risospeso in 5-10 ml di D-PBS senza Ca^{++} e Mg^{++} e centrifugato 10 minuti a 1000 rpm per rimuovere le piastrine. I PBMC così ottenuti sono stati risospesi in 2 ml di D-PBS senza Ca^{++} e Mg^{++} e contati mediante conta vitale con l'utilizzo del Trypan Blue. Infine, le cellule sono state risospese in terreno completo RPMI (RPMI Medium 1640, Gibco Life Technologies) contenente siero fetale bovino al 10% (FBS, Lonza), l'1% di soluzione antibiotica-antimicotica (Gibco Life Technologies) e l'1% di glutammina 200 mM (Gibco Life Technologies) alla concentrazione desiderata, oppure congelati.

Prima di iniziare la purificazione dei PBMC, il sangue intero è stato centrifugato a 2500 rpm (Megafuge 1.0R, Heraeus) per 7 minuti per separare il plasma dalla frazione cellulare. Il plasma è stato raccolto, aliquotato (700 µl/tubo) e conservato a -20 °C fino al momento dell'uso. Il plasma rimasto nella provetta è stato rimescolato alla frazione cellulare e si è poi proceduto alla purificazione dei PBMC.

2.3.2 Congelamento e scongelamento dei PBMC

Congelamento – Per conservare le cellule a lungo termine, le si congelano in azoto liquido alla temperatura di -196 °C. In queste condizioni le cellule possono essere conservate per un tempo indeterminato. La soluzione di congelamento è composta da FBS e da dimetil-solfossido (DMSO, Sigma) al 10%. Le cellule da congelare sono state raccolte mediante centrifugazione a 1200 rpm per 8 minuti (Megafuge 1.0R, Heraeus), lavate un paio di volte in D-PBS senza Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺, contate e risospese in 1 ml di soluzione di congelamento pre-raffreddata in ghiaccio, trasferite in opportuni tubi per congelamento (criotubi, Nunc) e pre-congelate a -80 °C previo inserimento dei tubi in un crio-contenitore (Nunc) contenente isopropanolo. Dopo due giorni le provette sono state trasferite e conservate in azoto liquido.

Scongelo – Lo scongelamento delle cellule è una procedura delicata che deve avvenire molto rapidamente per ridurre al minimo la morte cellulare. I tubi contenenti le cellule congelate, dopo essere stati prelevati dall'azoto liquido, sono stati immediatamente posti in un bagnetto a 37 °C per un minuto circa, il tempo necessario affinché cominci a liquefarsi il contenuto della provetta. Direttamente nella provetta è stato poi aggiunto 1 ml di terreno di coltura RPMI completo pre-riscaldato a 37 °C, lasciando cadere una goccia di terreno ogni 5-7 secondi. L'intero volume è stato poi trasferito (sempre gocciolando) in un tubo contenente 8 ml di terreno di coltura pre-riscaldato a 37 °C. Le cellule sono state centrifugate a 1200 rpm (Megafuge 1.0R, Heraeus), per 8 minuti, lavate con 6 ml di terreno e ricentrifugate a 1200 rpm per 8 minuti. Il pellet è stato risospeso in 2 ml di terreno di coltura RPMI completo pre-riscaldato a 37 °C, le cellule sono state contate e diluite alla concentrazione desiderata e utilizzate.

2.3.3 Saggio di proliferazione cellulare (MTT)

Per la valutazione della proliferazione cellulare dei PBMC è stato utilizzato un saggio colorimetrico, che prevede l'utilizzo di bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT, Sigma Aldrich), un composto che viene enzimaticamente modificato solo in cellule metabolicamente attive o proliferanti. Questo saggio è stato utilizzato per selezionare il lotto di FBS con le caratteristiche necessarie per supportare la crescita di cellule linfocitarie, e per confrontare l'efficacia di diversi stimoli policlonali di indurre differenziamento di linfociti B memoria in plasmacellule.

Brevemente, i PBMC sono stati seminati in piastre da 96 pozzetti a fondo piatto, ad una concentrazione di $0,5 \times 10^6$ cellule/ml (200 μ l/pozzetto), in terreno completo RPMI. Dopo 3-5 giorni d'incubazione, in assenza e in presenza degli stimoli da analizzare, sono stati aggiunti a ciascun pozzetto 20 μ l di una soluzione di MTT alla concentrazione di 5 mg/ml. Le piastre sono state successivamente incubate a 37 °C per 4 ore per consentire la formazione dei precipitati di formazano. Infine, sono stati aggiunti 200 μ l di isopropanolo contenente il 10% di Triton X-100 e HCl 0,1 N per sciogliere i cristalli di formazano e consentire lo sviluppo di un colore uniforme. L'intensità del colore, che è direttamente proporzionale alla vitalità cellulare, è stata misurata con un lettore ELISA alla lunghezza d'onda di 570 nm.

2.3.4 Stimolazione policlonale dei linfociti B memoria

I linfociti B della memoria continuano a circolare nel corpo di un individuo per moltissimi anni in uno stato "di allerta". In seguito all'incontro di tali linfociti con lo stesso antigene che li ha generati (risposta anamnestic), essi vanno incontro ad un processo di differenziamento che li porta a trasformarsi in plasmacellule, specializzate nella produzione di grandi quantità di anticorpi. Con opportuni stimoli, è possibile indurre *in vitro* il differenziamento policlonale dei linfociti B memoria in plasmacellule le quali possono poi essere utilizzate per quantificare il numero di linfociti B diretti contro un antigene specifico, come verrà descritto nel protocollo del saggio B-cell elispot. Per ottimizzare le condizioni di coltura

necessarie per indurre il differenziamento dei linfociti B memoria in plasmacellule sono state analizzate differenti concentrazioni (**Tabella 7**) di tre composti:

- ODN2006 (Labogen), un oligonucleotide sintetico antagonista del Toll-like Receptor 9 (TLR9);
- Pokeweed mitogen (PKW, Sigma), una sostanza che induce la proliferazione dei linfociti B;
- Proteina A di *S. aureus* Cowan (SAC, Sigma), che induce l'attivazione dei linfociti B attraverso un *pathway* linfocita T-indipendente

Inoltre, è stata anche valutata l'efficacia di uno stimolo policlonale commerciale (R848, Mabtech) costituito da un antagonista dei Toll-like Receptor 7 (TLR7) e 8 (TLR8), e IL-2 (**Tabella 7**).

Tabella 7. Stimoli policlonali per l'induzione del differenziamento dei linfociti B memoria in plasmacellule

Nome stimolo	Composizione e concentrazione finale
Stimolo B	ODN 2006 3 µg/ml SAC 1:10.000 PKW 0,1 µg/ml
Stimolo C	ODN2006 6 µg/ml SAC 1:10.000 PKW 1 µg/ml
Stimolo D	ODN2006 2.5 µg/ml SAC 1:5.000 PKW 0,06 µg/ml
Stimolo Mabtech	R848 1 µg/ml IL-2 10 ng/ml

I PBMC sono stati diluiti in terreno RPMI completo fresco, ad una concentrazione di 1×10^6 /ml, e seminati in piastre da 96 o da 24 pozzetti, rispettivamente 100 µl/pozzetto o 500 µl/pozzetto. La concentrazione finale di $0,5 \times 10^6$ cellule/ml è stata ottenuta mediante l'aggiunta di un ugual volume di terreno di coltura (PBMC

non stimolati), oppure mediante l'aggiunta di un ugual volume di una soluzione contenente lo stimolo policlonale ad una concentrazione 2X (PBMC stimolati). Le piastre sono state poi incubate a 37 °C per 5-6 giorni.

Il grado di attivazione dei linfociti B memoria indotto dagli stimoli policlonali è stato misurato mediante il saggio MTT.

2.3.5 Saggio B-cell Elispot per la ricerca di cellule secernenti IgG

Il saggio B cell-Elispot (*Enzyme Linked Immuno-Spot*) permette in modo molto specifico e sensibile di identificare e quantificare *ex-vivo*, in un campione di sangue periferico, o in campioni cellulari derivati da organi linfoidi o da siti mucosali, il numero totale di linfociti B secernenti anticorpi, e tra questi il numero di cellule B secernenti anticorpi diretti verso uno specifico antigene. Questa metodica è stata descritta per la prima volta nel 1983 [Czerkinsky *et al.*, 1983, Sedgwick *et al.*, 1983] e permette di ottenere informazioni difficilmente acquisibili con altre metodiche attualmente disponibili.

Per quantificare il numero totale di cellule B memoria secernenti anticorpi, nel nostro casolo solo IgG, indipendentemente dalla loro specificità verso un antigene, si utilizzano piastre da 96 pozzetti pre-adsorbite con un anticorpo anti-immunoglobuline di classe G (IgG) umane. I PBMC o i linfociti B purificati, vengono seminati nei pozzetti. Le cellule per gravità si depositano sul fondo del pozzetto e gli anticorpi secreti vengono immobilizzati dagli anticorpi anti-IgG umane nelle immediate vicinanze di ciascuna cellula formando un immunocomplesso. Dopo alcune ore di incubazione le cellule vengono rimosse e gli immunocomplessi vengono rilevati mediante la formazione di un sandwich, analogamente a quanto accade nel saggio ELISA, aggiungendo un anticorpo secondario coniugato con biotina seguito da un sistema di amplificazione del segnale (streptavidina coniugata ad un enzima) e da un sistema rilevatore (il substrato cromogeno dell'enzima). Si formerà uno spot colorato in corrispondenza di ciascuna cellula secernente l'immunoglobulina, e se le cellule sono sufficientemente separate tra di loro ciascuno spot corrisponderà, quindi, ad una cellula secernente. Gli spot sono quantificati mediante un lettore di piastre per Elispot (Aelvis).

Per quantificare negli stessi campioni cellulari il numero di cellule B memoria secernenti anticorpi antigene-specifici, i PBMC o i linfociti B purificati, sono piastrati in parallelo in piastre da 96 pozzetti precedentemente pre-adsorbite con l'antigene. Le IgG antigene-specifiche secrete dalle cellule B si legheranno all'antigene immobilizzato sul fondo del pozzetto. Gli immunocomplessi sono quindi evidenziati mediante aggiunta di un anticorpo anti-IgG umane coniugato con biotina, come descritto per le IgG totali.

Il saggio B-cell ELISpot utilizzato per valutare la risposta umorale in individui vaccinati con Gardasil o Cervarix è stato eseguito usando i reagenti del kit commerciale "Human IgG B-cell Elispot" (Mabtech) seguendo un protocollo da noi ottimizzato.

Le piastre per B-cell elispot (MAIPSWU, Millipore) utilizzate in questo studio sono state trattate con etanolo al 70% per 2 minuti, per rendere idrofila la membrana di PVDF presente al fondo di ciascun pozzetto, e successivamente lavate 5 volte con acqua distillata per rimuovere ogni traccia di etanolo. Quindi, le piastre sono state pre-adsorbite, a 4 °C per 20-24 ore, con 100 µl/pozzetto di un anticorpo anti-IgG umane (*capture antibody* MT91/145), diluito alla concentrazione di 15 µg/ml in PBS (per quantificare il numero totale di linfociti B secernenti IgG), o con 100 µl/pozzetto di VLP di HPV6,11, 16 e 18, diluite alla concentrazione di 12,5 µg/ml in PBS, al fine di quantificare il numero di linfociti B specifici contro HPV6, 11, 16 e 18. Dopo l'adsorbimento le piastre sono state lavate 5 volte con PBS ed incubate con RPMI addizionato di 10% di FBS per 30 minuti prima di aggiungere a ciascun pozzetto i PBMC da analizzare.

Dopo la stimolazione policlonale dei PBMCs (come descritto nel capitolo 2.3.4) le cellule, stimulate e non stimulate, sono state raccolte e centrifugate a 1200 rpm (Megafuge 1.0R, Heraeus) per 8 minuti. Quindi, il surnatante è stato eliminato e le cellule sono state risospese in 6 ml di terreno di coltura (pre-riscaldato a 37 °C). Le cellule sono state poi lavate 3 volte, per rimuovere tutti gli anticorpi secreti dalle plasmacellule ed eventualmente rimasti adesi sulla superficie delle stesse e infine, risospese in 1 ml di terreno di coltura e contate con il metodo del Trypan Blue. Per quantificare i linfociti B memoria antigene-specifici, le cellule, stimulate e non stimulate, sono state risospese alla concentrazione di $1,25 \times$

10^6 /ml e successivamente seminate (200 μ l/pozzetto in duplicato) in una piastra per B-cell ELISpot pre-adsorbita con l'antigene desiderato. Per quantificare, invece, il numero totale di linfociti B in grado di produrre IgG, le cellule sono state risospese alla concentrazione di $6,25 \times 10^4$ /ml e seminate in modo da ottenere tre differenti concentrazioni finali ($12,5 \times 10^4$ /pozzetto, $6,25 \times 10^3$ /pozzetto e $3,12 \times 10^3$ /pozzetto) in una piastra per B-cell ELISpot pre-adsorbita con un anticorpo anti-IgG umane. Le piastre seminate sono poi incubate per due ore a 37 °C.

Terminata l'incubazione, le cellule sono state rimosse e le piastre lavate 5 volte con 200 μ l/pozzetto di PBS. A ciascun pozzetto sono stati poi aggiunti 100 μ l di anticorpo biotinilato anti-IgG umane (MT78/145 1 μ g/ml) e le piastre sono state incubate per 2 ore a temperatura ambiente. L'anticorpo in eccesso è stato eliminato e le piastre lavate 5 volte con PBS. Successivamente, sono stati aggiunti 100 μ l/pozzetto di avidina coniugata all'enzima perossidasi di rafano (diluito 1:1000) per un'ora a temperatura ambiente. L'eccesso di enzima è stato rimosso mediante 5 lavaggi con PBS e, infine, sono stati aggiunti 100 μ l/pozzetto di substrato TMB. Dopo 7-10 minuti le piastre sono state lavate 3 volte con acqua distillata in modo da rimuovere l'eccesso di cromogeno e lasciate essiccare per 16-18 ore prima di acquisire le immagini con il lettore per piastre Elispot.

2.3.6 Saggio ELISA

L'ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) è un saggio immunoenzimatico che consente di misurare la concentrazione (o il titolo) di una molecola in un fluido biologico sfruttando la sensibilità e la specificità del legame antigene-anticorpo. Nello studio oggetto di questa tesi, l'ELISA è stato utilizzato per misurare il titolo anticorpale IgG anti-HPV6, 11, 16 e 18 nel plasma di soggetti vaccinati con Gardasil e Cervarix.

In breve, le VLP di ciascun genotipo di HPV sono state diluite alla concentrazione di 2 μ g/ml in PBS e adsorbite (100 μ l/pozzetto) in piastre da 96 pozzetti (*Half area 96 well plate highbind*, Fisher Scientific). Dopo aver incubato la piastra a 4 °C per 16-20 ore, la soluzione contenente le VLP è stata rimossa e le piastre sono state lavate due volte con PBS-Tween 0,05% (150 μ l/pozzetto). Le piastre sono

state successivamente incubate con 100 µl/pozzetto di PBS contenente l'1% di albumina di siero bovino (BSA, Sigma) a 37 °C per un'ora, e quindi con il plasma da analizzare per 2 ore a 37 °C. Per determinare il titolo anticorpale, ciascun campione di plasma è stato diluito serialmente (1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400, 1:12800, 1:25600) con PBS contenente BSA all'1% e aggiunto (50 µl di ciascuna diluizione) in duplicato ai pozzetti. Le piastre sono state, quindi, lavate 5 volte con PBS-Tween 0,05% (150 µl/pozzetto) e successivamente a ciascun pozzetto sono stati aggiunti 50 µl di anticorpo secondario anti-IgG umane coniugato con perossidasi di rafano (goat anti-human IgG-HRP, Abcam), diluito 1:5000 in PBS contenente BSA all'1%, e incubate per un'ora a 37 °C. Terminata l'incubazione, l'anticorpo secondario è stato rimosso e la piastra è stata lavata ulteriormente per 5 volte con PBS-Tween 0,05% (150 µl/pozzetto). 50 µl di substrato (ABTS 1-Step, Thermo Scientific) sono stati aggiunti a ciascun pozzetto e la piastra incubata per 30 minuti a 37 °C. Il colore sviluppato nella piastra è stato letto con un lettore di piastre ELISA ad una lunghezza d'onda di 620 nm. Il titolo anticorpale per ciascun campione di plasma è il valore più basso di diluizione al quale si riesce a misurare la presenza di anticorpi diretti contro ciascun antigene vaccinale.

Per ciascuna VLP è stato determinato il cutoff, cioè il valore soglia al di sopra del quale considerare positivi i titoli anticorpali misurati. Tale valore è stato determinato analizzando il plasma di 24 donne (alla diluizione 1:100) che non hanno ricevuto alcun vaccino anti-HPV.

2.3.7 Disegno dello studio

Il progetto in corso, oggetto di questa tesi di Dottorato, è uno studio prospettico osservazionale svolto in collaborazione con il Servizio di Microbiologia e Virologia dell'Azienda Ospedaliera di Padova, con il SIS di Padova e con l'Ospedale S. Orsola-Malpighi di Bologna, per valutare la risposta immunitaria umorale anti-HPV in volontari, adolescenti e adulti sani, vaccinati con *Gardasil* (Regione Veneto) o *Cervarix* (Regione Emilia Romagna).

I volontari, al momento dell'arruolamento, dovevano rientrare nei requisiti di inclusione stabiliti dal protocollo di studio approvato dal Comitato Etico

dell'Azienda Ospedaliera: sesso femminile, aver completato da almeno 1 mese il ciclo di vaccinazione profilattica anti-HPV, assenza di patologie neoplastiche o di patologie infiammatorie croniche, assenza di febbre o altri sintomi di infezione acuta, nessuna gravidanza in corso. Il giorno del prelievo sono stati raccolti i dati anamnestici del volontario e a ciascun soggetto (e/o al genitore, nel caso in cui il soggetto fosse un minore) è stato consegnato il modulo per il consenso informato e per il consenso al trattamento dei dati personali. Dopo sottoscrizione dello stesso, il volontario è stato sottoposto al prelievo di sangue periferico di 12-13 ml. Fino ad oggi sono state incluse nello studio 283 volontarie, stratificate per età, tipo di vaccino ricevuto e tempo trascorso dalla terza dose di vaccino come mostrato in **Figura 17**. L'arruolamento è ancora in corso e proseguirà fino al raggiungimento del numero di individui previsto dal protocollo di studio (480 individui totali da reclutare).

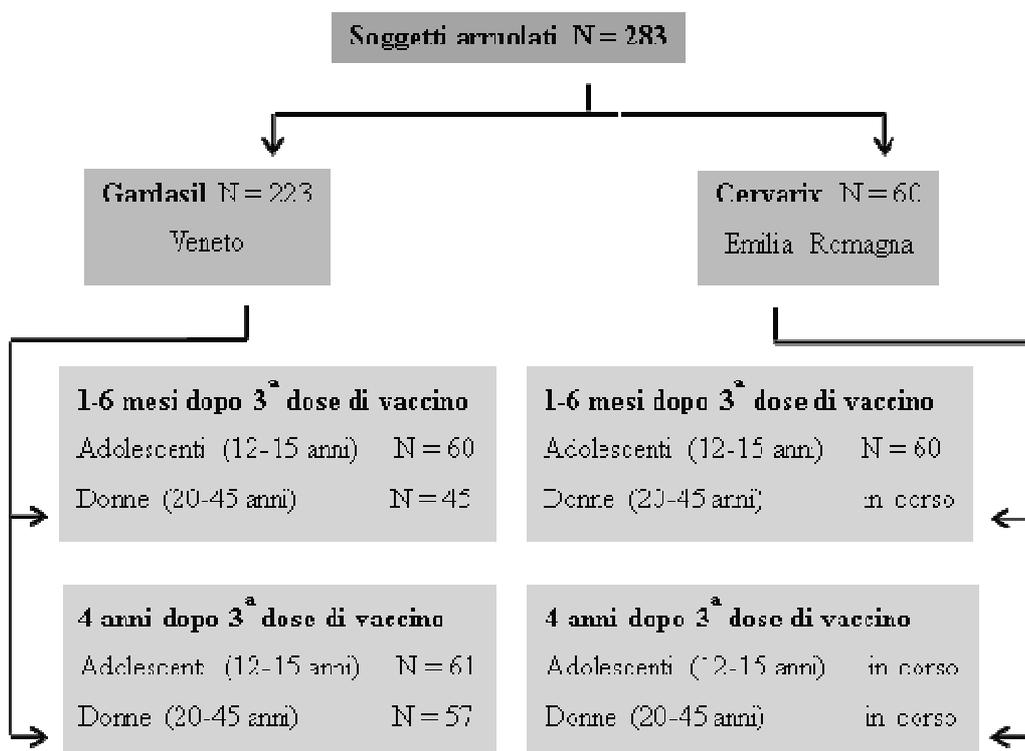


Figura 17. Schema dell'arruolamento dei volontari

3. RISULTATI

3.1 PRODUZIONE E CARATTERIZZAZIONE DEI PLASMIDI p6sheLLr+, p11L1h, p16sheLL e p18sheLL

I DNA plasmidici contenenti i geni codificanti le proteine L1/L2 dei genotipi 6, 11, 16 e 18 di HPV sono stati prodotti mediante trasformazione delle cellule competenti XL-Gold, inizialmente su piccola scala (minipreparazione) per verificarne le caratteristiche desiderate e, successivamente, su larga scala (maxipreparazione) per ottenere quantità sufficienti di ciascun plasmide per la produzione di VLP, come già descritto in “Materiali e metodi”.

Dopo selezione dei batteri trasformati in piastra, sono state raccolte tre colonie batteriche indipendenti, le quali sono state utilizzate per allestire colture batteriche liquide di 3-5 ml necessarie per l'estrazione e successiva quantificazione del DNA plasmidico mediante lettura dell'assorbanza alla lunghezza d'onda di 260 nm. Aliquote di 500 ng di ciascun DNA plasmidico sono state successivamente sottoposte a digestione con opportuni enzimi di restrizione e successiva analisi elettroferetica in gel di agarosio allo 0.8% (dati non mostrati). L'analisi dei frammenti di restrizione consente di verificare se durante il processo di trasformazione e di amplificazione del DNA si siano verificati riarrangiamenti e/o delezioni grossolane, che potrebbero perciò impedire l'espressione dei geni di HPV. I frammenti di DNA attesi per ciascuna digestione sono riportati in **Tabella 5** del capitolo “Materiale e metodi”.

Poiché i plasmidi ottenuti dalle minipreparazioni sono risultati corretti, le colture batteriche ottenute dalle 3 colonie indipendenti sono state congelate al fine di generare *stock* cellulari. Si è successivamente proceduto alla produzione del DNA plasmidico su larga scala, come descritto nel capitolo dei “Materiali e Metodi”. La concentrazione di DNA è stata quantificata mediante lettura spettrofotometrica a 260 nm e i risultati sono riportati nella **Tabella 8**.

Tabella 8. Concentrazione e purezza dei plasmidi p6sheLLr+, p11L1h, p16 sheLL e p18sheLL ottenuti da maxipreparazione

PLASMIDE	CONCENTRAZIONE ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	RAPPORTO $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$	QUANTITA' TOTALE (μg)
p6sheLLr+	4,19	1,87	1258
p11L1h	0,73	1,89	219
p16sheLL	4,08	1,89	1226
p18sheLL	3,34	1,93	1336

I plasmidi p6sheLLr+, p16sheLL e p18sheLL sono ad alto numero di copie, mentre il plasmide p11L1h è a basso numero di copie. Questo spiega una differente efficienza di produzione dei plasmidi da parte dei batteri competenti trasformati.

Successivamente, aliquote di ciascun DNA purificato sono state analizzate mediante digestione con enzimi di restrizione e analisi elettroforetica.

I risultati, presentati nella **Figura 18** indicano che l'analisi dei tagli di restrizione dei plasmidi p6sheLLr+, p11L1h, p16sheLL e p18sheLL ottenuti dalla preparazione su larga scala danno origine ai frammenti attesi, indicando che i DNA ottenuti non hanno subito riarrangiamenti grossolani. I plasmidi su larga scala ottenuti sono stati quindi diluiti ad una concentrazione di $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, aliquotati e conservati a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ fino al momento del loro utilizzo.

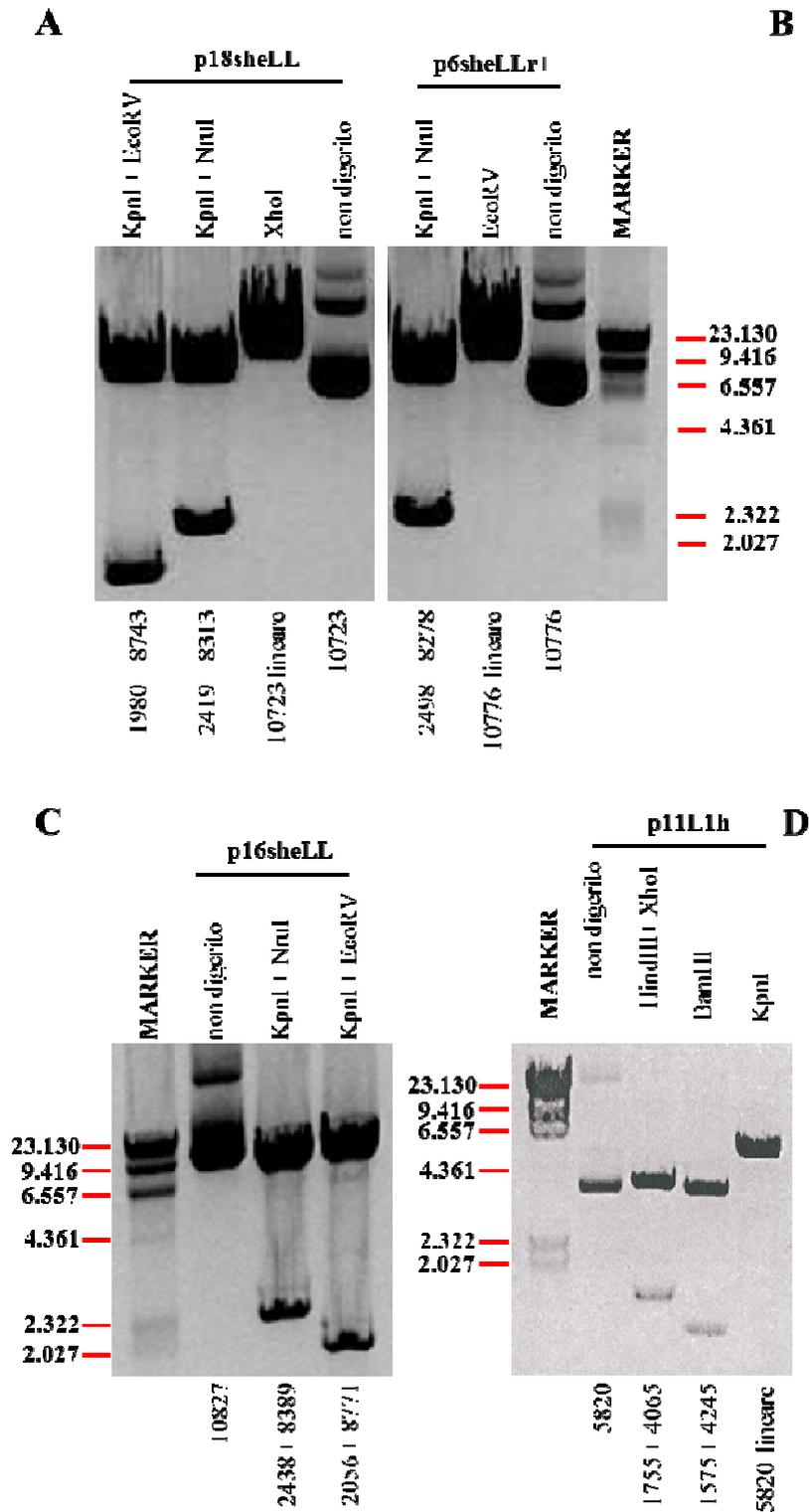


Figura 18. Analisi elettroforetica in gel di agarosio allo 0,8% del DNA dei plasmidi p6sheLLr+, p11L1h, p16sheLL e p18sheLL ottenuti mediante preparazione su larga scala. Il marker è rappresentato dal DNA del fago λ digerito con HindIII. Per ogni plasmide sono specificate le dimensioni (esprese in paia di basi) attese per ciascuna digestione.

3.2 PRODUZIONE DI VLP DI HPV6, 11, 16 e 18

3.2.1 Ottimizzazione delle condizioni di purificazione delle VLP

Le VLP di HPV6, 11, 16 e 18 prodotte durante il mio progetto di Dottorato mimano quelle somministrate a chi riceve il vaccino contro il Papillomavirus e sono una fonte di antigeni indispensabili per svolgere, *in vitro*, sia il test B-cell Elispot per misurare il numero di cellule memoria specifiche contro tali antigeni, sia il saggio ELISA per misurare il titolo anticorpale. Poiché il numero previsto di individui da arruolare nello studio, e da analizzare per quanto riguarda le risposte immunitarie umorali, è di circa 480 (arruolamento ancora in corso) si è resa necessaria la produzione di grossi quantitativi di VLP purificate (circa 4-5 mg per ciascun tipo di VLP) che sono state suddivise in aliquote monouso, al fine di standardizzare i saggi immunologici.

Come descritto nei “Materiali e Metodi”, per la produzione di VLP è stato utilizzato come protocollo di riferimento quello riportato nel sito <http://home.ccr.cancer.gov/lco> [Buck CB et al., 2004].

Inizialmente, per verificare che le condizioni descritte nel metodo di Buck e collaboratori fossero ottimali, sono state prodotte le VLP su piccola scala: una singola fiasca T75 per ciascun plasmide. Le cellule 293TT sono state seminate ad una concentrazione di 7×10^6 e lasciate 18-20 ore in incubatore in modo da farle aderire alla plastica e formare un monostrato con una confluenza inferiore al 50% (condizione indispensabile per ottenere una buona resa di VLP). Le cellule sono state trasfettate mediante lipofezione, raccolte dopo 48 ore dalla trasfezione e lisate, in presenza di un blando detergente e di sali, per permettere la maturazione degli pseudovirioni e ottenere così dei capsidi, formati da L1/L2 per le VLP di HPV6, 16 e 18 e solo da L1 per le VLP di HPV11, strutturalmente stabili. I lisati così ottenuti sono stati stratificati su gradiente di Optiprep e ultracentrifugati. Questo metodo consente un’efficace separazione delle VLP dai detriti cellulari e dagli pseudovirioni non assemblati correttamente e, inoltre, a differenza dei gradienti di cloruro di cesio (spesso utilizzati per la purificazione di pseudovirioni), ha una bassa osmolarità, non è caotropico e non è tossico per cellule. Al termine dell’ultracentrifugazione sono state raccolte 10 frazioni, come

descritto nel protocollo originale, mediante foratura del fondo della provetta con un ago, raccogliendo nella prima frazione (F1) 21 gocce (circa 750 μ l) e nelle successive (da F2 a F10) 10 gocce (circa 375 μ l). I rimanenti 2 ml circa della parte superiore del gradiente vengono scartati. La concentrazione proteica di ciascuna frazione è stata quantificata mediante il metodo dell'acido bicinconinico (BCA). Tutte le frazioni raccolte sono state analizzate in Western Blot, usando un anticorpo anti-L1 specifico per ciascun genotipo di HPV utilizzato, per verificare quali frazioni contenessero le VLP. In **Figura 19** è mostrato un esempio di analisi mediante Western Blot delle frazioni raccolte dopo purificazione. Dopo alcune prove preliminari anche la frazione F1 è stata scartata poiché sempre completamente priva della proteina L1, mentre è stato osservato che le frazioni arricchite in VLP sono generalmente comprese tra le frazioni F3 e F9 (mentre le frazioni F2 e F10 risultavano spesso negative) per le VLP di HPV6, 16 e 18 e nelle frazioni F5-F9 per HPV11. La resa di una singola T75, espressa in μ g della proteina L1 ricavata dalla somma delle frazioni positive, era compresa tra 40-100 μ g a seconda del tipo di VLP considerata.

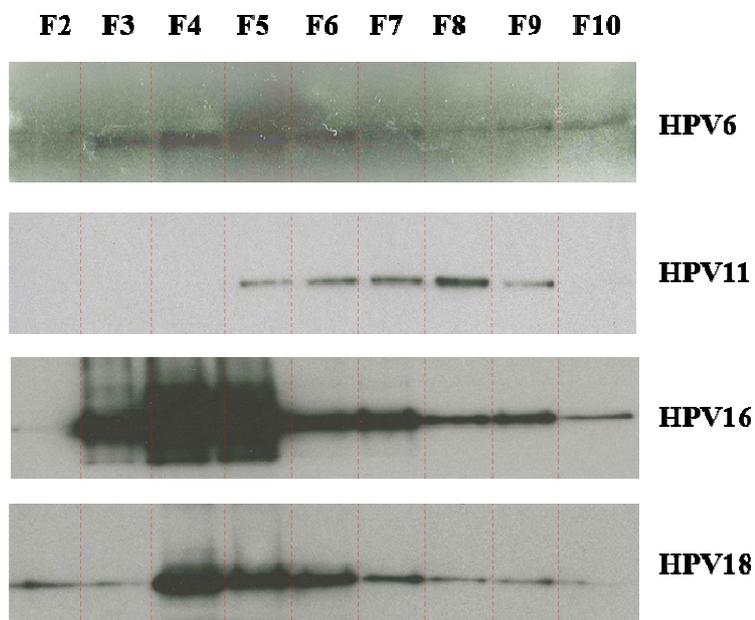


Figura 19. Analisi in western blot delle frazioni raccolte dopo gradiente di Optiprep. Le frazioni raccolte sono state analizzate in condizioni denaturanti in gel di acrilammide contenente SDS al 10% in presenza di un marker di pesi molecolari (ColorBurst 200-30 kDa). La proteina L1 (55 kDa) è ben visibile nelle frazioni tra F3 e F9 per VLP di HPV6, 16 e 18 e F5-F9 per le VLP di HPV11.

Le VLP ottenute, solo per quanto riguarda HPV16, sono state analizzate mediante saggio ELISA, per valutare se avessero la conformazione tridimensionale aspettata. Nel laboratorio di ricerca del Prof. Christensen (The Milton Medical Center, Pennsylvania) sono stati isolati e ben caratterizzati degli anticorpi murini capaci di riconoscere la proteina L1 di HPV16 [*Christensen ND et al., 1996*]. In particolare, l'anticorpo monoclonale H16.V5 è l'unico in grado di riconoscere degli epitopi di superficie conformazionali della proteina L1 di HPV16.

Le frazioni da F3 a F9 di HPV16 sono state unite e poi diluite in PBS alla concentrazione di 2 µg/ml (VLP native), oppure diluite alla stessa concentrazione in una soluzione di carbonato di sodio 0,2 M (VLP denaturate) e adsorbite ai pozzetti di una piastra per ELISA. L'anticorpo H16.V5 (gentilmente donatoci dal Prof. Christensen) è stato utilizzato per il riconoscimento delle VLP adese alla plastica, e gli immunocomplessi sono stati messi in evidenza mediante l'aggiunta di un anticorpo secondario coniugato con HRP e relativo substrato. Come si osserva in **Figura 20**, H16.V5 è in grado di legarsi alle VLP native ma solo parzialmente a quelle denaturate, mentre il siero di riferimento anti-HPV16 (fornito dal National Institute for Biological Standards and Control - NIBSC) riconosce entrambi i tipi di VLP poiché costituito da anticorpi policlonali anti-L1 di HPV16, capaci quindi di legare anche epitopi non conformazionali. Il parziale legame dell'anticorpo H16.V5 alle VLP denaturate può essere dovuto al fatto che la concentrazione di carbonato di sodio utilizzata non sia stata sufficiente a distruggere la struttura conformazionale di tutte le VLP ma solo di una parte di esse.

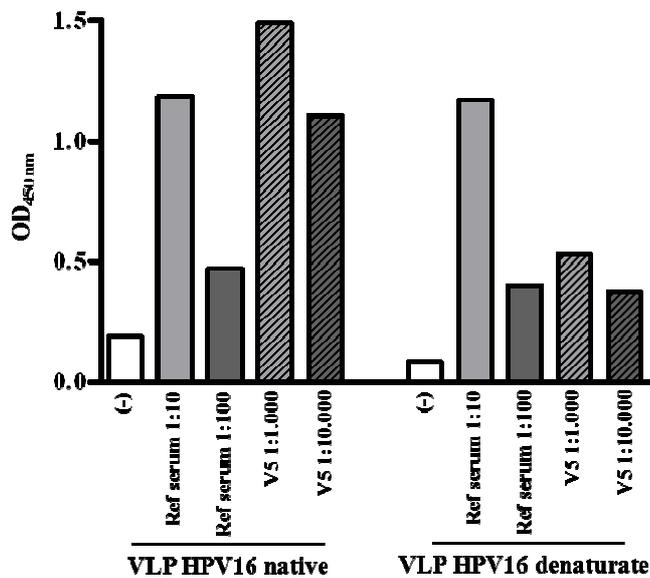


Figura 20. Saggio ELISA per verificare la corretta conformazione delle VLP di HPV16. Per il riconoscimento delle VLP, native e denaturate sono stati utilizzati sia l'anticorpo monoclonale murino H16.V5 sia un siero standardizzato anti-HPV16.

Sulla base di questi risultati si è passati alla produzione su larga delle VLP. Poiché la produzione su piccola scala è risultata ben riproducibile è stato rimodulato il volume di raccolta di ciascuna frazione in modo da accorparle e ottenerne solo 4, così composte:

HPV6 – F1 (31 gocce), F2 (35 gocce), F3 (35 gocce), F4 (volume restante)

HPV11 – F1 (50 gocce), F2 (25 gocce), F3 (25 gocce), F4 (volume restante)

HPV16 – F1 (31 gocce), F2 (35 gocce), F3 (35 gocce), F4 (volume restante)

HPV18 – F1 (40 gocce), F2 (30 gocce), F3 (30 gocce), F4 (volume restante)

Non è stato possibile produrre in un unico esperimento di trasfezione il quantitativo di VLP (di ciascuno dei 4 genotipi) necessario per analizzare tutti i campioni arruolati. Quindi sono stati prodotti piccoli lotti di ciascuna VLP, mediante trasfezione di 6-8 fiasche T75 per singolo plasmide. Di ogni lotto sono state raccolte le frazioni, quantificate mediante metodo BCA e analizzate sia in Western Blot sia con colorazione all'argento per valutare la presenza di impurezze. Al termine di tutte le analisi, le frazioni positive per la presenza di L1, prive di impurezze e con una concentrazione superiore a 70 µg/ml sono state unite

in un unico *pool*, riquantificate mediante BCA, suddivise in aliquote monouso e congelate a -80 °C.

In **Figura 21** è possibile vedere un esempio di analisi delle frazioni raccolte per singolo lotto prodotto, sia mediante colorazione all'argento sia mediante western blot. Ricercando la proteina L1 in western blot è possibile osservare che soltanto le frazioni F2 e F3 contengono le VLP. Inoltre, con la colorazione all'argento (estremamente sensibile e in grado di evidenziare la presenza di impurezze anche a bassissime concentrazioni) è stato possibile scartare le frazioni che pur arricchite di VLP contenevano però residui indesiderati (**Figura 21**, HPV18).

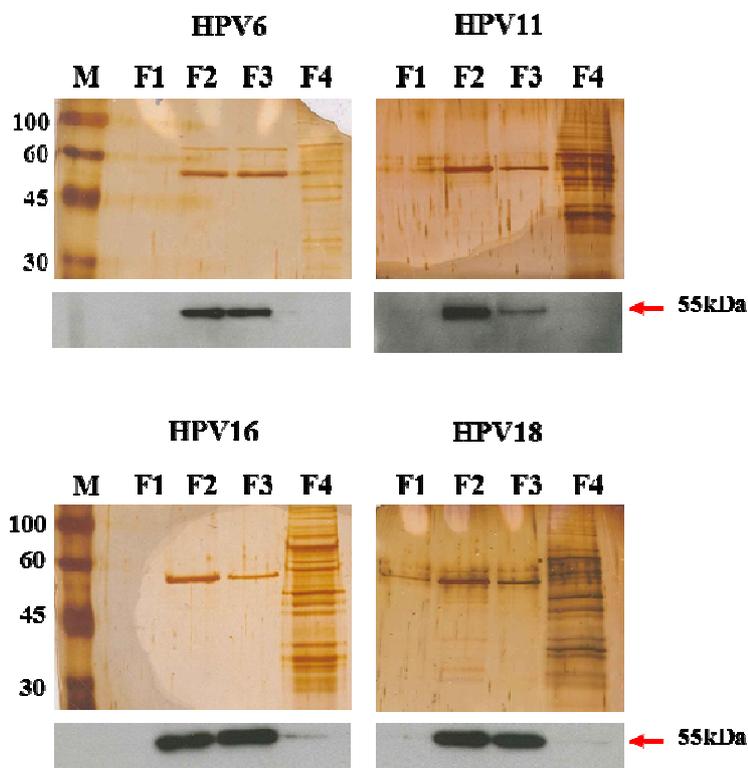


Figura 21. Analisi mediante western blot e colorazione all'argento delle frazioni raccolte dopo gradiente di Optiprep. Le frazioni da analizzare sono state fatte correre in condizioni denaturanti in gel di acrilammide al 10% in presenza di un marker (M) di pesi molecolari (ColorBurst 200-30 kDa). Per ciascun genotipo, il pannello superiore rappresenta il gel sottoposto a colorazione all'argento, mentre quello inferiore l'analisi mediante western blot.

Nella **Tabella 9** sono riassunte le concentrazioni proteiche misurate, per ogni frazione, in ciascun lotto di produzione. In grigio sono evidenziate le frazioni che

soddisfacevano i requisiti che ci siamo posti e sono state poi unite per formare un unico *stock*. Come è possibile osservare (**Tabella 9**), la quantità di VLP prodotte varia molto a seconda del plasmide utilizzato per la trasfezione. In particolare, il plasmide p11L1h è il meno efficiente, nonostante tutti i codoni rari, originariamente presenti nel gene L1, siano stati sostituiti con quelli più frequentemente utilizzati dalle cellule di mammifero. In tal modo l'espressione della proteina L1 è aumentata di circa 100 volte rispetto al gene *wild type*, ma comunque più bassa comparata all'espressione della proteina L1 ottenuta dalla trasfezione con i plasmidi p6sheLLr+, p16sheLL e p18sheLL [Mossadegh N et al., 2004].

Tabella 9. Concentrazione proteica delle frazioni ottenute dopo purificazione delle VLP su gradiente Optiprep

Lotto	HPV6 (µg/ml)				HPV11 (µg/ml)			
	F1	F2	F3	F4	F1	F2	F3	F4
1	116,0	273,8	206,8	955,5	112,7	107,7	75,9	1468
2	195,5	315,5	303,9	812,8	100,7	97,27	60,9	965,1
3	0	260,1	72,9	1104,5	134,3	88,1	78,6	1244,6
4					110,3	151,5	158,0	1693,9
5					153,8	145,8	135,6	1042,2
6					98,1	128,3	121,6	1163,7
7					55,6	79,7	57,4	1391,8
8					173,2	137,7	138,4	1502,5
9					76,5	108,5	117,7	1280,5

Lotto	HPV16 (µg/ml)				HPV18 (µg/ml)			
	F1	F2	F3	F4	F1	F2	F3	F4
1	204,8	217,0	172,1	743,7	107,8	110,4	84,2	676,6
3	180,2	288,3	223,1	881,4	84,5	134,7	89,8	1192,9
4	122,7	294,5	176,9	835,2	98,3	160,4	118,7	1072,4
5					237,9	316,1	235,5	2004,3
6					67,7	126,9	41,8	685,6
7					116,2	334,8	210,2	1614,1

Come già detto, per ciascuna VLP le frazioni positive per L1 e prive di impurità sono state unite in un unico *pool*, la concentrazione proteica è stata misurata e un'aliquota di ciascun *pool* di VLP analizzata un'ultima volta in western blot e mediante colorazione all'argento (**Figura 22**). Ciascuno *stock* di VLP è stato suddiviso in aliquote monouso di circa 25 µg di VLP (quantitativo sufficiente per effettuare il saggio B-cell Elispot per 5 campioni) e conservate a -80 °C fino al momento dell'utilizzo. La concentrazione di ciascun *pool* e il numero di aliquote prodotte sono riportate di seguito:

HPV6 – concentrazione finale 274,6 µg/ml – 180 aliquote da 100 µl

HPV11 – concentrazione finale 124,3 µg/ml – 146 aliquote da 180 µl

HPV16 – concentrazione finale 249,5 µg/ml – 190 aliquote da 120 µl

HPV18 – concentrazione finale 265,6 µg/ml – 170 aliquote da 140 µl

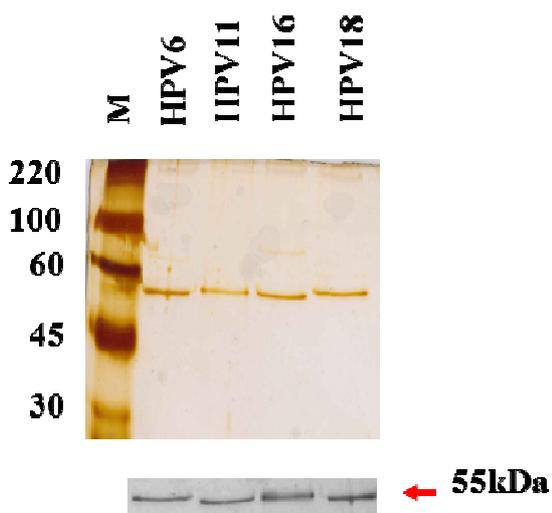


Figura 22. Analisi mediante western blot e colorazione all'argento dei *pool* di frazioni positive, per la proteina L1, di ciascuna VLP. Le frazioni da analizzare sono state fatte correre in condizioni denaturanti in gel di acrilammide al 10% in presenza di un marker (M) di pesi molecolari (ColorBurst 200-30 kDa).

3.3 OTTIMIZZAZIONE DEL SAGGIO B-CELL ELISPOT

Il B-cell Elispot è un saggio molto articolato che richiede molteplici passaggi, ciascuno dei quali contribuisce alla riuscita finale del risultato. Di seguito vengono elencati gli esperimenti che si sono resi necessari per ottimizzare le condizioni di ciascun passaggio.

3.3.1 Scelta del siero fetale bovino

I PBMC sono cellule primarie non particolarmente esigenti dal punto di vista delle condizioni colturali di crescita *in vitro*. Tra le sostanze che compongono il terreno di coltura, il siero bovino fetale è però indispensabile per il mantenimento di queste cellule in coltura. La qualità e l'origine del siero fetale bovino può influenzare significativamente la crescita delle cellule, attivando o inibendo la proliferazione cellulare, e quindi alterare i risultati sperimentali e l'interpretazione dei dati. A tale scopo, sono stati eseguiti alcuni esperimenti volti a scegliere il tipo di siero fetale bovino più idoneo. I PBMC, purificati da 4 donatori sani, sono stati risospesi in 3 terreni di coltura differenti, ciascuno contenente un siero fetale bovino fornito da 3 ditte diverse [FBS1 (Lonza), FBS2 (Euroclone) e FBS3 (Gibco)]. Quindi, ciascuna sospensione cellulare ($0,5 \times 10^6$ cellule/ml) è stata coltivata in duplicato come tale (cellule non stimolate) o stimolata con due concentrazioni (5 e 10 $\mu\text{g/ml}$) diverse di fitoemoagglutinina (PHA, un forte attivatore aspecifico di crescita cellulare) per 3 giorni a 37 °C. Dopo l'incubazione, è stata valutata la proliferazione della cellula di ciascun campione, non stimolato e stimolato, mediante il saggio MTT. In particolare, si è valutato il rapporto della densità ottica (valore direttamente proporzionale alla crescita delle cellule) delle cellule cresciute in presenza di un mitogeno rispetto al valore di densità ottica delle cellule cresciute in assenza di stimolazione (i PBMC crescono poco in coltura in assenza di stimolazione). Il valore del rapporto così ottenuto è indicativo dell'effetto del siero sulla crescita delle cellule. Come riportato in **Figura 23** i tre sieri hanno valori assoluti di OD, in presenza di PHA paragonabili.

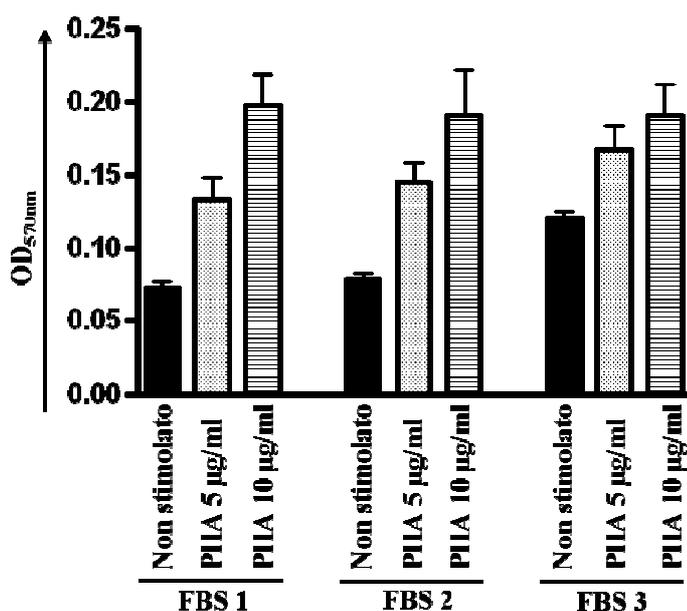


Figura 23. Analisi dell'effetto di differenti lotti di siero fetale bovino sulla crescita delle cellule. PBMC di sangue periferico purificati da 4 donatori sani sono stati incubati per 3 giorni a 37 °C in terreno contenente FBS1, FBS2 o FBS3, sia in assenza di stimolo, sia in presenza di 5 o di 10 µg/ml di PHA. La proliferazione cellulare è stata, quindi, misurata con il saggio MTT. I risultati per ogni condizione sono la media (+ SD) dei valori di OD 570 nm ottenuti dalle cellule dei 4 donatori.

Tuttavia, se si analizza l'indice di stimolazione (rapporto tra OD_{stimolato} e OD_{non stimolato}) (**Figura 24**), il siero FBS3 ha un valore inferiore rispetto a FBS1 e FBS2, suggerendo che tale siero favorisce la proliferazione delle cellule anche in assenza di stimoli mitogeni esterni.

Sulla base di questi risultati, e del costo di ciascun siero, è stato scelto il siero FBS1. Ne è stato acquistato un grosso quantitativo e tutti gli esperimenti di questo progetto sono stati eseguiti con lo stesso lotto di siero bovino fetale.

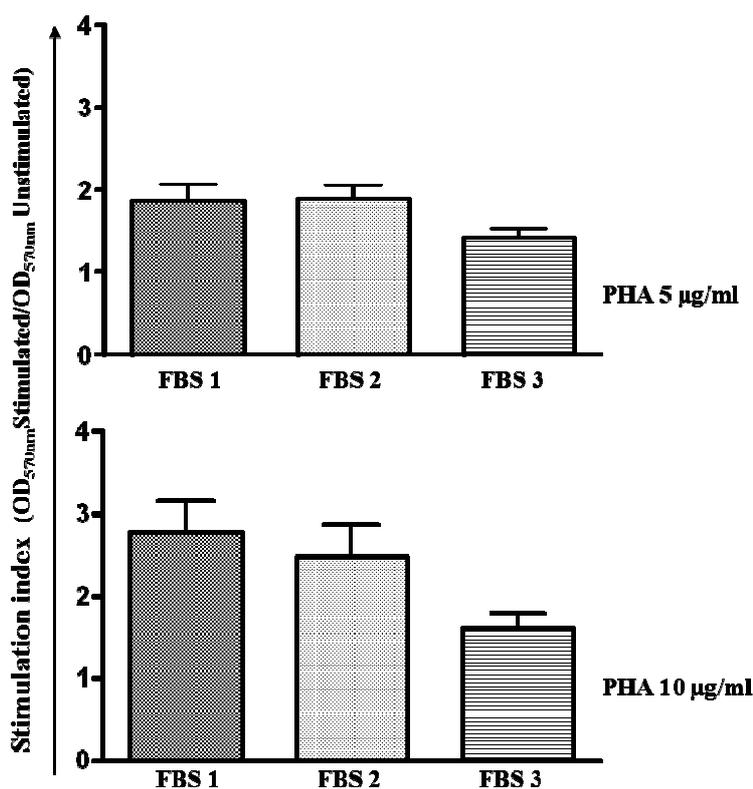


Figura 24. Indice di stimolazione di tre lotti di siero bovino fetale. PBMC ottenuti dalle cellule di 4 donatori sono stati stimolati e non con PHA (5-10 µg/ml) per 3 giorni a 37 °C in terreno contenente FBS1, FBS2 o FBS3, sia in assenza di stimolo, sia in presenza di 5 o di 10 µg/ml di PHA. La proliferazione cellulare è stata, quindi, misurata con il saggio MTT. In ordinata è rappresentato il rapporto dei valori medi tra OD_{stimolati} e OD_{non stimolati}

3.3.2 Ottimizzazione delle condizioni di crescita e di stimolazione dei PBMC per differenziare i linfociti B in plasmacellule

I linfociti B memoria circolano nel sangue in continuazione secernendo un quantitativo di anticorpi sufficiente ad individuare un antigene noto e a scatenare la risposta anamnestic. Per quantificare il numero di linfociti B memoria eseguendo il saggio B-cell Elispot è necessario stimolare *ex vivo* i PBMC purificati da un individuo al fine di indurre il differenziamento di tali cellule in plasmacellule, che secernendo elevate quantità di anticorpi antigene-specifici sono facilmente rilevabili.

Lo scopo dei seguenti esperimenti è stato valutare i seguenti parametri: 1) quale sia lo stimolo policlonale ottimale per attivare i linfociti B *ex-vivo*, 2) stabilire quali siano le migliori condizioni di crescita delle cellule (in piastre da 24 pozzetti

rispetto a piastre da 96 pozzetti) e 3) determinare il tempo ottimale di stimolazione prima dell'esecuzione del saggio B-cell Elispot (5 giorni rispetto a 6 giorni).

Gli stimoli policlonali definiti B, C e D contengono un olinucleotide (ODN 2006), *Staphylococcus aureus Cowan I*, e *Pokeweed*, a diverse concentrazioni per ciascuno stimolo. In particolare lo stimolo B contiene ODN 2006 (3 µg/ml), *S. aureus Cowan I* (1:10.000) e *Pokeweed* (0,1 µg/ml). Lo stimolo C è composto da ODN 2006 (6 µg/ml), *S. aureus Cowan I* (1:10.000) e *Pokeweed* (1 µg/ml). Infine lo stimolo D è composto da ODN 2006 (2,5 µg/ml), *S. aureus Cowan I* (1:5.000) e *Pokeweed* (0,06 µg/ml).

I PBMC ottenuti da 14 donatori sani ($0,5 \times 10^6$ cellule/ml) sono stati seminati, in doppio, in piastre da 24 pozzetti e da 96 pozzetti, coltivati in assenza e in presenza di ciascuno stimolo, e incubati a 37 °C per 5 e 6 giorni. Dopo l'incubazione, l'attivazione cellulare è stata valutata mediante saggio MTT. Come riportato nella **Figura 25**, gli stimoli policlonali B e D sono risultati i migliori. I risultati, inoltre, indicano che la semina delle cellule in piastre da 24 o da 96 pozzetti non influenza in modo significativo l'esito del saggio. Infine, l'attivazione cellulare è risultata superiore dopo 6 giorni d'incubazione (anche se le differenze non sono statisticamente significative).

Sulla base di questi risultati è stato scelto lo stimolo B in quanto la sua composizione richiede la minore quantità di reagenti, ed è perciò il più economico. Inoltre, si è scelto come supporto di crescita cellulare la piastra da 24 pozzetti poiché i volumi da seminare per ciascun individuo sono elevati (8-10 ml) e ciò riduce la possibilità di errori nell'esecuzione del saggio. Infine, si è scelto di stimolare le cellule per 5 giorni.

In conclusione, questi esperimenti hanno permesso di standardizzare il protocollo per la coltivazione e la stimolazione dei PBMC da utilizzare per il saggio B-cell Elispot.

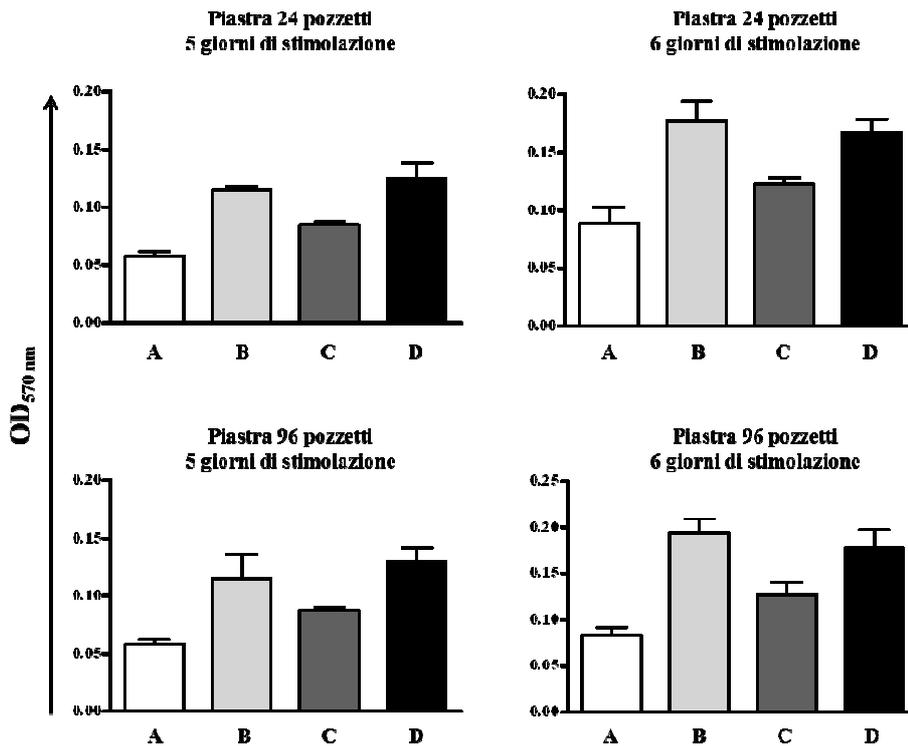


Figura 25. Analisi dei parametri di crescita dei PBMC in diverse condizioni sperimentali. I PBMC sono stati seminati in doppio in piastre da 24 e da 96 pozzetti, coltivati in assenza di stimolo (colonna A) e in presenza di ciascun stimolo B, C, D e incubati a 37 °C per 5 e 6 giorni. Dopo l'incubazione, la crescita cellulare è stata valutata mediante saggio MTT. I valori di OD_{570 nm} riportati sono la media (+SD) dei dati ottenuti con le cellule di 14 donatori sani.

3.3.3 Determinazione del numero ottimale di plasmacellule da seminare per quantificare i cloni B reattivi che producono IgG totali

Dopo avere stabilito le condizioni ottimali di coltura dei PBMC, si sono eseguiti esperimenti per determinare il numero di cellule ottimale da seminare nelle piastre da B-cell Elispot. Per l'esecuzione di questo saggio è necessario che il numero di cellule seminate nei pozzetti sia tale per cui gli spot (ciascuno corrispondente a una cellula secernente), che si ottengono al termine, siano ben isolati per poter essere contati dal lettore automatico. Se il numero di cellule presenti nel pozzetto è troppo elevato, gli spot tenderanno a sovrapporsi e la quantificazione sarà sottostimata o addirittura impossibile. Viceversa, se sono presenti poche cellule, si rischia di ottenere un numero di spot troppo basso e simile a quello dei pozzetti di controllo (background) in cui sono state seminate le cellule non stimolate.

A questo scopo i PBMC di 14 donatori sani sono stati stimolati *ex-vivo* in piastre da 24 pozzetti con lo stimolo B per 5 giorni e successivamente, contati e seminati, in duplicato, nella piastra Elispot (pre-adsorbita con un anticorpo anti IgG umane) a concentrazioni di 100.000, 50.000 e 25.000 cellule per pozzetto. La piastra è stata incubata 2 ore a 37 °C. Successivamente le cellule sono state rimosse e la piastra sviluppata secondo le istruzioni fornite nel kit per quantificare il numero di cellule B secernenti IgG totali.

I risultati di questi esperimenti, mostrati in **Figura 26** e **Figura 27**, dimostrano invece che esiste una correlazione inversamente proporzionale tra il numero di cellule seminate e il numero di spot calcolati (spot/10⁶ cellule). In particolare, se si osservano le foto dei pozzetti nei quali sono state seminate 100.000 e 50.000 cellule stimolate (**Figura 26**) gli spot sono sovraffollati e in parte sovrapposti, quindi inadatti per determinare il numero preciso di linfociti B secernenti anticorpi. In base a queste prove si è scelto di seminare 25.000 cellule per pozzetto in quanto gli spot risultavano più nitidi e, quindi, più facilmente quantificabili.

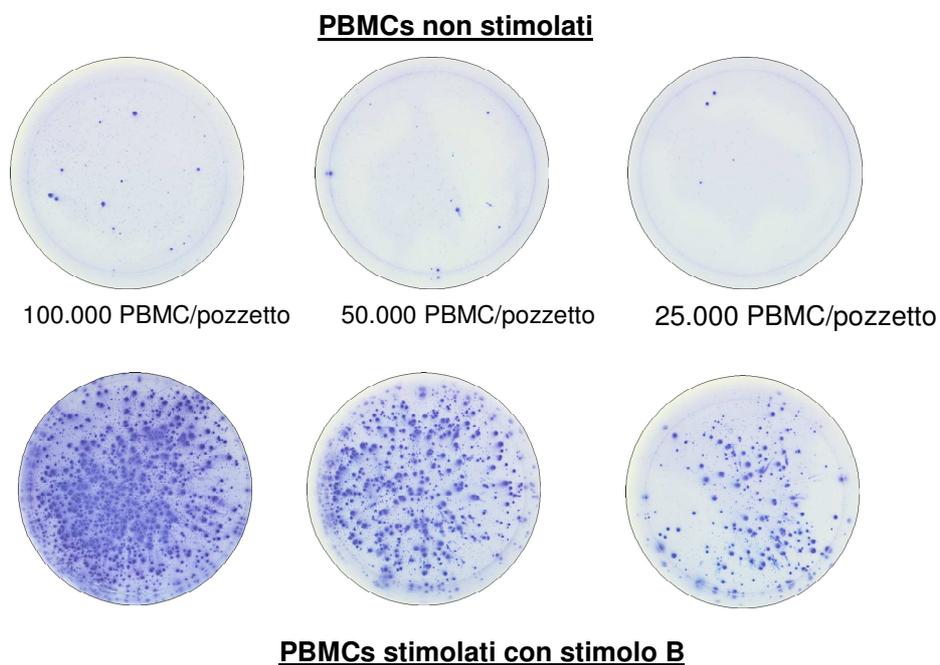


Figura 26. Immagine dei pozzetti di una piastra Elispot per la ricerca delle IgG totali. Pozzetti con PBMC non stimolati (in alto) e stimolati con lo stimolo B (in basso) alle concentrazioni di 100.000, 50.000 e 25.000 PMBC/pozzetto.

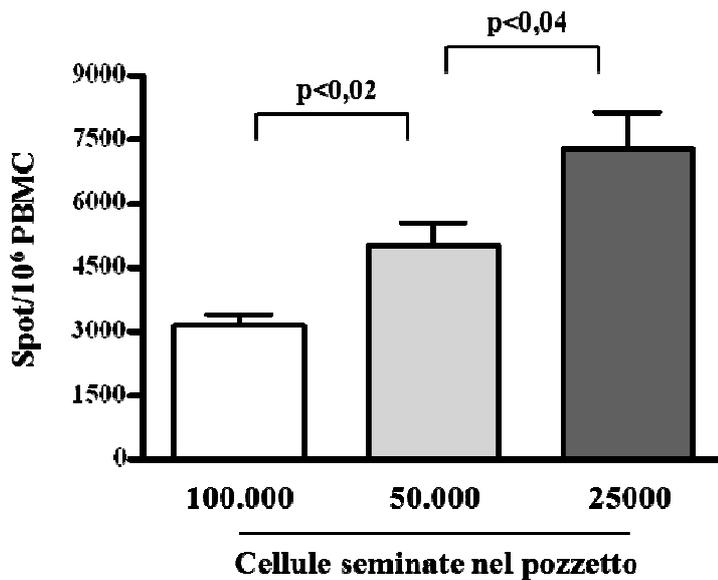


Figura 27. Determinazione del numero ottimale di cellule da utilizzare in saggio B-cell Elispot. I PBMC di 14 donatori sono stati stimolati *ex-vivo* per 5 giorni, seminati nei pozzetti della piastra Elispot (pre-assorbiti con un anticorpo anti-IgG umane), alla concentrazione di 100.000, 50.000 e 25.000 cellule/pozzetto. I risultati sono la media (+ SD) dei valori ottenuti da 14 campioni.

3.3.4 Confronto dei risultati del saggio B-cell Elispot per la ricerca di linfociti B secernenti IgG totali eseguiti su PBMC freschi e dopo un ciclo di congelamento/scongelo

In previsione dell'uso di questo saggio per analizzare campioni di individui vaccinati con *Gardasil* e *Cervarix*, si è pensato che non potrebbe essere sempre possibile eseguire il saggio Elispot immediatamente dopo la raccolta del campione e che, pertanto, potrebbe essere necessario congelare le cellule subito dopo il prelievo.

E' noto che le procedure di congelamento e di scongelamento delle cellule (soprattutto se cellule primarie) possono causare morte cellulare. Se la perdita di cellule è significativa ciò porterebbe a perdita del campione da analizzare, oppure ad un'alterazione importante del risultato.

Per valutare l'effetto delle procedure di congelamento e di scongelamento sul risultato del saggio B-cell Elispot, i PBMC di 14 donatori sono stati suddivisi in due aliquote: una è stata utilizzata per il saggio B-cell Elispot subito dopo il

prelievo, mentre la seconda, prima dell'esecuzione del saggio, è stata congelata e, successivamente, scongelata.

Il procedimento eseguito poi è stato lo stesso per entrambe le aliquote, ovvero stimolazione *ex-vivo* per 5 giorni seguita dal conteggio delle cellule e semina nelle piastre per Elispot pre-adsorbite con un anticorpo anti-IgG umana. Oltre allo stimolo B, si è scelto di saggiare, come attivatore policlonale dei linfociti B, anche una sostanza disponibile in commercio (Mabtech) premiscelata, e costituita da agonisti dei TLR-7 -8 e da IL-2. Si è voluto, verificare anche la capacità stimolatoria di questo induttore poiché essendo uno stimolo commerciale è già stato sottoposto a tutte le procedure di standardizzazione e si poteva comprare un unico lotto da utilizzare per l'analisi di tutti gli individui vaccinati; mentre i reagenti che compongono lo stimolo B sono miscelati al momento dell'uso, aumentando la possibilità di introdurre delle variabili.

I risultati degli esperimenti dimostrano che, sulle cellule fresche, lo stimolo B è un attivatore policlonale dei linfociti B più potente rispetto allo stimolo commerciale Mabtech, mentre il numero di cellule che secernono IgG totali risente maggiormente dell'effetto di congelamento/scongelamento (**Figura 28**, pannello A). Al contrario, il congelamento/scongelamento non influenza l'esito del saggio B-cell Elispot delle cellule trattate con lo stimolo commerciale Mabtech (**Figura 28**, pannello B). Confrontando i risultati ottenuti con i due stimoli policlonali solo sulle cellule congelate/scongelate (**Figura 29**), nella condizione ottimale di semina, cioè 25.000 cellule/pozzetto, si osserva che comunque lo stimolo B è migliore per attivare i linfociti B essendo sempre maggiore il numero di cellule B quantificate.

Sulla base di questi risultati, al fine di evitare errori grossolani nei risultati, si è scelto di congelare tutti i campioni degli individui arruolati nello studio, e di processarli tutti dopo scongelamento. Inoltre, è stato definitivamente scelto come attivatore policlonale *ex vivo* dei PBMC lo stimolo B.

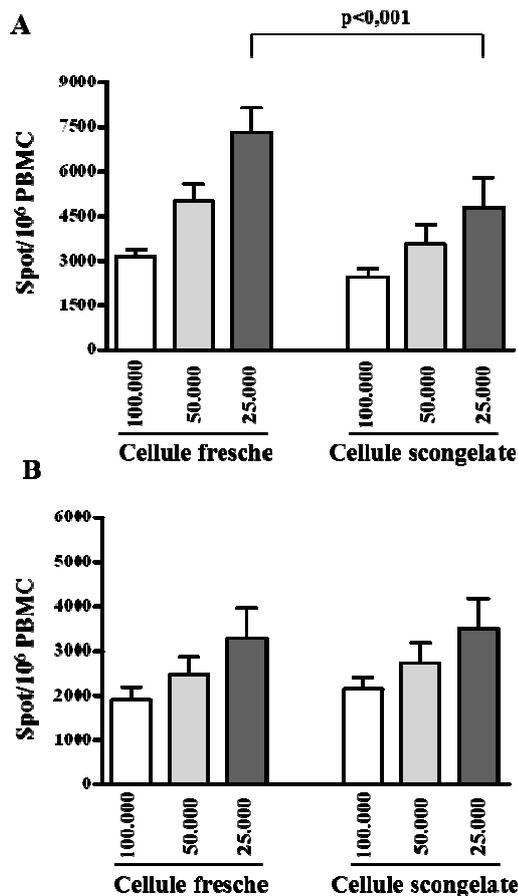


Figura 28. Confronto dei risultati di saggi B-cell Elispot per la ricerca di cellule B secernenti IgG totali eseguiti su PBMC freschi e dopo congelamento/scongelo. I PBMC freschi e dopo scongelamento sono stati stimolati *ex vivo* con lo stimolo B (pannello A) o con lo stimolo commerciale Mabtech (pannello B). I risultati sono la media (+SD) di 14 donatori.

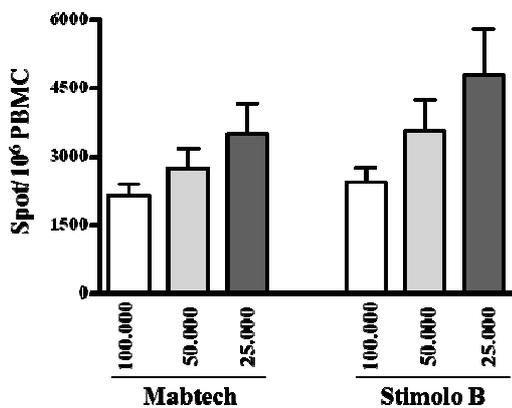


Figura 29. Confronto dei risultati di saggi B-cell Elispot descritti in Figura 31 eseguiti su PBMC dopo congelamento/scongelo. I PBMC dopo scongelamento sono stati stimolati *ex vivo* con lo stimolo B o con lo stimolo commerciale Mabtech. I risultati sono la media (+SD) di 14 donatori.

3.3.5 Determinazione del numero ottimale di cellule B secernenti IgG totali e anticorpi antigene-specifici per l'esecuzione del saggio B-cell Elispot

Per poter calcolare la frequenza dei cloni reattivi di linfociti B memoria secernenti anticorpi (di classe isotipica IgG) verso uno specifico antigene, le cellule derivanti dalla stimolazione policlonale *ex vivo*, devono essere piastrate in due piastre parallele, una preassorbita con un anticorpo anti IgG umane (per quantificare tutti i linfociti B secernenti IgG) e l'altra preassorbita con l'antigene verso il quale si ricerca la presenza di cellule B secernenti IgG specifiche. E' possibile quindi calcolare la frequenza delle cellule B memoria specifiche per un determinato antigene applicando la seguente formula:

$$[\text{Linfociti B antigene-specifici (SFC}/10^6)/\text{Linfociti B totali (SFC}/10^6)] \times 100$$

Pertanto, per ottimizzare la ricerca delle cellule B secernenti anticorpi diretti verso la proteina capsidica L1 di HPV 6, 11, 16 e 18 nel sangue periferico di persone vaccinate con Gardasil e Cervarix, sono stati utilizzati alcuni campioni di volontari con ciascuno dei quali si sono eseguiti un B-cell Elispot utilizzando come antigene le VLP prodotte in laboratorio (come descritto nei precedenti paragrafi), e in parallelo un saggio B-cell Elispot per quantificare il numero di linfociti B secernenti IgG totali.

Relativamente alla determinazione del numero di cellule B secernenti IgG totali negli individui vaccinati si è osservato che il numero di cellule seminate nei pozzetti delle piastre da Elispot (25.000/pozzetto scelto sulla base degli esperimenti precedenti) era ancora troppo elevato, poiché molti pozzetti sono risultati non contabili dal lettore di piastre. I 14 volontari sani utilizzati per fare le tutte le prove preliminari avevano un'età compresa fra i 38 e 55 anni, mentre lo studio prevede un coinvolgimento di adolescenti (12 anni) e giovani donne (20-46 anni). Poiché è noto dalla letteratura che l'età influisce negativamente sull'ampiezza delle risposte del sistema immunitario, è stato quindi necessario ridurre ulteriormente il numero di cellule stimulate da seminare nei pozzetti per l'esecuzione del saggio B-cell Elispot per la ricerca delle cellule B secernenti IgG totali. Sono state seminate rispettivamente 12.500, 6250 e 3125 cellule/pozzetto, e si è calcolato il numero di spot/10⁶. Come mostrato in **Figura 30**, si può osservare che non ci sono differenze significative tra le differenti semine, e quindi

che tutte le condizioni sono equivalenti. Poiché l'intervallo di età dei soggetti arruolati è ampio, si è preferito, per ciascun individuo, seminare sempre le cellule alle 3 differenti concentrazioni e di standardizzare il calcolo alla concentrazione di 6250 cellule/pozzetto.

Relativamente alla valutazione della frequenza di cloni reattivi antigene-specifici, poiché tale numero è generalmente inferiore all'1% abbiamo scelto di seminare 250.000 cellule/pozzetto. Non è stato possibile effettuare altre prove preliminari poiché la quantità di PBMC necessaria sarebbe stata troppo elevata e avrebbe richiesto un prelievo di sangue da ciascun volontario di circa 20 ml, non concesso dal Comitato Etico.

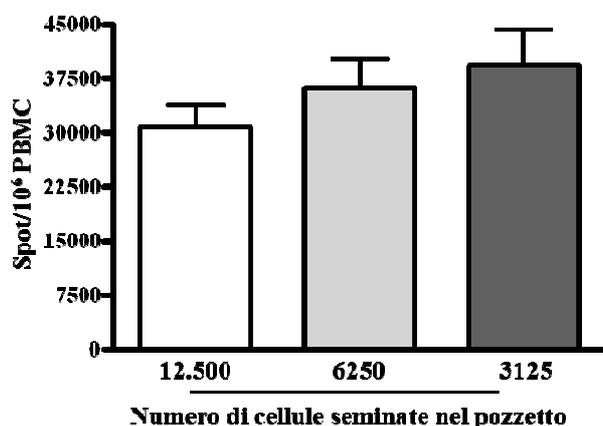


Figura 30. Determinazione del numero ottimale di PBMC stimolati da utilizzare nei saggi B-cell Elispot per la quantificazione delle cellule B secernenti IgG totali in individui vaccinati. I PBMC di 15 individui vaccinati con Gardasil sono stati stimolati *ex vivo* per 5 giorni, seminati nella piastra Elispot (pre-assorbita con un anticorpo anti-IgG umana), alla concentrazione di 12.500, 6.250 e 3.125 cellule/pozzetto. I risultati sono la media (+ SD) dei valori ottenuti dai 15 campioni.

Dal punto di vista operativo, per ciascun individuo, 8×10^6 PBMC purificati da sangue intero sono stati seminati in piastre da 24 pozzetti ad una concentrazione di $0,5 \times 10^6$ /ml (1 ml/pozzetto). Di questi, 4×10^6 PBMC sono stati addizionati con lo stimolo B per indurre il differenziamento dei linfociti B memoria in plasmacellule e i rimanenti 4×10^6 non sono stati stimolati rappresentando perciò la condizione basale. Dopo 5 giorni di stimolazione, le cellule sono state lavate, contate e piastrate nuovamente (come appena descritto) per l'esecuzione del

saggio B-cell Elispot per la quantificazione delle cellule B secernenti IgG totali e IgG antigene-specifiche. Dopo 2 ore di incubazione le cellule sono state rimosse e le piastre sono state sviluppate come descritto nel capitolo “Materiali e Metodi”.

3.3.6 Determinazione del cutoff per i saggi B-cell Elispot ed ELISA

Nei paragrafi precedenti sono stati descritti gli esperimenti che hanno condotto alla standardizzazione delle metodiche per la produzione su larga scala le VLP e del saggio B-cell Elispot.

La finalità degli esperimenti di seguito descritti è stata quella di effettuare lo screening di una coorte di adolescenti e giovani donne vaccinate con Gardasil a) stratificate per età di somministrazione del vaccino (12 anni e 20-45 anni), per valutare se il fattore “età” influisce sull’intensità della risposta immunitaria al vaccino; b) stratificate per tempo trascorso dalla somministrazione della 3^a dose di vaccino e la raccolta del campione (1-6 mesi e 4-5 anni) per valutare la persistenza della risposta immunitaria.

Prima di iniziare l’analisi dei campioni di sangue provenienti dalle vaccinate, per determinarne la frequenza delle cellule memoria specifiche anti-HPV e il relativo titolo anticorpale, sono stati analizzati 24 campioni di individui (di sesso femminile, intervallo di età 22-40 anni) che non hanno ricevuto alcun vaccino anti-Papillomavirus, al fine di stabilire valori soglia (cutoff) al di sopra del quale considerare positive le risposte. I valori di frequenza delle cellule B memoria HPV-specifiche (saggio B-cell Elispot) e i valori di assorbanza (OD) relativi alla presenza di anticorpi anti-HPV nel plasma (saggio ELISA) sono riassunti in **Tabella 10**.

Dei soggetti non vaccinati non si conosce la storia, in termini di infezioni naturali pregresse causate da HPV. Nel caso della frequenza delle cellule B memoria, 20 soggetti avevano un valore inferiore a 0,09% e 4 soggetti (nei confronti di tutti gli antigeni vaccinali) avevano valori compresi tra 0,1% e 0,355%. Quindi, per calcolare il valore soglia non è stato utilizzato il valore mediano, che avrebbe completamente escluso il peso di questi 4 individui, ma il valore medio. Relativamente ai valori di assorbanza ottenuti con il saggio ELISA, i valori erano uniformi, poiché, come è noto dalla letteratura, non tutte le donne sierconvertono

dopo un'infezione da HPV e qualora questo accadesse i titoli anticorpali sono anche 1000 volte inferiori a quelli di individui vaccinati con Gardasil o Cervarix. Quindi, per il saggio ELISA, il valore soglia per ciascun HPV è stato calcolato sommando il valore medio della OD e 3 volte la deviazione standard.

Tabella 10. Frequenza delle cellule B memoria e valori di assorbanza relativi alla presenza di anticorpi anti-HPV in soggetti non vaccinati per determinare i valori di cutoff dei successivi saggi

		Intervallo di frequenza (%)	Mediana	Media
B-cell Elispot	HPV6	0 - 0,210	0,040	0,059
	HPV11	0 - 0,302	0,057	0,066
	HPV16	0 - 0,250	0,055	0,078
	HPV18	0 - 0,355	0,050	0,074
		Intervallo di assorbanza (OD)	Media	Media+ 3SD
ELISA	HPV6	0,120 - 0,385	0,217	0,388
	HPV11	0,124 - 0,319	0,230	0,367
	HPV16	0,129 - 0,345	0,227	0,374
	HPV18	0,159 - 0,297	0,220	0,346

3.4 VALUTAZIONE DELL'IMMUNITA' B ANTIGENE-SPECIFICA IN SOGGETTI VACCINATI CON GARDASIL O CERVARIX

3.4.1 Analisi del numero di soggetti, vaccinati con *Gardasil*, con valori superiori al cutoff (% di responders) di cellule B memoria e dei titoli anticorpali

Si è proceduto ad eseguire il saggio B-cell Elispot e alla determinazione del titolo anticorpale dei campioni provenienti dagli individui vaccinati con *Gardasil*. Come già detto in precedenza, i soggetti sono stati suddivisi per età di somministrazione del vaccino e per tempo intercorso tra il momento del ricevimento della 3^a dose di vaccino e il prelievo di sangue.

Dopo 1-6 mesi dalla vaccinazione, la percentuale di individui con valori superiori al cutoff (responders) relativamente alla frequenza di cellule B memoria varia dal

92,9% al 100% nel caso di HPV6/11/16 per entrambe le coorti di età, mentre per HPV18 questo valore è dell'80% nel caso delle adolescenti (12 anni) e del 88,9% nel caso delle donne (20-45 anni) (**Figura 31**, pannello superiore). Anche dopo 4 anni dalla vaccinazione, la percentuale di individui con cellule B della memoria misurabili nel sangue risulta piuttosto alta. Come fisiologicamente atteso, si assiste ad una riduzione di tale percentuale che comunque non è significativa nel caso di HPV6, 11 e 16 per entrambe le coorti di età, mentre per HPV18, solo nel caso della coorte 20-45 anni si osserva (**Figura 31**, pannello superiore) una riduzione significativa del numero di individui con cellule B della memoria quantificabili.

Dopo 1-6 mesi dall'ultima vaccinazione, relativamente alla percentuale di individui con titoli anticorpali superiori al cutoff (**Figura 31**, pannello inferiore), tale valore è del 100%, per tutti gli antigeni, per la coorte delle adolescenti, mentre varia tra il 93,4% e il 100% nel caso della coorte 20-45 anni. Il numero di individui con un valore di IgG misurabili anche dopo 4 anni diminuisce significativamente per tutti gli antigeni di HPV per entrambe le coorti analizzate.

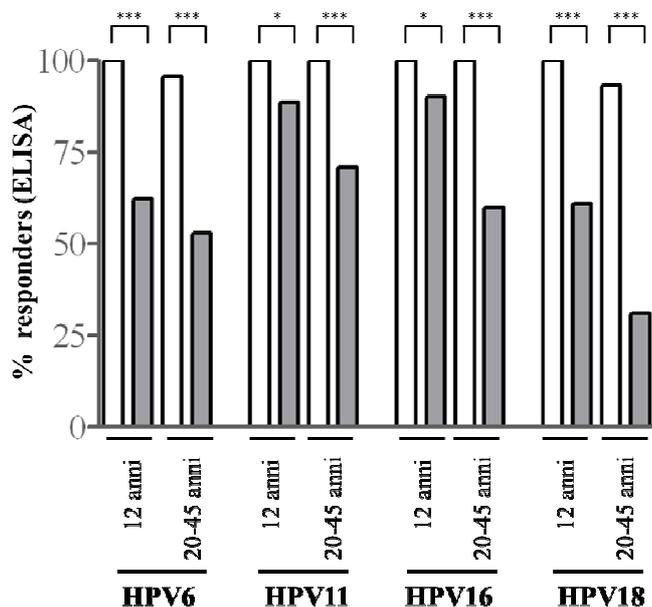
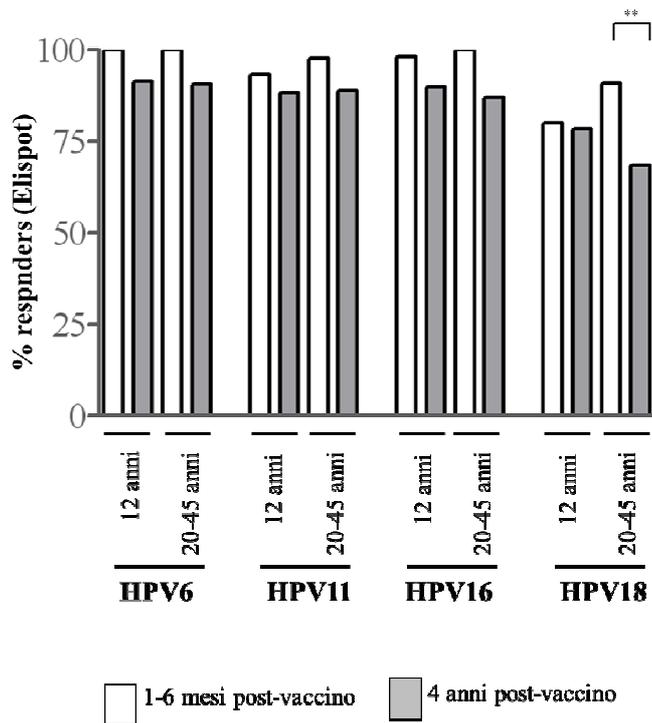


Figura 31. Analisi della percentuale di individui con valori superiori al cutoff (responders) dopo 1-6 mesi dalla vaccinazione. La percentuale di responders relativa alla frequenza delle cellule B memoria è rappresentata nel pannello superiore, mentre la percentuale di responders relativa ai titoli anticorpali è disegnata nel pannello inferiore. Campioni analizzati per ciascun antigene vaccinale: n = 60 coorte 12 anni e n = 45 coorte 20-45 (1-6 mesi post vaccinazione); n = 61 coorte 12 anni e n = 57 coorte 20-45 anni (4 anni post vaccinazione). L'analisi statistica è stata effettuata eseguendo il test del chi-quadrato con correzione di Yates. (*) p < 0,05; (**) 0,01 < p < 0,001; (***) p < 0,0001.

Inoltre, come si osserva in **Tabella 11**, la percentuale di individui con IgG ancora misurabili, dopo 4 anni dalla vaccinazione, è significativamente inferiore nella corte 20-45 anni rispetto alla corte delle adolescenti per HPV11, 16 e 18, mentre la percentuale di individui che hanno cellule B della memoria quantificabili non varia tra le due coorti.

Tabella 11. Percentuale di responder dopo 4 anni dalla vaccinazione, di cellule B della memoria e di titoli anticorpali

	% responders cellule B memoria			% responders titoli anticorpali		
	12 anni	20-45 anni	p value	12 anni	20-45 anni	p value
HPV6	92,0	91,3	ns	62,3	52,7	ns
HPV11	88,7	89,5	ns	88,6	70,9	0,032
HPV16	90,3	87,7	ns	90,2	60,0	0,0004
HPV18	79	70,2	ns	60,6	30,9	0,0012

3.4.2 Frequenza delle cellule B della memoria in adolescenti e donne vaccinate con *Gardasil*

Come precedentemente accennato, la frequenza di cellule B memoria HPV-specifiche è la percentuale del numero di cloni reattivi verso la proteina L1 di un determinato genotipo rispetto al totale delle cellule B che producono IgG. La **Figura 32**, mostra la frequenza delle cellule B memoria indotta dal *Gardasil* in campioni di adolescenti e giovani donne analizzati 1-6 mesi dopo la somministrazione del vaccino. Dalle analisi sono stati esclusi i campioni al di sotto del cutoff. Le frequenze delle cellule B memoria anti-HPV6, 11 e 16 sono comparabili tra di loro in entrambe le coorti di età, mentre per HPV18 la frequenza delle cellule B memoria è significativamente inferiore a quella degli altri genotipi di HPV in entrambe le coorti di età, suggerendo che la proteina L1 di HPV18 sia meno immunogenica rispetto alla stessa proteina degli altri genotipi di HPV e che l'età di somministrazione del vaccino non influenzi il numero di linfociti B antigene-specifici indotti dal *Gardasil*.

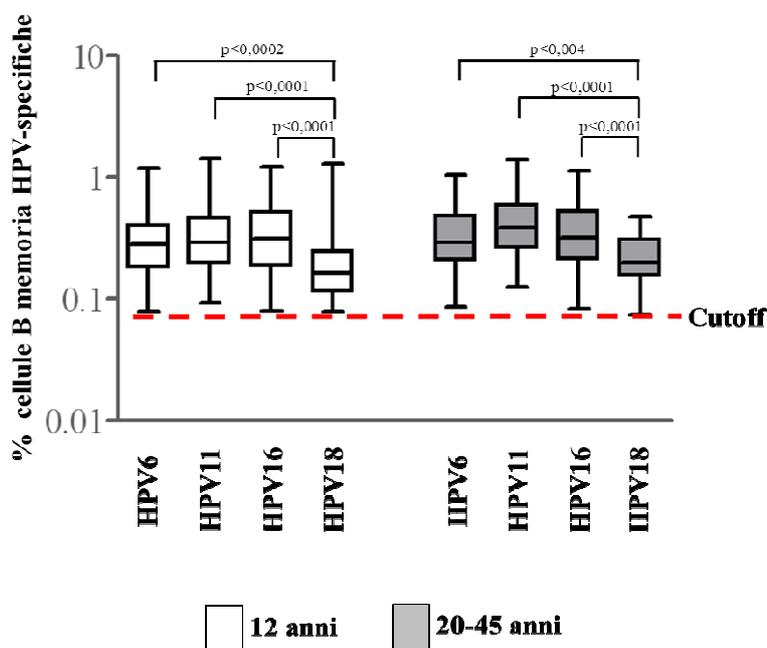


Figura 32. Frequenza delle cellule B memoria in adolescenti e giovani donne vaccinate con *Gardasil*, dopo 1-6 mesi dalla vaccinazione. Sono stati inclusi nell'analisi solo i campioni con valori superiori al cutoff. Coorte 12 anni: HPV6 n = 60, HPV11 n = 56, HPV16 n = 59, HPV18 n = 48. Coorte 20-45 anni: HPV6 n = 45, HPV11 n = 45, HPV16 n = 45, HPV18 n = 40. Ciascun "box & whiskers" rappresenta il valore minimo e massimo e il valore mediano. I dati sono stati analizzati mediante il test statistico non parametrico Mann-Whitney.

Un'analoga analisi è stata effettuata su campioni di adolescenti e giovani donne dopo 4 anni dalla somministrazione del vaccino. Anche in questo caso sono stati considerati solo i valori superiori al cutoff. La **Figura 33** mostra una distribuzione delle frequenze delle cellule B memoria HPV-specifiche molto simile a quella già descritta in **Figura 32**: il numero di linfociti B anti-L1 di HPV6, 11 e 16 è simile tra di loro e in entrambe le coorti di età, mentre per HPV18 è inferiore in maniera significativa rispetto ad HPV11 e 16. Anche a distanza di 4 anni dalla vaccinazione con *Gardasil*, il numero di cellule B memoria indotto non è influenzato dall'età di somministrazione del vaccino. Inoltre, il numero di linfociti B HPV-specifici risulta ancora significativamente superiore al valore soglia ($p < 0,0001$, dato non presente in figura), per ciascun antigene e per entrambe le coorti di età a distanza di 4 anni dalla vaccinazione.

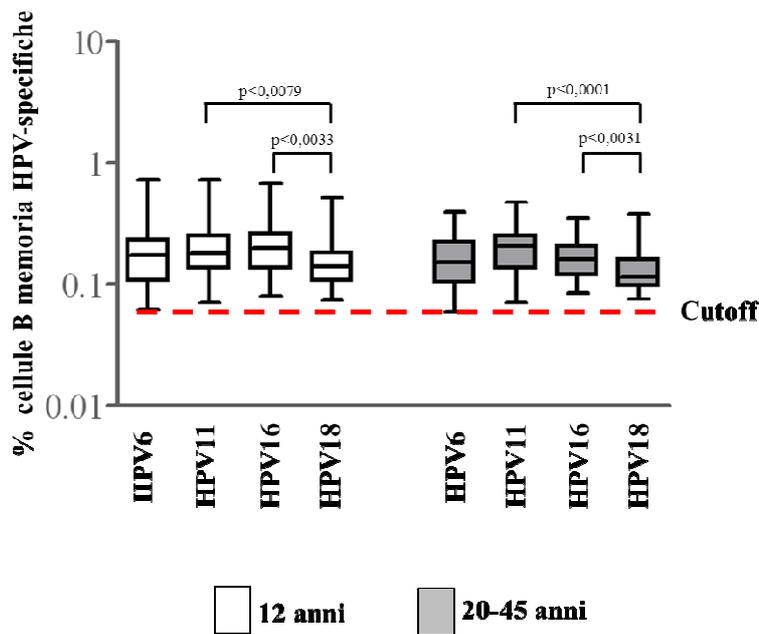


Figura 33. Frequenza delle cellule B memoria in adolescenti e giovani donne vaccinate con *Gardasil*, dopo 4 anni dalla vaccinazione. Sono stati inclusi nell'analisi solo i campioni con valori superiori al cutoff. Coorte 12 anni: HPV6 n = 57, HPV11 n = 55, HPV16 n = 56, HPV18 n = 49. Coorte 20-45 anni: HPV6 n = 52, HPV11 n = 51, HPV16 n = 50, HPV18 n = 40. Ciascun "box & whiskers" rappresenta il valore minimo e massimo e il valore mediano. I dati sono stati analizzati mediante il test statistico non parametrico Mann-Whitney.

Sovrapponendo i dati delle **Figure 32** e **33** è possibile osservare la variazione nel tempo del numero di linfociti B memoria nelle adolescenti e nelle donne vaccinate con *Gardasil* (**Figura 34**). Il numero di linfociti B memoria HPV-specifici si riduce significativamente dopo 4 anni dalla somministrazione del vaccino rispetto ai valori osservati dopo 1-6 mesi dall'ultima vaccinazione. Questa riduzione è evidente nei confronti di tutti gli antigeni vaccinali e anche in entrambe le coorti di età, ad eccezione del numero di cellule B memoria anti-HPV18 nella coorte di adolescenti, dove non c'è alcuna variazione statisticamente significativa nel corso del tempo.

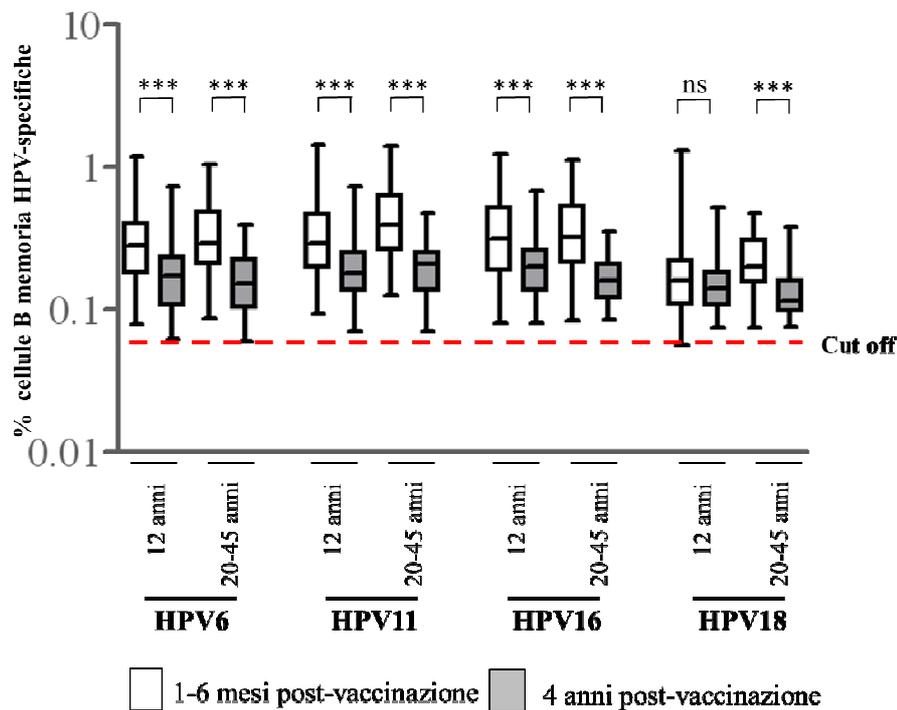


Figura 34. Confronto della frequenza delle cellule B memoria in adolescenti e giovani donne vaccinate con *Gardasil*, dopo 1-6 mesi e 4 anni dalla vaccinazione. Sono stati inclusi nell'analisi solo i campioni con valori superiori al cutoff e, tali valori sono riportati nelle didascalie delle Figure 32 e 33. Ciascun “box & whiskers” rappresenta il valore minimo e massimo e il valore mediano. I dati sono stati analizzati mediante il test statistico non parametrico Mann-Whitney. (***) $p < 0,0001$.

Come si può osservare dalla **Tabella 12**, dopo 4 anni dalla somministrazione del vaccino, la percentuale di riduzione della frequenza delle cellule B memoria è inferiore al 40% nel caso della coorte delle adolescenti, mentre varia tra il 45,5% e il 55% nel caso della coorte 20-45 anni per quanto riguarda gli antigeni HPV6, 11 e 16. Relativamente alle cellule B memoria anti-HPV18 la discrepanza è maggiore poiché la percentuale di riduzione è solo del 9,3% per la coorte 12 anni, mentre è del 42,3% per la coorte 20-45 anni di età. Se il tempo di riduzione delle cellule B memoria rimanesse costante (**Tabella 12**), a distanza di 10 anni dalla vaccinazione sarebbe necessario un richiamo, poiché i valori assoluti scenderebbero tutti al di sotto del valore soglia. In realtà non è possibile fare una previsione di questo tipo, poiché dopo un iniziale decremento della frequenza delle cellule B memoria, questo valore potrebbe stabilizzarsi oppure potrebbe

continuare a decrescere nel tempo ma con una velocità inferiore a quella osservata nei primi 4 anni.

Tabella 12. Valori mediani e velocità di riduzione della frequenza delle cellule B memoria HPV-specifiche

	Frequenza cellule B memoria					
	12 anni			20-45 anni		
	1-6 mesi	4 anni	Riduzione %	1-6 mesi	4 anni	Riduzione %
HPV6	0,271	0,170	37,3	0,291	0,151	48,1
HPV11	0,292	0,178	39,1	0,378	0,210	45,5
HPV16	0,312	0,200	35,9	0,363	0,163	55
HPV18	0,162	0,147	9,3	0,203	0,117	42,3

3.4.3 Titoli anticorpali in adolescenti e donne vaccinate con *Gardasil*

Come si può osservare dalla **Figura 35**, dopo 1-6 mesi dalla vaccinazione con *Gardasil*, il livello di anticorpi totali anti-HPV18 è significativamente inferiore rispetto a quello di anti-HPV11 e 16, mentre è inferiore, ma non in maniera significativa, rispetto ai titoli anticorpali di HPV6 in entrambe le coorti di età. Ciò conferma il fatto che le VLP di HPV18 sono meno immunogeniche rispetto agli altri antigeni presenti nella formulazione del vaccino. Inoltre, il titolo anticorpale verso tutti gli antigeni vaccinali è significativamente superiore nelle adolescenti (12 anni) rispetto alle donne (20-45 anni) vaccinate con *Gardasil*.

Questa osservazione, assieme alla precedente relativa alla frequenza delle cellule B memoria, indica che l'età alla quale viene somministrato il *Gardasil* non influisce sul numero di cellule secernenti anticorpi HPV-specifici indotte dal vaccino, ma sulla quantità totale di anticorpi secreti da ciascuna cellula. Le cellule B memoria della coorte 20-45 anni producono meno anticorpi rispetto a quelle delle adolescenti.

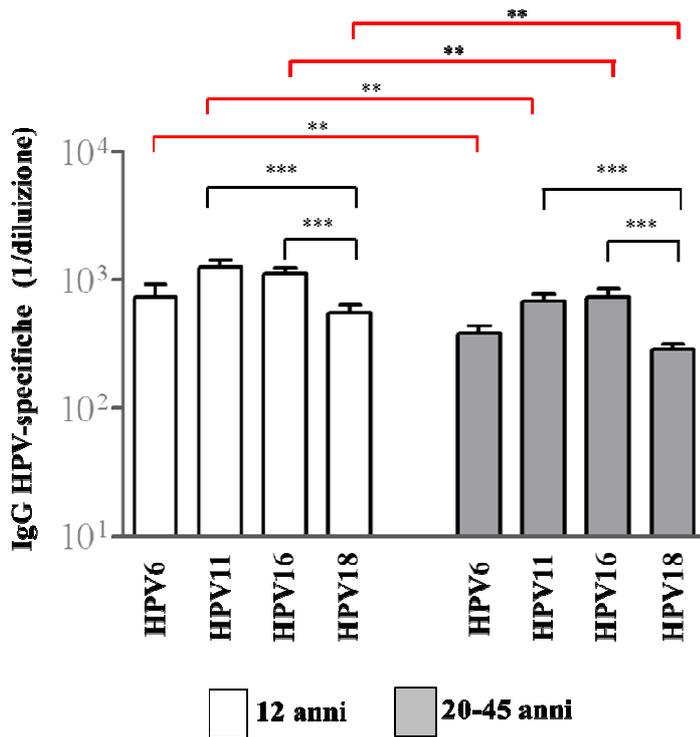


Figura 35. Titoli anticorpali in adolescenti e giovani donne vaccinate con Gardasil, dopo 1-6 mesi dalla vaccinazione. Sono stati inclusi nell'analisi solo i campioni con valori superiori al cutoff. Coorte 12 anni: HPV6, 11, 16 e 18 n = 60. Coorte 20-45 anni: HPV6 n = 43, HPV11 n = 45, HPV16 n = 45, HPV18 n = 42. Ciascun istogramma rappresenta il valore medio \pm SD. I dati sono stati analizzati mediante il test statistico non parametrico Mann-Whitney. (*) $0,01 < p < 0,001$; (**) $p < 0,0001$.

Dopo quattro anni dalla somministrazione del *Gardasil* (**Figura 36**) è possibile osservare che la quantità di anticorpi anti-HPV18 secreta è ancora significativamente inferiore a quella indotta dagli altri tre antigeni vaccinali solo nel caso della coorte delle adolescenti. I titoli anticorpali anti-HPV6, 11 e 16 sono ancora superiori in maniera statisticamente significativa nella corte delle adolescenti rispetto a quella delle giovani donne, mentre i titoli anticorpali anti-HPV18 sono comparabili nei due gruppi di età. Quindi, anche a distanza di 4 anni dalla vaccinazione, l'età di somministrazione del *Gardasil* influisce sulla quantità totale di anticorpi secreti dalle cellule B memoria ma non sul loro numero.

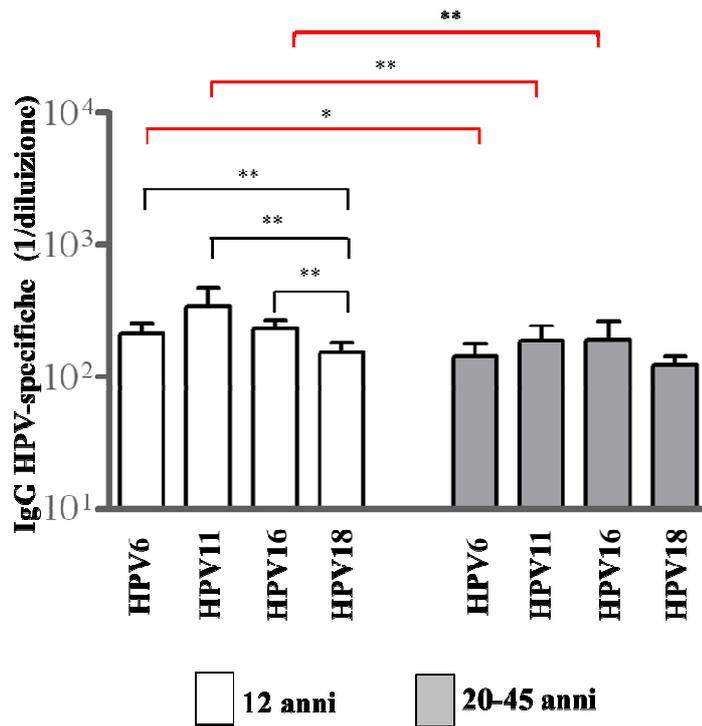


Figura 36. Titoli anticorpali in adolescenti e giovani donne vaccinate con *Gardasil*, dopo 4 anni dalla vaccinazione. Sono stati inclusi nell'analisi solo i campioni con valori superiori al cutoff. Coorte 12 anni: HPV6 n = 38, HPV11 n = 54, HPV16 n = 55, HPV18 n = 37. Coorte 20-45 anni: HPV6 n = 29, HPV11 n = 39, HPV16 n = 33, HPV18 n = 17. Ciascun istogramma rappresenta il valore medio \pm SD. I dati sono stati analizzati mediante il test statistico non parametrico Mann-Whitney. (*) $p < 0,05$; (**) $0,01 < p < 0,001$.

In **Figura 37**, è rappresentata la variazione nel tempo dei livelli di anticorpi anti-HPV specifici nei soggetti vaccinati con *Gardasil*. I titoli anticorpali verso tutti gli antigeni e, per entrambe le coorti di età, diminuiscono significativamente dopo 4 anni dalla vaccinazione comparati con quelli misurati dopo 1-6 mesi dalla somministrazione del *Gardasil* e risultano leggermente superiori ai valori soglia calcolati sugli individui non vaccinati.

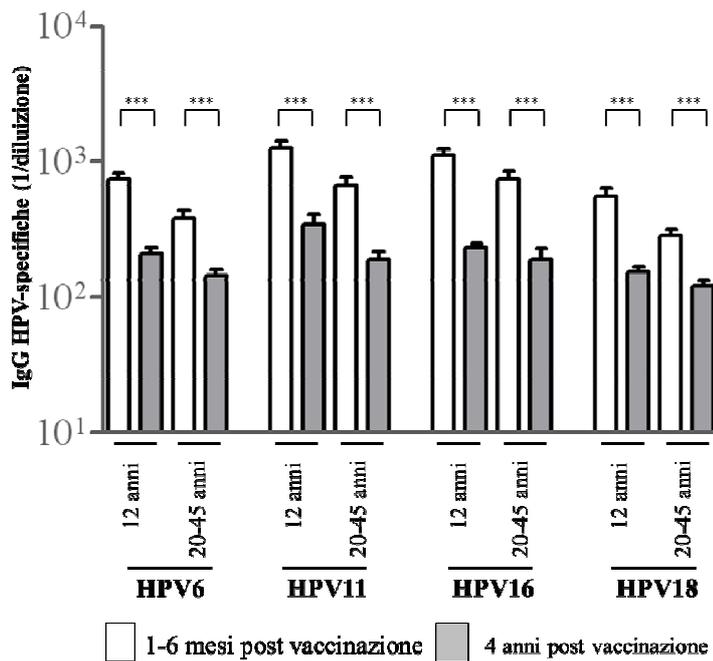


Figura 37. Confronto dei titoli anticorpali in adolescenti e giovani donne vaccinate con *Gardasil*, dopo 1-6 mesi e 4 anni dalla vaccinazione. Sono stati inclusi nell'analisi solo i campioni con valori superiori al cutoff, tali valori sono riportati nelle didascalie delle Figure 35 e 36. Ciascun istogramma rappresenta il valore medio \pm SD. I dati sono stati analizzati mediante il test statistico non parametrico Mann-Whitney. (***) $p < 0,0001$.

3.4.4 Confronto delle risposte immunitarie indotte dai vaccini *Gardasil* e *Cervarix* in adolescenti dopo 1-6 mesi dalla vaccinazione

Uno degli obiettivi dello studio è confrontare l'entità delle risposte immuni indotte dai vaccini *Gardasil* e *Cervarix*. Poiché per il vaccino *Cervarix* l'arruolamento delle donne (20-45 anni) dopo 1-6 mesi dalla vaccinazione e, di entrambe le coorti di età dopo 4 anni dalla somministrazione del vaccino, non è ancora stato completato, si è proceduto all'analisi di 60 campioni della coorte 12 anni dopo 1-6 mesi dalla vaccinazione.

La frequenza delle cellule B memoria (**Figura 38**, pannello superiore) sono significativamente più numerose nelle adolescenti vaccinate con *Cervarix* rispetto a quelle vaccinate con *Gardasil*. Inoltre, analogamente a quanto accade per i soggetti vaccinati con *Gardasil*, anche per le adolescenti vaccinate con *Cervarix* la frequenza delle cellule B memoria anti-HPV18 è significativamente inferiore

rispetto a quella anti-HPV16. Anche i titoli anticorpali HPV-specifici (**Figura 38**, pannello inferiore) sono significativamente superiori nella coorte di 12 anni vaccinate con *Cervarix* rispetto a quelle vaccinate con *Gardasil*. Analogamente, il livello degli anticorpi anti-HPV18 è statisticamente inferiore rispetto a quello anti-HPV16. Questo dato è un'ulteriore conferma del fatto che le VLP di HPV18 sono meno immunogeniche indipendentemente dal tipo di vaccino utilizzato.

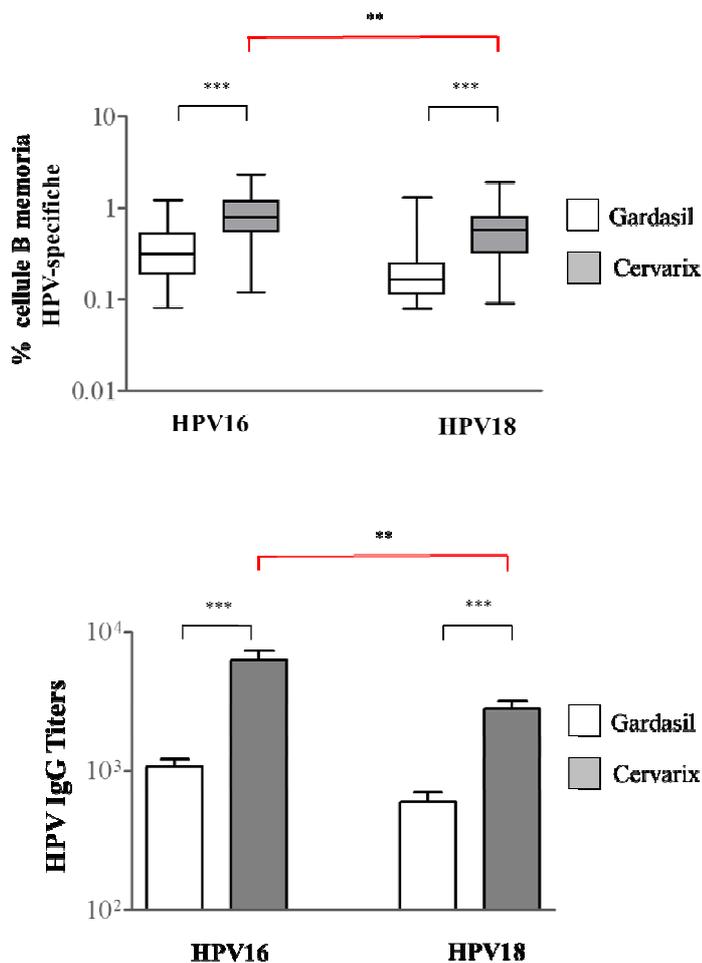


Figura 38. Confronto della frequenza delle cellule B memoria (pannello superiore) e dei titoli anticorpali (pannello inferiore) in adolescenti vaccinate con *Gardasil* o *Cervarix*, dopo 1-6 mesi vaccinazione. Sono stati inclusi nell'analisi solo i campioni con valori superiori al cutoff calcolato precedentemente, tali valori sono riportati nelle didascalie delle Figure 32 e 35 per gli individui vaccinati con *Gardasil*, mentre tutti i valori degli individui vaccinati con *Cervarix* (n=60) sono superiori al cutoff. Ciascun "box & whiskers" rappresenta il valore minimo e massimo e il valore mediano. Ciascun istogramma rappresenta il valore medio± SD. I dati sono stati analizzati mediante il test statistico non parametrico Mann-Whitney (***) 0,01<p<0,001; (***) p<0,0001.

4. DISCUSSIONE

Nel presente studio sono state valutate le risposte immunitarie umorali e cellulari di tipo B in adolescenti (12 anni) e in donne (20-45 anni) vaccinate con *Gardasil* e *Cervarix* dopo 1-6 mesi o 4 anni dalla vaccinazione.

Poiché le VLP non sono disponibili in commercio, per poter eseguire lo studio sono state prodotte su larga scala le VLP di HPV6, 11, 16 e 18 da utilizzare come antigeni per saggi ELISA e B-cell Elispot, utilizzando i plasmidi e i protocolli ottimizzati nel laboratorio del Dr Schiller del National Institute of Health (NIH, Bethesda, MD). A questo proposito sottolineo il fatto che tutti gli studi indipendenti di valutazione delle risposte immunitarie (quali la produzione di anticorpi neutralizzanti, la misurazione di IgG totali, la quantificazione di cellule B memoria e dei linfociti CD4⁺) indotte da entrambi i vaccini sono stati eseguiti utilizzando VLP prodotte secondo il metodo Schiller, rendendo i risultati di tali studi paragonabili tra loro, laddove i saggi eseguiti siano gli stessi.

Dopo aver prodotto le VLP e standardizzato le condizioni del saggio B-cell Elispot, è iniziata la fase di validazione clinica dei saggi e di screening degli individui vaccinati con *Gardasil*. Sono stati analizzati fino ad oggi 223 campioni suddivisi in due coorti di età, 12 (n=60) e 20-45 (n=45) anni, per capire se l'età di somministrazione del vaccino influisca sull'entità delle risposte immunitarie indotte dal vaccino, e in due coorti temporali, 1-6 mesi (n=61) e 4 anni (n=57) dopo la vaccinazione per studiare la durata di tali risposte.

La prima analisi che è stata eseguita aveva lo scopo di valutare la percentuale di individui con valori di frequenze di cellule B memoria o di titoli anticorpali superiori al cutoff stabilito (responders). Dopo 1-6 mesi dalla somministrazione del vaccino, la percentuale di responders relativa alla frequenza di cellule B memoria è risultata molto elevata, con percentuali comprese tra 92,7% e 100% per HPV6, 11 e 16, indipendentemente dall'età del soggetto. Invece, solo nel caso di HPV18 e, solo nella coorte delle adolescenti, la percentuale di responders è risultata dell'80%. Relativamente ai titoli anticorpali dopo 1-6 mesi dalla vaccinazione, anche la percentuale di individui con valori superiori al cutoff è

risultata molto elevata, con valori compresi tra 93,4% e 100% per entrambe le classi di età e per tutti gli antigeni vaccinali.

Dopo 4 anni dalla vaccinazione, invece, la percentuale di responders diminuisce, sia per quanto riguarda il numero di cellule B memoria sia per i titoli anticorpali, per tutti gli antigeni vaccinali. Tuttavia, tale diminuzione è risultata statisticamente significativa solo per i titoli anticorpali e solo nella corte delle donne (20-45 anni) rispetto a quella delle adolescenti (12 anni).

Nel complesso questi dati indicano che la percentuale di individui vaccinati con *Gardasil* con un valore di cellule B memoria circolanti superiore al cutoff rimane molto elevato anche a distanza di 4 anni dalla vaccinazione. Al contrario, i titoli anticorpali, a parità di tempo trascorso, calano più rapidamente e, in particolare, il decremento è maggiore nella corte “20-45 anni” rispetto alla corte “12 anni”.

Fisiologicamente, all’interno degli organi linfoidi secondari (milza, linfonodi, placche di Peyer e tonsille) in seguito all’incontro di un antigene con un linfocita B naive, quest’ultimo va incontro a proliferazione e progressiva maturazione dell’affinità nei confronti dell’antigene con conseguente formazione del centro germinativo. Al termine di questo processo, plasmacellule e cellule B memoria lasceranno il centro germinativo per andare nel torrente circolatorio [*Schmidlin H, 2009*]. Le plasmacellule secernono grandi quantitativi di anticorpi ma hanno una vita limitata e, una volta raggiunto il picco di produzione degli anticorpi in risposta ad un antigene, subentra la fase di contrazione della risposta immunitaria, caratterizzata dalla liberazione di citochine omeostatiche che hanno il compito di garantire la sopravvivenza a lungo termine dei cloni memoria dei linfociti B necessari per generare le risposte anamnestiche [*Beverley PCL, 2010, Good-Jacobson KL, 2010*].

L’immunosenescenza è un fenomeno molto complesso che progressivamente rende le cellule del sistema immunitario meno efficaci nello svolgimento delle loro funzioni. In particolare, la linfopoiesi si riduce con l’età con conseguente riduzione del numero totale di linfociti B naive disponibili [*Frasca D et al., 2011*]. Con l’età si riduce la capacità di *priming* (l’attivazione conseguente al primo incontro con un antigene) dei linfociti B e di formazione del conseguente centro germinativo; in aggiunta, i linfociti B antigene-specifici hanno una vita media più

breve e producono anticorpi con una più bassa affinità antigenica [Howard WA et al., 2006]. Inoltre, l'ipermutazione somatica che porta alla generazione di cloni di linfociti B memoria secernenti immunoglobuline di classe G diminuisce con l'età [Frasca D et al., 2008], così come la ridotta espressione di molecole costimolatorie sulla superficie dei linfociti T CD4⁺ helper in funzione dell'età influisce negativamente sul *priming* dei linfociti B nei linfonodi [Lazuardi L et al., 2005].

La riduzione dei titoli anticorpali osservata in questo studio a distanza di 4 anni dalla vaccinazione, è in linea con i dati riportati in letteratura, ma l'informazione importante aggiunta dal nostro studio riguarda la velocità di riduzione dei titoli anticorpali in funzione dell'età. In letteratura un solo lavoro analizza le percentuali di responders relative alla frequenza delle cellule B memoria, in una coorte di donne vaccinate con *Gardasil* o *Cervarix* di età compresa tra i 18 e i 45 anni, a distanza di 1, 12, 18 e 24 mesi dalla vaccinazione [Einstein MH et al., 2011]. Una comparazione diretta dei valori assoluti di questo studio con i dati da noi ottenuti è comunque difficile, poiché nel nostro studio le popolazioni "1-6 mesi" e "4 anni" sono rappresentate da persone diverse e il valore basale non è stato calcolato sugli individui prima di essere sottoposti alla vaccinazione. Però in entrambi gli studi si osserva una progressiva riduzione della percentuale di responders. Analizzando, invece, la percentuale di individui con titoli anticorpali sopra il valore soglia, i nostri dati sono comparabili a quelli descritti per una coorte di donne (24-45 anni) arruolate nello studio FUTURE I e II, il cui follow up è arrivato fino a 4 anni dalla vaccinazione [Castellsaguè X et al., 2011].

Dopo l'analisi dei responders, è stata analizzata l'ampiezza e la durata delle risposte cellulari di tipo B, espresse come percentuale di linfociti B antigene-specifici rispetto al totale dei linfociti B secernenti IgG (frequenze). I risultati dimostrano che la frequenza delle cellule B memoria nei soggetti vaccinati con *Gardasil* non è influenzata dall'età di somministrazione del vaccino, sia a breve termine (1-6 mesi) sia nel medio periodo (4 anni) per ciascun antigene vaccinale. La frequenza dei linfociti B antigene-specifici, per ciascun antigene vaccinale, si riduce dopo 4 anni dalla vaccinazione, ma in ogni caso resta significativamente superiore al cutoff, suggerendo che le risposte immunitarie indotte dal *Gardasil*

sono durature in entrambe le coorti di età. Inoltre, sempre indipendentemente dall'età, le frequenze di cellule B memoria sono risultate simili per HPV6, 11 e 16 e significativamente superiori a quelle misurate per HPV18, suggerendo che la proteina L1 di HPV18 sia meno immunogenica o che ci sia interferenza antigenica, in accordo con altri studi [*Einstein MH et al., 2011*], anche se ciò non sembra influenzare l'efficacia protettiva di HPV18 che è simile a quella conferita dagli altri antigeni vaccinali [*Castellsaguè X et al., 2011*]. Attualmente, i dati disponibili in letteratura mettono in relazione i titoli anticorpali, neutralizzanti e non, con l'età di somministrazione del vaccino, ma non ci sono studi che abbiano quantificato il numero di cellule B della memoria anti-HPV genotipo specifiche in funzione dell'età.

Successivamente, sono stati analizzati i titoli anticorpali nei soggetti vaccinati con *Gardasil*. Contrariamente a quanto osservato per la frequenza delle cellule B memoria, i risultati indicano che i titoli anticorpali sono influenzati dall'età di somministrazione del vaccino. Infatti, il livello degli anticorpi anti-HPV genotipo-specifici è risultato sempre significativamente inferiore nella coorte 20-45 anni rispetto a quello misurato nella coorte 12 anni, sia a 1-6 mesi sia 4 anni dopo la vaccinazione, suggerendo che, nonostante la frequenza di linfociti B memoria genotipo-specifico sia simile nelle due classi di età, la quantità totale di anticorpi secreti da ciascun linfocita B sia inferiore negli adulti. Questo fenomeno potrebbe dipendere da una ridotta espressione dell'enzima inducibile cicloossigenasi-2 (Cox-2). Infatti, questo enzima partecipa alla sintesi delle prostaglandine, molecole particolarmente abbondanti durante le infiammazioni croniche e le infezioni virali, e nei linfociti B umani attivati con stimoli policlonali l'enzima Cox-2 è espresso ad elevati livelli [*Ryan EP et al., 2005*]. È interessante notare che i topi Cox-2^{-/-}, privi del gene per la cicloossigenasi-2, vaccinati con VLP di HPV16 producono un ridotto quantitativo di anticorpi neutralizzanti rispetto ai topi *wild-type* [*Ryan EP et al., 2006*], e che, linfociti B umani, purificati da individui vaccinati con *Cervarix*, stimolati *in vitro* policlionalmente in presenza di inibitori di Cox-2, secernono meno anticorpi antigene-specifici rispetto a quelli privi del trattamento con l'inibitore [*Ryan EP et al., 2006*]. Tuttavia, non ci sono ancora dati *in vivo* sull'uomo che mettano in relazione il ruolo dell'enzima Cox-2

con la risposta umorale antigene-specifica e con l'età, e non è chiaro se tale meccanismo sia generalizzabile per qualsiasi antigene.

Ora che l'analisi dei soggetti vaccinati con *Gardasil* è completata, l'obiettivo di questo studio è completare l'arruolamento e l'analisi dei soggetti vaccinati con *Cervarix*, per poter comparare l'immunogenicità dei due vaccini. Fino ad ora sono stati analizzati 60 campioni di adolescenti vaccinati da 1-6 mesi con *Cervarix*. I dati preliminari indicano che il *Cervarix* induce risposte immunitarie anti-HPV16 e 18 (titoli anticorpali e frequenza di linfociti B memoria) significativamente superiori rispetto a quelle indotte da *Gardasil*. I nostri dati confermano ciò che è riportato in letteratura anche da altri studi clinici [*Einstein MH et al., 2011, Draper E et al., 2013*] ed è stato ipotizzato che il fattore cruciale responsabile dell'elevata immunogenicità del vaccino *Cervarix* sia l'adiuvante. L'AS04 è costituito da particelle di idrossido di alluminio ricoperte da molecole di MPL (monofosforil-lipide A); quest'ultimo è la porzione detossificata della parete del batterio gram- *Salmonella minnesota* ed è un potente agonista del TLR-4 presente sulle cellule presentanti l'antigene (APC), ne induce la maturazione e la migrazione verso i linfonodi [*Evans JT et al., 2003*]. Inoltre, MPL aumenta l'espressione delle molecole MHC di classe II sulla superficie delle APC e induce la secrezione di citochine necessarie per l'attivazione dei linfociti CD4+ helper in primo luogo che, a loro volta, indurranno l'attivazione e il *priming* dei linfociti B [*Schiller JT et al., 2012*]. Uno studio clinico ha dimostrato che le risposte immunitarie (umorali e cellulari di tipo B) indotte dal vaccino bivalente adiuvato con AS04 sono significativamente superiori a quelle indotte dallo stesso vaccino adiuvato solo con idrossido di alluminio [*Giannini SL et al., 2006*]. L'adiuvante contenuto nel vaccino *Gardasil* è brevettato dalla Merck ed è un sale solfato dell'idrossido di alluminio e anch'esso si è dimostrato un miglior induttore dell'immunità umorale e cellulare rispetto allo stesso vaccino contenente solo idrossido di alluminio [*Caulfield MJ et al., 2007*]. Purtroppo ad oggi non ci sono studi *in vitro* o *in vivo* che comparino direttamente il contributo immunogenico dei due adiuvanti in VLP di HPV prodotte con lo stesso sistema biologico. Indipendentemente dall'adiuvante utilizzato, la sua presenza nel vaccino anti-HPV rappresenta un fattore cruciale nell'induzione e nella durata delle risposte

immunitarie. Le VLP di HPV grazie alla loro struttura simmetrica e alla presenza di motivi aminoacidici altamente ripetuti [Zeltins A, 2013] sono comunque in grado di indurre una forte risposta umorale anche in assenza di adiuvanti [Dauner JG et al., 2010], ma tali risposte sono comunque inferiori a quelle misurate nel nostro e negli altri studi.

L'omologia di sequenza tra le proteine L1 di HPV16 e 18 contenute nelle VLP di *Cervarix* e *Gardasil* è rispettivamente del 99,6% e 99,4%, e ciò è dovuto al fatto che la proteina L1 espressa nelle VLP del *Cervarix* è una forma tronca di 35 aminoacidi al C-terminale rispetto alla forma *full-length* presente nel *Gardasil*. Tale differenza non sembra però possa contribuire a rendere le VLP più immunostimolanti [Einstein MH et al., 2011].

Indipendentemente dalla differente immunogenicità sarà importante richiamare le adolescenti, arruolate in questo studio, vaccinate con *Gardasil* o *Cervarix*, a distanza di 8-10 anni dalla vaccinazione, in modo da poter correlare le risposte immunitarie anti-HPV genotipo specifiche con i risultati degli screening cervico-vaginali (Pap-test).

Gardasil e *Cervarix* sono stati commercializzati a partire dal 2007, in Italia dal 2008, quindi, è ancora troppo presto per fare delle previsioni sulla durata a lungo termine delle risposte immunitarie e se sarà necessario somministrare una dose di richiamo ai soggetti già vaccinati. In ogni caso anche se a distanza di 8-10 anni dalla vaccinazione si riscontrasse un'assenza di anticorpi rilevabili, non si può affermare che la protezione conferita dal vaccino sia terminata, come dimostrato da studi di immunizzazione passiva, nei quali il siero di topi vaccinati con VLP di HPV16 è stato diluito in modo da ottenere una concentrazione di anticorpi neutralizzanti 100 volte inferiore al cutoff del saggio di neutralizzazione con pseudovirioni, e trasferito a topi sani non vaccinati. I topi così trattati sono stati successivamente esposti ad alte dosi di HPV16 per via intravaginale e sono risultati protetti dall'infezione [Longet S et al., 2011], mettendo in luce i limiti dei saggi che misurano l'immunità umorale attualmente disponibili. Alla luce di ciò possiamo affermare che il perfezionamento di saggi B-cell Elispot per la quantificazione dei linfociti B memoria HPV-specifici a lungo termine sarà sempre più importante.

Per concludere, i dati relativi ottenuti fino ad ora sulle risposte immunitarie indotte da entrambi i vaccini profilattici anti-HPV possono rappresentare uno strumento utile ai Servizi di Igiene e Sanità Pubblica e ai Dipartimenti di Prevenzione per programmare strategie di comunicazione che rendano più efficaci le campagne di vaccinazione nella popolazione prepuberale e nelle donne, soprattutto in quelle Regioni in cui l'adesione è molto bassa.

5. BIBLIOGRAFIA

Ashrafi GH, Haghseenas MR, Marchetti B, O'Brien PM, Campo MS. E5 protein of human papillomavirus type 16 selectively downregulates surface HLA class I. *Int J Cancer*, 2005, 113:276-283.

Aubin F, Laurent R. Human papillomavirus-associated cutaneous lesions. *Rev Prat*, 2006, 15(56):1905-1913.

Ault KA, Future II Study Group. Effect of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like-particle vaccine on risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2, grade 3, and adenocarcinoma in situ: a combined analysis of four randomised clinical trials. *Lancet*, 2007, 369(9576):1861-1868.

Beverly PCL. Immune memory: the basic and how to trigger an efficient long-term immune memory. *J Comp Path*, 2010, 142:S91-S95.

Bhat P, Mattarollo SR, Gosmann C, Frazer IH, Leggatt GR. Regulation of immune responses to HPV infection and during HPV directed Immunotherapy. *Immunol Rev*, 2011, 239:85–98.

Bodily J, Laimins LA. Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression. *Trends in Microbiol*, 2011, 19, 33-39 .

Bottley G, Watherston OG, Hiew YL, Norrild B, Cook GP, Blair GE. High-risk human papillomavirus E7 expression reduces cell-surface MHC class I molecules and increases susceptibility to natural killer cells. *Oncogene*, 2008, 27:1794-1799.

Bouvard V, Matlashewski G, Gu ZM, Storey A, Banks L. The human papillomavirus type 16 E5 gene cooperates with the E7 gene to stimulate proliferation of primary cells and increases viral gene expression, *Virology*, 1994, 203:73-80.

Breitburd F, Kinbauer R, Hubbert NL, Nonnenmacher B, Trin –Dinh-Desmarquet C, Orth G. Immunization with virus-like-particles from cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) can protect against experimental CRPV infection. *J Virol*, 1995, 69 (6):3959-3963.

Brennan K, Bowie AG. Activation of host pattern recognition receptors by viruses. *Curr Opin Microbiol*, 2010, 13:503-507.

Brown DR, Kjaer SK, Sigurdsson K, Iversen OE, Hernandez-Avila M, Wheeler CM et al. The impact of quadrivalent human papillomavirus (HPV types 6, 11, 16, 18) L1 virus-like particle vaccine on infection and disease due to oncogenic nonvaccine HPV types in generally HPV-naïve women aged 16-26 years. *J infect Dis*, 2009, 199(7):926-935.

Brown DR, Garland SM, Ferris DG, Joura E, Steben M, James M, et al. The humoral response to Gardasil over four years as defined by total IgG and competitive Luminex immunoassay. *Hum Vaccin*, 2011, 1;7(2).

Buck CB, Pastrana DV, Lowy DR, Schiller JT. Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors. *J Virol*, 2004, 78(2), 751-7.

Bulkmans NW, Berkhof J, Bulk S, Bleeker MC, van Kemenade FJ, Rozendaal L, Snijders PJ, Meijer CJ. High-risk HPV type-specific clearance rates in cervical screening. *Br J Cancer*, 2007, 96 (9):1419-24.

Burd EM. Human Papillomavirus and cervical cancer. *Clinical Microbiology*, 2003, 16:1-17.

Burns JE, Maitland NJ. Human Papillomavirus and cancer. *Microbiol Today*, 2005, 5:116-120.

Campo MS, Graham SV, Cortese MS, Ashrafi GH, Araibi EH, Dornan ES, Miners K, Nunes C, Man S. HPV-16 E5 down-regulates expression of surface HLA class I and reduces recognition by CD8 T cells. *Virology*, 2010, 407:137-42.

Carter JJ, Koutsky LA, Hughes JP, Lee SK, Kuypers J, Kiviat N. Comparison of human papillomavirus type 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection. *J Infect Dis*, 2000, 181 (6):1911-9.

Castellsaguè X, Munoz N, Pitisuttithum P, Tresukosol D, Monsonego J, Ault K, et al. Safety, immunogenicity and efficacy of quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, 18) recombinant vaccine in women aged 24-45 years: a randomised, double-blind trial. *Lancet*, 2009, 373(9679):1949-1957.

Castellsaguè X, Munoz N, Pitisuttithum P, Ferris D, Monsonego J, Ault K, et al. End-of-study safety, immunogenicity and efficacy of quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, 18) recombinant vaccine in women aged 24-45 years of age. *Br J Cancer*, 2011, 105(1):28-37.

Caulfield MJ, Shi L, Wang S, Wang B, Tobery TW, Mach H, et al. Effect of alternative aluminium adjuvants on the absorption and immunogenicity of HPV16L1 VLPs in mice. *Hum Vaccin*, 2007, 3:139-145.

Center for Disease Control, Recommendations on the use of quadrivalent human papillomavirus vaccine in males. Advisory Committee on immunization practices (ACIP), MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2011, 60:1705-1708.

Chellappan S, et al. Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen and human papillomavirus E7 share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89:4549-4553.

Chen Y, Ghim SJ, Jenson AB, Schlegel R. Mutant canine oral papillomavirus L1 capsid proteins which form virus-like particles but lack native conformational epitopes. *J Gen Virol*, 1998, 79(9):2137-2146.

Christensen ND, Kreider JW, Shah KV, Rando RF. Detection of human serum antibodies that neutralize infectious human papillomavirus type 11 virions. *J Gen Virol*, 1992, 73:1261-1267.

Christensen ND, Dillner J, Eklund C, Carter JJ, Wipf GC, Reed CA, Clader NM, Galloway DA. Surface conformational and linear epitopes on HPV-16 and HPV-18 L1 virus-like particles as defined by monoclonal antibodies. *Virology*, 1996, 223:174-184.

Christensen ND, Reed CA, Cladel NM, Han R, Kreider JW. Immunization with viruslike particles induces long-term protection of rabbits against challenge with cottontail rabbit papillomavirus. *J Virol*, 1996, 70(2):960-965.

Conrad M, Bubb VJ, Schlegel R. The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore forming protein. *J Virol*, 1993, 67:6170-6178.

Crow JM. HPV: the global burden. *Nature*, 2012, 488:S2-S3.

Czerkinsky C, Nilsson LA, Nygren H, Ouchterlony O, Tarkowski A. A solid phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for the enumeration of specific antibody-secreting cells. *J Immunol Methods*, 1983, 65:109-14.

Day PM, Lowy DR, Schiller JT. Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology*, 2003, 307:1-11.

Dauner JG, Pan Y, Hildesheim A, Harro C, Pinto LA. Characterization of the HPV-specific memory B cell and systemic antibody responses in women receiving an unadjuvanted HPV16 L1 VLP vaccine. *Vaccine*, 2010, 28:547-5413.

Davy CE, et al. Human papillomavirus type 16 E4-induced G2 arrest is associated with cytoplasmic retention of active Cdk1/cyclin B1 complexes. *Journal of Virology*, 2005, 79:3998-4011.

Descamps D, Hardt K, Spiessens B, Izurieta P, Verstraeten T, Breuer T. Safety of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine for cervical cancer prevention: a pooled analysis of 11 clinical trials. *Hum Vaccin*, 2009, 5(5):332-340.

de Gruijl TD, Bontkes HJ, Walboomers JMM, Stukart MJ, Doeknie FS, Remmink AJ. Differential T helper cell responses to human papillomavirus type 16 E7 related to viral clearance or persistence in patients with cervical neoplasia: a longitudinal study. *Cancer Res*, 1998, 58 (8):1700-6.

- de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, Zur Hausen H.** Classification of papillomaviruses. *J Virol*, 2004, 324 (1):17-27.
- Dillner J.** The serological response to papillomaviruses. *Semin Cancer Bio*, 1999, 9:529-39.
- Doobar J, Ely S, Sterling J.** Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature*, 1991, 352:824-27.
- Doorbar J.** Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *J Clin Sci (Lond)*, 2006, 5:525-41.
- Doorbar J, Quint B., Banks L., Bravo I.G., Stoler M., Broker T.R., Stanley M.A.** The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*, 2012, 30S:F55-F70.
- Draper E, Bissett SL, Howell-Jones R et al.** A randomized, observer-blinded immunogenicity trial of Cervarix and Gardasil human papillomavirus vaccines in 12-15 year old girls. *PLoS One*, 2013, 8(5):e61825.
- Du M, Fan X, Hong E, Chen JJ.** Interaction of oncogenic papillomavirus E6 proteins with fibulin-1. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 296:962-969.
- Dubina M, Goldenberg G.** Viral-associated nonmelanoma skin cancers: a review. *Am J Dermatopathol*, 2009, 31(6):561-573.
- Dyson N.** The regulation of E2F by pRb-family proteins. *Genes Dev*, 1998, 12:2245-2262.
- Einstein MH, Baron M, Levin MJ, Chatterjee A, Fox B, Scholar S, et al.** Comparison of the immunogenicity of the human papillomavirus (HPV)-16/18 vaccine and the HPV-6/11/16/18 vaccine for oncogenic non-vaccine types HPV31 and HPV45 in healthy women aged 18-45 years. *Hum Vaccin*, 2011, 7(12):1343-1358.
- Einstein MH, Baron M, Levin MJ, Chatterjee A, Edwards RP, Zepp F, et al.** Comparison of the immunogenicity and safety of Cervarix and Gardasil human papillomavirus (HPV) cervical cancer vaccines in healthy women aged 18-45 years. *Hum Vaccin*, 2009, 5(10):705-719.
- Evander M, Frazer IH, Payne E, Mei Qi Y, Hengst K, McMillian NAJ.** Identification of the $\alpha 6$ integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol*, 1997, 71:2449-2456.
- Evans JT, Cluff CW, Johnson DA, Lacy MJ, Persing DH, Baldrige JR.** Enhancement of antigen-specific immunity via the TLR4 ligands MPL adjuvant and Ribi.529. *Expert Rev Vaccine*, 2003, 2:219-229.

Fahey LM et al. A major role for the minor capsid protein of human papillomavirus type 16 in immune escape. *J Immunol*, 2009, 183:6151-6156.

Filippova M, Song H, Connolly JL, Dermody TS, Duerksen-Hughes PJ. The human papillomavirus 16 E6 protein binds to tumor necrosis factor (TNF) R1 and protects cells from TNF-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 2002, 277:21730-21739.

Filippova M, Parkhurst L, Duerksen-Hughes PJ. The human papillomavirus 16 E6 protein binds to Fas-associated death domain and protects cells from Fas-triggered apoptosis. *J Biol Chem*, 2004, 279:25729-25744.

Finnen RL, et al. Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins. *J Virol*, 2003, 77:4818-4826.

Franco EL. Health inequity could increase in poor countries if universal HPV vaccination is not adopted. *B.M.J*, 2007, 335:378-79.

Frasca D, Blomberg BB. Aging affects human B cell responses. *J Clin Immunol*, 2011, 31(3):430-435.

Frasca D, Landin AD, Lechner SC, Ryan JG, Schwartz R, Riley RL, Blomberg A. Aging down modulates the transcription factor E2A, activation-induced cytosine deaminase, and Ig class switching in human B cell. *J Immunol*, 2008, 180(8):5283-5288.

Frazer IH, Leggatt GR, Mattarollo SR. Prevention and treatment of papillomavirus-related cancers through immunization. *J Virol*, 2011, 29:111-38.

Frazer IH. Interaction of human papillomaviruses with the host immune system: a well evolved relationship. *Virology*, 2009, 384:410-414.

FUTURE II Study Group. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent high-grade cervical lesions. *N Engl J Med*, 2007, 356(19):1915-1927.

Garçon N, Descamps D, Leyssen M, Stoffel M, Di Pasquale A. Designing vaccines against human papilloma and hepatitis B virus: similarities and differences for preventable viral infections and role of AS04 adjuvant system in addressing specific challenges. *Vaccine & Vaccination*, 2012, 3(1):1-12.

Garland SM, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G, Harper DM, Leodolter S, Tang GW, Ferris DG, Steben M, Bryan J, Taddeo FJ, Railkar R, Esser MT, Sings HL, Nelson M, Boslego J, Sattler C, Barr E, Koutsky LA. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent anogenital diseases. *N Engl J Med*, 2007, 356 (19):1928-43.

Ghittoni R. et al. The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from Human papillomaviruses. *Virus Genes*, 2010, 40:1-13.

Giannini SL, Hanon E, Moris P, Van Mechelen M, Morel S, Dessy F, et al. Enhanced humoral and memory B cellular immunity using HPV16/18 L1 VLP vaccine formulated with the MPL/aluminium salt combination (AS04) compared to aluminium salt only. *Vaccine*, 2006, 24:5937-5949.

Giles S. Transmission of HPV. *Can Med Assoc J*, 2003, 168 (11):1391-5.

Good-Jacobson KL, Shlomchik MJ. Plasticity and heterogeneity in the generation of memory B cells and long-lived plasmacells: the influence of germinal center interactions and dynamics. *J Immunol*, 2010, 185:3117-3125.

Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, 1977, 36:59-72.

Guess JC, McCance DJ. Decreased migration of Langerhans precursor-like cells in response to human keratinocytes expressing human papillomavirus type 16 E6/E7 is related to reduced macrophage inflammatory protein-3 α production. *J Virol*, 2005, 79:14852-14862.

Hacke K, Rincon-Orozco B, Buchwalter G, Siehler SY, Wasyluk B, Wiesmuller L, Rosl F. Regulation of MCP-1 chemokine transcription by p53. *Mol Cancer*, 2010, 9:82-94.

Hashida T, Yasumoto S. Induction of chromosome abnormalities in mouse and human epidermal keratinocytes by the human papillomavirus type 16 E7 oncogene. *J Gen Virol*, 1991, 72:1569-1577.

Haupt RM, Wheeler CM, Brown DR, Garland SM, Ferris DG, Paavonen J, Lehtinen MO, Steben M, Jaura EA, Giacoletti KED, Radley DR, James MK, Saah AJ, Sings HL. Impact of an HPV6/11/16/18 L1 virus-like particle vaccine on progression to cervical intraepithelial neoplasia in seropositive women with HPV16/18 infection. *International Journal of Cancer*, 2011, 129:2632-2642.

Hebner CM, Laimins LA. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Med Viro.*, 2006, 16(2):83-97.

Herrero R, Hildesheim A, Rodriguez AC, Wacholder S, Bratti C, Solomon D, et al. Rationale and design of a community-based double-blind randomized clinical trial of an HPV16 and 18 vaccine in Guanacaste, Costa Rica. *Vaccine*, 2008, 26(37):4795-4808.

Huibregtse J, Scheffner M, Howley PM. Localization of the E6AP regions that direct human papillomavirus E6 binding, association with p53 and ubiquitination of associated proteins. *Mol Cell Biol*, 1993, 13:4918-4927.

Howard WA, Gibson KL, Dunn-Walters DK. Antibody quality in old age. *Rejuvenation Res*, 2006, 9(1):117-125.

Jansen KU, Rosolowsky M, Schults LD, Markus HZ, Cook JC, Donnelly JJ, Martinez D, Ellis RW, Shaw AR. Vaccination with yeast expressed cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) virus like particles protects rabbits from CRPV induced papilloma formation. *Vaccine*, 1995, 13:1509-1514.

Kessis TD, Connolly DC, Hendrick L, Cho KR. Expression of HPV16 E6 or E7 increases integration of foreign DNA. *Oncogene*, 1996, 72:427-431.

Kirnbauer R, Booy F, Cheng N, Lowy DR, Schiller JT. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(24):12180-12184.

Kirnbauer R, Chandrachud LM, O'Neil B, Wagner ER, Grindlay GJ, Armstrong A, McGarvie GM, Schiller JT, Lowy DR, Campo MS. Virus-like particles of bovine papillomavirus type 4 in prophylactic and therapeutic immunization. *Virology*, 1996, 219:37-44.

Klaes R, Woerner SM, Ridder R. Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer Res*, 1999, 59:6132-6136.

Klingelutz AJ, Foster SA, McDougall JK. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature*, 1996, 380:79-82.

Kreider JM, Bartlett GL. The Shope papilloma-carcinoma complex of rabbits: a model of neoplastic progression and spontaneous regression. *Adv Cancer Res*, 1981, 35:81-110.

Kyo S, et al. Regulation of early gene expression of human papillomavirus type 16 by inflammatory cytokines. *Virology*, 1994, 200:130-139.

IARC (International Agency for Research on Cancer) working group. *Human papillomaviruses*. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 100b, 2011; 261-319.

Insiga RP et al. Incidence, duration and reappearance of type-specific cervical human papillomavirus infections in young women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2010, 19:1585-1594.

Institute of Medicine. Adverse effects of vaccines: evidence and causality. Available at: <http://www.iom.edu/Reports/2011/Adverse-effects-of-vaccines-evidence-and-causality> (last accessed May 2012).

Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227:680-5.

Lazuardi L, Jenewein B, Wolf AM, Pfister G, Tzankov A, Grundeck-Loebenstein B. Age-related loss of naïve T cells and dysregulation of T-B cell interaction in human lymphnodes. *Immunology*, 2005, 114(1):37-43.

Lehtinen M, Paavonen J, Wheeler CM, Jaisamrarn U, Garland SM, Castellaguè X, Skinner SR, Aper D, Naud P, Salmeron J, Chow SN, Kitchener H, et al. Overall efficacy of HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against grade 3 or greater cervical intraepithelial neoplasia: 4-years end-of-study analysis of the randomised, double-blind PATRICIA trial. *The lancet*, 2012, 13:89-99.

Longet S, Schiller JT, Bobst M, Jichlinski P, Nardelli-Haeffliger DA. Murine genital-challenge model is a sensitive measure of protective antibodies against human papillomavirus infection. *J Virol*, 2011, 85:13253-13259.

Longworth MS, Laimins LA. The binding of histone deacetylases and the integrity of zinc finger-like motifs of the E7 protein are essential for the life cycle of human papillomavirus type 31. *J Virol*, 2004, 78 (7):3533-41.

Longworth MS, Wilson R, Laimins LA. HPV31 E7 facilitates replication by activating E2F2 transcription through its interaction with HDACs. *EMBO J*, 2005, 24 (10):1821-30.

Lu B, Kumar A, Castellsague X, Giuliano AR. Efficacy and safety of prophylactic vaccines against cervical HPV infection and diseases among women: a systematic review & meta-analysis. *BMC Infect Dis*, 2011, 11-13.

Madison KC. Barrier function of the skin: “la raison d’être” of the epidermis. *J Invest Dermatol*, 2003, 121:231-241.

Markowitz LE, Tsu V, Deeks SL, Cubie H, Wang SA, Vicari AS, Brothertorn ML. Human papillomavirus vaccine introduction: the first five years. *Vaccine*, 2012, 30S:F139-F148.

Massimi P, Gammon N, Thomas M, Banks L. HPV E6 specifically targets different cellular pools of its PDZ domain-containing tumor suppressor substrates for proteasome-mediated degradation. *Oncogene*, 2004, 23:8033-8039.

Masterson PJ, Stanley MA, Lewis AP, Romanos MA. A C-terminal helicase domain of the human papillomavirus E1 protein binds E2 and the DNA polymerase alpha-primase p68 subunit. *Journal of Virology*, 1998, 72:7407-7419.

Miura S, Kawana K, Schust DJ, Fujii T, Yokoyama T, Iwasawa Y, Nagamatsu T, Adachi K, Tomio A, Tomio K, Kojima S, Yasugi T, Kozuma S, Taketani Y. CD1d, a sentinel molecule bridging innate and adaptive immunity, is downregulated by the human papillomavirus (HPV) E5 protein: a possible mechanism for immune evasion by HPV. *J Virol*, 2010, 22:11614-11623.

Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature*, 2010, 10:550-560.

Mohr IJ, Clark R, Sun S. Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science* 1990, 250:1694-1699.

Mossadegh N, Gissmann L, Muller M, Zentgraf H, Alonso A, Tomakidi P. Codon optimization of the human papillomavirus 11 (HPV11) L1 gene leads to increased gene expression and formation of virus-like particles in mammalian epithelial cells. *Virology*, 2004, 326:57-66.

Muñoz N, Castellsagué X, de González AB, Gissmann L. HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*, 2006, 24 (3):1-10.

Nardelli-Haeffliger D, Wirthner D, Schiller JT, Lowy DR, Hildesheim A, Ponei F, De Grandi P. Specific antibody levels at the cervical during the menstrual cycle of women vaccinated with human papillomavirus 17 virus-like-particles. *J Natl Cancer Inst*, 2003, 95:1128-1137.

Nelson LM, Rose RC, Moroianu J. Nuclear import strategies of high risk HPV16 L1 major capsid protein. *J Biol Chem*, 2002, 277:23958–23964.

Nindl I, Gottschling M., Stockfleth E. Human papillomaviruses and non-melanoma skin cancer: basic virology and clinical manifestations. *Disease Markers*, 2007, 23 (4):247-259.

Paavonen J, Jenkins D, Bosch FX, Naud P, Salmeron J, Wheeler CM et al. Efficacy of a prophylactic adjuvanted bivalent L1 virus-like particle vaccine against infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: an interim analysis of a phase III double blind, randomised controlled trial. *Lancet*, 2007, 369(9580):2161-2170.

Park JS, Kim EJ, Kwon HJ, Hwang ES, Namkoong SE, Um SJ. Inactivation of interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by HPV E7 oncoprotein. *J Biol Chem*, 2000, 275:6764-6769.

Parr EL, Parr MB. Immunoglobulin G is the main protective antibody in mouse vaginal secretions after vaginal immunization with attenuated herpes simplex virus type 2. *J Virol*, 1997, 71(11):8109-8115.

Passmore J-AS, Marais DJ, Sampon C, Allan B, Parker N, Milner M. Cervicovaginal, oral, and serum IgG and IgA responses to human papillomavirus type 16 in women with cervical intraepithelial neoplasia. *J Virol*, 2007, 79 (9):1375-1380.

Ramanakumar AV, Goncalves O, Richardson H, Tellier P, Ferenczy A, Coutlée F, Franco FL. Human papillomavirus (HPV) types 16, 18, 31, 45

DNA loads and HPV-16 integration in persistent and transient infections in young women. *Infect Dis*, 2010, 10:326-338.

Richards RM, Lowy DR, Schiller JT, Day PM. Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein L2, at a furin consensus site is necessary for infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103:1522-1527.

Rocha-Zavaleta L, Pereira-Suarez AL, Yescas G, Cruz-Mimiaga RM, Garcia-Carranca A, Cruz-Talonia F. Mucosal IgG and IgA responses to human papillomavirus type 16 capsid proteins in HPV 16-infected women without visible pathology. *Viral Immunol*, 2003, 16 (2):159-68.

Romanowski B, de Borba PC, Naud PS, Roteli-Martins CM, De Carvalho NS, Teixeira JC, et al. Sustained efficacy and immunogenicity of the human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine: analysis of a randomised placebo-controlled trial up to 6.4 years. *Lancet*, 2009, 374(9706):1975-1985.

Ronco LV, Karpova AY, Vidal M, Howley PM, Human papillomavirus 16 E6 oncoproteins binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes Dev*, 1998, 12:2061-2072.

Routes JM, Morris K, Ellison MC, Ryan S. Macrophages kill human papillomavirus type 16 E6-expressing tumor cells by tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide-dependen mechanisms. *J Virol*, 2005, 79:116-123.

Ryan EP, Pollock SJ, Murant TI, Bernstein SH, Felgar RE, Phipps RP. Activated human B lymphocytes express cyclooxygenase-2 and cyclooxygenase inhibitors attenuate antibody production. *J Immunol*, 2005, 174:2619-2626.

Ryan EP, Malboeuf CM, Bernard M, Rose RC, Phipps RP. Cyclooxygenase-2 inhibition attenuates antibodies responses against human papillomavirus-like particles. *J Immunol*, 2006, 177:7811-7819.

Sasagawa T, Takagi H, Makinoda S. Immune responses against human papillomavirus (HPV) infection and evasion of host defense in cervical cancer. *J Infect Chenother*, 2012, 18:807-815.

Sedgwick JD, Holt PG. A Solid-Phase Immunoenzymatic technique for the Enumeration of Specific Antibody-Secreting Cells. *J Immunol Methods*, 1983, 57:301-307.

Schiffman M, Castle PE. The promise of global cervical cancer prevention. *N Engl J of Med*, 2005, 253: 2101-2104.

Schiller JT, Douglas RL. Immunogenicity testing in human papillomavirus Virus-Like-Particles vaccine trials. *J Infect Dis*, 2009, 200:166-171.

Schiller JT, Castellsagué X, Garland SM. A review of clinical trials of human papillomavirus prophylactic vaccines: *Vaccine*, 2012, 30S:F123-F138.

Schiller JT, Lowy DR. Understanding and learning from the success of prophylactic human papillomavirus vaccines. *Nature Reviews*, 2012, 10:681-692.

Schmidlin H, Diehl SA, Blom B. New insight in the regulation of human B cell differentiation. *Trends Immunol*, 2009, 30(6):277-285.

Schwarz TF, Spaczynski M, Schneider A, Wysocki J, Galaj A, Perona P, et al. Immunogenicity and tolerability of an HPV-16(18 AS04-adjuvanted prophylactic cervical cancer vaccine in women aged 15-55 years. *Vaccine*, 2009, 27(4):581-587.

Shafti-Keramat S, Handisurya A, Kriehuber E, Meneguzzi G, Slupetzky K, Kirnbauer R. Different heparin sulphate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses. *J Virol*, 2003, 77:13125-13135.

Shin MK, Balsitis S, Brake T, Lambert PF. Human papillomavirus E7 oncoprotein overrides the tumor suppressor activity of p21 in cervical carcinogenesis. *Cancer Res*, 2009, 69:5656-5663.

Sinal SH, Woods CR. Human papillomavirus infection of genital and respiratory tracts in young children. *Semin Pediatr Infect Dis*, 2005, 16(4): 306-16.

Solomon D, Davey D, Kurman R, et al. The 2001 Bethesda System terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA*, 2002, 287:2114-19.

Stanley MA. Immune responses to human papilloma viruses. *Indian J Med Res*, 2009, 130 (3):266-276.

Stanley M. Prophylactic HPV vaccines: prospects for eliminating ano-genital cancer. *Br J Cancer*, 2007, 96:1320-1323.

Stanley M. HPV - Immune response to infection and vaccination. *Infect Agent Cancer*, 2010, 5:19-25.

Stanley M. Immune intervention in HPV infection: current progress and future developments. *Expert Rev Vaccines*, 2003, 2 (5):615-617.

Stanley MA. Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. *Clin Microbiol Rev*, 2012, 25(2):215-222.

Straight SW, Hinkle PM, Jewers RJ, McCance DJ. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 transforms fibroblast and effects the downregulation of the epidermal growth factor receptor in keratinocytes. *J Virol*, 1993, 67:4521-4532.

Syrianen S, Puranen M. Human papillomavirus infection in children: the potential role of maternal transmission. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2000, 11(2):259-274.

Suzich JA, Ghim SJ, Palmer-Hill FJ, White WI, Tamura JK, Bell JA. Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(25):11553-11557.

Termine N, Panzarella V, Falaschini S, Russo A, Matranga D, Lo Muzio L, Campisi G. HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck squamous cell carcinoma biopsies: a meta-analysis (1988-2007). *Ann Oncol*, 2008; (10):1681-1690.

Thomsen P, van Deurs B, Norrild B, Kayser L. The HPV16 E5 oncogene inhibits endocytic trafficking. *Oncogene*, 2000, 19:6023-6032.

Thorland EC, Myers SL, Gostout BS, Smith DI. Common fragile sites are preferential targets for HPV16 integrations in cervical tumors. *Oncogene*, 2003, 22:1225-1237.

Tomakidi P, Cheng H, Kohl A, Komposch G, Alonso A. Modulation of the epidermal growth factor receptor by the human papillomavirus type 16 E5 protein in raft cultures of human keratinocytes. *Eur J Cell Biol*, 2000, 79:407-412.

Tong X, Howley PM. The bovine papillomavirus E6 oncoprotein interacts with paxillin and disrupts the actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94:4412-4417.

Tsao YP, Li LY, Tsai TC, Chen SL. Human papillomavirus type 11 and 16 E5 represses p21^{Waf1/Sdi1/Cip1} gene expression in fibroblasts and keratinocytes. *J Virol*, 1996, 70:7535-7539.

Um SJ, Rhyu JW, Kim EJ, Jeon KC, Hwang ES, Park JS. Abrogation of IRF-1 response by High-risk HPV E7 protein in vivo. *Cancer Lett*, 2002, 179:205-212.

Valle GF, Banks L. The human papillomavirus HPV6 and 16 E5 proteins operate with E7 in the transformation of primary rodent cells. *J Gen Virol*, 1995, 76:1239-1245.

van der Burg SH, Piersma SJ, de Jong A, van der Hulst JM, Kwappenberg KMC, van den Hende M. Association of cervical cancer with the presence of CD4+ regulatory T cells specific for human papillomavirus antigens. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104 (29):12027-12092.

You J, Croyle JL, Nishimura A, Ozato K, Howley PM. Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes. *Cell*, 2004, 117:349-360.

Wheeler CM, Castellsaguè X, Garland CM, Szarewski A, Paavonen J, Naud P, et al. Cross-protective efficacy of HPV16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by nonvaccine oncogenic HPV types: 4-years end-of-study analysis of the randomized double-blind PATRICIA trial. *Lancet Oncol*, 2012, 13(1):100-110.

Wikstrom A, van Doornum GJ, Quint WG, Schiller JT, Dillner J. Identification of human papillomavirus seroconversion. *J Gen Virol*, 1995, 76:529-539.

World Health Organization. Global Advisory Committee on Vaccine Safety, report of meeting held 17-18 June 2009. Available: <http://www.who.int/vaccine-safety/jun-2009/en/index.html> (last accessed May 2012).

Woodman CB, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7 (1):11-22.

Zeltins A. Construction and characterization of virus-like particles: a review. *Mol Biotechnol*, 2013, 53:92107.

Zobel T, Iftner T, Stubenrauch F. The Papillomavirus E8 E2 Protein Represses DNA Replication from Extrachromosomal Origins. *Mol Cell Biol*, 2003, 23 (22):8352-8362.

zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers – a brief historical account. *Virology*, 2009, 384:260-265.