



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA  
"TOR VERGATA"**

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN  
MICROBIOLOGIA MEDICA E IMMUNOLOGIA

CICLO XXI

***VETTORI VIRALI INFLUENZALI CONTENENTI DETERMINANTI  
ANTIGENICI DI HIV-1 INDUCONO IMMUNITA' PROTETTIVA  
NEI TOPI DOPO SINGOLA IMMUNIZZAZIONE PER VIA  
MUCOSALE***

Dr.ssa Maria Giuseppina Stillitano

A.A. 2008/2009

Tutor: Dr.ssa Maria Rita Castrucci

Coordinatore: Prof. Enrico Garaci

## **1 SOMMARIO**

## **2 INTRODUZIONE**

*2.1 INFEZIONE NATURALE DA HIV-1*

*2.2 RISPOSTA IMMUNE DURANTE L'INFEZIONE DA HIV-1*

*2.3 RAZIONALE ALLA VACCINAZIONE CONTRO IL VIRUS HIV-1*

*2.4 STRATEGIE DI VACCINAZIONE PER L'INDUZIONE DI LINFOCITI T DELLA MEMORIA RESIDENTI NELLE MUCOSE GENITO-RETTALI*

*2.5 VIRUS INFLUENZALI RICOMBINANTI QUALI VETTORI DI ANTIGENI PER IMMUNIZZAZIONE*

*2.6 IMMUNOGENICITÀ DEL VIRUS DELL'INFLUENZA RILEVATA NEL CORSO DELL'INFEZIONE VAGINALE DI TOPI*

## **3 SCOPO DEL LAVORO**

## **4 RISULTATI**

*4.1 COSTRUZIONE DI UN VIRUS INFLUENZALE RICOMBINANTE CHE ESPRIME UN POLIEPITOPO CKG*

*4.2 EFFICACIA DELLA REPLICAZIONE DEL VIRUS WSN/CKG NEI TOPI*

*4.3 INDUZIONE DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA CELLULARE MUCOSALE E SISTEMICA ATTRAVERSO SINGOLA IMMUNIZZAZIONE DI TOPI CON IL VIRUS WSN/CKG*

*4.4 INDUZIONE DELLA RISPOSTA ANTICORPALE P18HIB-SPECIFICA ATTRAVERSO L'IMMUNIZZAZIONE DI TOPI CON IL VIRUS WSN/CKG*

*4.5 PROTEZIONE NEI CONFRONTI DI UN'INFEZIONE SECONDARIA CON IL VIRUS VACCINIA RICOMBINANTE IN TOPI IMMUNIZZATI CON IL VIRUS WSN/CKG*

*4.6 RICHIAMO DELLA RISPOSTA MEDIATA DAI LINFOCITI T DELLA MEMORIA IN SEGUITO AD INFEZIONE SECONDARIA CON IL VIRUS VACCINIA RICOMBINANTE*

## **5 DISCUSSIONE**

## **6 MATERIALI E METODI**

*6.1 VIRUS, CELLULE E TOPI*

*6.2 COSTRUZIONE DEL PLASMIDE pPOL I-WSN-HA/CKG*

*6.3 GENERAZIONE DEL VIRUS INFLUENZALE RICOMBINANTE WSN/CKG*

- 6.4 WESTERN BLOT**
- 6.5 VALUTAZIONE DELLE PROPRIETA' DI CRESCITA IN VITRO DEL VIRUS WSN/CKG**
- 6.6 IMMUNIZZAZIONE DEI TOPI**
- 6.7 REPLICAZIONE VIRALE NEL TRATTO RESPIRATORIO E VAGINALE DEI TOPI**
- 6.8 ANALISI DELL'RNA VIRALE MEDIANTE RT-PCR**
- 6.9 ISOLAMENTO DELLE POPOLAZIONI LINFOCITARIE**
- 6.10 SAGGIO ELISPOT IFN- $\gamma$  SPECIFICO**
- 6.11 ANALISI DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA MEDIANTE ELISA**
- 6.12 RILEVAMENTO DELLA PROTEZIONE VERSO UN'INFEZIONE SECONDARIA CON IL VIRUS VACCINIA RICOMBINANTE**

## **7 BIBLIOGRAFIA**

# **SOMMARIO**

Lo sviluppo di un vaccino efficace contro il virus dell'HIV-1 è una delle sfide più importanti che la Sanità pubblica sta affrontando in questi ultimi 20 anni. Una conoscenza ancora incompleta dei correlati di protezione e la variabilità genetica del virus HIV pone sostanziali impedimenti al raggiungimento di questo obiettivo. L'infezione dal virus HIV-1 si acquisisce prevalentemente attraverso la mucosa del tratto genito-rettale, pertanto, l'induzione di un'immunità mucosale rappresenta uno degli obiettivi primari nelle strategie che mirano a definire un efficace vaccino per il virus HIV-1. In particolare, un'immunizzazione in grado di attivare una risposta sia cellulare che umorale nelle mucose coinvolte nei processi di acquisizione del virus o dei linfonodi regionali può rappresentare una strategia efficace di prevenzione o controllo della replicazione e diffusione del virus dal sito di ingresso, ai tessuti linfoidi e al sangue.

Numerose osservazioni suggeriscono il ruolo importante che i linfociti T CD8+ svolgono nel contenimento dell'infezione con il virus HIV-1, tra queste l'evidenza dell'associazione temporale tra la comparsa di una risposta mediata dai linfociti T HIV-specifici in seguito all'infezione acuta e la riduzione della replicazione virale ad un livello stabile (set-point), l'associazione significativa di particolari alleli MHC I con la protezione dalla progressione della malattia, e l'aumento della replicazione virale in seguito alla deplezione dei linfociti T CD8+ in modelli di studio Macachi/HIV-1.

Diverse strategie vaccinali nei confronti del virus HIV-1 si basano sull'impiego di protocolli di "prime-boost" in grado di indurre un aumento selettivo di linfociti T della memoria specifici per antigeni del virus HIV trasportati da vettori. Tra i diversi sistemi di trasporto e rilascio di antigeni, i vettori virali vivi ricombinanti sono ampiamente considerati, poiché hanno la capacità di attivare una forte risposta cellulare ed anticorpale nei confronti degli antigeni che esprimono. Il virus influenzale ricombinante, che esprime antigeni estranei provenienti dal virus HIV-1, è uno strumento promettente in tal senso.

Alla luce di tali premesse abbiamo ritenuto interessante valutare la capacità di un virus influenzale di tipo A che esprime un poliepitopo HIV fuso all'estremità N-terminale dell'emagglutinina (HA) matura, di indurre una risposta immunitaria cellulare e umorale in seguito all'infezione di topi BALB/c per via vaginale e di conferire protezione nei confronti di un'infezione secondaria con i virus Vaccinia ricombinanti che esprimono gli stessi antigeni. In particolare abbiamo generato un virus influenzale ricombinante dal fenotipo attenuato (WSN/CKG), che esprime il peptide cluster PCLUS3, derivato dalla glicoproteina gp120 di HIV-1, il peptide P18IIIB, epitopo per i linfociti T citotossici (CTL) derivato dal loop V3 della gp120 di HIV-1 IIIB, e un secondo epitopo CTL derivato dalla proteina Gag di HIV-1, nella regione N-terminale del virus A/WSN/CKG.

Mediante saggi ELISPOT, abbiamo osservato che una singola somministrazione per via vaginale con il virus WSN/CKG, induce nei topi una risposta immune a lungo termine mediata da linfociti T CD8+ antigene-specifici, nei linfonodi iliaci (ILN) drenanti la mucosa genito-rettale, e nella milza dei topi infettati, con un picco intorno al settimo giorno dopo l'infezione, che viene rapidamente richiamata nella milza in seguito ad un'infezione secondaria con il virus Vaccinia esprimente la proteina Env (vPE16) o Gag (vDK1). Tali risultati sono analoghi se i topi vengono immunizzati per via intranasale. Abbiamo poi analizzato mediante saggi ELISA la produzione di anticorpi antigene-specifici nel siero di topi ad un mese dall'infezione con il virus WSN/CKG e abbiamo osservato elevati livelli di IgG P18IIIB-specifiche nei topi che sono stati infettati sia per via intranasale che vaginale. L'immunità indotta attraverso l'infezione con il virus WSN/CKG è, inoltre, in grado di conferire protezione ai topi contro un'infezione secondaria con il virus Vaccinia ricombinante vPE16.

I dati che abbiamo ottenuto complessivamente dal nostro studio indicano che un'immunizzazione mucosale, ed in particolare, un'immunizzazione per via vaginale, con un virus influenzale ricombinante che esprime un polipeptido derivante dal virus HIV-1 può indurre nei topi una risposta immunitaria antigene-specifica, protettiva e a lungo termine.

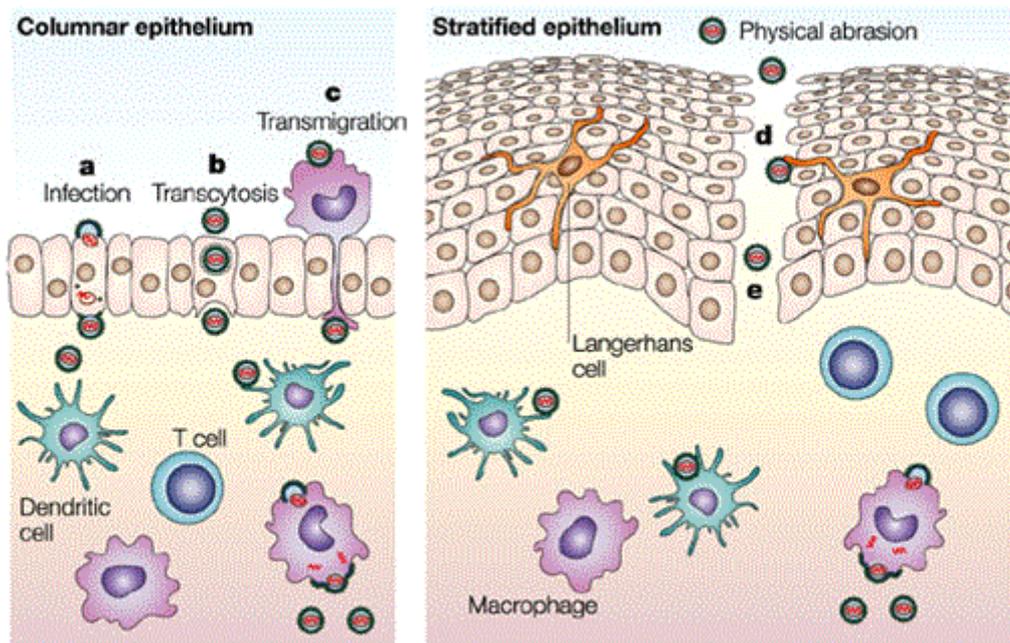
# **INTRODUZIONE**

## **2.1 INFEZIONE NATURALE DA HIV-1**

Il Virus dell'Immunodeficienza Umana (Human Immunodeficiency Virus, HIV) è l'agente eziologico della Sindrome da Immunodeficienza Acquisita (Acquired Immunodeficiency Syndrome, AIDS) [Barre-Sinoussi F *et al.* 1983; Coffin J *et al.* 1986]. Oltre 60 milioni della popolazione mondiale, ad oggi, risulta affetta dal virus HIV, e circa 5 milioni di nuove infezioni vengono dichiarate annualmente dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO). L'infezione con il virus HIV-1 avviene, nella maggior parte dei casi, attraverso rapporti sessuali (85% dei casi) [Royce RA *et al.* 1997]. Le mucose genito-rettali costituiscono la principale via di trasmissione naturale del virus dell'HIV che inizia il suo processo di replicazione nelle cellule linfoidi permissive ivi presenti, e successivamente diffonde negli organi linfoidi e nel sangue. In particolare, l'infezione avviene attraverso i tessuti non cheratinizzati dell'epitelio squamoso della vagina e dell'ectocervice, nonché attraverso il monostrato di epitelio colonnare dell'endocervice.

In linea generale, la trasmissione del virus HIV-1 non è molto efficiente; la trasmissione uomo-donna avviene con una probabilità molto bassa: circa 1 su 200-2000 esposizioni [Gray RH *et al.* 2001]. Tale peculiarità è strettamente legata all'anatomia dei tessuti genitali che sono disposti in maniera tale da costituire una vera e propria barriera protettiva contro l'invasione di patogeni. La mucosa intatta costituisce una barriera che limita l'infezione al tratto cervico-vaginale e porta al ritrovamento esclusivamente di poche popolazioni di cellule infette. Per infettare produttivamente un individuo mediante trasmissione sessuale, il virus HIV-1 deve superare lo strato di muco che agisce come un microbicida, intrappolando i virioni ed impedendo loro di raggiungere ed infettare le cellule di Langerhans (LCs) che si trovano nello strato sottostante di cellule epiteliali [Maher D *et al.* 2005; Miller CJ *et al.* 2005] (Figura 1). Le LCs costituiscono le prime cellule bersaglio di HIV-1 ed hanno funzione di cellule presentanti l'antigene (Antigen Presenting Cells - APC). L'espansione dell'infezione iniziale per mezzo delle cellule linfoidi infette è limitata dalla risposta del sistema immunitario innato locale e dai meccanismi di difesa che esso riesce ad innescare per prevenire la disseminazione sistemica del virus, quindi dell'infezione. Sebbene diversi studi abbiano dimostrato la caratteristica delle LCs di catturare i patogeni impedendone l'invasione dei tessuti, è stato visto che il virus HIV-1 è in grado di infettarle e diffondere successivamente ai linfociti T, semplificando così il processo iniziale di infezione dell'organismo ospite [Blauvelt A *et al.* 2000]. Tuttavia, l'acquisizione di HIV-1 da parte delle LCs risulta molto complessa. Osservazioni recenti hanno evidenziato che le LCs possono prevenire l'infezione da HIV-1 mediante la cattura e la degradazione del virus [de Witte L *et al.* 2007]. Questa funzione protettiva dipende dal fenotipo delle LCs e, più specificatamente, dalla funzione delle lectine langerhine di tipo C.

## TRASMISSIONE DEL VIRUS HIV-1 ATTRAVERSO LA MUCOSA GENITALE



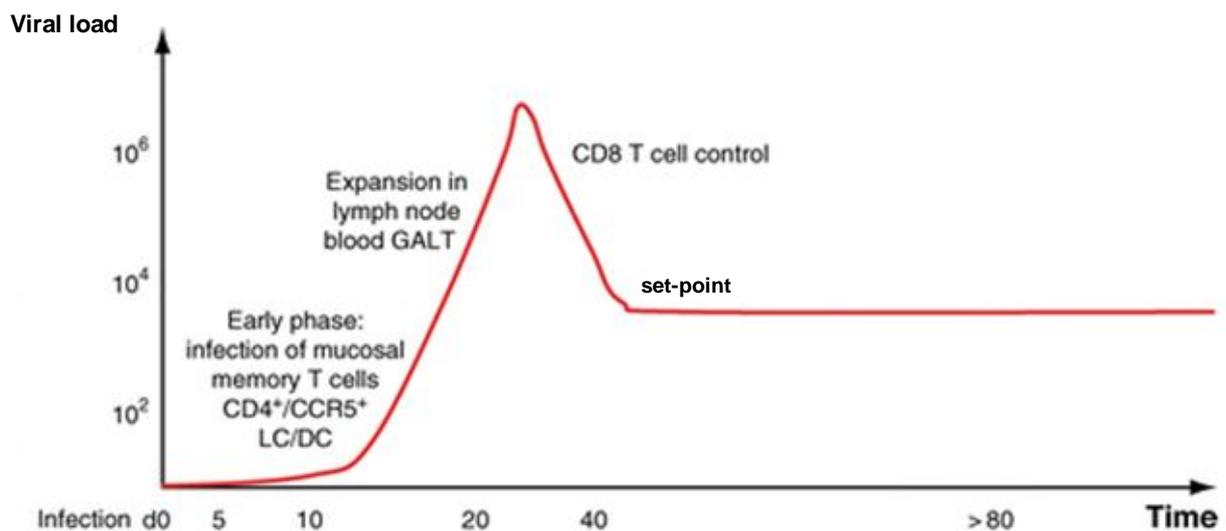
Nature Reviews | Microbiology

**Figura 1** a), b), c) Possibili modalità di attraversamento dell'epitelio della mucosa genitale da parte del virus HIV-1; d) riconoscimento e legame del virus HIV-1 alle cellule di Langherans (LCs); e) attraversamento della barriera epiteliale a causa di abrasioni nel tessuto epiteliale vaginale; riconoscimento e legame del virus HIV-1 alle cellule Dendritiche e successiva disseminazione del virus nei linfonodi drenanti.

In particolare, infatti, le LCs riescono a proteggere l'organismo dall'infezione con HIV-1 internalizzandolo attraverso le langherine nei granuli di Birbeck dove viene degradato [de Jong MA & Geijtenbeek TB 2008]. Questa barriera può, tuttavia, essere oltrepassata per inibizione delle langherine, e il virus può infettare produttivamente le LCs. Le LCs infettate si attivano, riducono il livello di espressione delle langherine e migrano nei linfonodi, dove trasmettono il virus HIV-1 ai linfociti T CD4+. L'interazione del virus con l'epitelio induce, inoltre, un massivo rilascio di MIP3- $\alpha$  (Proteina Infiammatoria dei Macrofagi) e di conseguenza l'accumulo di cellule dendritiche mieloidi (mDCs). Tali DCs stromali che esprimono sia il recettore DC-SIGN che CCR5 sono anch'esse implicate nel processo di infezione di HIV-1. In particolare, l'interazione della glicoproteina gp120 di HIV-1 con il recettore CD4/CCR5 porta alla fusione della membrana virale con la membrana cellulare e successivamente alla replicazione virale direttamente nelle DCs. In alternativa, il legame del virus con il recettore DC-SIGN pur non determinando un processo di fusione con la membrana della DC favorisce l'infezione in "trans" di cellule bersaglio che esprimono il recettore CD4/CCR5 o CXCR4 [Geijtenbeek TB *et al.* 2000; Kown DS *et al.* 2002]. Il virus dell'HIV può infettare anche le pDCs nei tessuti periferici attraverso il legame al CD4 presente sulla superficie delle pDCs; dopo l'internalizzazione del virus viene indotta l'espressione del CCR7 che consente alle pDCs di migrare verso i linfonodi [Fong L *et al.* 2002; Fontenau JF *et al.* 2004]. Molto probabilmente, l'intrappolamento, l'attività antimicrobica del muco e la degradazione mediata dal recettore delle lectine di tipo C riduce drammaticamente il pool invasivo di HIV ad un numero ristretto di particelle virali che raggiungono la lamina propria. L'infezione da HIV-1 si stabilisce allorchè le cellule infette (LCs, DCs) migrano nei linfonodi che drenano la mucosa genitale e nei tessuti linfatici dell'intestino. Lo stabilirsi dell'infezione in questo sito è una conseguenza della presenza di linfociti T CD4+, cellule bersaglio di HIV, che portano ad una massiva replicazione virale [Pope M *et al.* 1994; Douek DC *et al.* 2002]. La maggior parte di questi linfociti T CD4+ sono cellule della memoria immunitaria, posseggono il recettore CD45R0 ed esprimono livelli di CCR5 più elevati rispetto a quelli che circolano nel sangue.

Studi condotti sulle primissime fasi di infezione mucosale nei *Macachi Rhesus* con il virus dell'Immunodeficienza delle Scimmie (SIV) ha fornito una conoscenza più dettagliata di quello che accade ai primi stadi di un'infezione [Pope M & Haase AT 2003; Li Q *et al.* 2005] (Figura 2). Malgrado la somministrazione del virus ad un titolo elevato, i primi tre giorni successivi all'infezione non sono state rilevate cellule infette nella mucosa. Le prime cellule infette ad essere rilevate sono i linfociti T CD4+ della memoria che esprimono il corecettore CCR5.

## ANDAMENTO DELLA VIREMIA IN SEGUITO AD INFEZIONE NATURALE DA HIV-1



**Figura 2** In seguito ad un'infezione naturale con il virus HIV le prime cellule infette ad essere rilevate nella lamina propria sono i linfociti T CD4+ della memoria che esprimono il corecettore CCR5. Trascorsi i primi tre giorni il numero di cellule infettate aumenta e alla fine della prima settimana il virus è rilevabile nei linfonodi, trasportato dalle LCs e dalle DCs plasmacitoidi. Dopo la prima settimana, il virus inizia a diffondere attraverso il sangue anche in altri siti, ed in particolare nei tessuti linfoidi associati all'intestino (GALT) dove risiede un gran numero di linfociti T della memoria CD4+/CCR5+. Nel sangue il virus raggiunge un picco massimo di carica virale intorno al ventunesimo giorno, e successivamente i livelli di HIV-1 iniziano a diminuire per la progressiva comparsa della risposta immunitaria specifica (linfociti T CD8+ specifici), raggiungendo un livello stabile ("set-point").

Trascorsi i primi tre giorni dall'infezione il numero di cellule infettate aumenta. Alla fine della prima settimana il virus è rilevabile nei linfonodi dove è stato portato dalle LCs e dalle DCs plasmacitoidi (pDCs). La produzione di virus può essere amplificata nei linfonodi drenanti allorché i linfociti T entrano in contatto con le DC venendo allo stesso tempo stimolati e infettati [Pope M *et al.* 1994]. Trascorsi sette giorni dall'infezione, il virus, che ha iniziato a diffondere attraverso il sangue, è rilevabile anche in altri siti, ed in particolare nei tessuti linfoidei associati all'intestino (GALT) dove risiede un gran numero di linfociti T della memoria CD4+/CCR5+. La disseminazione del virus in altri siti linfoidei corrisponde ad un'espansione esponenziale dell'infezione e ad un aumento dei linfociti T CD4+ associati all'intestino infettati, di cui l'80% viene distrutto [Mattapallil JJ *et al.* 2005]. Nel sangue il virus raggiunge un picco intorno al ventunesimo giorno, corrispondente a più di  $10^7$  particelle/ml di plasma. Successivamente la viremia inizia a diminuire a causa della saturazione delle popolazioni di cellule bersaglio (linfociti T della memoria CD4+/CCR5+) e per la progressiva comparsa della risposta immunitaria specifica [Borrow P *et al.* 1994; Safrit JT *et al.* 1994; Phillips AN 1996]. Senza l'intervento di una terapia i livelli di viremia diminuiscono da 10 a 100 volte rispetto al picco, rimanendo stabili (raggiungimento del set-point) per circa 2-6 mesi dopo l'infezione. Questo processo è inversamente correlato al controllo della progressione della malattia [Joannidis JP *et al.* 1998]. Trascorso questo periodo di fase acuta inizia il declino dei linfociti T CD4+ e la comparsa dell'AIDS.

## **2.2 RISPOSTA IMMUNE DURANTE L'INFEZIONE DA HIV-1**

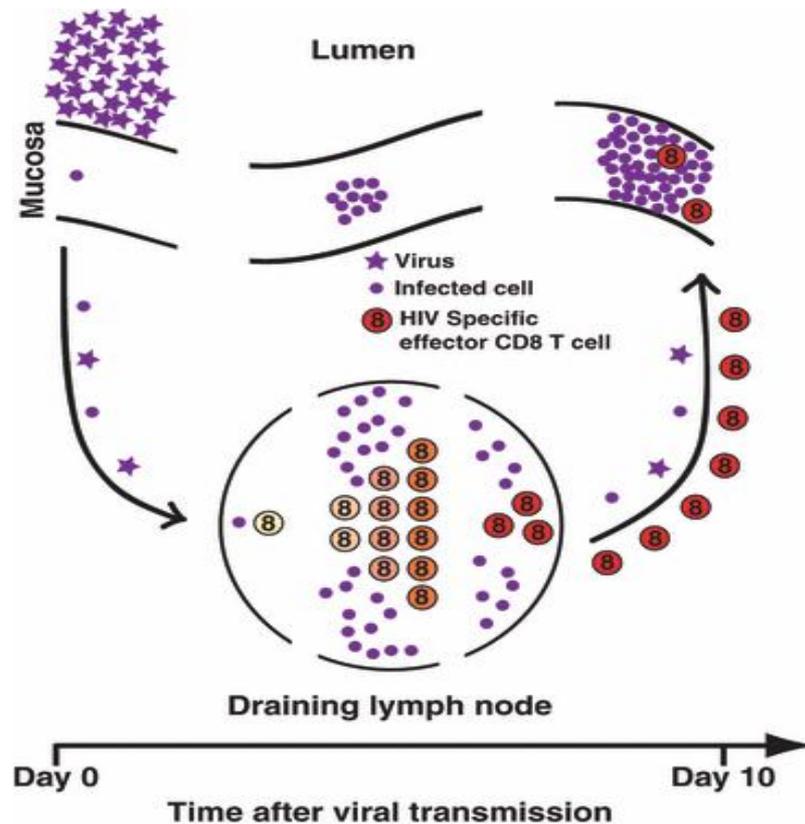
Durante i primi stadi dell'infezione diversi meccanismi effettori dell'immunità innata intervengono limitando la diffusione del virus. Nel momento in cui inizia a comparire la viremia è stata osservata l'attivazione di cellule Natural Killer (NK), DCs e la produzione di citochine, come l'IFN $\alpha$  plasmatico [Pulendran B *et al.* 2001; Alter G *et al.* 2004]. Il contributo relativo di questi eventi precoci e la loro influenza sullo sviluppo di una risposta specifica in grado di effettuare un controllo precoce dell'infezione è oggetto di studi volti a definire gli aspetti maggiormente rilevanti dell'immunità innata. La prima forma di risposta specifica riguarda la comparsa dei linfociti T CD8+ e successivamente degli anticorpi [Safrit JT *et al.* 1994]. L'espansione della popolazione dei linfociti T CD8+ HIV-specifici circolanti risulta essere il 10% dei linfociti T CD8+ totali al picco della viremia, e tali cellule sono ritenute responsabili della riduzione del livello di viremia e del controllo dell'infezione [Borrow P *et al.* 1994; Wilson JD *et al.* 2000]. I linfociti T CD8+ controllano l'infezione mediante rilevamento e uccisione delle cellule infettate, oppure interferendo con un meccanismo non citolitico nei processi di replicazione virale. E' fondamentale che l'eliminazione del virus avvenga nei primissimi giorni dopo l'infezione, di conseguenza, in queste

prime fasi dell'infezione è necessario stabilire un livello di immunità cellulare elevato ai siti d'entrata del virus [Belyakov IM & Berzofsky JA 2004; Haase AT 2005]. D'altra parte, la circolazione dei linfociti T vergini è ristretta ai tessuti linfoidei secondari, al sangue e alla linfa, dunque, nel corso dell'infezione naturale, prima che i linfociti T CD8+ maturi siano in grado di esercitare un controllo e prevenire l'infezione primaria da HIV nei siti mucosali dai quali il virus entra nell'organismo, sono necessari una serie di altri eventi: il virus HIV-1 deve iniziare a replicare per produrre gli antigeni necessari a stimolare l'innescamento della risposta immunitaria, le APC devono veicolare tali antigeni ai tessuti linfoidei secondari, i linfociti T CD8+ devono essere attivati specificamente, espandersi, migrare nei siti d'infezione, entrare in contatto con le cellule infette e ucciderle [Masopust D 2008] (Figura 3).

Alcune osservazioni suggeriscono inequivocabilmente che i linfociti T CD8+ svolgono un ruolo importante nel contenimento dell'infezione da HIV-1, tra queste l'evidenza di un'associazione temporale tra la comparsa della risposta dei linfociti T CD8+ HIV-specifici in seguito all'infezione acuta e la riduzione della replicazione virale fino ad un livello stabile di viremia (set-point), la selezione delle mutazioni negli epitopi virali per i linfociti T CD8+, l'associazione di particolari alleli MHC di classe I con la progressione dell'AIDS. In particolare, la dimostrazione che l'azione antivirale dei linfociti T CD8+ si contrappone alla replicazione virale determinando il raggiungimento di un equilibrio della viremia (set-point) è stata fatta su un gruppo di macachi i cui linfociti T CD8+ sono stati depleti mediante infusione di anticorpi anti-CD8; è stato osservato che la deplezione dei linfociti T CD8+ correla con l'aumento della carica virale [Jin X *et al.* 1999; Schmitz JE *et al.* 1999]. La continua selezione di mutanti che evadono il riconoscimento da parte dei linfociti T citotossici (CTL) implica una continua pressione selettiva [Phillips RE *et al.* 1991; Moore CB *et al.* 2002]. La risposta sostenuta dai linfociti di tipo T, infatti, deve evolvere continuamente, spesso con pattern di immunodominanza differenti durante la fase cronica rispetto a quelli della fase acuta, di riflesso alla selezione dei mutanti per l'evasione del virus [Goulder PJ *et al.* 2001].

Due o tre mesi dopo l'infezione primaria compaiono anche gli anticorpi [Safrit JT *et al.* 1994]. Tuttavia essi non sono in grado di neutralizzare contemporaneamente tutte le varianti virali, di conseguenza danno solo un piccolo contributo al controllo dell'infezione [Richman DD *et al.* 2003; Wei X *et al.* 2003]. L'effetto limitato è da attribuire alla natura quasi-specie della popolazione virale oltre che ad un elevato grado di glicosilazione capace di camuffare le porzioni riconosciute dagli anticorpi [Wyatt R *et al.* 1998; Chen B *et al.* 2005]. Anche i siti di riconoscimento presenti nelle regioni maggiormente conservate vengono efficacemente nascosti agli anticorpi cross-reattivi prodotti dai linfociti B.

## INDUZIONE DI LINFOCITI T CD8+ SPECIFICI PER HIV-1



**Figura 3** Diffusione del virus HIV-1 e attivazione della risposta mediata dai linfociti T CD8+ specifici. Una rapida attivazione dell'immunità cellulare contro il virus è fondamentale ai fini del controllo e contenimento dell'infezione. Tuttavia prima che i linfociti T CD8+ specifici presenti nei tessuti linfoidi siano in grado di partecipare all'eradicazione dell'infezione primaria di HIV, è necessario che l'antigene virale dal sito d'ingresso venga processato dalle APC infettate nei tessuti linfoidi locali e presentato ai linfociti T CD8+ specifici, i quali si attivano, si espandono e maturano un fenotipo effettore nei siti d'infezione dove riconoscono e uccidono le cellule infette.

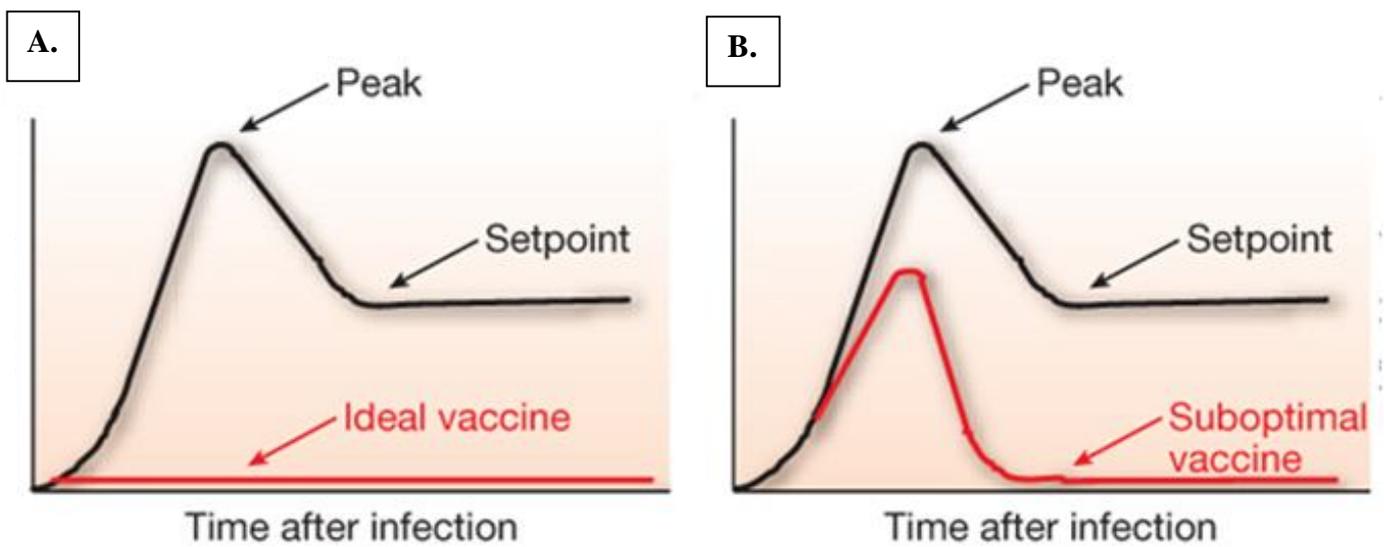
La flessibilità conformazionale della glicoproteina 120 (gp120) è, infatti, in grado di diminuire l'efficienza di presentazione del sito di legame del recettore mediante la formazione di una barriera entropica termostabile che elude le regioni bersaglio degli anticorpi [Kwong PD *et al.* 2002]. Anche l'integrazione nel genoma della cellula ospite, caratteristica del ciclo replicativo del virus, è un modo di eludere il sistema immunitario. Sotto questa forma, infatti, il virus si trova in una forma latente e l'assenza di una significativa espressione delle sue proteine non permette che sia rilevato dal sistema immunitario [Finzi D *et al.* 1998].

### **2.3 RAZIONALE ALLA VACCINAZIONE CONTRO IL VIRUS HIV-1**

La realizzazione di un vaccino contro HIV-1 ha come obiettivo principale quello di indurre nei soggetti vaccinati uno stato di immunità cellulare e umorale tale da prevenire un'infezione in seguito ad un'eventuale esposizione al virus. Il “vaccino ideale” è in grado di indurre un'immunità sterilizzante e di bloccare l'infezione, ma negli studi clinici effettuati ciò si è rivelato impossibile, pertanto attualmente si mira al controllo della replicazione virale e alla prevenzione della malattia. Sembra, infatti, più realistica l'ideazione di un “vaccino sub-ottimale” che pur non essendo in grado di prevenire l'infezione provveda ad un controllo parziale della replicazione del virus dopo l'infezione (Figura 4). Tale controllo parziale, esemplificato nella riduzione del picco e del “set-point” della carica virale dopo l'infezione, è ben dimostrato in alcuni studi preclinici che impiegano approcci vaccinali in grado di indurre la risposta dei linfociti T [Barouch DH 2008]. I lunghi tentativi volti a sviluppare un vaccino efficace per l'AIDS sono stati finora ostacolati da una serie di difficoltà legate all'incapacità di indurre una risposta anticorpale neutralizzante, all'instaurazione precoce di riserve virali latenti, all'assenza di chiari correlati di protezione, nonché alla straordinaria variabilità di HIV-1 e alla sua capacità di evadere la risposta immunitaria specifica.

Analisi filogenetiche dell'RNA virale denotano una considerevole eterogeneità del virus. Vi sono tre principali tipi di HIV-1: M, N e O, introdotti nella specie umana dagli scimpanzé. Il tipo M è suddiviso in sei principali sottotipi: A, B, C, D, E e G, i quali rappresentano le prime diramazioni dell'albero filogenetico del virus negli umani [Korber B *et al.* 2000]. I sottotipi differiscono tra loro per un 20% degli aminoacidi che li costituiscono e hanno distinte distribuzioni geografiche.

## OBIETTIVI DI UN VACCINO PER HIV-1



**Figura 4** (A) Un vaccino ideale è in grado di proteggere dall'infezione e offre un'immunità sterilizzante. (B) Un vaccino sub-ottimale è in grado di mantenere il picco di replicazione e il set-point virale più bassi.

Contemporaneamente all'identificazione e sequenziamento del virus HIV-1, sono stati fatti diversi tentativi di ideare un vaccino impiegando la gp120 dell'envelope virale, ma successivamente questa idea è stata abbandonata a causa dell'intrinseca variabilità antigenica del virus e della differente suscettibilità alla neutralizzazione rilevata tra isolati primari e ceppi virali da essi derivati in seguito a crescita su linee cellulari *in vitro*, nonché per l'elevato grado di glicosilazione della proteina che scherma i determinanti antigenici, bersaglio degli anticorpi [Wyatt R *et al.* 1998; Chen B *et al.* 2005].

Le difficoltà a indurre la produzione di anticorpi protettivi e l'evidenza che l'immunità cellulare svolge un ruolo critico nella resistenza contro il virus HIV-1 hanno determinato un cambiamento di prospettiva nei tentativi di ideare un vaccino, indirizzando l'attenzione verso la necessità di generare una "buona" immunità mediata dai linfociti T CD8+, dove "buona" sottintende la quantità, la qualità e la distribuzione anatomica dei linfociti T CD8+ della memoria [Pantaleo G & Koup RA 2004; McMichael AJ 2006]. Numerosi studi hanno, infatti, dimostrato la stretta relazione tra la risposta immunitaria mediata da linfociti T CD8+ e il controllo della replicazione di HIV [Migueles SA *et al.* 2002; Betts MR *et al.* 2006; Almeida JR *et al.* 2007; Saez-Cirion A *et al.* 2007].

Cruciale per la conoscenza della patogenesi di HIV e il controllo dell'infezione è lo studio di individui che infettati dal virus, e non trattati con una terapia antiretrovirale, rimangono sani. Gli individui che mantengono inalterata nel tempo la quantità di linfociti T CD4+ dopo essere stati infettati dal virus vengono definiti "long-term non progressors" (LTNP). In particolare, basandosi sulla quantità di carica virale plasmatica di HIV si distinguono due gruppi di "HIV controllers": un gruppo, designato "elite controllers", mantiene i livelli di RNA al di sotto del limite rilevabile (<50 copie/ml), l'altro gruppo, definito "viremic controllers" conserva nel tempo livelli di RNA plasmatico comunque bassi (50-2000 copie/ml) [Deeks SG & Walker BD 2007]. Gli "elite controllers" rappresentano meno dell'1% della popolazione infettata da HIV. Sebbene tra gli individui appartenenti alla categoria dei "controllers" HIV/SIV siano stati riportati casi di una forte risposta immunitaria mucosale di tipo T CD8+, pochi lavori parlano dettagliatamente di questo fenomeno [Critchfield JW *et al.* 2007; Ling B *et al.* 2007]. In uno studio recente è stata esaminata comparativamente la risposta mediata dai linfociti T CD8+ Gag-specifici nel sangue e nella mucosa rettale di un gruppo di 17 "elite controllers" (<75 copie/ml), 11 "viremic controllers" (75-2000 copie/ml), 14 "non controllers" (>10000 copie/ml) e 10 trattati con terapia antiretrovirale (<75 copie/ml) [Ferre AL *et al.* 2009]. È stato osservato che lo stato di "controllers" correla maggiormente con la risposta T CD8+ nella mucosa rispetto alla risposta rilevata nel sangue. In particolare, i gruppi "controllers" hanno evidenziato una risposta mucosale T CD8+ Gag-specifica di ampiezza maggiore rispetto ai "non controller" e agli individui trattati con terapia antiretrovirale.

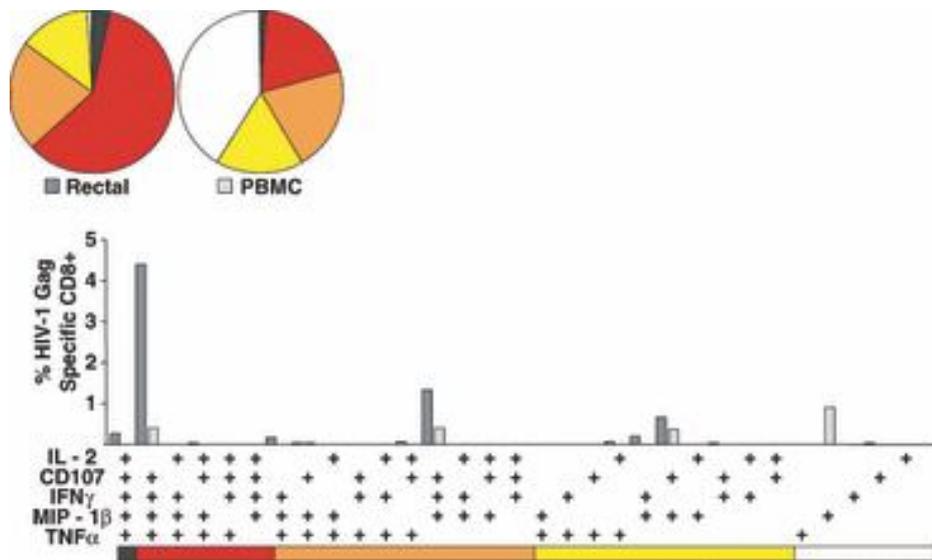
Tale risposta nei “controllers” è mediata da linfociti T CD8+ “polifunzionali”, in grado di produrre molteplici fattori antivirali contemporaneamente (IFN $\gamma$ , MIP-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, CD107), presenti in quantità abbondanti nei tessuti mucosali (Figura 5). Molti lavori, infatti, hanno dimostrato che la sola produzione di IFN $\gamma$  è insufficiente per definire la qualità di una risposta immunitaria protettiva. Al contrario, la presenza di linfociti T polifunzionali, in grado di rilasciare contemporaneamente più citochine, nel sangue di pazienti LTNP correla negativamente con i livelli di carica virale [Betts MR *et al.* 2001; Boaz MJ *et al.* 2002; Makedonas G & Betts MR 2006; Seder RA *et al.* 2008]. Tali dati, tuttavia, non sono sufficienti a dimostrare che la risposta mediata da linfociti T CD8+ polifunzionali mucosali garantisce il controllo immune. Alcuni “controllers”, infatti, non presentano una risposta T CD8+ particolarmente robusta [Ferre AL *et al.* 2009]. Diviene, quindi, molto importante identificare eventuali fattori addizionali che possono contribuire alla non progressione clinica dell’infezione da HIV-1.

A tal proposito, è stata osservata una consistente associazione tra alcuni alleli HLA di classe I e la risposta mediata dai linfociti T CD8+. Ciò suggerisce che un particolare alplotipo MHC I presente in alcuni individui possa favorevolmente condizionare la risposta citotossica e contribuire al controllo immune dell’infezione da HIV-1 e alla non progressione della malattia [Carrington M 2003; den Uyl D *et al.* 2004; Lopez-Vazquez A *et al.* 2005]. In uno studio condotto recentemente è stato osservato che individui con particolari alleli HLA (HLA-B13, 27, 57, 58 e 81) sviluppano una risposta immune mediata da linfociti T CD8+ IFN $\gamma$ + IL2+ HIV-specifici nel sangue periferico ad una frequenza elevata rispetto ai soggetti privi di tali alleli “protettivi” [Emu B *et al.* 2008]. Diversi studi hanno evidenziato un’associazione tra la risposta CTL specifica per la proteina virale Gag e una carica virale bassa [Zuniga R *et al.* 2006; Borghans JA *et al.* 2007]. Molecole HLA associate ad una lenta progressione della malattia legano preferenzialmente peptidi della regione p24 di Gag [Borghans JA *et al.* 2007; Streeck H *et al.* 2007; Rolland M *et al.* 2008].

Un’altra considerazione importante riguarda il ruolo della risposta immunitaria mucosale mediata dai linfociti T CD8+ nei soggetti “altamente esposti, persistentemente sieronegativi” (highly exposed, persistently sieronegative – HEPS). Linfociti T CD8+ specifici sono stati rilevati nella mucosa cervicovaginale di donne esposte sessualmente al rischio di infezione da virus HIV-1 e nella mucosa vaginale di *Macachi Rhesus* non infetti ma esposti a SIV [McChesney MB *et al.* 1998; Kaul R *et al.* 2000]. Tuttavia non sono stati ancora pubblicati dei lavori che documentino in maniera approfondita questi fenomeni [Letvin NL *et al.* 2007].

Esistono altri fattori da approfondire, come la fitness e i meccanismi di immunità anti-virale, e i fattori di restrizione dell’ospite che sono legati al controllo di HIV-1 e alla sua patogenesi.

## RISPOSTA IMMUNE CELLULARE DI UN PAZIENTE HIV-1 “CONTROLLER”



**Figura 5** Rappresentazione grafica dell'ampiezza e qualità della risposta di linfociti T CD8+ specifici per l'epitopo Gag di HIV-1 rilevabili nel sangue periferico e nella mucosa rettale di un paziente HIV-1 "controller". I grafici a barre mostrano la percentuale della risposta HIV-1 specifica dei linfociti T polifunzionali mentre la legenda illustra la combinazione delle citochine prodotte dai linfociti T specifici. I colori variano in riferimento al numero di citochine prodotte in una stessa cellula (nero: 5, rosso: 4, arancio: 3, giallo: 2, bianco: 1). I linfociti T HIV-1 specifici presenti nella mucosa rettale sono soprattutto polifunzionali, al contrario quelli presenti nel sangue sono, in gran parte, monofunzionali.

Tuttavia i risultati ottenuti nei vari studi condotti implicano che la risposta immunitaria mucosale mediata dai linfociti T svolge un ruolo importante nella sorveglianza immunologica della mucosa intestinale. La deplezione dei linfociti T CD4+ della memoria nei tessuti linfoidi associati all'intestino entro i primi 4-10 giorni di infezione, infatti, mette le basi per l'immunodeficienza e l'attivazione cronica di un'immunità che dipende in parte dall'ingresso di microbi attraverso le mucose gastrointestinali danneggiate [Li Q *et al.* 2005; Mattapallil JJ *et al.* 2005; Brenchley JM *et al.* 2006].

La strategia migliore di immunizzazione contro il virus HIV-1 non è ancora ben definita e differenti forme di vaccino sono attualmente testati in studi preclinici e clinici con lo scopo di generare una risposta anticorpale e citotossica efficace nell'indurre un'immunità protettiva nei siti sistemici e mucosali in seguito ad un'infezione naturale da HIV-1 [Belyakov IM *et al.* 2004; Gherardi MM & Esteban M 2005; Belyakov IM *et al.* 2006; Dale CJ *et al.* 2006].

#### **2.4 STRATEGIE DI VACCINAZIONE PER L'INDUZIONE DI LINFOCITI T DELLA MEMORIA RESIDENTI NELLE MUCOSE GENITO-RETTALI**

L'idea che strategie di immunizzazione possano indurre linfociti T della memoria a lungo termine nelle mucose genitali e rettali dove svolgere un'immediata azione effettrice nel corso delle prime fasi dell'infezione, che precorrono la diffusione virale nei tessuti linfoidi, rappresenta attualmente un'importante ipotesi di studio per lo sviluppo di un effettivo vaccino contro le infezioni da HIV. Nell'ambito dell'immunità cellulare i linfociti T della memoria possono essere distinti, in base alla loro funzionalità, alla loro localizzazione e alla presenza di marcatori fenotipici, principalmente in due sottopopolazioni definite "central memory" (T<sub>CM</sub>) ed "effector memory" (T<sub>EM</sub>) [Sallusto F *et al.* 2004]. Si ritiene che nel corso di un'infezione secondaria queste due sottopopolazioni abbiano un'effettiva divisione di funzioni: i T<sub>CM</sub>, dislocati nei linfonodi, hanno una funzione effettrice limitata, proliferano rapidamente in seguito a stimolazione antigenica e velocemente divengono cellule effettrici che migrano nel sito di infezione; i linfociti T<sub>EM</sub> si trovano nei tessuti periferici, hanno una capacità proliferativa ridotta, e sono coinvolti in funzioni effettrici di immediata protezione, pertanto sono in grado di svolgere un'attività citotossica e di produrre rapidamente citochine effettrici quali IFN $\gamma$  [Sallusto F *et al.* 1999; Masopust D *et al.* 2001]. I linfociti T della memoria possono persistere per un lungo tempo in assenza di stimolo antigenico; il loro mantenimento dipende dall'espressione di molecole anti-apoptotiche e dalla loro capacità di rispondere a citochine omeostatiche come IL-15, che media la proliferazione, e IL-7 che aumenta la sopravvivenza [Goldrath AW *et al.* 2002; Tan JT *et al.* 2002; Schluns KS & Lefrancois L 2003].

Le strategie vaccinali attualmente impiegate negli studi volti a determinare un selettivo aumento della popolazione di linfociti T della memoria si fondano su protocolli di “prime-boost”, secondo cui un comune antigene di interesse viene somministrato in più ripetizioni con modalità distinte ed atte ad indurre ad ogni somministrazione una risposta cellulare specifica sempre maggiore che si traduce in un aumento della popolazione di cellule della memoria. Molti di questi protocolli in fase sperimentale prevedono una prima immunizzazione (prime) mediante somministrazione per via sistemica, sottocute o nel muscolo, di DNA plasmidico in grado di indurre l'espressione degli antigeni desiderati. A questa prima stimolazione antigenica segue a distanza di una o due settimane una seconda immunizzazione (boost) mediata da un vettore ricombinante, quali ad esempio il virus Vaccinico o Adenovirus, in grado di far esprimere l'antigene durante l'infezione.

Sebbene vi sia un consenso unanime circa la necessità di indurre con la vaccinazione una popolazione di linfociti T della memoria che siano rilevabili e funzionali sulle mucose genitali ed intestinali, non altrettanto condivisi appaiono i protocolli di immunizzazione adottati a tal fine nelle differenti strategie di vaccinazione “prime-boost”. L'immunizzazione eterologa “prime-boost” è una strategia comprovata in grado di indurre un'elevata frequenza di linfociti T effettori e della memoria, e in particolare linfociti T CD8+ ad alta avidità che sono rilevanti nell'efficacia del vaccino [Gherardi MM & Esteban M 2005; Belyakov IM *et al.* 2006, 2007; Ranasinghe C *et al.* 2007].

I fattori chiave da considerare nella scelta di una strategia vaccinale nei confronti di un determinato patogeno sono principalmente i seguenti: effettivo rilascio dell'antigene nel sito mucosale induttore dell'immunità; incremento della risposta immunitaria mucosale mediante impiego di adiuvanti mucosali sicuri; scelta di un protocollo e di una via di immunizzazione che induca una risposta protettiva nei siti mucosali di interesse e a livello sistemico; scelta di una formulazione antigenica adeguata nel corso dell'ottimizzazione del regime di immunizzazione mucosale.

Differenti sistemi di rilascio dell'antigene sono stati ideati, consistenti di microparticelle, strutture basate sui lipidi, e vari batteri e virus vivi attenuati [Eriksson K & Holmgren J 2002; Kersten G & Hirschberg H 2004]; tra questi, i vettori virali vivi sono tra i maggiori candidati come vaccino per l'elevata capacità di indurre una vigorosa risposta immunitaria cellulare ed innescare una risposta anticorpale nei confronti degli antigeni estranei espressi. Ulteriori vantaggi dell'impiego dei vettori includono la loro abilità di infettare naturalmente cellule bersaglio e tessuti di interesse, la facilità con cui rilasciano l'antigene nelle vie mucosali, la loro azione di adiuvanti naturali grazie alla capacità di indurre citochine e chemochine in seguito ad infezione.

Tra i vettori virali vivi principalmente descritti in letteratura sono annoverabili gli Adenovirus (Ad). I vettori adenovirali sono agenti infettivi e, come tali, immunogeni mucosali naturali che possono

essere somministrati per via orale e intranasale. Essi sono stati ampiamente impiegati nella terapia genica e la loro biologia molecolare e l'interazione con l'ospite sono alquanto note [Voltan R & Robert-Gurof M 2003]. La scelta di manipolare questi vettori ha riguardato principalmente la possibilità di inserire all'interno del loro genoma sequenze geniche codificanti antigeni estranei e la capacità di essere rilasciati per via intranasale ad indurre una risposta immunitaria protettiva [Prevec L *et al.* 1989]. Inoltre, l'utilizzo di Poxvirus ricombinanti nella fase di richiamo nei protocolli di immunizzazione "prime-boost" si è dimostrato un approccio vaccinale molto efficiente in differenti modelli animali, in particolar modo per la capacità di indurre una risposta immunitaria cellulare specifica e, ancor di più, in quanto questi virus sono in grado di conferire protezione contro differenti patogeni [Schneider J *et al.* 1999; Ramshaw IA & Ramsay AJ 2000; McShane H 2002].

Protocolli di vaccinazione sistemica basati su un regime "prime-boost" che consistono in una prima immunizzazione attraverso l'inoculo di DNA plasmidico, capace di indurre l'espressione di geni codificanti gli antigeni di interesse, come "prime", seguito da un Poxvirus ricombinante come "booster", innescano una risposta immunitaria cellulare molto vigorosa contro una varietà di antigeni, inclusi HIV e SIV [Kent SJ *et al.* 1998; Hanke T & McMichael AJ 2000]. In uno studio condotto su un gruppo di *Macachi Rhesus*, l'immunità ottenuta in seguito ad una vaccinazione con un "prime-boost" di DNA-MVA (Virus di Ankara Modificato) ha ritardato la progressione dell'AIDS in seguito ad un'infezione con un ceppo patogeno di SHIV (Simian Human Immunodeficiency Virus) [Wang SW *et al.* 2004]. In un altro studio, condotto sui *Macachi Cynomologus*, la combinazione tra via mucosale e via parenterale per la somministrazione di DNA (prime) e MVA (boost) induce una risposta immunitaria cellulare vigorosa ed il controllo a livello sistemico nei confronti di un'infezione con un ceppo patogeno omologo di SHIV somministrato per intravena [Makitalo B *et al.* 2004]. E' interessante osservare che in questi studi si trova una correlazione tra l'ampiezza della risposta immunitaria indotta e l'efficacia protettiva della vaccinazione, dato che gli animali con bassa carica virale dimostrano una risposta immunitaria umorale e cellulare ampia e forte. L'immunizzazione attraverso la via mucosale (rettale) di un gruppo di *Macachi Rhesus* con un vaccino contenente un peptide HIV/SIV risulta più efficace rispetto alla via sistemica (sottocute) nell'eliminazione del virus disseminato nelle mucose intestinali in seguito all'infezione per via rettale con SHIV [Belyakov IM *et al.* 2001]. Inoltre, è stato osservato che un vaccino somministrato per via mucosale e in grado di indurre efficacemente la produzione di CTL ad alta avidità nelle mucose può ritardare la fase acuta del picco viremico nei *Macachi Rhesus* che hanno subito un'infezione per via rettale con un ceppo SHIV patogeno; vi è, infatti, una correlazione migliore tra il raggiungimento del picco viremico e l'ampiezza della

risposta CTL rilevabile nella mucosa rettale piuttosto che a livello sistemico [Belyakov IM *et al.* 2006]. In definitiva i dati ottenuti suggeriscono il ruolo diretto dei linfociti T CD8+ residenti nei siti mucosali nella riduzione degli stadi iniziali dell'infezione virale e, negli stadi successivi, della progressione della malattia in seguito ad infezione mucosale. Inoltre, il mantenimento dei linfociti T CD4+ nella lamina propria dell'intestino e la riduzione della carica virale nell'intestino correlano con i CTL mucosali ad alta avidità indotti dal vaccino somministrato per via mucosale [Belyakov IM *et al.* 2007]. Studi recenti sono stati fondati su un'analisi comparativa della via di immunizzazione mucosale e quella sistemica in seguito ad una prima immunizzazione (prime) con DNA e un successivo richiamo (boost) con rMVA (o Ad) esprimente la glicoproteina gp160 Env di HIV-1, con l'obiettivo di indagare sulla differente abilità di indurre una risposta CTL HIV-specifica sia a livello mucosale che sistemico [Belyakov IM *et al.* 2008]. Tali studi, condotti in un modello murino, dimostrano che l'immunizzazione mucosale per via rettale induce nella mucosa gastrointestinale una risposta di cellule T CD8+ ad alta avidità migliore rispetto ad un'immunizzazione per via intramuscolo o mista. Una singola immunizzazione rettale con il virus rMVA da solo non è in grado di indurre una risposta di tipo T cellulo-mediata rilevabile nella mucosa dell'intestino mentre nella milza è possibile rilevare linfociti T ad alta avidità dopo una singola immunizzazione per via rettale o intramuscolo di rMVA. Pertanto, risulta evidente che l'impiego di una strategia "prime-boost" è necessaria per indurre linfociti T CD8+ ad alta avidità a livello mucosale ma anche per l'ampiezza della risposta immunitaria a livello mucosale. Appare, altresì, importante rilevare che diversamente dall'immunità sistemica, dove una singola immunizzazione con il virus rMVA è in grado di indurre linfociti T CD8+ ad alta avidità nella milza, l'induzione di un'immunità mucosale richiede protocolli di immunizzazione mirati a questo fine.

Nell'ambito dell'impiego sperimentale dei vettori virali come possibile strategia vaccinale contro il virus dell'HIV viene considerato anche il virus influenzale. Uno dei lavori rappresentativi, considerata la capacità che ha tale virus di infettare i tessuti mucosali, descrive l'immunizzazione nel modello murino mediante protocollo "prime-boost" con un virus influenzale ricombinante (prime) che esprime il noto epitopo CTL "P18IIIB", derivante dal loop V3 della proteina Env di HIV-1IIIB, e un virus Vaccinia ricombinante (MVA) (boost), esprimente l'intera proteina Env di HIV-1. La comparazione della risposta immunitaria cellulare specifica per l'antigene estraneo indotta da questi vettori somministrati nei topi per via sistemica o mucosale ha messo in evidenza che il virus influenzale e MVA possono attivare una risposta immunitaria cellulare specifica rilevabile nei linfonodi drenanti il tratto genito-rettale (GRLNs) dei topi e nella milza, allorchè i

vettori siano somministrati rispettivamente per via intranasale/intraperitoneale oppure intranasale/intranasale [Gherardi MM *et al.* 2003].

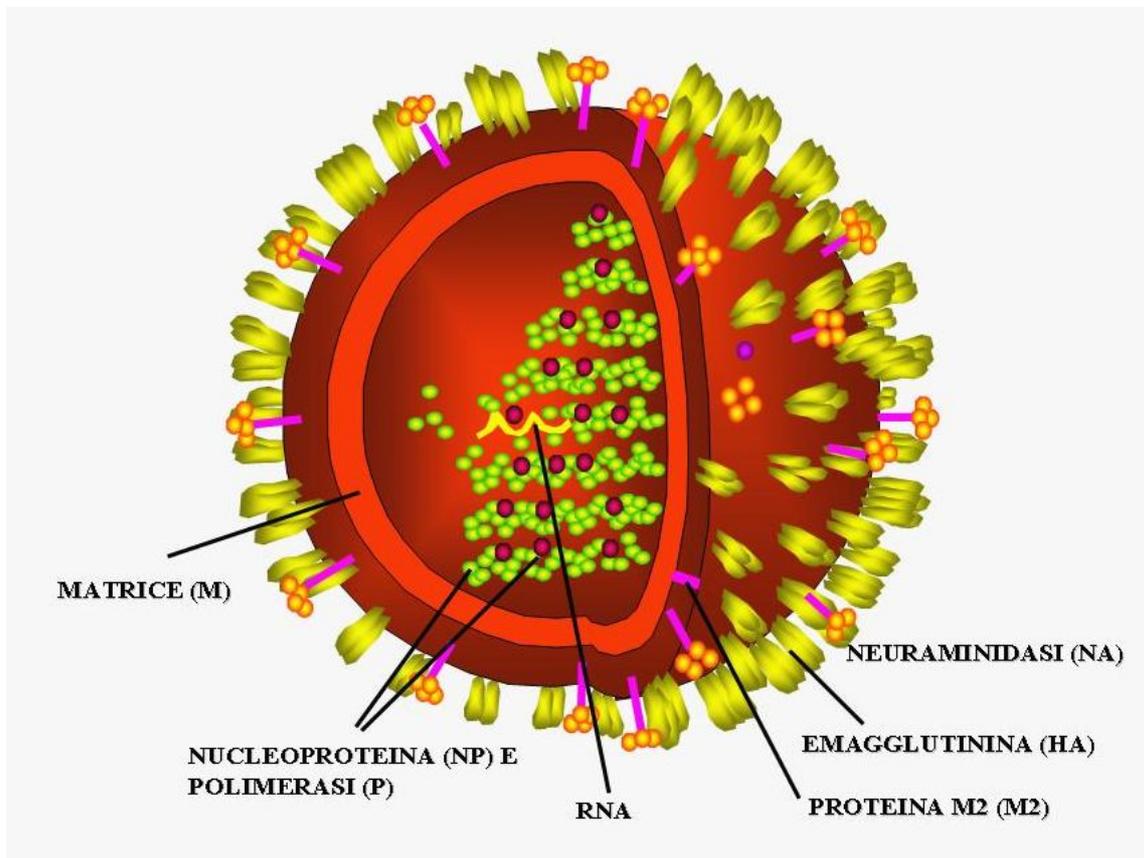
## **2.5 VIRUS INFLUENZALI RICOMBINANTI QUALI VETTORI DI ANTIGENI PER IMMUNIZZAZIONE**

Gli studi di "Reverse Genetics" applicati al virus dell'Influenza hanno inizio nel 1989 nel Laboratorio di P. Palese, Mount Sinai, School of Medicine, New York con la costruzione di un virus influenzale ricombinante contenente il gene reporter chloramphenicol-acetyltransferase (CAT) fiancheggiato dalle estremità regolative del gene NS [Luytjes W *et al.* 1989].

In aggiunta ad una prima raccolta di importanti informazioni riguardanti le proprietà biologiche del virus dell'Influenza, mediante l'analisi della relazione tra la struttura e la funzione dei vari prodotti virali, questo metodo di studio, ed i suoi miglioramenti metodologici che sono seguiti, ha permesso di individuare alcuni geni virali capaci di tollerare modificazioni genetiche di tipo strutturale e funzionale senza che vi sia la compromissione della replicazione e della formazione di nuove particelle virali (Figura 6). E' stato così possibile generare virus aventi vari difetti funzionali con fenotipo attenuato nella virulenza. Alcune di queste strategie di attenuazione sono oggi ritenute di grande utilità per generare ceppi vaccinali nei riguardi di virus aviari altamente patogeni [Steel J *et al.* 2009]. Altri studi hanno permesso di individuare possibili modificazioni a carico di alcuni geni in grado di sopportare l'inserimento o la sostituzione di sequenze genetiche codificanti prodotti di varie dimensioni ed estranei al virus dell'Influenza [Castrucci MR *et al.* 1992; Castrucci MR & Kawaoka Y 1993; Garcia-Sastre A *et al.* 1994; Palese P *et al.* 1997; Staczek J *et al.* 1998]. L'applicazione di tali strategie hanno poi consentito in definitiva l'avvio di una serie di studi relativi al possibile impiego sperimentale di questi virus quali vettori di antigeni per l'immunizzazione in relazione a diverse patologie infettive e tumorali.

I virus influenzali attenuati, quali i "cold-adapted", impiegati negli USA per la vaccinazione ordinaria dell'Influenza, e i virus geneticamente modificati che includono mutazioni di attenuazione della virulenza, potrebbero costituire dei potenziali candidati quali vettori di antigeni HIV-1. Essi, infatti, hanno delle caratteristiche fondamentali per questo scopo: hanno un genoma ad RNA, pertanto non si corre il rischio di un'integrazione nel genoma cellulare, eliminando così possibili problemi di oncogenesi legati ai vettori; esistono svariati sottotipi di Influenza e ciò offre un'ampia diversità di varianti antigeniche non suscettibili a neutralizzazione da parte dell'immunità preesistente nella popolazione naturalmente immune; hanno, inoltre, la capacità di indurre una risposta immunitaria mucosale se somministrati per via intranasale, la loro via naturale di infezione (Tabella 1).

## INFLUENZA VIRUS



**Figura 6** I virus influenzali sono ad RNA segmentato, monocatenario a polarità negativa; appartengono alla Famiglia degli *Orthomyxoviridae* e sono in grado di infettare le mucose del tratto respiratorio superiore dell'uomo e di alcune specie animali. I virus di Tipo A e di Tipo B hanno un genoma costituito da 8 segmenti di RNA virale. Nell'envelope sono inserite la proteina integrale di membrana M2 con funzione di canale ionico e due glicoproteine, l'emagglutinina (HA) e la neuraminidasi (NA), che, oltre ad avere un importante ruolo nel ciclo replicativo virale, costituiscono anche i principali antigeni contro cui è indirizzata la risposta anticorpale protettiva dell'organismo infettato. All'interno dell'involucro lipoproteico si trova il nucleocapside. La nucleoproteina (NP) si lega all'RNA ed entrambi si associano al complesso delle polimerasi PB1, PB2 e PA.

## **PROPRIETÀ DEI VIRUS INFLUENZALI RICOMBINANTI**

- ✓ Generazione di virus geneticamente stabili
- ✓ Virus a RNA che non si integra nel genoma cellulare
- ✓ Forte capacità di induzione di linfociti T e B specifici per l'antigene estraneo
- ✓ Possibile utilizzo di varianti antigeniche distinte non suscettibili a neutralizzazione da parte dell'immunità preesistente nella popolazione
- ✓ Utilizzo di virus ricombinanti vivi attenuati, virus inattivati o prodotti immunogenici da essi derivati

***Tabella 1***

Tuttavia, un certo grado di conservazione filogenetica dei geni interni del virus può costituire un limite al suo utilizzo come vettore.

Nella Tabella 2 sono riportati alcuni esempi di antigeni estranei veicolati da virus influenzali ricombinanti e relative strategie di inserimento. Uno dei primi casi in cui il virus influenzale è stato impiegato come ricombinante a scopo di vaccino sperimentale è stato nei confronti della Malaria. Epitopi specifici per i linfociti B e T della proteina circumsporozoite (CS) del Plasmodio sono stati inseriti, mediante “Reverse Genetics”, all’interno del segmento genomico dell’emagglutinina (HA) del virus influenzale, e nei topi immunizzati con tale virus ricombinante ciò ha determinato lo sviluppo di una risposta immunitaria, mediata dai linfociti T CD8+, specifica nei confronti del Plasmodium, ulteriormente aumentata nei protocolli di “prime-boost” [Li S *et al.* 1993b; Murata K *et al.* 1996; Bruna-Romero O *et al.* 2001; Gonzalez-Aseguinolaza G *et al.* 2003].

Nel nostro Laboratorio sono stati generati principalmente virus influenzali ricombinanti, impiegati come vettori, mediante inserimento di brevi sequenze oligopeptidiche nella regione gambo dell’NA virale. In tal modo si è potuto veicolare determinanti ben caratterizzati di antigeni modello, ottenendo virus ricombinanti finalizzati allo studio della risposta immune valutata nel corso di infezioni respiratorie murine. In particolare, virus esprimenti epitopi immunodominanti derivati dalla nucleoproteina del virus della Coriomeningite Linfocitaria Murina (WSN/LCMV), o della proteina p56 di  $\gamma$ -herpesvirus-68 (WSN/HV-56), o le sequenze degli epitopi immunodominanti, riconosciute da molecole MHC di classe I e II, dell’ovalbumina di pollo (WSN/OVAI e WSN/OVAII), sono alcuni esempi di virus ricombinanti generati in tal senso [Castrucci MR *et al.* 1992, 1994; Stevenson PG *et al.* 1999; Topham DJ *et al.* 2001; Garulli B *et al.* 2004; Chapman TJ *et al.* 2005; Garulli B *et al.* 2008]. L’utilizzo di tali virus, unitamente all’impiego di topi transgenici aventi i linfociti T con uno specifico recettore (TCR) in grado di legare i complessi di questi peptidi con le rispettive molecole MHC, hanno consentito un’agevole analisi di alcune importanti funzioni effettrici di linfociti specifici per l’antigene rilevate nel corso di infezioni sperimentali.

Diversi studi sono stati condotti al fine di indagare sulla capacità del virus influenzale di esprimere proteine antigeniche estranee derivanti dal virus HIV, ed altresì sul traffico e la localizzazione nei vari siti mucosali e sistemici dei linfociti stimolati in seguito ad un’immunizzazione [Li S *et al.* 1993a; Muster T *et al.* 1995; Ferko B *et al.* 1998, 2001; Gherardi MM *et al.* 2003; Nakaya Y *et al.* 2003]. Uno dei primi studi condotti sui virus influenzali come possibili immunogeni nei confronti del virus HIV riguarda la costruzione di un virus ricombinante esprime un epitopo immunogenico di HIV derivante dal “loop” V3 della proteina gp120 (IHIGPGRIFYFT) di HIV-1, all’interno dell’HA di un virus influenzale [Li S *et al.* 1993a]. L’obiettivo di questo studio è stato volto ad indagare sull’antigenicità e l’immunogenicità del virus influenzale ricombinante.

## VETTORI VIRALI INFLUENZALI

**HA:** Antigenic site B of H3N2 HA in H1N1 HA (Li S *et al.* 1992)

V3 loop of HIV-1 gp120 protein (Li S *et al.* 1993)

ELDKWA epitope from HIV-1 gp41 (Muster *et al.* 1994)

CD8+ T cell epitope from the circumsporozoite (CS) protein of *Plasmodium yoelii* (Li S *et al.* 1993; Murata K *et al.* 1996)

B-cell epitope from the outer membrane protein F of *Pseudomonas aeruginosa* (Staczeck J *et al.* 1998)

Large domains of the *Bacillus anthracis* (Li ZN *et al.* 2005)

**NA:** CD8+ T cell epitope from NP of LCMV (Castrucci MR *et al.* 1994)

CD8+ T cell epitope from OVA (SIINFEKL) (Topham DJ *et al.* 2001)

CD8+ T cell epitope from p56 of  $\gamma$ -herpesvirus-68 (Stevenson PG *et al.* 1999)

**NS1:** 137 C-terminal aa residues of HIV-1 Nef protein ( Ferko B *et al.* 2001)

Esat-6 protein of Mycobacterium Tuberculosis (Sereinig S *et al.* 2006)

**Tabella 2** Elenco esemplificativo di alcuni antigeni estranei veicolati da virus influenzali ricombinanti.

Testato in un modello murino tale virus è stato in grado di indurre una risposta immunitaria umorale (rilevata nei sieri dei topi infettati) e cellulare (rilevata nella milza) specifica nei confronti della regione proteica di HIV. Tale risultato dimostra che il virus influenzale ricombinante può essere utilizzato come vettore di espressione per indurre una risposta immunitaria mediata dai linfociti T e B contro altri agenti patogeni e, in particolare, HIV. In uno studio condotto alla fine degli anni '90 si è indagato sulla capacità di un virus influenzale ricombinante somministrato per via intranasale di indurre una risposta mucosale anche nelle mucose del tratto genitale. Il virus influenzale ricombinante, esprime un determinante antigenico della proteina gp141 (ELDKWA) all'interno dell'HA, in grado di replicare nel tratto respiratorio dei topi ma non nei polmoni, ha indotto anticorpi specifici per la proteina di HIV nel siero e nella mucosa del tratto genitale. Inoltre linfociti B secernenti anticorpi specifici per ELDKWA sono stati rilevati nei polmoni, nella milza e nei tratti urogenitali [Ferko B *et al.* 1998]. Questi risultati sono a riprova del fatto che i virus influenzali ricombinanti sono in grado di indurre un'immunità specifica nei confronti del virus HIV-1 a livello delle membrane mucosali. In uno studio condotto successivamente dagli stessi autori è stato costruito un virus influenzale ricombinante iperattenuato, esprime all'interno del gene non strutturale NS1, debole di una regione codificante circa 150 aminoacidi, una porzione della proteina Nef (137 aminoacidi) di HIV-1 [Ferko B *et al.* 2001]. Tale virus H1N1/Nef, non è in grado di replicare *in vivo* nei topi infettati, tuttavia, risulta capace di indurre una risposta CTL Nef-specifica sia nei linfonodi drenanti il tratto respiratorio dei topi (MLN) che nella milza, in seguito ad una singola somministrazione del virus per via intranasale. Una seconda infezione di questi animali con un differente sottotipo di virus influenzale ricombinante H3N2/Nef risulta in un tipico profilo di risposta CTL secondaria, specifica sia per gli epitopi virali conservati che per gli epitopi della proteina Nef.

La possibilità di indurre uno stato di immunità umorale e cellulare a lungo termine nel tratto genitale e intestinale appare essenziale ai fini di una profilassi immunitaria protettiva nei riguardi di un'infezione naturale da HIV. I risultati sopra richiamati rafforzano l'idea di considerare i virus influenzali ricombinanti tra i possibili vettori ed immunogeni sperimentali utili negli studi relativi allo sviluppo di vaccini contro le infezioni da HIV.

Alla luce dei dati che indicano l'importante ruolo protettivo svolto da specifici linfociti T della memoria nelle mucose genitali durante le fasi precoci dell'infezione, e che precedono la disseminazione del virus HIV nei tessuti linfoidi locali e sistemici, appare evidente che l'induzione di una forte immunità mucosale costituisce un requisito fondamentale nella speranza di sviluppare un vaccino contro il virus HIV [Lehener T *et al.* 1996; Belyakov IM *et al.* 1998; Lehener T *et al.* 1999]. L'abilità del virus influenzale di indurre un'efficace immunità mucosale costituisce uno dei

possibili vantaggi a favore dell'impiego di tale virus come vettore di antigeni in una strategia vaccinale nei riguardi di HIV.

Sulle basi di queste osservazioni, gli studi condotti nel nostro Laboratorio sono stati diretti a valutare l'immunogenicità conseguente l'infezione con virus influenzali di una via alternativa di infezione, ovvero la mucosa vaginale di topi precedentemente trattati con progesterone. I risultati ottenuti indicano che è possibile indurre un'infezione produttiva della mucosa genitale con il virus dell'Influenza e rilevare conseguentemente una risposta immune specifica sia mucosale che sistemica [Garulli B *et al.* 2004].

## **2.6 IMMUNOGENICITA' DEL VIRUS DELL'INFLUENZA RILEVATA NEL CORSO DELL'INFEZIONE VAGINALE DI TOPI**

Sebbene l'infezione vaginale con il virus dell'Influenza sia di scarso rilievo fisiologico, l'analisi del conseguente stato di immunità nei riguardi di virus influenzali di differente sottotipo antigenico, definita "immunità eterosubtipica", costituisce una proficua strategia di valutazione delle proprietà immunogeniche associate all'infezione delle mucose genitali con il virus influenzale. Diversi studi hanno dimostrato l'importante ruolo svolto dai CTL cross-reattivi nella protezione da virus eterosubtipici [Yewdell JW *et al.* 1985; Taylor PM & Askonas BA 1986; Liang S *et al.* 1994; Epstein SL *et al.* 1998; Nguyen HH *et al.* 1999]. Inoltre, studi condotti sui linfociti B hanno dimostrato che anche gli anticorpi non neutralizzanti cross-protettivi sono coinvolti nell'immunità verso virus eterosubtipici [Nguyen HH *et al.* 2001; Tumpey TM *et al.* 2001]. In particolare, è stato osservato che i topi ai quali sono stati eliminati i linfociti B in circolo in seguito al trattamento con un anticorpo specifico per questa sottopopolazione linfocitaria non sono in grado di sviluppare un'immunità eterosubtipica nei confronti di un'infezione letale con il virus dell'Influenza A. Gli anticorpi cross-reattivi nei topi immunizzati sono, dunque, in grado di limitare l'infezione prodotta da un differente sottotipo antigenico.

Al fine di analizzare in maggior dettaglio l'immunogenicità ed il grado di risposta immune protettiva inducibile mediante immunizzazione per via vaginale con il virus dell'Influenza è stato condotto nel nostro Laboratorio uno studio fondato su un'analisi comparativa della risposta immune e dell'efficacia protettiva conseguente l'immunizzazione di topi effettuata per via vaginale rispetto alla classica via respiratoria di immunizzazione [Garulli B *et al.* 2007]. A questo scopo, topi BALB/c immunizzati con il virus influenzale X-31 (H3N2) attraverso le due distinte vie di infezione sono stati sottoposti ad infezione secondaria con dose letale di un virus influenzale di diverso sottotipo antigenico, A/WSN/33/ (H1N1) somministrato per via intranasale. Si è potuto così determinare che l'attività citotossica rilevata mediante Saggio del Cromo dei CTL specifici per

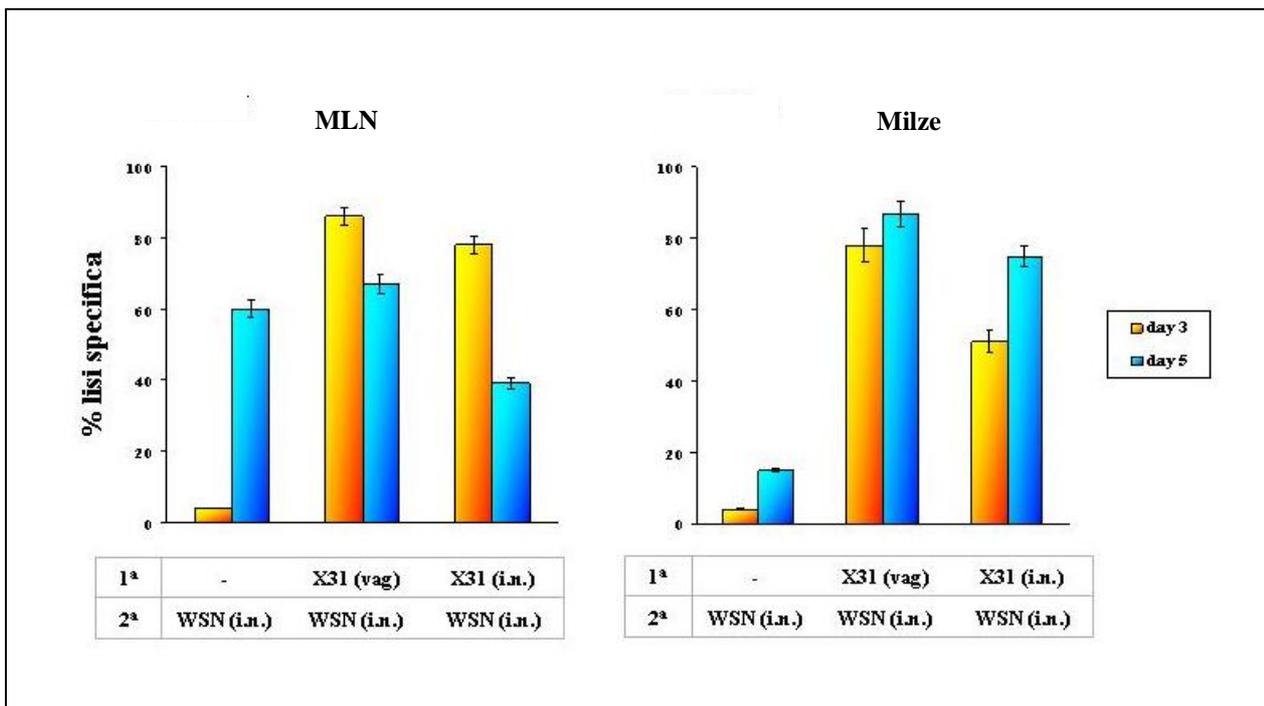
l'epitopo NPI47 nei linfonodi drenanti del mediastino (MLN) e nelle milze dei topi di controllo in seguito ad infezione primaria con il virus WSN appare appena evidente al terzo giorno dall'infezione e aumenta parzialmente al quinto giorno (Figura 7). Diversamente, i topi immunizzati quattro mesi prima con X-31 e nuovamente infettati con WSN per via intranasale mostrano un'attività citotossica dei CTL derivanti dagli MLN e dalle milze che è già al suo picco massimo sin dal terzo giorno successivo all'infezione. Il grado di attività citotossica e la cinetica di comparsa appare del tutto simile nei due gruppi di topi immunizzati attraverso la via intranasale o vaginale, indicando che quest'ultima costituisce un sito induttivo di CTL molto efficiente (Figura 7).

Il rilevamento della risposta immune umorale è stata condotta dopo un periodo relativamente lungo di tre mesi dall'infezione con il virus dell'Influenza, somministrato per via intranasale o vaginale, per meglio determinare livelli stabili di anticorpi presenti nel siero e sulle mucose dei topi trattati (Figura 8). Il livello di anticorpi IgG rilevati nel siero, nei lavaggi broncheo-alveolari (BAL) e nei lavaggi vaginali evidenzia che l'immunizzazione attraverso la via intranasale risulta più efficace dell'immunizzazione vaginale nell'indurre sia le IgG che le IgA.

Gli studi di protezione da un'infezione secondaria con una dose letale di virus offrono una sintesi dell'efficacia delle differenti componenti dell'immunità specifica indotta con la vaccinazione, valutata attraverso un'azione congiunta di contenimento e recupero dello stato di malattia. Come si osserva in Figura 9A, l'infezione secondaria con 100 MLD<sub>50</sub> di virus omologo è ben controllata da anticorpi neutralizzanti indotti con l'immunizzazione intranasale o vaginale nei due gruppi di topi. Un risultato analogo si osserva nell'infezione secondaria condotta con 10 MLD<sub>50</sub> di virus eterologo A/WSN/33/ (H1N1) (Figura 9B). Viceversa, l'infezione respiratoria con una dose di 20 MLD<sub>50</sub> di virus eterologo è associato ad una ridotta sopravvivenza dei topi immunizzati per via vaginale rispetto a quelli immunizzati per via intranasale (Figura 9B).

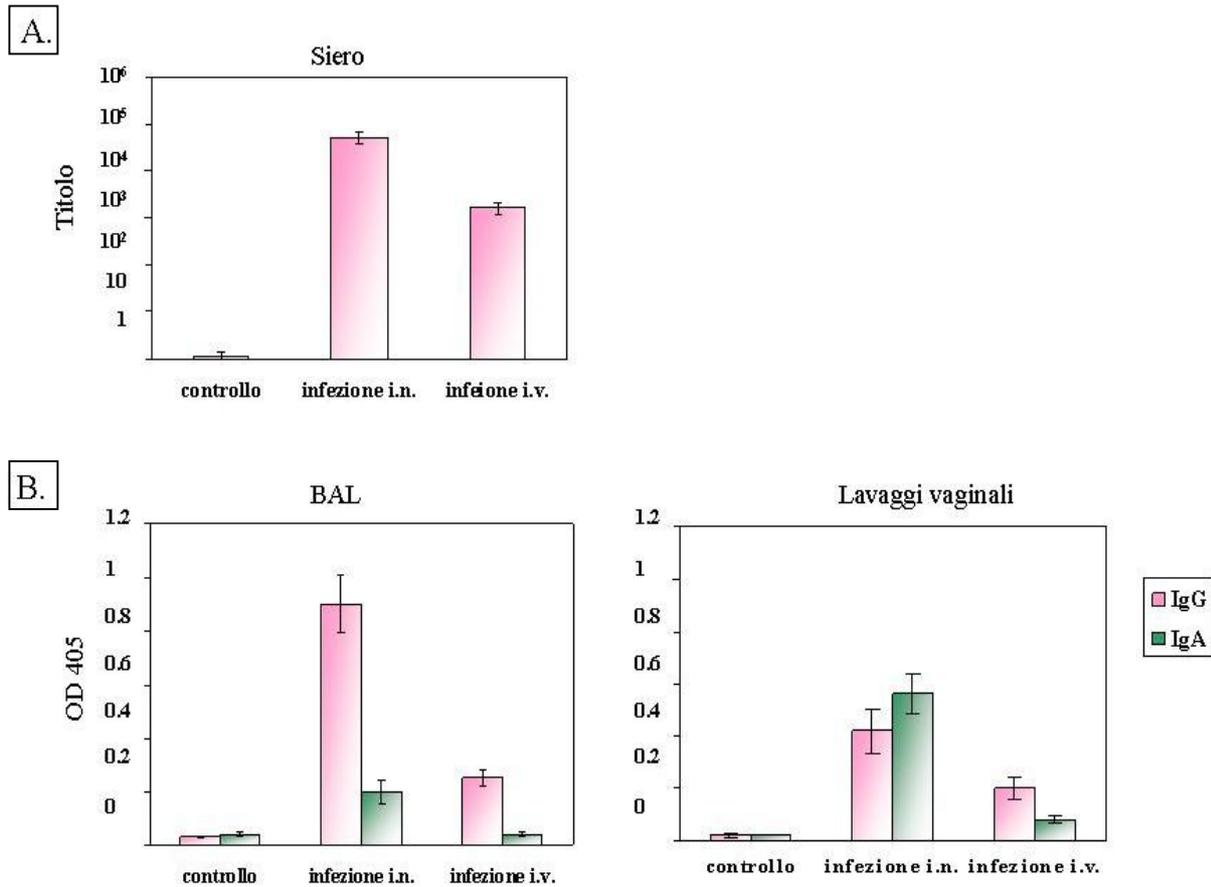
Attraverso questo studio è stato possibile rilevare che l'immunizzazione praticata attraverso la via genitale risulta qualitativamente e quantitativamente comparabile con la via intranasale nell'indurre effettori CTL e linfociti T della memoria a lungo termine, rilevati nei rispettivi linfonodi locali e nella milza. Tali cellule della memoria sono in grado di svolgere una funzione protettiva e sono inoltre richiamate in siti mucosali distali in seguito ad un'infezione secondaria con un virus influenzale avente in comune gli specifici determinanti antigenici. Sebbene l'infezione vaginale, rispetto all'infezione intranasale, induca un livello di anticorpi ed una percentuale di sopravvivenza dei topi leggermente inferiore, l'immunogenicità dei virus influenzali rilevata a seguito dell'infezione vaginale appare tuttavia significativamente rilevante ed in grado di indurre immunità protettiva nei riguardi di un'infezione secondaria con un virus omologo o di differente sottotipo antigenico.

## IMMUNIZZAZIONE INTRANASALE E VAGINALE A CONFRONTO: CTL DOPO INFEZIONE SECONDARIA



**Figura 7** Attività di lisi specifica dei CTL negli MLN e nelle milze dopo l'infezione secondaria con un virus influenzale A eterosubtipico. Quattro mesi dopo l'immunizzazione ricevuta per via vaginale o intranasale con il virus X-31 (H3N2), i topi sono stati infettati con il virus A/WSN/33/ (H1N1). Il terzo e quinto giorno dopo l'infezione i topi sono stati sacrificati ed è stato condotto il saggio di rilascio del <sup>51</sup>Cr al fine di determinare l'attività citotossica dei CTL specifici per l'epitopo NP147 nei linfonodi drenanti del mediastino (MLN) e nelle milze.

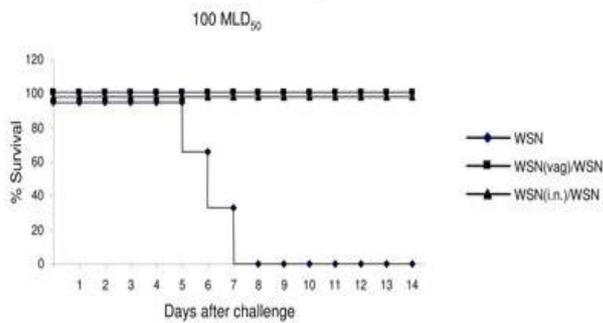
## IMMUNIZZAZIONE INTRANASALE E VAGINALE A CONFRONTO: RISPOSTA IMMUNE UMORALE



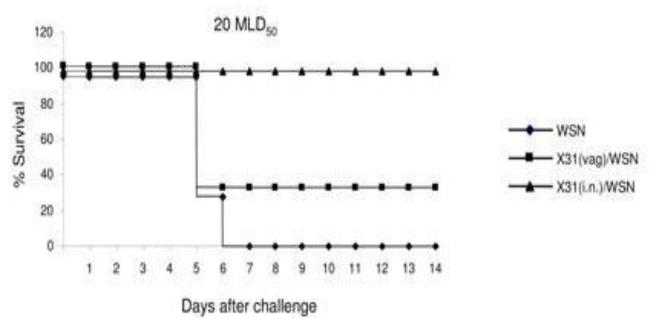
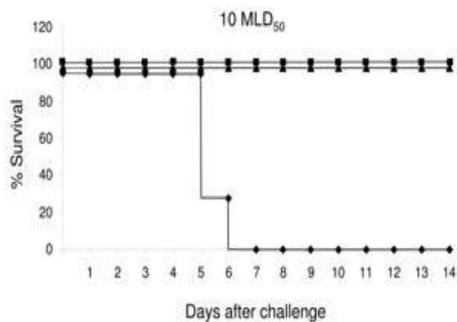
**Figura 8** I sieri, i lavaggi broncheo-alveolari (BAL) e i lavaggi vaginali di topi infettati attraverso la via vaginale o intranasale con il virus X-31 (H3N2) sono stati raccolti dopo 3 mesi e analizzati per il rilevamento di anticorpi IgG e IgA mediante saggio ELISA.

## IMMUNIZZAZIONE INTRANASALE E VAGINALE A CONFRONTO: PROTEZIONE DA INFEZIONE CON DOSI LETALI DI VIRUS INFLUENZALI

### A. Homologous challenge



### B. Heterologous challenge



**Figura 9** Sopravvivenza dei topi BALB/c immunizzati per via vaginale o intranasale con il virus WSN (H1N1) (A) o X-31 (H3N2) (B) e tre mesi dopo infettati per via intranasale con 100 MLD<sub>50</sub> del virus omologo WSN (A) oppure con 10 o 20 MLD<sub>50</sub> di virus eterologo WSN (B).

# **SCOPO DEL LAVORO**

La speranza di realizzare un possibile vaccino contro le infezioni da HIV-1 sembra essere dettata dall'efficacia protettiva che una popolazione residente di linfociti T della memoria immunospecifici, indotti con la vaccinazione nelle mucose genitali, potrebbe assumere nel controllo delle prime fasi dell'infezione da HIV-1 ed eventualmente nel suo decorso successivo. Alcuni concetti fondamentali nella definizione di un vaccino candidato ideale contro le infezioni da HIV-1, quali la composizione antigenica più appropriata o le modalità di somministrazione che risultino in un'ottimale induzione e localizzazione tissutale di cellule effettrici della memoria, non sembrano ancora raccogliere un consenso unanime nella comunità scientifica. Tuttavia l'assoluta esigenza di sviluppare una profilassi vaccinale e/o di immunoterapia nelle infezioni da HIV non può desistere da una continua ricerca di questo obiettivo e di strategie di controllo dell'infezione che possano tradursi in una qualche applicazione in tal senso.

Gli studi intrapresi a questo scopo nel nostro Laboratorio perseguono tre linee principali:

1. valutare eventuali possibili utilizzi del virus dell'Influenza quale vettore di antigeni HIV-1, inteso, in particolare, come strumento di ausilio nella sperimentazione di potenziali vaccini candidati contro HIV -1.
2. stabilire la possibilità di un effettivo utilizzo nella profilassi vaccinale verso le infezioni da HIV-1 di virus influenzali ricombinanti esprimenti antigeni HIV-1, in forma di virus vivi attenuati e/o di prodotti inattivati da essi derivati.
3. analizzare le proprietà immunogeniche del virus influenzale associate a strategie innovative di vaccinazione con particolare riferimento all'impiego di virus influenzali ricombinanti in schemi sperimentali di immunizzazione murina attraverso la mucosa vaginale.

Un primo risultato che sembra sostenere la validità e l'interesse degli studi intrapresi risiede nell'aver dimostrato la possibilità di indurre un processo di infezione produttiva a carico della mucosa vaginale di topi con virus dell'Influenza, e l'induzione in tal modo di un conseguente stato di immunità mucosale protettiva rilevabile a lungo termine nei tessuti linfoidei locali e sistemici [Garulli B *et al.* 2004]. Un secondo risultato di rilievo ottenuto nel nostro Laboratorio è relativo all'analisi comparativa dello stato di immunità nei confronti di virus influenzali eterosubtipici e al conseguente grado di protezione eterosubtipica indotto in seguito all'immunizzazione dei topi praticata per via mucosale vaginale rispetto alla via respiratoria, classicamente impiegata con il virus dell'Influenza [Garulli B *et al.* 2007]. Il rilevamento dell'infettività e immunogenicità conseguenti l'infezione delle mucose vaginali con il virus influenzale potrebbe apparire come un fenomeno di scarso rilievo fisiologico. Tuttavia, il confronto effettuato nel contesto di un'immunità verso virus influenzali eterosubtipici, sostenuta sia da anticorpi mucosali cross-reattivi che da CTL, ha consentito una fine caratterizzazione delle proprietà immunogeniche della

mucosa vaginale quale sito induttivo della risposta immune indotta mediante immunizzazione con virus influenzali.

Lo scopo del lavoro qui presentato si focalizza in particolare su una valutazione ulteriore delle potenzialità di utilizzo di virus influenzali ricombinanti in modelli di infezione murina quali vettori di antigeni HIV-1 in relazione alla loro capacità di indurre nella mucosa genitale un'immunità a lungo termine. La proposta nel suo concreto si riferisce alla costruzione di un virus ricombinante dell'Influenza (WSN/CKG) in grado di veicolare antigeni HIV-1 (PCLUS3-P18IIIB-Gag192-208) fusi all'estremità N-terminale dell'HA e alla caratterizzazione della risposta immune verso tali antigeni indotta in seguito ad immunizzazione dei topi attraverso la mucosa vaginale o respiratoria. In considerazione della nuova strategia adottata nel veicolare gli antigeni HIV, è stato ritenuto necessario condurre un'analisi sia della capacità infettiva del virus che della conseguente risposta immune e del grado di protezione inducibile nei riguardi di un'infezione secondaria prodotta con due virus Vaccinia ricombinanti (vPE16 e vDK1) esprimenti rispettivamente le proteine Env e Gag del virus HIV-1. Gli antigeni HIV impiegati nella costruzione del virus WSN/CKG sono stati selezionati in quanto ampiamente caratterizzati e descritti in letteratura, offrendo così un riferimento che faciliti l'interpretazione dei risultati ottenuti, ed anche perché rispondenti a criteri funzionali appropriati al rilevamento della risposta immune.

# **RISULTATI**

#### **4.1 COSTRUZIONE DI UN VIRUS INFLUENZALE RICOMBINANTE CHE ESPRIME UN POLIPEPTOPO CKG**

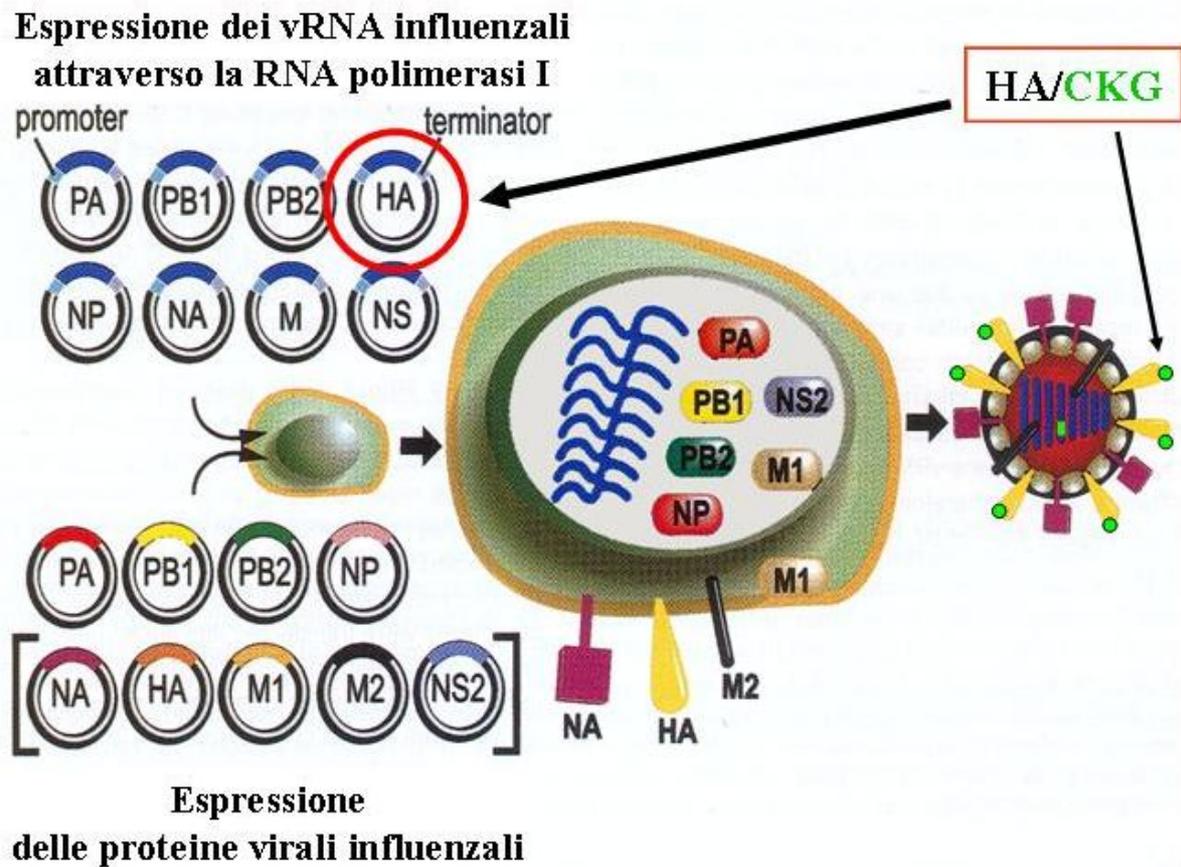
Una serie di studi sviluppati principalmente da alcuni autori dimostra l'efficacia immunogenica e il carattere protettivo della risposta immune indotta nei topi in seguito alla somministrazione per via rettale di un lipopeptide sintetico contenente determinanti antigenici del virus HIV-1. Tale peptide comprende un epitopo multideterminante T helper, denominato PCLUS3, derivante dalla glicoproteina gp120 del virus HIV-1, in grado di indurre una risposta proliferativa nei topi e la produzione di IL-2 nei pazienti HIV positivi, e nella regione C-terminale, il peptide P18 del loop V3 della glicoproteina gp160 di HIV-1 (P18IIIB), che corrisponde al principale determinante neutralizzante di HIV-1IIIB e all'epitopo CTL immunodominante nei topi e negli umani [Takahashi H *et al.* 1988; Clerici M *et al.* 1989; Berzofsky JA *et al.* 1991; Shirai *et al.* 1992; Ahlers JD *et al.* 1993, 1996].

Alla luce di tali studi precedentemente condotti in protocolli vaccinali nei topi, tramite la metodica di "Reverse Genetics" (Figura 10), è stato generato un virus influenzale ricombinante che veicola la sequenza che codifica il dominio PCLUS3-P18IIIB, insieme ad un epitopo CTL derivato dalla proteina Gag di HIV-1, inseriti nella proteina emagglutinina (HA) del virus influenzale A/WSN/33. In particolare, questo polipeptide antigenico, denominato CKG, è stato inserito tra il peptide segnale (PS) dell'HA e il residuo di acido aspartico presente nella regione N-terminale della proteina HA matura, che segue il clivaggio da parte di peptidasi nel reticolo endoplasmatico, come precedentemente descritto in Li ZN *et al.* [Li ZN *et al.* 2005]. La sequenza inserita è seguita da una sequenza spaziatrice (GGGD) al fine di ridurre l'ingombro sterico e facilitare il folding proprio dell'HA virale e del polipeptide inserito come dominio indipendente.

La Figura 11A mostra una rappresentazione schematica del costrutto chimerico HA/CKG impiegato nella metodica di Reverse Genetics, sviluppata da Neumann G e dai suoi collaboratori, per generare il virus influenzale ricombinante, denominato WSN/CKG [Neumann G *et al.* 1999]. Tale metodica si basa sulla cotrasfezione di plasmidi esprimenti i segmenti genomici virali ad RNA dell'Influenza, sotto controllo di una sequenza promoter riconosciuta dalla RNA Polimerasi I umana, unitamente a plasmidi di espressione delle proteine virali PB1, PB2, PA e NP (Figura 10).

Il virus WSN/CKG raccolto dal supernatante delle cellule trasfettate è stato purificato per placche mediante 3 passaggi. La sequenza nucleotidica dell'RNA derivato dalla preparazione stock del virus purificato ha confermato l'inserzione "in frame" di 201 nucleotidi che codificano, nel complesso, la regione CKG e il suo braccio spaziatore.

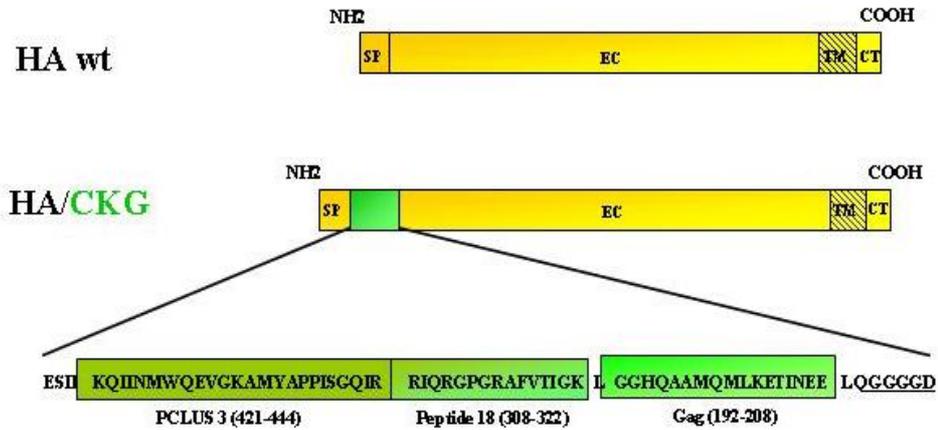
## GENERAZIONE DI VIRUS INFLUENZALI RICOMBINANTI



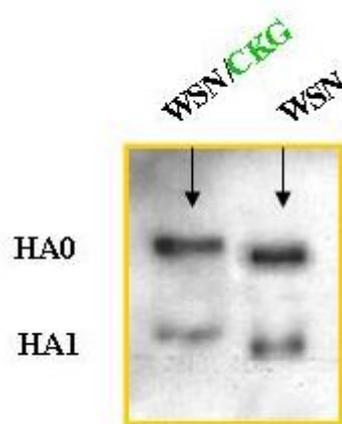
*Figura 10* Rappresentazione schematica della metodologia sviluppata da Neumann et al 1999 per la generazione di virus influenzali ricombinanti mediante trasfezione in cellule di plasmidi esprimenti le proteine virali e segmenti genomici ad RNA. Tale metodica è stata impiegata nel nostro Laboratorio per la costruzione del virus influenzale WSN/CKG.

## PROTEINA CHIMERA HA/CKG

A.



B.



**Figura 11** (A) Rappresentazione schematica della proteina chimera HA/CKG. Il polipeptido CKG, inserito tra il peptide segnale (PS) dell'HA e l'estremità N-terminale della proteina che segue il clivaggio del peptide segnale, contiene la sequenza codificante il peptide cluster PCLUS3, corrispondente al peptide T-helper multideterminante della glicoproteina Env dell'envelope di HIV-1, il peptide 18 della regione loop V3 della glicoproteina gp160 di HIV-1, P18IIIIB, corrispondente al principale determinante antigenico neutralizzante del ceppo IIB di HIV-1 ed epitopo CTL riconosciuto nell'ambito di alcune classi di molecole MHC, e, infine, una sequenza derivata dalla proteina Gag di HIV-1 costituente un secondo epitopo CTL riconosciuto da molecole H-2<sup>d</sup>.

(B) Rilevamento mediante Western Blot dei differenti patterns di migrazione di HA0 e HA1 dei virus WSN e WSN/CKG.

Per verificare il mantenimento del polipeptide CKG nella struttura del virione WSN/CKG, la forma parentale (wt) del virus WSN e la forma ricombinante WSN/CKG sono state purificate, le proteine virali sono state separate mediante SDS-PAGE al 12% e le HA dei due virus caratterizzate attraverso immunoblotting con una miscela di anticorpi monoclonali anti-HA.

Come si può osservare dalla Figura 11B, i patterns di migrazione di HA0 e HA1 del virus WSN/CKG presentano un peso molecolare maggiore rispetto a WSN, così come atteso per la presenza di 67 aminoacidi (aa) aggiuntivi del polipeptide CKG.

Il virus ricombinante WSN/CKG è in grado di replicare in cellule MDCK similmente al virus parentale WSN. La cinetica di replicazione dei due virus è stata valutata rilevando il numero di PFU presenti in aliquote prelevate a tempi differenti dopo l'infezione di cellule MDCK ad una determinata molteplicità d'infezione (MOI).

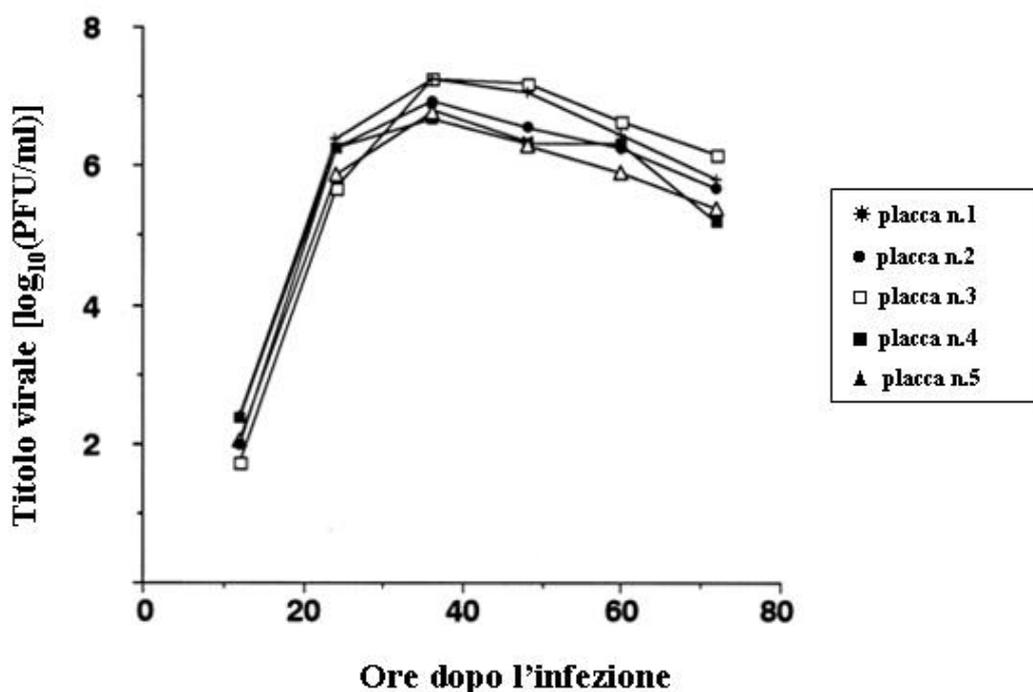
I titoli di WSN/CKG mostrano un picco di  $3 \times 10^7$  PFU/ml al giorno 2 dopo l'infezione, per WSN il picco ha valori più elevati di 1log rispetto al ricombinante.

La Figura 12 mostra la cinetica di crescita di preparazioni di stock virali derivate da differenti placche di virus WSN/CKG. Tutte mostrano una cinetica di crescita sulle MDCK comparabile, suggerendo che l'inserzione di 67 aa non comporta la compromissione della funzione di attacco al recettore e fusogena dell'HA, dunque, dell'abilità del virus ricombinante di replicare in cellule di mammifero, quali le MDCK.

#### **4.2 EFFICACIA DELLA REPLICAZIONE DEL VIRUS WSN/CKG NEI TOPI**

Per valutare il grado di patogenicità del virus ricombinante WSN/CKG nei topi, è stata inizialmente determinata la dose letale minima del 50% nei topi (MLD<sub>50</sub>) infettati per via intranasale con il virus WSN/CKG, in comparazione con quella di WSN. Come si può vedere dalla Tabella 3, non ci sono topi morti tra quelli infettati con il virus WSN/CKG fino ad una dose virale corrispondente a  $10^6$  PFU, mentre l'MLD<sub>50</sub> del virus parentale WSN è  $10^3$  PFU. Successivamente sono stati esaminati i titoli virali del virus WSN/CKG dopo l'infezione *in vivo*, nei turbinati nasali e nei tratti respiratori di topi femmine BALB/c. Per meglio determinare la carica virale nei turbinati nasali, i topi sono stati infettati per via intranasale con  $10^6$  PFU di WSN/CKG e  $10^3$  PFU di WSN. La carica virale misurata nei polmoni dei topi al giorno 4 dopo l'infezione con il virus WSN/CKG (media dei titoli:  $6.5 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>) risulta più bassa di  $2 \log_{10}$  di quella misurata nei topi infettati con WSN (media dei titoli:  $8.2 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>) (Figura 13A). Nei turbinati nasali, il virus ricombinante WSN/CKG replica a livelli più bassi (media dei titoli:  $4.0 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>) rispetto a WSN (media dei titoli:  $5.5 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>).

## CINETICA DI CRESCITA DEL VIRUS WSN/CKG IN CELLULE MDCK



**Figura 12** Studio dell'andamento di crescita del virus WSN/CKG mediante titolazione su cellule MDCK. Cellule MDCK sono state incubate con preparazioni di virus WSN/CKG derivate da singole placche ad una MOI di 0.01 PFU/ml. A vari intervalli di tempo sono stati raccolti i diversi supernatanti e titolati per determinare il numero di unità formanti placche (PFU/ml).

**MORTALITA' DEI TOPI INFETTATI CON I VIRUS WSN  
E WSN/CKG**

Quantità di virus PFU (log <sub>10</sub> )	WSN- CKG	WSN
1	0	0
2	0	1
3	0	2
4	0	3
5	0	3
6	0	3

***Tabella 3** Determinazione della dose letale minima del 50% (MLD<sub>50</sub>) nei topi infettati con il virus WSN/CKG, in comparazione con quella di WSN. Topi di 6 settimane sono stati anestetizzati e infettati per via intranasale con 50µl di virus a diverse diluizioni (5 topi/diluizione). Quindi è stata monitorata la mortalità per un tempo di 21 giorni.*

Analisi di RT-PCR condotte sull'RNA di polmoni omogeneizzati di topi infettati con entrambi i virus hanno permesso di valutare la stabilità genetica del gene chimerico HA/CKG in seguito al processo di infezione con il virus ricombinante WSN/CKG.

Come si può osservare nella Figura 13B, i prodotti di amplificazione mediante PCR, corrispondenti alla regione N-terminale dell'HA, presentano una dimensione molecolare maggiore nel caso di WSN/CKG indicando che tale virus conserva stabilmente il gene chimerico anche in seguito alla replicazione del virus nei polmoni; il sequenziamento di tale regione, rivela l'assenza di mutazioni nell'inserito CKG.

E' stata inoltre determinata la capacità replicativa dei virus WSN e WSN/CKG in seguito ad infezione per via vaginale in topi femmine BALB/c pre-trattati con progesterone.

Il picco di massima replicazione appare evidente dal giorno 3 al giorno 5 dopo l'infezione e presenta titoli più elevati nel caso di WSN, rispetto al virus ricombinante, così come osservato precedentemente [Garulli B *et al.* 2004]. Il virus WSN/CKG, benché somministrato con un inoculo ad un titolo più elevato di 2 log<sub>10</sub> rispetto a WSN, viene completamente eliminato al giorno 5 dopo l'infezione (Figura 14).

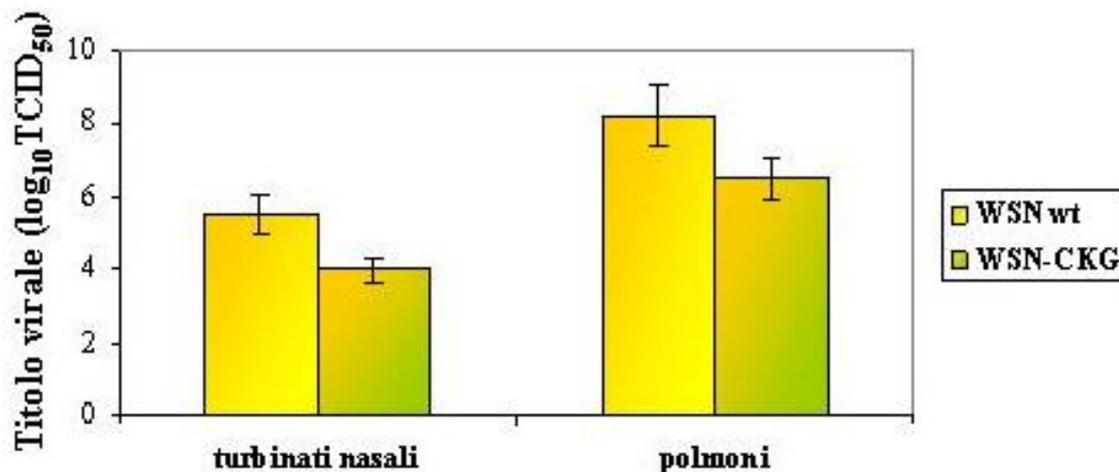
Infine, per determinare se in seguito ad infezione vaginale vi è diffusione e replicazione del virus negli organi riproduttivi interni, la presenza di virus è stata verificata nelle ovaie e negli ovidotti di topi infettati con il virus WSN/CKG mediante saggi di infezione su monostrato di cellule MDCK e con approcci molecolari di amplificazione di sequenze geniche virali tramite PCR. Come si può osservare dalla Figura 15A, nelle ovaie e negli ovidotti dei topi infettati con il virus WSN/CKG, non si rileva alcuna presenza di virus fino a 7 giorni dopo l'infezione. Inoltre, l'analisi RT-PCR condotta sull'RNA totale degli omogenati di ovaie, ovidotti e vagina, raccolti a 4 giorni dall'infezione, ha evidenziato la presenza di virus esclusivamente nella vagina (Figura 15B). E' importante notare che l'assenza di una diffusione del virus negli ovidotti e nelle ovaie è stata osservata altresì in seguito ad infezione dei topi con dosi elevate del virus parentale WSN (dati non riportati).

#### ***4.3 INDUZIONE DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA CELLULARE MUCOSALE E SISTEMICA ATTRAVERSO SINGOLA IMMUNIZZAZIONE DI TOPI CON IL VIRUS WSN/CKG***

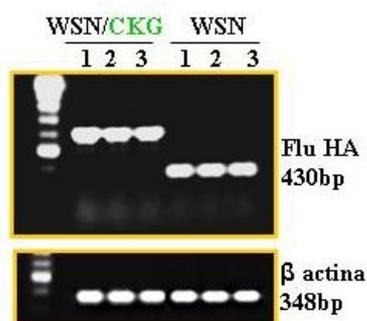
Il rilevamento di una vigorosa risposta immunitaria mucosale e sistemica si correla strettamente con la prevenzione di molte infezioni contratte attraverso i compartimenti mucosali. Il cross-talk immunologico tra i differenti siti mucosali assume un ruolo fondamentale nel conferire uno stato di protezione nei confronti di tali infezioni.

## REPLICAZIONE DEL VIRUS WSN/CKG NEL TRATTO RESPIRATORIO DI TOPI

A.



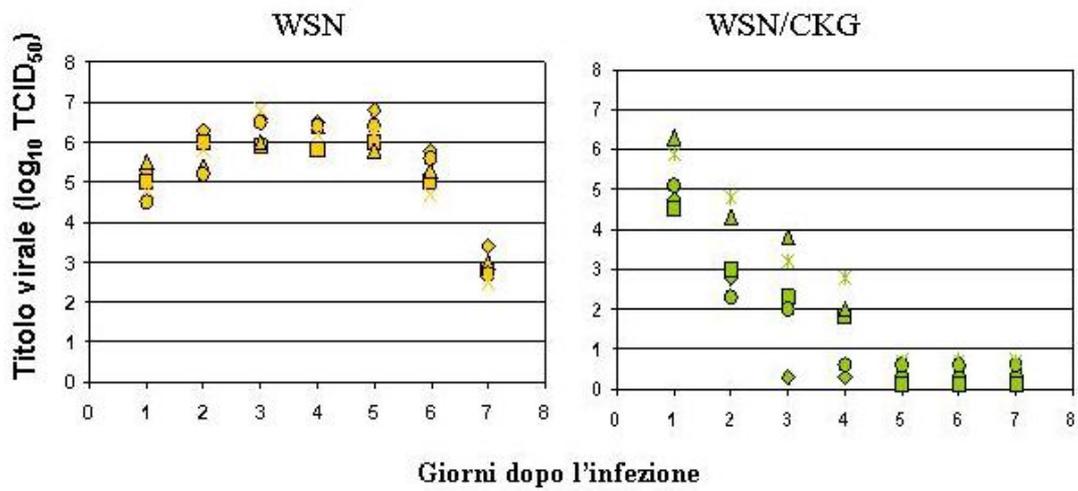
B.



**Figura 13** (A) I topi sono stati infettati per via intranasale con  $10^6$  PFU del virus WSN/CKG e  $10^3$  PFU del virus WSN, 4 giorni dopo sono stati sacrificati e i titoli virali negli omogenati di polmoni e nei turbinati nasali sono stati valutati mediante determinazione della diluizione limite infettante 50% delle colture di cellule MDCK in triplicato (TCID<sub>50</sub>).

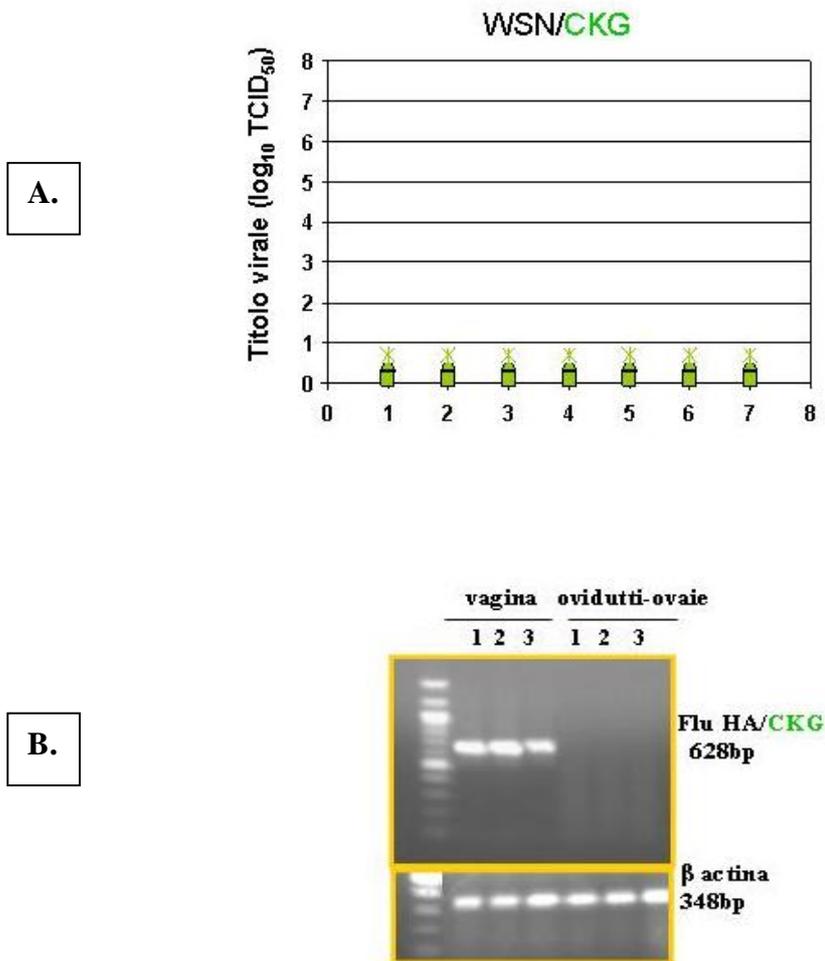
(B) Analisi di RT-PCR condotta sull'RNA estratto da omogenati di polmoni di topi infettati con i virus WSN/CKG e WSN.

## REPLICAZIONE DEI VIRUS WSN E WSN/CKG NEL TRATTO VAGINALE DI TOPI



**Figura 14** Topi femmine BALB/c pre-trattati con progesterone sono stati infettati per via vaginale con i virus WSN/CKG ( $10^6$  PFU/ $10\mu$ l) e WSN ( $10^3$  PFU/ $10\mu$ l) e il titolo virale dei lavaggi vaginali raccolti a diversi tempi dopo l'infezione è stato determinato su cellule MDCK.

## DETERMINAZIONE DELLA PRESENZA DI VIRUS NEGLI OVIDOTTI E NELLE OVAIE IN SEGUITO AD INFEZIONE PER VIA VAGINALE



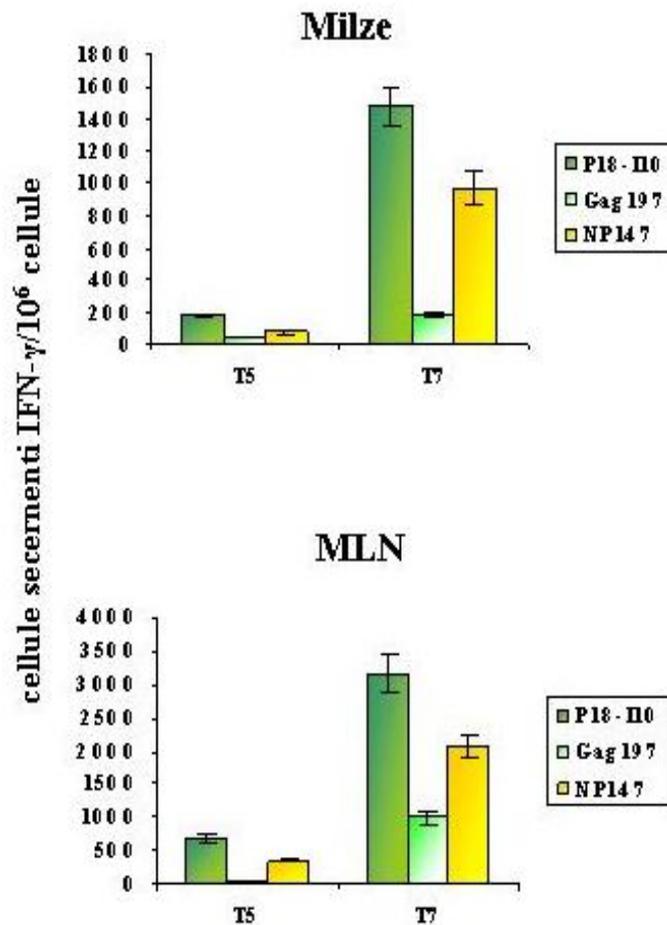
**Figura 15** (A) Topi femmine BALB/c pre-trattati con progesterone sono stati infettati per via vaginale con il virus WSN/CKG ( $10^6$  PFU/10 $\mu$ l) e la presenza di virus negli omogenati di ovidotti ed ovaie a diversi tempi dopo l'infezione è stata determinata su cellule MDCK.

(B) Analisi di RT-PCR condotta sull'RNA totale estratto da tessuto omogenato di vagina, ovidotti ed ovaie omogeneizzati dei topi infettati con il virus WSN/CKG a 4 giorni dall'infezione.

Le mucose del tratto respiratorio rappresentano un sito molto efficace di immunizzazione, in grado di indurre un'immunità specifica a lungo termine anche nel tratto genitale [Muster T *et al.* 1995; Gallichan WS & Rosenthal KL 1996, 1998; Dupuy C *et al.* 1999; Klavinski LS *et al.* 1999; Ferko B *et al.* 2001; Gherardi MM *et al.* 2003]. Poche informazioni si hanno riguardo al traffico di cellule immuno-effettrici rilevabili nelle vie respiratorie in seguito ad un'immunizzazione attraverso la via vaginale.

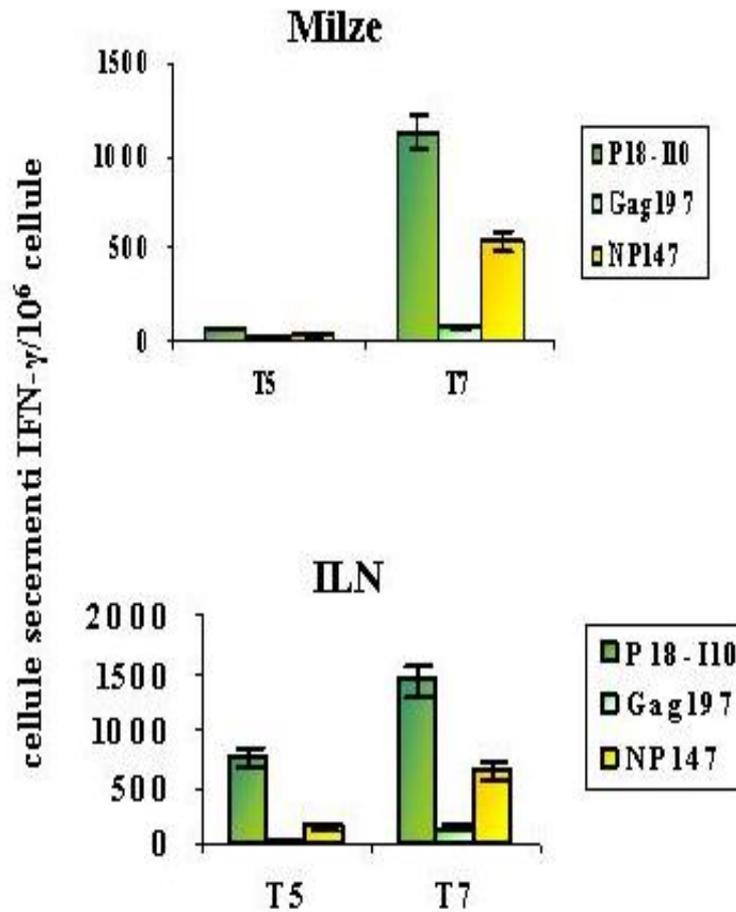
Studi condotti precedentemente, dimostrano che l'immunizzazione per via vaginale con un virus influenzale ricombinante che esprime il peptide 18 del loop V3 della gp160 di HIV-1IIIB nel gambo della neuraminidasi (NA), induce una risposta immunitaria a lungo termine mediata dai linfociti T CD8<sup>+</sup> specifici per l'epitopo P18-I10 molto forte, rilevabile sia nei compartimenti mucosali che sistemici [Garulli B *et al.* 2004]. In seguito ad un'immunizzazione per via vaginale, nelle milze e nei linfonodi drenanti il tratto genito-rettale (ILN) dei topi, vengono prodotti elevati livelli di linfociti T citotossici (CTL) della memoria a lungo termine virus-specifici, come dimostra il rapido richiamo di effettori CTL in seguito alla riesposizione all'antigene. Tuttavia, il meccanismo attraverso il quale la risposta sostenuta da cellule della memoria conferisce protezione nei confronti di un'infezione secondaria con un virus rimane poco chiara. Per esaminare la risposta immunitaria mediata dai linfociti T CD8<sup>+</sup> indotta dagli antigeni HIV-1 trasportati dal virus ricombinante WSN/CKG, topi femmine BALB/c sono stati immunizzati una sola volta per via intranasale o vaginale con 10<sup>6</sup> PFU del virus, in accordo al protocollo di immunizzazione riportato in Materiali e Metodi. I topi sono stati sacrificati 5 e 7 giorni dopo l'infezione e i linfonodi regionali (MLN e ILN) e le milze sono stati raccolti per quantificare il numero di linfociti T CD8<sup>+</sup> specifici per gli epitopi P18-I10 (H-2D<sup>d</sup>) e NP-147 (H-2K<sup>d</sup>). Le determinazioni condotte mediante saggio ELISPOT mostrano che i linfociti derivati dagli MLN dei topi infettati con il virus WSN/CKG per via intranasale hanno dato una risposta IFN- $\gamma$  specifica per gli epitopi P18 e NP rilevabile al giorno 5 dopo l'infezione, rispettivamente 660 e 332 linfociti che rilasciano IFN- $\gamma$ /10<sup>6</sup> cellule, che aumenta al giorno 7, rispettivamente 3168 e 2048 linfociti che rilasciano IFN- $\gamma$ /10<sup>6</sup> cellule (Figura 16). Riguardo alla risposta rilevabile nelle milze, si osserva che il numero di linfociti T CD8<sup>+</sup> antigene-specifici è più basso rispetto agli MLN e al giorno 7 arriva rispettivamente a 1480 SCF/10<sup>6</sup> cellule per P18 e 970 SCF/10<sup>6</sup> cellule per NP147. L'analisi condotta parallelamente sui linfociti degli ILN e delle milze dei topi infettati con il virus WSN/CKG per via vaginale mostra una cinetica della risposta dei linfociti T CD8<sup>+</sup> simile a quella ottenuta nell'infezione intranasale (Figura 17). In particolare, i valori misurati negli ILN al giorno 7 dopo l'infezione sono 1422 SCF/10<sup>6</sup> cellule per P18 e 638 SCF/10<sup>6</sup> cellule per NP147, mentre nelle milze 1125 SCF/10<sup>6</sup> cellule per P18 e 540 SCF/10<sup>6</sup> cellule per NP147.

## RISPOSTA CELLULARE PRIMARIA AL VIRUS WSN/CKG SOMMINISTRATO PER VIA INTRANASALE



**Figura 16** Risposta primaria specifica rilevabile nei linfonodi MLN e nella milza di topi infettati per via intranasale con il virus WSN/CKG. I topi infettati con  $10^6$  PFU del virus WSN/CKG sono stati sacrificati 5 e 7 giorni dopo l'infezione e i linfonodi regionali MLN e le milze sono stati raccolti per saggiare la risposta T CD8+ specifica per gli epitopi P18-II0 (H-2D<sup>d</sup>), Gag 197 (H-2K<sup>d</sup>) e NP-147 (H-2K<sup>d</sup>) mediante saggio ELISPOT.

## RISPOSTA CELLULARE PRIMARIA AL VIRUS WSN/CKG SOMMINISTRATO PER VIA VAGINALE



**Figura 17** Risposta primaria specifica rilevabile nei linfonodi ILN e nella milza di topi infettati per via vaginale con il virus WSN/CKG. I topi infettati con  $10^6$  PFU del virus WSN/CKG sono stati sacrificati 5 e 7 giorni dopo l'infezione e i linfonodi regionali ILN e le milze sono stati raccolti per testare la risposta T CD8+ specifica per gli epitopi P18-I10 ( $H-2D^d$ ), Gag 197 ( $H-2K^d$ ) e NP-147 ( $H-2K^d$ ) mediante saggio ELISPOT.

Sebbene il numero di linfociti T CD+8 HIV-specifici ottenuti dall'infezione vaginale dei topi sia leggermente più basso di quello indotto per via intranasale, nel complesso la risposta immunitaria dei linfociti T CD8+ specifici indotta nei linfonodi iliaci e nella milza in seguito ad immunizzazione vaginale può considerarsi sostenuta e comparabile a quella indotta per via respiratoria.

In tutte le condizioni testate è stato saggiato anche un peptide aspecifico che non ha dato evidenze di legame allo stesso complesso di istocompatibilità, dimostrando, così, che la risposta immunitaria rilevata nei topi immunizzati è specifica per i peptidi antigenici impiegati nel rilevamento (dati non riportati).

Si è inoltre valutata la risposta dei linfociti T CD8+ secernenti IFN- $\gamma$  specificamente in risposta allo stimolo con il peptide Gag197-205 nei linfonodi e nelle milze dei topi infettati per via intranasale o vaginale con il virus WSN/CKG. La regione C-terminale di CKG contiene un epitopo CTL immunodominante (Gag 197-205: AMQMLKETI) della proteina p24 di HIV-1 che è riconosciuto in associazione con l'allele K<sup>d</sup>, e corrispondente alla stessa molecola MHC I che lega anche l'epitopo immunodominante NP147 della nucleoproteina (NP) del virus influenzale [Bodmer HC *et al.* 1988; Mata M *et al.* 1998]. Il saggio ELISPOT mostra valori di linfociti specifici più bassi per Gag rispetto a NP sia nei topi immunizzati per via intranasale che vaginale (Figure 16 e 17).

In conclusione, dai dati riportati in questa serie di esperimenti appare evidente che una singola dose del virus WSN/CKG somministrata attraverso le vie di immunizzazione intranasale e vaginale induce livelli elevati di linfociti T specifici per gli antigeni della nucleoproteina virale così come per quelli HIV-1 rilevabili sia a livello locale (MLN e ILN) che a livello sistemico (milza).

#### **4.4 INDUZIONE DELLA RISPOSTA ANTICORPALE P18IIB-SPECIFICA ATTRAVERSO L'IMMUNIZZAZIONE DI TOPI CON IL VIRUS WSN/CKG**

Nel corso degli studi della risposta immunitaria nei confronti del virus HIV-1 condotti da Ahlers JD e dai suoi collaboratori è stato rilevato che la stimolazione di linfociti TCD4+ da parte di una regione contenente un insieme di epitopi immunodominanti T, stimola i linfociti T helper che a loro volta inducono i linfociti B a produrre anticorpi nei riguardi del principale determinante neutralizzante che costituisce il loop V3 della gp160 di HIV-1 [Ahlers JD *et al.* 1996].

Per verificare se anche il virus ricombinante WSN/CKG è in grado di indurre la produzione di anticorpi verso il peptide P18 fuso al C-terminale della sequenza PCLUS3, topi femmine BALB/c sono stati immunizzati per via intranasale o vaginale somministrando una singola dose del virus WSN/CKG e, trascorsi 30 giorni, sacrificati.

Come si osserva in Figura 18, livelli simili di IgG P18-specifici sono stati rilevati, mediante saggio ELISA, nel siero dei topi immunizzati per via intranasale e vaginale con il virus WSN/CKG. Di

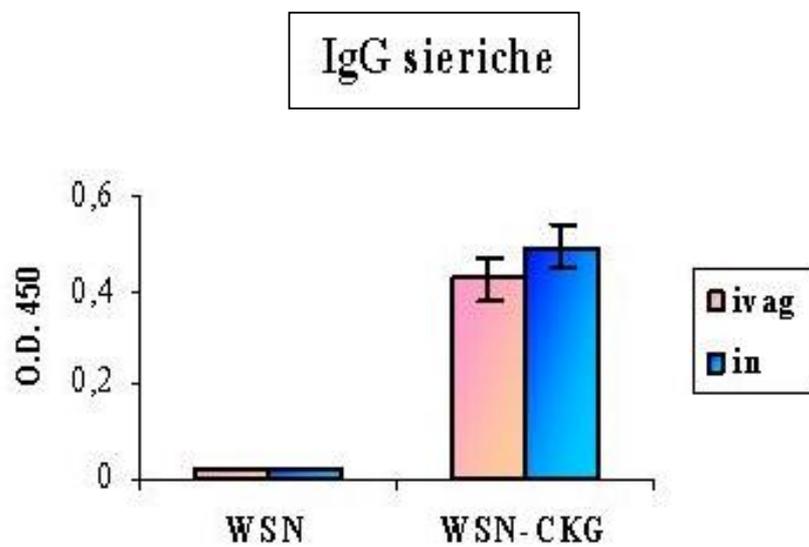
contro, tali anticorpi non sono stati rilevati nei sieri dei topi immunizzati con il virus parentale WSN.

Questi dati dimostrano che la regione loop V3 di Env è esposta correttamente sull'HA virale ed è in grado di stimolare anticorpi specifici in seguito all'infezione con il virus WSN/CKG.

#### **4.5 PROTEZIONE NEI CONFRONTI DI UN'INFEZIONE SECONDARIA CON IL VIRUS VACCINIA RICOMBINANTE IN TOPI IMMUNIZZATI CON IL VIRUS WSN/CKG**

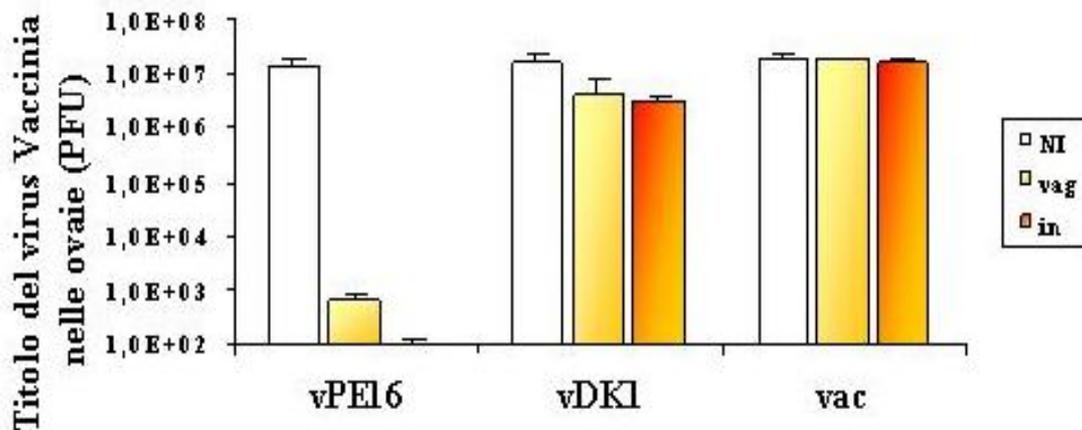
Gli studi di protezione da infezione secondaria con un agente patogeno costituiscono un'analisi complessa dell'efficacia immuno-protettiva dei diversi effettori della risposta immune evocata in seguito ad immunizzazione. Pertanto, alla luce dei risultati ottenuti, è stata condotta una serie di esperimenti diretti a valutare se la risposta immunitaria indotta dal virus WSN/CKG è in grado di indurre l'eliminazione dell'infezione virale da parte del virus Vaccinia ricombinante che esprime la proteina Env (vPE16) oppure la proteina Gag (vDK1) di HIV-1. A questo scopo, un gruppo di topi femmine BALB/c, precedentemente immunizzato per via intranasale o vaginale con una singola dose del virus WSN/CKG è stato infettato per via intraperitoneale (i.p.) con  $2 \times 10^6$  PFU/300 $\mu$ l di vPE16 o vDK1. In un esperimento parallelo, come controllo, un gruppo di topi immunizzati con il virus WSN/CKG è stato infettato con il ceppo WR del virus Vaccinia che non esprime antigeni HIV-1. Poiché il virus Vaccinia replica molto efficientemente nelle ovaie, queste sono state rimosse 6 giorni dopo l'infezione, omogeneizzate e la sospensione ottenuta è stata titolata su un monostrato di cellule CV-1 per stabilire la carica virale del virus Vaccinia. I topi immunizzati non mostrano alcuna protezione evidente nei confronti dell'infezione con il virus WR Vaccinia (Figura 19). Tuttavia, in seguito all'immunizzazione per via intranasale con il virus WSN/CKG i topi risultano completamente protetti dall'infezione con vPE16; il virus, infatti, non è stato rilevato nelle ovaie. Per quanto riguarda i topi immunizzati per via vaginale, è stata rilevata una modesta replicazione del virus nelle ovaie di tali topi, sebbene i titoli siano di 4  $\log_{10}$  inferiori rispetto ai topi non immunizzati. Questi dati sono a riprova di un lavoro condotto precedentemente da altri autori, con il quale si dimostra che l'immunizzazione mucosale con il polipeptide PCLU3-P18IIIB produce una protezione completa nei confronti di una infezione secondaria con il virus vPE16 somministrato per via intrarettale [Derby M *et al.* 2001]. Al contrario, la Figura 19 mette in evidenza che nei topi immunizzati con il virus WSN/CKG, in seguito all'infezione con il virus vDK1 si ha una riduzione della replicazione virale solo di 1  $\log_{10}$  rispetto ai topi non immunizzati. Da questo risultato si deduce che la sola presenza di linfociti T Gag-specifici non è sufficiente a conferire una protezione completa nei confronti di un'infezione secondaria con il virus Vaccinia.

**RISPOSTA UMORALE SPECIFICA PER IL DETERMINANTE  
ANTIGENICO P18 RILEVABILE NEL SIERO DI TOPI INFETTATI CON IL  
VIRUS WSN/CKG**



**Figura 18** I topi sono stati immunizzati per via intranasale o vaginale con una singola dose del virus WSN/CKG o WSN e, trascorsi 30 giorni, sacrificati. Il siero è stato separato dai campioni di sangue intero prelevati dal plesso retro-orbitale dei topi. I livelli di IgG P18-specifici sono stati rilevati, mediante saggio ELISA.

## STUDI DI PROTEZIONE IN SEGUITO AD INFEZIONE CON VIRUS VACCINIA RICOMBINANTE



**Figura 19** Determinazione delle PFU di virus Vaccinia nelle ovaie di topi immunizzati con il virus WSN/CKG e infettati con il virus Vaccinia ricombinante che esprime la proteina Env (vPE16) oppure la proteina Gag (vDK1) di HIV-1. Gruppi di topi, precedentemente immunizzati per via intranasale o vaginale con WSN/CKG, sono stati infettati, dopo 6 settimane, per via intraperitoneale con vPE16 o vDK1 ( $2 \times 10^6$  PFU/300 $\mu$ l). In un esperimento parallelo, un gruppo di topi di controllo è stato prima immunizzato con WSN/CKG e poi infettato con il ceppo parentale WR Vaccinia. Sei giorni dopo, i topi sono stati sacrificati, e il virus presente negli omogenati di tessuto di ovaie è stato titolato tramite il saggio delle placche su cellule CV-1. Tutte le titolazioni sono state effettuate in triplicato pertanto il valore delle PFU/ovaie è il risultato di una media aritmetica +/- la deviazione standard.

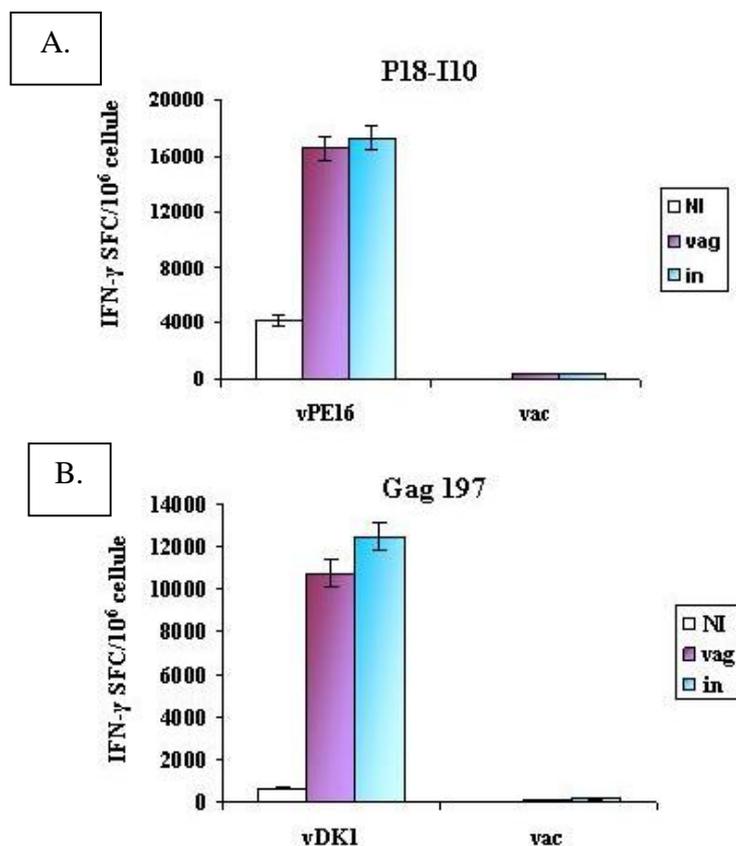
Nel complesso, questi risultati indicano che l'immunizzazione con il virus WSN/CKG induce una significativa immunità protettiva nei confronti di un'infezione secondaria con il virus vPE16, soprattutto se somministrato per via intranasale.

#### ***4.6 RICHIAMO DELLA RISPOSTA MEDIATA DAI LINFOCITI T DELLA MEMORIA IN SEGUITO AD INFEZIONE SECONDARIA CON IL VIRUS VACCINIA RICOMBINANTE***

Una caratteristica fondamentale delle cellule della memoria indotte con un'immunizzazione o in seguito ad infezioni primarie con uno specifico agente infettivo è quella di essere amplificata rapidamente e di essere richiamata precocemente nel sito di infezione secondaria con un patogeno che esprime gli stessi antigeni. Pertanto, è stata valutata l'ampiezza della risposta immunitaria mediata da linfociti T CD8<sup>+</sup> antigene-specifici nella milza dei topi immunizzati con il virus ricombinante WSN/CKG e successivamente infettati con il virus Vaccinia ricombinante (vPE16 o vDK1). A tal fine gli splenociti dei topi sacrificati al sesto giorno dopo l'infezione secondaria con il virus Vaccinia ricombinante sono stati raccolti e saggiati mediante ELISPOT. Si può osservare che sia l'immunizzazione per via vaginale che intranasale con il virus WSN/CKG stimola effettori nella milza che vengono rapidamente richiamati in tempi precoci dopo l'infezione secondaria con il virus Vaccinia ricombinante. In particolare, l'aumento del numero dei linfociti TCD8<sup>+</sup> che producono IFN- $\gamma$  P18-specifico è superiore di 4 volte rispetto al gruppo di topi non immuni, e gli splenociti specifici richiamati per l'epitopo P18 risultano essere il 17% dei linfociti T CD8<sup>+</sup> totali (Figura 20A). E' interessante osservare che la sub-ottimale risposta primaria specifica per l'epitopo Gag, indotta in seguito a immunizzazione per via intranasale o vaginale con il virus WSN/CKG, viene efficientemente richiamata dall'infezione secondaria con il virus vDK1, come rivelano i livelli di linfociti T CD8<sup>+</sup> Gag-specifici secernenti IFN- $\gamma$  aumentati rispettivamente di 16 e 19 volte rispetto al gruppo di controllo che ha ricevuto solamente l'infezione con vDK1 (Figura 20B). Nel complesso, gli splenociti Gag-specifici costituiscono circa il 10-12% del totale dei linfociti T CD8<sup>+</sup>. Nei topi immunizzati con il virus WSN/CKG e infettati con il virus Vaccinia WR non si rileva alcun aumento della risposta specifica per i peptidi P18 e Gag.

Nel complesso, i risultati ottenuti mettono in evidenza un vigoroso incremento della risposta mediata dai linfociti T antigene-specifici rilevabile nella milza di topi precedentemente immunizzati per via vaginale o intranasale con il virus WSN/CKG e sottoposti ad infezione secondaria con il virus Vaccinia ricombinante per via sistemica.

## RISPOSTA CELLULARE SECONDARIA



**Figura 20** Richiamo della risposta secondaria di linfociti T CD8+ rilevata nella milza di topi immunizzati con il virus WSN/CKG e infettati con i virus Vaccinia ricombinanti. Gruppi di topi, precedentemente immunizzati per via intranasale o vaginale con WSN/CKG sono stati infettati, dopo 6 settimane, per via intraperitoneale con vPE16 (A), vDK1 (B) o Vaccinia WR (A, B) ( $2 \times 10^6$  PFU/300 $\mu$ l). Sei giorni dopo, i topi sono stati sacrificati e il numero di linfociti specifici per gli epitopi immunodominanti P18-I10 e Gag197 presenti nelle milze sono stati determinati mediante ELISPOT.

# **DISCUSSIONE**

A distanza di anni dalla scoperta del Virus dell'Immunodeficienza Acquisita HIV-1, inizialmente circoscritto in comunità ristrette e con comportamenti omosessuali promiscui, l'infezione è ancora largamente diffusa tra la popolazione umana, particolarmente nelle aree di sottosviluppo, per cause economiche, culturali e di inosservanza delle norme igieniche. Nonostante le accresciute conoscenze di immunologia e delle proprietà biologiche del virus HIV-1, le prospettive concrete di realizzare un vaccino pienamente efficace nel prevenire l'infezione appaiono di grande difficoltà ed ancora irrisolte su aspetti fondamentali quali la selezione ottimale degli antigeni. Un vaccino che sia in grado di indurre uno stato di immunità non sterilizzante, ma comunque capace di determinare un controllo nelle prime fasi dell'infezione e sul suo decorso, non sembra tuttavia irrealizzabile e potrebbe offrire un contributo importante, unitamente ad altri approcci chemioterapici, ai fini di un controllo efficace che limiti la diffusione dell'infezione da HIV nella popolazione. Gli studi condotti su numerosi soggetti a rischio di infezione, o già infetti e che non procedono nella fase di malattia conclamata, grazie ad un efficace controllo immune esercitato sulla replicazione virale, dimostrano che l'acquisizione di un'immunità protettiva nei riguardi di HIV-1 è possibile, ed alimentano le speranze di poter realizzare un vaccino efficace. Indipendentemente dalla composizione antigenica che risulterà meglio garantire un'efficace profilassi vaccinale protettiva, un requisito che sembra essere importante nelle prospettive di realizzare un tale vaccino riguarda l'individuazione di una strategia di immunizzazione che al meglio induca linfociti T della memoria residenti nelle mucose genitali e nei tessuti linfoidei drenanti la regione genito-rettale. Numerose evidenze, sia cliniche che sperimentali, sottolineano l'importante ruolo protettivo che potrebbe assumere un'immunità attiva rilevabile nei tessuti linfoidei associati agli organi genito-rettali, i quali costituiscono, oltre tutto, il sito di inizio della diffusione virale e prendono parte al mantenimento dello stato di infezione nella fase cronica [Lehner T *et al.* 1996; Belyakov IM *et al.* 1998, 2001; Ferre AL *et al.* 2009].

Tra le varie strategie mirate all'induzione di un'efficace risposta immune, i nostri studi si sono focalizzati, per lo più, sull'utilizzo di virus influenzali ricombinanti come vettori di antigeni di HIV-1 e sull'indagine della capacità di tali virus di infettare la mucosa vaginale di topi [Garulli B *et al.* 2004]. In particolare, i dati qui riportati sono relativi alla caratterizzazione della risposta immune indotta in topi BALB/c a seguito di un'infezione respiratoria o genitale con il virus influenzale ricombinante WSN/CKG capace di veicolare antigeni di HIV-1 in forma di proteina di fusione con l'emagglutinina virale. Sebbene vi sia la mancanza di un'analisi quantitativa diretta degli specifici CTL presenti nella sotto-mucosa vaginale e della qualità delle funzioni effettrici da essi svolte, con particolare riferimento alle citochine prodotte, lo studio qui condotto con il virus WSN/CKG

fornisce, tuttavia, alcune interessanti evidenze riguardanti le strategie di immunizzazione mirate a stimolare nella mucosa genitale un'immunità locale protettiva a lungo termine.

Il raffronto effettuato tra via di immunizzazione vaginale e respiratoria, in relazione all'ampiezza della risposta immune nei confronti del virus WSN/CKG e al grado di protezione rilevato in seguito ad infezione secondaria con virus Vaccinia ricombinanti esprimenti i corrispondenti antigeni HIV-1, dimostra che la mucosa genitale costituisce un efficiente sito induttivo di immunità cellulare mucosale quasi comparabile al tratto respiratorio. Questo giudizio emerge da considerazioni sui risultati che riguardano sia la capacità di replicazione dei virus utilizzati come anche dall'ampiezza e grado di protezione della risposta immune agli antigeni specifici.

I virus influenzali ricombinanti contenenti determinanti antigenici estranei nell'HA o nell'NA mostrano normalmente una virulenza ridotta rispetto al virus parentale. La capacità di replicazione del virus WSN/CKG, comparata a quella del ceppo parentale WSN, si conferma in una scala ridotta e si correla direttamente con il fenotipo attenuato nella virulenza e i ridotti titoli virali misurati, particolarmente, nell'infezione *in vivo*. Nonostante la dose infettante impiegata, 1000 volte maggiore del virus WSN/CKG rispetto al virus selvatico WSN, nell'infezione dei topi attraverso la via intranasale o vaginale, i titoli virali di WSN/CKG rilevati negli omogenati polmonari e nei lavaggi vaginali sono sostanzialmente inferiori a quelli di WSN e spiegano così il carattere non letale del virus ricombinante. L'infezione intranasale dei topi con virus influenzali adattati ad essi produce una polmonite, generalmente associata ad un vasto danno polmonare alveolare, con bronchiolite accompagnata a replicazione del virus anche nelle alte vie respiratorie. Viceversa, l'infezione vaginale con virus influenzale è anzitutto dipendente da una fase ormonale progestinica, indotta nelle condizioni sperimentali in seguito a trattamento con progesterone, ed appare inoltre essere strettamente limitata alla mucosa del canale vaginale senza che vi sia alcuna diffusione di virus negli organi riproduttivi interni. La contenuta replicazione virale nel solo canale vaginale spiega anche perché dosi particolarmente elevate di inoculo virale siano tollerate al pari di dosi molto ridotte. La limitata estensione dell'epitelio vaginale infetto rispetto alla più ampia superficie epiteliale interessata dal processo di replicazione virale nel corso di un'infezione polmonare si traduce in una più contenuta carica di antigeni virali, che si riflette poi in una minore stimolazione antigenica particolarmente nel caso di virus attenuati quali il virus WSN/CKG. Questo comporta una minore induzione di linfociti T CD8+, specifici sia per l'epitopo P18IIIB che NP147, rilevabili nella milza e nei linfonodi iliaci rispetto ai linfonodi del mediastino interessati nell'infezione respiratoria con lo stesso virus. Questo dato suggerisce che un'efficiente induzione di una risposta cellulare di linfociti T CD8+ da parte di virus ricombinanti influenzali richiede un processo di infezione seguito da replicazione virale che non sia eccessivamente contenuta. Nonostante la

minore induzione di linfociti T CD8+ in seguito ad immunizzazione vaginale, rispetto alla via respiratoria, e quindi la ridotta immunità protettiva dei topi infettati con virus Vaccinia ricombinante vPE16, è tuttavia importante sottolineare che i valori rilevati di linfociti T CD8+ specifici per gli antigeni HIV-1 sono comunque elevati e anche la protezione da virus Vaccinia appare significativa con un titolo virale rilevato nelle ovaie al giorno 6 di circa 4 unità di log<sub>10</sub> inferiore ai titoli dei topi di controllo.

Oltre agli epitopi per i linfociti T, PCLUS3 e P18IIIB, della gp120 di HIV-1, l'estremità C-terminale di CKG contiene l'epitopo Gag197-205 che analogamente all'epitopo del virus influenzale NP147 si complessa con molecole H2-K<sup>d</sup>, competendo quindi con esso nel processamento e nella presentazione ai linfociti specifici da parte delle cellule presentanti l'antigene (APC). Il contesto di questa competizione determina, forse, la condizione per cui l'epitopo Gag 197 si comporta come un epitopo subdominante rispetto a NP147 e di conseguenza induce un minor numero di effettori cellulari T CD8+ specifici per Gag197, così come appare evidente indipendentemente dalla via mucosale vaginale o respiratoria impiegata nell'immunizzazione con virus WSN/CKG. Tuttavia, è interessante notare che il numero di linfociti T CD8+, rilevati nella fase acuta di maggiore picco della risposta primaria, seppur ridotto, aumenta notevolmente fino a 19 volte in seguito ad infezione secondaria con il virus Vaccinia ricombinante vDK1. Nonostante questo forte incremento del numero di linfociti effettori T CD8+ specifici per l'epitopo Gag 197 stimolato dal virus vaccinico ricombinante, non sembra tuttavia che essi siano in grado di contrastare in modo significativo la replicazione del virus vDK1 nelle ovaie suggerendo che altri fattori non rilevati nella nostra analisi possono essere determinanti nel controllo della replicazione virale. E' forse possibile ipotizzare la presenza in questi organi di un numero troppo esiguo di cellule effettrici della memoria immediatamente funzionali al momento dell'infezione, o anche un carente profilo di citochine da esse prodotte.

Un precedente studio condotto nel nostro Laboratorio mette a disposizione ulteriori dati utili nel contesto delle strategie di immunizzazione attraverso la mucosa genitale. Sebbene il grado di immunità locale indotta mediante infezione vaginale con virus dell'Influenza e la conseguente protezione eterosubtipica a virus influenzali di differente sottotipo antigenico non siano fisiologicamente rilevanti, questo modello di analisi offre tuttavia interessanti relazioni circa il possibile impiego di virus influenzali quali vettori di antigeni HIV-1 [Garulli B *et al.* 2007]. L'infezione vaginale di topi con virus A/WSN/33 appare ben tollerata, non associata ad alcun segno di stress o alterazioni nel comportamento animale durante la stabulazione e, contrariamente all'immunizzazione intranasale, richiede soltanto una leggera anestesia. Titoli virali nei lavaggi vaginali dimostrano una replicazione virale fino a 6 giorni dopo l'infezione con un picco di

massima al secondo o terzo giorno. Al contrario, gli organi riproduttivi interni, quali ovidotti ed ovaie, non mostrano alcuna traccia di diffusione di virus infettivo dalla mucosa vaginale, saggiato mediante inoculo di omogenato di tessuto in coltura di cellule MDCK e confermato attraverso analisi PCR. L'infezione vaginale praticata anche a dosi elevate di virus influenzale, fino a 100 MLD<sub>50</sub>, determinate mediante infezione intranasale di topi sotto anestesia, non produce alcun particolare disturbo dimostrando così, almeno in questa specie animale e limitatamente a possibili effetti connessi con l'infezione in fase acuta, che l'infezione vaginale con virus influenzali è ben tollerata [Garulli B *et al.* 2004]. Inoltre, il grado di protezione da un'infezione secondaria intranasale con dosi letali del virus A/WSN/33 (H1N1) rivela un'efficace immunità protettiva ottenuta comparabilmente nei topi precedentemente immunizzati per via intranasale o vaginale con il virus X-31 (H3N2). Un'adeguata protezione dei topi immunizzati, in particolare per via vaginale, con il virus WSN è anche evidente osservando i diminuiti livelli di replicazione virale nella mucosa vaginale nel corso dell'infezione secondaria con virus X-31. In questo caso è interessante rilevare che la riduzione della replicazione virale secondaria sulla mucosa vaginale appare precocemente già al giorno 1-2 dopo l'infezione. Questo pronto controllo della replicazione virale sulla mucosa vaginale dimostra come gli effettori dell'immunità eterosubtipica, quali anticorpi e linfociti T mucosali cross-reattivi, siano effettivamente operanti ed in grado di contenere precocemente nei primi giorni l'infezione vaginale secondaria con virus influenzali antigenicamente distinti. Un'interessante considerazione a questo riguardo è che la mucosa vaginale manca di tessuto linfoide organizzato intraepiteliale, che si ritrova invece in altre mucose, quali l'intestino (GALT, gut associated lymphoid tissue) o le mucose che rivestono il tratto respiratorio (NALT e BALT, rispettivamente, nasal- e broncho- associated lymphoid tissue). Nel contesto delle infezioni naturali da virus HIV, è forse possibile speculare che l'assenza di un tale tessuto linfoide intraepiteliale nella mucosa vaginale non offra al virus infettante il vantaggio di un immediato accesso a cellule linfoide suscettibili all'infezione, con un particolare riguardo ai linfociti T CD4+. In caso contrario, probabilmente, verrebbe meno il breve intervallo di giorni che, immediatamente dopo l'infezione, precede la diffusione del virus nei linfonodi locali e poi sistemici, dove il processo di replicazione virale diviene inarrestabile, limitando, di fatto, le condizioni per la speranza di un possibile controllo delle prime fasi dell'infezione da parte dell'immunità indotta con la vaccinazione. L'evidenza di un rapido controllo della replicazione virale, nei riguardi di un virus dell'Influenza di un distinto sottotipo antigenico, dovuto ad un'immunità eterosubtipica offre la riprova che è possibile indurre uno stato di immunità protettiva a lungo termine a livello della mucosa genitale. Pertanto un simile stato di immunità protettiva potrebbe essere indotto anche nei riguardi delle infezioni da HIV ed operare un immediato ed altrettanto efficace controllo della replicazione virale

dopo l'avvenuta infezione. Sulla base di questi risultati appare evidente che una forte immunità mucosale genitale, inducibile mediante immunizzazione locale, potrebbe costituire un elemento fondamentale nello sviluppo di un vaccino contro le infezioni da HIV-1. In particolare, un efficace protocollo di immunizzazione attraverso le superfici mucosali genitali capace di stimolare una risposta immunitaria specifica a livello umorale e cellulare può rappresentare una strategia efficace per la prevenzione o il controllo della replicazione del virus dell'HIV, come anche sostenuto da altri autori [Lehner T *et al.* 1996; Belyakov IM *et al.* 1998, 2008].

Le strategie di ingegneria genetica proposte ad oggi per incrementare il carico antigenico veicolato con virus influenzali prospettano varie possibilità. Alcune si basano sulla fusione di specifici geni da veicolare con forme tronche del gene virale NS1 e prevedono necessariamente l'espressione di una sequenza autoproteolitica nel prodotto di traduzione che liberi la proteina virale dal suo carico di antigene estraneo [Ferko B *et al.* 2001; Sereinig S *et al.* 2006]. L'inserimento della sequenza nucleotidica che codifica la serie di aminoacidi con funzione autoproteolitica potrebbe tuttavia subire traslocazioni indesiderate in seguito a fenomeni di ricombinazione e favorire il clivaggio dell'HA, con possibili alterazioni del tropismo tissutale e della virulenza di un tale virus. Alternativamente, è stata dimostrata la costruzione di frammenti genomici bicistronici che vede duplicata e modificata la normale sequenza nucleotidica 3' del gene NA, avente funzioni regolative non codificanti [Vieira Machado A *et al.* 2006]. La costruzione del virus WSN/CKG è stata realizzata riprendendo una strategia di costruzione precedentemente descritta da altri autori [Li ZN *et al.* 2005]. Diversamente dai virus influenzali ricombinanti generati precedentemente nel nostro Laboratorio, la particolarità del virus WSN/CKG di avere un'HA chimerica introduce sostanziali novità nel contesto delle problematiche sopra discusse e che vedono favorevolmente i virus influenzali ricombinanti quale possibile strumento nello studio di strategie innovative di vaccinazione e quali possibili immunogeni in applicazioni di protocolli di "prime-boost" nella profilassi vaccinale alle infezioni da HIV. Tali novità sostanziali riguardano essenzialmente il maggior carico antigenico, che può essere veicolato in forma di proteina di fusione con HA, e l'impiego sicuro di questi virus ricombinanti, almeno nella forma di virus inattivati o virus vivi attenuati, quali, ad esempio, i virus riassortanti, che possono essere ottenuti in seguito a riassortimento con il ceppo vaccinale "cold adapted", impiegato negli USA per la vaccinazione ordinaria contro l'Influenza. Con riferimento in particolare agli antigeni di HIV-1 e alla modalità adottata per il loro inserimento nell'HA del virus WSN/CKG è da rilevare che essi sono stati selezionati nella prospettiva di documentare e caratterizzare le differenti componenti della risposta immune specifica indotta in seguito all'impiego di virus infettivo come anche di virus inattivato. La fusione degli antigeni all'estremità N-terminale dell'HA produce una proteina chimera che consente

l'esposizione extracellulare degli antigeni nella cellula infetta e naturalmente presenti anche sulla superficie del virione. Gli anticorpi specifici per P18IIB, rilevati nel siero degli animali infettati, rappresentano una prima conferma dell'attesa esposizione alle cellule immunocompetenti di questo determinante antigenico. Nelle prospettive future di questo studio, è auspicabile che tale carattere trovi un suo riscontro anche nella valutazione immunogenica del virus WSN/CKG inattivato. Il carattere subdominante dell'epitopo per CTL, Gag197, che si contrappone a quello particolarmente immunodominante di P18IIB, così come la loro combinazione in associazione con l'epitopo T-helper, rappresentato dalla sequenza di PCLUS3, si prestano alle esigenze di una valutazione dell'immunogenicità del virus WSN/CKG anche in forma inattivata. Gli studi intrapresi per documentare l'eventuale efficacia immunogenica di questi prodotti inattivati sono in una fase preliminare che non consente anticipazioni. A questo riguardo non è tuttavia possibile escludere che l'accumulo massivo di molecole HA chimeriche sulla superficie cellulare nel corso del processo infettivo possa essere determinante ai fini di un'esposizione favorevole ed una loro immunogenicità ottimale rispetto alle quantità più contenute di antigene somministrato con virus inattivati non replicanti. Le procedure di inattivazione dell'infettività virale con agenti alchilanti, quali formaldeide e  $\beta$ -propiolattone, possono inoltre alterarne l'antigenicità e l'immunogenicità. In termini generali, un'effettiva difficoltà nella produzione di virus, nel processo di infezione ed altre proprietà biologiche riguardanti in particolare la stabilità genetica di virus influenzali ricombinanti, quali ad esempio WSN/CKG, potrebbe risiedere in una limitazione funzionale dell'HA causata dall'ingombro sterico degli antigeni fusi con essa. Oltre ad impedimenti sterici, sono anche possibili interferenze dipendenti dalla natura biochimica delle sequenze proteiche antigeniche e dalle interazioni che queste possono eventualmente generare nelle fasi di formazione del virione e nello svolgimento delle funzioni dell'HA.

Nonostante i molti elementi richiamati a favore di un possibile impiego dei virus influenzali ricombinanti in grado di veicolare antigeni HIV, essi non costituiscono, tuttavia, una proposta implicita in tal senso, quali vettori virali in protocolli di "prime-boost". Vi sono delle importanti riserve e valutazioni di natura immunogenica che quanto prima devono essere accuratamente investigate.

L'esistenza di molteplici varianti antigeniche del virus dell'Influenza offre un'ampia possibilità di selezione di varianti virali antigenicamente distanti che potrebbero essere impiegate come vettori, sfuggendo così a condizioni di immunità neutralizzante la loro infettività che può essere presente nella popolazione e assicurando in tal modo l'inizio di un processo di infezione. Tuttavia, la presenza di un certo grado di conservazione filogenetica del profilo antigenico dei geni interni dei virus influenzali potrebbe richiamare una risposta secondaria verso tali antigeni conservati. Questo

limiterebbe, di fatto, l'immunogenicità degli antigeni estranei veicolati con virus influenzali ricombinanti producendo una polarizzazione della risposta CTL, specifica per gli antigeni virali condivisi con i ceppi di virus influenzali naturalmente presenti nella popolazione, verso il vettore. La minore replicazione del virus WSN/CKG conseguente l'infezione vaginale, rispetto a quella polmonare, si traduce in una minor induzione di linfociti T CD8+ specifici a cui si accompagna un minor grado di protezione, così come osservato nel gruppo di topi immunizzati per via vaginale ed infettati poi con il virus ricombinante vPE16. Questo risultato dimostra come una ridotta replicazione del vettore virale si correli direttamente con una sua ridotta immunogenicità in termini di risposta cellulare citotossica e minore protezione, richiamando l'importanza che una pre-esistente immunità al vettore potrebbe assumere nelle strategie di vaccinazione basate su protocolli di "prime-boost". Pertanto, una valutazione obiettiva di quanto un'immunità preesistente ai virus influenzali possa influire negativamente sull'effettiva possibilità di utilizzo di virus ricombinanti vivi attenuati, o di virus influenzali ricombinanti inattivati, richiede necessariamente un'accurata verifica in tal senso.

Le recenti notizie riguardanti il fallimento nella sperimentazione clinica umana di fase 2b (STEP trial) di un candidato vaccino basato su vettori adenovirali Ad5 difettivi nella replicazione, ma comunque in grado di promuovere una buona espressione degli antigeni di HIV-1 (Gag, Pol, Nef) veicolati e conseguente induzione di una risposta cellulo-mediata, alimentano forti perplessità che si possa produrre uno stato di immunità protettiva attraverso l'uso di vettori virali [Buchbinder SP *et al.* 2008; Watkins DI *et al.* 2008]. Le ragioni particolari di questo insuccesso non sono ben chiare, anche se la specificità delle risposte dei linfociti T CD8+ agli antigeni HIV-1 non sembra particolarmente diversificata. Tuttavia, i dubbi maggiori sono alimentati piuttosto dall'evidenza che il grado di un'immunità preesistente agli Adenovirus degli individui vaccinati si correli direttamente con un'aumentata percentuale, rispetto ai controlli non vaccinati, delle persone a rischio che hanno contratto l'infezione. Questo fatto, in particolare, richiama direttamente in causa il modello di studio qui proposto e che si fonda sul virus dell'influenza nei riguardi del quale la popolazione umana presenta una diffusa immunità acquisita. Nel nostro Laboratorio è stato recentemente intrapreso uno studio mirato ad analizzare nei topi le influenze esercitate da una preesistente immunità al virus influenzale nei riguardi dell'impiego di un differente sottotipo antigenico del virus quale vettore di antigeni HIV-1. I dati finora raccolti mostrano interessanti relazioni che sono in una fase di studio ancora preliminare per essere riportati e dovutamente discussi. Tuttavia, essi sembrano rimarcare l'importanza di un'immunità locale che deve necessariamente essere indotta nelle mucose di interesse e sembrano altresì ribadire un ruolo centrale della strategia di immunizzazione ai fini di un'efficace protezione dall'infezione. La relazione che potrebbe motivare l'insuccesso registrato

con i vettori adenovirali nella sperimentazione clinica potrebbe forse risiedere nelle modalità di immunizzazione impiegate combinate alle proprietà immunogeniche dei virus adenovirali. I vettori adenovirali che hanno fallito la sperimentazione clinica sono stati somministrati per via intramuscolo. Studi condotti precedentemente da Gallichan WS e Rosenthal KL sul modello murino di infezione con Adenovirus indicano che l'immunizzazione per via sistemica con questi virus produce una forte risposta immune che è tuttavia rilevabile nei siti mucosali soltanto per un limitato periodo di tempo di pochi mesi [Gallichan WS & Rosenthal KL 1996, 1998]. Questi dati sottolineano il concetto che la compartimentalizzazione funzionalmente distinta del sistema immunitario fa sì che l'immunizzazione per via sistemica sia di valore inferiore rispetto alla via mucosale per ciò che riguarda la prevenzione di alcune patologie infettive contratte attraverso le mucose, come è nel caso dell'infezione da HIV. L'immunizzazione attraverso la via mucosale è, infatti, maggiormente efficace nell'indurre un'immunità protettiva sia mucosale che sistemica [Belyakov IM *et al.* 2001].

Come commento conclusivo ai risultati presentati è possibile sostenere il concetto secondo il quale l'induzione di una forte immunità locale, indotta direttamente sulle mucose genitali, costituisce una condizione assolutamente necessaria ai fini di un'ottimale somministrazione di immunogeni appropriati all'induzione di una immunità protettiva e quindi alle speranze di pervenire alla formulazione di un vaccino efficace contro le infezioni da HIV. Sebbene le mucose respiratorie siano in grado di costituire un efficiente sito induttivo che risulta in un'immunità protettiva anche a livello genitale, così come dimostrato anche dai dati sperimentali del virus WSN/CKG qui riportati, appare tuttavia importante stabilire se un'eventuale immunità preesistente al vettore possa limitare in qualche misura l'efficacia induttiva di un sito mucosale distale, quale quello respiratorio, nell'indurre un'immunità protettiva nelle mucose genitali. Un approfondimento di questi aspetti costituisce pertanto il programma di attività future nel nostro Laboratorio e che riguardano la linea di studio qui presentata.

# **MATERIALI E METODI**

## **6.1 VIRUS, CELLULE E TOPI**

Il virus dell'Influenza di tipo A, A/WSN/33 (H1N1) è stato coltivato in uova embrionate di pollo.

Le uova sono state messe in un apposito incubatore in oscillazione automatica a 37°C e, trascorsi 9 giorni, con l'ausilio di una lampada al tungsteno sono state selezionate in base alla presenza della camera d'aria, indice che sono state fecondate. Successivamente sono stati inoculati 100µl di virus diluito 1:500 in PBS1x con l'aggiunta di 150µl di antibiotico antimicotico. Le uova infette sono state incubate a 37°C e, trascorsi 3 giorni, il liquido allantoideo è stato prelevato, centrifugato a bassa velocità (1000 rpm/15 minuti) per separare eventuali residui dell'uovo e conservato sterilmente a -80°C. Il titolo virale è stato calcolato mediante Saggio di Emagglutinazione delle emazie di pollo e determinazione delle Unità Formanti Placca per ml di sospensione virale (PFU/ml).

Il virus WSN/CKG è stato generato nel nostro Laboratorio.

I virus vPE16 e vDK1 sono stati ottenuti tramite "NIH AIDS Research and Reference Reagent Program".

Le cellule MDCK (Madin-Darby canine Kidney) sono tenute in coltura nel nostro Laboratorio a 37°C e CO<sub>2</sub> al 5%, in terreno Eagle MEM (*Minimum Essenzial Medium* - Gibco, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) supplementato con 5% FCS (*Foetal Calf Serum* - Gibco, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) inattivato a 56°C per 30 minuti, 1% glutammina, 1% amminoacidi non essenziali, 3% bicarbonato al 7% (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).

La linea cellulare 293T (cellule embrionali renali umane di origine epiteliale) è tenuta in coltura nel nostro Laboratorio a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, in terreno DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium* - Gibco, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) addizionato con il 10% (v/v) di siero fetale bovino (FBS, *Foetal Bovine Serum* - Gibco, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), inattivato a 56°C per 30 minuti, 1% di penicillina e 1% di streptomina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).

Le cellule CV-1 (cellule fibroblastoidi di scimmia) sono tenute in coltura nel nostro Laboratorio a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, in terreno Eagle MEM (*Minimum Essenzial Medium* - Gibco, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) supplementato con 5% FCS (*Foetal Calf Serum* - Gibco, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) inattivato a 56°C per 30 minuti, 1% glutammina, 1% amminoacidi non essenziali, 3% bicarbonato al 7% (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).

I topi BALB/c, femmine consanguinee di 6-8 settimane, sono stati acquistati presso la ditta Charles River, Calco, Italia e mantenuti nello stabulario con cicli di luce/buio di 12 ore.

## 6.2 COSTRUZIONE DEL PLASMIDE pPOL I-WSN-HA/CKG

Il plasmide pPolI-WSN-HA/CKG, contenente il cDNA del gene chimerico HA/CKG, è stato costruito inserendo la sequenza sintetica codificante il polipeptido CKG tra l'estremità 3' della sequenza nucleotidica corrispondente al peptide segnale (PS) e la sequenza nucleotidica codificante il dominio N-terminale dell'HA matura del plasmide pPolI-WSN-HA precedentemente costruito dal Dr. Kawaoka Y. (University of Wisconsin, Madison, Wisconsin 53706, USA) [Neumann G *et al.* 1999].

Il costrutto genico sintetico CKG, inserito tra i due siti di restrizione ClaI-PstI, contiene la sequenza codificante il peptide cluster PCLUS3 (residui 421-444; KQIINMWQEVGKAMYAPPISGQIR), corrispondente al peptide T-helper multideterminante della glicoproteina Env dell'envelope di HIV-1, il peptide 18 della regione loop V3 della glicoproteina gp160 di HIV-1, P18IIIB (residui 308-322; RIQRGPGRAFVTIGK), corrispondente al principale determinante antigenico neutralizzante del ceppo IIIB di HIV-1 ed epitopo CTL riconosciuto nell'ambito di alcune classi di molecole MHC, e, infine, una sequenza derivata dalla proteina Gag di HIV-1 (residui 192-208; GGHQAAMQMLKETINEE) costituente un secondo epitopo CTL riconosciuto da molecole H-2<sup>d</sup> [Ahlers JD *et al.* 1993; Mata M *et al.* 1998]. Esso è stato generato clonando in successione sequenze oligonucleotidiche contenenti codoni ottimizzati per poter essere impiegato nei mammiferi ed introdotto nel plasmide pPolI-WSN-NA, precedentemente costruito dal Dr. Kawaoka Y. (University of Wisconsin, Madison, Wisconsin 53706, USA) [Neumann G *et al.* 1999]. Successivamente, tramite PCR effettuata su quest'ultimo plasmide è stata amplificata la regione codificante la sequenza CKG, fiancheggiata da due siti di restrizione NsiI e SacI contenuti nella sequenza nucleotidica dei primers utilizzati:

Fw 5': CAAATGCATTTGTAGCTACAGATCGATCCAAACAAATAATCAATATGTGG-3'  
(MWG – Biotech);

Rev 5': TACTGAGCTCAATCTGCAGTTCTTCATTTATTGTTTCTTTTAGCATTTGCAT-3'  
(MWG – Biotech).

Il prodotto di amplificazione, di circa 200 basi, contenente la sequenza nucleotidica codificante il polipeptido CKG, è stato digerito NsiI-SacI e clonato nel plasmide pPolI-WSN-HA, anch'esso precedentemente digerito con gli enzimi di restrizione corrispondenti, defosforilato e purificato su gel di agarosio. Infine, all'interno del plasmide ottenuto da questo primo clonaggio è stato sub-clonato, mediante enzimi di restrizione PstI-SacI, un secondo prodotto PCR amplificato sulla sequenza genica dell'HA di pPolI-WSN-HA in modo da ricostituire l'intera sequenza nucleotidica del gene HA. Il primer forward utilizzato per quest'ultima amplificazione ha il sito di restrizione PstI che è presente all'estremità 3'-end della sequenza CKG, una sequenza di codoni per gli

aminoacidi GGGGD, che costituiscono un braccio spaziatore interposto tra la sequenza CKG e l'estremità N-terminale dell'HA matura, ed un tratto di appaiamento della regione nucleotidica a polarità positiva corrispondente ai nucleotidi 81-101 di HA:

Fw 5': AAAGTGCAGGGGGGAGGAGGGGACGCAGACACAATATGTATAGGC 3'

(MWG - Biotech).

Il primer reverse è esattamente complementare al tratto HA 409-385 contenente il sito di restrizione naturale SacI: Rev 5': GATACTGAGCTCAATTGCTCCCTC 3' (MWG - Biotech).

Il prodotto finale del clonaggio così realizzato è costituito dal plasmide pPolI-WSN-HA/CKG che codifica il cDNA del gene chimera HA/CKG, completo delle estremità regolative del frammento genomico HA, necessarie alle funzioni di replicazione e riconoscimento da parte dell'RNA polimerasi virale. La traduzione del corrispondente mRNA comporta la sintesi della proteina chimera HA/CKG avente gli antigeni di HIV-1 inseriti a valle della sequenza nucleotidica codificante il peptide segnale e separati da un braccio spaziatore GGGGD dall'estremità N-terminale della proteina matura HA.

### **6.3 GENERAZIONE DEL VIRUS INFLUENZALE RICOMBINANTE WSN/CKG**

Il virus dell'Influenza ricombinante esprime all'interno dell'HA il poliepitopo CKG (WSN/CKG) è stato generato mediante l'impiego della metodica di Reverse Genetics descritta da Neumann G *et al.* 1999.

Per generare il virus ricombinante con l'HA chimerica (HA/CKG) sono stati utilizzati i geni del virus A/WSN/33 (H1N1), ed in particolare 7 plasmidi esprimenti ciascuno l'RNA virale del segmento genomico corrispondente e 4 plasmidi esprimenti le 4 proteine virali che costituiscono il complesso ribonucleoproteico [Neumann G *et al.* 1999]. I plasmidi di espressione pcDNA-PB2, pcDNA-PB1, pcDNA-PA e pCAGGS-NP ricevuti dal Dr. Kawaoka Y. (University of Wisconsin, Madison, Wisconsin 53706, USA) codificano per le proteine PB2, PB1, PA ed NP, necessarie alla trascrizione e alla replicazione del genoma virale. I plasmidi per gli RNA virali sono pPolI-PB1, pPolI-PB2, pPolI-PA, pPolI-NP, pPolI-NA, pPolI-M, pPolI-NS e contengono la corrispondente sequenza cDNA dei segmenti genomici di WSN. Ciascun plasmide possiede la regione Promotore riconosciuta dall'RNA polimerasi I umana (PolI) e una regione Terminatore della trascrizione operata dall'RNA PolI murina, poste rispettivamente a monte e a valle dei segmenti genomici virali che contengono. Il plasmide pPolI-HA/CKG codificante il gene chimera HA/CKG viene aggiunto agli 11 plasmidi sovraelencati e la combinazione contenente 1µg di ciascun plasmide viene trasfettata, utilizzando Lipofectamina 2000 (Invitrogen/Gibco-BRL) ad una concentrazione di 2µl/µg di plasmide, secondo le Istruzioni Invitrogen, in un monostrato sub-confluente di cellule

293T seminate in piastrelle di Petri da 35 mm ( $3 \times 10^5$  cellule/piastrina). Successivamente le piastrelle sono state incubate a 37°C e 5.0% CO<sub>2</sub> e 48 ore dopo è stato prelevato il supernatante contenente il virus ricombinante e con esso sono state infettate le cellule MDCK ed effettuato un Saggio delle placche. Il virus ottenuto da alcune placche singole è stato amplificato mediante crescita sulle cellule MDCK e successivamente sono stati fatti gli stock.

La presenza della sequenza genica del polipeptide CKG è stata confermata attraverso il sequenziamento del cDNA amplificato con PCR. A questo scopo, l'RNA totale del virus è stato estratto da 250µl di supernatante cellulare seguendo la metodica prevista dal protocollo Trizol Trizol-LS (Life Technologies) e risospeso in 20µl di H<sub>2</sub>O deionizzata (Millipore) priva di tracce di RNasi. Successivamente è stato retrotrascritto in cDNA con la Super ScriptII Reverse Transcriptase (Invitrogen Life Technologies) secondo istruzioni Invitrogen. Il primer plus-sense utilizzato per la retro trascrizione è HA5-29 (5'-AAAGCAGGGGAAAATAAAAACAACC-3' - MWG - Biotech). Per l'amplificazione mediante PCR è stato impiegato il primer forward HA5-29 e il primer reverse HA409-384 (5'-GATACTGAGCTCAATTGCTCCCTCAG-3'). I prodotti dell'RT-PCR sono stati verificati su un gel di agarosio all'1%, purificati secondo istruzioni del kit QIAquick PCR purification (Qiagen) e le sequenze sono state determinate utilizzando il metodo del Big Dye terminator sequencing Kit e un sequenziatore AB1377 (Applied Biosystem).

#### **6.4 WESTERN BLOT**

Cellule MDCK sono state infettate con il virus WSN o con WSN/CKG ad una molteplicità d'infezione (MOI) di 5 PFU/ml e incubate in terreno Eagle MEM (Minimum Essenzial Medium, Gibco - supplementato con 5% FCS Foetal Calf Serum, 1% glutammina, 1% amminoacidi non essenziali, 3% di una soluzione di NaHCO<sub>3</sub> al 7%) e con 1µg/ml di tripsina. Le piastre sono state incubate a 37°C e trascorse 24 ore il terreno di coltura è stato raccolto e chiarificato con centrifuga a 3000 rpm/10 minuti. Il virus contenuto nella coltura soprannatante è stato parzialmente purificato mediante centrifuga su un gradiente di saccarosio al 30% diluito in una soluzione tamponata STE (50mM Tris-HCl pH 7.2, 100mM NaCl, e 1mM EDTA). Il pellet contenente il virus è stato risospeso in una piccola aliquota di STE, lisato con una soluzione di lisi contenente detergente ed inibitori di proteasi (1% Triton X-100, 2mM phenylmethylsulfonylfluoride) e le proteine virali sono state separate per elettroforesi mediante SDS-PAGE al 12%, e trasferite su una membrana in Polyvinylidene fluoride (PVDF) (Immobilon P, Millipore) a 250mA per 90 minuti utilizzando una soluzione costituita da 50mM Tris-HCl, 400mM glicina, 0.1% SDS, 20% metanolo e la camera elettroforetica Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad).

La membrana elettroforetica PVDF contenente le proteine virali è stata sottoposta a lavaggi e trattata con una soluzione di 10% latte disidratato, 10mM Tris-HCl pH 8.0, 150mM NaCl, 0.1% Tween 20 (SIGMA); il filtro è stato successivamente incubato con una miscela di anticorpi monoclonali murini anti-HA (donati gentilmente dal Dr. Webster RG, St. Jude Children's Research Hospital, TN, U.S.A.) diluita 1:200 in PBS (phosphate-buffered saline) e incubato per 2 ore a temperatura ambiente. Trascorso il tempo, il filtro è stato lavato per 3 volte con PBS e incubato per 1 ora a temperatura ambiente con un anti-siero di capra, in grado di legare specificamente immunoglobuline di topo, coniugato a HRP (horseradish peroxidase - Amersham Pharmacia Biotech) diluito 1:1000 in PBS. La presenza di immunocomplessi legati alle proteine virali sono stati rilevati mediante una reazione chemiluminescente (ECL - enhanced chemiluminescence - Amersham Pharmacia Biotech) innescata dall'attività perossidasi delle immunoglobuline di capra coniugate con HRP.

#### **6.5 VALUTAZIONE DELLE PROPRIETA' DI CRESCITA IN VITRO DEL VIRUS WSN/CKG**

Cellule MDCK seminate in piastrine da 24 pozzetti e sub-confluenti sono state incubate con il virus WSN/CKG (ad una MOI di 0.01 PFU/ml) in triplicato per 1 ora a 37°C e successivamente per l'intera notte, dopo aver aggiunto terreno MEM contenente 0.3% BSA (bovine serum albumin) e 0.5µg/ml di tripsina TPCK. A vari intervalli di tempo è stato raccolto il supernatante ed è stato titolato il virus mediante il saggio delle placche.

#### **6.6 IMMUNIZZAZIONE DEI TOPI**

I topi Balb/c sono stati leggermente anestetizzati con Avertin (2,2,2-tribromoetanolo) somministrato per via intraperitoneale e successivamente infettati con il virus influenzale ricombinante WSN/CKG ( $10^6$  PFU/30µl WSN/CKG) o il ceppo selvatico WSN ( $10^3$  PFU/30µl), attraverso due vie alternative: la via intranasale o la via vaginale. Nell'immunizzazione vaginale i topi vengono trattati, 5 giorni prima dell'inoculo del virus, con 2mg di progesterone somministrato sottocute (Depo-Provera; Pharmacia and Upjohn) [Garulli B *et al.* 2004].

Per determinare la Dose Letale Minima 50% (MLD<sub>50</sub>) delle preparazioni stock dei virus impiegati nello studio, gruppi di topi Balb/c di 6 settimane sono stati anestetizzati e infettati con 50µl di virus a dosi scalari in ragione di 10 (5 topi/diluizione). Quindi è stata monitorata la morbidità (% perdita di peso) e la mortalità per un tempo di 21 giorni.

### **6.7 REPLICAZIONE VIRALE NEL TRATTO RESPIRATORIO E VAGINALE DEI TOPI**

Per determinare le capacità di replicazione del virus WSN/CKG nel tratto respiratorio, nella mucosa vaginale e negli organi riproduttori interni quali ovidotti ed ovaie, gruppi di 4 topi sono stati infettati per via intranasale o vaginale. Ai tempi indicati, sono stati prelevati polmoni e turbinati nasali da gruppi di topi immunizzati per via intranasale, ovidotti ed ovaie da gruppi immunizzati per via vaginale. Gli organi sono stati risospesi al 10% (p/v) in PBS, omogeneizzati, centrifugati a 2000 rpm ed impiegati nei saggi di determinazione del corrispondente titolo virale valutato come dose infettante il 50% di colture di cellule MDCK (TCID<sub>50</sub>%). Aliquote di 50µl di diluizioni logaritmiche di ciascun campione, nell'intervallo 10<sup>-1</sup>-10<sup>-9</sup>, sono state impiegate nell'infezione in triplicato di una piastra a 96 pozzetti, contenenti cellule MDCK sub-confluenti. Trascorse 48 ore dall'infezione, 50µl del sopranatante di ciascun pozzetto sono stati analizzati per rilevare la presenza di virus mediante emagglutinazione di un ugual volume di una sospensione di eritrociti di pollo allo 0.5% (v/v) in PBS, ed i dati così raccolti sono stati elaborati per determinare la TCID<sub>50</sub>% mediante il metodo di calcolo di Reed & Muench [Reed LJ & Muench H 1938].

Il titolo virale nei lavaggi vaginali effettuati a vari tempi dall'infezione con due volumi di 50µl di PBS, è stato determinato su cellule MDCK come descritto sopra per gli omogenati di tessuto.

### **6.8 ANALISI DELL'RNA VIRALE MEDIANTE RT-PCR**

Campioni di polmoni, vagina, ovidotti e ovaie, raccolti dopo l'infezione sono stati omogeneizzati in 1ml di Trizol (Invitrogen Life Technologies) e l'RNA totale isolato secondo le istruzioni del reagente Invitrogen. Il cDNA degli RNA messaggeri delle cellule infette è stato ottenuto mediante retrotrascrizione con la reverse trascrittasi SuperScript II e primers oligo(dT)<sub>20</sub> (Invitrogen Life Technologies). L'amplificazione specifica del gene virale HA e del gene di controllo β-actina è stata fatta mediante PCR impiegando il primer forward HA5-29 e il primer reverse HA409-384 per l'HA; per rilevare la β-actina sono stati impiegati i seguenti primers:

primer Fw 5'-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAA-3' (MWG - Biotech);

primer Rev 5'-TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3' (MWG - Biotech).

### **6.9 ISOLAMENTO DELLE POPOLAZIONI LINFOCITARIE**

Le milze, i linfonodi del mediastino (MLN) che drenano il tratto respiratorio e i linfonodi iliaci (ILN) che drenano il tratto vaginale dei topi immunizzati (5 topi/gruppo) sono stati raccolti a differenti intervalli di tempo dopo immunizzazione e le cellule linfoidee disperse meccanicamente fino ad ottenere una sospensione omogenea di cellule singole. Gli eritrociti presenti nella

sospensione cellulare sono stati rimossi mediante lisi in seguito a trattamento per 5 minuti con una soluzione di  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

#### **6.10 SAGGIO ELISPOT IFN- $\gamma$ SPECIFICO**

La determinazione quantitativa dei linfociti T CD8+ che producono IFN- $\gamma$  in seguito a stimolazione con un antigene specifico è stata fatta mediante saggio ELISPOT (enzyme-linked immunospot) seguendo le istruzioni del kit (mouse IFN- $\gamma$  ELISPOT Kit – Pharmingen, BD).

Brevemente, piastre da 96 pozzetti con fondo in nitrocellulosa (MAHA S4510; Millipore) sono state ricoperte con 100 $\mu\text{l}$  di un anticorpo monoclonale (Pharmigen, BD) capace di riconoscere IFN- $\gamma$  prodotto da linfociti di topo, alla concentrazione finale 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , e incubate a 4°C per tutta la notte.

Il giorno seguente è stato effettuato 1 lavaggio con 200 $\mu\text{l}$  di terreno di coltura contenente 10% di siero bovino (FBS), al fine di saturare le interazioni aspecifiche della membrana con proteine ed immunoglobuline sieriche (Blocking solution), e successivamente in ciascun pozzetto sono stati aggiunti 200 $\mu\text{l}$  di Blocking solution e la piastra è stata incubata a temperatura ambiente per 2 ore.

Dopo aver eliminato la Blocking solution, in ciascun pozzetto sono stati aggiunti 100 $\mu\text{l}$  di peptide (ad una concentrazione finale 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) diluito in terreno RPMI1640 supplementato con 10% FBS, e 100 $\mu\text{l}$  della sospensione di linfociti ottenuti dalle milze e dai linfonodi ( $1-2 \times 10^5$  cellule/pozzetto) dei topi sacrificati. I controlli negativi, effettuati per escludere possibili reazioni aspecifiche sono stati allestiti con linfociti incubati con terreno RPMI1640 supplementato con 10% FBS aggiunti ai pozzetti in assenza dei peptidi antigenici specifici. I controlli positivi effettuati per una verifica della specifica reattività del sistema verso l'IFN- $\gamma$  rilasciato dai linfociti T sono stati effettuati mediante l'aggiunta di 50ng/ml di PMA e ionomicina (SIGMA) a 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$  nei pozzetti contenenti linfociti.

Le cellule sono state incubate a 37°C e 5.0% di  $\text{CO}_2$  per 1 giorno, quindi rimosse e le piastrine lavate 1 volta con acqua deionizzata (Millipore) e 3 volte con PBST (PBS, 0.05% Tween 20). Successivamente sono stati aggiunti 100 $\mu\text{l}$  di anticorpo monoclonale (MAb) anti-IFN $\gamma$  coniugato con biotina (ad una concentrazione 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in PBS contenente il 10% FCS. La piastra è stata incubata per 2 ore a temperatura ambiente. I pozzetti sono stati lavati 3 volte con 200  $\mu\text{l}$ /pozzetto di PBST e sono stati distribuiti 100 $\mu\text{l}$ /pozzetto di Streptavidina coniugata ad HRP diluita in PBS e 10% FCS. Dopo l'incubazione di 1 ora a temperatura ambiente, i pozzetti sono stati lavati 4 volte con 200 $\mu\text{l}$  di PBST e 2 volte con 200 $\mu\text{l}$  di PBS. Infine sono stati aggiunti 100 $\mu\text{l}$ /pozzetto di una soluzione di substrato della perossidasi in presenza di un sistema rivelatore (300 $\mu\text{l}$  di soluzione AEC diluiti in 10ml di 0.1M Na-acetato). Non appena evidenziata la comparsa di spot specifici nei pozzetti di controllo positivo, la piastra è stata lavata sotto il rubinetto dell'acqua per arrestare la reazione di colorazione e il numero delle cellule formanti spot (SFCs) è stato determinato mediante

lettura strumentale con il programma AID EliSpot Reader (AID GmbH, Strassberg, Germany). Il numero dei linfociti T CD8<sup>+</sup> antigene-specifici che producono IFN- $\gamma$  è stato calcolato sottraendo il valore dei controlli negativi (background) dalla conta totale delle SFCs di singoli campioni e considerando positivi esclusivamente i valori che superavano di almeno 2 volte il background. L'SFC è definito come la media degli spot dei pozzetti in duplicato per 10<sup>6</sup> linfociti.

### ***6.11 ANALISI DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA MEDIANTE ELISA***

La determinazione del titolo degli anticorpi IgG sierici specifici verso il determinante antigenico P18IIIB di HIV dei topi infettati con il virus WSN/CKG è stata fatta mediante saggio ELISA [Webster RG et al 1983]. Campioni di sangue sono stati raccolti dal plesso retro-orbitale dei topi prima e 30 giorni dopo l'immunizzazione con il virus WSN e WSN/CKG. Il siero è stato raccolto da tali campioni dopo coagulazione e conservato a -70°C fino al momento del saggio.

Per il saggio ELISA, piastrine da 96 pozzetti in polistirene (Nunc-Immuno Plate Maxi Sorp; Nunc Life Technologies) sono state ricoperte con 100 $\mu$ l del peptide P18IIIB (10  $\mu$ M) (Primm, Milano) diluito in 0.1M buffer di carbonato a pH 9.6 e incubate tutta la notte a 4°C. Il giorno seguente i siti di legame aspecifico delle proteine sono stati saturati con 200 $\mu$ l/pozzetto di Blocking solution (1% BSA diluita in PBS) e la piastra è stata incubata 1.5 ore a 4°C, quindi lavata con PBST. Successivamente sono stati distribuiti in triplicato 100 $\mu$ l/pozzetto di siero dei campioni da testare (diluito 1:100 in PBS) e fatta un'incubazione di 1.5 ore a 37°C. In seguito i pozzetti sono stati lavati 5 volte con 200 $\mu$ l di PBST, e sono stati aggiunti 100 $\mu$ l/pozzetto di antisiero policlonale di capra anti-IgG murino coniugato ad una HRP (SIGMA) (diluito 1:5000 in PBST) e la piastra è stata incubata nuovamente 1.5 ore a 37°C. Dopo l'incubazione e 5 lavaggi, gli anticorpi legati specificamente al peptide adsorbito sono stati evidenziati con l'aggiunta di 100 $\mu$ l di substrato della perossidasi TMB (Vector). L'assorbanza del sopranatante di reazione di ciascun campione è stata letta ad una lunghezza d'onda di 450 nm con uno strumento di lettura BioRad.

### ***6.12 RILEVAMENTO DELLA PROTEZIONE VERSO UN'INFEZIONE SECONDARIA CON IL VIRUS VACCINIA RICOMBINANTE***

Gli studi di protezione dei topi immunizzati sono stati eseguiti mediante infezione secondaria con il virus Vaccinia ricombinante esprimente l'intera sequenza della gp160 di HIV-1 IIIB (vPE16) o l'intero gene Gag di HIV-1 IIIB (vDK1) o con un ceppo del virus Vaccinia non ricombinante (vac). I topi vaccinati sono stati infettati, a distanza di 6 settimane dall'immunizzazione, con 2x10<sup>6</sup> PFU/300 $\mu$ l dei rispettivi virus Vaccinia per via intraperitoneale. Sei giorni dopo l'infezione, i topi

sono stati sacrificati e le ovaie sono state raccolte e conservate a -80 °C fino al momento del saggio di titolazione della carica virale presente in questi organi.

Le ovaie di ciascun topo sono state, quindi, omogeneizzate in 1ml di terreno MEM supplementato con 2% FCS e il rilascio di particelle virali favorito maggiormente mediante lisi attraverso ripetuti cicli di congelamento e scongelamento. Il supernatante contenente il virus è stato ottenuto centrifugando la sospensione cellulare a 1500 rpm per 6 minuti. I titoli virali sono stati determinati distribuendo 0.1ml di diluizioni seriali di 1log del supernatante su uno strato confluyente di cellule CV-1. La conta delle placche di lisi è stata effettuata trascorse 48 ore dall'infezione mediante fissazione e successiva colorazione del monostrato cellulare infettato con una soluzione all'1% di cristal violetto. Tutte le titolazioni virali sono state effettuate in triplicato e il valore di PFU/ovaie è il risultato di una media aritmetica +/- la deviazione standard.

# **BIBLIOGRAFIA**

Ahlers JD, Pendleton CD, Dunlop N, Minassian A, Nara PL, Berzofsky JA. 1993. "Construction of an HIV-1 peptide vaccine containing a multideterminant helper peptide linked to a V3 loop peptide 18 inducing strong neutralizing antibody responses in mice of multiple MHC haplotypes after two immunizations". *J Immunol.* 150 (12): 5647-65.

Ahlers JD, Dunlop N, Pendleton CD, Newman M, Nara PL, Berzofsky JA. 1996. "Candidate HIV type 1 multideterminant cluster peptide-P18MN vaccine constructs elicit type 1 helper T cells, cytotoxic T cells, and neutralizing antibody, all using the same adjuvant immunization". *AIDS Res Hum Retroviruses.* 12 (4): 259-72.

Almeida JR, Price DA, Papagno L, Arkoub ZA, Sauce D, Bornstein E, Asher TE, Samri A, Schnuriger A, Theodorou I, Costagliola D, Rouzioux C, Agut H, Marcelin AG, Douek D, Autran B, Appay V. 2007. "Superior control of HIV-1 replication by CD8+ T cells is reflected by their avidity, polyfunctionality, and clonal turnover". *J Exp Med.* 204: 2473-85.

Alter G, Malenfant JM, Delabre RM, Burgett NC, Yu XG, Lichterfeld M, Zaunders J, Altfeld M. 2004. "Increased natural killer cell activity in viremic HIV-1 infection". *J Immunol.* 173: 5305-11.

Barouch DH. 2008. "Challenges in the development of an HIV-1 vaccine". *Nature.* 455(2): 613- 19.

Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dautet C, Axler-Blin C, Vézinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L. 1983. "Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)". *Science.* 220: 868-71.

Belyakov IM, Derby MA, Ahlers JD, Kelsall BL, Earl P, Moss B, Strober W, Berzofsky JA. 1998. "Mucosal immunization with HIV-1 peptide vaccine induces mucosal and systemic cytotoxic T lymphocytes and protective immunity in mice against intrarectal recombinant HIV-vaccinia challenge". *Proc Natl Acad Sci USA.* 95: 1709-14.

Belyakov IM, Hel Z, Kelsall B, Kuznetsov VA, Ahlers JD, Nacsa J, Watkins DI, Allen TM, Sette A, Altman J, Woodward R, Markham PD, Clements JD, Franchini G, Strober W, Berzofsky JA. 2001. "Mucosal AIDS vaccine reduces disease and viral load in gut reservoir and blood after mucosal infection of macaques". *Nat Med.* 7: 1320-26.

Belyakov IM, Ahlers JD, Berzofsky JA. 2004. "Mucosal AIDS vaccines: current status and future directions". *Expert Rev Vaccines.* 3 (4 suppl): 65-73.

- Belyakov IM, Berzofsky JA. 2004. "Immunobiology of mucosal HIV infection and the basis for development of a new generation of mucosal AIDS vaccines". *Immunity*. 20: 247-53.
- Belyakov IM, Kuznetsov VA, Kelsall B, Klinman D, Moniuszko M, Lemon M, Markham PD, Pal P, Clements JD, Lewis MG, Strober S, Franchini G, Berzofsky JA. 2006. "Impact of vaccine-induced mucosal high-avidity CD8+ CTLs in delay of AIDS-viral dissemination from mucosa". *Blood*. 107 (8): 3258-64.
- Belyakov IM, Isakov D, Zhu Q, Dzutsev A, Berzofsky JA. 2007. "A novel functional CTL avidity/activity compartmentalization to the site of mucosal immunization contributes to protection of macaques against simian/human immunodeficiency viral depletion of mucosal CD4+ T cell". *J Immunol*. 178: 7211-21.
- Belyakov IM, Ahlers JD, Nabel GJ, Moss B, Berzofsky AJ. 2008. "Generation of functionally active HIV-1 specific CD8+CTL in intestinal mucosa following mucosal, systemic or mixed prime-boost immunization". *Virology*. 381: 106-15.
- Berzofsky JA, Pendleton CD, Clerici M, Ahlers J, Lucey DR, Putney SD, Shearer GM. 1991. "Construction of peptides encompassing multideterminant clusters of human immunodeficiency virus envelope to induce in vitro T cell responses in mice and humans of multiple MHC types". *J Clin Invest*. 88 (3): 876-84.
- Betts MR, Ambrozak DR, Douek DC, Bonhoeffer S, Brenchley JM, Casazza JP, Koup RA, Picker LJ. 2001. "Analysis of total human immunodeficiency virus (HIV)-specific CD4(+) and CD8(+) T-cell responses: relationship to viral load in untreated HIV infection". *J Virol*. 75: 11983-91.
- Betts MR, Nason MC, West SM, De Rosa SC, Migueles SA, Abraham J, Lederman MM, Benito JM, Goepfert PA, Connors M, Roederer M, Koup RA. 2006. "HIV non-progressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells". *Blood*. 107: 4781-89.
- Blauvelt A, Glushakova S, Margolis LB. 2000. "HIV-infected human Langerhans cells transmit infection to human lymphoid tissue ex vivo". *AIDS*. 14: 647-51.
- Boaz MJ, Waters A, Murad S, Easterbrook PJ, Vyakarnam A. 2002. "Presence of HIV-1 gag-specific IFN $\gamma$  + IL-2+ and CD2+ IL-2+ CD4+ T cell responses is associated with non-progression in HIV-1 infection". *J Immunol*. 169: 6376-6385.
- Bodmer HC, Pemberton RM, Rothbard JB, Askonas BA. 1988. Enhanced recognition of a modified peptide antigen by cytotoxic T cells specific for influenza nucleoprotein. *Cell*. 52: 253-8.

- Borghans JA, Molgaard A, de Boer RJ, Kesmir C. 2007. "HLA alleles associated with slow progression to AIDS truly prefer to present HIV-1 p24". *PLoS ONE*. 2: e920.
- Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MB. 1994. "Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primate human immunodeficiency virus type 1 infection". *J Virol*. 68: 6103-10.
- Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, Kazzaz Z, Bornstein E, Lambotte O, Altmann D, Blazar BR, Rodriguez B, Teixeira-Johnson L, Landay A, Martin JN, Hecht FM, Picker LJ, Lederman MM, Deeks SG, Douek DC. 2006. "Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection". *Nature Med*. 12: 1365-71.
- Bruña-Romero O, González-Aseguinolaza G, Hafalla JCR, Tsuji M, Nussenzweig RS. 2001. "Complete, long-lasting protection against malaria of mice primed and boosted with two distinct viral vectors expressing the same plasmodial antigen". *Proc Natl Acad Sci USA*. 98: 11491-96.
- Buchbinder SP, Mehrotra DV, Duerr A, Fitzgerald DW, Mogg R, Li D, Gilbert PB, Lama JR, Marmor M, Del Rio C, McElrath MJ, Casimiro DR, Gottesdiener KM, Chodakewitz JA, Corey L, Robertson MN; Step Study Protocol Team. 2008. Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial. *Lancet*. 372 (9653): 1881-93.
- Carrington M, O'Brien SJ. 2003. "The influence of HLA genotype on AIDS". *Annu Rev Med*. 54: 535-51.
- Castrucci MR, Bilsel P, Kawaoka Y. 1992. "Attenuation of influenza A virus by insertion of a foreign epitope into the neuraminidase". *J Virol*. 66: 4647-53.
- Castrucci MR, Kawaoka Y. 1993. "Biologic importance of neuraminidase stalk length in influenza A virus". *J Virol*. 67(2): 759-64.
- Castrucci MR, Hou S, Doherty PC, Kawaoka Y. 1994. "Protection against lethal lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) infection by immunization of mice with an influenza virus containing an LCMV epitope recognized by cytotoxic T lymphocytes". *J Virol*. 68: 3486-90.
- Chapman TJ, Castrucci MR, Padrick RC, Bradley LM, Topham DJ. 2005. "Antigen-specific and non-specific CD4+ T cell recruitment and proliferation during influenza infection". *Virology*. 340(2): 296-306.
- Chen B, Vogan EM, Gong H, Skehel JJ, Wiley DC, Harrison SC. 2005. Structure of an unliganded simian immunodeficiency virus gp120 core. *Nature*. 433: 834-41.

- Clerici M, Stocks NI, Zajac RA, Boswell RN, Bernstein DC, Mann DL, Shearer GM, Berzofsky JA. 1988. "Interleukin-2 production used to detect antigenic peptide recognition by T-helper lymphocytes from asymptomatic HIV-seropositive individuals". *Nature*. 339 (6223): 383-5.
- Coffin J, Haase A, Levy JA, Montagnier L, Oroszlan S, Teich N, Temin H. 1986. "What to call the AIDS virus?". *Nature*. 321: 10.
- Critchfield JW, Lemongello D, Walker DH, Garcia JC, Asmuth DM, Pollard RB, Shacklett BL. 2007. "Multifunctional human immunodeficiency virus (HIV) gag-specific CD8+ T-cell responses in rectal mucosa and peripheral blood mononuclear cells during chronic HIV type 1 infection". *J Virol*. 81: 5460-71.
- Dale CJ, Thomson S, De Rose R, Ranasinghe C, Medveczky CJ, Pamungkas J, Boyle DB, Ramshaw IA, Kent SJ. 2006. "Prime-boost strategies in DNA vaccines". *Methods Mol Med*. 127: 171-197.
- Deeks SG, Walker BD. 2007. "Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy". *Immunity*. 27: 406-16.
- de Jong MA & Geijtenbeek TB. 2008. Human immunodeficiency virus-1 acquisition in genital mucosa: Langerhans cells as key-players. *J Inter Med*. 265 (1): 18-28.
- den Uyl D, van der Horst-Bruinsma IE, van Agtmael M. 2004. "Progression of HIV to AIDS: a protective role for HLA-B27?". *AIDS Rev*. 6: 89-96.
- Derby M, Alexander-Miller M, Tse R, Berzofsky J. 2001. "High-avidity CTL exploit two complementary mechanisms to provide better protection against viral infection than low-avidity CTL". *J Immunol*. 166 (3): 1690-7.
- de Witte L, Nabatov A, Pion M, Fluitsma D, de Jong MA, de Gruijl T, Piguet V, van Kooyk Y, Geijtenbeek TB. 2007. "Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells". *Nat Med*. 13: 367-71.
- Douek DC, Brenchley JM, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Okamoto Y, Casazza JP, Kuruppu J, Kunstman K, Wolinsky S, Grossman Z, Dybul M, Oxenius A, Price DA, Connors M, Koup RA. 2002. "HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells". *Nature*. 417: 95-98.
- Dupuy C, Buzoni-Gatel D, Touzé A, Bout D, Coursaget P. 1999. "Nasal immunization of mice with human papillomavirus type 16 (HPV-16) virus-like particles or with the HPV-16 L1 gene elicits specific cytotoxic T lymphocytes in vaginal draining lymph nodes". *J Virol*. 73 (11): 9063-71.

- Emu B, Sinclair E, Hatano H, Ferre A, Shacklett B, Martin JN, McCune JM, Deeks SG. 2008. "HLA class I-restricted T cell responses may contribute to the control of HIV infection, but such responses are not always necessary for long-term virus control". *J Virol.* 82: 5398-407.
- Epstein SL, Lo CY, Misplon JA, Bennink JR. 1998. "Mechanism of protective immunity against influenza virus infection in mice without antibodies". *J Immunol.* 160: 322-27.
- Eriksson K, Holmgren J. 2002. "Recent advances in mucosal vaccines and adjuvants". *Curr Opin Immunol.* 14: 666-72.
- Ferko B, Katinger D, Grassauer A, Egorov A, Romanova J, Niebler B, Katinger H, Muster T. 1998. "Chimeric influenza virus replicating predominantly in the murine upper respiratory tract induces local immune responses against human immunodeficiencyvirus type 1 in the genital tract". *J Infect Dis.* 178: 1359-68.
- Ferko B, Stasakova J, Sereinig S, Romanova J, Katinger D, Niebler B, Katinger H, Egorov A. 2001. "Hyperattenuated recombinant influenza A virus nonstructural-protein-encoding vectors induce human immunodeficiency virus type 1 Nef-specific systemic and mucosal immune responses in mice". *J Virol.* 75: 8899-908.
- Ferre AL, Hunt PW, Critchfield JW, Young DH, Morris MM, Garcia JC, Pollard RB, Yee HF Jr, Martin JN, Deeks SG, Shacklett BL. 2009. "Mucosal immune responses to HIV-1 in elite controllers: a potential correlate of immune control". *Blood.* 113 (17): 3978-89.
- Finzi D, Siliciano RF. 1998. "Viral dynamics in HIV-1 infection". *Cell.* 93: 665-71.
- Fong L, Mengozzi M, Abbey NW, Herndier BG, Engleman EG. 2002. "Productive infection of plasmacytoid dendritic cells with human immunodeficiency virus type 1 is triggered by CD40 ligation". *J Virol.* 76: 11033-41.
- Fonteneau JF, Larsson M, Beignon AS, McKenna K, Dasilva I, Amara A, Liu YJ, Lifson JD, Littman DR, Bhardwaj N. 2004. "Human immunodeficiency virus type 1 activates plasmacytoid dendritic cells and concomitantly induces the bystander maturation of myeloid dendritic cells". *J Virol.* 78: 5223-32.
- Gallichan WS, Rosenthal KL. 1996. "Long-lived cytotoxic T lymphocyte memory in mucosal tissues after mucosal but not systemic immunization". *J Exp Med.* 184 (5): 1879-90.

- Gallichan WS, Rosenthal KL. 1998. "Long-term immunity and protection against herpes simplex virus type 2 in the murine female genital tract after mucosal but not systemic immunization". *J Infect Dis.* 177 (5): 1155-61.
- García-Sastre A, Muster T, Barclay WS, Percy N, Palese P. 1994. "Use of a mammalian internal ribosomal entry site element for expression of a foreign protein by a transfectant influenza virus". *J Virol.* 68: 6254-61.
- Garulli B, Kawaoka Y, Castrucci MR. 2004. "Mucosal and systemic immune responses to a human immunodeficiency virus type 1 epitope induced upon vaginal infection with a recombinant influenza A virus". *J. Virol.* 78: 1020-25.
- Garulli B, Meola M, Stillitano MG, Kawaoka Y, Castrucci MR. 2007. "Efficient vagina-to-lower respiratory tract immune trafficking in a murine model of influenza A virus infection". *Virology.* 361: 274-82.
- Garulli B, Stillitano MG, Barnaba V, Castrucci MR. 2008. "Primary CD8+ T-Cell Response to Soluble Ovalbumin Is Improved by Chloroquine Treatment In Vivo". *Clinical and vaccine immunology* 15 (10): 1497-504.
- Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Middel J, Cornelissen IL, Nottet HS, KewalRamani VN, Littman DR, Figdor CG, van Kooyk Y. 2000. "DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells". *Cell.* 100: 587-97.
- Gherardi MM, Najera JL, Perez-Jimenez E, Guerra S, Garcia-Sastre A, Esteban M. 2003. "Prime-boost immunization schedules based on influenza virus and vaccinia virus vectors potentiate cellular immune responses against human immunodeficiency virus Env protein systemically and in the genitoretal draining lymph nodes". *J Virol.* 77: 7048-57.
- Gherardi MM, Esteban M. 2005. Recombinant poxviruses as mucosal vaccine vectors. *J Gen Virol.* 86 (Pt 11): 2925-36.
- Goldrath AW, Sivakumar PV, Glaccum M, Kennedy MK, Bevan MJ, Benoist C, MathisD, Butz EA. 2002. "Cytokine requirements for acute and basal homeostatic proliferation of naïve and memory CD8+ T cells". *J Exp Med.* 195: 1515-22.
- González-Aseguinolaza G, Nakaya Y, Molano A, Dy E, Esteban M, Rodríguez D, Rodríguez JR, Palese P, García-Sastre A, Nussenzweig RS. 2003. "Induction of protective immunity against malaria by primingboosting immunization with recombinant cold-adapted influenza and modified vaccinia Ankara

viruses expressing a CD8+ T-cell epitope derived from the circumsporozoite protein of *Plasmodium yoelii*". *J Virol.* 77: 11859-66.

Goulder PJ, Altfeld MA, Rosenberg ES, Nguyen T, Tang Y, Eldridge RL, Addo MM, He S, Mukherjee JS, Phillips MN, Bunce M, Kalams SA, Sekaly RP, Walker BD, Brander C. 2001. "Substantial differences in specificity of HIV-specific cytotoxic T cells in acute and chronic HIV infection". *J Exp Med.* 193: 181-94.

Gray RH, Wawer MJ, Brookmeyer R, Sewankambo NK, Serwadda D, Wabwire-Mangen F, Lutalo T, Li X, vanCott T, Quinn TC, Rakai Project Team. 2001. "Probability of HIV-1 transmission per coital act in monogamous, heterosexual, HIV-1-discordant couples in Rakai, Uganda". *Lancet.* 357: 1149-53.

Haase AT. 2005. "Perils at mucosal front lines for HIV and SIV and their hosts". *Nat Rev Immunol.* 5: 783-92.

Hanke T, McMichael AJ. 2000. "Design and construction of an experimental HIV-1 vaccine for a year-2000 clinical trial in Kenya". *Nat Med.* 6: 951-55.

Jin X, Bauer DE, Tuttleton SE, Lewin S, Gettie A, Blanchard J, Irwin CE, Safrit JT, Mittler J, Weinberger L, Kostrikis LG, Zhang L, Perelson AS, Ho DD. 1999. Dramatic rise in plasma viremia after CD8+ T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *J Exp Med.* 189: 991-98.

Joannidis JP, McQueen PG, Goedert JJ, Kaslow RA. 1998. "Use of neural networks to model complex immunogenetic association of disease: human leukocyte antigen impact on the progression of human immunodeficiency virus infection. Am". *J Epidemiol* 147: 464-71.

Kaul R, Plummer FA, Kimani J, Dong T, Kiama P, Rostron T, Njagi E, MacDonald KS, Bwayo JJ, McMichael AJ, Rowland-Jones SL. 2000. "HIV-1-Specific Mucosal CD8+ Lymphocyte Responses in the Cervix of HIV-1- Resistant Prostitutes in Nairobi". *J Immunol.* 164: 1602-11.

Kent SJ, Zhao A, Best SJ, Chandler JD, Boyle DB, Ramshaw IA. 1998. "Enhanced T-cell immunogenicity and protective efficacy of a human immunodeficiency virus type 1 vaccine regimen consisting of consecutive priming with DNA and boosting with recombinant fowlpox virus". *J Virol.* 72: 10180-88.

Kersten G, Hirschberg H. 2004. "Antigen delivery systems". *Expert Rev Vaccines* 3: 453-62.

Klavinski LS, Barnfield C, Gao L, Parker S. 1999. "Intranasal immunization with plasmid DNA-lipid complexes elicits mucosal immunity in the female genital and rectal tracts". *J Immunol.* 162(1):254-62.

- Korber B, Muldoon M, Theiler J, Gao F, Gupta R, Lapedes A, Hahn BH, Wolinsky S, Bhattacharya T. 2000. "Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains". *Science* 288: 1789-96.
- Kown DS, Gregorio G, Bitton N, Hendrickson WA, Littmam DR. 2002. "DC-SIGN-mediated internalization of HIV is requie for trans-enhancement of T cell infection". *Immunity*. 16: 135-44.
- Kwong PD, Doyle ML, Casper DJ, Cicala C, Leavitt SA, Majeed S, Steenbeke TD, Venturi M, Chaiken I, Fung M, Katinger H, Parren PW, Robinson J, Van Ryk D, Wang L, Burton DR, Freire E, Wyatt R, Sodroski J, Hendrickson WA, Arthos J. 2002. "HIV evades antibody-mediated neutralization through conformational masking of receptor-binding sites". *Nature*. 420: 678-82.
- Lehner T, Wang Y, Cranage M, Bergmeier LA, Mitchell E, Tao L, Hall G, Dennis M, Cook N, Brookes R, Klavinskis L, Jones I, Doyle C, Wards R. 1996. "Protective mucosal immunity elicited by targeted iliac lymph node immunization with a subunit SIV envelope and core vaccine in macaques". *Nat Med*. 2: 767-75.
- Lehner T, Bergmeier L, Wang Y, Tao L, Mitchell E. 1999. "A rational basis for mucosal vaccination against HIV infection". *Immunol. Rev*. 170: 183-96.
- Letvin NL, Rao SS, Dang V, Buzby AP, Koriath-Schmitz B, Dombagoda D, Parvani JG, Clarke RH, Bar L, Carlson KR, Kozlowski PA, Hirsch VM, Mascola JR, Nabel GJ. 2007. "No evidence for consistent virus-specific immunity in simian immunodeficiency virus exposed, uninfected rhesus monkeys". *J Virol*. 81: 12368-74.
- Li Q, Duan L, Estes JD, Ma ZM, Rourke T, Wang Y, Reilly C, Carlis J, Miller CJ, Haase AT. 2005. "Peak SIV replication in resting memory CD4+ T cells depletes gut lamina propria CD4+ T cells". *Nature*. 434: 1148-52.
- Li S, Schulman J, Moran T, Bona C, Palese P. 1992. Influenza A virus transfectants with chimeric hemagglutinins containing epitopes from different subtypes. *J Virol*. 66 (1): 399-404.
- Li S, Polonis V, Isobe H, Zaghoulani H, Guinea R, Moran T, Bona C, Palese P. 1993a. "Chimeric influenza virus induces neutralizing antibodies and cytotoxic T cells against human immunodeficiency virus type 1". *J Virol*. 67: 6659-66.
- Li S, Rodrigues M, Rodriguez D, Rodriguez JR, Esteban M, Palese P, Nussenzweig RS, Zavala F. 1993b. "Priming with recombinant influenza virus followed by administration of recombinant vaccinia virus induces CD8+ T-cell-mediated protective immunity against malaria". *Proc Natl Acad Sci USA*. 90: 5214-18.

- Li ZN, Mueller SN, Ye L, Bu Z, Yang C, Ahmed R, Steinhauer DA. 2005. "Chimeric influenza virus hemagglutinin proteins containing large domains of the Bacillus anthracis protective antigen: protein characterization, incorporation into infectious influenza viruses, and antigenicity". *J Virol.* 79 (15): 10003-12.
- Liang S, Mozdzanowska K, Palladino G, Gerhard W. 1994. "Heterosubtypic immunity to influenza type A virus in mice: effector mechanisms and their longevity". *J Immunol.* 152: 1653-61.
- Ling B, Veazey RS, Hart M, Lackner AA, Kuroda M, Pahar B, Marx PA. 2007. "Early restoration of mucosal CD4 memory CCR5 T cells in the gut of SIV-infected rhesus predicts long term non-progression". *AIDS.* 21: 2377-85.
- López-Vázquez A, Miña-Blanco A, Martínez-Borra J, Njobvu PD, Suárez-Alvarez B, Blanco-Gelaz MA, González S, Rodrigo L, López-Larrea C. 2005. "Interaction between KIR3DL1 and HLA-B\*57 supertype alleles influences the progression of HIV-1 infection in a Zambian population". *Hum Immunol.* 66: 285-9.
- Luyties W, Kristal M, Enami M, Pavin JD, Palese P. 1989. "Amplification, expression and packaging of a foreign gene by influenza virus". *Cell.* 58: 1107-13.
- Maher D, Wu X, Schacker T, Horbul J, Southern P. 2005. "HIV binding, penetration, and primary infection in human cervicovaginal tissue". *Proc Natl Acad Sci USA.* 102: 11504-9.
- Makedonas G, Betts MR. 2006. "Polyfunctional analysis of human T cell responses: importance in vaccine immunogenicity and natural infection". *Springer Semin Immunopathol.* 28: 209-19.
- Mäkitalo B, Lundholm P, Hinkula J, Nilsson C, Karlén K, Mörner A, Sutter G, Erfle V, Heeney JL, Wahren B, Biberfeld G, Thorstensson R. 2004. "Enhanced cellular immunity and systemic control of SHIV infection by combined parenteral and mucosal administration of a DNA prime MVA boost vaccine regimen". *J Gen Virol.* 85: 2407-19.
- Masopust D, Vezys V, Marzo AL, Lafrancois L. 2001. "Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue". *Science.* 291: 2413-17.
- Masopust D. 2008. "Developing an HIV cytotoxic T-lymphocyte vaccine: issues of CD8 T-cell quantity, quality and location". *J Inter Med.* 265: 125-37.

- Mata M, Travers PJ, Liu Q, Frankel FR, Paterson Y. 1998. The MHC class I-restricted immune response to HIV-gag in BALB/c mice selects a single epitope that does not have a predictable MHC-binding motif and binds to Kd through interactions between a glutamine at P3 and pocket D. *J Immunol.* 61 (6): 2985-93.
- Mattapallil JJ, Douek DC, Hill B, Nishimura Y, Martin M, Roeder M. 2005. "Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection". *Nature.* 434: 1093-97.
- McChesney MB, Collins JR, Lu D, Lu X, Torten J, Ashley RL, Cloyd MW, Miller CJ. 1998. "Occult systemic infection and persistent simian immunodeficiency virus (SIV)-specific CD4(+)-T-cell proliferative responses in rhesus macaques that were transiently viremic after intravaginal inoculation of SIV". *J Virol.* 72: 10029-35.
- McMichael AJ. 2006. "HIV vaccines". *Annu Rev Immunol.* 24: 227-55.
- McShane H. 2002. "Prime-boost immunization strategies for infectious diseases". *Curr Opin Mol Ther.* 4: 23-27.
- Migueles SA, Laborico AC, Shupert WL, et al. 2002. "HIV-specific CD8+ T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors." *Nat Immunol.* 3: 1061-68.
- Miller CJ, Li Q, Abel K, Kim EY, Ma ZM, Wietgreffe S, La Franco-Scheuch L, Compton L, Duan L, Shore MD, Zupancic M, Busch M, Carlis J, Wolinsky S, Haase AT. 2005. "Propagation and dissemination of infection after vaginal transmission of simian immunodeficiency virus". *J Virol.* 79: 9217-27.
- Moore CB, John M, James IR, Christiansen FT, Witt CS, Mallal SA. 2002. "Evidence of HIV-1 adaptation to HLA-restricted immune responses at a population level". *Science.* 296: 1439-43.
- Murata K, García-Sastre A, Tsuji M, Rodrigues M, Rodriguez D, Rodriguez JR, Nussenzweig RS, Palese P, Esteban M, Zavala F. 1996. "Characterization of in vivo primary and secondary CD8+ T cell responses induced by recombinant influenza and vaccinia viruses". *Cell Immunol.* 173: 96-107.
- Muster T, Ferko B, Klima A, Purtscher M, Trkola A, Schulz P, Grassauer A, Engelhardt OG, Garcia-Sastre A, Palese P, Katinger H. 1995. "Mucosal model of immunization against human immunodeficiency virus type 1 with a chimeric influenza virus". *J Virol.* 69: 6678-86.

- Myszka DG, Sweet RW, Hensley P, Brigham-Burke M, Kwong PD, Hendrickson WA, Wyatt R, Sodroski J, Doyle ML. 2000. "Energetics of the HIV gp120-CD4 binding reaction". *Proc Natl Acad Sci USA*. 97: 9026-31.
- Nakaya Y, Zheng H, García-Sastre A. 2003. "Enhanced cellular immune responses to SIV Gag by immunization with influenza and vaccinia virus recombinants". *Vaccine*. 21 (17-18): 2097-106.
- Neumann G, Watanabe T, Ito H, Watanabe S, Goto H, Gao P, Hughes M, Perez DR, Donis R, Hoffmann E, Hobom G, Kawaoka Y. 1999. "Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96 (16): 9345-50.
- Nguyen HH, Moldoveanu Z, Novak MJ, Van Ginkel FW, Ban E, Kiyono H, McGhee JR, Mestecky J. 1999. "Heterosubtypic immunity to lethal influenza A virus infection is associated with virus-specific CD8+ cytotoxic T lymphocyte responses induced in mucosa-associated tissues". *Virology*. 254: 50-60.
- Nguyen HH, van Ginkel FW, Vu HL, McGhee JR, Mestecky J. 2001. "Heterosubtypic immunity to influenza A virus infection requires B cells but not CD8+ cytotoxic T lymphocytes". *J Infect Dis*. 183: 368-76.
- Palese P, Zavala F, Muster T, Nussenzweig RS, Garcia-Sastre A. 1997. "Development of novel influenza virus vaccines and vectors". *J Infect Dis*. 176: S45-S49.
- Pantaleo G, Koup RA. 2004. "Correlates of immune protection in HIV-1 infection: what we know, what we don't know, what we should know". *Nat Med*. 10: 806-10.
- Phillips AN. 1996. "Reduction of HIV concentration during acute infection: independence from a specific immune response". *Science*. 271: 497-99.
- Phillips RE, Rowland-Jones S, Nixon DF, Gotch FM, Edwards JP, Ogunlesi AO, Elvin JG, Rothbard JA, Bangham CR, Rizza CR, McMichael AJ. 1991. "Human immunodeficiency virus genetic variation that can escape cytotoxic T cell recognition". *Nature*. 354: 453-59.
- Pope M, Betjes MG, Romani N, Hirmand H, Cameron PU, Hoffman L, Gezelter S, Schuler G, Steinman RM. 1994. "Conjugates of dendritic cells and memory T lymphocytes from skin facilitate productive infection with HIV-1". *Cell*. 78: 389-98.
- Pope M, Haase AT. 2003. "Transmission, acute HIV-1 infection and the quest for strategies to prevent infection". *Nat Med*. 9: 847-52.

- Prevec L, Schneider M, Rosenthal KL, Belbeck LW, Derbyshire JB, Graham FL. 1989. "Use of human adenovirus-based vectors for antigen expression in animals". *J Gen Virol.* 70: 429-34.
- Pulendran B, Palucka K, Banchereau J. 2001. "Sensing pathogens and tuning immune responses". *Science.* 293: 253-56.
- Ramshaw IA, Ramsay AJ. 2000. "The prime-boost strategy: exciting prospects for improved vaccination". *Immunol Today.* 21: 163-65.
- Ranasinghe C, Turner SJ, McArthur C, Sutherland DB, Kim JH, Doherty PC, Ramshaw IA. 2007. "Mucosal HIV-1 poxvirus prime-boost immunization induces high-avidity CD8<sup>+</sup> T cells with regime-dependent cytokine/granzyme B profiles". *J Immunol.* 178 (4): 2370-79.
- Reece JC, Handley AJ, Anstee EJ, Morrison WA, Crowe SM, Cameron PU. 1998. "HIV selection by epidermal dendritic cells during transmission across human skin". *J Exp Med.* 187: 1623-31.
- Reed Lj, Muench H. 1938. "A simple method of estimating fifty per cent endpoints". *Am J Hyg.* 27: 493-7.
- Richman DD, Wrin T, Little SJ, Petropoulos CJ. 2003. "Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection". *Proc Natl Acad Sci USA.* 100: 4144-49.
- Rolland M, Heckerman D, Deng W, Rousseau CM, Coovadia H, Bishop K, Goulder PJ, Walker BD, Brander C, Mullins JI. 2008. "Broad and Gag-biased HIV-1 epitope repertoires are associated with lower viral loads". *PLoS ONE.* 3: e1424.
- Royce RA, Sena A, Cates W Jr, Cohen MS. 1997. "Sexual transmission of HIV". *N Engl J Med.* 336: 1072-8.
- Sáez-Ciri3n A, Lacabartz C, Lambotte O, Versmisse P, Urrutia A, Boufassa F, Barré-Sinoussi F, Delfraissy JF, Sinet M, Pancino G, Venet A, Agence Nationale de Recherches sur le Sida EP36 HIV Controllers Study Group. 2007. "HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype". *Proc Natl Acad Sci USA.* 104: 6776-81.
- Safrit JT, Andrews CA, Zhu T, Ho DD, Koup RA. 1994. "Characterization of human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocyte clones isolated during acute seroconversion: recognition of autologous virus sequences within a conserved immunodominant epitope". *J Exp Med.* 179: 463-72.

- Sallusto F, Lening D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. 1999. "Two subset of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions". *Nature*. 401: 708-12.
- Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. 2004. "Central memory and effector memory T cell subset: function, generation, and maintenance". *Annu Rev Immunol*. 22: 745-63.
- Schluns KS, Lefrancois L. 2003. "Cytokine control of memory T-cell development and survival". *Nat Rev Immunol*. 3: 269-79.
- Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S, Sasseville VG, Simon MA, et al. 1999. "Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes". *Science*. 283: 857-60.
- Schneider J, Gilbert SC, Hannan CM, Degano P, Prieur E, Sheu EG, Plebanski M, Hill AV. 1999. "Induction of CD8+ T cells using heterologous prime-boost immunisation strategies". *Immunol Rev*. 170: 29-38.
- Seder RA, Darrah PA, Roederer M. 2008. "T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design". *Nat Rev Immunol*. 8: 247-58.
- Sereinig S, Stukova M, Zabolotnyh N, Ferko B, Kittel C, Romanova J, Vinogradova T, Katinger H, Kiselev O, Egorov A. 2006. Influenza virus NS vectors expressing the mycobacterium tuberculosis ESAT-6 protein induce CD4+ Th1 immune response and protect animals against tuberculosis challenge. *Clin Vaccine Immunol*. 13 (8): 898-904.
- Shirai M, Pendleton CD, Berzofsky JA. 1992. "Broad recognition of cytotoxic T cell epitopes from the HIV-1 envelope protein with multiple class I histocompatibility molecules". *J Immunol*. 148 (6): 1657-67.
- Shirai M, Kurokohchi K, Pendleton CD, Arichi T, Boyd LF, Takahashi H, Margulies DH, Berzofsky JA. 1996. "Reciprocal cytotoxic T lymphocyte cross-reactivity interactions between two major epitopes within HIV-1 gp160". *J Immunol*. 157 (10): 4399-411.
- Staczek J, Gilleland HE Jr, Gilleland LB, Harty RN, García-Sastre A, Engelhardt OG, Palese P. 1998. A chimeric influenza virus expressing an epitope of outer membrane protein F of *Pseudomonas aeruginosa* affords protection against challenge with *P. aeruginosa* in a murine model of chronic pulmonary infection. *Infect Immun*. 66 (8): 3990-4.

- Steel J, Lowen AC, Pena L, Angel M, Solórzano A, Albrecht R, Perez DR, García-Sastre A, Palese P. 2009. "Live attenuated influenza viruses containing NS1 truncations as vaccine candidates against H5N1 highly pathogenic avian influenza". *J Virol.* 83 (4): 1742-53.
- Stevenson PG, Belz GT, Castrucci MR, Altman JD, Doherty PC. 1999. A gamma-herpesvirus sneaks through a CD8(+) T cell response primed to a lytic-phase epitope. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96 (16): 9281-6.
- Streeck H, Lichterfeld M, Alter G, Meier A, Teigen N, Yassine-Diab B, Sidhu HK, Little S, Kelleher A, Routy JP, Rosenberg ES, Sekaly RP, Walker BD, Altfeld M. 2007. "Recognition of a defined region within p24 gag by CD8+ T cells during primary human immunodeficiency virus type 1 infection in persons expressing protective HLA class I alleles". *J Virol.* 81: 7725-31.
- Takahashi H, Cohen J, Hosmalin A, Cease KB, Houghten R, Cornette JL, DeLisi C, Moss B, Germain RN, Berzofsky JA. 1988. "An immunodominant epitope of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp160 recognized by class I major histocompatibility complex molecule-restricted murine cytotoxic T lymphocytes". *Proc Natl Acad Sci USA.* 85 (9): 3105-9.
- Tan JT, Ernst B, Kieper WC, LeRoy E, Sprent J, Surth CD. 2002. "Interleukin (IL)-15 and IL-7 jointly regulate homeostatic proliferation of memory phenotype CD8+ cells but are not required for memory phenotype CD4+ cells". *J Exp Med.* 195: 1523-32.
- Taylor PM, Askonas BA. 1986. "Influenza nucleoprotein-specific cytotoxic T-cell clones are protective in vivo". *Immunology.* 58: 417-20.
- Topham DJ, Castrucci MR, Wingo FS, Belz GT, Doherty PC. 2001. "The role of antigen in the localization of naive, acutely activated, and memory CD8(+) T cells to the lung during influenza pneumonia". *J Immunol.* 167 (12): 6983-90.
- Tumpey TM, Renshaw M, Clements JD, Katz JM. 2001. "Mucosal delivery of inactivated influenza vaccine induces B-cell-dependent heterosubtypic cross-protection against lethal influenza A H5N1 virus infection". *J Virol.* 75: 5141-50.
- Vieira Machado A, Naffakh N, Gerbaud S, van der Werf S, Escriou N. 2006. Recombinant influenza A viruses harboring optimized dicistronic NA segment with an extended native 5' terminal sequence: induction of heterospecific B and T cell responses in mice. *Virology.* 345 (1): 73-87.

Voltan R, Robert-Guroff M. 2003. "Live recombinant vectors for AIDS vaccine development". *Curr Mol Med.* 3: 273-84.

Wang SW, Bertley FM, Kozlowski PA, Herrmann L, Manson K, Mazzara G, Piatak M, Johnson RP, Carville A, Mansfield K, Aldovini A. 2004. "An SHIV DNA/MVA rectal vaccination in macaques provides systemic and mucosal virus-specific responses and protection against AIDS". *AIDS Res Hum Retroviruses.* 20: 846-59.

Webster RG, Brown LE, Jackson DC. 1983. "Change in antigenicity of the hemagglutinin molecule of H3 influenza virus at acidic pH". *Virology.* 126: 587-99.

Wei X, Decker JM, Wang S, Hui H, Kappes JC, Wu X, Salazar-Gonzalez JF, Salazar MG, Kilby JM, Saag MS, Komarova NL, Nowak MA, Hahn BH, Kwong PD, Shaw GM. 2003. "Antibody neutralization and escape by HIV-1". *Nature.* 422: 307-12.

Wilson JD, Ogg GS, Allen RL, Davis C, Shaunak S, Downie J, Dyer W, Workman C, Sullivan S, McMichael AJ, Rowland-Jones SL. 2000. "Direct visualization of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes during primary infection". *AIDS.* 14: 225-33.

Wyatt R, Kwong PD, Desjardins E, Sweet RW, Robinson J, Hendrickson WA, Sodroski JG. 1998. The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature.* 393: 705-11.

Yewdell, JW, Bennink JR, Smith GL, Moss B. 1985. "Influenza virus nucleoprotein is a major target antigen for cross-reactive anti-influenza A virus cytotoxic T lymphocytes". *Proc Natl Acad Sci USA.* 82: 1785-89.

Zuñiga R, Lucchetti A, Galvan P, Sanchez S, Sanchez C, Hernandez A, Sanchez H, Frahm N, Linde CH, Hewitt HS, Hildebrand W, Altfeld M, Allen TM, Walker BD, Korber BT, Leitner T, Sanchez J, Brander C. 2006. "Relative dominance of Gag p24-specific cytotoxic T lymphocytes is associated with human immunodeficiency virus control." *J Virol.* 80: 3122-25.