

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO**

**Facoltà di Medicina e Chirurgia**

**XXIV CICLO DOTTORATO DI RICERCA IN**

**MALATTIE INFETTIVE**



**FATTORI UMORALI PROTETTIVI COME STRUMENTI PER  
LA GENERAZIONE DI VACCINI EFFICACI CONTRO  
L'INFEZIONE DA HIV**

Relatore: **Prof. Massimo Galli**

Correlatore / Tutor: **Dr.sa Lucia Lopalco**

Tesi di Dottorato

**Dr. Lorenzo Diomedè**

n. matricola: R08269

Anno Accademico 2010/2011

*Alla mia famiglia e alla mia futura sposa*

## Indice

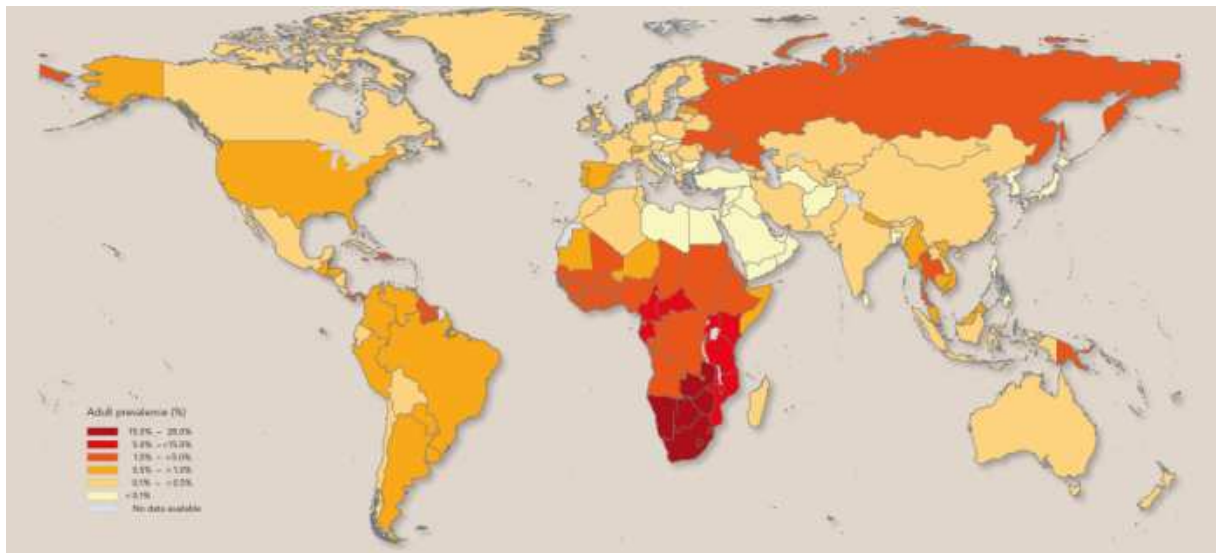
1. INTRODUZIONE .....	5
1.1 GENERALITA' DI HIV .....	5
1.2 DECORSO NATURALE E PATOGENESI DELL'INFEZIONE DA HIV .....	8
1.3 DIFFERENTE CONTROLLO DELLA MALATTIA.....	11
1.4 CORRELATI DI PROTEZIONE NELLE DIVERSE POPOLAZIONI.....	14
1.4.1 FATTORI VIRALI .....	15
1.4.2 FATTORI GENETICI.....	17
1.4.3 FATTORI IMMUNOLOGICI: <i>immunità innata</i> .....	20
1.4.4 FATTORI IMMUNOLOGICI: <i>immunità cellulo-mediata</i> .....	23
1.4.4.1 <i>Cellule T CD4+</i> .....	24
1.4.4.2 <i>Cellule T CD8+</i> .....	26
1.4.5 FATTORI IMMUNOLOGICI: <i>immunità umorale</i> .....	28
1.4.5.1 <i>Immunità umorale anti-HIV:</i> .....	28
1.4.5.2 <i>Immunità umorale anti-cellula</i> .....	36
1.5 STRATEGIE VACCINALI BASATE SULLO STUDIO DEI CORRELATI UMORALI PROTETTIVI NATURALI .....	38
1.5.1 Vaccini anti- <i>envelope</i> virale.....	38
1.5.2 Vaccini anti-CCR5 .....	42
2. SCOPO DELLA TESI .....	44
3. MATERIALI E METODI .....	45
3.1 STUDIO I.....	45
3.2 STUDIO II.....	49
3.3 STUDIO III .....	51
3.4 STUDIO IV .....	54
3.5 STUDIO V .....	58
4. RISULTATI.....	61
4.1 <b>Valutazione di risposte umorali nell'infezione da HIV come possibili correlati di protezione (STUDIO I)</b> .....	62
4.1.1 <i>Pazienti e disegno sperimentale</i> .....	62
4.1.2 <i>Parametri umorali</i> .....	62
4.1.3 <i>Alberi di classificazione</i> .....	66
4.2 <b>Anticorpi gp41-specifici come correlati di protezione in neonati da madri infettate con il sottotipo C di HIV-1 (STUDIO II)</b> .....	68
4.2.1 <i>Popolazione in studio</i> .....	68
4.2.2 <i>Anticorpi leganti la gp41 in campioni di siero da coppie madre-figlio</i> .....	69
4.2.3 <i>Neutralizzazione di HIV nei sieri da coppie madre-figlio</i> .....	70
4.2.4 <i>Correlazione tra la neutralizzazione HIV e la specificità degli anticorpi verso la gp41</i> .....	72
4.3 <b>IgA mucosali monoclonali gp41-specifiche derivate da individui esposti ad HIV IgG- sieronegativi (ESN) (STUDIO III)</b> .....	74
4.3.1 <i>Costruzione di una libreria IgA Fab-k/λ da cellule B di donne ESN cambogiane</i> .....	74
4.3.2 <i>Fab IgA specifiche per la regione P1 e per la MPER modificata della gp41</i> .....	74
4.3.3 <i>Caratterizzazione dei Fab-IgA P1- e gp41-specifici</i> .....	76
4.3.4 <i>Fab-IgA gp41-specifici da ESN bloccano la trascitosi di HIV-1 attraverso una stretta barriera epiteliale</i> .....	78
4.4 <b>Generazione di Virus-Like-Particles (VLPs) esprimenti differenti glicoproteine di HIV-1 (STUDIO IV)</b> .....	79
4.4.1 <i>Disegno delle proteine Env chimeriche</i> .....	79
4.4.2 <i>Caratterizzazione delle VLPs-HIV rilasciate dalle cellule di insetto</i> .....	80
4.4.3 <i>Induzione di anticorpi serici diretti contro HIV-VLP</i> .....	81

4.4.4 Attività neutralizzante dei sieri immuni indotti da HIV-VLPs .....	82
<b>4.5 VLP per indurre anticorpi contro epitopi protettivi presenti all'interno di regioni conservate della gp41 di HIV-1 (STUDIO V) .....</b>	<b>84</b>
4.5.1 Assemblaggio e controllo dei peptidi di gp41 coniugati ad AP205 .....	84
4.5.2 Immunogenicità dei peptidi della gp41 .....	86
4.5.3 AP20-gp41 VLP inducono anticorpi neutralizzanti .....	87
4.5.4 L'attività ADCC è indotta solo da una regione della gp41 .....	88
<b>5. DISCUSSIONE .....</b>	<b>91</b>
<b>6. CONCLUSIONI .....</b>	<b>98</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>99</b>

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 GENERALITA' DI HIV

La sindrome dell'immunodeficienza acquisita (AIDS) costituisce un drammatico problema di salute in tutto il mondo: in circa 20 anni sono stati registrati oltre 25 milioni di morti (Hemelaar, J et al 2004). La malattia è causata dal virus dell'immunodeficienza umana (HIV), che, attualmente, infetta circa 33 milioni di persone (UNAIDS 2007); la popolazione maggiormente colpita vive in Asia e nell'Africa sub-Sahariana.



**Fig.1** Situazione epidemiologica globale delle infezioni da HIV nel 2007

([http://www.unaids.org/epidemic\\_update/report/index.html](http://www.unaids.org/epidemic_update/report/index.html)).

Gli isolati di HIV si distinguono in HIV di tipo 1 (HIV-1) e HIV di tipo 2 (HIV-2). HIV-1 è causa di AIDS in tutto il mondo, mentre HIV-2 è ristretto a poche regioni dell'Africa centrale e occidentale. HIV appartiene al genere *Lentivirus* della famiglia *Retroviridae*. Il nome dei Retrovirus deriva dal fatto che nella cellula infetta il genoma virale a RNA è trascritto in DNA dall'enzima virale trascrittasi inversa (RT); il DNA entra quindi nel nucleo e si integra nel genoma cellulare (Levy JA et al 2007).

HIV-1 è caratterizzato da una notevole eterogeneità genetica, la quale dipende da vari fattori, primo tra tutti la mancanza di attività di proofreading della trascrittasi inversa (Op de Coul ELM et al 2001), la velocità di turn-over del virus *in vivo* (Ho DD et al 1995), la pressione

selettiva esercitata dal sistema immunitario dell'ospite (Michael NLet al 1999) ed, infine, gli eventi di ricombinazione durante la replicazione (Temin HM 1993).

Il genoma retrovirale è costituito da due copie identiche di RNA a singolo filamento, che presentano i geni strutturali *gag*, *pol*, e *env*. Oltre a questi tre geni principali, il genoma di HIV-1 presenta una complessa combinazione di geni regolatori/accessori (Fanales-Belasio E et al 2010).

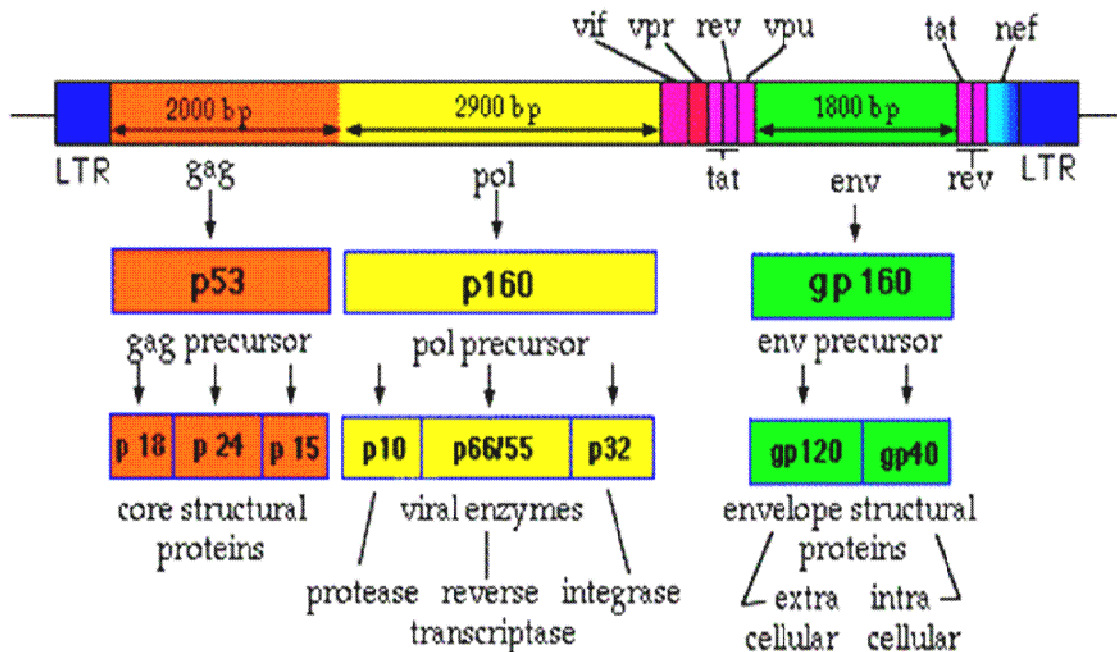
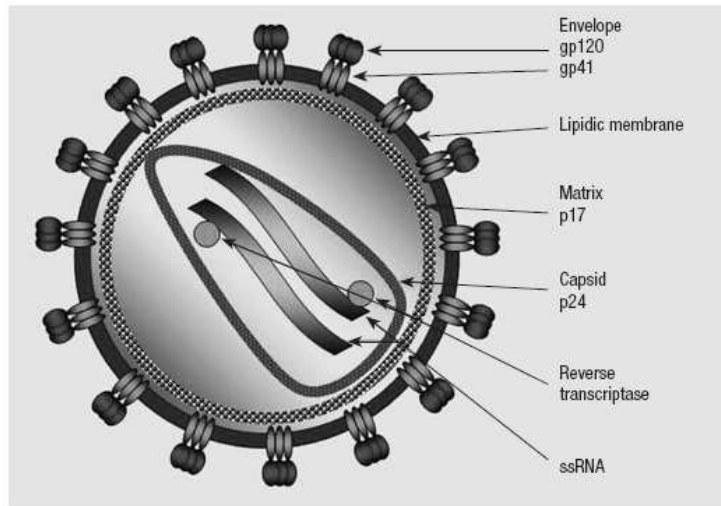


Fig. 2 Rappresentazione genomica del virus HIV

Il gene *gag* codifica per le proteine che costituiscono il core (p24, p7 e p6) e la matrice (p17), mentre il gene *env* codifica per le glicoproteine dell'envoltone (gp120 e gp41), che sono coinvolte nel riconoscimento delle molecole cellulari di superficie. Il gene *pol*, infine, codifica per gli enzimi necessari per la replicazione del virus: la trascrittasi inversa (RT), che converte l'RNA virale in DNA; l'integrasi, che incorpora il DNA virale all'interno del cromosoma della cellula ospite (stato provirale); la proteasi, che taglia le grandi proteine precursori Gag e Env nelle singole componenti mature (Fanales-Belasio E et al 2010).

La particella virale ha un diametro di 100 nm ed è circondata da una membrana lipidica esterna a cui sono ancorate le glicoproteine, gp120 e gp41, organizzate in eterodimeri associati a loro volta in complessi trimerici, mediante un'interazione non covalente.



**Fig.3** Struttura della particella di HIV-1 (Fanales-Belasio E et al 2010).

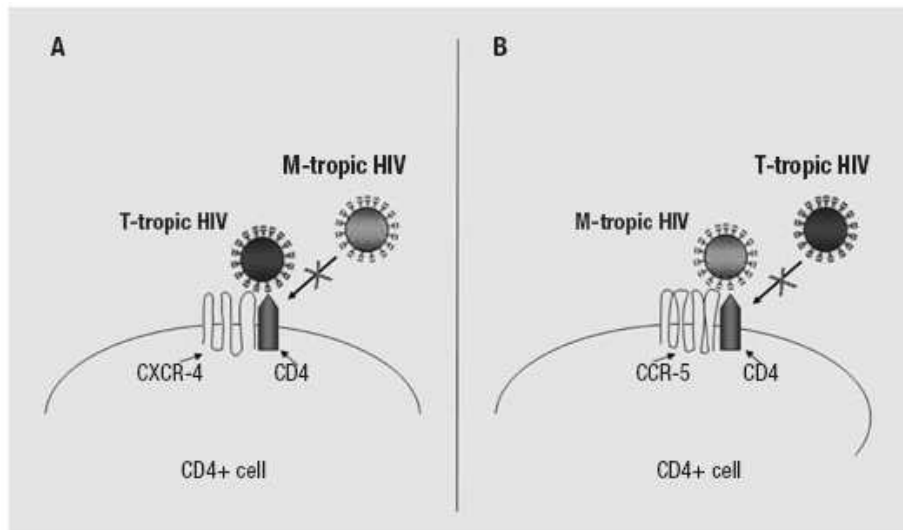
Il ciclo replicativo di HIV può essere riassunto in sei passaggi: 1) riconoscimento della cellula bersaglio, legame ed entrata; 2) perdita del rivestimento esterno; 3) retrotrascrizione; 4) integrazione provirale; 5) sintesi e assemblaggio delle proteine virali; 6) gemmazione.

Nel legame tra il virus e la cellula è coinvolto il complesso trimero composto dagli eterodimeri gp120-gp41; in particolare, la gp41 presenta un peptide idrofobico fusogenico nell'estremità ammino-terminale, che è essenziale per la fusione della membrana virale con quella cellulare (Weiss RA 1993).

Inizialmente, la gp120 lega la molecola cellulare CD4, una glicoproteina monomerica di 58 kDa, espressa sulla superficie di circa il 60% dei linfociti T circolanti, sui precursori delle cellule T che si trovano nel midollo osseo e nel timo, sui monociti/macrofagi, eosinofili, cellule dendritiche e cellule microgliali del sistema nervoso centrale. Dopo il legame tra gp120 e CD4, il complesso dell'envlope virale subisce un cambiamento conformazionale, grazie al quale la gp120 è in grado di legare il recettore per chemochine che si trova anch'esso sulla superficie cellulare, ed è necessario per l'infezione da parte del virus

La diversa espressione dei recettori per le chemochine sulle cellule bersaglio è un fattore determinante del tropismo di HIV (Broder CC et al 1995). Infatti, alcuni ceppi di HIV legano preferenzialmente il recettore per chemochine  $\beta$  CCR5 (26); questi ceppi sono detti M-tropici (macrofago-tropici) o virus R5. I ligandi del CCR5 (RANTES, MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$ ) sono in grado di inibire l'infezione di HIV in vitro (Coakley E et al 2005), poiché competono con il virus per il legame al CCR5. Altri isolati, invece, preferiscono il recettore CXCR4, e sono definiti T-tropici (linfociti-T-tropici) o virus X4. Anche in questo caso, la chemochina  $\alpha$  SDF-1 inibisce la replicazione dei virus X4, competendo per il legame al CXCR4. Infine, alcuni

isolati sono in grado di legare sia il CCR5 che CXCR4 e sono definiti virus X4R5 (Fanales-Belasio E et al 2010).



**Fig.4** Tropismo di HIV. A: HIV T-tropico; B: HIV M-tropico (Fanales-Belasio E et al 2010).

## 1.2 DECORSO NATURALE E PATOGENESI DELL'INFEZIONE DA HIV

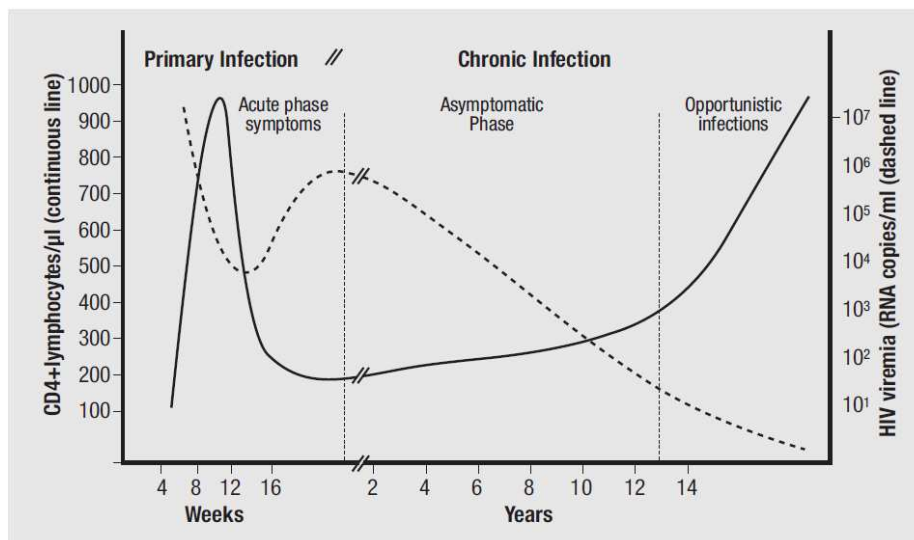
La trasmissione di HIV è dipendente sia dalle caratteristiche biologiche dell'isolato virale sia dalla suscettibilità dell'ospite. Il virus si trova principalmente integrato o in forma replicante all'interno delle cellule infette, le quali rappresentano i veicoli di trasmissione del virus stesso (Martin N et al. 2009). Infatti, le cellule HIV-infette possono trasferire il virus alle cellule del sistema immunitario locale (per esempio cellule T, macrofagi, cellule dendritiche) come le cellule del rivestimento vaginale o della mucosa anorettale.

Nel caso dell'infezione acquisita attraverso un rapporto eterosessuale, che rappresenta la modalità di infezione più frequente in tutto il mondo, il primo tessuto colpito dal virus è la mucosa della cervice (Lekkerkerker AN et al 2006). Qui, le cellule dendritiche e i linfociti CD4+ vengono infettati attraverso il meccanismo recettore-dipendente e permettono così al virus di raggiungere i linfonodi e diffondersi nel sangue. Nei primi stadi dell'infezione il virus si replica all'interno del tessuto linfatico delle mucose infettate e all'interno dei linfonodi locali (Pantaleo G et al. 1993). Le cellule infettate possono andare incontro a lisi oppure portare avanti un'infezione latente; questa seconda opzione avviene soprattutto nei macrofagi e nelle cellule T CD4+ resting, diventando così riserve virali (reservoir) (Alexaki A et al.



2008). Queste riserve rappresentano un grande ostacolo per l'eradicazione totale del virus dall'organismo dato che ne consente la persistenza anche in presenza di un effettivo regime di trattamento antiretrovirale altamente attivo (HAART).

Dopo 10-12 giorni dall'infezione, l'RNA virale risulta rilevabile nel sangue mediante RT-PCR (fig.5). L'insorgenza della viremia nel plasma rappresenta un punto critico nel decorso naturale dell'infezione da HIV, in quanto indica la capacità dell'individuo di trasmettere a sua volta il virus (Busch MP et al. 1997) e coincide con la prima diagnosi di infezione nel sangue (Nguyen KA et al. 2000). I livelli di RNA virale aumentano velocemente e raggiungono il picco massimo (oltre 100 milioni di copie/cm<sup>3</sup>) approssimativamente nella fase di sieroconversione anticorpale (fig.5). Questi alti livelli di viremia hanno breve durata, finché l'organismo non elicitava una specifica risposta umorale e cellulo-mediata, che controlla parzialmente la replicazione virale. Nelle settimane successive, la viremia diminuisce di diversi ordini di grandezza fino a stabilizzarsi ad un livello basale (viral setpoint) (Kahn JO et al.1998).



**Fig.5** Decorso clinico dell'infezione da HIV (Fanales-Belasio E et al. 2010).

La replicazione virale delle prime settimane e il raggiungimento del viral setpoint (periodo denominato "fase acuta") sono influenzati da vari fattori dell'immunità innata e acquisita. Il controllo iniziale della replicazione virale sembra essere dovuto all'immunità cellulo-mediata, e in particolare all'attività citotossica dei linfociti T CD8+, prima della comparsa degli anticorpi che riconoscono HIV e/o neutralizzanti (Bangham CR et al.2009).

Il momento in cui compaiono anticorpi anti-HIV nel sangue (sierconversione) si osserva a circa 3-5 settimane dall'infezione, con una media di 22 giorni (Buttò S et al. 2010). In un

periodo che può variare da qualche giorno a qualche settimana dall'infezione, l'individuo è soggetto a sintomi simili a quelli dati da un'influenza o da una mononucleosi.

La fase sintomatica dura 7-10 giorni, raramente più di 14 giorni. Durante l'infezione acuta, il numero di cellule T CD4+ cala drasticamente, in associazione agli alti livelli di viremia, prima che si sviluppi la risposta antivirale (Gupta KK et al. 1993). Quando si attiva la risposta immunitaria, la viremia diminuisce, mentre il numero di cellule T CD4+ risale, ma senza raggiungere il livello precedente all'infezione. Inoltre, si osserva un indebolimento funzionale della risposta immunitaria ad HIV e ad altri antigeni, indicando che il virus induce precocemente una disfunzione delle cellule T CD4+ e di altre cellule del sistema immunitario (Rosenberg YJ et al. 1998).

Poche settimane dopo l'inizio dell'infezione acuta, la maggior parte degli individui entra in una fase clinica asintomatica, generalmente associata a una diminuzione dei livelli di viremia e all'assenza di sintomi. Questo periodo è conseguenza della risposta innata e adattativa al virus (Ford ES et al. 2009). In particolare, gli anticorpi prevengono l'infezione delle cellule legando specificamente gli antigeni di HIV (anticorpi neutralizzanti) (Stamatatos L et al. 2009), o facilitando l'eliminazione delle cellule infettate mediante un meccanismo conosciuto come "citotossicità cellulare dipendente da anticorpi" (ADCC), mediata dai linfociti T e dalle cellule NK (Chung A et al. 2008). Inoltre, i linfociti T CD8+ specifici per HIV riconoscono gli antigeni virali sulla superficie delle cellule infettate e le eliminano tramite un'azione citotossica (Bangham CR et al. 2008). Nonostante queste azioni antivirali del sistema immunitario, durante la fase asintomatica, HIV continua a replicarsi in vari compartimenti dell'organismo, inducendo uno stato di infiammazione sistemica cronica.

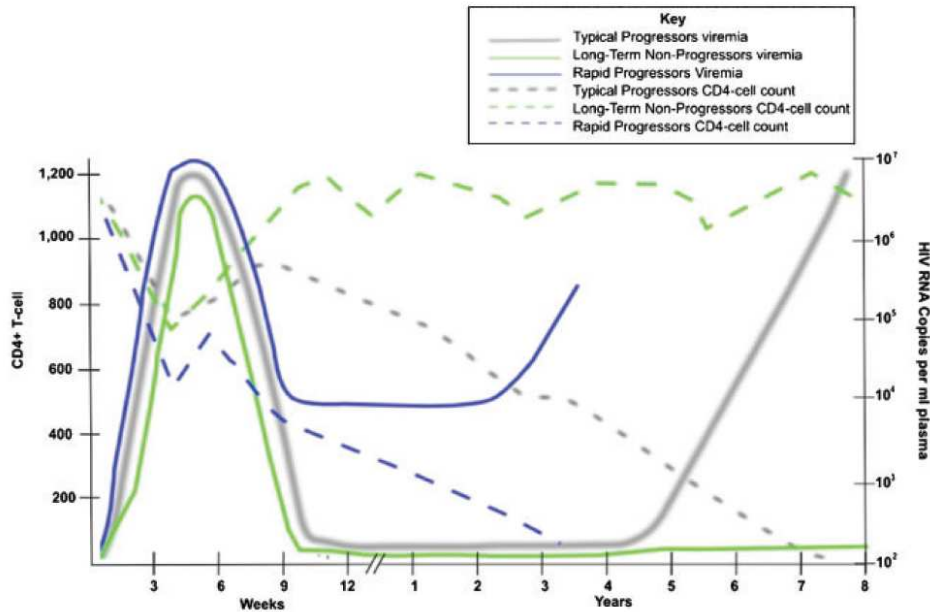
Durante la fase asintomatica, HIV provoca una lenta ma progressiva perdita di linfociti T CD4+ e un indebolimento del sistema immunitario (Ford ES et al. 2009). La progressione della malattia dipende dalla capacità dell'ospite di mantenere sotto controllo la replicazione virale e di ricostituire il pool di cellule T della memoria nello strato mucosale associato al tessuto linfoide o ai linfonodi. In assenza di un contenimento virale, il numero dei linfociti T CD4+ può scendere sotto le 200 cellule/ $\mu$ l, che determina il rischio di infezioni batteriche, virali, fungine o di tumori, come conseguenza di un grave indebolimento del sistema immunitario (Brooks JT et al. 2009). UNAIDS/WHO ha stimato che, in assenza di trattamento terapeutico, il periodo medio che intercorre tra l'inizio dell'infezione e la morte causata da AIDS è di circa 11 anni. Ovviamente, il periodo stimato è molto variabile, e dipende dall'isolato virale e dalla risposta immunitaria dell'ospite.

Nell'ambito dell'infezione da HIV, infatti, oltre ai cosiddetti *normal progressors*, il cui decorso della malattia è stato finora descritto, esistono altri sottogruppi di individui infetti in cui si riscontra un duraturo controllo della malattia senza l'intervento della terapia antiretrovirale, sono i *long term non-progressors ed elite controllers*. Inoltre soggetti che risultano completamente sieronegativi, nonostante siano venuti a contatto con il virus ripetutamente, vengono definiti *ESN (exposed but sieronegative)*.

### 1.3 DIFFERENTE CONTROLLO DELLA MALATTIA

Anni dopo l'inizio della pandemia dell'AIDS del 1981, emerge un piccolo sottoinsieme di individui HIV infetti con una progressione della malattia ad AIDS decisamente lenta. Queste persone, denominate *long-term non-progressors* (LTNPs), rappresentano un gruppo di sieropositivi non sottoposti a terapia antiretrovirale nonostante siano stati infettati da diversi anni - in alcuni casi fino a 20-25 anni (Mikhail M et al. 2003). Essi rappresentano tra il 2 e il 5% di tutte le persone HIV-infette (Okulicz JF et al. 2009). Durante tutto il loro decorso clinico, i LTNPs mantengono bassi i livelli di viremia ed elevati i livelli di cellule T CD4+, ciò in contrasto con i soggetti *Fast Progressors*, i quali acquisiscono l'AIDS dopo alcuni anni di infezione in assenza di terapia.

La carica virale nella maggior parte delle persone infette diminuisce da diversi milioni di copie di RNA  $\text{ml}^{-1}$ , nella fase acuta, fino a 50.000-11.000 copie  $\text{ml}^{-1}$ , nella fase cronica asintomatica (Gupta SB et al. 2007). Rispetto ai progressori rapidi, che tipicamente progrediscono verso l'AIDS entro 3-5 anni, i LTNPs rimangono spesso asintomatici per 10-20 anni con un elevata conta di cellule T CD4+ ( $>500$  cellule  $\text{ul}^{-1}$ ) (Fig.6) (Pantaleo & Fauci, 1996). In confronto, i LTNPs - a volte indicati come *controllers viremici* - mantengono tra le 5.000 e le 15.000 copie di RNA  $\text{ml}^{-1}$  nel corso della loro infezione, la maggior parte ha meno di 10.000 copie  $\text{ml}^{-1}$  e molti hanno tra le 50 e le 2.000 copie  $\text{ml}^{-1}$  (Hunt PW 2009; Mikhail et al, 2003).



**Fig.6** Il decorso della malattia in progressori tipici HIV-infetti, LTNP e progressori rapidi secondo la conta delle cellule T CD4+ e la viremia (Pantaleo & Fauci, 1996).

Un piccolo sottoinsieme di LTNP ( $\leq 1\%$ ), denominato *elite controllers* (ECs), presenta livelli non rilevabili di RNA virale ( $<50$  copie  $\text{ml}^{-1}$ ) per un periodo di tempo indeterminato, che potrebbe essere anche per anni (Tabella 1) (Piacentini et al. 2009; Saxena et al. 2007). Si stima che circa 1 su 300 persone infette da HIV soddisfino i criteri per essere un EC e, recentemente, in una coorte di 4586 soggetti HIV-infetti seguiti dal 1986, Okulicz et al. (2009) hanno mostrato che lo 0,55% sono ECs. In confronto, il 3,32% e il 2,04% degli individui appartenenti alla stessa coorte sono stati classificati come LTNP con una conta di cellule T CD4+ maggiore di 500 cellule  $\text{microlitri}^{-1}$  durante 7 e 10 anni di follow-up, rispettivamente (Okulicz et al., 2009).

	EC	LTNP
CD4 <sup>+</sup> T-cell level (cells $\mu\text{l}^{-1}$ )	$\geq 500^*$	$\geq 500$
Viral load (copies $\text{ml}^{-1}$ )	$\leq 50$	$\leq 10\,000^*$
Antiretroviral therapy	No	No
Years without AIDS	Months–years	$\geq 7\text{--}20^*$

\*Values can vary in studies.

**Tab.1** Definizioni delle maggiori “popolazioni controller”( Poropatich K et al. 2011).

Se la maggior parte di ECs e LTNPs hanno una conta di cellule T CD4+ entro valori normali, diversi individui, che controllano la viremia (*viremic controllers*), possono subire infezioni opportunistiche come risultato di una deplezione delle cellule T CD4+ (Hunt, 2009). Questa evidenza mostra che “il controllo elite” di HIV-1, definito dalla carica virale quasi non rilevabile in assenza di terapia, non si correla sempre con una conservazione della conta di cellule T CD4+. Nel loro studio recente, Okulicz et al. (2009) hanno trovato che individui classificati come *viremic controllers* (5-20 copie di RNA ml<sup>-1</sup>) progredivano verso l'AIDS più rapidamente, perché avevano una conta più bassa di cellule T CD4+ (<350 cellule microlitri<sup>-1</sup>) rispetto ai normali ECs, che avevano mantenuto stabile e più elevata la conta cellulare.

Sorprendentemente, però, nel 1989 fu descritto un fenomeno assai importante: risposte cellulari T specifiche, dirette contro proteine dell'envelope e del core di HIV, furono ritrovate in individui che non sierconvertivano e risultavano negativi per la presenza di antigeni virali, nonostante gli stessi fossero partner sessuali di individui HIV-positivi (Ranki A et Al. 1989). Tali soggetti appartenevano a quel gruppo di individui che ad oggi è definito come un piccolo numero di persone esposte al virus (meno dell'1%), le quali non si infettano, nonostante la duratura e ripetuta esposizione al virus. Questi soggetti sono denominati *Exposed Seronegative* (ESN), *Exposed Uninfected* (EU) or *Highly Exposed Persistently Seronegative* (HEPS); essi risultano negativi sia per la presenza di IgG specifiche contro HIV, sia per la presenza di genoma virale ricercato tramite PCR nel sangue. Nessuna delle definizioni, però, di quelle finora proposte per descrivere questo gruppo di soggetti, risulta pienamente soddisfacente: infatti, la definizione di *exposed seronegative* o quella di *highly exposed seronegative* trascura la possibile presenza di IgA HIV-specifiche mucosali in questi individui. Tali definizioni sono basate sull'assunto, possibilmente errato, che queste persone non abbiano mai subito un'infezione subclinica e limitata nel tempo (Shearer GM et al. 1996). Non c'è nessuna prova che i correlati di protezione, genetici ed immunitari, che verranno descritti in seguito, conferiscano un'assoluta resistenza all'infezione da HIV; piuttosto, si crede che questi correlati siano associati ad una solida down-modulazione della suscettibilità a tale infezione.

Questi individui quindi, quasi totalmente resistenti all'infezione, sono stati ritrovati in varie coorti, tra cui coppie discordanti, prostitute, lavoratori sanitari esposti e neonati da madri infette, i quali sono stati esposti all'infezione in utero. La maggiore evidenza di resistenza deriva proprio dallo studio di prostitute, le quali, seppur esposte ripetutamente al virus, in seguito a rapporti non protetti con più partner, non si infettavano. L'esposizione persistente a

bassi livelli sembrerebbe essenziale per determinare la resistenza all'HIV e per mantenere una risposta sia umorale che cellulo-mediata (Lopalco L 2004).

## **1.4 CORRELATI DI PROTEZIONE NELLE DIVERSE POPOLAZIONI**

Le categorie di soggetti LTNPs ed ESNs sono accumulate dal semplice fatto che “naturalmente” possiedono dei meccanismi di difesa multifattoriali nei confronti di HIV, riconducibili a tre tipologie principali: fattori virologici (esterni all'ospite), fattori genetici e immunologici (entrambi propri dell'ospite) (Fig.7). Questi meccanismi hanno da sempre catturato l'attenzione dei ricercatori intenzionati a comprenderli a fondo, per poterli in seguito riprodurre o stimolare in individui “naturalmente sprovvisti”. Ciò risulterebbe di fondamentale importanza per la progettazione di un potenziale vaccino.

E' importante sottolineare che, data l'esistenza di molteplici fattori protettivi, la protezione stessa, derivante da uno solo di questi, può risultare parziale e che, quindi, sono proprio le combinazioni di questi meccanismi a fornire una protezione di livello superiore contro l'infezione (Margolis L et al. 2006). A complicare ancora di più questa esplorazione è il riconoscimento che la protezione non può essere costante nel tempo, influenzata com'è da fattori non ancora pienamente compresi (Margolis L et al. 2006; Kaul R et al. 2001) . In tal modo, un individuo apparentemente protetto, nonostante un periodo di esposizione ad alto rischio, può, per una serie di motivi, perdere la sua protezione relativa in successive esposizioni al virus. Così l'identificazione dei meccanismi che possono proteggere contro l'acquisizione dell'infezione o portare ad un suo controllo nel tempo, risulta essere un compito non facile.

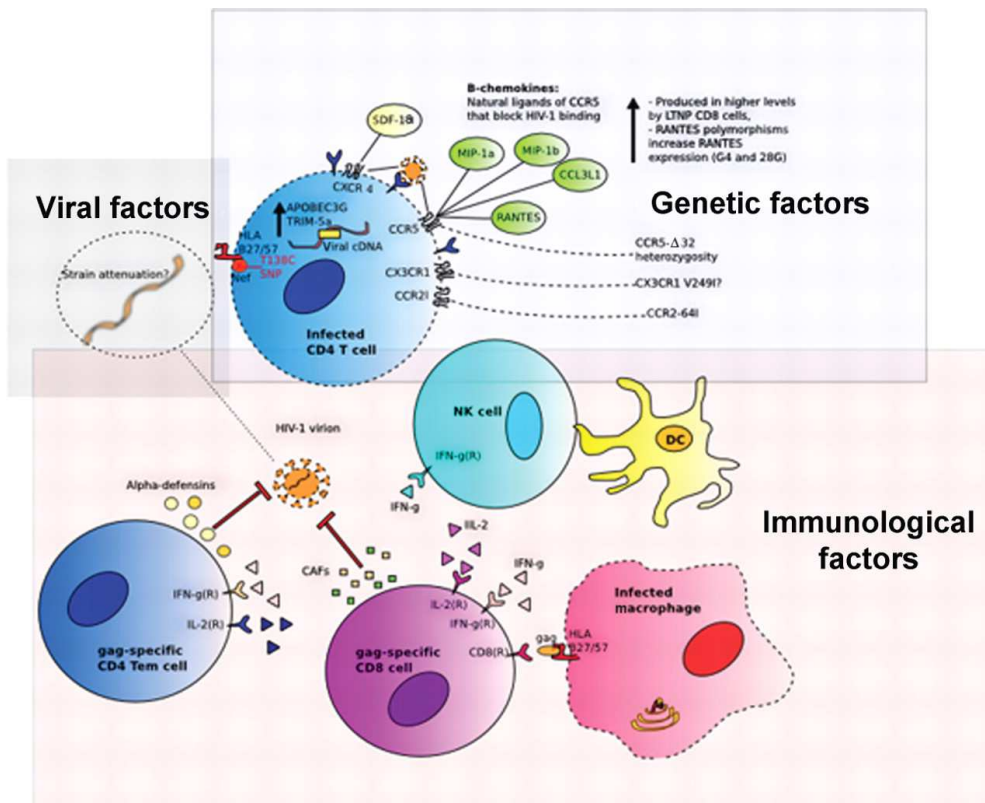


Fig.7 Fattori associati al controllo long-term dell'infezione da HIV ( Poropatich K et al. 2011).

## 1.4.1 FATTORI VIRALI

Alcuni studi hanno dimostrato che i ceppi virali da LTNP sono meno evoluti e quindi meno capaci di eludere la risposta immunitaria dell'ospite, se confrontati con i ceppi progressors (Sandonis et al, 2009; Wang et al, 2003). Infatti i cloni virali LTNP, rispetto ai cloni virali progressors, sembrerebbero replicare più lentamente e infettare meno efficacemente le cellule CD4+ in coltura (Choudhary et al., 2005). Nel loro studio, Choudhary et al. (2005) hanno rilevato che in assenza di interleuchina-1 (IL-1) e del fattore di crescita trasformante TGF-β - che upregola l'espressione del recettore chemochinico CCR5, l'infettività e gli eventi citopatici sono stati ridotti nei cloni virali LTNP R5-tropici rispetto ai cloni dei progressors. Ciò suggerisce che questi LTNPs ospitano ceppi R5 attenuati, con delle mutazioni che interferiscono con l'infezione e li rendono non altamente citopatici.

L'attenuazione virale, infatti, risulta da mutazioni in geni strutturali e non-strutturali. Diversi studi hanno riportato che grandi delezioni geniche attenuanti, nei LTNPs, sono associate al controllo delle infezioni (Calugi et al, 2006;. Deacon et al, 1995;. Huang et al, 1998). Tuttavia, questa associazione è difficile da dimostrare perché l'attenuazione potrebbe

effettivamente essere l'effetto piuttosto che la causa del controllo a lungo termine. Per esempio, a seguito di infezione con un ceppo virale non-attenuato, una forte risposta delle cellule T potrebbe indurre nel genoma di HIV-1 mutazioni che rendono il virus più debole.

Evidenze sperimentali indicano che alcuni individui LTNPs vengono infettati da mutanti virali, difettivi della sequenza genica nef. Infatti la proteina Nef può giocare un ruolo nella progressione dell'infezione da HIV: nella sua forma wild-type riduce la presentazione dell'antigene da parte dell'ospite interferendo, quindi, con la processazione intracellulare dell'antigene stesso, e lo fa legandosi a recettori HLA di classe I (Tolstrup et al., 2006). Larghe delezioni nel gene nef consentono una più efficiente processazione delle proteine virali in vivo e potrebbero rappresentare il meccanismo alla base del ruolo di Nef nell'attenuazione di HIV. La prova è data dal fatto che la ridotta inibizione della presentazione dell'antigene (HLA di classe I) in cellule T CD4 +, è osservata in LTNPs ma non in normal progressors, ed è dovuta a diverse mutazioni al di fuori della regione conservata del gene nef (Casartelli et al., 2003). Ciò rende probabile che tali mutazioni siano il risultato di un processo casuale, non comune.

Una mutazione puntiforme in posizione 138 (T138Q) nel gene nef, è stata riscontrata più frequentemente in LTNPs rispetto ai normal progressors ed è citata come causa di diminuzione di fitness e replicazione virale (Kirchhoff et al, 1999; Tolstrup et al, 2006). Kirchhoff et al. (1999) hanno eseguito un'analisi di sequenza approfondita rivelando che la mutazione era presente nel 8,5% di 59 LTNPs / SPs, mentre era completamente assente in 32 normal progressors. In generale, le mutazioni nef attenuanti, come la T138Q, non sono comuni nella maggior parte dei controllers, come è stato dimostrato in un'ampia coorte di ECs (n = 63), in cui solo tre soggetti avevano delezioni nel loro gene nef (Blankson et al, 2007).

Oltre al gene virale nef, altre “mutazioni attenuanti” sono state studiate: per esempio, l'inserzione di due amminoacidi nella proteina Vif è stata associata ad uno stato asintomatico di lunga durata (Alexander L et al. 2002), in quanto costituisce una modificazione della sequenza amminoacidica che indirizza la proteina al nucleo (Farrow MA et al. 2005). Come si può immaginare, in questo processo potrebbe essere coinvolta anche l'interazione della proteina stessa con APOBEC3G, importante fattore anti-retrovirale intrinseco alla cellula (esaminato nei dettagli, successivamente, nel paragrafo dell'immunità innata). Oltre a ciò, la presenza di una mutazione R77Q nel gene che codifica per la proteina Vpr è stata riscontrata più frequentemente negli individui LTNPs rispetto ai tipici progressors (Mologni D et al. 2006). La proteina Vpr prodotta da questo ceppo virale mutante non presenta le normali caratteristiche associate alla forma wild-type, quali l'induzione di apoptosi. Altri studi,



invece, non hanno trovato differenze genotipiche nella sequenza funzionale di vpr o nel suo motivo di legame, tra LTNPs e progressors (Lai M et al. 2006; Shen C et al. 2008).

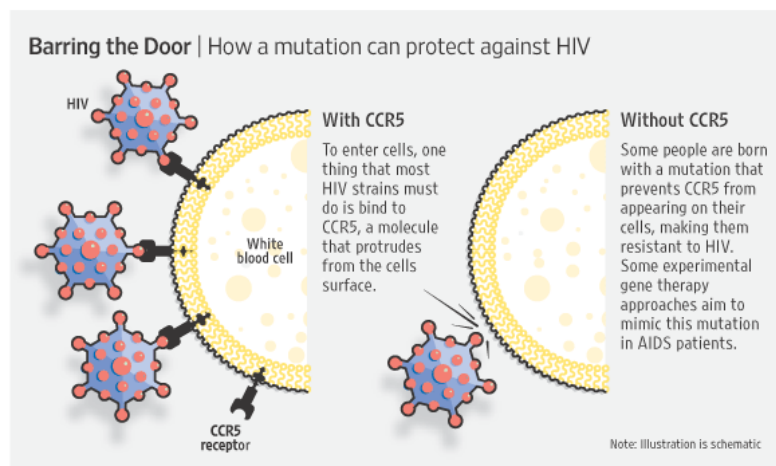
In ultima analisi, riguardo la proteina Env di HIV-1, utilizzando una linea cellulare che permette l'espressione inducibile dei recettori CD4 e CCR5, Lassen et al. (2009) hanno scoperto che cloni env, ottenuti da Elite Controllers (n = 7) sono stati significativamente meno capaci di eseguire un'entrata nella cellula target, mediata da CD4 e CCR5, rispetto ai cloni env provenienti da progressors, cronicamente infetti. Eppure in alcuni Elite Controllers, virus capace di replicare non può essere isolato (Julg B et al. 2010; Wang B et al. 2003); invece, virus nel plasma è tuttavia rilevabile nella vasta maggioranza di controllers, grazie a saggi ultrasensibili e in alcuni casi questo può raggiungere livelli più elevati che in pazienti HAART-soppressi (Hatano H et al. 2009). Dettagliate analisi genotipiche e fenotipiche suggeriscono che questi isolati sono pienamente virulenti. Secondo alcuni studi, i livelli di viremia bassi e cronici negli ECs derivano dalla discordanza tra i genotipi del virus plasmatico e provirus integrato nelle cellule CD4+ resting (Bailey JR et al. 2006). Virus sequenziati dal plasma e da cellule mononucleate del sangue periferico (PBMCs), provenienti da Elite Controllers, non mostrano delezioni geniche rilevanti che conducono ad una riduzione della capacità replicativa (Miura T et al. 2008). Comunque, proprietà funzionali tali come l'entrata o la capacità replicante virale nei controllers appare differente rispetto ai progressors cronici, come visto in precedenza per i cloni env da ECs con ridotta *entry fitness* (Lassen et al. 2009).

Il virus però, da solo, non può spiegare il ritardo nella progressione della malattia osservato nei LTNPs, e non sembrerebbe giocare un ruolo fondamentale nel raro gruppo degli ECs; perciò è importante comprendere pienamente i fattori intrinseci nell'ospite, in grado di controllare l'infezione e da cui poter trarre informazioni per una cura funzionale.

## **1.4.2 FATTORI GENETICI**

Il CCR5 è normalmente espresso, a livelli molto bassi, sulla superficie delle cellule T CD4+ naive e, a livelli superiori, in cellule T CD4+ memory attivate, così come in monociti e macrofagi (Potter SJ et al. 2007). Una delezione di 32 bp nel gene CCR5 si traduce in un frameshift tale che molti aminoacidi a valle differiscono dalla sequenza wild type, fino a quando un codone di stop prematuro termina la traduzione. Così viene generata una proteina

tronca non funzionale che rimane intrappolata nel reticolo endoplasmatico. Persone omozigoti per questa mutazione sono altamente protetti dall'infezione da HIV R5-tropici (la maggior parte dei ceppi HIV-1 trasmessi) a causa della mancata espressione del CCR5 sulla superficie delle cellule T CD4+ (Dean M et al 1996) (Fig.8). Si stima che solo l'omozigosi dell'allele CCR5 $\Delta$ 32 sia presente in un elevato numero di ESNs, (circa il 3.2%), nei quali però non si osservano varianti genetiche dei recettori chemochinici o delle chemochine (Liu H et al. 2004).



**Fig. 8** Rappresentazione schematica del risultato della delezione  $\Delta$ 32 CCR5 in omozigosi (tratta dal sito web [http://www.tradingnostop.com/images/stories/feedgator/images/7d4025c2b9d00f9f42beb3bd8d6b4221\\_mutazione-ccr5.gif](http://www.tradingnostop.com/images/stories/feedgator/images/7d4025c2b9d00f9f42beb3bd8d6b4221_mutazione-ccr5.gif))

La frequenza di questo polimorfismo varia nelle diverse etnie e si stima che nelle popolazioni dove si riscontra più frequentemente, come il Nord Europa e dell'Asia occidentale, circa l'1% della popolazione caucasica è omozigote e tra il 9 e il 20% sono eterozigoti per la CCR5- $\Delta$ 32 (Lucotte G & Mercier G 1998;. Pereyra F et al. 2008). Il polimorfismo è quasi assente tra gli africani nativi, asiatici orientali e indiani d'America (Stephens JC et al 1998). E' stato dimostrato che tale mutazione, presente in alcuni LTNP in eterozigosi, risulta in una riduzione dell'espressione del CCR5 sulle cellule T CD4+ ed è associata a un rallentamento nella progressione verso l'AIDS (Dean M et al 1996; Eugen-Olsen J et al 1997). Altri studi indicano che circa il 30% dei LTNP ed Elite Controllers Caucasici possiedano una mutazione  $\Delta$ 32/CCR5 in eterozigosi, ma rimangono comunque ugualmente suscettibili all'entrata e all'infezione produttiva di HIV (Rabi SA et al. 2011).

Polimorfismi in CCR2 e CX3CR1 che HIV-1, molto raramente, utilizza come co-recettori, sono stati associati ad un rallentamento nella progressione della malattia. Ad esempio, la

mutazione CCR2-64I ha mostrato ridurre l'espressione del CXCR4 sulle cellule T CD4+, interferendo così con l'infezione da virus X4-tropico (Kalinkovich A et al 1999). Nello studio di una coorte di prostitute keniate, positive per HIV-1 (Anzala AO et al 1998), la frequenza della CCR2-64I è stata tre volte superiore nei LTNPs rispetto a quella riscontrata nei progressors. In un altro studio, individui omozigoti per la mutazione CCR2-64I mostrano alcuni livelli di resistenza nella trasmissione sessuale di HIV (Louisirirochanakul S et al 2002).

Variazione nel gene del recettore per chemochine DARC (Duffy antigen/chemokine receptor), presente sui globuli rossi, ovvero il polimorfismo T-46C, sembra rallentare la velocità di progressione della malattia e il tasso di perdita delle cellule T CD4+ in una coorte di afro-americi HIV-infetti (He et al., 2008). In realtà, il vantaggio di sopravvivenza conferito dalla DARC T-46C negli afro-americi ha dimostrato essere altrettanto protettivo come portare una copia del polimorfismo CCR5-Δ32 negli americani di origine europea.

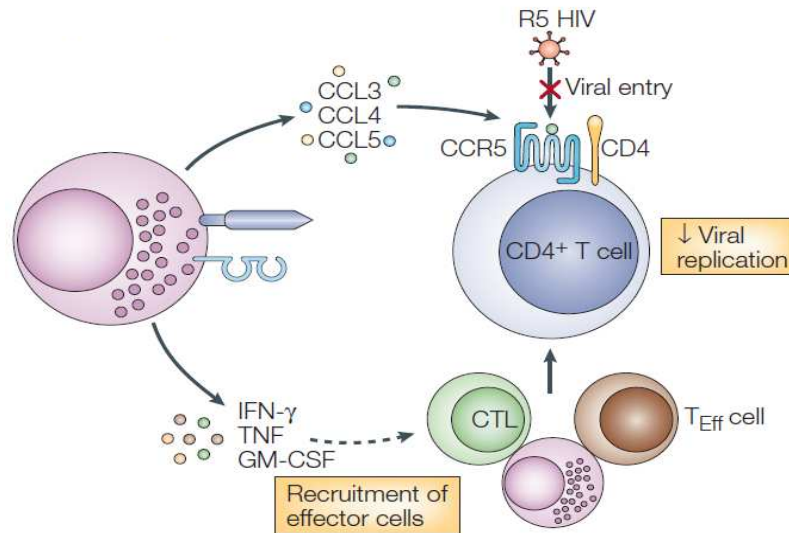
Alcuni polimorfismi nei geni codificanti i ligandi del CCR5, come RANTES, MIP-1α, MIP-1 β, potrebbero produrre effetti protettivi grazie all'aumento della produzione delle chemochine stesse e quindi alla conseguente downmodulazione del CCR5 sulla superficie cellulare (McDermott DH et al 2000). Anche il legame dell'SDF-1 (Stromal cell-derived factor 1) al CXCR4 ha mostrato conferire parziale protezione all'infezione (Sanchez-Carrasquillo E et al 2000). SDF-1, altamente espresso nella mucosa genitale, potrebbe avere un ruolo protettivo nella diffusione del ceppo X4 di HIV, infatti l'omozigosi della mutazione SDF1-3'A è stata associata ad una ritardata progressione ad AIDS (Hendel H et al. 1998). Variazioni genetiche possono verificarsi, e influire sull'andamento della malattia, anche nei geni dei complessi maggiori di istocompatibilità (MHC), ovvero di quelle proteine espresse sulle cellule specializzate nella presentazione dell'antigene al sistema immunitario. Queste, nell'uomo, sono gli HLA (da *Human Leukocyte Antigen*): le due prime sottoregioni individuate, HLA-A e HLA-B, contengono i loci maggiori codificanti per gli antigeni di classe I. La regione codificante per gli antigeni di classe II, denominata HLA-D, è situata alla sinistra della regione HLA-B ed è suddivisa in 3 sottoregioni HLA-DP, DQ e DR. Tra i diversi genotipi, infatti, soprattutto la presenza dell'allele HLA-B\*5701 è stato associato (Migueles SA et al 2000) allo status di LTNP; in uno studio, B\*57 è stato secondo al B\*27, come l'allele più comunemente associato alla non-progressione (Kaslow RA et al 1996). Infatti, la maggior parte dei LTNPs, ed anche ECs, presenta gli alleli HLA-B57 e HLA-B27, come marker predittivi di uno stato clinico asintomatico (Migueles SA et al 2000).

Anche l'allele HLA-B54 può essere associato ad uno stato asintomatico di lunga durata (LTNP o EC). Inoltre, Carrington M et al (1999) hanno dimostrato che l'eterozigosi massima, per uno o più loci HLA di classe I (A,B,C), ritarda l'insorgenza di AIDS in una coorte di individui HIV-infetti, mentre l'omozigosi fa progredire rapidamente la malattia. Gli alleli HLA di classe I, B\*35 e Cw\*04, invece, sono stati costantemente associati al rapido sviluppo di AIDS nella popolazione caucasica (Carrington M et al 1999). L'uso di uno specifico repertorio *TCR beta chain*, HLA-Cw7 ristretto, è stato trovato in soggetti asintomatici a lungo termine ed è stato associato ad un'elevata conta di cellule T CD4+, nonché ad una lenta progressione della malattia (Bodman-Smith MD et al 2002).

Comunque, i meccanismi che spiegherebbero tutte queste associazioni non sono stati ancora compresi a fondo, ma gli studi suggeriscono che un controllo precoce e a lungo termine, indotto dall'MHC di classe I, potrebbe aiutare a selezionare e a far mantenere varianti virali attenuate.

### **1.4.3 FATTORI IMMUNOLOGICI: *immunità innata***

Solo pochi studi sono stati indirizzati a ricercare il ruolo dell'immunità innata sia nella bassa suscettibilità ad HIV degli ESNs, sia nel controllo a lungo termine dell'infezione dei LTNPs. L'abbondante presenza di macrofagi, cellule dendritiche e cellule Natural Killer (NK) nella mucosa potrebbe essere importante nella protezione contro l'infezione da HIV (Lehner T et al 2008). Le cellule NK hanno molte funzioni sia nell'immunità innata che in quella cellulo-mediata grazie alla vasta espressione di recettori di superficie che permette loro di inibire o attivare le cellule bersaglio (Vieillard et al., 2010) (Fig. 9). Le cellule NK da LTNPs viremici e non viremici hanno dimostrato di produrre livelli significativamente più elevati di interferone gamma (IFN- $\gamma$ ) rispetto ai progressors e ai soggetti sani non infetti; questo è stato riscontrato anche in una coorte di ESNs (Montoya CJ et al 2006); ciò risulta infatti come il principale meccanismo attraverso cui le cellule NK mediano il controllo dell'infezione (O'Connor GM et al 2007; Vieillard V et al 2010) e suggerisce che la produzione IFN- $\gamma$  da parte delle cellule dell'immunità innata potrebbe giocare un ruolo maggiore nella resistenza naturale all'infezione da HIV.



© 2005 Nature Publishing Group

**Fig.9** Meccanismi non-citolitici, mediati dalle cellule NK, per il controllo dell'infezione da HIV (Fauci AS et al 2005);

Le NK sono certamente importanti per il controllo delle infezioni virali in soggetti con infezione da HIV, anche se le cellule T CD8+ hanno dimostrato un superiore controllo della replicazione dell'HIV-1 in soggetti EC (O'Connell KA et al 2009). Un recente studio ha suggerito un importante coinvolgimento delle cellule NK specifiche contro HIV nella prevenzione della trasmissione verticale madre-figlio: infatti madri e neonati che possiedono NK che rispondono a peptidi virali, sono sostanzialmente meno capaci di trasmettere e acquisire l'infezione, rispettivamente (Tiemessen CT et al 2009).

L'evidenza mostra che le cellule NK da LTNPs hanno un fenotipo anormale rispetto ai soggetti viremici HIV-1-infetti e soggetti non infetti (O'Connor et al., 2007). Recentemente, Vieillard et al. (2010) hanno eseguito su larga scala l'analisi di 21 diversi marcatori fenotipici sulle cellule NK per dimostrare che i marcatori da LTNPs con carica virale non rilevabile sono significativamente diversi da controllori viremici (50 000 copie di RNA ml-1) e progressori. Ciò indica che per questi soggetti la carica virale influenza l'espressione recettoriale sulle cellule NK.

APOBEC3G è una citidina deaminasi che blocca l'integrazione HIV-1 nel DNA ospite, inducendo un'ipermutazione G → A nel DNA retrovirale, che causa la prematura formazione di codoni di stop e rende la replicazione di HIV-1 incompetente (Piacentini L et al 2009). Individui affetti da HIV, con bassi livelli di mRNA di APOBEC3G sono associati ad un aumentato rischio di progressione verso l'AIDS, mentre il contrario è vero per quelli con alti livelli di mRNA di APOBEC3G (Jin X et al 2007). Un recente studio (Vázquez Pérez JA et al

2009) che ha esaminato livelli di espressione dell'mRNA di APOBEC3G in PBMC, da un gruppo di soggetti HIV-1-infetti, a differenti stadi della malattia, ha trovato livelli di mRNA più elevati correlati alla maggiore conta delle cellule T CD4 e a un'inferiore carica virale HIV-1 ( $P = 0,0004$ ). Inoltre, soggetti naïve per la terapia, con più bassa carica virale ( $<10\ 000$  copie ml<sup>-1</sup>), e un'infezione superiore a 3 anni, avevano più alti livelli di espressione di APOBEC3G rispetto ai progressors e ai controlli sani non infetti. Le ipermutazioni indotte da APOBEC3G nel DNA vpu/env provirale sono state correlate ad una maggiore conta di cellule T CD4 ( $P = 0,042$ ) in un'ampia coorte di donne kenote con infezione da HIV ( $n = 208$ ) (Land AM et al 2008). Gli stessi Vázquez Pérez JA et al (2009) suggeriscono che l'esposizione ad HIV potrebbe rafforzare l'espressione di APOBEC3G nei PBMC, in assenza di infezione nei soggetti ESN. Infatti, una sospensione dell'esposizione è associata alla riduzione dell'espressione della proteina. Biasin M et al (2007) hanno dimostrato che l'alta espressione di APOBEC3G risulta significativamente aumentata nei PBMC periferici (soprattutto monociti) e nel tessuto cervicale degli ESNs, sia a livello basale che dopo stimolazione con IFN- $\alpha$ , in confronto a soggetti non esposti ad HIV.

Nell'immunità innata può essere inserita anche la barriera mucosale, essendo l'HIV un virus trasmesso per l'85% per via mucosale, offrendo una difesa fisica e immunologica ai contagi. Le superfici mucosali delle vie respiratorie, gastrointestinali e urogenitali sono separate dal mondo esterno da delicate barriere epiteliali. Gli epitelii e le ghiandole associate (come le ghiandole salivari) producono difese aspecifiche o innate tra cui mucine e proteine antimicrobiche. Le cellule epiteliali sono partecipanti attivi nella difesa delle mucose. Funzionano come sensori che rilevano i componenti microbici pericolosi attraverso i recettori Toll-like (TLR). I TLRs sono componenti importanti dell'immunità innata, si trovano su macrofagi, cellule dendritiche, neutrofili, linfociti B e T, oltre alle già citate cellule epiteliali. In particolare, il TLR-7 riconosce RNA a singolo filamento, quindi potrebbe riconoscere l'RNA di HIV, ma è presente soltanto nei compartimenti endosomiali (Iwasaki A et al 2004; Jansen CA et al 2006). Però, due studi (Bochud et al, 2007; Soriano-Sarabia et al, 2008), hanno scoperto che SNPs (singole nucleotide polymorphisms) nel gene TLR9 sono associati ad una rapida progressione della malattia da HIV-1. I polimorfismi 1635A/G TLR9 e 1174G/A sono positivamente correlati con la progressione rapida della malattia, maggiore carica virale e bassa conta di cellule T CD4+ in grandi coorti di individui con infezione da HIV, in assenza di terapia (Bochud PY et al 2007; Soriano -Sarabia N et al 2008).

Comunque, molteplici meccanismi immunitari effettori contribuiscono alla protezione delle superfici mucosali. Cellule B antigene-specifiche e cellule T effettrici del sangue riconoscono

le venule endoteliali alte (HEV) mucosali e si inseriscono nella mucosa. Le cellule B della mucosa si differenziano per diventare plasmacellule mucosali, molte delle quali producono IgA dimeriche, esportate in secrezioni come IgA secretorie (sIgA) per intercettare gli antigeni e patogeni, e per evitare l'invasione della mucosa. IgG neutralizzanti sono presenti anche all'interno dei tessuti della mucosa; IgG mucosali potrebbero derivare da plasmacellule locali o del sangue, per diffusione da capillari locali fenestrati. Le cellule infettate potrebbe essere uccise da specifici linfociti T citotossici (CTL) o tramite citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente (ADCC), una collaborazione tra natural killer (NK) e anticorpi. Gli agenti patogeni possono anche essere catturati dalle cellule dendritiche (DC) e macrofagi, e trasportati ai linfonodi drenanti.

Infine, anche le chemochine svolgono ruoli chiave nell'immunità innata, in quanto la loro presenza non solo attiva, ma anche potenzia risposte immunitarie umorali e cellulo-mediate. Alcuni studi hanno mostrato che la concentrazione, nella saliva e nel latte materno, del CCL28, una chemochina che richiama preferenzialmente plasmacellule secernenti IgA nella lamina propria della mucosa (Lazarus NH et al 2003; Hieshima K et al 2004), è incrementata nella maggior parte (78% di 50 soggetti) degli individui ESN. In una coorte in Zambia è stata rilevata una diretta correlazione tra il CCL28 e la sopravvivenza di HIV-infetti e neonati (Castelletti E et al 2007). Inoltre, Iqbal SM et al (2005) hanno trovato che livelli cervicovaginali di CCL5 sono risultati dieci volte più elevati in prostitute ESN rispetto ai controlli non esposti ad HIV. In contrasto però, Kaul R et al. (2008) hanno dimostrato che elevati livelli mucosali di RANTES potrebbero riflettere un'elevata suscettibilità ad HIV, come indicato dal numero di cellule bersaglio, suscettibili ad HIV, presenti nella mucosa cervicovaginale. In generale, comunque, si può affermare che l'attività neutralizzante nei confronti di HIV è stata associata a livelli aumentati di  $\beta$ -chemochine (CCL4, CCL5, CCL11) (Hasselrot K et al 2010).

#### **1.4.4 FATTORI IMMUNOLOGICI: *immunità cellulo-mediata***

L'immunità cellulo-mediata è basata sull'azione dei linfociti T, le cui due principali categorie sono i CD4+ e i CD8+. Entrambe le sottopopolazioni sono caratterizzate da specifiche restrizioni HLA, molecole TCR (T-Cell Receptors) coinvolte nel corso dell'infezione da HIV.

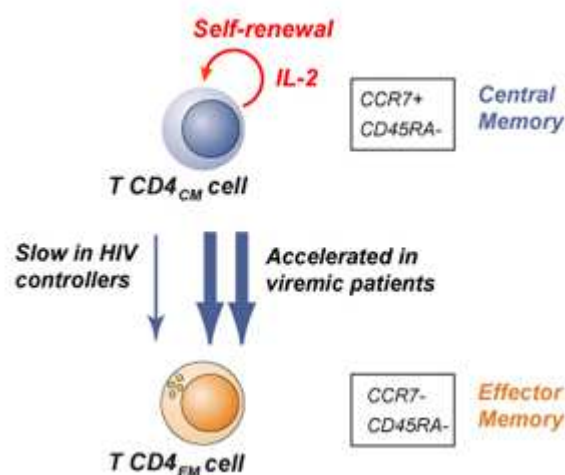
#### **1.4.4.1 Cellule T CD4+**

Il ruolo delle cellule T CD4+ nel controllo a lungo termine di HIV-1 non è chiaro, soprattutto in termini della loro capacità di indurre e mantenere una risposta T CD8+ HIV-specifica. In alcuni LTNPs è stata trovata una robusta, policlonale e Gag-specifica, risposta T CD4+ che a differenza dei progressori, è mantenuta a livelli elevati per tutta la durata della loro infezione e direttamente correlata con un carico virale inferiore (Boaz MJ et al 2002; Migueles SA et al 2000; Rosenberg ES et al 1997). Rispetto ai progressori e controller viremici, le risposte delle cellule T CD4+ da LTNPs hanno dimostrato avere il fenotipo CD4+/IL-2+/IFN- $\gamma$ +, con una vasta produzione di IL-2, indicativo di una forte risposta di tipo helper-1 (Migueles SA et al 2000; Potter SJ et al 2007). Tuttavia, è difficile valutare la relazione causale che le cellule CD4+ HIV-specifiche hanno con lo stato di non-progressione della malattia in questi individui, in quanto i bassi livelli di replicazione del virus potrebbero risultare inducenti la produzione di cellule CD4+ virus-specifiche nei LTNPs.

In individui ESN, sono state trovate cellule T HIV-specifiche, nonostante l'assenza di infezione, le quali hanno mostrato produrre basse quantità di IL-10 in confronto a quelle di soggetti infetti (Mazzoli S et al 1997), come si riscontra in alcuni LTNPs, le cui cellule producono bassi livelli anche di un'alta citochina Th2, come l'IL-4 (Zanusso S et al 1996). Anche cellule T CD4+ env-specifiche, sono state isolate da ESNs, le quali, invece, hanno mostrato un aumento nella produzione di CC-chemochine, in particolare RANTES e MIP-1 $\beta$  (Furci L et al 1997; Suresh P et al 2007) e la capacità di sopprimere in vitro la replicazione di ceppi di HIV R5-tropici (Furci L et al 1997).

Alcune evidenze però suggeriscono che i LTNPs hanno una ridotta attivazione delle cellule T CD4+ rispetto ai soggetti con malattia a progressione rapida (Bello G et al 2009; Marchetti G et al 2009). Minore attivazione immunitaria delle cellule T CD4+ riduce il numero di cellule sensibili alla infezione da HIV-1 e può potenzialmente portare ad una migliore prognosi della malattia (Fig.10). In uno studio, alcuni ECs (n = 4), esaminati longitudinalmente per 4 anni, avevano bassi livelli di attivazione immunitaria (misurata come quantità di cellule HLA-DR+/CD38+) e spontanea apoptosi delle cellule T CD4+, paragonabile ai controlli non infetti e inferiore ai progressori (Bello G et al 2009).





**Fig.10** Mantenimento del serbatoio di cellule T CD4+ central memory in HIV controllers come arma per la risposta a lungo termine (<http://www.pasteur.fr/recherche/RAR/RAR2006/Igc-en.html>)

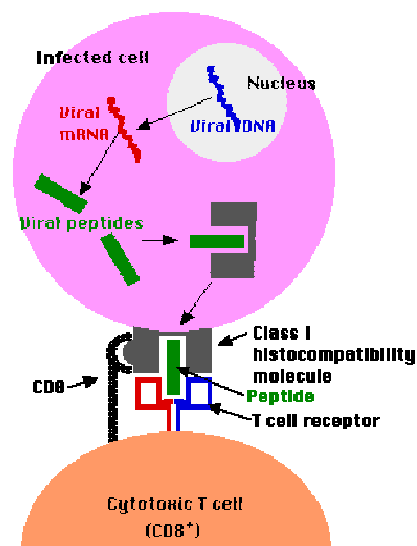
Contrariamente a questi risultati, ci sono prove indicanti che le cellule effettrici T CD4+, nei LTNPs, si trovano in uno stato cronico attivato, grazie alla loro maggiore espressione di HLA-DR sulla superficie cellulare, alla riduzione di produzione di IL-7 $\alpha$ , e ad un aumento di produzione di IFN- $\gamma$  (Potter SJ et al 2007); negli ESNs, invece la produzione di IFN- $\gamma$  risulta in alcuni ridotta (Hladik F et al 2003) , in altri, come visto in precedenza, risulta aumentata (Montoya CJ et al 2006). Queste cellule T CD4+, dei LTNPs, non mostrano segni dello stesso tipo di attivazione immunitaria generalizzata visto in progressori rapidi, ma piuttosto una specifica attivazione immunitaria limitata alle cellule T effettrici della memoria. In un'analisi effettuata, tramite microarray, di 135 antigeni di superficie delle cellule T, Wu JQ et al. (2007) hanno dimostrato che le cellule CD4+ dei LTNPs hanno avuto un upregolazione dell'espressione in superficie di HLA-DR, CD71 e CD38 rispetto ai pazienti viremici in terapia antiretrovirale altamente attiva (HAART).

L'equilibrio IL-7/IL-7R (IL-7 Receptor) è importante per il mantenimento dei livelli di cellule T CD4+ e distruggere questo equilibrio aumenta il rischio di progressione verso l'AIDS (Marchetti G et al 2009). E' stato trovato che LTNPs hanno livelli di espressione significativamente elevati di IL-7R su cellule T CD4+ rispetto ai progressori. Ciò solleva la questione se esiste una correlazione tra la ridotta attivazione delle cellule T con gli elevati livelli di IL-7R che esprimono le cellule T CD4+. Nei LTNPs le cellule T CD4+ di memoria sono state trovate anche esprimere elevati livelli del recettore per chemochine CCR7 sulla

loro superficie cellulare rispetto ai progressori e ai controlli non infetti (Marchetti G et al. 2009) (Fig.10).

#### **1.4.4.2 Cellule T CD8+**

Le Cellule T CD8+ e la loro trasformazione in CTL - le cellule effettrici citotossiche responsabili dell'uccisione delle cellule HIV-infette - sono i mediatori più importanti per abbassare la carica virale negli HIV-1 controllers e per facilitare il controllo immunitario nei LTNPs (Migueles & Connors 2001). Le risposte delle cellule T CD8+ dei LTNPs hanno dimostrato di essere ampiamente specifiche per sequenze conservate nei geni env, gag e pol (Betts MR et al 1999; Geldmacher C et al 2007; Migueles & Connors 2001). Le risposte CTL Gag-specifiche, che vengono attivate dopo il legame con gli epitopi antigenici p24 presentati da alleli HLA di classe I (Fig.11), selezionano positivamente varianti virali *escape* che non sono in grado di replicare nel modo più efficace (Geldmacher C et al 2007).



**Fig.11** Riconoscimento epitopi virali da parte delle cellule T CD8+.

( <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/C/ClassIpath.gif>)

Geldmacher et al. (2007) hanno isolato epitopi specifici dalle regioni N- e C-terminali di Gag che fortemente correlano con una bassa carica virale ed un'elevata conta di cellule T CD4+ nei LTNPs, identificandoli così come importanti bersagli immunologici. Recentemente è stato dimostrato (Ferré AL et al 2010) che cellule T CD8+ polifunzionali ed HIV-specifiche, rispondenti a Gag p24 sono più abbondanti nella mucosa rettale di HIV-controllers rispetto ai non-controllers o a individui trattati con HAART.

Tuttavia, lo stesso interrogativo che si applica alle cellule T CD4+ dei LTNPs vale anche per le loro cellule T CD8+ - ovvero, non si sa se alti livelli di cellule T CD8+ virus-specifiche siano la causa o l'effetto della loro bassa carica virale. Prima che vengano effettuati importanti progressi in un vaccino cellulo-mediato contro HIV, è importante comprendere quali particolari aspetti di una potente e specifica risposta CTL anti-HIV (se qualitativi o quantitativi) sono più fortemente correlati con la non-progressione della malattia. Fattori quantitativi (la frequenza di una risposta CTL HIV-specifica), non risultano differire significativamente tra LTNPs e Progressors e sono stati esclusi dal ruolo principale nella non-progressione della malattia (Betts MR et al 2006). Al contrario, alcuni studi hanno trovato che risposte delle cellule T CD8+ nei LTNPs differiscono significativamente dal punto di vista qualitativo (es. proliferazione, produzione di molecole citotossiche come IFN- $\gamma$ , IL-2 e granzima B) (Betts MR et al 2006; Migueles SA et al 2002). Betts et al. (2006) hanno dimostrato che i progressori hanno delle risposte CD8+ polifunzionali molto basse (sulla base di secrezione di citochine e chemochine) rispetto ai LTNPs. La frequenza totale di cellule T CD8+ HIV-specifiche non correla con la carica virale nei soggetti di studio, mentre i fattori qualitativi, come la frequenza e la percentuale di cellule T CD8+ Gag-specifiche che esprimono tutte le cinque funzioni (degranolazione, IFN- $\gamma$ , MIP-1 $\beta$ , Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  e IL-2) correlano inversamente con il carico virale in LTNPs ( $P < 0,001$ ). Se le cellule T CD8+ dei progressori sono state trovate svolgere non più di tre funzioni in una sola volta, le cellule T CD8+ dei LTNPs hanno prodotto quattro o cinque risposte contemporaneamente, dimostrando la loro potente risposta polifunzionale.

Nei loro esperimenti, Migueles et al. hanno dimostrato che cellule T CD8+ proliferanti ed HIV-specifiche, nei LTNPs, hanno avuto maggiore secrezione di molecole effettrici come la perforina e il granzima B, necessario per la lisi, CTL-mediata, delle cellule T CD4+ infette (Migueles et al., 2002, 2008). Solitamente la perforina è secreta in maniera strettamente regolata e non coordinata con il granzima B.

La presenza di Cellule CTLs HIV-specifiche sono state descritte in diverse Coorti di ESNs e molti autori dichiarano che queste cellule rendano un fondamentale contributo nella modulazione della resistenza ad HIV. CTLs HIV specifiche sono state osservate in una coorte di prostitute kenyote (Kaul R et al 2000); in tossicodipendenti (Makedonas G et al 2002); e in partner sessuali di pazienti HIV-infetti (Lo Caputo S et al 2003). Questi studi hanno analizzato approssimativamente 100 ESNs: CTLs HIV-specifici sono stati trovati nella maggior parte di tali ESNs (>70%).

La recente descrizione di un alternativo meccanismo di processamento e presentazione di antigeni esogeni da parte delle molecole HLA di classe I, conosciuto come *cross-priming*, potrebbe spiegare la presenza di CTLs negli individui ESN in assenza di un'infezione corrente. Secondo tale meccanismo, le cellule dendritiche possono processare il virus e presentarlo ai CTL precursori in assenza di replicazione virale (Reimann J et al 1999). Se questo fosse il caso, la presenza di CTLs HIV-specifici in soggetti ESN sarebbe la conseguenza, non necessariamente di un'infezione, ma di un differente e presumibilmente più efficiente pathway di processazione di antigeni all'interno delle cellule dendritiche.

Il confronto delle risposte T HIV-specifiche negli ESNs e negli individui HIV-infetti suggerisce anche che le differenze, nella suscettibilità all'infezione tra questi due gruppi, risiede nella qualità piuttosto che nella quantità delle loro risposte immunitarie. Perciò, CTLs CD8+ dei soggetti ESN riconoscono epitopi di HIV che sono differenti da quelli riconosciuti dalle cellule dei pazienti infetti (Kaul R et al 2001); epitopi T cell CD4+, raramente conservati nella proteina Env di HIV risultano immunodominanti negli ESNs, ma sono difficilmente riconosciuti da pazienti HIV-infetti (Jennes W et al 2003); e linfociti T CD8+, Gag-stimolati, isolati dagli ESNs sono caratterizzati da più elevati livelli di perforina intracellulare e granzima rispetto a quelli isolati da partners HIV-infetti (n=30 ESNs studiati) (Pallikkuth S et al 2007).

## **1.4.5 FATTORI IMMUNOLOGICI: *immunità umorale***

### **1.4.5.1 Immunità umorale anti-HIV:**

#### **Anticorpi anti-HIV nella storia naturale dell'infezione**

Subito dopo l'isolamento di HIV sono stati sviluppati numerosi test per ricercare anticorpi contro il virus. Questi anticorpi sono prodotti subito dopo l'infezione acuta (entro 1 o 2 settimane). La risposta anticorpale specifica per HIV comincia precocemente con la presenza di anticorpi diretti contro la proteina *Gag*, seguita poi da *Nef*, *Rev* e infine da *Env*; successivamente, e durante il primo anno di infezione, la produzione di anticorpi da parte delle cellule B è stabile (Elkins MK et al 2005). Dopo la produzione di IgG si osserva anche la presenza di anticorpi di classe IgA con un titolo più elevato in individui siero convertiti di recente, o che sono evoluti in AIDS (Margalith M et al 2001) rispetto ai soggetti con

un'infezione asintomatica. Considerando che generalmente questi anticorpi sono in concentrazione molto minore rispetto a quelli delle IgG (Kozlowski PA et al 2002; Shearer MH et al 1999), un'elevata carica virale e la presenza di IgA ad alto titolo potrebbe essere indice dell'avanzamento dell'infezione da HIV (2321).

Anticorpi diretti contro le varie proteine virali possono avere un differente isotipo; differenti sottoclassi possono essere dirette contro Gag, mentre una prevalenza di IgG1 si riscontra generalmente per gli anticorpi specifici per l'envelope (Barker E et al 1995). Per altro, citochine presenti al momento dell'esposizione delle cellule B alle proteine virali, possono influenzare il tipo di anticorpi prodotti (Barker E et al 1995). Le IgG1 sono la sottoclasse dominante e possono presentare titoli simili nei vari studi clinici (Ljunggren K et al 1988), mentre i livelli delle altre class anticorpali (IgM, IgA, IgG2, IgG4, IgD) possono variare a seconda dello stadio clinico.

### **Anticorpi neutralizzanti**

Una risposta convenzionale dell'ospite contro un'infezione virale si attua attraverso la produzione di anticorpi che riconoscono il virus e lo inattivano (neutralizzazione). Il potenziale neutralizzante di anticorpi anti-HIV varia tra gli individui. Anticorpi neutralizzanti (Nab) appaiono solitamente tardi nella risposta antivirale (mesi o anni post-infection) (Fenyo EM et al 1996; Burton DR 2002). Studi longitudinali hanno mostrato che titoli anticorpali neutralizzanti spesso aumentano nel tempo nei sieri di pazienti LTNP asintomatici (Cecilia D et al 1999). Infatti, alti titoli anticorpali neutralizzanti verso isolati precoci autologhi di HIV, sono stati osservati in campioni di siero tardivi dagli stessi individui (Zhang P et al 1999).

Diversi studi hanno dimostrato, anche se con piccole quantità dei campioni, che i LTNPs hanno una più forte risposta Nab virus-specifica contro sia ceppi virali autologhi che eterologhi, rispetto ai normal progressors (Braibant M et al 2008; Cecilia D et al 1999; Sreepian A et al 2004). È interessante notare che alcuni studi hanno dimostrato che i livelli di anticorpi neutralizzanti nei LTNPs raggiungono il picco tardivamente a causa di bassi livelli di replicazione virale e di un maggior numero di popolazioni virali eterogenee. Al contrario, i progressori perdono rapidamente la loro risposta neutralizzante nel corso della loro infezione a causa del loro costante declino di cellule T CD4+ (Cecilia D et al 1999; Lopalco L 2004).

NAbs HIV-specifici riconoscono epitopi all'interno della proteine strutturali Gag ed Env (Tab.2), anche se questi epitopi sono scarsamente immunogenici (Sreepian et al 2004).

**Proteina dell'envelope del virus: gp120**

Loop V3

Sito di legame al CD4

Regione V1

Regione V2

Regione visibile dopo il legame al CD4

**Proteina dell'envelope: gp41****Catene di carboidrati presenti sull'envelope**

**Tab.2** Regioni di HIV sensibili alla neutralizzazione mediata dagli anticorpi (tutte le regioni possono avere epitopi lineari o conformazionali, ma il dominio di legame al CD4 è generalmente conformazionale e gli epitopi nella gp41 sono solitamente lineari (Levy JA 2007).

La più forte risposta NAb-mediata, trovata nei LTNPs, è stata contro le proteine gp120 e gp41 di Env (Lopalco L 2004). La regione C1 e C2 della gp120, il V3 loop di gp120 (GPGRAF e motivi NNNT) e il motivo KLIC della gp41 sono esempi di peptidi immunogenici, target degli NAb nei LTNP (Sreepian et al., 2004). In una coorte di 67 LTNP, mutazioni nella gp120 hanno indotto un'ampia risposta neutralizzante, definita come almeno il 90% di riduzione di infettività NAb-mediata verso quattro isolati di virus primari eterologhi da ceppi differenti (Mahalanabis et al 2009). Risultati simili sono stati trovati in altri studi che hanno esaminato l'ampiezza delle risposte neutralizzanti da LTNPs e progressori verso oltre 20 isolati virali (Deeks SG et al 2006; Doria-Rose NA et al 2010).

Per la prima volta, Simek et al. (2009) hanno utilizzato una nuova tecnica di screening per identificare un gruppo di 'elite neutralizers', che costituiscono un sottoinsieme di individui infetti da HIV con anticorpi neutralizzanti reattivi contro numerosi isolati di HIV-1 provenienti da differenti clade. Questi elite neutralizers, che costituiscono circa l'1% dei 1.800 individui HIV-1-infetti provenienti dai cinque continenti, sono stati trovati neutralizzare più di uno pseudovirus, a un titolo IC50 (la concentrazione di anticorpi capace di neutralizzare il 50% dell'infettività del virus) di 300, sia all'interno di uno stesso clade, che contro virus appartenenti ad almeno quattro differenti clades. Questi anticorpi di recente scoperta offrono una rinnovata speranza perchè un vaccino possa indurre NAb HIV-1-specifici. Il passo successivo è ora di stabilire se questi anticorpi specifici si trovano nei soggetti LTNP ed EC e se ciò è direttamente correlato con la riduzione della loro carica virale.

Il termine “*anticorpi neutralizzanti ad ampio spettro*” (*broadly neutralizing antibodies* - BNAbs) si riferisce specificamente agli anticorpi monoclonali che sono stati clonati da individui affetti da HIV che hanno la capacità di prevenire l'infezione da HIV delle cellule suscettibili. non è corretto, si riferisce a tutti quegli anticorpi serici in grado di neutralizzare un ampio spettro di virus appartenenti a differenti clades. Essi sono in grado di neutralizzare più isolati, e sono di particolare interesse per lo sviluppo del vaccino, proprio perché possono neutralizzare sottotipi virali provenienti dalle diverse regioni del mondo. Anche se è noto che i BNAbs sono stati isolati da persone sieropositive, queste specificità anticorpali sono raramente riscontrabili in risposta a infezioni naturali. Sono stati ben caratterizzati diversi BNAbs: tre (b12, 447-52D, e 2G12) riconoscono epitopi del conservato dominio esterno della gp120 (Trkola A et al. 1996), e gli altri (2F5, Z13, e 4E10) riconoscono epitopi sulla membrana prossimale regione esterna (MPER) di gp41 (Zwick MB et al. 2001) (Tabella 3).

#### Broadly neutralizing antibodies against HIV

Broadly neutralizing antibody	Epitope recognized	Description of epitope
4E10	MPER of HIV-1 gp41	NWFNIT, may have cross-reactivity with cardiolipin
2F5	MPER of HIV-1 gp41	ELDKWA, may have cross-reactivity with cardiolipin
Z13	MPER of HIV-1 gp41	WNWFDITN
447-52D	gp120	Conformationally conserved epitope on outer domain of gp120
B12	gp120	Conformationally conserved epitope on outer domain of gp120

*MPER* membrane proximal external region

**Tab.3** Anticorpi neutralizzanti ad ampio spettro contro HIV (Baum LL 2010).

La regione MPER è composta dai residui aminoacidici compresi tra 662 e 683. Esperimenti di neutralizzazione in vitro e studi di protezione contro challenge virali in modelli animali, hanno dimostrato la loro capacità protettiva (Binley JM et al. 2004; Mascola JR et al. 2000). Dato che così pochi individui infetti da HIV fanno BNAbs, una domanda ovvia è il perché. Intensi sforzi nello sviluppo dei vaccini sono focalizzati su BNAbs. Gli studi svolti per capire meglio la grande capacità di legame di tali BNAbs comprendono studi di variabilità degli epitopi, i quali hanno dimostrato che 15 dei 25 residui MPER sono invariati. Hanno anche rivelato che 2F5 è stato in grado di legarsi a 31 diverse varianti della MPER; ciò contribuirebbe alla sua importante capacità di legarsi ai vari sottotipi virali (Bryson S et al. 2009). Quando è stata confrontata la capacità di legame del 2F5 e del 4E10, il legame del 4E10 è risultato più lento e termodinamicamente meno favorevole. Studi hanno dimostrato che il legame dipende dalla profondità di immersione degli epitopi riconosciuti dai BNAbs

all'interno della membrana virale (Dennison SM et al. 2009). Le differenze tra le strutture conformazionali degli epitopi legati da 4E10 e Z13 dimostrano la natura dinamica della regione riconosciuta da questi anticorpi (Pejchal RJ et al. 2009).

L'anticorpo VRC01, che riconosce il cosiddetto *CD4-binding site* nella gp120 (Wu et al. 2010) è stato scoperto neutralizzare il 90% dei circa 200 isolati di diversi ceppi di HIV ed essere non solo ampio, ma che potente, nella sua neutralizzazione - una duplice risposta che i ricercatori hanno sempre temuto di non trovare contemporaneamente in anticorpi neutralizzanti HIV-specifici.

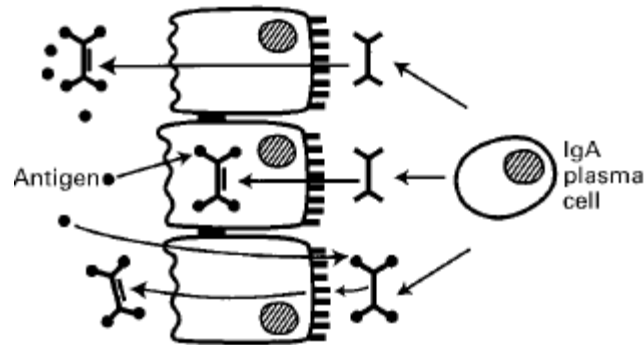
La proteina gp120 dell'envelope di HIV, infatti, è protetta dal riconoscimento degli anticorpi da uno scudo denso di glicani. Tuttavia, l'anticorpo monoclonale ampiamente neutralizzante (BNAbs) 2G12 e molti degli anticorpi recentemente descritti, PGT, sembrano legarsi direttamente al rivestimento di glicani di HIV. Anche se le interazioni tra carboidrati e proteine sono deboli (Wyatt R et al), il 2G12 riconosce il dimannosio terminale delle frazioni di oligomannosi,. Tuttavia, anche se il 2G12 neutralizza clade B, in generale è meno efficace contro altri clade, in particolare il C, che ha una disposizione di glicani oligomannosi un po' diversa rispetto ai virus B clade. Al contrario, sono stati recentemente isolati sei BNABs (PGTs 125-128, 130 e 131) che si legano specificamente ai glicani Man<sub>8/9</sub> sulla gp120 e neutralizzano potentemente adifferenti clade (Walker LM et al 2011). PGT 128, la più ampia di questi anticorpi, neutralizza oltre il 70% dei virus in circolazione a livello mondiale (Burton DA et al 2011) ed è, in media, un ordine di grandezza più potente dei recentemente descritti BNABs PG9, PG16, VRC01, e PGV04 (noto anche come VRC-PG04) (Walker LM et al 2009; Wu X et al 2010, 2011). La potenza di neutralizzazione espressa dalla classe di anticorpi PGT suggerisce che essi possono fornire una protezione a concentrazioni sieriche relativamente basse. Quindi, gli epitopi riconosciuti da questi anticorpi possono essere obiettivi per la progettazione di immunogeni per vaccini.

### **IgA mucosali antivirali negli ESNs**

Una possibile protezione immunitaria (o resistenza) negli individui ESN è anche correlata con la presenza di anticorpi IgA mucosali HIV-specifiche (Mazzoli S et al 1997). Queste IgA sono state osservate nelle secrezioni cervicali di soggetti ESN da coorti con differenti background genetici come donne eterosessuali provenienti dall'Italia (Mazzoli S et al 1997) e dall'India (Wanchu A et al , CROI 2008) , prostitute dal Kenya (Kaul R et al 1999; Hirbod T



et al 2008), dalla Thailandia (Beyre C et al 1999), dalla Cambogia (Nguyen M et al 2006) e dalla Costa D'Avorio (Ghys PD et al 2000). Tali anticorpi sono stati trovati anche nei liquidi seminali di partner ESN maschi di donne HIV-infette (Mazzoli S et al 1997).



**Fig.12** IgA a livello della barriera mucosale (Mestecky J 1999)

Uno studio effettuato su 145 neonati di madri HIV-infette ha mostrato che IgA salivari HIV-specifiche possono essere trovate proprio in tali neonati (IgA in 13/145 casi). Da notare che tutti i neonati HIV-esposti nei quali sono state rilevate le IgA, rimangono non-infetti dopo 1 anno di follow-up (Farquhar C et al 2008). Anche il nostro recente studio (Diomede L et al, *J Virology in press*) ha dimostrato la passiva acquisizione di anticorpi gp41-specifici, con capacità neutralizzanti, in neonati di madri infettate da HIV di sottotipo C.

La rilevazione di IgA reattive contro HIV nelle secrezioni mucosali dei soggetti ESN, in assenza di rilevabili IgG HIV-specifiche nel loro siero (sieronegatività), potrebbe sembrare enigmatica, specialmente dal punto di vista convenzionale dello switch isotipico degli anticorpi. Comunque, forti risposte antivirali IgA, con attività neutralizzante, sono state osservate in assenza di IgM e IgG virus-specifiche nelle condizioni sperimentali.

In alcuni soggetti ESN, la resistenza ad HIV è stata associata ad anticorpi HIV-neutralizzanti diretti contro piccole parti all'interno della regione ad  $\alpha$ -elica della porzione extramembrana della gp41 (epitopo QARILAV) (Clerici M et al 2002). Questa interagisce con la regione C5 della gp120 (Lopalco L et al 1993), un determinante neutralizzante conservato. Degno di nota è che l' $\alpha$ -elica della gp41 non è riconosciuta da IgA in individui HIV-infetti. In altre coorti ESN, IgA HIV-neutralizzanti riconoscono una separata regione immunodominante della gp41 (epitopo ELDKWA) (Krause RM et al 1997), che è frequentemente riconosciuta da individui HIV-sieropositivi. Possibilmente più di una regione di HIV può modulare la suscettibilità dell'ospite ad HIV.

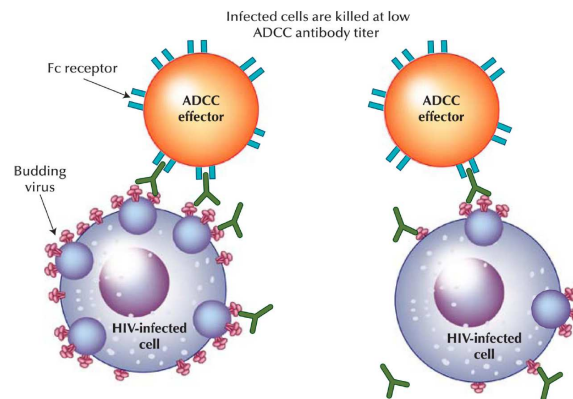
E' stato mostrato che IgA HIV-specifiche di ESNs sono capaci di prevenire l'entrata di HIV nelle cellule CD4+ nell'infezione in vitro di PBMC (Devito C et al 2000, 2002) e di inibire la transitosi in un modello in vitro, usando linee cellulari del colon (Devito C, Broliden K et al 2000). Infatti il nostro gruppo, in collaborazione con Tudor et al (2009) ha recentemente dimostrato che anticorpi monoclonali, IgA mucosali gp41-specifiche, derivati da soggetti ESN, bloccano la transitosi epiteliale e bloccano l'infezione delle cellule CD4+ da parte di HIV. Inoltre, si osserva di frequente come questo meccanismo sia efficace su più ceppi virali: infatti, IgA da soggetti ESN hanno mostrato cross-neutralizzare isolati primari di HIV di differenti clade (includendo A,B,C e D) (Devito C et al 2002).

E' importante sottolineare però che anticorpi IgA mucosali sono stati trovati in alcuni ma non in tutti i gruppi di individui ESN. Infatti, studi condotti in alcune coorti dell'Africa e del Nord America non hanno mostrato IgA mucosali HIV-specifiche (n=97) (Buchacz K et al 2001; Dorrell L et al 2000), mentre risultati ambigui (IgA 2/14 soggetti ESN) sono stati riportati in un'altra coorte (Skurnick JH et al 2002). Tali discrepanze potrebbero essere dovute alle difficoltà tecniche associate con la rilevazione di IgA nei liquidi mucosali, nei quali la concentrazione di tali anticorpi risulta molto bassa (Jackson S et al 2000; Wright PF et al 2002). In aggiunta, sebbene le IgA sono solo parzialmente sensibili al taglio proteolitico (Hirbod T et al 2007) , i livelli delle immunoglobuline mucosali possono variare a causa dei differenti metodi di raccolta campioni e in base alla concentrazione di enzimi proteolitici. Tuttavia, quando campioni raccolti in differenti coorti ESN, con differenti metodi, vengono analizzate nello stesso laboratorio, usando la stessa metodologia ELISA, e la stessa fonte di antigeni, IgA HIV-specifiche sono state riscontrate in alcune ma non in tutte le coorti (Mestecky J et al 2009). Questi risultati contraddittori suggeriscono che fattori sconosciuti potrebbero essere coinvolti nell'induzione e/o nella rilevazione delle risposte immunitarie mucosali HIV-specifiche (Mestecky J et al 2011).

### **ADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)**

La neutralizzazione non è, comunque, l'unico meccanismo di difesa dell'ospite mediato da anticorpi specifici. IgG1 HIV-specifiche si legano agli epitopi virali espressi sulle cellule infette e la loro regione Fc viene riconosciuta dai recettori FcγIII presenti su una serie di diverse cellule effettrici che possono mediare l'attività ADCC (Fig.13) , quali cellule natural killer (NK), monociti/macrofagi e neutrofili. Tali cellule uccidono quelle infette tramite un meccanismo citolitico o via apoptosi. Le cellule NK ,in particolare, utilizzano un determinato

meccanismo di riconoscimento volto ad uccidere le cellule infettate, in assenza di anticorpi, e ne usano un altro, quando gli anticorpi invece sono presenti.



**Fig.13** Meccanismo di ADCC (Baum LL 2010).

Anche se è possibile che un anticorpo abbia sia la capacità di neutralizzare il virus che mediare ADCC, come dimostrano gli studi in vitro di Tudor D et al. (2011), in cui l'importante anticorpo neutralizzante 2F5 è capace di stimolare ADCC nei confronti di isolati virali R5 e R4 tropici, la neutralizzazione del virus e l'attività ADCC sono spesso mediate da peculiarità degli anticorpi che non necessariamente coincidono. Gli studi di Chung AW et al. (2009) hanno confermato che la maggior parte di individui con infezione da HIV hanno nel siero anticorpi ADCC specifici anti-HIV, andando a misurare la degranolazione delle cellule effettrici con CD107a (LAMP-1), marker associato all'attività effettrice di NK e CD8<sup>+</sup>. Con il progredire della malattia, le cellule NK, in pazienti HIV-positivi, prima perdono la capacità di mediare le stesse funzioni NK e dopo, perdono la capacità di mediare l'attività ADCC. Recenti studi dimostrano che un inibitore delle metalloproteinasi della matrice porta ad un aumento nell'espressione dei recettori Fc sulle cellule effettrici, il che suggerisce che tali inibitori potrebbero essere dei terapeutici in grado di ricostituire le funzioni ADCC nelle fasi successive della malattia (Liu Q et al. 2009).

E' stata dimostrata la cross-reattività degli anticorpi che inducono ADCC con ceppi di HIV-1 e HIV-2 ed è stata osservata anche attività ADCC nef-specifica in presenza di plasma e PBMC provenienti da pazienti long-term non progressors (Yamada T et al. 2004) suggerendo che l'ADCC è diretta anche contro proteine di HIV non appartenenti all'envelope, ma espresse sulla superficie delle cellule infette (Brombin C et al, submitted).

### **1.4.5.2 Immunità umorale anti-cellula**

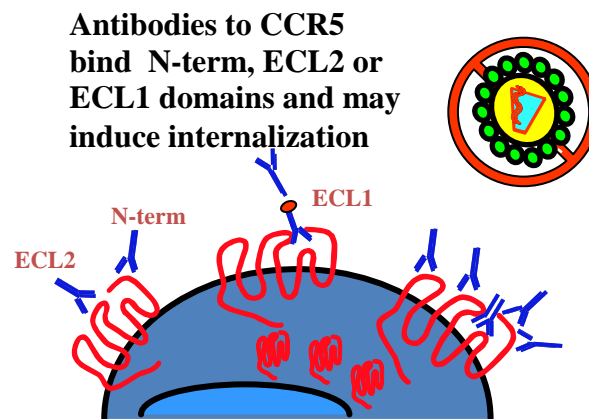
L'induzione di risposte immunitarie anti-cellula è piuttosto comune, e anticorpi anti-linfociti sono stati osservati precocemente nei sieri di pazienti HIV-infetti (Dorsett B et al 1985). Anche soggetti ESN possiedono alcuni anticorpi non-convenzionali, i quali potrebbero giocare un ruolo nella neutralizzazione di HIV. Anticorpi anti-cellula, come gli anti-CD4 o gli anti-CCR5, isolati da pazienti ESN e LTNP, hanno mostrato proprietà neutralizzanti verso HIV (De Santis C et al 1993;).

IgG HIV-neutralizzanti, dirette contro HLA di classe I e molecole CD4, sono state trovate nei sieri di soggetti ESN (Lopalco L et al 1999, 2000; Burastero SE et al 1996). Anticorpi anti-CD4 degli individui ESN riconoscono un ampio pannello di epitopi, compresi gli epitopi coinvolti nelle interazioni CD4-gp120. Anticorpi anti-CD4 sono stati trovati anche in alcuni individui HIV-sieropositivi e in alcuni donatori sani; tuttavia, tali anticorpi riconoscono differenti epitopi in confronto a quelli trovati nei sieri ESN (Lopalco L et al 1999; Burastero SE et al 1996). Simili risposte anticorpali si sono riscontrate in neonati da madri HIV-infette, sia nella trasmissione orizzontale sia in quella verticale (Lopalco L et al 1999). E' importante sottolineare che gli anticorpi anti CD4 riconoscono epitopi attivati dal legame con la gp120, suggerendo che tale risposta anticorpale è generata dopo ripetute e durature esposizioni ad HIV (Beretta A et al 1996; Lopalco L et al 2000).

Un'altra proteina cellulare, il corecettore chemochinico CCR5, è anche riconosciuta negli ESNs e LTNPs da IgA e IgG sia livello mucosale che sistemico.

Differenti tipologie di anticorpi bloccanti HIV, diretti contro il CCR5, sono stati isolati da soggetti infetti, o esposti all'HIV ma che non si infettano o addirittura anche in soggetti non esposti al virus.

Anticorpi anti-CCR5 che riconoscono il secondo loop esterno (ECL2) competono direttamente con HIV per il sito di legame al corecettore. La comparsa di tali anticorpi è stata osservata sia in soggetti non esposti ad HIV (Bouhlal H et al 2005), sia in individui HIV-positivi (Greene E et al 2001). Anticorpi diretti, invece contro il primo loop esterno (ECL1) del CCR5, non interferiscono con il legame diretto di HIV, ma piuttosto inducono downregolazione del recettore, abolendo così l'infettività del virus (Clerici M et al 2000; Barassi C et al 2004, 2005; Russo S et al 2006; Lopalco L 2004, 2008, 2011) (Fig.14). Dati recenti hanno dimostrato che il meccanismo di azione di questi anticorpi è mediato da una internalizzazione *long-lasting* del recettore attraverso un pathway dipendente dalla clatrina (Pastori C et al 2006), sembra suggerire che gli anticorpi CCR5-specifici mediano il loro effetto secondariamente al riconoscimento antigene-specifico.



**Fig.14** Anticorpi che riconoscono il CCR5 (Lopalco L 2010)

Anticorpi di questo tipo sono stati rilevati solo in soggetti ESN e in soggetti LTNP HIV-positivi, confermando l'ipotesi che tali anticorpi potrebbero essere coinvolti nella protezione da HIV o nel controllo dell'infezione (Brombin C et al, submitted).

A tal proposito, il nostro gruppo, in uno studio clinico, ha ricercato anticorpi anti-CCR5 in 497 soggetti, includendo 85 LTNPs, 70 *progressors*, 135 pazienti HIV-positivi riceventi la HAART (*terapia antiretrovirale altamente attiva*), e 207 donatori negativi per HIV (Pastori C et al 2006) (così come in un altro studio più recente in cui compaiono anche 10 ECs; *submitted*, Brombin C et al). Anticorpi anti-CCR5 sono stati isolati dal 23% dei LTNP ma non dalle altre sottopopolazioni studiate. Abbiamo così dimostrato che tali anticorpi riconoscono un epitopo conformazionale presente sul primo loop esterno e inducono una stabile e duratura downregolazione del CCR5 dalla superficie dei linfociti T. Inoltre, i livelli di anticorpi anti-CCR5 sembrano correlare con i livelli di esposizione ad HIV, essendo più bassi in soggetti sieronegativi (ESN) e più alti in individui LTNP sieropositivi (0,1% vs 8% degli anticorpi totali, rispettivamente).

La persistenza di livelli molto bassi, quasi non rilevabili, di replicazione virale potrebbe rappresentare un continuo stimolo che non conduce ad un'attivazione immunitaria, simile a quella osservata nel corso delle naturali infezioni virali latenti (per esempio l'herpes virus) o in antigeni alimentari e/o nei vaccini, i quali potrebbero instaurare tolleranza ma anche mantenere il loro potenziale antigenico (Lopalco L 2010).

Durante l'infezione di HIV, il legame degli antigeni virali potrebbe indurre alterazioni negli antigeni dell'ospite, i quali sono successivamente presentati al sistema immunitario in forma di epitopi self non comuni, generando quindi una risposta anti-self (Russo S et al 2006). La

generazione degli anticorpi anti-CCR5 sono stati attribuiti a diversi meccanismi: Ditzel et al. hanno mostrato che il CCR5 può agire come un allo antigene negli individui omozigoti per la  $\Delta 32$ . Gli anticorpi anti-CCR5 diretti verso epitopi differenti da quelli visti dagli anticorpi degli ESNs sono stati osservati anche in individui sani non precedentemente esposti ad HIV (Bouhlal H et al 2001, 2005). Questa scoperta potrebbe essere spiegata da fenomeni autoimmuni attivati da perturbazioni della membrana non associate a stimoli di HIV, come ad esempio virus esogeni o endogeni, o un'inflammatione locale. Quindi, soggetti ESN potrebbero subire un priming (possibilmente cross-reattivo) con altri virus o proteine, ed una volta esposti ad HIV, potrebbero montare una risposta secondaria, diretta verso allo-antigeni e self-antigeni associati con le particelle virali (Russo S et al 2006).

Inoltre, anticorpi anti-CCR5 risultano non indurre nessuna apparente alterazione nelle funzioni immunitarie, come dimostrato dal continuo e duraturo stato di buona salute dei soggetti che presentano tali anticorpi: queste scoperte incoraggiano ad indirizzare le ricerche verso anticorpi specifici per il CCR5. Gli anticorpi anti-CCR5 non influenzano le fisiologiche funzioni immunitarie grazie alla ridondanza della famiglia dei recettori chemochinici, ma potrebbero giocare un iniziale ruolo nella protezione (Margolis L et al 2006). Da notare è che gli anticorpi sia anti-CD4 che anti-CCR5 sono stati descritti come marker specifici di esposizione ad HIV in individui Asiatici e Caucasicci ma non Africani (Lopalco L et al 2005). Questa discrepanza potrebbe essere dovuta a differenze nel background genetico, nella via di esposizione, o nelle differenti condizioni ambientali, le quali possono modulare le risposte immunitarie ai microbi (Rizzardin G et al 1996, 1998; Clerici M et al 2000).

## **1.5 STRATEGIE VACCINALI BASATE SULLO STUDIO DEI CORRELATI UMORALI PROTETTIVI NATURALI**

### **1.5.1 Vaccini anti-*envelope* virale**

Dopo quasi 30 anni di ricerca sull'HIV, gli sforzi per la progettazione e lo sviluppo di un vaccino rimane senza frutto. Ad oggi, gli antigeni nativi e ricombinanti volti a suscitare risposte cellulari e umorali non sono riusciti a suscitare l'immunità protettiva nei trial clinici in tutto il mondo. Anche se numerosi quesiti scientifici e clinici sono ancora senza risposta, nuovi approcci vaccinali, non-classici, sono in pista.

La maggior parte dei vaccini prototipo utilizzati nelle sperimentazioni cliniche hanno impiegato proteine dell' *envelope*, native o ricombinanti, formulate con adeguati vettori e/o adiuvanti, con l'obiettivo di indurre risposte cellulari e anticorpali sotto vaccinazione. A causa delle peculiari caratteristiche e funzioni dell' *envelope* di HIV nel mediare l'attacco e l'ingresso del virus, gli approcci di immunizzazione classici sono stati in gran parte senza successo, e una descrizione chiara dei correlati di protezione di successo sono ancora in fase di definizione (Barouch DH et al 2010).

Il ruolo delle risposte cellulari nel combattere HIV è ancora controverso, poiché gli studi preclinici e sperimentazioni sui vaccini non sono riusciti a dimostrare la capacità dell'immunità cellulare di prevenire o controllare l'infezione acuta (McElrath MJ 2010), al contrario, anticorpi neutralizzanti da soli sono stati protettivi in esperimenti di immunizzazione passiva (Watkins JD et al 2011).

Recenti studi hanno confermato che attività anti-HIV di successo, mediate da anticorpi, includono citotossicità delle cellule anticorpo-dipendente (ADCC), l'inibizione virale (ADCVI) e il blocco della trascrizione virale attraverso la mucosa (Bomsel M et al 2011; Ferrari G et al 2011).

Il compartimento mucosale è infatti lo scenario chiave in cui l'immunità dell'ospite, sia innata e adattiva, che cellulare e umorale, ha di fatto l'unica opportunità di 'respingere' HIV.

Forti IgA HIV-bloccanti nelle secrezioni genitali, descritte negli esposti ad HIV, partner sessuali sani di soggetti HIV-infetti, sono state considerate conferire resistenza naturale contro HIV (Rerks-Ngarm S et al 2009; Barassi C et al 2004; Devito C et al 2000). Pertanto, non sorprende che le IgA anti-gp41, indotte da nuovi immunogeni, hanno impedito l'infezione sotto challenge virale, esercitando un certo numero di attività anticorpo-mediata, oltre alla neutralizzazione dell'infezione delle cellule T CD4+ che avviene anche in assenza di rilevabili risposte sistemiche neutralizzanti (Bomsel M et al 2011). Inoltre, anche difese a bassi titoli potrebbero dimostrarsi utili nel controllo dell'entrata locale del virus nei soggetti vaccinati, come di recente osservato in uno studio in Thailandia (Rerks-Ngarm S et al 2009). Ciò che sembra fare la differenza nella protezione dall'HIV non è semplicemente la 'quantità' di anticorpi, ma piuttosto la loro 'qualità', cioè la specificità dell'epitopo insieme al tipo di funzioni effettrici che essi potrebbero guidare: ad esempio, gli anticorpi anti-gp41 hanno dimostrato di impedire l'ingresso di HIV attraverso gli strati delle mucose, attraverso il blocco della trascrizione, nonché attraverso la neutralizzazione del virus e l'ADCC (Bomsel M et al 2011; Devito C et al 2000; Tudor D et al 2009).

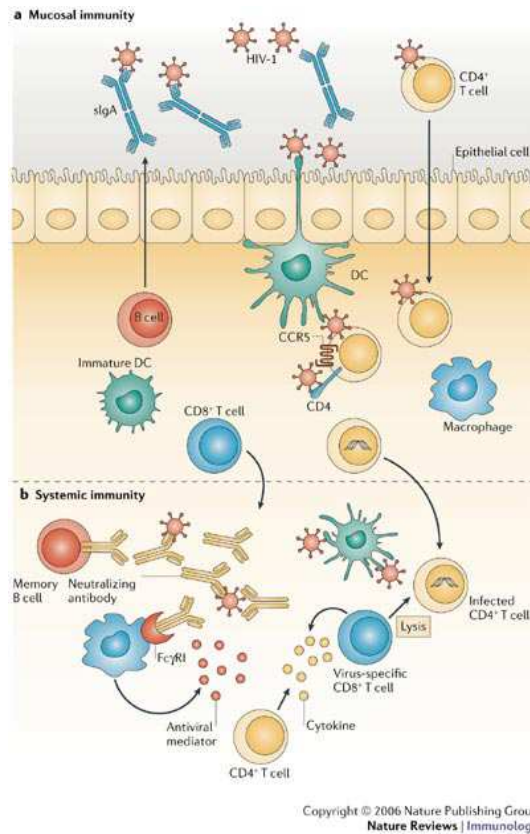
Proteine env native (gp120 e gp41) non sono state in grado di suscitare risposte efficaci sistemiche e soprattutto mucosali in molti studi clinici, perché il loro eterotrimerico instabile ha offerto, all'immunità dell'ospite, un obiettivo difficile, a causa della sua flessibilità, della sua glicosilazione schermante e dell'esposizione transitoria di epitopi significativi (Barouch DH et al 2010).

Le proteine dell'envelope di HIV formano uno spike trimerico inserito nella membrana virale: i lipidi svolgono un ruolo importante nel controllo della struttura 3D degli epitopi Env, soprattutto quelli della gp41, come conseguenza, ingresso di HIV nelle cellule bersaglio è in gran parte influenzato dai lipidi (Coutant J et al 2008). Perciò nuovi vettori vaccinali costituiti da membrane lipidiche, come virosomi e VLPs, sono riusciti a migliorare l'immunogenicità degli epitopi della gp41 e la presentazione dell'antigene in modo significativo, come dimostrano i nostri lavori (Bomsel M et al 2011; Visciano ML et al 2011). Gp41 dimostra una sequenza più conservata della gp120, probabilmente a causa della sua scarsa esposizione nell'eterotrimerico, e del suo ruolo chiave nel mediare l'entrata, sia nelle cellule del sistema immunitario e sia nella superficie mucosale. Anticorpi neutralizzanti anti-gp41 sono stati associati alla naturale resistenza ad HIV, hanno dimostrato efficacia nell'immunizzazione passiva e, soprattutto, hanno conferito protezione sotto vaccinazione e challenge virali.

Esperimenti di immunizzazione di successo contro HIV-1 sono nati da nuove strategie che disegnano immunogeni in grado di indurre anticorpi contro epitopi selezionati escludendo quelli immunodominanti, che sono domini 'esca'; l'uso di specifici *scaffold proteici tridimensionali* e vettori altamente immunogenici ma sicuri, è un altro punto chiave per superare le limitazioni derivanti dagli immunogeni classici: come la dispersione delle risposte immunitarie verso epitopi multipli; la generazione di anticorpi non-protettivi o addirittura rafforzanti l'infezione, e il raggiungimento di titoli anticorpali bassi e di breve durata (Walker LM et al 2010). Altri approcci, come la progettazione di antigeni mosaico, sono volti ad aumentare la forza e l'intensità delle risposte umorali, impedendo la fuga del virus dalla neutralizzazione senza influire le risposte delle cellule T (Barouch DH et al 2010).

L'HIV-1 ha principalmente un'infezione a trasmissione sessuale; per questo nuove strategie sono state finalizzate a colpire solo i principali siti iniziali di ingresso di HIV, cioè la mucosa rettale e genitale. L'immunità mucosale è profondamente diversa da quella sistemica, non solo in termini di risposta effettrice, ma anche nella sua iniziazione (Fig.15): i modi, di solito efficaci, per presentare gli antigeni e di indurre l'immunità sistemica potrebbero non funzionare correttamente quando è necessario stimolare reazioni nella mucosa.





**Fig.15** Rappresentazione schematica della risposta immunitaria sistemica e mucosale contro HIV (Letvin NL 2006).

E' ormai riconosciuto che la mucosa genitale è stimolata in maniera migliore dalla vaccinazione intranasale; nuovi adiuvanti (Lindqvist M et al 2009), vettori vaccinali auto-adiuvanti, come le VLPs, sono stati recentemente sviluppati per migliorare la risposta immunitaria della mucosa e per ottenere una risposta locale e di protezione proprio nella mucosa genitale, così come la generazione di anticorpi circolanti (Bomsel M et al 2011).

Molti dei menzionati approcci innovativi sono stati testati in un nuovo prototipo di vaccino profilattico (virosoma accoppiato a subunità gp41 [P1-rgp41]), fornendo una prova significativa del loro potenziale nella tecnologia dei vaccini (Bomsel M et al 2011). In primo luogo, l'immunogeno è basato sulla conservata glicoproteina gp41, progettato per concentrare le risposte verso epitopi protettivi, e quindi ottenere una risposta più ampia umorale ed evitare interferenze dovute a domini immunodominanti, non-protettivi. In secondo luogo, è stato utilizzato un vettore basato sui lipidi per presentare la gp41 ricombinante in una conformazione trimerica, imitando gli spikes nativi dell'env; inoltre, antigeni influenzali esposti sulla superficie virosomale hanno fornito un adiuvante sicuro ed efficace in grado di indurre una forte risposta immunitaria senza interferire con l'immunità pre-esistente dell'ospite. La protezione, osservata nelle femmine di scimmie rhesus (8 scimmie su 11

vaccinate) a seguito di challenge virale, è stata correlata alle IgA gp41-specifiche della mucosa, capaci di bloccare la trascrizione di HIV, e alle IgG mucosali HIV-specifiche dotate di attività ADCC (Lopalco L & Bomsel M, editorial 2011, Expert Review of Vaccines)

### **1.5.2 Vaccini anti-CCR5**

La produzione di anticorpi anti-CCR5 è stata indotta in vari esperimenti condotti sia in roditori e in scimmie (Barassi, C et al 2005; Chackerian, B et al 1999 e 2004).

Esperimenti di immunizzazione sono stati effettuati da Chain et al. (2008), che hanno immunizzato dei conigli con peptidi chimera che corrispondono a corti frammenti del dominio N-terminale e con la tossina del tetano. E' stata generata una forte risposta anticorpale; esperimenti di legame *in vitro* hanno mostrato che gli anticorpi specifici per il CCR5 corrispondono a una piccola percentuale degli anticorpi totali prodotti con l'immunizzazione; in ogni caso, questi anticorpi specifici bloccano, *in vitro*, l'infezione dei macrofagi da parte del virus.

De Vito et al. (Devito, C et al 2004) hanno invece somministrato un priming con DNA, seguito da un boost costituito da peptidi derivati dal dominio V3 della gp120, dalla regione MPER della gp41 (contenente l'epitopo ELDKWAS) e dal dominio ECL2 del CCR5. Questo tipo di immunizzazione, effettuata nei topi, ha prodotto IgG e IgA specifiche nel siero e nelle secrezioni mucosali (intestinali, vaginali e polmonari), e sono state rilevate fino a 12 mesi dopo la somministrazione del boost.

Nel nostro laboratorio, Barassi et al. (2005) hanno creato degli immunogeni chimera, costituiti da un peptide derivato da ECL1 umano, inserito nella proteina capsidica del Flock House Virus (FHV), un sistema di espressione che mantiene gli inserti in conformazione nativa (Buratti, E et al 1998). Somministrando questi immunogeni ai topi per vie mucosali e sistemiche, sono state rilevate IgG e IgA anti-CCR5 umano nei sieri e nei fluidi vaginali murini. Questi anticorpi riducono notevolmente i livelli di CCR5 sulla superficie dei linfociti T CD4+ derivati dal sangue periferico e dai fluidi vaginali. Esperimenti *in vitro* hanno mostrato che queste IgA e IgG murine legano specificamente linfociti T CD4+ umani e murini e la linea cellulare U87 (transfettata per esprimere stabilmente il CCR5 umano); inoltre, sono in grado di downregolare l'espressione del CCR5 dalle cellule CD4+ umane e murine; infine, inibiscono l'infettività di ceppi R5 di sottotipo B *in vitro*.

Chackerian et al. (Chackerian, B et 1999) hanno usato il dominio N-terminale del CCR5 di macaco fuso alla streptavidina; una volta coniugato ad alte densità alla proteina capsidica L1

all'interno di pseudovirus di papilloma bovino, hanno immunizzato i macachi, i quali, in risposta, hanno prodotto alti titoli di IgG anti-CCR5, in grado di neutralizzare *in vitro* ceppi di SHIV (simian human immunodeficiency virus) CCR5-dipendenti. Cellule derivate dalla milza, dal timo e PBMC, sono state analizzate con citofluorimetria ma non è stata evidenziata alcuna diminuzione nel numero di cellule esprimenti il CCR5 (linfociti e macrofagi) negli animali immunizzati rispetto ai controlli. Nei macachi sottoposti all'infezione (challenge) da SHIV, la carica virale è decisamente più bassa rispetto ai controlli, indicando che gli autoanticorpi anti-CCR5 contribuiscono a tenere sotto controllo la replicazione virale.

Borges et al. (2004) hanno testato un vaccino consistente in tre peptidi extracellulari del CCR5, un frammento N-terminale della gp120 e la proteina ricombinante p27 di SIV. Questi peptidi sono stati legati alla proteina batterica HSP70, usata come vettore, e con questo sistema sono stati vaccinati i macachi mediante somministrazioni mucosali e sistemiche. La somministrazione vaginale di SHIV ha provocato infezione tutti i macachi, con una sostanziale differenza di carica virale tra gli animali vaccinati e i controlli; il virus è stato eliminato in 5 animali su 9 immunizzati.

Misumi et al. (Misumi, S et al 2006) hanno utilizzato peptidi sintetici ciclici dal secondo loop esterno (ECL2), per indurre anticorpi anti-CCR5 nei macachi. Gli animali sono stati immunizzati con un peptide coniugato ciclico (cDDR5-MAP), inducendo produzione di anticorpi reagenti sia verso il CCR5 di macaco che umano, e in grado di inibire *in vitro* l'infezione di un isolato virale di laboratorio (JRFL) di isolati primari (sottotipo A: 93RW004 e sottotipo C: MJ4), tutti di ceppo R5, e di un isolato patogeno di SHIV (SF162P3). In seguito al challenge con SHIV, i macachi mostrano un'infezione acuta attenuata e una carica virale più bassa rispetto ai controlli.

Questi esperimenti dimostrano che è possibile indurre anticorpi anti-CCR5, che mostrano attività neutralizzante *in vitro*. Questi anticorpi, *in vivo*, non proteggono gli animali dall'infezione, però sono in grado di tenere la carica virale sotto controllo (Russo, S. e tal 2010).

## 2. SCOPO DELLA TESI

Il presente studio racchiude diversi lavori aventi per obiettivo comune l'intento di generare nuovi approcci vaccinali contro l'infezione da HIV attraverso l'analisi di possibili correlati di protezione umorali contro l'infezione da HIV, presenti in quelle popolazioni che naturalmente, senza l'aiuto di fattori esterni (come ad esempio, le terapie antiretrovirali), riescono a rimanere IgG-sieronegative, nonostante una duratura esposizione ad HIV (ESNs), o sono in grado di controllare, per lungo tempo, la stessa infezione (LTNPs, ECs).

Infatti la prima parte della tesi riguarda, nel particolare, lo studio dei parametri umorali che caratterizzerebbero una coorte di 45 individui infetti da HIV ai differenti stadi clinici; uno studio sulla trasmissione materno infantile; e infine, una coorte di donne cambogiane ESN, dalle cui cellule B, presenti nelle secrezioni cervico-vaginali, è stata costruita una libreria fagica di Fab IgA-k/λ, e scrinata per la specificità verso gp41 di HIV. Dallo studio di questi gruppi si è potuto risalire alle caratteristiche che definiscono le proprietà degli anticorpi HIV-specifici: in termini di isotipi anticorpali coinvolti; epitopi virali riconosciuti; e attività neutralizzante del virus.

Da questi presupposti si è potuto così proseguire lo studio nel progettare e produrre immunogeni che vadano a stimolare quella risposta immunitaria umorale, osservata naturalmente nelle categorie sopra citate, e di cui, la maggior parte degli individui, sono sprovvisti. Questo si è cercato di farlo disegnando proteine chimeriche costituite dal sistema carrier delle *VLPs* (*Virus-Like-Particles*), e cioè virus non infettivi costituiti da proteine dell'envelope auto-assemblanti, prive di materiale genetico, utilizzate già per l'immunizzazione contro il papillomavirus. Questi immunogeni ricombinanti sono stati poi impiegati per immunizzare i topi, i cui sieri sono stati testati per immunogenità, attività neutralizzante ed anche per l'ADCC.

Quindi, per riassumere, lo studio dei correlati umorali protettivi contro l'infezione da HIV, è servito per disegnare immunogeni che potrebbero rappresentare una nuova strategia vaccinale contro HIV.

## 3. MATERIALI E METODI

### 3.1 STUDIO I

#### **Popolazione in studio**

Sono stati analizzati pazienti (38 uomini e 17 donne, di età compresa tra 17-67 anni) di due diverse coorti italiane. In particolare, il nostro campione comprendeva 10 Long Term Non Progressors (LTNP), 8 Elite Controllers (EC), 10 Pazienti in progressione veloce, trattati con HAART (HAART +), 10 infezioni acute (AI), 7 pazienti affetti da AIDS, allo stadio terminale della malattia (AIDS).

Tutte le popolazioni studiate sono stati reclutati presso il Dipartimento di Malattie Infettive dell'Istituto Scientifico San Raffaele o presso la Clinica Malattie Infettive dell'Università degli Studi di Milano, Ospedale L. Sacco.

La **tab.1** riassume lo stato clinico della popolazione in studio. Il comitato istituzionale di revisione e il comitato etico locale di ogni sito clinico hanno approvato le indagini, e tutti i soggetti hanno dato il consenso informato per lo studio.

Un pool di 10 controlli sani non esposti al virus HIV sono stati utilizzati come controlli negativi in tutti i test.

**Tab I. Stato clinico della popolazione in studio.**

	N° Patients	Follow up	Risk Factor	Age	Sex	Therapy	HIV RNA	CD4
		Months after therapy		mean (range)			mean (range)	mean (range)
LTNP	10	nd	Hetero, Homo, IVDU*, Transfusion	49 (71-43)	7M, 3F	no	2,680 (0-11,000)	821 (513-1,515)
EC	8	nd	Hetero, Homo, IVDU	51 (34-67)	4M, 4F	no	<37	1,082 (511-1,880)
HAART	10	nd	Hetero, Homo	42 (32-61)	9M, 1F	2NRTI, 3NRTI, NNRTI +IP, 3NRTI+IP, 2NRTI+2IP	23,518 (0-190,000)	738 (517-2,184)
AI	10	0	Hetero, Homo	31 (17-49)	6M, 4F	no	88,450 (0-190,000)	621 (204-1,069)
AI (followup)	10	6 (4-8)				NNRTI+1IP, 3NRTI+1IP, 2NRTI+2IP	2,846 (0-13,347)	940 (440-1,452)
AIDS	7	nd	Homo, IVDU	37 (33-46)	5M, 2F	no	73,637 (21,079- 440,000)	226 (141-236)

\*IVDU stands for Intravenous Drug Users

## Quantificazione delle immunoglobuline

IgA e IgG totali sono state misurate in tutti i campioni con metodo ELISA. In breve, il *coating* delle piastre ELISA è stato fatto con una diluizione 1:2000 di goat anti-human IgA o IgG (100 ul/pozzetto), in tampone di *coating* e incubate per 1 ora a 37° C. Dopo il lavaggio, è stata aggiunto un tampone di bloccaggio (1% skimmed milk in phosphate buffer, Sigma) e le piastre sono state incubate per 1 ora a 37° C. Diluizioni seriali dei campioni e le IgA o IgG, standard di riferimento (Sigma), sono state incubate per 1 ora a 37° C. Dopo il lavaggio, Goat anti-human IgA-Biotin (diluito 1:5000) o Goat anti-human IgG-Biotin-conjugate, diluito 1:2000 (KPL,) è stato aggiunto e incubato 1 ora a temperatura ambiente. Poi, streptavidin-HRP-coniugato (Vector Laboratory), diluito 1:3000, è stato incubato per 1 ora a temperatura ambiente. TMB substrato (KPL) è stato incubato per 5 minuti a temperatura ambiente al buio. Poi 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> è stato aggiunto, e le piastre sono state lette con uno spettrofotometro a 450 nm. Le concentrazioni delle IgA o IgG totali sono state determinate per interpolazione, utilizzando la retta di calibrazione di IgA o IgG standard di riferimento, rispettivamente.

## Legame delle immunoglobuline alle proteine env ricombinanti e peptidi

Le frazioni di immunoglobuline sono state testate in ELISA. Le piastre sono stati coperte con le proteine ricombinanti (gp120 Bal e gp120 IIIB ottenuti tramite il NIBSC, programma EVA Centro per l'AIDS reagenti, Regno Unito. Gp41 da Morgane Bomsel) e peptidi gp41- specifici

(**Tab.1**) a 1 ug/mL, con la media di 1 notte di incubazione in buffer  $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Le piastre sono state saturate 1h con PBS e 3% di BSA. Le Ig eluite sono state aggiunte e incubate per 1h a 37° C. Il legame delle Ig è stato rivelato dagli anticorpi rabbit HRP-conjugated anti-human IgG and IgA (Dako, Santa Barbara, California, USA). La reazione enzimatica è stata sviluppata e letto a 492 nm. I titoli endpoint sono stati definiti come due volte la densità ottica (OD) ottenuti in 20 soggetti sieronegativi di controllo.

### **Test di neutralizzazione virale**

Due linee di cellule geneticamente modificate, TZM-bl e U87.CD4.CCR5 e sei ceppi HIV-1 (**Tab.2**) sono stati utilizzate per valutare in vitro l'attività neutralizzante di tutti i campioni. Le cellule TZM-bl sono geneticamente per esprimere una proteina Tat-reattiva gene luciferasi reporter. U87.CD4.CCR5 cellule sono geneticamente ingegnerizzate per esprimere CD4 e CCR5, per consentire l'ingresso di HIV-1, e sono anche geneticamente modificate per esprimere il gene luciferasi. Stock di HIV-1 pseudovirus sono state generati dalla co-trasfezione delle cellule 293-T con plasmidi basati sul pCAGGS esprimenti Env e un plasmide *backbone* mancante di Env (pNL4-3.Luc.RE-); sono stati titolati per l'infettività nelle TZM-bl e U87/CD4/CCR5. La co-trasfezione genera pseudoviruses HIV-1 che sono in grado di infettare le cellule con un singolo ciclo di infezione perché i plasmidi codificano un genoma di HIV-1 incompleto. L'attività neutralizzante è valutata tramite la riduzione dell'espressione del gene della luciferasi dopo un singolo ciclo di infezione virale. L'espressione del gene luciferasi è quantificata dalla luminescenza ed è direttamente proporzionale alla quantità di infezione virale.

Humoral parameters used in this study			
Isotype	Region	Protein	
IgG	ECL1	CCR5	
IgA	ECL1	CCR5	
IgG	P1	HR2-gp41	
IgA	P1		
IgG	T20	HR2-gp41	
IgA	T20		
IgG	QARILAV	HR1-gp41	
IgA	QARILAV		
IgG	Consensus B	gp41	
IgA	Consensus B		
IgG	IIIB	gp120	
IgA	IIIB		
IgG	BAL	gp120	
IgA	BAL		
Igs	ADCC		
IgG	Total		
IgA	Total		
Viruses used for neutralization			
Viruses	Clade	Tropism	Target cells
SOS 140	Lab Strain B	R5	U87
SF162	Lab strain B	R5	TZMbl
QH0692	Primary B	R5	TZMbl
PVO	Primary B	R5	TZMbl
AC10	Primary B	R5	TZMbl
ZM214	Primary C	R5	TZMbl

**Tab.2 Parametri umorali e virus usati in neutralizzazione**

## Analisi Statistica

Nella prima fase di analisi, abbiamo classificato gli endpoint di interesse in variabili *continue* o *discrete*. In particolare, le variabili che assumono una vasta gamma di valori sono state considerate come *continue*. Dall'altra parte, le variabili aventi tanti valori corrispondenti a zero e poche misure con valori diversi, sono state divise in 2 sottoinsiemi, cioè trasformate come variabili 0-1, con valori 0 o 1 (= diverso da 0). Quindi, sono state considerate come variabili *discrete*. Si desidera sottolineare che le variabili continue e discrete sono stati trattate separatamente, con strumenti statistici adeguati per la natura della variabile oggetto di studio. Inoltre, per le successive analisi, sono state utilizzate alcune "risposte ratio" ottenute normalizzando i valori grezzi delle variabili continue sul totale della risposta immunitaria. Ovviamente, anche questi rapporti sono stati trattati come endpoints continui. Vengono definite "Ratio\_nome della risposta". Ad esempio, "ratioG\_120Bal" indica una variabile ottenuta come rapporto tra IgG\_120Bal e IgG\_Total. Grafici a barre di variabili



categoriali (IgACCR5, IgAT20, IgAP1, IgGCCR5, IgGT20, IgGP1 e IgG-QARILAV) sono mostrati in fig.1 (cap.4, Risultati).

Infine, analisi di classificazione e di regressione (CART) è stata effettuata per sviluppare una definizione clinica per classificare i pazienti HIV sulla base di tutte le misure, cioè, tutti gli anticorpi, gli endpoint clinici e i virus. La percentuale di pazienti correttamente classificati è stata utilizzata come una misura di precisione per la definizione clinica derivata.

## **3.2 STUDIO II**

### **Popolazione in studio**

74 donne sudafricane, madri per la prima volta, frequentanti il Coronation Women and Children Hospital, di Johannesburg, sono state studiate. Al momento dell'arruolamento, tutte sono state sottoposte al test per HIV-1 per valutare la sieropositività, carica virale e sottotipo: 40 sono risultate infette da sottotipo C e 34 non infette. Il sangue del cordone ombelicale è stato preso da tutte le madri ed i sieri sono stati ottenuti da madri e neonati. Programmi PMTCT (Programs Mother-To-Child Transmition) in Sud Africa attualmente prevedono una somministrazione di una singola dose di Nevirapina (NVP) alla madre durante il travaglio (300 mg ogni tre ore) e al bambino entro poche ore dalla nascita (17). Dei bambini nati da madri con infezione da HIV, 24 sono risultati HIV positivi e 16 HIV negativi. Diagnosi sierologica di routine per infezione da HIV in bambini PCR-positivi è stata confermata a quindici mesi di età. Cellule e plasma, dal sangue materno e dal cordone ombelicale, sono state raccolte contemporaneamente al momento del parto, e i campioni sono stati aliquotati e conservati a -80 ° C fino al test. Lo studio è stato condotto in conformità con gli orientamenti della Dichiarazione della Associazione Medica Mondiale di Helsinki ed è stato approvato dal Comitato Etico dell'Università di Witwatersrand, Johannesburg, Sud Africa.

### **Titolazione di anticorpi specifici anti-Env tramite ELISA**

Sieri di madri e bambini sono stati testati per il legame al pannello di peptidi sintetici gp41 (Tab.3), con procedure ELISA standard. In breve, pozzetti della piastra sono stati rivestiti con 50 ng/pozzetto di ogni peptide ed incubato overnight, a 4°C in 50 mM di buffer NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Tutte le piastre sono stati saturate con soluzione 5% di skim milk (Sigma-Aldrich, Italia), 5% di FBS e 0,1% di Tween20, per 1 ora a 37° C. Diciassette diluizioni seriali dei sieri in duplicato, a partire da 1:20 fino ad oltre 1:1,300,000, sono stati aggiunte e incubate per 1 ora a 37° C. Le piastre sono state incubate con biotinylated goat anti-human

IgG diluito 1:5000 (SBA, Birmingham, USA), per 1 ora a temperatura ambiente, e poi con horseradish peroxidase streptavidin (Vector Lab, Burlingame, CA, USA), diluita 1:3000 per 1 ora a temperatura ambiente. La reazione enzimatica è stato sviluppato e letto a 450nm. I titoli sono stati definiti come diluizioni del campione che danno una OD superiore al valore cut-off. Il cut-off è stato valutato e definito come media OD+3SD per ciascuna diluizione dei campioni di tutti i controlli negativi. Ogni OD, ottenuta con la diluizione di un specifico campione, è stata confrontata con il valore del cut-off ed espressa come titolo.

Pep	Domain	Sequences	SF162	R5	Features & Significant epitopes	
			DUI72	R5-C		
			DUI56	R5-C		
gp41	#3	HR1 584-606	GIKQLQARVLAVERYLKDQQLLG GIKQLQTRVLAIERYLKDQQLLG GIKQLQARVLAIERYLKDQQLLG			Neutralizable QARILAV epitope within HR1
	#27	596-613	ERYLKDQQLLGIGWCSGK ERYLKDQQLLGIGWCSGK ERYLKDQQLLGLWCSGK			Cystein loop, immunodominant epitope (IDE)
	#14	HR2 649-671	NYTNLIYTLIEESQNQQEKNQE NYTNTIYSLLEESQNQQEKNKD NYTDTIYRLLLEDSONQQEE NEKD			Hydrophobic and glycosylated domain
	#23	HR2 616-643	CTTAVPWNASWSNKSQSLDQIWNMTWME CTTAVPWNASWSNKSIEIWNMTWME CTTNVPWNSSWSNKSQTDIWNMTWME			Hydrophobic and glycosylated domain
	#20	HR2 662-689	QNQQEKNQELLELDKQASLWVWFDISK QNQQEKNKDLLALDSWESLWVWFITE QNQQEKNKDLLALDRWQNLWVWFITE			MPER domain, 2F5 and 4E10 epitopes
	#12-B	HR2 657-680	LIEESQNQQEKNQELLELDKQAS LLEESQNQQEKNKDLLALDSWES LLEESQNQQEKNKDLLALDRWQNL			MPER domain, 2F5 epitope
	#12-C	HR2 649-680	NYTNLIYSLIEESQNQQEKNQELLELDKQAS NYTNTIYSLLEESQNQQEKNKDLLALDSWES NYTDTIYRLLLEDSONQQEKNKDLLALDRWQNL			MPER domain, 2F5 epitope

Tab.3 Sequenze peptidiche gp41 di HIV.

## Produzione di Pseudovirus per saggio di neutralizzazione di HIV-1.

Gli stock di pseudovirus-Env di HIV sono stati prodotti tramite la co-trasfezione di cellule 293T/17 con 2 mg di un plasmide esprimente HIV-1 rev/env e 12 mg di un plasmide backbone, env-carente, di HIV (pSG3ΔEnv). Il surnatante contenente pseudovirus è stato raccolto 24 ore dopo la trasfezione, chiarificato mediante centrifugazione e filtrato attraverso filtri di 0,45 mm, e singole aliquote da 1 ml sono state conservate a -80° C. Il 50% della dose infettiva della coltura tissutale (Tissue Culture Infectious Dose/TCID50), per ogni preparazione di pseudo virus, è stata determinata tramite infezione delle cellule TZM.bl, come descritto in precedenza (Li M et al 2005).

## **Test di neutralizzazione virale**

La neutralizzazione è stata misurata nelle cellule TZM-bl con virus Env-pseudotyped (Li M et al 2005). In breve, 200 TCID<sub>50</sub> di pseudovirus, in 50 ul di terreno, è stato incubato con 100 ul di tutti i sieri, serialmente diluiti, o TriMab (una miscela di anticorpi monoclonali 2F5, 2G12, b12, 50:50:50 ug/ml) (NISBC), utilizzato come controllo positivo in una piastra da 96 pozzetti in triplicato per 1 ora a 37° C. E' stata aggiunta una sospensione di 100 ul di cellule TZM-bl ( $1 \times 10^4$  cellule/pozzetto) contenente 75 ug/ml destrano DEAE (SIGMA); le culture sono state poi incubate a 37° C in 5% CO<sub>2</sub> / 95% aria per 48 h. L'infezione è stata monitorata attraverso la valutazione dell'attività della luciferasi. I titoli sono stati calcolati come ID<sub>50</sub>, la diluizione del campione alla quale le unità di luminescenza relativa (RLU) sono state ridotte del 50% rispetto ai pozzetti di controllo con il virus senza inibitore, dopo la sottrazione del fondo RLU nei pozzetti con le cellule di controllo (senza infezione da virus). I campioni che mostrano titoli di neutralizzazione superiori a 1:100 sono stati considerati come sieri "altamente" neutralizzanti.

## **Analisi statistica**

Per determinare l'associazione tra anticorpi IgG anti-epitopi gp41 e neutralizzazione del virus, è stato stabilito un cut-off di 1:20. Di conseguenza, i sieri sono stati classificati come a basso/alto titolo o neutralizzanti/non-neutralizzanti a secondo di questo cut-off. L'ipotesi di indipendenza tra titoli anticorpali e neutralizzazione del virus è stata valutata mediante test non parametrici, dal momento che la frequenza attesa in una cella è stata inferiore al 5%.

Per tutte le ipotesi testate, p-value a due-code inferiori a 0,05 sono stati considerati significativi. L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando la versione SAS 9.1 (SAS Institute, Cary, NC) e i whisker plots sono stati ottenuti utilizzando STATA 9.1 (StataCorp LP, College Station TX, USA).

## **3.3 STUDIO III**

### **Popolazione in studio**

In questo studio, 52 donne ESN che vivono con un partner stabile HIV-1 sieropositivo (n=41) o prostitute (n=11), sono stati reclutati presso l'*Anonymous and Free Voluntary Counseling and Testing Center* dell'Istituto Pasteur (Phnom Penh, Cambogia). Tutte le donne ESN sono

state confermate come sieronegative, tramite test di PCR su sangue e test sierologici. Tutti i soggetti studiati sono privi di mutazioni geniche CCR5-Δ32, anche nello stato eterozigote.

## Costruzione e panning della libreria combinatoriale

Una libreria combinatoriale Fab  $\alpha/\kappa\lambda$  è stata costruita secondo *Barbas CF, 1991*. L'RNA delle cellule B cervico-vaginali delle donne ESN con IgA gp41-specifiche nelle secrezioni (n= 22) è stato estratto con Trizol (Tecnologia Vita Invitrogen, Paisley, UK), come consigliato dal produttore. Per amplificare tutti i segmenti genici delle regioni V delle catene pesanti e leggere, è stato utilizzato un set di primer oligonucleotidi (**Tab.4**) come descritto da *Sblattero e Bradbury, 1998*.

### V<sub>H</sub> 5' sense, forward primers \*

V<sub>H1a</sub> : 5'-CAG GTG CAG CTC GAG CAG TCT GGG-3'  
 V<sub>H1f</sub> : 5'-CAG GTG CAG CTG CTC GAG TCT GGG-3'  
 V<sub>H2</sub> : 5'-CAG GTC ACC TTG CTC GAG TCT GGT-3'  
 V<sub>H3a</sub> : 5'-GAG GTG CAG CTC GAG GAG TCT GGG-3'  
 V<sub>H3f</sub> : 5'- GAG GTG CAG CTG CTC GAG TCT GGG-3'  
 V<sub>H4f</sub> : 5'-CAG GTG CAG CTG CTC GAG TCG GG-3'  
 V<sub>H4g</sub> : 5'-CAG GTG CAG CTA CTC GAG TGG GG-3'  
 V<sub>H5</sub> : 5'-GAG GTG CAG CTC GAG CAG TCT GG-3'  
 V<sub>H6</sub> : 5'-CAG GTA CAG CTC GAG CAG TCA GG-3'  
 V<sub>H7</sub> : 5'-CAG GTG CAG CTC GAG CAA TCT GG-3'

### C<sub>H</sub> 3' anti-sense, back primers \*

CHA-1 5'-AGT TGA ACT AGT TGG GCA GGG CAC AGT CAC-3'  
 CHA-2 5'-AGT TGA ACT AGT TCG GCA GGG AAC AGT CAC-3'

### CL3' primers

### C kappa 3' anti-sense back primers \*

CLK : 5'-TCC TTC TAG ATT ACT AAC ACT CTC CCC TGT TGA AGC-3'

### C lambda 3' anti-sense back primers \*

CL2 : 5'-CGC CGT CTA GAA TTA TGA ACA TTC TGT AGG-3'

\*The restriction sites for cloning are underlined

### V kappa 5' sense, forward primers \*

V<sub>K1a</sub> : 5'-GAC ATC GAG CTC ACC CAG TCT CCA-3'  
 V<sub>K1b</sub> : 5'-GAC ATC GAG CTC ACC CAG TCT CC-3'  
 V<sub>K2a</sub> : 5'-GAT ATT GAG CTC ACT CAG TCT CCA-3'  
 V<sub>K3a</sub> : 5'-GAA ATT GAG CTC ACG CAG TCT CCA-3'  
 V<sub>K3b</sub> : 5'-GAA ATT GAG CTC AC(G/A) CAG TCT CCA-3'  
 V<sub>K5</sub> : 5'-GAA ACG GAG CTC ACG CAG TCT CCA-3'  
 V<sub>K6</sub> : 5'-GAA ATT GAG CTC ACT CAG TCT CCA-3'

### V lambda 5' sense, forward primers \*

V<sub>L1</sub> : 5'-CAG TCT GAG CTC ACG CAG CC(G/A) CCC TC-3'  
 V<sub>L2</sub> : 5'-CAG TCT GAG CTC ACT CAG CCT GCC TC-3'  
 V<sub>L3</sub> : 5'-GCC TCC TAT GAG CTC ACT CAG CCA-3'  
 V<sub>L4a</sub> : 5'-CAG CCT GAG CTC ACT CAA TCA TCC TC-3'  
 V<sub>L4b</sub> : 5'- CAG CCT GAG CTC ACT CAG CCC CCG TC-3'  
 V<sub>L5</sub> : 5'-CAG CCT GAG CTC ACT CAG CCG (G/T)CT TCC-3'  
 V<sub>L6</sub> : 5'- AAT TTT GAG CTC ACT CAG CCC CAC-3'  
 V<sub>L7</sub> : 5'-CAG ACT GAG CTC ACT CAG GAG CCC-3'  
 V<sub>L8</sub> : 5'-CAG ACT ACC CAG GAG CCA TCG TTC-3'  
 V<sub>L9</sub> : 5'-CAG CCT GAG CTC ACT CAG CCA CCT TC-3'  
 V<sub>L10</sub> : 5'-CAG GCA GAG CTC ACT CAG CCA CCC TCG-3'

**Tab.4 Primer oligonucleotidi utilizzati per l'amplificazione, tramite PCR, di sequenze umane  $\alpha$  (Fd) e  $\kappa$  e  $\lambda$ .**

I prodotti di PCR sono stati clonati nel vettore phagemid, pComb3X, sotto il controllo del promotore LacZ (fornito dal dottor C Barbas III, The Scripps Institute, La Jolla, CA), per produrre la libreria Fab-IgA. Il fago helper è stato VCSM13, recante la resistenza alla kanamicina. In breve, la libreria è stata costruita per clonazione sequenziale nel vettore phagemid, pComb3X, della catena leggera utilizzando SacI e XbaI, seguito dal frammento Fd utilizzando XhoI e SpeI. La libreria Fab è stata generata trasformando il DNA risultante in E. Coli XL1 Blue (Tet<sup>r</sup>, F+) elettrocompetenti. La risultante libreria IgA  $\kappa/\lambda$  espressa sulla superficie dei fagi filamentosi M13 è stata composta da  $1 \times 10^7$  cloni indipendenti.

Il panning della libreria è stata condotta su due diversi antigeni, P1 e gp41-ΔMPR, usando protocolli standard (De Bruin R et al 1999). Il peptide P1 è stato immobilizzato su piastra

ELISA (Peptide Immobilizzatore, Exiqon, Vaedbeck, Danimarca) con un range di concentrazioni (decrescente), tutte quelle in cui il P1 forma oligomeri (250-30  $\mu\text{M}$ ) (Alfsen A & Bomsel M 2002). I fagi specificatamente legati sono stati trattati per tre step consecutivi di panning sulle concentrazioni decrescenti delle P1. I fagi non legati sono stati raccolti e utilizzati per un secondo panning sulla gp41- $\Delta\text{MPR}$  trimeriche, immobilizzate negli immunotubi (range 50-12  $\mu\text{M}$ ) (Maxisorp, NUNC), seguita da tre round consecutivi di panning con ulteriore concentrazioni decrescenti dell'antigene.

### **Espressione e purificazione dei Fabs solubili**

Costrutti per l'espressione di Fabs solubili sono stati preparati tramite subcloning del DNA nel vettore pASK88, originariamente progettato per IgG1 (Skerra A et al 1994). Pertanto, i geni codificanti l'intero Fd IgA ( $V_H\text{-}C_H1$ ) e la catena leggera ( $V_L\text{-}C_L$ ) sono stati inseriti in modo sequenziale nel pASK88, tra i siti PstI e NcoI ( $V_H\text{-}C_H1$ ), e SacI e HindIII ( $V_L\text{-}C_L$ ), rispettivamente. Come controllo, IgG1 umana lisozima-specifica, D1.3, è stata prodotta utilizzando lo stesso vettore pASK88.

Fabs solubili sono stati preparati trasformando, con i vettori, le cellule di E. coli, ceppo JM83. La produzione di Fabs funzionali è stata effettuata come precedentemente descritto (Fiedler M & Skerra A 1999). In breve, le culture sono state coltivate in 1 l di terreno Luria Bertani contenente  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  di ampicillina, e l'espressione è stata indotta per 14 ore a  $22^\circ \text{C}$  con l'aggiunta di  $0,2 \mu\text{g ml}^{-1}$  di anhydrotetracycline (ACROS Chimica, Thermo Fisher-Sci. Inc, Roskilde, Danimarca) ad una  $OD_{550\text{nm}}$  di 0,5. I Fabs sono stati purificati dalla frazione periplasmatica del pellet di E. coli, mediante cromatografia di affinità con metallo immobilizzato, con un Kit GE Healthcare (GE Healthcare Europe GmbH, Monaco di Baviera, Germania, 17-5286-01, HisTrap FF crude).

### **ELISA**

La concentrazione dei Fabs è stata misurata mediante ELISA a sandwich utilizzando anticorpi di capra anti-IgA umane (Caltag, Burlingame, CA) e di topo, biotinilati, anti- catene leggere Ig umane,  $\kappa$  e  $\lambda$  (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ), con una curva standard generata da IgA umane (Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, PA).

La specificità dei cloni Fab è stata rilevata tramite rivestimento delle micropiastre (NUNC-Immuno Plate MaxiSorp Surface, o Peptide Immobilizer (Exiqon) plate per P1), con gp41ricombinanti (gp41- $\Delta\text{MPR}$  o gp41-MPR, entrambe trimeriche), peptide P1, o antigeni

estranei, compresa sieralbumina bovina, DNA, e HA di peptidi di influenza (Roche, Basilea, Svizzera). L'incubazione è stata effettuata una notte a 4° C. Il legame del Fab, è stata rilevato con anticorpo di topo biotinilato anti-catene leggere umane. Tutti gli esperimenti sono stati effettuati con Fabs da almeno tre purificazioni indipendenti, ciascuno effettuato in duplice copia. Per confrontare diversi Fabs, in ELISA competitivo, sono state usate differenti concentrazioni di ciascun Fab per competere nel legame con i costrutti della gp41-MPR. Per i confronti tra Fabs con differenti tipi di catene leggere, il Fab competitore è stato aggiunto ad una concentrazione 20 volte superiore a quella del Fab testato. Il legame è stato rilevato sempre con anticorpo di topo biotinilato, anti-catene leggere umane.

### **Inibizione della transitosi indotta da HIV-1**

La transitosi di HIV-1, ottenuta attraverso monostrati della linea cellulare epiteliale HT29, viene indotta dal contatto con PBMCs infettati da HIV-1 come precedentemente descritto (Alfsen A et al 2001; Bomsel M et al 1997). I PBMCs sono stati infettati con un isolato R5 tropico di clade B o di clade C, come descritto (Bouschbacher M et al 2008). I Fabs sono stati pre-incubati con PBMCs HIV-1-infette (0,8 milioni di cellule per point) per 30 minuti a 4° C, prima dell'aggiunta dei PBMCs sul lato apicale dei monostrati cellulari (1 milione di cellule), cresciuti in un sistema bicamerale. In alternativa, è stata usata la linea cellulare linfocitica CEM, cronicamente infettata dal clone NDK (clade D, X4 tropico) (Bomsel M et al 1997). La transitosi di HIV-1 è stata valutata misurando la p24 nel terreno basolaterale, mediante test ELISA (Beckman Coulter, Villepinte, Francia), dopo 2 ore dal contatto apicale delle cellule infette sul monostrato epiteliale ed espressa in percentuale di transitosi. Per ogni condizione, sono state eseguiti almeno tre esperimenti indipendenti. IgG 2F5 è stato usato come controllo positivo a 1 ug ml<sup>-1</sup>.

## **3.4 STUDIO IV**

### **Generazione dei geni dell'envelope chimerico di HIV**

I geni dell'envelope modificato di HIV contengono il segnale Honeybee Mellitin signal sequence (HMSS) al 5', e il dominio trans-membrana della glicoproteina gp64 (gp64TM) del baculovirus al 3'; sono stati sintetizzati e codone-ottimizzati per l'espressione nelle cellule eucariotiche (GenScript Co., Piscataway, NJ, USA) (Fig.10, Cap.4 Risultati). D'altra parte, la sequenza codificante per il dominio trans-membrana della glicoproteina gp64 (gp64TM) è

stata introdotta al C-terminale dei geni chimerici. Immediatamente a monte del gp64<sup>TM</sup>, è stato introdotto il dominio trimerizzazione di gp41 di HIV (gp41 TD), derivato da un consensus di un virus di clade B. I geni env chimerici sono stati sub-clonati nel sito NheI del vettore pFastBac Dual (Invitrogen), a valle del promotore p10 (Fig.1), e i cloni positivi sono stati screenati per il corretto orientamento relativo al promotore, tramite analisi della sequenza nucleotidica.

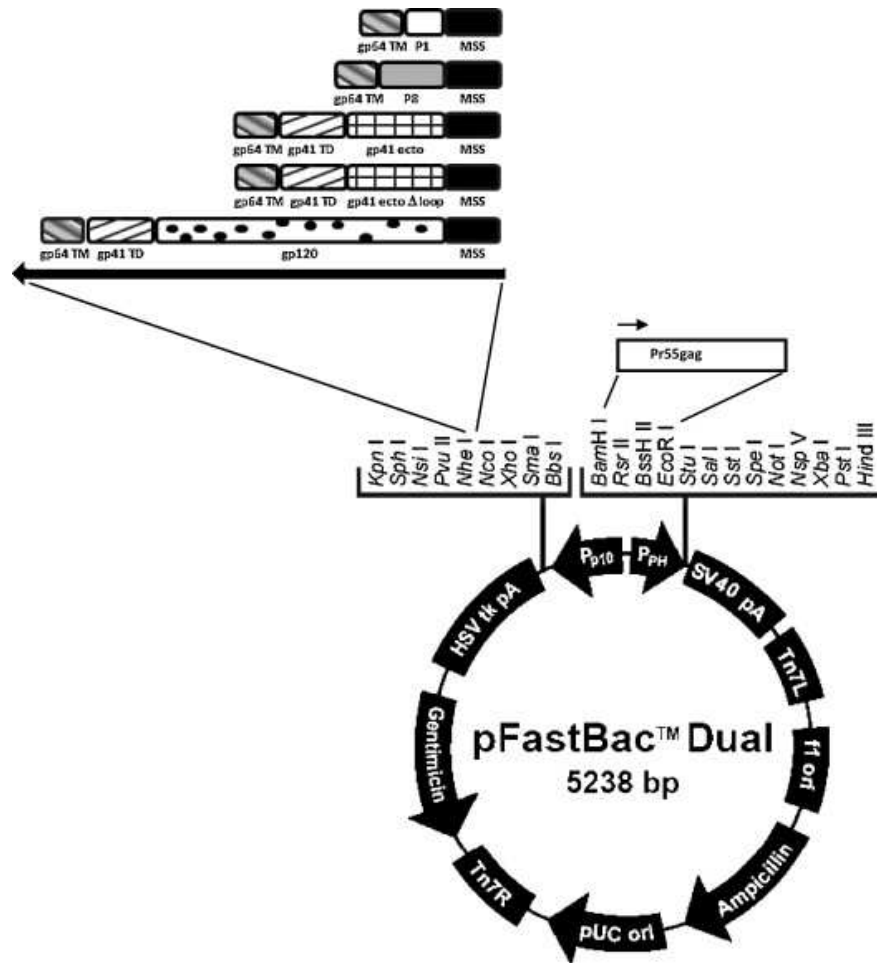


Fig.1 Rappresentazione schematica del vettore ricombinante di espressione in baculovirus.

## Produzione di baculovirus ricombinanti

Bacmidi ricombinanti sono stati ottenuti, in E.Coli DH10Bac<sup>TM</sup>, con trasposizione sito-specifica dell'elemento mini-Tn7 dal vettore ricombinante pFastBac Dual al sito di attacco mini-attTn7 sul vettore shuttle baculovirus (bacmide), presente nei batteri, con le funzioni Tn7 fornite in trans dal plasmide pMON7124 helper. La trasposizione di geni virali sul bacmide distrugge lo schema di lettura del lacZα, risultando colonie batteriche bianche su uno

sfondo di colonie blu, le quali portano il bacmide originario. Il DNA bacmide ricombinante è stato isolato dai batteri secondo un protocollo appositamente sviluppato per plasmidi di grandi dimensioni (>100 kb) (Ioannou PA et al 1994) e l'inserimento dei geni virali è stato verificato tramite PCR.

### **Colture di cellule di insetto e produzione delle VLPs**

Cellule di insetto HighFive, derivate da *Trichoplusia in egg cell homogenates* (Invitrogen Inc.), sono state propagate in SF900, terreno privo di siero, integrato con 1% di antibiotici (Gibco-BRL) e  $9 \times 10^5$  cellule, seminate in piastre da 6-pozzetti, sono state trasfettate con 10-20 ug di DNA bacmide ricombinante, con il metodo Cellfectin (Gibco-BRL). Dopo 72 ore di incubazione, baculovirus ricombinante rilasciato nel supernatante delle cellule trasfettate (P1) è stato utilizzato per infettare  $2 \times 10^6$  cellule HighFive/pozzetto e il baculovirus ricombinante rilasciato, è stato raccolto dopo 72 ore di incubazione (P2). Un passo ulteriore infezione è stato effettuato per ottenere baculovirus ricombinante P3, da utilizzare per la preparazione su larga-scala delle VLPs. HighFive sono state propagate in sospensione e  $4 \times 10^9$  cellule sono state infettate con il baculovirus ricombinante P3 ad una molteplicità di infezione (MOI) di 5 in un volume finale di 100 ml. Dopo 5 ore di incubazione in agitatore orbitale, le cellule sono state diluite con terreno di coltura SF900 ad una concentrazione di  $1 \times 10^6$  ml<sup>-1</sup> e incubate per 96 ore in agitatore orbitale. Infine le cellule HighFive sono state propagate a 28° C in assenza di CO<sub>2</sub>.

### **Analisi dell'espressione delle VLPs**

Cellule e surnatanti da colture cellulari HighFive sono stati raccolti 4 giorni dopo l'infezione. I lisati sono stati preparati facendo bollire il pellet cellulare per 5 min in un tampone contenente 5% b-mercaptoetanolo, 2% SDS, 10% glicerolo e 0,01% blu di bromofenolo. In parallelo, i surnatanti sono stati centrifugati a  $2000 \times g$  per 15 minuti a 4° C e le VLPs sono state pellettate con un'ultra-centrifugazione a 100.000 g per 75 min, con saccarosio al 25%, come precedentemente descritto (Buonaguro L et al,2001) e risospesi in tampone TNE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl e 1 mM EDTA). Per l'analisi in SDS-PAGE, 15 ul di ogni campione sono stati mescolati con 15 ul di 2× Laemmli sample buffer e bolliti per 3 minuti, e separati in condizioni standard denaturanti SDS-PAGE. Il gel è stato trasferito su membrana di nitrocellulosa assorbente. Per l'analisi non denaturante BN-PAGE, le VLPs sono state incubate in un volume uguale di tampone di solubilizzazione (0,12% Triton X-100 in 1 mM



EDTA/1.5 M di acido aminocaproico) per liberare le proteine dell'envelope. I campioni sono stati aggiunti 4:1 la diluente fornito dal kit NativePage sample preparation (Invitrogen) e 1% di Coomassie G-250 e caricati in un gel 4-16% Bis-Tris NuPAGE (Invitrogen).

Espressione proteica è stata analizzata mediante la tecnica convenzionale del Western Blot utilizzando diversi anticorpi primari: anticorpo policlonale coniglio anti-p24 (NIBSC-CFAR, Catalogo # ARP432), un mix di MAbs anti-gp41, 2F5 e 4E10 (NIBSC-CFAR, Catalogo # EVA3063 e # ARP3239 ), un mix di anticorpi monoclonali anti-gp120, 2G12e b12 (NIBSC-CFAR, Catalogo # EVA3064 ed # EVA3065). Specifici anticorpi secondari sono stati utilizzati per identificare gli anticorpi primari legati, e la visualizzazione è stata ottenuta con l'aggiunta di streptavidina coniugata alla perossidasi (HRPO) e il cromogeno 4-cloro-1-naftolo.

### **Test Sierologici**

La presenza e il titolo degli anticorpi specifici anti-Gag e anti-Env, indotti dai protocolli di vaccinazione, è stato valutato in campioni di siero ottenuti da topi immunizzati tramite ELISA. Piastre da 96-pozzetti (Becton Dickinson) sono state rivestite con 100 ng purificato di rp24 di clade B (NIBSC-CFAR, Catalogo # EVA620) e gp140 di clade A (NIBSC-CFAR, Catalogo # ARP698), o peptidi gp41 p1/p8. Le piastre sono state poi incubate con diluizioni di siero dei topi, inattivato al calore in diluizioni da 1:100 a 1:100 000. Dopo i lavaggi con PBS-Tween (0.1%), i pozzetti sono stati incubati 90 min a 37° C con anticorpi HRP-conjugated rabbit anti-mouse IgG (BioRad) (diluizione 1:1000).

### **Produzione di pseudovirus per test di neutralizzazione**

L'attività neutralizzante dei sieri inattivati al calore, provenienti da animali immunizzati, è stata valutata utilizzando uno pseudovirus di clade B, il QH0692 (ottenuto tramite l'*NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, USA*), in una forma standardizzata e validata di *single-round infection*. Gli stock di pseudovirus, con ENV di HIV-1, *single-round infection*, sono stati prodotti secondo il procedimento standard, precedentemente descritto nello STUDIO II del presente capitolo.

### **Test di neutralizzazione su cellule TZM.bl**

Il test è stato effettuato secondo il protocollo tecnico standard, già descritto nello STUDIO II del presente capitolo.

La dose inibitoria del 50% ( $IC_{50}$ ) è stata calcolata come la diluizione del siero che ha indotto una riduzione del 50% in unità di luminescenza relativa (RLU) rispetto ai pozzetti di controllo con i virus, dopo la sottrazione dell'RLU di fondo delle cellule di controllo. Un pool di anticorpi neutralizzanti monoclonali, 2F5, b12 e 2G12 (TRIMAB) è stato utilizzato con concentrazioni rispettive di 7.4 , 2.5 , 0.82 e 0.27 ug/ml. Un pool di 3 antisieri di topi preimmuni è stato utilizzato come controllo negativo. Inoltre, un pool di antisieri di animali immunizzati con le diverse gp41-VLPs è stato testato anche in combinazione 1:1 con un pool di antisiero da animali immunizzati con gp140-VLPs. La definizione di effetto additivo o sinergico si basa sul seguente algoritmo: se i due sieri combinati inducono, individualmente, una riduzione dell'infezione del 50%, a una diluizione di 1:10, e la loro combinazione ha determinato una riduzione dell'infezione del 50% a una diluizione di 1:20, l'effetto è stato considerato come "additivo". In alternativa, una riduzione del 50% dell'infezione, alla diluizione di siero più alta della loro combinazione (diluizione > 1:20,) è stato considerato come "sinergico". I risultati sono espressi come percentuale della riduzione di infettività per ciascun siero o pool di antisieri, dopo aver sottratto i valori osservati con pool di sieri pre-immuni.

## **3.5 STUDIO V**

### **Produzione delle VLPs AP205**

Il cDNA codificante la proteina capsidica virale dell' RNA-fago AP205 è stato introdotto tra i siti di restrizione EcoRI/HindIII del vettore di espressione pTacnSD, sotto il controllo di un forte promotore inducibile (pTac) e trasformato nel ceppo ospite di E. coli RB791. L'espressione della proteina capsidica è stata indotta con l'aggiunta di 1 mM di IPTG, per 4 ore a 37° C. Le cellule sono state purificate mediante centrifugazione e risospese in un tampone di caricamento per cromatografia a scambio anionico (20 mM sodio fosfato, pH 7,2). La miscela è stata sonicata cinque volte a 22 kHz per 15 secondi, con intervalli di 1 minuto per raffreddare la soluzione in ghiaccio. Il lisato di E. coli, contenente la proteina capsidica espressa, è stato pulito tramite trattamento con benzonasi (5U/mL, Novagen), seguito da centrifugazione. Capsidi virali sono stati purificati da cromatografia a scambio anionico (Fractogel™ TMAE (M), Merck). Le proteine batterica delle cellule ospiti sono stati rimossi con un lavaggio con 333 mM NaCl, e i capsidi sono stati eluiti a 600 mM di NaCl. Infine, i

capsidi purificati sono stati puliti mediante cromatografia gel filtration (CL-4B sefarosio, Amersham) utilizzando PBS come tampone di corsa e conservati a -80° C.

### **Accoppiamento chimico dei peptidi di gp41 alle VLPs AP205**

AP205 VLPs (sciolte in HEPES, pH 7,2) sono state fatte reagire con un eccesso molare di 20 volte del *crosslinker eterobifunzionale* succinimidyl-6-( $\beta$  maleimidopropionamido)-hexanoate (SMPH) (PIERCE, Rockford, USA) per 1 ora a temperatura ambiente.

AP205 derivatizzate sono state mescolate con eccessi molari di 2 o 5 volte dei peptidi della gp41 (Fig.15, cap.4 RISULTATI) per produrre i vaccini coniugati.

P1 e P8 sono stati sintetizzati chimicamente (purezza > 95%) da Eurogentec (Belgio). La reazione di accoppiamento è stata effettuata per 4 ore a temperatura ambiente.

### **Immunizzazione dei topi**

Topi BALB/c femmine, di otto settimane di età, sono stati immunizzati per via sottocutanea tre volte con 50 ug e due volte con 100 ug di AP205- peptidi gp41 coniugati, AP205-3-13, AP205-3-17, AP205-3-20, AP205-3-24 o con 50 ug di AP205-P1 e P8-coniugat, ogni 10 giorni. Vaccini AP205-P1 e AP205-P8 sono stati somministrati anche per via intranasale. I campioni di siero sono stati prelevati 8 giorni dopo l'ultima vaccinazione e titoli anticorpali peptide-specifici sono stati misurati prima e dopo immunizzazione. Non sono stati somministrati adiuvanti.

### **Analisi ELISA**

Piastre ELISA (96-well MAXIsorb, NUNC) sono state rivestite con peptidi della gp41 ad una concentrazione di 10 ug/ml in buffer coating (0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,6). Le piastre sono state incubate overnight a 4° C. Dopo il lavaggio con PBS/0.05% Tween, le piastre sono state bloccate per 2 ore a 37° C con 2% BSA/PBS. Poi, il siero dei singoli topi è stato aggiunto a diluizioni seriali di 5 volte (con una diluizione iniziale di 1:200 nel primo pozzetto) e incubate per 2 ore a temperatura ambiente. Le piastre sono state poi lavate 5 volte con PBS/0.05% Tween. Gli anticorpi anti-gp41 sono stati rilevati con anticorpi HRP-labeled goat anti-mouse IgG (Jackson Immuno Research Laboratories). I titoli anticorpali sono stati definiti come i reciproci della diluizione necessaria per raggiungere il 50% del segnale misurato a saturazione (titoli OD50).

## **Produzione pseudovirus e test di neutralizzazione su cellule TZM.bl**

L'attività neutralizzante dei sieri inattivati al calore, provenienti da animali immunizzati, è stata valutata utilizzando un pannello di pseudovirus, tra cui due clade B, il QH0692 e ZM214, uno di clade C, AC10, e un ceppo di laboratorio, SF162, (ottenuti tramite l'*NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, USA*), in una forma standardizzata e validata di *single-round infection*. Gli stock di pseudovirus, con ENV di HIV-1, *single-round infection*, sono stati prodotti secondo il procedimento standard, precedentemente descritto nello STUDIO II del presente capitolo.

Il test è stato effettuato secondo il protocollo tecnico standard, già descritto nello STUDIO II e IV del presente capitolo.

## **Saggio ADCC**

I test ADCC sono stati eseguiti come descritto (Tudor D and Bomsel M 2011) usando un test di fluorescenza rapido. Le cellule bersaglio sono state le cellule linfotropiche T CD4+ CEM-NKr rivestite sia con peptidi di gp41 (5 µM), o le CEM Env1213, esprimenti stabilmente la glicoproteina dell'env di HIV-1 (Keler T et al 1996). Le cellule effettrici sono state THP1 (linea cellulare monocitaria) esprimenti Fc-gammaRI, (Ricerca AIDS e reagente Reference Program, NIH). Brevemente, le cellule bersaglio a 3x10<sup>6</sup> cellule/ml sono stati doppiamente colorati con il colorante citosolico CFSE: *5-(and-6-)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester* (Molecular Probes, Eugene, Oregon) a 1 µM and il *membrane dye PKH-26* (Sigma, St. Louis, MO) a 1 µM per 5 min a 37°C. Dopo la colorazione, le cellule bersaglio sono state incubate con gli anticorpi (campioni di siero alla diluizione indicata, o 2F5 come controllo positivo) per 30 minuti a temperatura ambiente. Le cellule THP1 sono state poi aggiunte in rapporto Effettore: Target (E:T) di 10:1. Quando indicato, le cellule sono state incubate con IgG irrilevanti per 15 minuti, prima della loro aggiunta nella reazione ADCC. Poi, le co-culture cellulari sono state centrifugate per 1 min a 1000 rpm e incubate per 4 ore a 37° C. Profili di fluorescenza delle co-culture cellulari sono state immediatamente acquisite utilizzando un FACS Calibur Becton Dickinson. L'analisi dei dati è stata effettuata utilizzando il software Cytomics RXP. L'ADCC è calcolata come segue:

$(\% \text{ of PKH-26}^{\text{high}} \text{ CFSE negative cells}) / (\% \text{ of PKH-26}^{\text{high}} \text{ CFSE negative cells}) + (\% \text{ of PKH-26}^{\text{high}} \text{ CFSE}^{\text{high}} \text{ cells}) \times 100.$

La percentuale di lisi ADCC è stimata come la differenza nell'aumento delle uccisioni cellulari in presenza e in assenza di un dato anticorpo.

## 4. RISULTATI

I risultati del presente lavoro di tesi sono inclusi nei dati dei seguenti articoli:

- STUDIO I (C. Brombin, L. Diomede, D. Tudor, ES Drillet, C. Pastori, E. Poli, A. Riva, C. Uberti-Foppa, M. Galli, C. Di Serio, M. Bomsel, L Lopalco. *Humoral immune responses signature in HIV exposure/infection*. Submitted)
- STUDIO II (Diomede L., S. Nyoka, L. Scotti, D. Savarino, A. Zambon, G. Sherman, M.,Sarzotti-Kelsoe, C. Gray, L. Lopalco. *Passively transmitted gp41 antibodies in babies born from subtype C HIV-1 seropositive women: correlation between fine specificity and Protection*. In press, *Journal of Virology*)
- STUDIO III (Tudor D, Derrien M, Diomede L, Drillet AS, Houimel M, Moog C, Reynes JM, Lopalco L, Bomsel M. *HIV-1 gp41-specific monoclonal mucosal IgAs derived from highly exposed but IgG-seronegative individuals block HIV-1 epithelial transcytosis and neutralize CD4(+) cell infection: an IgA gene and functional analysis*. *Mucosal Immunol*. 2009 Sep;2(5):412-26)
- STUDIO IV (Visciano ML, Diomede L, Tagliamonte M, Tornesello ML, Asti V, Bomsel M, Buonaguro FM, Lopalco L, Buonaguro L. *Generation of HIV-1 Virus-Like Particles expressing different HIV-1 glycoproteins*. *Vaccine*. 2011 Jul 12;29(31):4903-12.)
- STUDIO V (C. Pastori, D. Tudor, L. Diomede, D. Savarino, AS Drillet, A. Jegerlehner, TA. Röhn, M Bomsel , L. Lopalco. *Virus like Particle based strategy to elicit antibodies targeting HIV protective epitopes within conserved regions of gp41*. Submitted)

## **4.1 Valutazione di risposte umorali nell'infezione da HIV come possibili correlati di protezione (STUDIO I)**

### **4.1.1 Pazienti e disegno sperimentale**

Quarantacinque soggetti infetti da HIV ai differenti stadi clinici (10 AI, 10 LTNP, 8 EC, 7 AIDS, 10 HAART+), sono stati arruolati nello studio; i pazienti nei sottogruppi AI e HAART+ hanno ricevuto una terapia adeguata.

Le variabili di tutti i gruppi sono state confrontate per determinare le differenze significative e fase-specifiche e quindi identificare delle univoche caratteristiche umorali, utili a contraddistinguere le evoluzioni cliniche e, soprattutto, definire i correlati di protezione.

Alcuni parametri sono stati definiti "*continui*", perché i loro valori possono assumere una vasta gamma di valori numerici e sono presenti in tutti i campioni (ad esempio IgG totali); gli altri valori vengono definiti "*discreti*" (non continui), in quanto possono assumere un numero finito di valori e quindi limitato, o sono presenti solo in alcuni campioni (ad esempio le IgG anti-gp41\_P1). Al fine di ottenere una correlazione più informativa dei dati, IgG e IgA specifiche sono state confrontate con i valori delle immunoglobuline totali e i loro rapporti sono stati presi come parametri analitici continui.

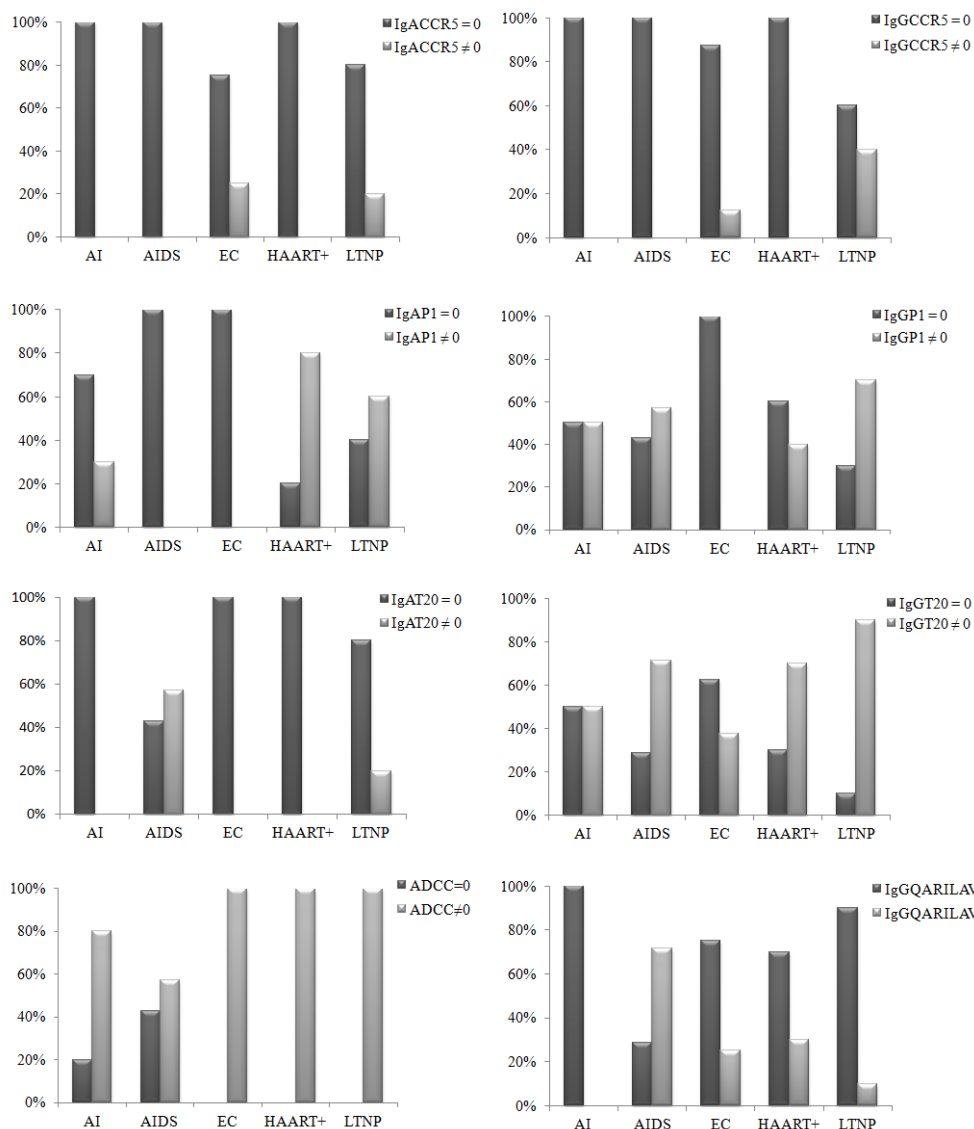
### **4.1.2 Parametri umorali**

Diciassette parametri umorali sono stati determinati in ogni campione: IgG e IgA totali, e immunoglobuline HIV-specifiche (IgG e IgA isotipi) verso gp140, gp41 e gp120\_Bal, gp120\_IIIB, e verso tre diversi epitopi della gp41 (QARILAV, T20 e P1, domini nell' N-terminale e nella membrana-prossimale), già descritti come target di anticorpi neutralizzanti; l'attività ADCC e, infine, gli anticorpi anti-corecettore CCR5.

La **Fig.1** riassume otto variabili categoriali osservate nei sottogruppi di pazienti HIV-positivi, ovvero IgG e IgA specifiche per gli epitopi della gp41, per il corecettore CCR5 e l'ADCC. Entrambe le IgG e IgA per il CCR5 sono state osservate esclusivamente in una ridotta percentuale di pazienti EC e LTNP. IgG verso il QARILAV sono state trovate soprattutto nei

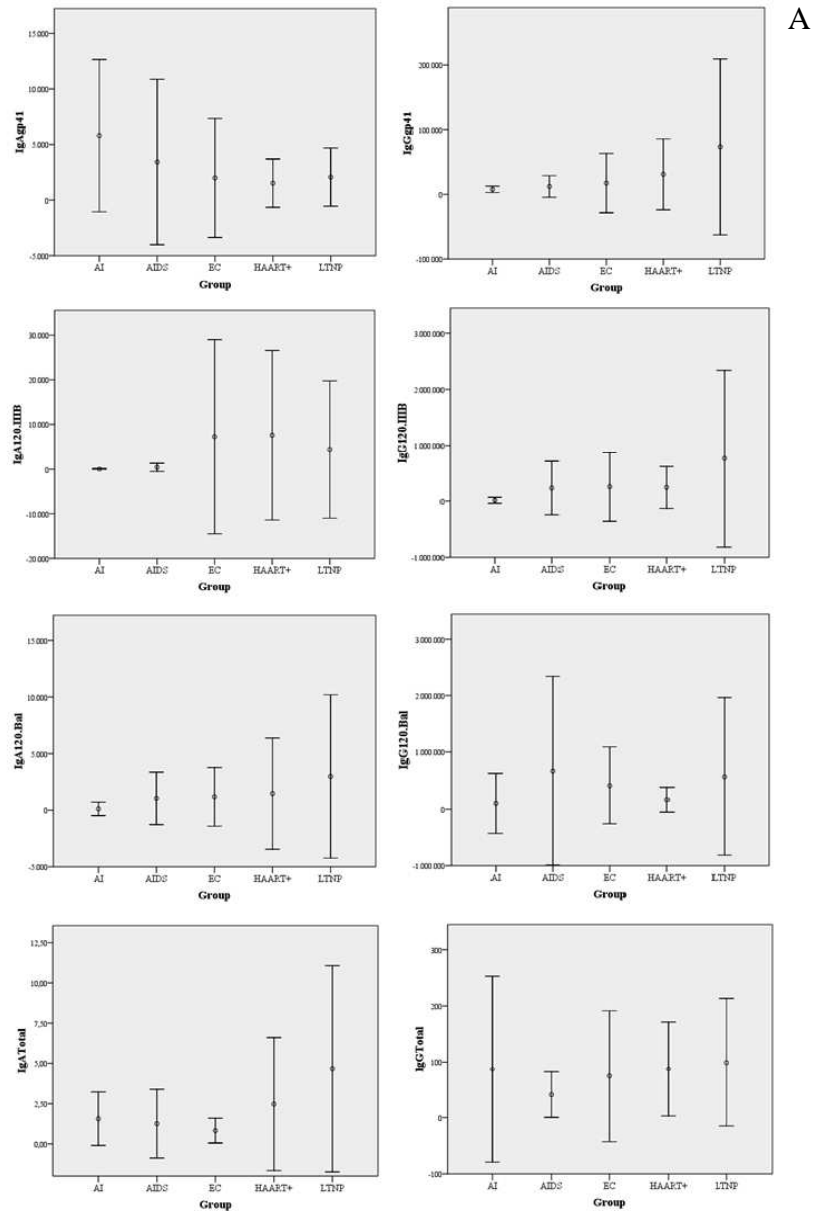
pazienti affetti da AIDS e, in misura minore, in altri sottogruppi, ma non in AI. Nessun IgA con questa specificità (verso il QARILAV) sono state isolate in ogni sottogruppo.

IgG verso il peptide P1 sono state trovate in tutti i sottogruppi, tranne che negli ECs, mentre IgA sono stati isolati in tutti i sottogruppi tranne EC e AIDS. IgG T20 sono state osservate in tutti i sottogruppi, mentre IgA con la stessa specificità sono state trovate solo in LTNP e nelle persone con AIDS.



**Fig.1 Rappresentazione grafica di variabili non continue.** Le variabili con tanti valori pari a zero, sono state divise in due categorie: insieme finito costituito da solo valori uguali a 0 e valori diversi da 0.

**La Figura 2A** mostra la distribuzione dei parametri nelle sottopopolazioni dei pazienti HIV-positivi arruolati nello studio: quantità molto diverse di questi anticorpi sono stati osservati in test ELISA, con notevoli differenze tra i gruppi.



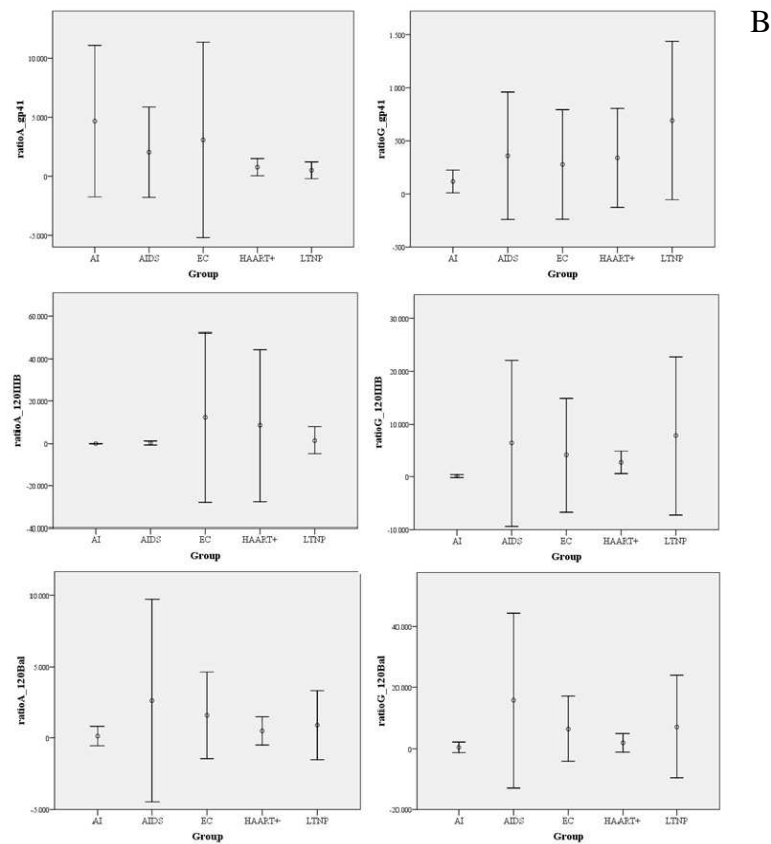
**Fig.2A** Distribuzione di tutte le variabili continue valutate nelle popolazioni HIV-sieropositive. Il pannello A mostra gli anticorpi.

Gli anticorpi IgA totali hanno mostrato una più marcata eterogeneità rispetto alle IgG, essendo più basse nelle AI rispetto al gruppo dei LTNP e molto diverse tra questi ultimi e i soggetti EC. Anticorpi anti gp41 sono stati altamente variabili tra i gruppi, sostenendo un possibile ruolo come biomarker. Infatti la gp41 ha suscitato una più forte risposta IgA rispetto a quella IgG nell'infezione precoce (AI). Questo probabilmente è dovuto al fatto che le AI sono state reclutate non subito dopo l'esposizione ma entro i 3 mesi, e quindi le IgA hanno avuto modo di essere generate come risposta terziaria. Perciò IgG gp41-specifiche hanno mostrato variabilità negli EC vs LTNP, e HAART+ vs AIDS.



Anticorpi gp120IIIB sono stati trovati soprattutto nelle fasi centrali dell'infezione. Le IgA Bal e IIB erano quasi assenti in AI, mentre negli stessi, le IgG per gp120Bal hanno mostrato una maggiore variabilità. Le IgG gp120Bal sono state anche molto simili in EC e in LTNP, invece le IgG gp120IIIB sono state differenti tra di loro. Le IgA gp120Bal sono state molto simili negli HAART+ vs AIDS, mentre le IgG con la stessa specificità hanno mostrato medie diverse e una maggiore variabilità.

Le differenze tra i gruppi sono state ulteriormente rafforzate dall'analisi del rapporto delle immunoglobuline IgA e IgG env-specifiche sulle rispettive immunoglobuline totali, mostrato in **fig. 2B**.

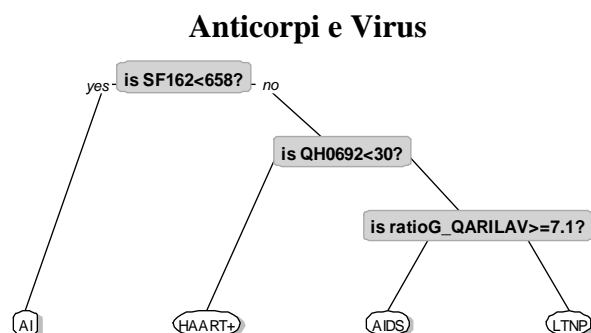
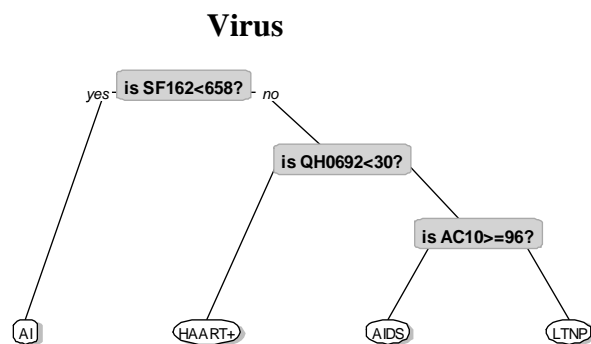
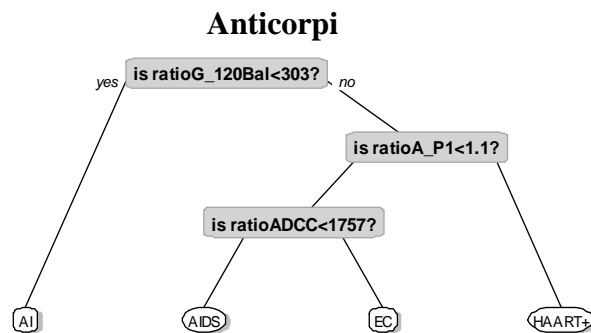


**Fig.2B** Distribuzione di tutte le variabili continue valutate nelle popolazioni HIV-sieropositive. Il pannello B mostra il rapporto degli anticorpi (anticorpi specifici/anticorpi totali).

Il rapporto IgA anti-gp41/IgA totali è stato molto elevato e variabile in AI, e persino superiore al rapporto corrispondente di IgG anti-gp41/IgG totali; sempre in AI, i rapporti di IgA anti-gp120/IgA tot. e IgG anti-gp120/IgG tot. sono stati vicino allo zero; i rapporti di IgG anti-gp41/IgG tot. e IgG anti-gp120IIIB/IgG tot. sono stati più elevati nei LTNP rispetto agli EC e ai gruppi AI.

### 4.1.3 Alberi di classificazione

Gli alberi di regressione stanno acquisendo popolarità nel campo della ricerca medica dal momento che sono facili da interpretare per i non- statistici e dotati di una grande efficienza e flessibilità. Gli alberi di classificazione e di regressione (CART) possono scoprire l'esistenza di dati predittivi in grado di classificare i pazienti in gruppi clinicamente importanti, attraverso l'analisi di qualsiasi tipo di dati, quali i parametri categoriali o continui, variabili con valori mancanti, e così via. Pertanto, l'analisi CART è stata effettuata in questo studio con l'obiettivo di identificare quali fossero i parametri più informativi, utili per discriminare gruppi di pazienti; a questo scopo, tutti i parametri umorali, tutti i virus, gli anticorpi e i virus, o i gruppi di pazienti sono stati inclusi nell'analisi. La **figura 3** mostra i CARTs risultanti e le regole decisionali, esposti in una versione semplificata.



**Fig.3 Alberi di classificazione valutati con i rapporti degli anticorpi.** Nel Pannello, tutti i parametri sono stati valutati in tutti i soggetti HIV sieropositivi. I numeri all'interno del quadrato grigio indicano i livelli di soglia e sono espressi in diluizione 1/n.

#### ANALISI CART SU ANTICORPI

Il rapporto tra IgG<sub>120Bal</sub> e IgG<sub>Tot</sub> (quando la ratioG<sub>120Bal</sub> < 303) ha discriminato il 70% dei pazienti AI; utilizzando il rapporto tra IgA P1 e IgA Tot (ratioA\_P1 >1.1) è stato classificato l'80% dei pazienti HAART+. Il rapporto tra ADCC e IgG<sub>Total</sub> (ratio\_ADCC) ha identificato il 100% dei pazienti con AIDS (quando la ratio\_ADCC <1757) e il 75% dei pazienti EC (quando la ratio ADCC ≥1757). Anche se non visualizzati nella figura **3A** (CART in alto), il 60% dei pazienti LTNP sono stati erroneamente classificati e associati principalmente al gruppo HAART+. Un punto cruciale di questa analisi è che le informazioni sia degli isotipi IgA che di quelli IgG sono richieste per classificare i pazienti HIV-positivi.

#### ANALISI CART SUI VIRUS

Come mostrato nella Figura **3A** (CART centrale), la neutralizzazione dell' SF162 ha classificato tutti i pazienti AI; informazioni sul QH0692 ha identificato il 70% dei pazienti HAART+. Dati su AC10 hanno discriminato l'86% dei pazienti con AIDS (quando AC10 ≥ 96) e il 70% dei pazienti LTNP (quando AC10 <96).

#### ANALISI CART SU ANTICORPI E VIRUS

Come mostrato nella Figura **3A** (CART in basso), i dati dell'SF162 hanno classificato i pazienti AI; informazioni sul QH0692 hanno anche identificato il 70% dei pazienti HAART+ (quando QH0692 < 30). Il rapporto tra IgG<sub>QARILAV</sub> e IgG Tot (ratioG<sub>QARILAV</sub>), ha distinto il 71% dei pazienti con AIDS (quando la ratioG<sub>QARILAV</sub> ≥7.1) ed il 100% dei pazienti LTNP (quando la ratioG<sub>QARILAV</sub> <7.1). Da notare che due su tre rami degli ultimi due alberi risultano sovrapponibili.

Al fine di facilitare la comprensione dei principali risultati derivanti dallo studio, abbiamo inserito tali parametri chiave in una tabella di riepilogo finale.

Parametri umorali	Scoperte
IgG e IgA	Entrambi gli isotipi sono richiesti per definire una “firma umorale”

	dei pazienti HIV+
IgA	Persi nelle fasi tardive dell'infezione, come in AIDS
Anti-gp41 IgA	Significativamente associati alla carica virale (HIV RNA), sostenendo un ruolo nel controllo del virus
IgG per gp120Bal	Significativamente diversi nei gruppi AI vs AIDS e in HAART+ vs AIDS, il che suggerisce che la terapia HAART può influenzare il modello IgG
Anti-gp41 IgG	Non si trovano in AI; a basso contenuto in HAART+; modelli diversi osservati in EC vs LTNP e in HAART+ vs AIDS. Significativamente associato con l'attività più ampia di neutralizzazione verso i ceppi testati (B-R5)
IgA per gp41	Più alte delle IgG, condividono la stessa specificità nell'infezione precoce (AI)
ADCC	Osservata in AI e in pazienti affetti da AIDS, suggerendo la necessità che gli antigeni circolanti siano prodotti e mantenuti nel tempo
Anticorpi anti-CCR5	Indotti tardivamente nell'infezione da HIV, possibilmente attraverso una bassa dose di esposizione agli antigeni (LTNP e EC)
Anticorpi anti-MPER	Modelli differenti negli EC vs LTNP, probabilmente a causa della presenza di virus in circolazione e/o per tempistica dell'infezione
IgG e IgA per i peptidi P1 and T20 (gp41)	IgG si trovano in tutti i pazienti HIV+; IgA perse in fasi tardive dell'infezione, per esempio AIDS, e in EC; Differenti pattern in HAART+ vs LTNP vs EC, il che suggerisce un cambiamento di target di epitopi della gp41 durante l'infezione
IgA verso specifici epitopi di gp41 (e.g. QARILAV)	Solo osservata nei pazienti con antigeni circolanti bassi o nulli (LTNP e EC), suggerendo di giocare un ruolo nel controllo del virus

## 4.2 Anticorpi gp41-specifici come correlati di protezione in neonati da madri infettate con il sottotipo C di HIV-1 (STUDIO II)

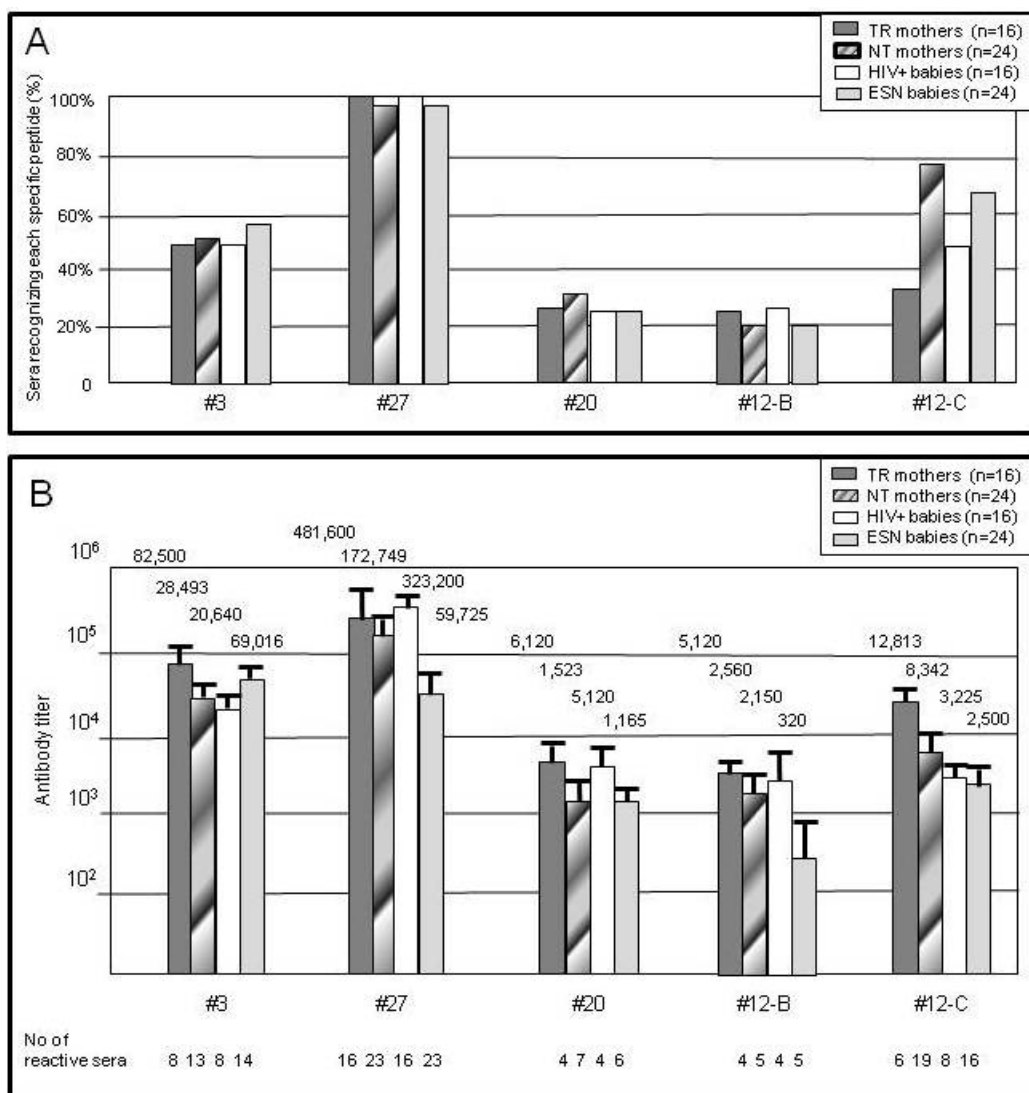
### 4.2.1 Popolazione in studio

74 donne sudafricane, primipare, sono state arruolate nello studio: 40 sono risultate infette da sottotipo C e 34 non infette. Le madri che hanno trasmesso l'infezione ai propri figli sono state definite TR (transmitting), mentre le madri che non l'hanno trasmessa, sono state

definite NT (Non-Transmitting.). Quindi, sangue del cordone ombelicale è stato preso da tutte le madri ed i sieri sono stati ottenuti da madri e neonati.

#### **4.2.2 Anticorpi leganti la gp41 in campioni di siero da coppie madre-figlio**

Tutti i sieri materni e i campioni di sangue del cordone ombelicale sono stati analizzati sul pannello di peptidi sintetici che coprono differenti regioni della gp41 (sequenze nella tab.3, MATERIALI E METODI), la loro reattività è sintetizzata nella **fig. 4**, dove è espressa come percentuale relativa (**Fig.4A**) e titolo specifico (**Fig.4B**), rispettivamente.



**Fig.4 Anticorpi leganti la gp41 di donne HIV-infette e dei loro bambini.** Le immagini mostrano la percentuale dei sieri di sangue materno e di sangue del cordone che sono stati trovati contenere un alto titolo di anticorpi anti-peptidi gp41 (pannello A) ed i valori medi dei titoli anticorpali [1/n] (gruppo B). Tutti i campioni sono stati testati in duplicato. TR mothers (Transmitting); NT mothers (Non-Transmitting); HIV+ babies (neonati infetti); ESN Babies (neonati non infetti).

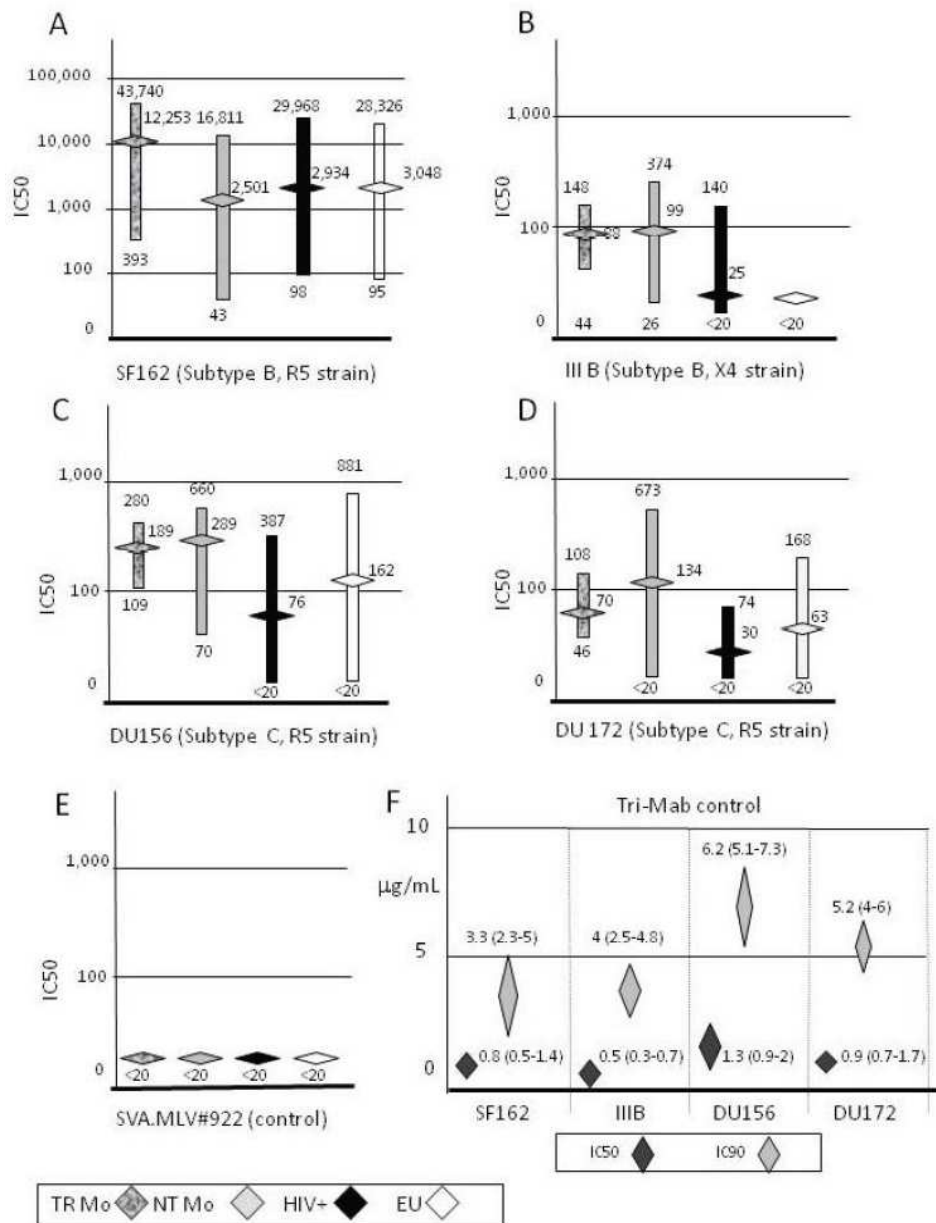
I campioni da donne di controllo non-infette e dei loro bambini sono risultati negativi per gli anticorpi anti-HIV (tutti i titoli sono stati al di sotto del valore soglia, dati non riportati). Tredici sieri di madri NT (n=13/24, 54%) hanno riconosciuto una regione HR1, contenente l'epitopo QARILAV (peptide #3); anche sieri da madri TR hanno riconosciuto questa regione della gp41. Sieri da neonati ESN hanno riconosciuto lo stesso dominio HR1, suggerendo che questa IgG-specificità è derivata dalla trasmissione materna alla nascita (**Fig. 4A**). Il novanta per cento dei sieri NT (23/24) e il 100% del TR sieri (16/16) hanno riconosciuto gli epitopi immunodominanti nella gp41, trovati nel dominio del loop di disolfuro (peptide #27). Questa reattività è stata confermata nei bambini corrispondenti a queste madri (**Fig. 4A**). Nel complesso, i titoli di IgG contro tutte le regioni della gp41 testate variano da 1:172749 a 1:1523 nelle madri NT (**Fig.4B**) e da 1:481600 a 1:5120 nelle madri TR, e la differenza cumulativa è stata statisticamente significativa ( $p < 0,01$ ). Le medie dei titoli delle IgG da bambini ESN variano da 1:69016 a 1:2150 (Fig. 2B), mentre in bambini HIV-positivi i titoli variano da 1:323.000 a 1:2.560; anche nei neonati, la differenza cumulativa tra i titoli è risultata statisticamente significativa ( $P < 0,005$ ). Nessun anticorpo legante è stato trovato nei gruppi dei peptidi #23 e #14, corrispondenti alle regioni idrofobiche di gp41 (dati non riportati).

Circa il 25% dei sieri ha riconosciuto il peptide consenso MPER #20, con i sieri delle madri NT più reattivi (29%) rispetto alle madri TR, bambini ESN e HIV+ (25%; **fig.4A**). Anticorpi diretti all'epitopo 2F5 MPER sono stati analizzati su due differenti peptidi sottotipo-specifici (#12-B e #12-C). Circa il 20% dei sieri di tutti i gruppi hanno riconosciuto il peptide #12 sottotipo B. Al contrario, diciannove sieri di madri NT sono stati trovati contenere anticorpi per il peptide #12-C (n = 19/24, 79%), mentre solo sedici campioni dai loro bambini ESN (n=16/24, 67%) hanno mostrato anticorpi per il peptide sottotipo C. Sei sieri materni TR (n=6/16; 37,5%) hanno legato il peptide #12C con titoli elevati, mentre i sieri da otto bambini HIV-positivi (N =8/16, 50%) hanno mostrato anticorpi anti-MPER (peptide #12 C) (**Fig.4B**).

### **4.2.3 Neutralizzazione di HIV nei sieri da coppie madre-figlio**

Tutti i campioni materni e neonatali sono stati analizzati in saggi di neutralizzazione su quattro ceppi di HIV-1: ossia ad alta sensibilità, i sottotipi B, ceppi di laboratorio, SF162 (R5-

B) e IIIB (X4-B), e a bassa sensibilità, isolati primari DU172 e DU156 (entrambi R5-C). Questi ultimi sono sottotipi C, quindi simili ai ceppi autologhi che hanno infettato le madri arruolate nello studio. La limitata quantità di campioni di siero disponibili ha impedito l'isolamento di ceppi virali autologhi. Campioni che mostrano titoli di neutralizzazione superiori a 1:100 sono stati considerati come sieri "altamente" neutralizzanti. I sieri hanno neutralizzato il ceppo virale SF162 con maggiori titoli rispetto ai virus di sottotipo C (**Fig. 5A-D**); bassi livelli di neutralizzazione sono stati ottenuti con il III B (**Fig. 5B**).



**Fig.5 Saggi di neutralizzazione di HIV sia in neonati che nelle madri.** La neutralizzazione è stata calcolata come IC50 (intervallo e media) corrispondente alla diluizione del campione che porta al 50% di neutralizzazione. Il pannello F mostra IC50 e IC90 (valori e range) ottenuti con il TriMab. In quest'ultimo pannello, sull'asse Y ci sono le concentrazioni degli anticorpi, invece del titolo di neutralizzazione (1/n). Tutti i campioni sono stati testati in duplicato. EU (Exposed Uninfected).

Più elevati titoli neutralizzanti si sono trovati in madri NT vs TR, reagenti verso entrambi i virus di sottotipo C ( $p < 0,05$ ) e in bambini ESN vs HIV-infetti ( $p < 0,01$ ). Campioni da controlli HIV- non infetti non neutralizzano qualsiasi virus testato (media IC50  $< 1,20$ ; dati non riportati). Tutti i sieri sono risultati negativi contro il sottotipo di virus estranei SVA.MLV # 922 (**Fig. 5E**). Anticorpi di controllo positivo TriMab hanno neutralizzato tutti i virus testati, come previsto (**Fig. 5F**).

In dettaglio, tutti i sieri da madri NT hanno mostrato attività neutralizzante contro SF162 e DU156, 20/24 (83%) hanno anche neutralizzato DU172. I campioni da bambini ESN hanno neutralizzato sia SF162 e DU156 e 15/24 (62%) anche DU172. Sieri TR di controllo hanno mostrato attività neutralizzante contro SF162 e 10/16 hanno neutralizzato entrambi i virus del sottotipo C (DU156 e DU 172) (**Fig. 5A-D**). Campioni HIV-1-infetti di sangue del cordone hanno neutralizzato SF162 (13/16), quattro su sedici di loro non neutralizzano nessun ceppo virale, sei hanno neutralizzato entrambi i sottotipi virali C, mentre sei hanno neutralizzato solo il ceppo DU156 (**Fig. 5A-D**).

#### **4.2.4 Correlazione tra la neutralizzazione HIV e la specificità degli anticorpi verso la gp41**

Risultati osservati nei saggi di neutralizzazione sono stati ulteriormente studiati usando un modello statistico tra i gruppi che trasmettono e quelli che non trasmettono (coppie TR-HIV+ e NT-ESN, rispettivamente, **Tabella 1**), per stabilire le associazioni tra gli anticorpi leganti ogni peptide e l'attività di neutralizzazione per ogni sottogruppo di sieri. Coppie TR hanno mostrato un minor numero di valori significativi rispetto a quelli NT, e gli anticorpi per il dominio HR1 non sono stati significativi per tutte le madri TR e per i loro neonati. Nelle madri NT, le IgG al dominio IDE (peptide #27) sono risultate significativamente associate con la neutralizzazione di tutti i virus, ad eccezione di DU156; gli anticorpi per HR1 (peptide #3) e per il dominio MPER (sottotipo C, peptide # 12) sono stati associati alla neutralizzazione dei due ceppi di laboratorio e all'isolato DU172, ma non al DU156. Al contrario, i peptidi #12-B e #20 sono stati associati alla neutralizzazione dei ceppi di laboratorio, ma non agli isolati di sottotipo C (**Tabella 1**).

Nel bambini ESN, le IgG al dominio IDE (peptide #27) sono state significativamente associate con la neutralizzazione di SF162, DU172 e DU156. Gli anticorpi per MPER (#12-C) sono stati associati alla neutralizzazione solo di SF162 e DU172, mentre gli anticorpi ad



altri domini, come HR1 e HR2 (# 3, # 20 e # 12-B) sono stati associati solo alla neutralizzazione di SF162. Nessuna specificità degli anticorpi è risultata significativamente associata ad attività di neutralizzazione del ceppo IIB (Tabella 2). Nelle madri HIV+ (TR-M), le IgG a IDE (peptide #27) sono risultate significativamente associate alla neutralizzazione di due dei quattro ceppi virali; gli anticorpi per HR1 (peptide #3) non hanno evidenziato associazioni significative alla neutralizzazione di uno dei virus testati, mentre il dominio MPER (# 12-C) è stato associato alla neutralizzazione dei due ceppi di laboratorio e con DU172, ma non con DU156. Al contrario, la reattività verso il #12-B e #20 è stata associata alla neutralizzazione dei due ceppi di laboratorio e di uno dei due isolati del sottotipo C (Tabella 2). Nei neonati HIV+, le IgG per IDE e MPER (# 27 e # 12-C) sono risultati significativamente associati solo con la neutralizzazione di SF162 e DU172. Anticorpi per HR1 (#3) non hanno mostrato alcuna associazione con la neutralizzazione dei virus; il dominio HR2 (# 12-B) è stato associato alla neutralizzazione solo del ceppo SF162; anticorpi per il peptide #20 hanno dimostrato una più ampia associazione con i due ceppi di laboratorio e con DU156 (Tabella 1).

HIV strain	Very sensitive laboratory strains				Low sensitive primary subtype C			
	SF162 (R5)		IIB (X4)		DU172 (R5)		DU156 (R5)	
pep <sup>1</sup>	NTr-Mo <sup>2</sup>	EUN-N <sup>3</sup>	NTr-M <sup>2</sup>	EUN-N <sup>3</sup>	NTr-M <sup>2</sup>	EUN-N <sup>3</sup>	NTr-M <sup>2</sup>	EUN-N <sup>3</sup>
#3 HR1, QARILAV	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	NS	<b>0.008</b>	NS	NS	NS
#27 IDE, Immunodomin.	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	NS	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	NS	<b>&lt;0.001</b>
#20 HR2, MPER, 2F5+4E10 epit.	<b>0.037</b>	<b>0.044</b>	<b>0.004</b>	NS	NS	NS	NS	NS
#12-B HR2, MPER 2F5 epitope	<b>0.028</b>	<b>0.007</b>	<b>0.028</b>	NS	NS	NS	NS	NS
#12-C HR2, MPER 2F5 epitope	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	NS	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	NS	NS
	TR-Mo <sup>4</sup>	HIV+N <sup>5</sup>	TR-Mo <sup>4</sup>	HIV+N <sup>5</sup>	TR-Mo <sup>4</sup>	HIV+N <sup>5</sup>	TR-Mo <sup>4</sup>	HIV+N <sup>5</sup>
#3 HR1, QARILAV	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
#27 IDE, immunodomin.	<b>0.01</b>	<b>0.01</b>	NS	NS	<b>0.05</b>	<b>0.05</b>	NS	NS
#20 HR2, MPER, 2F5+4E10 epit.	<b>0.001</b>	<b>0.02</b>	<b>0.001</b>	<b>0.05</b>	NS	NS	<b>0.05</b>	<b>0.03</b>
#12-B HR2, MPER 2F5 epitope	<b>0.05</b>	<b>0.05</b>	<b>0.05</b>	NS	<b>0.05</b>	NS	NS	NS
#12-C HR2, MPER 2F5 epitope	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	NS	<b>0.007</b>	<b>0.01</b>	NS	NS

<sup>1</sup> The analysis includes five gp41 peptides that elicited antibodies (titer >1:20); significant p values are reported in bold; NS, not significant.  
<sup>2</sup> NTr-Mo, HIV-1-infected, non transmitting mothers  
<sup>3</sup> EUN-N, HIV-1-exposed, uninfected newborns  
<sup>4</sup> TR-Mo, HIV-1infected, transmitting mothers  
<sup>5</sup> HIV+N, HIV-1infected, infected newborns.

Tab.1 P-value del test di associazione tra anticorpi ad alto titolo e neutralizzazione del virus.

## **4.3 IgA mucosali monoclonali gp41-specifiche derivate da individui esposti ad HIV IgG-sieronegativi (ESN) (STUDIO III)**

### **4.3.1 Costruzione di una libreria IgA Fab-k/ $\lambda$ da cellule B di donne ESN cambogiane**

In primo luogo abbiamo analizzato la risposta umorale anti-HIV-1 nelle secrezioni genitali di donne ESN. Come rilevato in studi preliminari con ELISA gp41- e gp120-specifici e confermato in Western Blot (dati non riportati), il 50% delle donne cambogiane ESN aveva IgA gp41-specifici, ma non gp120-specifici, nelle loro secrezioni cervico-vaginali. Inoltre, non è stato possibile rilevare IgG HIV-envelope specifiche, a conferma dello stato IgG-sieronegativo degli individui ESN analizzati (dati non riportati).

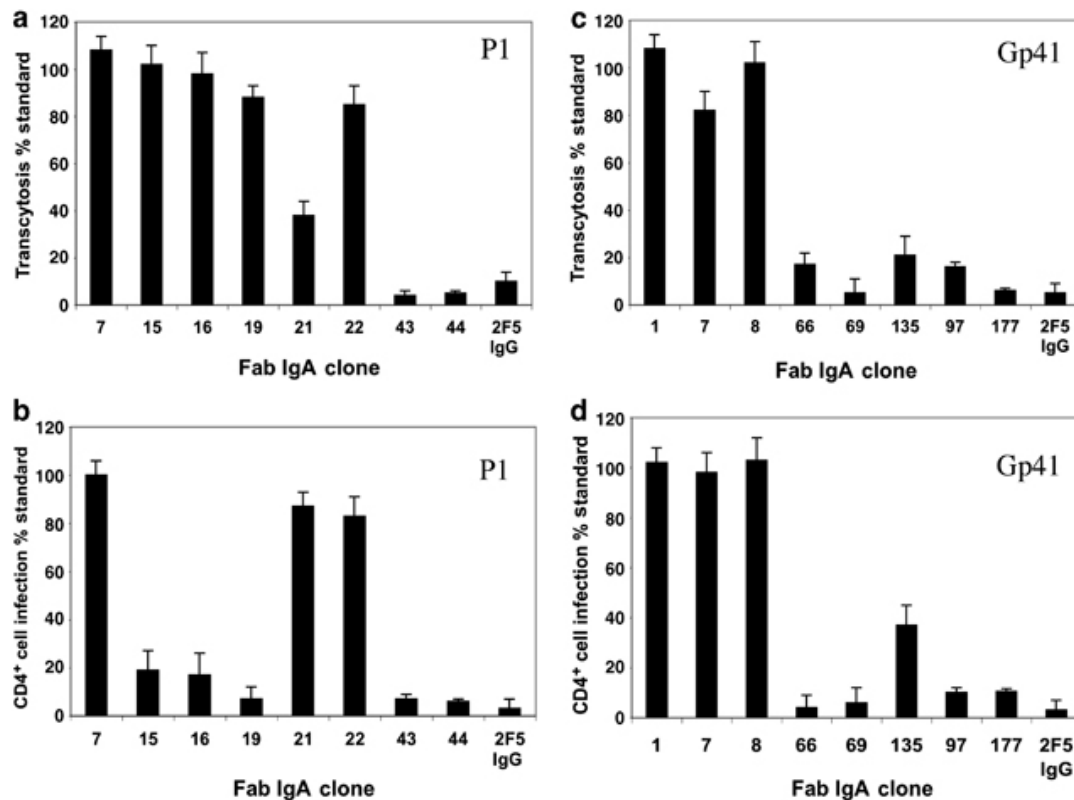
Successivamente, i linfociti B cervicali di quelle donne ESN, aventi IgA gp41-specifiche nelle loro secrezioni, sono stati utilizzati per costruire una libreria fagica di IgA-k/ $\lambda$  utilizzando un set di primer in grado di riconoscere tutti i geni funzionali V umani. Tale libreria è risultata composta da circa  $1 \times 10^7$  cloni indipendenti, la dimensione prevista per una libreria di anticorpi.

### **4.3.2 Fab IgA specifiche per la regione P1 e per la MPER modificata della gp41**

Per identificare nuovi anticorpi neutralizzanti specifici per gp41, l'attenzione è stata rivolta sulla gp41-MPR, cioè il peptide P1 (aa 649-684).

La libreria è stata screenata da tre successivi *panning* sul P1, immobilizzato su piastre ELISA, con concentrazioni decrescenti ad ogni passaggio, da 250 a 30  $\mu$ M. A tutte queste concentrazioni, P1 rimane oligomero. Di 100 cloni analizzati dopo il completamento del *panning*, 20 hanno legato specificamente il P1 in ELISA, con una densità ottica (OD) > 0,6 (dati non riportati). Questi cloni specifici sono stati direttamente valutati per la loro attività funzionale neutralizzante contro la trascitosi di HIV-1 e l'infezione delle cellule T CD4+. Come mostrato in **Figura 6a** e **b**, alcuni cloni potrebbe bloccare in modo efficiente la trascitosi o l'infezione delle CD4+. In particolare i cloni 43 e 44 potrebbero bloccare entrambi i meccanismi di entrata delle cellule con efficienza > 90%. Il sequenziamento delle

catene pesanti e leggere ha dimostrato che questi due cloni sono identici. D'ora in poi saranno denominati Fab43.



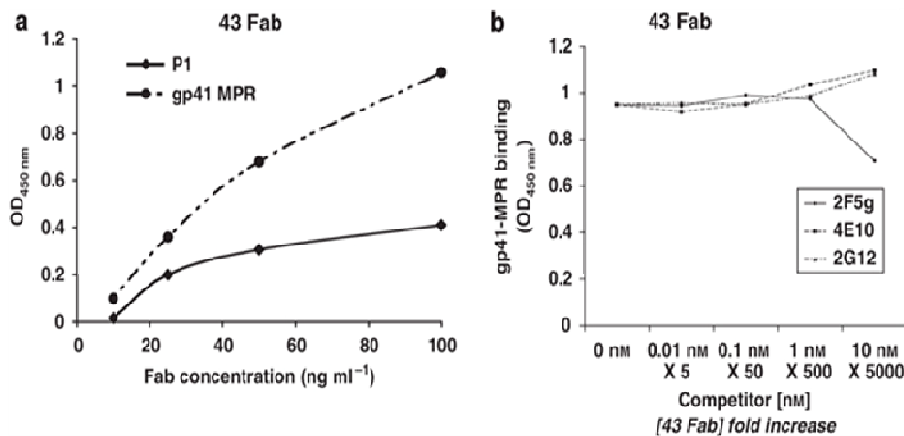
**Fig.6** Attività bloccanti HIV-1 di Fab dalla libreria di IgA (da individui ESN) specifiche per P1 o per gp41- $\Delta$ MPR (regione prossimale alla membrana) trimeriche. I dati sono rappresentativi dei cloni analizzati, sia specifici per P1 (8 su 17 analizzati) sia per la gp41 (8 su 20 analizzati). Le barre di errore rappresentano la media di almeno due esperimenti indipendenti eseguiti utilizzando cellule infettate da HIV-1 X4-tropico NDK, sottotipo D, per la transcitosi (a-c) o virus libero X4-tropico Lai, per gli esperimenti di infezione su cellule CD4+ CXCR4+ HeLa-LTR lacZ (b-d). La IgG 2F5, è stata usata come controllo positivo. I Fabs solubili sono stati testati alla concentrazione di 100-300 ng ml<sup>-1</sup>.

Per selezionare cloni di Fab-IgA specifici per regioni diverse dalla P1 della gp41, per prima cosa la libreria è stata depleta di fagi leganti il P1, dopo un round di panning sullo stesso P1. I fagi non leganti sono stati sottoposti a tre cicli sequenziali di panning su concentrazioni decrescenti (da 50 a 12  $\mu$ M) della gp41-deltaMPR trimerica, proteina ricombinante priva degli epitopi 2F5 e 4E10. Dei 100 cloni analizzati dopo il completamento del panning, 17 hanno legato specificamente la gp41 in ELISA, con una OD > 0,6 (dati non riportati). La **Figura 6** mostra che, a livello funzionale, i leganti scelti specifici per la gp41, oltre a bloccare la transcitosi di HIV-1 (**Figura 6a** e **c**), hanno bloccato efficacemente l'infezione delle cellule T (**Figura 6b** e **d**), con l' IgG 2F5 che funge da controllo positivo. Tre cloni gp41-specifici con efficiente attività di blocco sono stati scelti per ulteriori analisi, due dei quali hanno catene pesanti identiche ma diverse catene leggere, lambda per il Fab 69 e kappa per il Fab 177. Il

terzo, il Fab 66, presenta delle sequenze delle catene pesanti e leggere, diverse da quelle dei Fab 69 e 177.

### **4.3.3 Caratterizzazione dei Fab-IgA P1- e gp41-specifici**

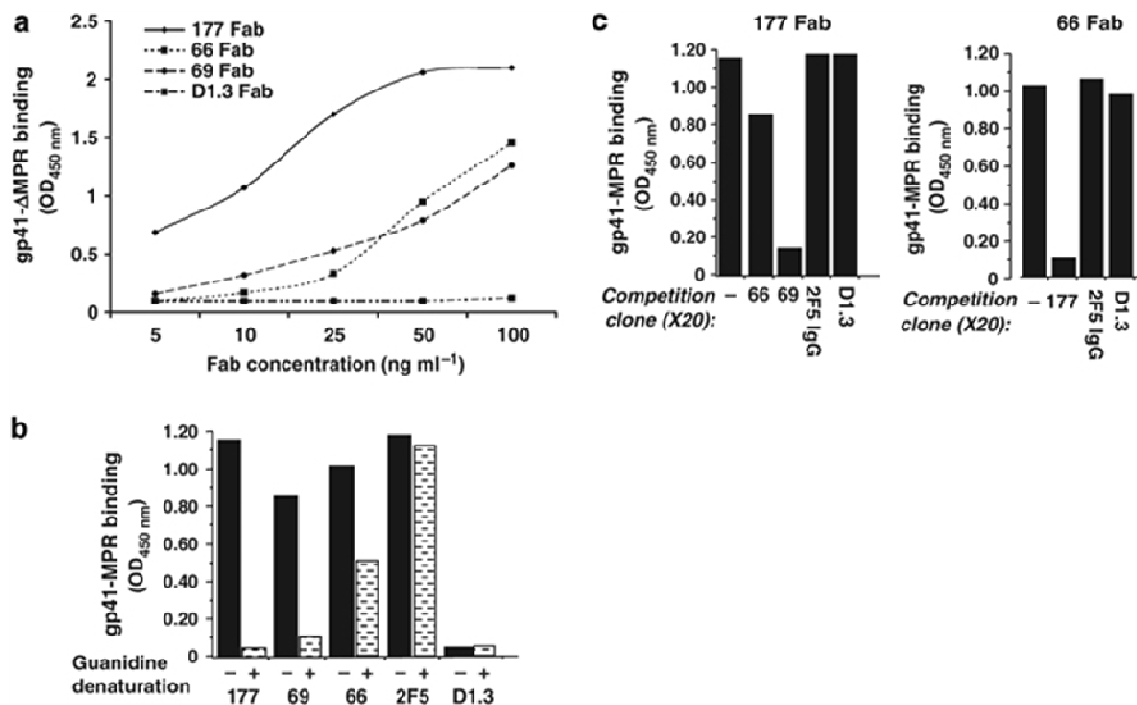
Il DNA dei fagi selezionati è stato subclonato nel vettore pASK88, un vettore progettato per alti livelli di produzione di Fab. Utilizzando questo sistema di espressione, il risultante Fab 43 ha legato il peptide P1 in un modo concentrazione-dipendente, e una proteina gp41 trimerica contenente gli epitopi 2F5 e 4E10 (gp41-MPR) (**Figura 7a**).



**Fig.7** (a) Il legame del Fab 43 al P1 e alla gp41-MPR (regione prossimale alla membrana) si verifica in modo dose-dipendente. L'esperimento mostrato, valutato tramite ELISA, è rappresentativo di almeno tre esperimenti indipendenti. (b) Il Fab 43 si lega al P1, in epitopi diversi dai lineari, ELDKWA o NWFDIT, riconosciuti da IgG 2F5 e 4E10. Il 2G12 (specifico per gp120) è utilizzato come controllo negativo. L'esperimento mostrato, valutato in ELISA competitivo, è rappresentativo di almeno tre esperimenti indipendenti. Il peptide P1 è stato piastrato a 205 ng ml<sup>-1</sup>, mentre la gp41-MPR trimerica a 500ng ml<sup>-1</sup>.

Le IgG 2F5 e 4E10 non riescono a competere con il Fab 43 per il P1 (B clade) e la gp41-MPR in saggio di ELISA competitivo (**Figura 7b**). Questi risultati hanno indicato che il Fab 43 si lega al P1, in epitopi diversi dagli esapeptidi lineari, ELDKWA o NWFDIT, forse ancora coinvolgendo epitopi come 2F5 o 4E10, ma come una struttura non lineare. L'epitopo P1-specifico è più probabilmente conformazionale, perché il Fab 43 non ha legato nessuno dei 15 peptidi lineari sovrapposti che coprono la regione P1 (dati non riportati).

Anche i Fabs 66, 69 e 177, prodotti utilizzando il sistema vettoriale pASK88, hanno legato la gp41- $\Delta$ MPR in un modo concentrazione-dipendente (**Figura 8a**). I dati suggeriscono che gli epitopi riconosciuti da questi Fab sono conformazionali. Infatti, l'associazione dei Fab 177 e 69 a gp41-MPR è stata fortemente diminuita dalla denaturazione dell'antigene con guanidina-HCl. Il legame del Fab 66 è stato meno coinvolto e vincolante di IgG-2F5, utilizzato come controllo positivo, il quale non è stato affatto colpito dalla denaturazione con guanidina-HCl (**Fig. 8b**).



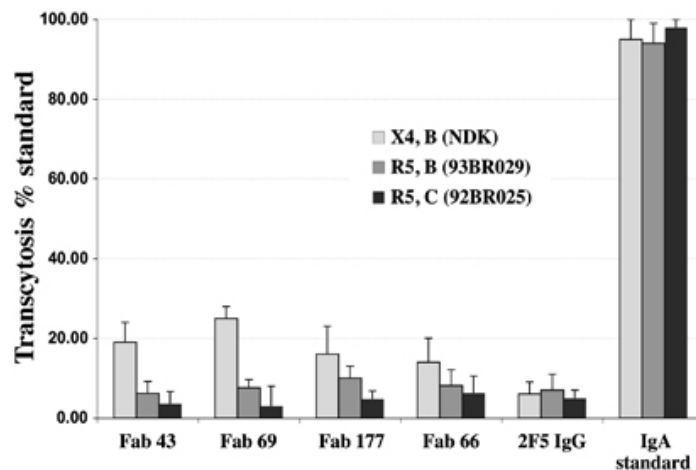
**Fig.8** (a) I cloni Fab legano specificamente la gp41- $\Delta$ MPR (piastrata a 250ng ml<sup>-1</sup>) in modo dose-dipendente (valutato tramite ELISA). (b) L'effetto della denaturazione della gp41-MPR (piastrata a 250ng ml<sup>-1</sup>) sul legame dei Fabs 177, 69, e 66 è stato valutato confrontando il legame dei Fab con la gp41-MPR in presenza o no, di guanidina, con il metodo ELISA come in Figura 7. Le IgG, 2F5 specifico per il legame all'epitopo lineare ELDKWA e D1.3 non-specifico, sono stati utilizzati come controlli. L'esperimento mostrato è rappresentativo di almeno tre esperimenti indipendenti. (c) Legame competitivo dei Fab 66, 69, e 177 a gp41-MPR. Gli ELISA di competizione sono stati eseguiti come in Figura 3b. Le IgG 2F5 e D1.3 sono stati usati come controlli. L'esperimento mostrato è rappresentativo di almeno tre esperimenti indipendenti.

Successivamente, il legame competitivo dei Fab 66, 69 e 177 a gp41 è stata valutato in ELISA competitivo. L'interazione del Fab 177 con gp41-MPR è stata completamente inibita da un eccesso di 20 volte di Fab 69 (**Fig. 8c**) e viceversa (dati non riportati). Poiché questi due Fab hanno identiche catene pesanti ma differenti catene leggere, questi risultati suggeriscono che la catena pesante di questi Fab partecipa al legame alla gp41, e la catena leggera potrebbe modularne l'affinità. L'interazione del Fab 66 con la gp41 è stata quasi completamente inibita

da un eccesso di Fab 177, ma al contrario, l'interazione del Fab 177 alla gp41 è stata solo parzialmente inibita da un eccesso di Fab 66 (**Fig. 8c**). Questo suggerisce che questi due Fab riconoscono, con affinità diverse, epitopi differenti ma sovrapposti.

#### **4.3.4 Fab-IgA gp41-specifici da ESN bloccano la transitosi di HIV-1 attraverso una stretta barriera epiteliale**

In accordo con il risultato mostrato in Figura 1 per clade D di HIV-1, X4 tropico, isolato di laboratorio NDK, i cloni Fab gp41-specifici isolati dalle donne ESN hanno bloccato la transitosi dell'isolato primario, R5 tropico, di entrambi i clade B e C, con IC90 <50 ng ml<sup>-1</sup> (**Figura 9**). L'attività bloccante da parte dei Fab verso i virus R5 tropici (IC90 =150 ng ml<sup>-1</sup> per i vari cloni) è molto superiore a quella di IgG 2F5 (IC90 =1 ug ml<sup>-1</sup>). È interessante notare che i Fab sono stati leggermente più potenti nel bloccare gli R5 tropici rispetto a il virus di laboratorio adattato, molto infettivo, di clade D, X4 tropico, NDK. La cross-neutralizzazione tra gli isolati X4/clade B e R5/clade C conferma che gli epitopi riconosciuti dai Fab-IgA, isolati dagli ESN, sono conservati sia nella sequenza sia a il livello conformazionale.

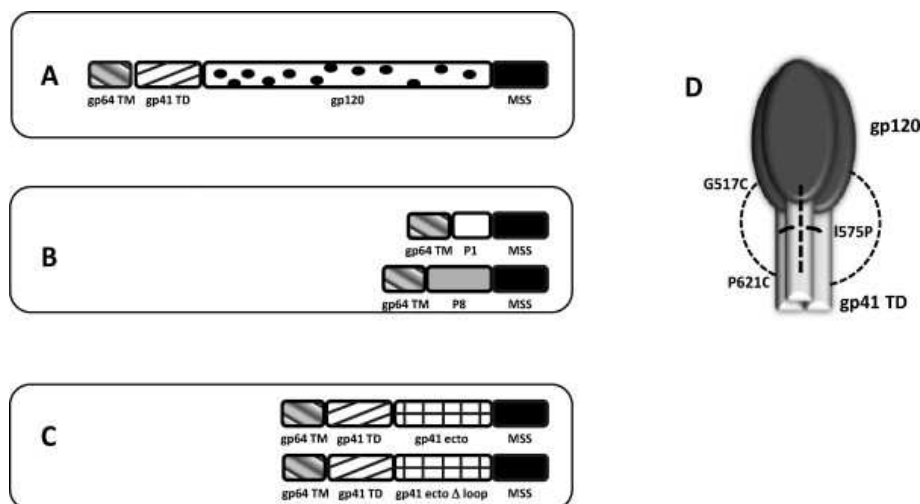


**Fig.9** La transitosi di HIV-1 indotta cellule HIV-infettate, attraverso uno stretto monostrato di cellule epiteliali. Cellule CEM, con infezione cronica da clade D HIV-1 X4 tropico (barre grigio chiaro), PBMC infettati da clade B R5 tropico (barre grigio scuro), o PBMC infettati da clade C (barre nere) sono state utilizzate per avviare la transitosi. I Fabs (50-150 ng ml<sup>-1</sup>), o i controlli 2F5 (1 ug ml<sup>-1</sup>) e IgA non specifiche (150 ng ml<sup>-1</sup>), sono stati pre-incubati con le cellule infettate prima di inoculare le stesse al polo apicale del monostrato epiteliale. La Transitosi è stata valutata 2 ore più tardi, misurando il contenuto di p24 nel medio basale. Le barre di errore rappresentano la media di almeno tre esperimenti indipendenti.

## 4.4 Generazione di Virus-Like-Particles (VLPs) esprimenti differenti glicoproteine di HIV-1 (STUDIO IV)

### 4.4.1 Disegno delle proteine Env chimeriche

La sequenza chimerica della gp140 da esprimere sulla superficie delle VLP è stata progettata a partire dalla gp120 derivata da un isolato ugandese di clade A (numero di accesso GenBank AF062521). In particolare, la sequenza segnale della gp120 autologa è stata sostituita dall'eterologa sequenza segnale Honeybee Mellitin (HMSS) e il dominio trans-membrana della gp41 è stato sostituito con quello della principale glicoproteina del baculovirus gp64 (gp64TM) (**Fig. 10A**).



**Fig.10** Rappresentazione schematica delle proteine chimeriche dell'env di HIV.

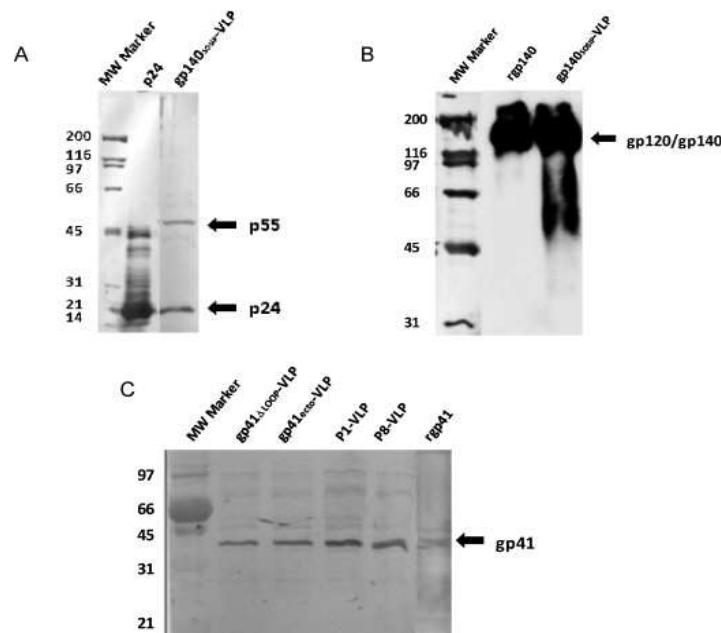
Gli stessi domini eterologhi, MSS e gp64TM, sono stati utilizzati per generare le gp41 chimerici da visualizzare sulla superficie VLP. In particolare, sono stati selezionati due peptidi nella regione di gp41 MPER: (1) un peptide di 35-mer che copre i domini ELDKWA e NWFDIT, epitopi dei NABS 2F5 e 4E10 rispettivamente (designato P1, aa 650-684) e (2) un peptide di 73-mer che si estende oltre l'NH<sub>2</sub> terminus del peptide P1 (designato P8, aa 612-684) (**Fig. 10B**). In alternativa, l'intero ectodominio della gp41 è stato espresso con o senza una delezione del loop di cisteine (aa 600-620) (**Fig. 10C**).

Inoltre, la molecola gp140 è stata ulteriormente modificata introducendo una mutazione nella regione C-terminale della gp120 (G517C) e nel segmento immunodominante della gp41 (P621C), per stabilizzare l'associazione tra le due subunità. Inoltre, una sostituzione I575P

nella regione N-terminale heptad-repeat di gp41 è stata introdotto per stabilizzare ulteriormente le interazioni gp41-gp41. Tale modifica alla gp140 è designata gp140<sub>SOSIP</sub> (**Fig. 10D**). Baculovirus ricombinanti, esprimenti l'envelope chimerico e i geni codificanti Pr55gag, sono stati prodotti come descritto in precedenza (vedere cap.3 MATERIALI E METODI).

#### **4.4.2 Caratterizzazione delle VLPs-HIV rilasciate dalle cellule di insetto**

Dopo che le VLP sono state prodotte a seguito di 3 cicli di infezione di cellule di insetto HighFive (come precedentemente descritto), la presenza di tutte le proteine virali confezionate nelle stesse VLP assemblate è stata confermata dall'analisi in Western Blot eseguita sui lisati delle VLP concentrate. In particolare, il policlonale anti-p24 ha riconosciuto due bande che mostrano pesi molecolari compatibili con la p24 e Pr55gag in tutte le preparazioni VLP (**Fig. 11A**). Un mix di MAb anti-gp120, 2G12 e B12, ha individuato una banda prevalente nella gp140SOSIP-VLP, con accanto la forma solubile della stessa gp140 ugandese espressa sulla VLP (**Fig. 11B**). Infine, un mix di MAb anti-gp41, 2F5 e 4E10, ha individuato una banda specifica nelle p1-VLP, p8-VLP, gp41ecto-VLP e gp41ΔLOOP-VLP (**Fig. 11C**).

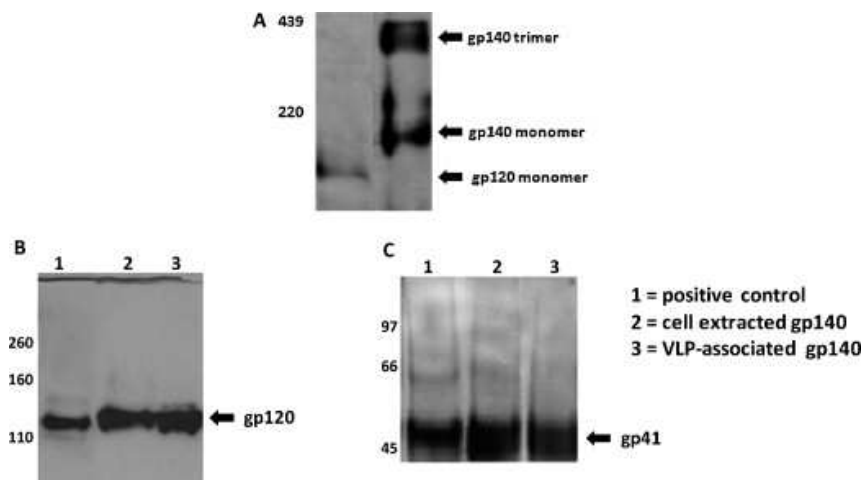


**Fig.11** Analisi di immunoblot per le singole VLPs generate in cellule di insetto HighFive infettate.

La formazione di trimeri delle proteine Env in gp140SOSIP-VLP è stata studiata in BN-PAGE (gel nativo) che, oltre alla banda corrispondente al monomero gp120/gp41, ha mostrato



una banda supplementare prevalente di circa 400 kDa, corrispondente ai trimeri, a conferma che l'espressione nelle membrane fornisce stabilità ai trimeri Env (**Fig. 12A**).

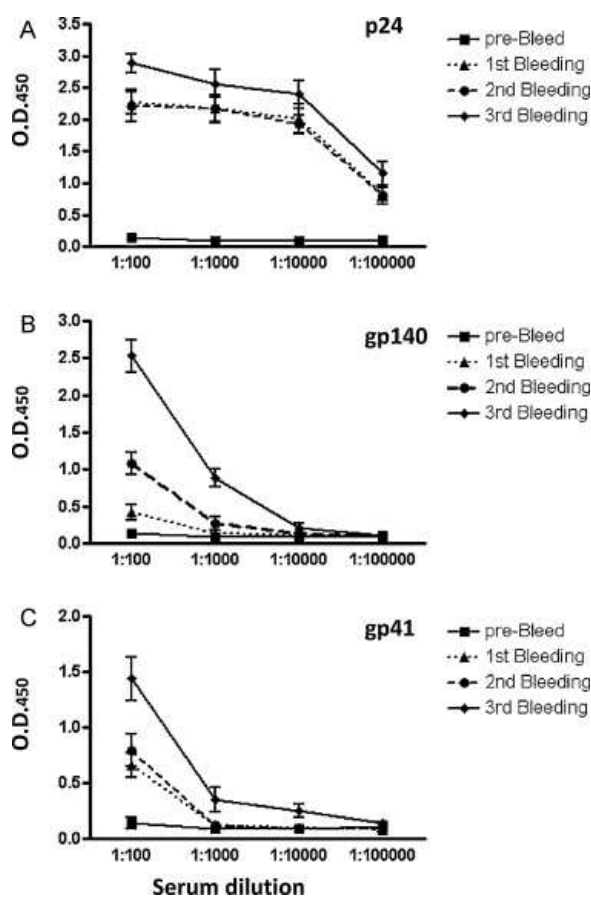


**Fig.12 Caratterizzazione di gp140 espressa sulle VLP.** Full-length gp140 sono state analizzate su BN-PAGE nativo, per verificare le strutture trimeriche della gp120/gp41 espressa VLP. La Ferritina 12-mer (220 kDa) e 24-mer (kDa 439) è servita come marcatore di dimensioni molecolari (A). In alternativa, le proteine sono state analizzate in SDS-PAGE in condizioni riducenti e denaturanti (B e C), mostrando l'associazione non-covalente delle subunità gp120 e gp41.

#### **4.4.3 Induzione di anticorpi sierici diretti contro HIV-VLP**

L'induzione di una risposta immunitaria umorale da tali HIV-VLP è stata valutata in duplicato nel modello murino BALB/C tramite somministrazione intra-peritoneale, utilizzando un protocollo con tre dosi di vaccinazione. Gli animali sono stati iniettati con 20 ug di VLP purificate, in PBS. Alla settimana 3 e 7 dopo l'iniezione primaria, ogni gruppo è stato rafforzato con la stessa quantità di antigene.

Titoli anticorpali sierici indotti da HIV-VLP sono stati valutati mediante test ELISA eseguiti su micropiastra con p24, gp140 o gp41 di HIV e le reazioni sono state considerate positive se superiori alla OD+3SD dei sieri pre-immuni, alla stessa diluizione. In base a tali criteri, i sieri del prelievo dopo la terza immunizzazione, a prescindere dalla VLP utilizzata come immunogeno, hanno mostrato una reazione positiva contro la proteina p24 fino ad una diluizione finale di 1:10<sup>5</sup> (**Fig. 13A**).



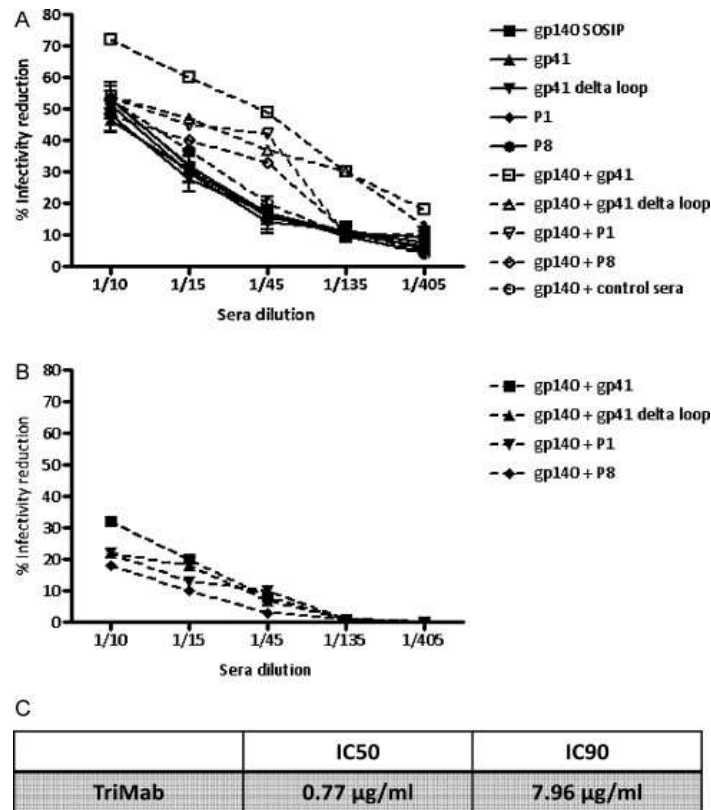
**Fig 13 Risposta umorale indotta in topi immunizzati con VLP.** Pannelli A e B mostrano i risultati da tutti gli animali immunizzati con gp140SOSIP-VLP. Il Pannello C mostra i risultati di tutti gli animali immunizzati con gp41ecto-VLP, come esempio di tutte le gp41-VLP.

In alternativa, sieri dell'ultimo prelievo degli animali immunizzati con gp140SOSIP-VLP hanno mostrato una reazione positiva contro la gp140 fino ad una diluizione finale di  $1:10^3$ , con una  $OD_{450}$  di 0,9 (**Fig. 13B**). Allo stesso modo, sieri dell'ultimo prelievo di animali immunizzati con p1-VLP, p8-VLP, gp41ecto-VLP e gp41 $\Delta$ loop-VLP hanno reagito contro l'antigene gp41, fino ad una diluizione finale di  $1:10^3$ , con una  $OD_{450}$  significativamente più bassa, e cioè di 0,3 (**Fig. 13C**). In particolare, i sieri di animali di questi ultimi quattro gruppi hanno mostrato simili reattività anti-gp41 nella valutazione ELISA.

#### **4.4.4 Attività neutralizzante dei sieri immuni indotti da HIV-VLPs**

Gli antisieri dei topi sono stati testati in saggi di neutralizzazione di HIV utilizzando la linea cellulare TZM.bl e uno pseudovirus di clade B QH0692, il cui envelope mostra una

divergenza del 18,9% dall'envelope di clade A sulle VLP descritte nel presente studio. Tutti i sieri da animali immunizzati con VLPs individuali hanno mostrato una attività di neutralizzazione limitata e bassa, con una concentrazione inibitoria del 50% (IC<sub>50</sub>) ottenuto con diluizione del siero di 1:10 o inferiore (**Fig. 14A**).



**Fig.14** Titolazione dell'attività neutralizzante sulle cellule TZM.bl. (A) Sieri testati singolarmente o mischiati insieme. (B) Le miscele degli stessi sieri sono state testate dopo adsorbimento di ogni siero individuale sulla corrispondente HIV-VLP utilizzata per il protocollo di vaccinazione. I valori del 50 e del 90% di concentrazione inibitoria (IC<sub>50</sub> e IC<sub>90</sub>) sono ottenuti con il TRIMAB nelle stesse condizioni sperimentali. Le linee continue indicano i sieri dai singoli animali; linee tratteggiate indicano le miscele di pool di sieri.

Per verificare il possibile effetto, additivo o sinergico, di antisieri indotto dalle diverse VLP analizzate, saggi di neutralizzazione sono stati eseguiti utilizzando diversi mix (volume1:1) di antisieri. Effetto additivo/sinergico è stato mostrato con tutte le miscele di siero testate e la migliore curva di riduzione di infettività è stata ottenuta combinando l'antisiero indotto dalla gp140SOSIP-VLP con quello ottenuto da gp41ecto-VLP. Una riduzione di infettività 50%, infatti, è stato osservato alla diluizione di siero di 1:45 (IC<sub>50</sub> 1:45). Le altre miscele sono state in grado di indurre la riduzione di infettività del 50% ad una diluizione di siero più bassa (IC<sub>50</sub> 1:10), fatta eccezione per la combinazione di antisiero siero indotto dalla gp140SOSIP-VLP con quello da P8-VLP (IC<sub>50</sub> <1:10) (**fig.14A**).Le miscele degli stessi sieri sono state testate dopo adsorbimento di ogni siero individuale sulla corrispondente HIV-VLP utilizzata per il

protocollo di vaccinazione. I risultati hanno mostrato la perdita di attività di neutralizzazione per tutte le miscele, confermando che l'attività di neutralizzazione è dovuta a specifici anticorpi anti-HIV presenti nei sieri immuni degli animali (**Fig. 14B**). Nel stesse impostazioni sperimentali, il TRIMAB è stato utilizzato come controllo positivo (**Fig. 14C**).

## 4.5 VLP per indurre anticorpi contro epitopi protettivi presenti all'interno di regioni conservate della gp41 di HIV-1 (STUDIO V)

### 4.5.1 Assemblaggio e controllo dei peptidi di gp41 coniugati ad AP205

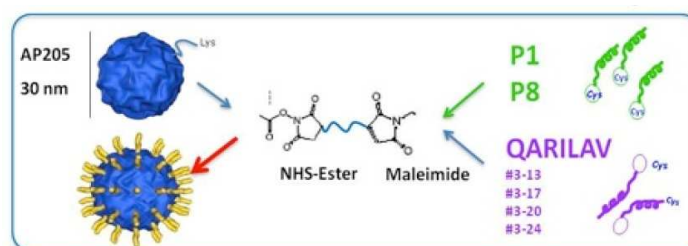
Peptidi della gp41 sono stati coniugati sulla superficie delle VLP derivate dal batteriofago Q $\beta$ , o AP205. In particolare un cross-linker è stato utilizzato per coniugare covalentemente i peptidi della regione HR1 di gp41, 03-20, 03-13, 03-17, 03-24, e della regione HR2 :P1 e P8 (grazie a residui di cisteina introdotti al C-terminale dei peptidi) ai residui di lisina sulla superficie delle AP205 VLPs (**Figura 15**).

Gp41 03-13 (NH<sub>2</sub>-LQARILAVEVERYLC-CONH<sub>2</sub>, MW 1547 Da),

Gp41 03-17 (NH<sub>2</sub>-GIKQLQARILAVEVERYLC-CONH<sub>2</sub>, MW 1973 Da),

Gp41 03-20 (NH<sub>2</sub>-LQARILAVEVERYLKDQQLLGC-CONH<sub>2</sub>, MW 2330 Da),

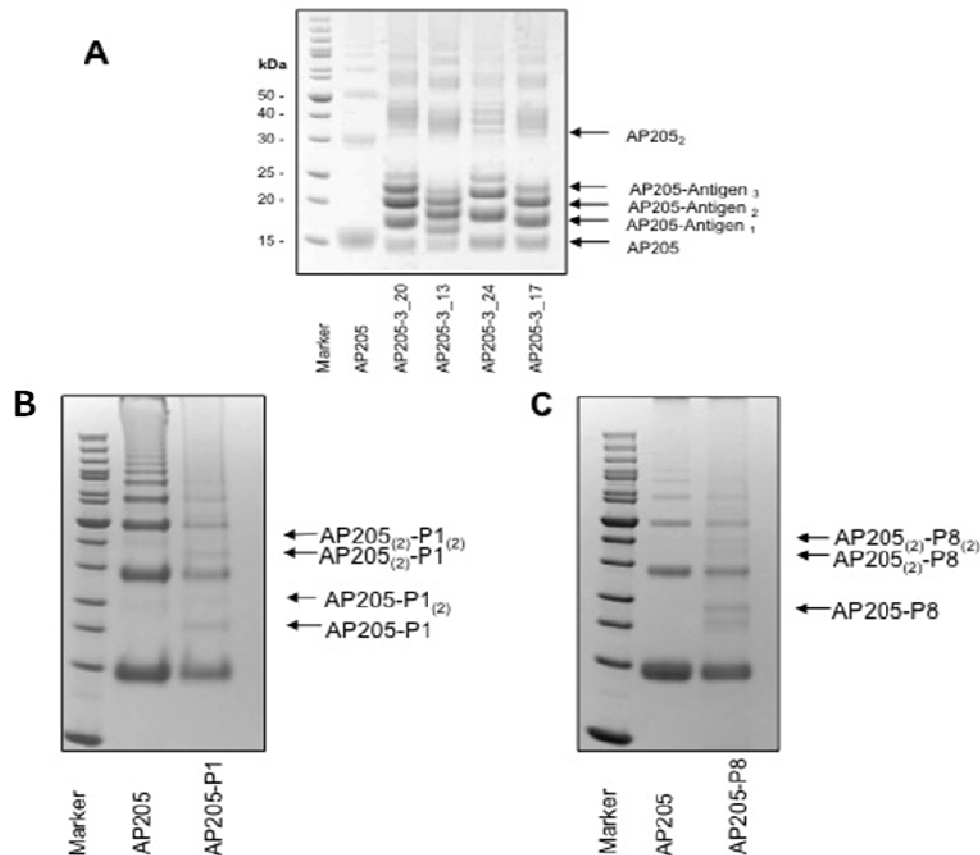
Gp41 03-24 (NH<sub>2</sub>-GIKQLQARILAVEVERYLKDQQLLGC-CONH<sub>2</sub>, MW 2756 Da).



**Fig.15** Rappresentazione schematica della coniugazione dei peptidi alle VLP e della loro sequenza..

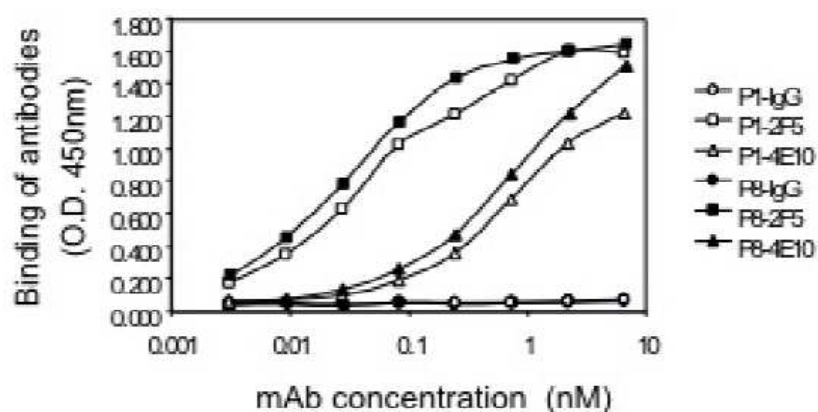
Tutti e sei i peptidi sono stati efficacemente coniugati alle AP205-VLP, come mostrato in Figura 16. Data l'importanza dell'affollamento dei peptidi sulla superficie delle VLP, i vaccini coniugati sono stati analizzati mediante SDS-PAGE per determinare il numero di peptidi legati a una singola AP205-VLP. Come mostrato nella **Fig.16**, i pesi delle bande in un gel di

SDS-Page in riduzione e denaturazione, corrispondevano alle subunità di AP205 associate a uno, due o tre peptidi.



**Fig.16 Caratterizzazione dei vaccini AP205 con peptidi di gp41coniugati.** (A) SDS-PAGE delle AP205-gp41: la banda più bassa "AP205" rappresenta solo una subunità AP205; le bande "AP205-Antigen<sub>1</sub>", "AP205-Antigen<sub>2</sub>" e "AP205-Antigen<sub>3</sub>" rappresentano una singola subunità AP205 coniugata con 1, 2 o 3 peptidi di gp41, rispettivamente. (B) SDS-PAGE di AP205-P1 e (C) di AP205-P8: la banda più bassa "AP205" rappresenta solo una subunità AP205; le bande "AP205-Antigen" e "AP205-Antigen<sub>2</sub>", e le bande "AP205<sub>2</sub>-Antigen" e "AP205<sub>2</sub>-Antigen<sub>2</sub>" rappresentano una singola subunità AP205 coniugata con 1 o 2 peptidi, e un dimero di AP205 coniugato con 1 o 2 peptidi, rispettivamente.

Successivamente è stato valutato se gli epitopi neutralizzanti per P1 e P8 fossero ancora accessibili sulla superficie delle AP205-P1 e AP205-P8 VLPs dopo l'accoppiamento dei peptidi, tramite saggio ELISA a sandwich (**Fig.17**). Questo non è stato necessario per le gp41-HR1 AP205 VLP, a causa della breve lunghezza dei loro peptidi e la conseguente limitazione nella loro possibili conformazioni.



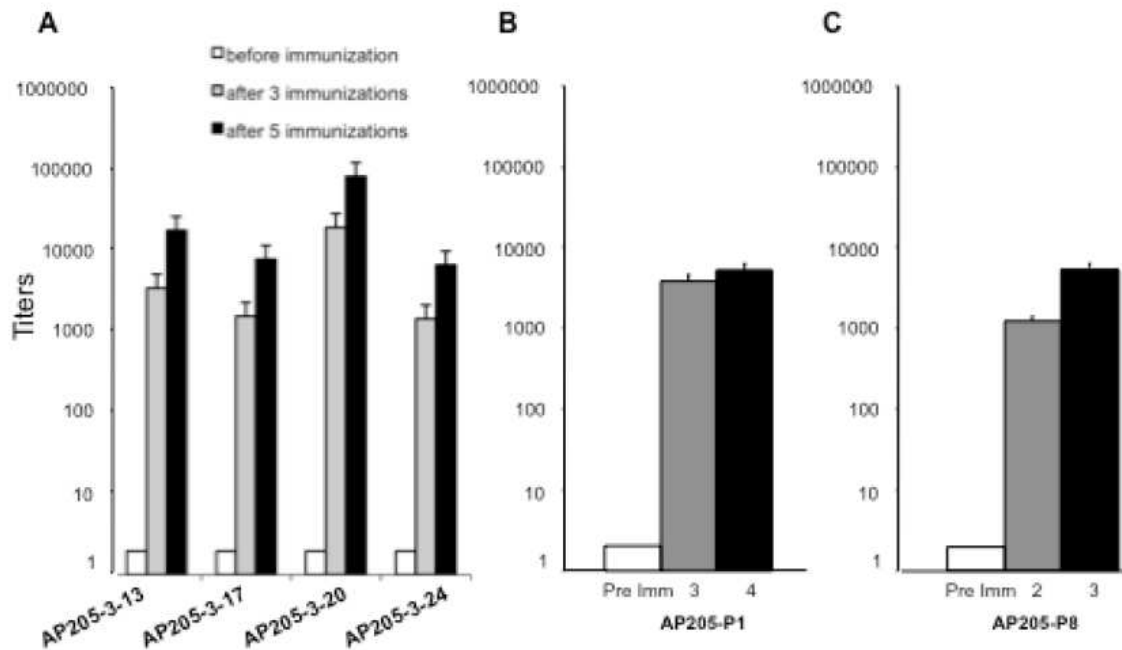
**Fig.17** Il legame di IgG 2F5 e 4E10 a AP205-P1 e -P8 VLP, valutate con il metodo ELISA. Diverse concentrazioni di 2F5 e 4E10 sono state valutate.

Le VLP sono state legate al supporto solido utilizzando un antisiero AP205; le due IgG ampiamente neutralizzanti, 2F5 e 4E10, sono state fatte legare alle VLPs, AP205-P1 e AP205-P8. La **Fig.17**, dimostra che sia il 2F5 che il 4E10 hanno riconosciuto le VLP a livello sub-nanomolare, anche se l'AP205-P8 ha mostrato una migliore accessibilità rispetto all'AP205-P1 per entrambe le IgG; in altre parole, P1 e P8 sono facilmente accessibili sulla superficie delle VLP e mantengono una piena esposizione dei loro epitopi neutralizzanti.

#### **4.5.2 Immunogenicità dei peptidi della gp41**

Gruppi di cinque topi sono stati immunizzati per via sottocutanea con AP205-gp41-HR1, vaccini comprendenti AP205-3-13, AP205-3-17, AP205-3-20, AP205-3-24. Titoli anticorpali specifici per i peptidi sono stati determinati dopo la terza e la quinta immunizzazione, e confrontati con i titoli pre-immuni (**Fig.18, A**).

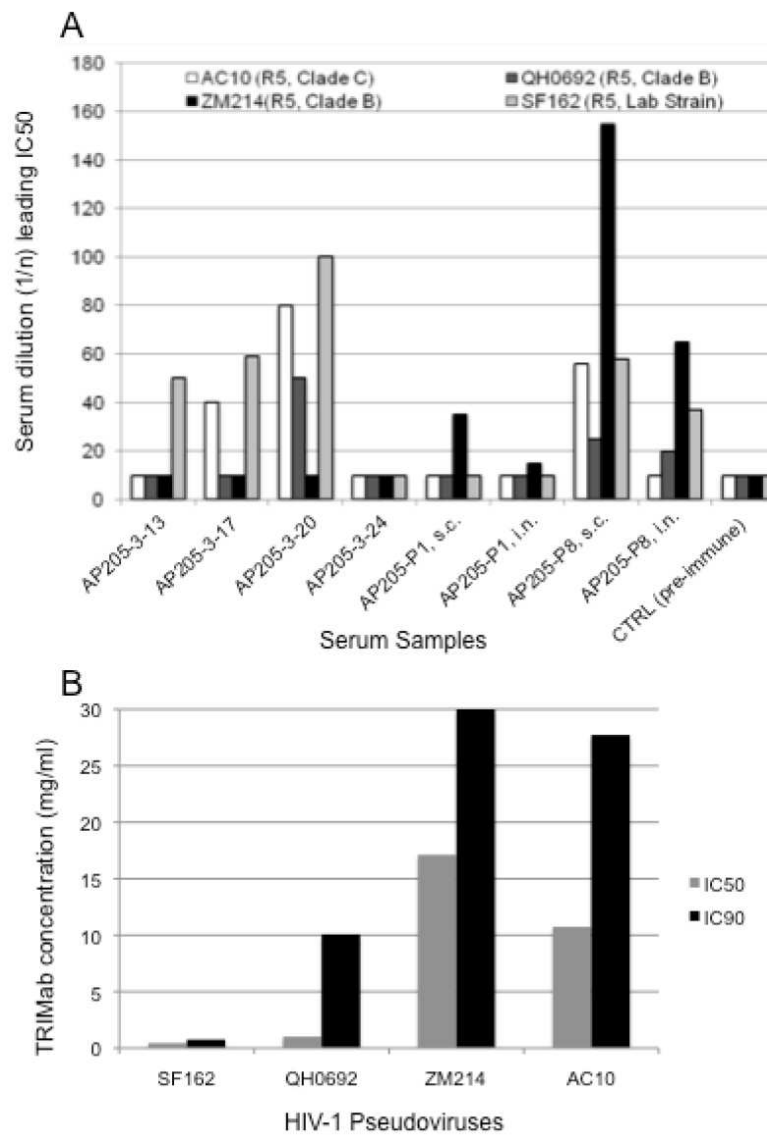
Alti titoli di anticorpi specifici sono stati ottenuti dopo tre immunizzazioni con tutti e quattro i vaccini coniugati; i titoli sono ulteriormente aumentati dopo cinque immunizzazioni. L'AP205-3-20 coniugato ha indotto i più alti titoli anticorpali. Gruppi di cinque topi sono stati immunizzati per via sottocutanea o intranasale con AP205-P1 e AP205 -P8. I titoli anticorpali specifici sono stati determinati dopo tre o quattro vaccinazioni per P1, e dopo due e tre vaccinazioni per P8 e confrontati con i titoli pre-immuni: titoli elevati sono stati raggiunti già dopo tre e due vaccinazioni, rispettivamente (**Fig.18, B e C**). Vaccinazioni intranasali hanno indotto più bassi titoli rispetto a quelli ottenuti per via sottocutanea.



**Fig.18** Immunogenicità dei vaccini AP205-peptidi gp41. (A) Vaccinazioni con peptidi HR1. Sieri corrispondenti alla pre-immunizzazione, e dopo il terzo e il quinto ciclo di vaccinazione, sono stati analizzati mediante test ELISA contro i peptidi corrispondenti; (B) e (C) vaccinazioni con regioni HR2. Titoli anticorpali sono mostrati come i reciproci della diluizione necessaria per raggiungere il 50 per cento del segnale misurato a saturazione.

### **4.5.3 AP20-gp41 VLP inducono anticorpi neutralizzanti**

Tutti i sieri immuni sono stati valutati nei test di neutralizzazione contro quattro diversi ceppi di HIV-1: il ceppo di laboratorio, ad alta sensibilità, SF162 (R5-clade B), gli isolati primari, scarsamente sensibili, ZM214 e QH0692 (entrambi R5-clade B) e un isolato primario di clade C, AC10. I dati di neutralizzazione, riassunti nella **Fig.19**, hanno mostrato che tutti gli antisieri verso le gp41-VLP, tranne AP205-3-24, hanno ridotto l'infezione da HIV-1 SF162 (media  $IC_{50}$  = 1:50-1:100), mentre due antisieri anche neutralizzato AC10 (media  $IC_{50}$  1:40-1:80). L'isolato ZM214 non è stata neutralizzata da nessun siero, mentre l'altro clade B, QH692, è stata neutralizzato solo da AP205-3-20 (media  $IC_{50}$ =1:50). Nel complesso, l'antisiero AP205-3-20 ha mostrato la migliore attività neutralizzante, con un  $IC_{50}$  media di 1:78. Antisieri per AP205-P1 hanno mostrato attività neutralizzanti molto basse, mentre AP205-P8 hanno indotto anticorpi neutralizzanti con una media di  $IC_{50}$  di 1:73.5 per i sieri di topi immunizzati per via sottocutanea, e 1:33 per i topi immunizzati per via intranasale.



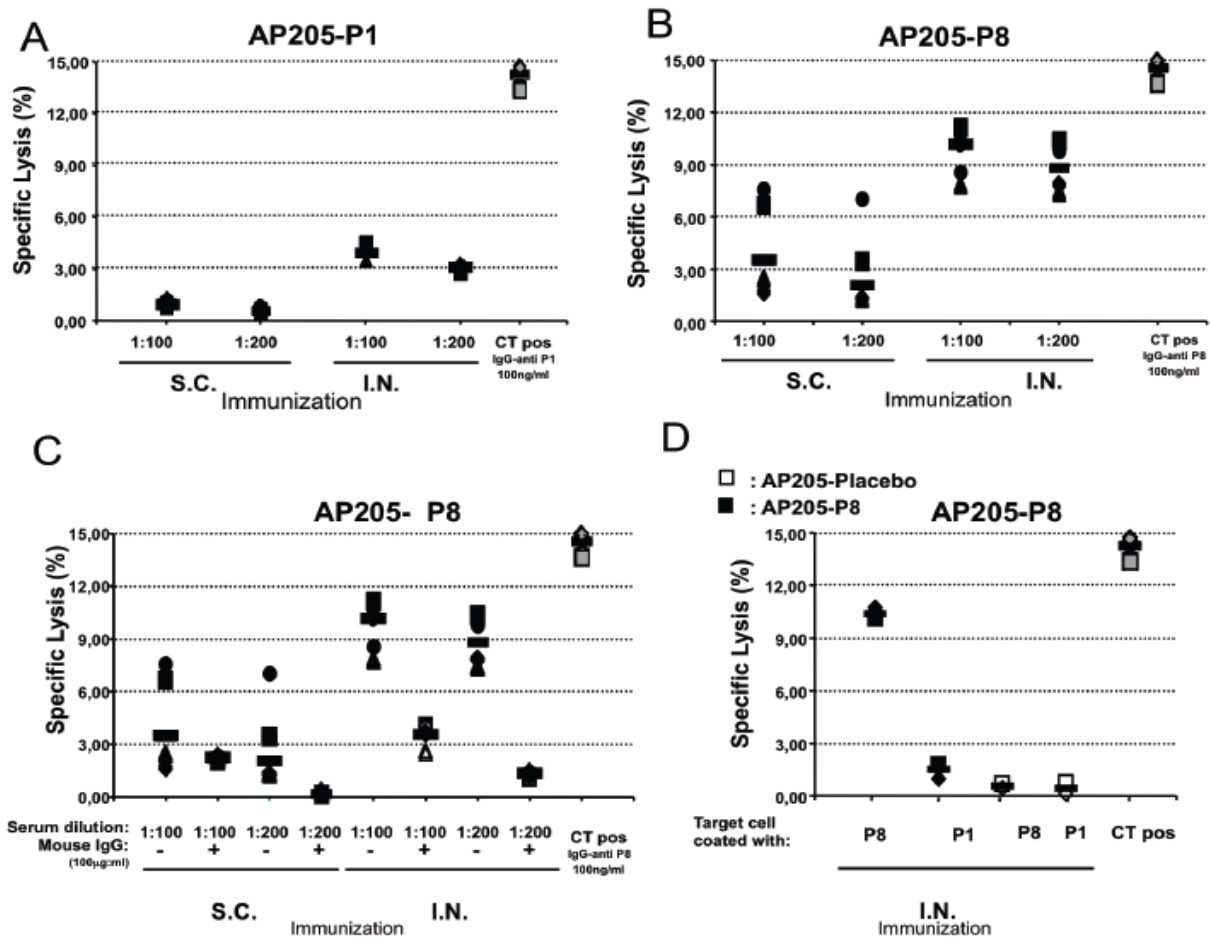
**Fig.19 Neutralizzazione di antisieri da vaccini coniugati AP205-gp41.** (A): antisieri contro gp41-HR1 (AP205-3-13, AP205-3-17, 3-20 AP205 e AP205-3-24) sono stati ottenuti da vaccinazioni per via sottocutanea. Antisieri per gp41 HR2 (AP205 e AP205-P1-P8) sono stati ottenuti da vaccinazioni per via sottocutanea o intranasale. Antisieri raccolti dopo cinque immunizzazioni sono stati testati nel saggio di neutralizzazione. Un pool di sieri pre-immuni è stato utilizzato come controllo negativo, con la stessa diluizione dei gp41-antisieri. (B): neutralizzazione di controllo ottenuta con TriMab, testati a diluizioni tra 0,1-30 mg/ml contro gli stessi quattro ceppi virali.

#### **4.5.4 L'attività ADCC è indotta solo da una regione della gp41**

Abbiamo valutato l'ADCC di tutti i sieri immuni da ogni gruppo di topi vaccinati usando le THP1 esponenti Fc-gammaRI, come cellule effettrici, e le NKr-CEM esponenti i peptidi P1 e P8. L'ADCC è stata valutata in % di lisi specifica.



Grazie alla disponibilità di campioni sono stati testati gli anticorpi dopo l'ultima immunizzazione. Nessuna attività ADCC è stata rilevata in sieri da immunizzazioni con AP205- gp41-HR2 (non mostrato), in contrasto con AP205 accoppiato al P1 e P8. Quindi, la vaccinazione AP205-P1 per via intranasale ha indotto una bassa, anche se significativa, attività ADCC (**Fig.20, A**); sorprendentemente i sieri derivati da AP205-P8, sono stati potenti induttori di ADCC, specialmente sieri di topi vaccinati per via intranasale rispetto a quelli vaccinati per via sottocutanea (**Fig.20, B**).



**Fig.20** Attività ADCC di antisieri dai vaccini peptidici AP205-gp41. L'attività ADCC è stata valutata utilizzando come cellule effettrici THP1 esprimenti Fc-gammaRI e cellule target NKr-CEM rivestite sia con P1 o P8, come indicato. ADCC è valutata in% di lisi specifica corrispondenti a lisi delle cellule bersaglio meno lisi in presenza del siero di topo non specifico alla stessa diluizione. **A:** I sieri di topi vaccinati immunizzati con AP205-P1 (1:100 diluizione e 1: 200). **B:** Siero da topi vaccinati con AP205-P8 (1:100 diluizione and 1: 200). **C:** I sieri di topi vaccinati AP205-P8 (1:100 diluizione and 1: 200) dopo pre-incubazione di cellule effettrici con un eccesso di IgG normali di topo. **D:** I sieri di topi vaccinati per via intranasale con AP205-P8 (diluizione 1:200) contro c cellule rivestite da P8 e da P1. Sieri AP205-placebo mancano di attività ADCC. 2F5 è stato utilizzato come positive control.

Al fine di confermare che l'ADCC era effettivamente dovuta a IgG sieriche e non ad altri fattori del siero, le cellule effettrici sono state incubate con IgG di topi pre-immuni, prima

dell'aggiunta dei sieri immuni, per competere con le IgG gp41-specifiche del siero di topi vaccinati. Come previsto, la pre-incubazione con IgG ha completamente eliminato l'ADCC indotta da AP205-P1 e P8 (**Fig.20, C**). In questo caso, la potente attività ADCC dei sieri potrebbe essere dovuta al riconoscimento di di epitopi conformazionali che possono essere ricostruiti solo in peptidi larghi, come il P8 di 55 aa. Quindi è stato valutato se la forte ADCC dimostrata dal siero derivato da AP205-P8 è dovuta alla regione aggiuntiva presente nel peptide P8, non coperta da P1. Di conseguenza, l'attività ADCC dei sieri AP205-P8 è stata valutata utilizzando cellule bersaglio rivestite con P1 e P8. In queste condizioni, l'attività ADCC dei sieri AP205-P8 dopo la vaccinazione intranasale è stata limitata alle cellule bersaglio rivestite da P8, dal momento che le cellule bersaglio rivestite con P1 non sono state lisate (**Fig.20, D**). I sieri di topi vaccinati con placebo, sono stati utilizzati come controllo negativo. Questi ultimi test mostrano che una robusta attività ADCC si potrebbe ottenere solo dopo la vaccinazione con AP 205-P8 per via intranasale.

## 5. DISCUSSIONE

Nonostante sia noto che l'immunità umorale svolge un ruolo importante nell'infezione da HIV, la definizione dei principali fattori protettivi riguardanti le diverse specificità degli anticorpi e l'ampiezza della protezione in vivo, sono ancora oggetto di discussione.

In questa tesi, il primo studio ha riguardato l'analisi di una serie di parametri umorali da diversi gruppi di pazienti sieropositivi (come la quantità relativa di anticorpi specifici per gli epitopi di HIV, la neutralizzazione del virus) per mezzo di strumenti statistici (ad esempio, gli algoritmi di classificazione), al fine di definire specifiche "firme umorali" che identifichino lo stato dei pazienti e, soprattutto, biomarcatori clinicamente importanti.

Come osservazione generale, abbiamo notato che gli anticorpi IgA e IgG hanno mostrato diversi, e talvolta opposti, comportamenti nei loro pattern in tutti o in alcuni gruppi di pazienti. Concentrandosi sulla risposta IgA totale, si può affermare che i gruppi AI, AIDS ed EC hanno mostrato pattern simili: valori medi bassi e bassa variabilità. Inoltre, la risposta IgA nei LTNP è stata elevata in termini di valore medio, ma ha anche mostrato un'elevata variabilità. D'altra parte, le risposte IgG sono state abbastanza simili in termini di valori medi tra i gruppi, ma con variabilità diversa, la più alta variabilità è stata osservata nel gruppo di AI. Anticorpi anti CCR5 sono stati osservati solo in alcuni individui di controllo dell'infezione (EC e LTNP), suggerendo che potrebbero essere elicitati tardi nel corso dell'infezione e che una bassa dose di esposizione agli antigeni potrebbe essere necessaria per permettere la loro maturazione. Contrariamente alle IgA per P1 e T20, le IgG verso gli stessi epitopi, che rappresentano domini MPER nella gp41, sono stati trovati in tutti i gruppi. È interessante notare che gli anticorpi anti-MPER hanno mostrato un andamento molto diverso nei LTNP e ECs, suggerendo che la loro generazione potrebbe dipendere dalla presenza in circolo del virus. Inoltre, la reattività di IgA e IgG a T20 e P1 è stata diversa in LTNP, HAART e EC, suggerendo che le risposte umorali vengono indirizzate in modo diverso a epitopi MPER nel corso dell'infezione. Come conferma, anticorpi anti-QARILAV, epitopo che si trova nel dominio HR1, appaiono in fasi successive di infezione, essendo assente in AI e massima nel gruppo AIDS. Questa evidenza potrebbe essere dovuta a particolari condizioni di esposizione agli antigeni, a causa della natura idrofobica del dominio HR1. Il primo caso può essere dovuto ad una dose molto bassa di antigene, o a virioni difettosi nel fornire questo stimolo; mentre nell'altro caso, le particelle del virus generato in ritardo nell'infezione, come l'AIDS, potrebbe essere strutturalmente diverse da quelle delle infezioni precoci, come di solito

accade per i ceppi di laboratorio e di isolati virali primari, che subiscono molti cicli di replicazione nell'infezione in vitro. Questa ipotesi potrebbe anche spiegare la mancanza di tali anticorpi nel gruppo AI.

Un altro punto chiave che emerge dalle analisi CART (alberi di classificazione e di regressione) è che entrambi i dati su IgG e IgA specifiche sono stati necessari per definire lo status dei pazienti sieropositivi (Fig.3, CART in alto).

In generale questi risultati hanno dimostrato l'elevata variabilità di IgA totali o gp41-specifiche tra tutti i gruppi di pazienti, e sostenuto il loro ruolo come biomarker; perciò le IgA contro epitopi specifici, hanno suscitato domande riguardo i meccanismi alla base della loro generazione, dal momento che sono state osservate solo in pazienti che controllano altamente la malattia. L'analisi degli alberi di classificazione ha confrontato tutti i parametri valutati nello studio e ha identificato le variabili chiave che meglio definiscono le "firme umorali" della maggior parte dei gruppi di pazienti, confermando che la capacità funzionale di neutralizzare il virus è correlata più accuratamente con la presenza di un specifico sottoinsieme di anticorpi, o con la loro proporzione sul totale delle immunoglobuline.

In conclusione, l'analisi statistica effettuata su varie misure umorali in pazienti HIV-positivi ha portato a definire interessanti differenze tra i gruppi, anche se i dati devono essere confermati in grandi coorti, lo studio ha chiarito alcuni end-point, come le immunoglobuline verso gp41 e la neutralizzazione di specifici ceppi virali.

Per ciò che riguarda il secondo studio del presente lavoro, l'analisi della popolazione africana materno-infantile ha offerto un'occasione unica per valutare la trasmissione di specifiche risposte umorali dalla madre al bambino e di valutare il loro potenziale di protezione, con l'obiettivo di progettare un vaccino specifico per questa popolazione. Le piccole dimensioni della coorte nel nostro studio (74 coppie madre-figlio, di cui 24 coppie HIV+/ESN, più 16 coppie di controllo HIV+/HIV+ e 34 HIV-/HIV-) potrebbe avere limitato l'uso di una più raffinata modellazione statistica; quindi, i risultati preliminari che sono stati riportati qui dovrebbero essere progettati e convalidati, quando possibile, in studi più numerosi.

I nostri risultati hanno mostrato che tutte le madri sieropositive e i loro neonati dispongono di alti titoli di IgG verso tre epitopi all'interno di gp41, cioè MPER, IDE e QARILAV (quest'ultimo nell'HR1). Le risposte anticorpali verso questi epitopi di gp41 sono state quantitativamente inferiori nelle madri NT ( $p < 0,01$ ) e nei loro bambini ESN ( $p < 0,005$ ) rispetto alle coppie madre-figlio sieropositive, mentre la percentuale di campioni reattivi contro i differenti epitopi di gp41 è molto simile per tutti i sottogruppi studiati (Fig. 4A-B). Questo risultato potrebbe essere spiegato con l'esistenza di diversi pool di anticorpi dotati di

effetti protettivi, neutri o addirittura rafforzanti l'infezione da HIV, ciascuno riconoscendo epitopi simili, contigui, come già segnalato per il dominio MPER (Alam S et al 2008; Beck Z et al 2008; Bomsel M et al 2011; Mascola J et al 1999).

Anticorpi gp41-specifici, derivanti dalla maggior parte delle madri e neonati, hanno neutralizzato il ceppo SF162; oltre il 50% dei campioni oggetto di studio hanno neutralizzato i due ceppi di sottotipo C, cioè DU172 e DU156 (Fig.5A-D). I risultati sull'attività neutralizzante dei bimbi ESN ci suggeriscono che l'epitopo del 2F5 potrebbe fornire un bersaglio di neutralizzazione più forte rispetto a quello del 4E10, dal momento che il peptide # 20 copre entrambi gli epitopi (2F5 e 4E10), mentre i peptidi # 12 solo l'epitopo 2F5. Questo, però, contrasta con precedenti studi che hanno mostrato il 2F5 inefficace nella neutralizzazione degli isolati di clade C, a causa della presenza di mutazioni nel dominio MPER di tali sottotipi, rispetto alle sequenze di clade B (Hessel AJ et al 2010; Hocini H et al 1997). Tuttavia, attività neutralizzanti dirette al dominio MPER potrebbero essere dovute ad anticorpi riconoscenti epitopi sovrapposti o diversi da ELDKWAS (cioè l'epitopo bersaglio del 2F5), quindi spiegando perché il 2F5 non neutralizza il C sottotipo (Hessel AJ et al 2009; Hocini H et al 1997; Mascola JR et al 2000). Un altro motivo per tale discrepanza potrebbe essere dovuto alla lunghezza superiore del peptide # 12-C utilizzato nello studio rispetto al # 12-B (otto aminoacidi sono stati aggiunti alla N-terminale) e questo fatto potrebbe spiegare perché il 2F5 non è riuscito a neutralizzare il clade C in altri studi (Hocini H et al 1997; Mascola JR et al 2000). E' infatti noto che la lunghezza di un dominio MPER sintetico è un fattore chiave per ottenere una conformazione più "naturale" degli epitopi bersaglio; questo fattore potrebbe essere cruciale per indurre anticorpi protettivi e potrebbe anche spiegare perché i peptidi # 3 e # 27 hanno mostrato un basso livello di neutralizzazione (Bomsel M et al 2011; Zwick MB et al 2001).

Nel nostro studio di MTCT (Mother-To-Child-Transmission), non solo sono stati riscontrati diversi tipi di anticorpi anti-MPER, ma sono stati osservati anche diversi tipi di anticorpi IDE-specifici. La definizione di dominio IDE deriva dalla diffusa presenza di anticorpi specifici in quasi tutti i soggetti con infezione da HIV (Clerici M et al 2002; Hemelaar J et al 2006). La maggior parte degli studi sul dominio IDE non è riuscita a trovare anticorpi neutralizzanti con questa specificità, però risposte neutralizzanti IDE-specifiche sono state a volte segnalate (Fouda GG et al 2011; Devito C et al 2000). Pertanto, il dominio IDE potrebbe indurre la generazione di pool anticorpali dotati di diverse funzioni effettrici, protettive, neutre o addirittura dannose per l'ospite. In questo studio, anticorpi protettivi IDE-specifici sono stati trasmessi dalla madre al neonato, ed sono stati significativamente associati alla

neutralizzazione di due e tre ceppi virali nelle madri TR e nei bambini ESN, rispettivamente (Tab.1).

Anticorpi specifici per l'epitopo QARILAV sono stati associati alla neutralizzazione significativa nelle madri NT, ma non in neonati ESN.

Perciò, l'analisi di questa coorte sostiene l'ipotesi che la gp41 è importante nel mitigare la trasmissione di HIV e i domini sulla molecola dovrebbero essere considerati nella progettazione di un vaccino. In questa coorte è stata valutata la presenza e la reattività di specifici anticorpi, una strategia che ha permesso di osservare diversi pool anticorpali (neutralizzanti o no) condividere la stessa specificità per un determinato dominio, ma forse dotati di diverse funzioni effettrici e impegnati a diffondersi in vari compartimenti, come ad esempio i distretti della mucosa.

Rimanendo nell'ambito dei correlati di protezione umorali nelle categorie di ESNs, nel terzo studio del progetto di tesi, i Fab-IgA monoclonali, risultanti da linfociti B della mucosa cervicale di donne ESN, hanno mostrato una potente attività neutralizzante non solo contro la trascitosi di HIV-1 nelle cellule epiteliali, ma anche contro l'infezione dei linfociti T CD4+ da HIV. L'accesso ai geni specifici individuali di IgA di ESN, fornisce la prova inequivocabile del loro verificarsi in vivo, a differenza di studi precedenti svolti solo su frazioni di IgA policlonali da fluidi biologici (Horton RE et al 2009; Hirbod T et al 2008).

In vitro, sia le IgG e che le IgA secretorie, da liquidi mucosali, hanno dimostrato di interferire con i primi eventi di ingresso di HIV-1, tramite la trascitosi attraverso le barriere epiteliali (Bomsel M et al 1998; Apodaca G et al 1991). L'attività anti-infettiva del gruppo di Fab specifici per le regioni nella gp41 suggerisce che altri epitopi sono importanti per l'interazione di HIV-1 con le cellule epiteliali. Tali epitopi potrebbero essere il sito di legame per la caveolina 1 (Hovanessian AG et al 2004) recentemente descritto essere bersaglio di IgG neutralizzanti l'infezione, o l'epitopo QARILAV all'interno della regione HR1 di gp41, bersaglio di IgA neutralizzanti (Clerici M et al 2002). In alternativa, nuovi epitopi conformazionali potrebbero essere smascherati in seguito all'interazione di gp41 con la superficie epiteliale che coinvolge le subunità, gp120 e gp41 di HIV (Apodaca G et al 1991).

Complessivamente, l'efficienza dei Fab nel proteggere da HIV gli epiteliali e le cellule CD4+ suggerisce che la bassa concentrazione di IgA, presente nelle secrezioni genitali, potrebbe essere protettiva anche in vivo.

Lo sviluppo della risposta immunitaria umorale è un processo in continua evoluzione caratterizzato dalla maturazione dell'affinità (Tonegawa S et al 1983). Individui ESN sono sottoposti ad una stimolazione antigenica ripetuta nei siti delle mucose a causa di ripetuti

rapporti non protetti (2-6 eventi di rapporti non protetti a settimana per le coppie sierodiscordanti, e 1-15 rapporti sessuali non protetti al giorno per le prostitute) e quindi frequente e ripetuta esposizione ad HIV. Pertanto, ci si potrebbe aspettare di trovare anticorpi con maturata affinità nei siti della mucosa di questi individui a causa di una selezione antigene-guidata, in un periodo di mesi o addirittura anni. Questo studio ha quindi dimostrato che tali anticorpi, evoluti lentamente e naturalmente durante le esposizioni multiple ad HIV, attraverso la maturazione dell'affinità all'antigene e le mutazioni somatiche guidate sempre dall'antigene, potrebbero essere "i migliori" per neutralizzare diversi ceppi HIV-1. Questo studio suggerisce inoltre che l'uso di vaccini mucosali, contenenti un piccolo numero di peptidi chiave corrispondenti agli epitopi riconosciuti dagli anticorpi IgA di individui ESN, potrebbe essere un ulteriore modo per indurre a livello locale una concentrazione sufficiente di anticorpi neutralizzanti, in grado di evitare l'infezione al punto di entrata e prevenire l'espansione e la diffusione del virus nelle regioni distali.

A questo punto, infatti, l'insieme di tutti i dati derivanti dallo studio delle risposte anticorpali HIV-specifiche nelle popolazioni esposte non-infette e controllanti l'infezione, ha potuto indirizzare la progettazione di immunogeni, come possibili strategie vaccinali.

A tal proposito, il quarto studio della tesi ha avuto proprio come obiettivo principale quello di ingegnerizzare *HIV-1 Pr55gag Virus-Like Particles*, esprimenti sulla loro superficie proteine modificate dell'envelope, gp140 o gp41, volte a indurre anticorpi neutralizzanti.

L'immunogenicità delle diverse HIV-VLP generate nel presente studio è stata valutata in topi BALB/c tramite somministrazioni intra-peritoneali in assenza di adiuvanti. I sieri di ogni prelievo sono stati valutati in ELISA e hanno mostrato un effetto aumentante con le successive somministrazioni dell'antigene, indicando che tutte le HIV-VLPs, valutate nello studio sono fortemente immunogeniche anche in assenza di adiuvante. Considerando il valore positivo della diluizione finale nel test ELISA, la OD<sub>450</sub> è stata molto più alta per gli anti-gp140 che per gli anti-gp41 (0,9 vs 0,3), a conferma della bassa immunogenicità della regione MPER di gp41, precedentemente riportata da altri (Kim M et al 2007).

Tutti gli antisieri indotti dalle singole HIV-VLPs sono stati testati in modo indipendente, nel saggio di neutralizzazione su TZM.bl, Un'attività neutralizzante, limitata e deludente, è stata osservata quando sono stati usati sieri da animali immunizzati con VLPs individuali (IC<sub>50</sub> 1:10), confermando i bassi livelli di attività neutralizzante provocati dalle VLP esprimenti Env di HIV in questo saggio di neutralizzazione (Crooks ET et al 2007; Kim M et al 2007) . Una delle possibili spiegazioni potrebbe essere una bassa affinità degli anticorpi di topi per epitopi rilevanti per la neutralizzazione. È interessante notare che le combinazioni di antisieri

indotti da VLPs diverse hanno mostrato un effetto sinergico nelle attività di neutralizzazione, soprattutto quando l'antisiero indotto dalla gp140<sub>SOSIP</sub>-VLP è stato combinato con quello stimolato da gp41ecto-VLP. Ciò potrebbe suggerire che le due VLP singole hanno indotto risposte immunitarie complementari, ampliando gli epitopi bersaglio per l'attività di neutralizzazione. Il limitato miglioramento nell'attività di neutralizzazione osservato con le altre combinazioni di sieri, suggerisce sia la mancanza di epitopi rilevanti negli altri antigeni-gp41 espressi sulle VLPs o la loro inadeguata presentazione conformazionale alle cellule B.

Questo studio, insieme al quinto e ultimo lavoro di tesi, ha comunque dimostrato che le VLPs rappresentano un valido sistema per presentare ali antigeni ospiti nella loro conformazione tridimensionale, più verosimile e vicina alla realtà.

Particelle ottenute da virus batterici sono altamente immunogeniche ma non replicano in un ospite non-naturale e non-permissivo come i vertebrati (Rohn TA et al 2011). In particolare, AP205 è un fago recentemente isolato, idoneo a fornire VLPs versatili che possono indurre una risposta immunitaria pronta e forte nei mammiferi (Spohn G et al 2010, Tissot AC et al 2010). Una delle caratteristiche chiave delle VLPs AP205 è l'alta densità di antigeni vaccinali che ogni particella è in grado di ospitare: superiore è la densità di antigeni, maggiore è l'attivazione delle cellule B che sarà raggiunta, anche in assenza di adiuvante.

Quando le VLPs sono state somministrate come immunogeni, titoli anticorpali elevati sono stati osservati già dopo tre dosi, ulteriormente rafforzata dopo la somministrazione della quinta. Tra gli immunogeni HR1-specifici, AP205#20 ha mostrato i più alti titoli, suggerendo che la sua coda C-terminale favorisce una conformazione adatta e di esposizione, e una maggiore immunogenicità delle VLPs, rispetto agli altri peptidi (Fig.18A). Inoltre, l'elevata densità dei peptidi visualizzati su queste VLP avrebbe dovuto promuovere una stimolazione intensa delle APC e/o specifiche risposte delle cellule B. Questa ipotesi è ulteriormente rafforzata dall'efficace neutralizzazione mostrata dagli antisieri AP205-3-20, che hanno mostrato più elevati titoli anticorpali tra gli antigeni HR1 e sono stati in grado di neutralizzare tre dei quattro ceppi virali testati nel saggio (Fig.19A).

Come dimostrato da studi precedenti (Bomsel M et al 2011), gli antisieri AP205-P8 hanno raggiunto titoli anticorpali superiori a quelli AP205-P1, all'ultima vaccinazione (Fig. 18B-C). L'efficacia maggiore del P8 nella vaccinazione (o come subunità vaccinale), evidente anche nei test di neutralizzazione (Fig.19A), potrebbe essere dovuta alla sua maggiore lunghezza rispetto al P1, che ha permesso al peptide P8 di adottare una conformazione 3D più vicina a quella originale nell'MPER, in grado di visualizzare uno o più epitopi chiave per la neutralizzazione di HIV.



La somministrazione intranasale delle VLPs è stata un po' più efficace nell'indurre anticorpi in grado di indirizzare un'ADCC (Fig.20A-C) piuttosto che attività neutralizzante (Fig.19A); inoltre, l'antigene P8 è risultato più efficace, rispetto a P1, nell'indurre anticorpi in grado di attivare l'eliminazione specifica di cellule bersaglio. Questo potrebbe essere attribuito all'induzione di *anticorpi 2F5-like*, in quanto si sa che il 2F5 è in grado di indurre attività ADCC (Tudor D et al 2011). Il presente studio suggerisce che i titoli anticorpali giocano un ruolo minore nello stimolare l'attività ADCC e indica che, come per gli epitopi neutralizzanti, anche gli epitopi ADCC sono unici e sono contenuti nella regione P8, quindi le strutture delle regioni studiate potrebbero essere rilevanti per tale attività, e questo potrebbe spiegare perché gli anticorpi verso P8 sono più efficaci di quelli diretti al P1.

## 6. CONCLUSIONI

Lo studio delle coorti che naturalmente presentano meccanismi umorali protettivi contro l'infezione da HIV ha portato a considerare la gp41 come uno dei target virali principali contro cui si sviluppa una forte ed efficace risposta umorale protettiva (neutralizzante o ADCC dipendente). Questo è servito per indirizzare la progettazione e il disegno di immunogeni chimerici, basati su VLPs, esprimenti diversi peptidi e regioni della gp41 di HIV-1, i quali potrebbero rappresentare un'importante strategia vaccinale contro il virus. Un altro punto chiave del presente lavoro è stato quello di aver individuato e dimostrato un altro meccanismo fondamentale grazie al quale gli anticorpi, presenti in queste popolazioni o indotti con le immunizzazioni, acquisiscono la capacità di bloccare l'infezione di HIV: questo meccanismo è appunto l'attività ADCC, cioè la capacità di tali anticorpi di indurre l'uccisione delle cellule infette da parte di differenti cellule effettrici.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- Alam, S. M., R. M. Scarce, R. J. Parks, K. Plonk, S. G. Plonk, L. L. Sutherland, M. K. Gorny, S. Zolla-Pazner, S. Vanleeuwen, M. A. Moody, S. M. Xia, D. C. Montefiori, G.D. Tomaras, K. J. Weinhold, S. A. Karim, C. B. Hicks, H. X. Liao, J. Robinson, G. M. Shaw, and B. F. Haynes.** 2008. Human immunodeficiency virus type 1 gp41 antibodies that mask membrane proximal region epitopes: antibody binding kinetics, induction, and potential for regulation in acute infection. *J Virol* 82:115-25.
- Alexaki, A., Liu Y., Wigdahl B.** 2008. Cellular reservoirs of HIV-1 and their role in viral persistence. *Curr. HIV Res.* 6: 388-400.
- Alexander L, Aquino-DeJesus MJ, Chan M, Andiman WA** Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication by a two-amino-acid insertion in HIV-1 Vif from a nonprogressing mother and child. *J Virol.* 2002 Oct;76(20):10533-9.
- Alfsen, A. & Bomsel, M.** HIV-1 gp41 envelope residues 650–685 exposed on native virus act as a lectin to bind epithelial cell galactosyl ceramide. *J. Biol. Chem.* 277, 25649–25659 (2002).
- Alfsen, A., Iniguez, P., Bouguyon, E. & Bomsel, M.** Secretory IgA specific for a conserved epitope on gp41 envelope glycoprotein inhibits epithelial transcytosis of HIV-1. *J. Immunol.* 166, 6257–6265 (2001).
- Anzala AO, Ball TB, Rostron T, O'Brien SJ, Plummer FA, Rowland-Jones SL.** CCR2-64I allele and genotype association with delayed AIDS progression in African women. University of Nairobi Collaboration for HIV Research. *Lancet.* 1998 May 30;351(9116):1632-3.
- Apodaca, G., Bomsel, M., Arden, J., Breitfeld, P.P., Tang, K. & Mostov, K.E.** The polymeric immunoglobulin receptor. A model protein to study transcytosis. *J. Clin. Invest.* 87, 1877–1882 (1991).
- Bailey JR, Williams TM, Siliciano RF, Blankson JN.** Maintenance of viral suppression in HIV-1-infected HLA-B\*57+ elite suppressors despite CTL escape mutations. *J Exp Med.* 2006 May 15;203(5):1357-69. Epub 2006 May 8.
- Bangham, C.R.** 2009. CTL quality and the control of human retroviral infections. *Eur. J. Immunol.* 39: 1700-1712.
- Barassi C, Lazzarin A, Lopalco L.** CCR5-specific mucosal IgA in saliva and genital fluids of HIV-exposed seronegative subjects. *Blood.* 2004 Oct 1;104(7):2205-6.

- Barassi C**, Lazzarin A, Lopalco L. CCR5-specific mucosal IgA in saliva and genital fluids of HIV-exposed seronegative subjects. *Blood* 104(7), 2205–2206 (2004).
- Barassi, C.**; Soprana, E.; Pastori, C.; Longhi, R.; Buratti, E.; Lillo, F.; Marenzi, C.; Lazzarin, A.; Siccardi, A.G.; Lopalco, L. Induction of murine mucosal CCR5-reactive antibodies as an anti-human immunodeficiency virus strategy. *J. Virol.* 2005, 79, 6848-6858.
- Barbas, C.F. III.**, Kang, A.S., Lerner, R.A. & Benkovic, S.J. Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88, 7978–7982 (1991).
- Barker E**, Barnett SW, Stamatatos L, and Levy JA. 1995. The human immunodeficiency viruses, p.1-96. In J. A. Levy (ed.), *The Retroviridae*, vol.4. Plenum Press, New York, N.Y.
- Barouch DH**, Korber B. HIV-1 Vaccine development after STEP. *Annu. Rev. Med.* 61, 153–167 (2010).
- Barouch DH**, Korber B. HIV-1 vaccine development after STEP. *Annu. Rev. Med.* 61, 153–167 (2010).
- Barouch DH**, O'Brien KL, Simmons NL *et al.* Mosaic HIV-1 vaccines expand the breadth and depth of cellular immune responses in rhesus monkeys. *Nat. Med.* 16(3), 319–323 (2010).
- Baum LL**. Role of humoral immunity in host defense against HIV. *Curr HIV/AIDS Rep.* 2010 Feb; 7(1):11-8.
- Beck, Z.**, Z. Prohaszka, and G. Fust. 2008. Traitors of the immune system—enhancing antibodies in HIV infection: their possible implication in HIV vaccine development. *Vaccine* 26:3078-85.
- Bello G**, Velasco-de-Castro CA, Bongertz V, Rodrigues CA, Giacoia-Gripp CB, Pilotto JH, Grinsztejn B, Veloso VG, Morgado MG. Immune activation and antibody responses in non-progressing elite controller individuals infected with HIV-1. *J Med Virol.* 2009 Oct; 81(10):1681-90.
- Beretta A**, Furci L, Burastero S, Cosma A, Dinelli ME, Lopalco L, DeSantis C, Tambussi G, Carrow E, Sabbatani S, Clerici M, Lazzarin A, Siccardi AG. HIV-1-specific immunity in persistently seronegative individuals at high risk for HIV infection. *Immunol Lett.* 1996 Jun; 51(1-2):39-43.
- Betts MR**, Krowka JF, Kepler TB, Davidian M, Christopherson C, Kwok S, Louie L, Eron J, Sheppard H, Frelinger JA. Human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocyte activity is inversely correlated with HIV type 1 viral load in HIV type 1-infected long-term survivors. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1999 Sep 1; 15(13):1219-28.

**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. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells. *Blood*. 2006 Jun 15;107(12):4781-9.

**Beyrer C**, Artenstein AW, Ruggao S, Stephens H, VanCott TC, Robb ML, Rinkaew M, Birx DL, Khamboonruang C, Zimmerman PA, Nelson KE, Natpratan C. Epidemiologic and biologic characterization of a cohort of human immunodeficiency virus type 1 highly exposed, persistently seronegative female sex workers in northern Thailand. Chiang Mai HEPS Working Group. *J Infect Dis*. 1999 Jan;179(1):59-67.

**Biasin M**, Piacentini L, Lo Caputo S, Kanari Y, Magri G, Trabattoni D, Naddeo V, Lopalco L, Clivio A, Cesana E, Fasano F, Bergamaschi C, Mazzotta F, Miyazawa M, Clerici M. Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G: a possible role in the resistance to HIV of HIV-exposed seronegative individuals. *J Infect Dis*. 2007 Apr 1;195(7):960-4.

**Blankson JN**, Bailey JR, Thayil S, Yang HC, Lassen K, Lai J, Gandhi SK, Siliciano JD, Williams TM, Siliciano RF. Isolation and characterization of replication-competent human immunodeficiency virus type 1 from a subset of elite suppressors. *J Virol*. 2007 Mar;81(5):2508-18. Epub 2006 Dec 6.

**Boaz MJ**, Waters A, Murad S, Easterbrook PJ, Vyakarnam A. Presence of HIV-1 Gag-specific IFN-gamma+IL-2+ and CD28+IL-2+ CD4 T cell responses is associated with nonprogression in HIV-1 infection. *J Immunol*. 2002 Dec 1;169(11):6376-85.

**Bochud PY**, Hersberger M, Taffé P, Bochud M, Stein CM, Rodrigues SD, Calandra T, Francioli P, Telenti A, Speck RF, Aderem A; Swiss HIV Cohort Study. Polymorphisms in Toll-like receptor 9 influence the clinical course of HIV-1 infection. *AIDS*. 2007 Feb 19;21(4):441-6.

**Bodman-Smith MD**, Williams I, Johnstone R, Boylston A, Lydyard PM, Zumla A. T cell receptor usage in patients with non-progressing HIV infection. *Clin Exp Immunol*. 2002 Oct;130(1):115-20.

**Bogers, WM**, Bergmeier, LA, Ma, J, Oostermeijer, H, Wang, Y, Kelly, CG, Ten Haaf, P, Singh, M, Heeney, JL and Lehner, T. 2004. A novel HIV-CCR5 receptor vaccine strategy in the control of mucosal SIV/HIV infection. *Aids*;18:25-36.

**Bonsel M**, Tudor D, Drillet AS, Alfsen A, Ganor Y, Roger MG, Mouz N, Amacker M, Chalifour A, Diomede L, Devillier G, Cong Z, Wei Q, Gao H, Qin C, Yang GB, Zurbriggen R, Lopalco L, Fleury S. Immunization with HIV-1 gp41 subunit virosomes induces mucosal

antibodies protecting nonhuman primates against vaginal SHIV challenges. *Immunity*. 2011 Feb 25;34(2):269-80.

**Bomsel, M.** *et al.* Intracellular neutralization of HIV transcytosis across tight epithelial barriers by anti-HIV envelope protein dIgA or IgM. *Immunity* 9, 277–287 (1998).

**Bomsel, M.** Transcytosis of infectious human immunodeficiency virus across a tight human epithelial cell line barrier. *Nat. Med.* 3, 42–47 (1997).

**Bouhlal H,** Hocini H, Quillent-Grégoire C, Donkova V, Rose S, Amara A, Longhi R, Haeffner-Cavaillon N, Beretta A, Kaveri SV, Kazatchkine MD. Antibodies to C-C chemokine receptor 5 in normal human IgG block infection of macrophages and lymphocytes with primary R5-tropic strains of HIV-1. *J Immunol*. 2001 Jun 15;166(12):7606-11.

**Bouhlal H,** Latry V, Requena M, Aubry S, Kaveri SV, Kazatchkine MD, Belec L, Hocini H. Natural antibodies to CCR5 from breast milk block infection of macrophages and dendritic cells with primary R5-tropic HIV-1. *J Immunol*. 2005 Jun 1;174(11):7202-9.

**Bouschbacher, M.** *et al.* Early events in HIV transmission through a human vaginal mucosa. *AIDS* 22, 1257–1266 (2008).

**Braibant M,** Agut H, Rouzioux C, Costagliola D, Autran B, Barin F. Characteristics of the env genes of HIV type 1 quasispecies in long-term nonprogressors with broadly neutralizing antibodies. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2008 Mar 1;47(3):274-84.

**Broder CC,** Berger E. 1995. Fusogenic selectivity of the envelope glycoprotein is a major determinant of human immunodeficiency virus type 1 tropism for CD4+ cell lines vs. primary macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92: 9004-9008.

**Brombin C.,** L. Diomede, D. Tudor, ES Drillet, C. Pastori, E. Poli, A. Riva, C. Uberti-Foppa, M. Galli, C. Di Serio, M. Bomsel, L Lopalco HUMORAL IMMUNE RESPONSES SIGNATURE IN HIV EXPOSURE/INFECTION (submitted).

**Brooks, J.T.,** Kaplan J.E., Holmes K.K., Benson C., Pau A., Masur H. 2009. HIV-associated opportunistic infections-going, going, but not gone: the continued need for prevention and treatment guidelines. *Clin. Infect. Dis.* 48: 609-611.

**Buchacz K,** Parekh BS, Padian NS, van der Straten A, Phillips S, Jonte J, Holmberg SD. HIV-specific IgG in cervicovaginal secretions of exposed HIV-uninfected female sexual partners of HIV-infected men. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2001 Dec 10;17(18):1689-93.

**Buonaguro L.,** F.M. Buonaguro, M.L. Tornesello, D. Mantas, E. Beth-Giraldo and R. Wagner, *et al.* High efficient production of Pr55gag Virus-like Particles expressing multiple HIV-1 epitopes, including a gp120 protein derived from an Ugandan HIV-1 isolate of subtype A. *Antiviral Res*, 49 (2001), pp. 35–47.

**Burastero SE**, Gaffi D, Lopalco L, Tambussi G, Borgonovo B, De Santis C, Abecasis C, Robbioni P, Gasparri A, Lazzarin A, Celada F, Siccardi AG, Beretta A. Autoantibodies to CD4 in HIV type 1-exposed seronegative individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1996 Mar 1;12(4):273-80.

**Buratti, E**, McLain, L, Tisminetzky, S, Cleveland, SM, Dimmock, NJ and Baralle, FE. 1998. The neutralizing antibody response against a conserved region of human immunodeficiency virus type 1 gp41 (amino acid residues 731-752) is uniquely directed against a conformational epitope. *J Gen Virol*;79 ( Pt 11):2709-16.

**Burton DR**. Antibodies, viruses and vaccines. *Nat Rev Immunol*. 2002 Sep;2(9):706-13.

**Busch, M.P.**, Satten G.A. 1997. Time course of viremia and antibody seroconversion following human immunodeficiency virus exposure. *Am. J. Med.*, 102: 117-124.

**Buttò, S.**, Raimondo M., Fanales-Belasio E., Suligoi B. 2010. Suggested strategies for the laborator diagnosis of HIV infection in Italy. *Ann. Ist. Super. San.* 46: 24-33.

**Calugi G**, Montella F, Favalli C, Benedetto A. Entire genome of a strain of human immunodeficiency virus type 1 with a deletion of nef that was recovered 20 years after primary infection: large pool of proviruses with deletions of env. *J Virol*. 2006 Dec;80(23):11892-6. Epub 2006 Sep 20.

**Castelletti E**, Lo Caputo S, Kuhn L, Borelli M, Gajardo J, Sinkala M, Trabattoni D, Kankasa C, Lauri E, Clivio A, Piacentini L, Bray DH, Aldrovandi GM, Thea DM, Veas F, Nebuloni M, Mazzotta F, Clerici M. The mucosae-associated epithelial chemokine (MEC/CCL28) modulates immunity in HIV infection. *PLoS One*. 2007 Oct 3;2(10):e969.

**Cecilia D**, Kleeberger C, Muñoz A, Giorgi JV, Zolla-Pazner S. A longitudinal study of neutralizing antibodies and disease progression in HIV-1-infected subjects. *J Infect Dis*. 1999 Jun;179(6):1365-74.

**Chackerian, B**, Briglio, L, Albert, PS, Lowy, DR and Schiller, JT. 2004. Induction of autoantibodies to CCR5 in macaques and subsequent effects upon challenge with an R5-tropic simian/human immunodeficiency virus. *J Virol*;78:4037-47.

**Chackerian, B**, Lowy, DR and Schiller, JT. 1999. Induction of autoantibodies to mouse CCR5 with recombinant papillomavirus particles. *Proc Natl Acad Sci U S A*;96:2373-8.

**Chain, BM**, Noursadeghi, M, Gardener, M, Tsang, J and Wright, E. 2008. HIV blocking antibodies following immunisation with chimaeric peptides coding a short N-terminal sequence of the CCR5 receptor. *Vaccine*;26:5752-9.

**Chung AW**, Rollman E, Center RJ, et al. Rapid degranulation of NK cells following activation by HIV-specific antibodies. *J Immunol*. 2009;182:1202–1210.

**Chung, A.**, Rollman E., Johansson S., Kent S.J., Stratov I. 2008. The utility of ADCC responses in HIV infection. *Curr. HIV Res.*, 6: 515-519.

**Clerici M**, Barassi C, Devito C, Pastori C, Piconi S, Trabattoni D, Longhi R, Hinkula J, Broliden K, Lopalco L. Serum IgA of HIV-exposed uninfected individuals inhibit HIV through recognition of a region within the alpha-helix of gp41. *AIDS*. 2002 Sep 6;16(13):1731-41.

**Clerici M**, Butto S, Lukwiya M, Saresella M, Declich S, Trabattoni D, Pastori C, Piconi S, Fracasso C, Fabiani M, Ferrante P, Rizzardini G, Lopalco L. Immune activation in africa is environmentally-driven and is associated with upregulation of CCR5. Italian-Ugandan AIDS Project. *AIDS*. 2000 Sep 29;14(14):2083-92.

**Coakley E**, Petropoulos C.J., Whitcomb J.M. 2005. Assessing chemokine co-receptor usage in HIV. *Cur. Opin. Infect. Dis.*,18: 9-15.

**Coutant J**, Yu H, Clément MJ *et al.* Both lipid environment and pH are critical for determining physiological solution structure of 3-D-conserved epitopes of the HIV-1 gp41-MPER peptide P1. *FASEB J.*22(12),4338–4351 (2008).

**Crooks E.T.**, P.L. Moore, M. Franti, C.S. Cayanan, P. Zhu and P. Jiang, *et al.* A comparative immunogenicity study of HIV-1 virus-like particles bearing various forms of envelope proteins, particles bearing no envelope and soluble monomeric gp120. *Virology*, 366 September (2) (2007), pp. 245–262.

**De Bruin, R.**, Spelt, K., Mol, J., Koes, R. & Quattrocchio, F. Selection of high-affinity phage antibodies from phage display libraries. *Nat. Biotechnol.* 17, 397–399 (1999).

**De Santis C**, Robbioni P, Longhi R, Lopalco L, Siccardi AG, Beretta A, Roberts NJ Jr. Cross-reactive response to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) gp120 and HLA class I heavy chains induced by receipt of HIV-1-derived envelope vaccines. *J Infect Dis.* 1993 Dec;168(6):1396-403.

**Deacon NJ**, Tsykin A, Solomon A, Smith K, Ludford-Menting M, Hooker DJ, McPhee DA, Greenway AL, Ellett A, Chatfield C, Lawson VA, Crowe S, Maerz A, Sonza S, Learmont J, Sullivan JS, Cunningham A, Dwyer D, Dowton D, Mills J. Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science*. 1995 Nov 10;270(5238):988-91.

**Dean M**, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, Goedert JJ, Buchbinder SP, Vittinghoff E, Gomperts E, Donfield S, Vlahov D, Kaslow R, Saah A, Rinaldo C, Detels R, O'Brien SJ. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development



Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science*. 1996 Sep 27;273(5283):1856-62.

**Deeks SG**, Schweighardt B, Wrin T, Galovich J, Hoh R, Sinclair E, Hunt P, McCune JM, Martin JN, Petropoulos CJ, Hecht FM. Neutralizing antibody responses against autologous and heterologous viruses in acute versus chronic human immunodeficiency virus (HIV) infection: evidence for a constraint on the ability of HIV to completely evade neutralizing antibody responses. *J Virol*. 2006 Jun;80(12):6155-64.

**Devito C**, Broliden K, Kaul R, Svensson L, Johansen K, Kiama P, Kimani J, Lopalco L, Piconi S, Bwayo JJ, Plummer F, Clerici M, Hinkula J. Mucosal and plasma IgA from HIV-1-exposed uninfected individuals inhibit HIV-1 transcytosis across human epithelial cells. *J Immunol*. 2000 Nov 1;165(9):5170-6.

**Devito C**, Hinkula J, Kaul R, Kimani J, Kiama P, Lopalco L, Barass C, Piconi S, Trabattoni D, Bwayo JJ, Plummer F, Clerici M, Broliden K. Cross-clade HIV-1-specific neutralizing IgA in mucosal and systemic compartments of HIV-1-exposed, persistently seronegative subjects. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2002 Aug 1;30(4):413-20.

**Devito C**, Hinkula J, Kaul R, Lopalco L, Bwayo JJ, Plummer F, Clerici M, Broliden K. Mucosal and plasma IgA from HIV-exposed seronegative individuals neutralize a primary HIV-1 isolate. *AIDS*. 2000 Sep 8;14(13):1917-20.

**Devito C**, Zuber B, Schroder U, Benthin R, Okuda K, Broliden K, Wahren B and Hinkula J. 2004. Intranasal HIV-1-gp160-DNA/gp41 peptide prime-boost immunization regimen in mice results in long-term HIV-1 neutralizing humoral mucosal and systemic immunity. *J Immunol*;173:7078-89.

**Diomedea L.**, S. Nyoka, L. Scotti, D. Savarino, A. Zambon, G. Sherman, M., Sarzotti-Kelsoe, C. Gray, L. Lopalco. Passively transmitted gp41 antibodies in babies born from subtype C HIV-1 seropositive women: correlation between fine specificity and Protection (in press).

**Doria-Rose NA**, Klein RM, Daniels MG, O'Dell S, Nason M, Lapedes A, Bhattacharya T, Migueles SA, Wyatt RT, Korber BT, Mascola JR, Connors M. Breadth of human immunodeficiency virus-specific neutralizing activity in sera: clustering analysis and association with clinical variables. *J Virol*. 2010 Feb;84(3):1631-6.

**Dorrell L**, Hessel AJ, Wang M, Whittle H, Sabally S, Rowland-Jones S, Burton DR, Parren PW. Absence of specific mucosal antibody responses in HIV-exposed uninfected sex workers from the Gambia. *AIDS*. 2000 Jun 16;14(9):1117-22.

**Dorsett B**, Cronin W, Chuma V, Ioachim HL. Anti-lymphocyte antibodies in patients with the acquired immune deficiency syndrome. *Am J Med*. 1985 Apr;78(4):621-6.

**Elkins MK**, Vittinghoff E, Baranzini SE, Hecht FM, Sriram U, Busch MP, Levy JA, Oksenberg JR; San Francisco Primary Infection Group. Longitudinal analysis of B cell repertoire and antibody gene rearrangements during early HIV infection. *Genes Immun.* 2005 Feb;6(1):66-9.

**Eugen-Olsen J**, Iversen AK, Garred P, Koppelhus U, Pedersen C, Benfield TL, Sorensen AM, Katzenstein T, Dickmeiss E, Gerstoft J, Skinhøj P, Svejgaard A, Nielsen JO, Hofmann B. Heterozygosity for a deletion in the CKR-5 gene leads to prolonged AIDS-free survival and slower CD4 T-cell decline in a cohort of HIV-seropositive individuals. *AIDS.* 1997 Mar;11(3):305-10.

**Fanales-Belasio**, E., Raimondo M., Suligoì B., and Buttò S. 2010. Hiv virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Ann. Ist. Sup. Sanità*, 1: 5-14.

**Farquhar C**, **VanCott T**, Bosire R, Bermudez C, Mbori-Ngacha D, Lohman-Payne B, Nduati R, Otieno P, John-Stewart G. Salivary human immunodeficiency virus (HIV)-1-specific immunoglobulin A in HIV-1-exposed infants in Kenya. *Clin Exp Immunol.* 2008 Jul;153(1):37-43.

**Farrow MA**, Somasundaran M, Zhang C, Gabuzda D, Sullivan JL, Greenough TC. Nuclear localization of HIV type 1 Vif isolated from a long-term asymptomatic individual and potential role in virus attenuation. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2005 Jun;21(6):565-74.

**Fauci AS**, Mavilio D, Kottlilil S. NK cells in HIV infection: paradigm for protection or targets for ambush. *Nat Rev Immunol.* 2005 Nov;5(11):835-43.

**Fauci AS**, **Pantaleo G**, Stanley S, Weissman D. Immunopathogenic mechanisms of HIV infection. *Ann Intern Med.* 1996 Apr 1;124(7):654-63.

**Fenyö EM**, Putkonen P. Broad cross-neutralizing activity in serum is associated with slow progression and low risk of transmission in primate lentivirus infections. *Immunol Lett.* 1996 Jun;51(1-2):95-9.

**Ferrari G**, Pollara J, Kozink D, Harms T, Drinker M, Freil S, Moody MA, Alam SM, Tomaras GD, Ochsenbauer C, Kappes JC, Shaw GM, Hoxie JA, Robinson JE, Haynes BF. An HIV-1 gp120 envelope human monoclonal antibody that recognizes a C1 conformational epitope mediates potent antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) activity and defines a common ADCC epitope in human HIV-1 serum. *J Virol.* 2011 Jul;85(14):7029-36. Epub 2011 May 4.

**Ferre AL**, Lemongello D, Hunt PW, Morris MM, Garcia JC, Pollard RB, Yee HF Jr, Martin JN, Deeks SG, Shacklett BL. Immunodominant HIV-specific CD8+ T-cell responses are

common to blood and gastrointestinal mucosa, and Gag-specific responses dominate in rectal mucosa of HIV controllers. *J Virol.* 2010 Oct;84(19):10354-65.

**Fiedler, M. & Skerra, A.** Use of thiophilic adsorption chromatography for the one-step purification of a bacterially produced antibody F(ab) fragment without the need for an affinity tag. *Protein Expr. Purif.* 17, 421–427 (1999).

**Ford, E.S., Puroton C.E., Sereti I.** 2009. Immunopathogenesis of asymptomatic chronic HIV infection: the calm before the storm. *Curr. Opin. HIV AIDS*, 4: 206-214.

**Fouda, G. G.,** N. L. Yates, J. Pollara, X. Shen, G. R. Overman, T. Mahlokozera, A. B. Wilks, H. H. Kang, J. F. Salazar-Gonzalez, M. G. Salazar, L. Kalilani, S. R. Meshnick, B. H. Hahn, G. M. Shaw, R. V. Lovingood, T. N. Denny, B. Haynes, N. L. Letvin, G. Ferrari, D. C. Montefiori, G. D. Tomaras, and S. R. Permar. 2011. HIV-Specific Functional Antibody Responses in Breast Milk Mirror Those in Plasma and Are Primarily Mediated by IgG Antibodies. *J Virol* 85:9555-9567.

**Furci L,** Scarlatti G, Burastero S, Tambussi G, Colognesi C, Quillent C, Longhi R, Loverro P, Borgonovo B, Gaffi D, Carrow E, Malnati M, Lusso P, Siccardi AG, Lazzarin A, Beretta A. Antigen-driven C-C chemokine-mediated HIV-1 suppression by CD4(+) T cells from exposed uninfected individuals expressing the wild-type CCR-5 allele. *J Exp Med.* 1997 Aug 4;186(3):455-60.

**Geldmacher C,** Currier JR, Herrmann E, Haule A, Kuta E, McCutchan F, Njovu L, Geis S, Hoffmann O, Maboko L, Williamson C, Birx D, Meyerhans A, Cox J, Hoelscher M. CD8 T-cell recognition of multiple epitopes within specific Gag regions is associated with maintenance of a low steady-state viremia in human immunodeficiency virus type 1-seropositive patients. *J Virol.* 2007 Mar;81(5):2440-8. Epub 2006 Dec 20.

**Ghys PD,** Bélec L, Diallo MO, Ettiègne-Traoré V, Becquart P, Maurice C, Nkengasong JN, Coulibaly IM, Greenberg AE, Laga M, Wiktor SZ. Cervicovaginal anti-HIV antibodies in HIV-seronegative female sex workers in Abidjan, Côte d'Ivoire. *AIDS.* 2000 Nov 10;14(16):2603-8.

**Greene E,** Pinto LA, Landay AL, Kessler HA, Anderson SA, Dolan MJ, Shearer GM: Anti-CCR5 antibodies in sera of HIV-positive individuals. *Hum Immunol.* 2001 Feb;62(2):143-5.

**Gupta SB,** Jacobson LP, Margolick JB, Rinaldo CR, Phair JP, Jamieson BD, Mehrotra DV, Robertson MN, Straus WL. Estimating the benefit of an HIV-1 vaccine that reduces viral load set point. *J Infect Dis.* 2007 Feb 15;195(4):546-50. Epub 2007 Jan 5.

**Gupta, K.K.** 1993. Acute immunosuppression with HIV seroconversion. *N. Engl. J. Med.* 328: 288-289.

**Hasselrot K**, Bratt G, Duvefelt K, Hirbod T, Sandström E, Broliden K. HIV-1 exposed uninfected men who have sex with men have increased levels of salivary CC-chemokines associated with sexual behavior. *AIDS*. 2010 Jun 19;24(10):1569-75.

**Hatano H**, Delwart EL, Norris PJ, Lee TH, Dunn-Williams J, Hunt PW, Hoh R, Stramer SL, Linnen JM, McCune JM, Martin JN, Busch MP, Deeks SG. Evidence for persistent low-level viremia in individuals who control human immunodeficiency virus in the absence of antiretroviral therapy. *J Virol*. 2009 Jan;83(1):329-35. Epub 2008 Oct 22.

**He W**, Neil S, Kulkarni H, Wright E, Agan BK, Marconi VC, Dolan MJ, Weiss RA, Ahuja SK. Duffy antigen receptor for chemokines mediates trans-infection of HIV-1 from red blood cells to target cells and affects HIV-AIDS susceptibility. *Cell Host Microbe*. 2008 Jul 17;4(1):52-62.

**Hemelaar, J.**, E. Gouws, P. D. Ghys, and S. Osmanov. 2006. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. *AIDS*, 20: W13-W23.

**Hemelaar, J.**, E. Gouws, P. D. Ghys, and S. Osmanov. 2006. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. *Aids* 20:W13-23.

**Hendel H**, Hénon N, Lebuane H, Lachgar A, Poncelet H, Caillat-Zucman S, Winkler CA, Smith MW, Kenefic L, O'Brien S, Lu W, Andrieu JM, Zagury D, Schächter F, Rappaport J, Zagury JF. Distinctive effects of CCR5, CCR2, and SDF1 genetic polymorphisms in AIDS progression. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 1998 Dec 1;19(4):381-6.

**Hessell, A. J.**, E. G. Rakasz, D. M. Tehrani, M. Huber, K. L. Weisgrau, G. Landucci, D. N. Forthal, W. C. Koff, P. Poignard, D. I. Watkins, and D. R. Burton. 2010. Broadly neutralizing monoclonal antibodies 2F5 and 4E10 directed against the human immunodeficiency virus type 1 gp41 membrane-proximal external region protect against mucosal challenge by simian-human immunodeficiency virus SHIVBa-L. *J Virol* 84:1302-13.

**Hessell, A. J.**, E. G. Rakasz, P. Poignard, L. Hangartner, G. Landucci, D. N. Forthal, W. C. Koff, D. I. Watkins, and D. R. Burton. 2009. Broadly neutralizing human anti-HIV antibody 2G12 is effective in protection against mucosal SHIV challenge even at low serum

**Hieshima K**, Kawasaki Y, Hanamoto H, Nakayama T, Nagakubo D, Kanamaru A, Yoshie O. CC chemokine ligands 25 and 28 play essential roles in intestinal extravasation of IgA antibody-secreting cells. *J Immunol*. 2004 Sep 15;173(6):3668-75.

**Hirbod T**, Broliden K. Mucosal immune responses in the genital tract of HIV-1-exposed uninfected women. *J Intern Med*. 2007 Jul;262(1):44-58.

**Hirbod T**, Kaul R, Reichard C, Kimani J, Ngugi E, Bwayo JJ, Nagelkerke N, Hasselrot K, Li B, Moses S; Kibera HIV Study Group, MacDonald KS, Broliden K. HIV-neutralizing

immunoglobulin A and HIV-specific proliferation are independently associated with reduced HIV acquisition in Kenyan sex workers. *AIDS*. 2008 Mar 30;22(6):727-35.

**Hirbod, T.** *et al.* HIV-neutralizing immunoglobulin A and HIV-specific proliferation are independently associated with reduced HIV acquisition in Kenyan sex workers. *AIDS* 22, 727–735 (2008).

**Hladik F,** Desbien A, Lang J, Wang L, Ding Y, Holte S, Wilson A, Xu Y, Moerbe M, Schmechel S, McElrath MJ. Most highly exposed seronegative men lack HIV-1-specific, IFN-gamma-secreting T cells. *J Immunol*. 2003 Sep 1;171(5):2671-83.

**Ho, DD,** A. U. Neumann, A. S. Perelson, J. Chen, J. M. Leonard, and M. Markowitz. 1995. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infections. *Nature* 373: 123-126.

**Hocini, H.,** L. Belec, S. Iscaki, B. Garin, J. Pillot, P. Becquart, and M. Bomsel. 1997. High-level ability of secretory IgA to block HIV type 1 transcytosis: contrasting secretory IgA and IgG responses to glycoprotein 160. *AIDS Res Hum Retroviruses* 13:1179-85.

**Horton, R.E.** *et al.* Cervical HIV-specific IgA in a population of commercial sex workers correlates with repeated exposure but not resistance to HIV. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 25, 83–92 (2009).

**Hovanessian, A.G.** *et al.* The caveolin-1 binding domain of HIV-1 glycoprotein gp41 is an efficient B cell epitope vaccine candidate against virus infection. *Immunity* 21, 617–627 (2004).

**Huang Y,** Zhang L, Ho DD. Characterization of gag and pol sequences from long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Virology*. 1998 Jan 5;240(1):36-49.

**Hunt PW.** Natural control of HIV-1 replication and long-term non progression: overlapping but distinct phenotypes. *J Infect Dis*. 2009 Dec 1;200(11):1636-8.

**Ioannou P.A.,** C.T. Amemiya, J. Garnes, P.M. Kroisel, H. Shizuya and C. Chen, *et al.* A new bacteriophage P1-derived vector for the propagation of large human DNA fragments. *Nat Genet*, 6 (1994), pp. 84–89.

**Iqbal SM,** Ball TB, Kimani J, Kiama P, Thottingal P, Embree JE, Fowke KR, Plummer FA. Elevated T cell counts and RANTES expression in the genital mucosa of HIV-1-resistant Kenyan commercial sex workers. *J Infect Dis*. 2005 Sep 1;192(5):728-38. Epub 2005 Jul 27.

**Iwasaki A,** Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 2004 Oct;5(10):987-95.

**Jackson S**, Prince S, Kulhavy R, Mestecky J. False positivity of enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of secretory IgA antibodies directed at HIV type 1 antigens. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2000 Apr 10;16(6):595-602.

**Jansen CA**, van Baarle D, Miedema F. HIV-specific CD4+ T cells and viremia: who's in control? *Trends Immunol*. 2006 Mar;27(3):119-24.

**Jennes W**, Sawadogo S, Koblavi-Dème S, Vuylsteke B, Maurice C, Roels TH, Chorba T, Nkengasong JN, Kestens L. Cellular human immunodeficiency virus (HIV)-protective factors: a comparison of HIV-exposed seronegative female sex workers and female blood donors in Abidjan, Côte d'Ivoire. *J Infect Dis*. 2003 Jan 15;187(2):206-14. Epub 2002 Dec 30.

**Jin X**, Wu H, Smith H. APOBEC3G levels predict rates of progression to AIDS. *Retrovirology*. 2007 Mar 20;4:20.

**Julg B**, Pereyra F, Buzón MJ, Piechocka-Trocha A, Clark MJ, Baker BM, Lian J, Miura T, Martinez-Picado J, Addo MM, Walker BD. Infrequent recovery of HIV from but robust exogenous infection of activated CD4(+) T cells in HIV elite controllers. *Clin Infect Dis*. 2010 Jul 15;51(2):233-8.

**Kahn, J.O.**, Walker B.D. 1998. Acute human immunodeficiency virus type 1 infection . *N. Engl. J. Med.*, 339: 33-39.

**Kalinkovich A**, Weisman Z, Bentwich Z. Chemokines and chemokine receptors: role in HIV infection. *Immunol Lett*. 1999 Jun 1;68(2-3):281-7.

**Kaslow RA**, Carrington M, Apple R, Park L, Muñoz A, Saah AJ, Goedert JJ, Winkler C, O'Brien SJ, Rinaldo C, Detels R, Blattner W, Phair J, Erlich H, Mann DL. Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. *Nat Med*. 1996 Apr;2(4):405-11.

**Kaul R**, Plummer FA, Kimani J, Dong T, Kiama P, Rostron T, Njagi E, MacDonald KS, Bwayo JJ, McMichael AJ, Rowland-Jones SL. HIV-1-specific mucosal CD8+ lymphocyte responses in the cervix of HIV-1-resistant prostitutes in Nairobi. *J Immunol*. 2000 Feb 1;164(3):1602-11.

**Kaul R**, Rebbapragada A, Hirbod T, Wachih C, Ball TB, Plummer FA, Kimani J, Jaoko W. Genital levels of soluble immune factors with anti-HIV activity may correlate with increased HIV susceptibility. *AIDS*. 2008 Oct 1;22(15):2049-51.

**Kaul R**, Rowland-Jones SL, Kimani J, et al. Late seroconversion in HIV-resistant Nairobi prostitutes despite pre-existing HIV-specific CD8+ responses. *J Clin Invest*. 2001;107:341-9.

**Kaul R**, Trabattoni D, Bwayo JJ, Arienti D, Zagliani A, Mwangi FM, Kariuki C, Ngugi EN, MacDonald KS, Ball TB, Clerici M, Plummer FA. HIV-1-specific mucosal IgA in a cohort of HIV-1-resistant Kenyan sex workers. *AIDS*. 1999 Jan 14;13(1):23-9.

**Keler, T.**, H. Li, M. W. Cloyd, L. A. Vitale, and Y. M. Deo. 1996. Development of T-cell lines expressing functional HIV-1 envelope glycoproteins for evaluation of immune responses in HIV-infected individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 113:117-26.

**Kim M.**, Z. Qiao, J. Yu, D. Montefiori and E.L. Reinherz, Immunogenicity of recombinant human immunodeficiency virus type 1-like particles expressing gp41 derivatives in a pre-fusion state. *Vaccine*, 25 June (27) (2007), pp. 5102–5114.

**Kirchhoff F**, Easterbrook PJ, Douglas N, Troop M, Greenough TC, Weber J, Carl S, Sullivan JL, Daniels RS. Sequence variations in human immunodeficiency virus type 1 Nef are associated with different stages of disease. *J Virol*. 1999 Jul;73(7):5497-508.

**Kozlowski PA**, Williams SB, Lynch RM, Flanigan TP, Patterson RR, Cu-Uvin S, Neutra MR. Differential induction of mucosal and systemic antibody responses in women after nasal, rectal, or vaginal immunization: influence of the menstrual cycle. *J Immunol*. 2002 Jul 1;169(1):566-74.

**Krause RM**, Dimmock NJ, Morens DM. Summary of antibody workshop: The Role of Humoral Immunity in the Treatment and Prevention of Emerging and Extant Infectious Diseases. *J Infect Dis*. 1997 Sep;176(3):549-59.

**Lai M**, Chen J. The role of Vpr in HIV-1 disease progression is independent of its G2 arrest induction function. 2006 Oct;5(19):2275-80. *Cell Cycle*. Epub 2006 Oct 1.

**Land AM**, Ball TB, Luo M, Pilon R, Sandstrom P, Embree JE, Wachihhi C, Kimani J, Plummer FA. Human immunodeficiency virus (HIV) type 1 proviral hypermutation correlates with CD4 count in HIV-infected women from Kenya. *J Virol*. 2008 Aug;82(16):8172-82.

**Lassen KG**, Lobritz MA, Bailey JR, Johnston S, Nguyen S, Lee B, Chou T, Siliciano RF, Markowitz M, Arts EJ. Elite suppressor-derived HIV-1 envelope glycoproteins exhibit reduced entry efficiency and kinetics. *PLoS Pathog*. 2009 Apr;5(4):e1000377. Epub 2009 Apr 10.

**Lazarus NH**, Kunkel EJ, Johnston B, Wilson E, Youngman KR, Butcher EC. A common mucosal chemokine (mucosae-associated epithelial chemokine/CCL28) selectively attracts IgA plasmablasts. *J Immunol*. 2003 Apr 1;170(7):3799-805.

**Lehner T**, Wang Y, Pido-Lopez J, Whittall T, Bergmeier LA, Babaahmady K. The emerging role of innate immunity in protection against HIV-1 infection. *Vaccine*. 2008 Jun 6;26(24):2997-3001. Epub 2007 Dec 17.

- Lekkerkerker A.N.**, van Kooyk Y., Geijtenbeek T.B. 2006. Viral piracy: HIV-1 targets dendritic cells for transmission. *Curr. HIV Res.*, 4: 169-176.
- Letvin NL.** Progress and obstacles in the development of an AIDS vaccine. *Nat Rev Immunol.* 2006 Dec;6(12):930-9.
- Levy JA.** HIV pathogenesis: 25 years of progress and persistent challenges. *AIDS.* 2009 Jan 14;23(2):147-60.
- Levy JA.** HIV, patogenesi dell'AIDS. 2007, Piccin Nuova Libreria, Padova.
- Li, M.**, F. Gao, J. R. Mascola, L. Stamatatos, V. R. Polonis, M. Koutsoukos, G. Voss, P. Goepfert, P. Gilbert, K. M. Greene, M. Biliska, D. L. Kothe, J. F. Salazar-Gonzalez, X. Wei, J. M. Decker, B. H. Hahn, and D. C. Montefiori. 2005. Human immunodeficiency virus type 1 env clones from acute and early subtype B infections for standardized assessments of vaccine-elicited neutralizing antibodies. *J Virol* 79:10108-25.
- Lindqvist M**, Persson J, Thörn K, Harandi AM. The mucosal adjuvant effect of  $\alpha$ -galactosylceramide for induction of protective immunity to sexually transmitted viral infection. *J. Immunol.* 182(10),6435–6443 (2009).
- Liu H**, Hwangbo Y, Holte S, Lee J, Wang C, Kaupp N, Zhu H, Celum C, Corey L, McElrath MJ, Zhu T. Analysis of genetic polymorphisms in CCR5, CCR2, stromal cell-derived factor-1, RANTES, and dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin in seronegative individuals repeatedly exposed to HIV-1. *J Infect Dis.* 2004 Sep 15;190(6):1055-8. Epub 2004 Aug 2.
- Liu Q**, Sun Y, Rihn S, et al. Matrix metalloprotease inhibitors restore impaired NK cell-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.* 2009;83:8705–8712.
- Ljunggren K**, Broliden PA, Morfeldt-Månson L, Jondal M, Wahren B IgG subclass response to HIV in relation to antibody-dependent cellular cytotoxicity at different clinical stages. *Clin Exp Immunol.* 1988 Sep;73(3):343-7.
- Lo Caputo S**, Trabattoni D, Vichi F, Piconi S, Lopalco L, Villa ML, Mazzotta F, Clerici M. Mucosal and systemic HIV-1-specific immunity in HIV-1-exposed but uninfected heterosexual men. *AIDS.* 2003 Mar 7;17(4):531-9.
- Lopalco L & Bomsel M**, Protecting the initial site of viral entry: alternative HIV vaccine target. Editorial 2011, Expert Review of Vaccines.
- Lopalco L**, Barassi C, Paolucci C, Breda D, Brunelli D, Nguyen M, Nouhin J, Luong TT, Truong LX, Clerici M, Calori G, Lazzarin A, Pancino G, Burastero SE. Predictive value of



anti-cell and anti-human immunodeficiency virus (HIV) humoral responses in HIV-1-exposed seronegative cohorts of European and Asian origin. *J Gen Virol.* 2005 Feb;86(Pt 2):339-48.

**Lopalco L**, Burastero SE. HIV-1 and the self-nonsel connection: how to sleep with the enemy and be much better off. *AIDS Rev.* 2008 Jul-Sep;10(3):162-71.

**Lopalco L**, Longhi R, Ciccomascolo F, De Rossi A, Pelagi M, Andronico F, Moore JP, Schulz T, Beretta A, Siccardi AG. Identification of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp120/gp41 interacting sites by the idiotypic mimicry of two monoclonal antibodies. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1993 Jan;9(1):33-9.

**Lopalco L**, Magnani Z, Confetti C, Brianza M, Saracco A, Ferraris G, Lillo F, Vegni C, Lazzarin A, Siccardi AG, Burastero SE. Anti-CD4 antibodies in exposed seronegative adults and in newborns of HIV type 1-seropositive mothers: a follow-up study. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1999 Aug 10;15(12):1079-85.

**Lopalco L**, Pastori C, Cosma A, Burastero SE, Capiluppi B, Boeri E, Beretta A, Lazzarin A, Siccardi AG. Anti-cell antibodies in exposed seronegative individuals with HIV type 1-neutralizing activity. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2000 Jan 20;16(2):109-15.

**Lopalco L**. CCR5: From Natural Resistance to a New Anti-HIV Strategy. *Viruses.* 2010 Feb;2(2):574-600. Epub 2010 Feb 5.

**Lopalco L**. Humoral immunity in HIV-1 exposure: cause or effect of HIV resistance? *Curr HIV Res.* 2004 Apr;2(2):127-39.

**Lopalco L**. Natural anti-CCR5 antibodies in HIV-infection and -exposure. *J Transl Med.* 2011 Jan 27;9 Suppl 1:S4.

**Louisirootchanakul S**, Liu H, Roongpisuthipong A, Nakayama EE, Takebe Y, Shioda T, Wasi C. Genetic analysis of HIV-1 discordant couples in Thailand: association of CCR2 64I homozygosity with HIV-1-negative status. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2002 Mar 1;29(3):314-5.

**Lucotte G**, **Mercier G**. Distribution of the CCR5 gene 32-bp deletion in Europe. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1998 Oct 1;19(2):174-7.

**Madec Y**, Boufassa F, Porter K, Meyer L; CASCADE Collaboration. Spontaneous control of viral load and CD4 cell count progression among HIV-1 seroconverters. *AIDS.* 2005 Nov 18;19(17):2001-7.

**Mahalanabis M**, Jayaraman P, Miura T, Pereyra F, Chester EM, Richardson B, Walker B, Haigwood NL. Continuous viral escape and selection by autologous neutralizing antibodies in drug-naive human immunodeficiency virus controllers. *J Virol.* 2009 Jan;83(2):662-72.

**Makedonas G**, Bruneau J, Lin H, Sékaly RP, Lamothe F, Bernard NF. HIV-specific CD8 T-cell activity in uninfected injection drug users is associated with maintenance of seronegativity. *AIDS*. 2002 Aug 16;16(12):1595-602.

**Marchetti G**, Riva A, Cesari M, Bellistri GM, Gianelli E, Casabianca A, Orlandi C, Magnani M, Meroni L, d'Arminio Monforte A, Mussini C, Cossarizza A, Galli M, Gori A; Elvis Study Group. HIV-infected long-term nonprogressors display a unique correlative pattern between the interleukin-7/interleukin-7 receptor circuit and T-cell homeostasis. *HIV Med*. 2009 Aug;10(7):422-31.

**Margalith M**, Levy E, Rinaldo CR, Detels R, Phair J, Kaslow R, Saah AJ, Sarov B. HIV-1 IgA specific serum antibodies and disease progression during HIV-1 infection. *J Hum Virol*. 2001 Sep-Oct;4(5):269-77.

**Margolis L**, Shattock R. HIV-1 infection. *Virology*. 2003 Jul 20;312(1):135-50. Selective transmission of CCR5-utilizing HIV-1: the 'gatekeeper' problem resolved? *Nat Rev Microbiol*. 2006;4:312-7.

**Margolis L**, Shattock R. Selective transmission of CCR5-utilizing HIV-1: the 'gatekeeper' problem resolved? *Nat Rev Microbiol*. 2006 Apr;4(4):312-7.

**Martin N**, Sattentau Q. Cell-to-cell HIV-1 spread and its implications for immune evasion. *Curr Opin HIV AIDS*. 2009 Mar;4(2):143-9.

**Mascola, J. R.**, G. Stiegler, T. C. VanCott, H. Katinger, C. B. Carpenter, C. E. Hanson, H. Beary, D. Hayes, S. S. Frankel, D. L. Birx, and M. G. Lewis. 2000. Protection of macaques against vaginal transmission of a pathogenic HIV-1/SIV chimeric virus by passive infusion of neutralizing antibodies. *Nat Med* 6:207-10.

**Mascola, J. R.**, M. G. Lewis, G. Stiegler, D. Harris, T. C. VanCott, D. Hayes, M. K. Louder, C. R. Brown, C. V. Sapan, S. S. Frankel, Y. Lu, M. L. Robb, H. Katinger, and D. L. Birx. 1999. Protection of Macaques against pathogenic simian/human immunodeficiency virus 89.6PD by passive transfer of neutralizing antibodies. *J Virol* 73:4009-18.

**Mazzoli S**, Trabattoni D, Lo Caputo S, Piconi S, Blé C, Meacci F, Ruzzante S, Salvi A, Semplici F, Longhi R, Fusi ML, Tofani N, Biasin M, Villa ML, Mazzotta F, Clerici M. HIV-specific mucosal and cellular immunity in HIV-seronegative partners of HIV-seropositive individuals. *Nat Med*. 1997 Nov;3(11):1250-7.

**McDermott DH**, Beecroft MJ, Kleeberger CA, Al-Sharif FM, Ollier WE, Zimmerman PA, Boatman BA, Leitman SF, Detels R, Hajeer AH, Murphy PM. Chemokine RANTES promoter polymorphism affects risk of both HIV infection and disease progression in the Multicenter AIDS Cohort Study. *AIDS*. 2000 Dec 1;14(17):2671-8.

**McElrath MJ.** Immune responses to HIV vaccines and potential impact on control of acute HIV-1 infection. *J. Infect. Dis.* 202(Suppl. 2),S323–S326 (2010).

**MESTECKY J, M W RUSSELL, C O ELSON** Intestinal IgA: novel views on its function in the defence of the largest mucosal surface *Gut* 1999;**44**:2-5 doi:10.1136/gut.44.1.2 Leading article

**Mestecky J, Russell MW.** Specific antibody activity, glycan heterogeneity and polyreactivity contribute to the protective activity of S-IgA at mucosal surfaces. *Immunol Lett.* 2009 Jun 4;124(2):57-62.

**Mestecky J, Wright PF, Lopalco L, Staats HF, Kozlowski PA, Moldoveanu Z, Alexander RC, Kulhavy R, Pastori C, Maboko L, Riedner G, Zhu Y, Wrinn T, Hoelscher M.** Scarcity or absence of humoral immune responses in the plasma and cervicovaginal lavage fluids of heavily HIV-1-exposed but persistently seronegative women. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2011 May;27(5):469-86.

**Michael, NL** 1999. Host genetic influences on HIV-1 pathogenesis. *Curr. Opin. Immunol.* 11: 466-474.

**Miguel SA, Connors M.** Frequency and function of HIV-specific CD8(+) T cells. *Immunol Lett.* 2001 Nov 1;79(1-2):141-50.

**Miguel SA, Laborico AC, Shupert WL, Sabbaghian MS, Rabin R, Hallahan CW, Van Baarle D, Kostense S, Miedema F, McLaughlin M, Ehler L, Metcalf J, Liu S, Connors M.** HIV-specific CD8+ T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors. *Nat Immunol.* 2002 Nov;3(11):1061-8.

**Miguel SA, Osborne CM, Royce C, Compton AA, Joshi RP, Weeks KA, Rood JE, Berkley AM, Sacha JB, Cogliano-Shutta NA, Lloyd M, Roby G, Kwan R, McLaughlin M, Stallings S, Rehm C, O'Shea MA, Mican J, Packard BZ, Komoriya A, Palmer S, Wiegand AP, Maldarelli F, Coffin JM, Mellors JW, Hallahan CW, Follman DA, Connors M.** Lytic granule loading of CD8+ T cells is required for HIV-infected cell elimination associated with immune control. *Immunity.* 2008 Dec 19;29(6):1009-21.

**Miguel SA, Sabbaghian MS, Shupert WL, Bettinotti MP, Marincola FM, Martino L, Hallahan CW, Selig SM, Schwartz D, Sullivan J, Connors M.** HLA B\*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Mar 14;97(6):2709-14.

**Mikhail M, Wang B, Saksena NK.** Mechanisms involved in non-progressive HIV disease. *AIDS Rev.* 2003 Oct-Dec;5(4):230-44.

**Misumi, S**, Nakayama, D, Kusaba, M, Iiboshi, T, Mukai, R, Tachibana, K, Nakasone, T, Umeda, M, Shibata, H, Endo, M, Takamune, N and Shoji, S. 2006. Effects of immunization with CCR5-based cycloimmunogen on simian/HIVSF162P3 challenge. *J Immunol*;176:463-71.

**Miura T**, Brockman MA, Brumme CJ, Brumme ZL, Carlson JM, Pereyra F, Trocha A, Addo MM, Block BL, Rothchild AC, Baker BM, Flynn T, Schneidewind A, Li B, Wang YE, Heckerman D, Allen TM, Walker BD. Genetic characterization of human immunodeficiency virus type 1 in elite controllers: lack of gross genetic defects or common amino acid changes. *J Virol*. 2008 Sep;82(17):8422-30. Epub 2008 Jun 18.

**Mologni D**, Citterio P, Menzaghi B, Zanone Poma B, Riva C, Broggin V, Sinicco A, Milazzo L, Adorni F, Rusconi S, Galli M, Riva A; rHoPeS Group. Vpr and HIV-1 disease progression: R77Q mutation is associated with long-term control of HIV-1 infection in different groups of patients. *AIDS*. 2006 Feb 28;20(4):567-74.

**Montoya CJ**, Velilla PA, Chougnet C, Landay AL, Rugeles MT. Increased IFN-gamma production by NK and CD3+/CD56+ cells in sexually HIV-1-exposed but uninfected individuals. *Clin Immunol*. 2006 Aug;120(2):138-46. Epub 2006 Apr 19.

neutralizing titers. *PLoS Pathog* 5:e1000433.

**Nguyen M**, Pean P, Lopalco L, Nouhin J, Phoung V, Ly N, Vermisse P, Henin Y, Barré-Sinoussi F, Burastero SE, Reynes JM, Carcelain G, Pancino G. HIV-specific antibodies but not t-cell responses are associated with protection in seronegative partners of HIV-1-infected individuals in Cambodia. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2006 Aug 1;42(4):412-9.

**Nguyen, K.A.**, Busch M.P. 2000. Evolving strategies for diagnosing human immunodeficiency virus infection. *Am. J. Med.*, 109: 595-597.

**O'Connell KA**, Han Y, Williams TM, Siliciano RF, Blankson JN. Role of natural killer cells in a cohort of elite suppressors: low frequency of the protective KIR3DS1 allele and limited inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in vitro. *J Virol*. 2009 May;83(10):5028-34. Epub 2009 Feb 11.

**O'Connor GM**, Holmes A, Mulcahy F, Gardiner CM. Natural Killer cells from long-term non-progressor HIV patients are characterized by altered phenotype and function. *Clin Immunol*. 2007 Sep;124(3):277-83. Epub 2007 Jul 3.

**Okulicz JF**, Marconi VC, Landrum ML, Wegner S, Weintrob A, Ganesan A, Hale B, Crum-Cianflone N, Delmar J, Barthel V, Quinnan G, Agan BK, Dolan MJ; Infectious Disease Clinical Research Program (IDCRP) HIV Working Group. Clinical outcomes of elite

controllers, viremic controllers, and long-term nonprogressors in the US Department of Defense HIV natural history study. *J Infect Dis.* 2009 Dec 1;200(11):1714-23.

**Op de Coul, E. L. M.,** M. Prins, M. Cornellissen, A. van der Schoot, F. Boufassa, R. P. Brettler, I. Hernandez-Aguado, V. Shiffer, J. McMenamin, G. Rezza, R. Robertson, R. Zangerle, J. Goudsmit, R. A. Coutinho, and V. Lukashov. 2001. Using phylogenetic analysis to trace HIV-1 migration among western European injecting drug users seroconverting from 1984 to 1997. *AIDS*, 15: 257-266.

**Pallikkuth S,** Wanchu A, Bhatnagar A, Sachdeva RK, Sharma M. Human immunodeficiency virus (HIV) gag antigen-specific T-helper and granule-dependent CD8 T-cell activities in exposed but uninfected heterosexual partners of HIV type 1-infected individuals in North India. *Clin Vaccine Immunol.* 2007 Sep;14(9):1196-202.

**Pantaleo, G.,** Graziosi C., Demarest J.F., Butini F., Montroni M., Fox C.H., Orenstein J.M., Kotler D.P., Fauci A.S. 1993. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature*, 362: 355-358.

**Pastori C,** Weiser B, Barassi C, Uberti-Foppa C, Ghezzi S, Longhi R, Calori G, Burger H, Kemal K, Poli G, Lazzarin A, Lopalco L. Long-lasting CCR5 internalization by antibodies in a subset of long-term nonprogressors: a possible protective effect against disease progression. *Blood.* 2006 Jun 15;107(12):4825-33.

**Pereyra F,** Addo MM, Kaufmann DE, Liu Y, Miura T, Rathod A, Baker B, Trocha A, Rosenberg R, Mackey E, Ueda P, Lu Z, Cohen D, Wrinn T, Petropoulos CJ, Rosenberg ES, Walker BD. Genetic and immunologic heterogeneity among persons who control HIV infection in the absence of therapy. *J Infect Dis.* 2008 Feb 15;197(4):563-71.

**Piacentini L,** Biasin M, Fenizia C, Clerici M. Genetic correlates of protection against HIV infection: the ally within. *J Intern Med.* 2009 Jan;265(1):110-24.

**Poropatich K,** Sullivan DJ Jr. Human immunodeficiency virus type 1 long-term non-progressors: the viral, genetic and immunological basis for disease non-progression. *J Gen Virol.* 2011 Feb;92(Pt 2):247-68. Epub 2010 Nov 24.

**Potter SJ,** Lacabaratz C, Lambotte O, Perez-Patrigeon S, Vingert B, Sinet M, Colle JH, Urrutia A, Scott-Algara D, Boufassa F, Delfraissy JF, Thèze J, Venet A, Chakrabarti LA. Preserved central memory and activated effector memory CD4+ T-cell subsets in human immunodeficiency virus controllers: an ANRS EP36 study. *J Virol.* 2007 Dec;81(24):13904-15. Epub 2007 Oct 10.

**Rabi SA,** O'Connell KA, Nikolaeva D, Bailey JR, Jilek BL, Shen L, Page KR, Siliciano RF, Blankson JN. Unstimulated primary CD4+ T cells from HIV-1-positive elite suppressors are

fully susceptible to HIV-1 entry and productive infection. *J Virol.* 2011 Jan;85(2):979-86. Epub 2010 Nov 10.

**Ranki A**, Mattinen S, Yarchoan R, Broder S, Ghayeb J, Lähdevirta J, Krohn K. T-cell response towards HIV in infected individuals with and without zidovudine therapy, and in HIV-exposed sexual partners. *AIDS.* 1989 Feb;3(2):63-9.

**Reimann J**, Schirmbeck R. Alternative pathways for processing exogenous and endogenous antigens that can generate peptides for MHC class I-restricted presentation. *Immunol Rev.* 1999 Dec;172:131-52.

**Rerks-Ngarm S**, Pitisuttithum P, Nitayaphan S, Kaewkungwal J, Chiu J, Paris R, Prensri N, Namwat C, de Souza M, Adams E, Benenson M, Gurunathan S, Tartaglia J, McNeil JG, Francis DP, Stablein D, Birx DL, Chunsuttiwat S, Khamboonruang C, Thongcharoen P, Robb ML, Michael NL, Kunasol P, Kim JH; MOPH-TAVEG Investigators. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N. Engl. J. Med.* 361(23),2209–2220 (2009).

**Rizzardini G**, Piconi S, Ruzzante S, Fusi ML, Lukwiya M, Declich S, Tamburini M, Villa ML, Fabiani M, Milazzo F, Clerici M. Immunological activation markers in the serum of African and European HIV-seropositive and seronegative individuals. *AIDS.* 1996 Nov;10(13):1535-42.

**Rizzardini G**, Trabattoni D, Saresella M, Piconi S, Lukwiya M, Declich S, Fabiani M, Ferrante P, Clerici M. Immune activation in HIV-infected African individuals. Italian-Ugandan AIDS cooperation program. *AIDS.* 1998 Dec 24;12(18):2387-96.

**Rohn, T. A.**, W. T. Ralvenius, J. Paul, P. Borter, M. Hernandez, R. Witschi, P. Grest, H. U. Zeilhofer, M. F. Bachmann, and G. T. Jennings. 2011. A virus-like particle-based anti-nerve growth factor vaccine reduces inflammatory hyperalgesia: potential long-term therapy for chronic pain. *J Immunol* 186:1769-80.

**Rosenberg ES**, Billingsley JM, Caliendo AM, Boswell SL, Sax PE, Kalams SA, Walker BD. Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. *Science.* 1997 Nov 21;278(5342):1447-50.

**Rosenberg, Y.J.**, Anderson A.O., Pabst R. 1998. HIV-induced decline in blood CD4/CD8 ratios: viral killing or altered lymphocyte trafficking? *Immunol. Today*, 19: 10-17.

**Russo S**, Lopalco L. Is autoimmunity a component of natural immunity to HIV? *Curr HIV Res.* 2006 Apr;4(2):177-90.

**Sanchez-Carrasquillo E**, García V, Rivera CE, Febo I, Melendez-Guerrero LM. CCR5 and beta-chemokines in HIV-1 infected children. *P R Health Sci J.* 2000 Dec;19(4):345-51.

**Sandonís V**, Casado C, Alvaro T, Pernas M, Olivares I, García S, Rodríguez C, del Romero J, López-Galíndez C. A combination of defective DNA and protective host factors are found in a set of HIV-1 ancestral LTNPs. *Virology*. 2009 Aug 15;391(1):73-82. Epub 2009 Jun 25.

**Sblattero, D. & Bradbury, A.** A definitive set of oligonucleotide primers for amplifying human V regions. *Immunotechnology* 3, 271–278 (1998).

**Shearer GM**, Clerici M. Protective immunity against HIV infection: has nature done the experiment for us? *Immunol Today*. 1996 Jan;17(1):21-4.

**Shearer MH**, Dark RD, Chodosh J, Kennedy RC. Comparison and characterization of immunoglobulin G subclasses among primate species. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1999 Nov;6(6):953-8.

**Shen C**, Gupta P, Wu H, Chen X, Huang X, Zhou Y, Chen Y. Molecular characterization of the HIV type 1 vpr gene in infected Chinese former blood/plasma donors at different stages of diseases. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2008 Apr;24(4):661-6.

**Simek MD**, Rida W, Priddy FH, Pung P, Carrow E, Laufer DS, Lehrman JK, Boaz M, Tarragona-Fiol T, Miiro G, Birungi J, Pozniak A, McPhee DA, Manigart O, Karita E, Inwoley A, Jaoko W, Dehovitz J, Bekker LG, Pitisuttithum P, Paris R, Walker LM, Poignard P, Wrin T, Fast PE, Burton DR, Koff WC. Human immunodeficiency virus type 1 elite neutralizers: individuals with broad and potent neutralizing activity identified by using a high-throughput neutralization assay together with an analytical selection algorithm. *J Virol*. 2009 Jul;83(14):7337-48.

**Skerra, A.** A general vector, pASK84, for cloning, bacterial production, and single-step purification of antibody Fab fragments. *Gene* 141, 79–84 (1994).

**Skurnick JH**, Palumbo P, DeVico A, Shacklett BL, Valentine FT, Merges M, Kamin-Lewis R, Mestecky J, Denny T, Lewis GK, Lloyd J, Praschunus R, Baker A, Nixon DF, Stranford S, Gallo R, Vermund SH, Loria DB. Correlates of nontransmission in US women at high risk of human immunodeficiency virus type 1 infection through sexual exposure. *J Infect Dis*. 2002 Feb 15;185(4):428-38.

**Soriano-Sarabia N**, Vallejo A, Ramírez-Lorca R, Rodríguez Mdel M, Salinas A, Pulido I, Sáez ME, Leal M. Influence of the Toll-like receptor 9 1635A/G polymorphism on the CD4 count, HIV viral load, and clinical progression. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2008 Oct 1;49(2):128-35.

**Spohn, G.**, G. T. Jennings, B. E. Martina, I. Keller, M. Beck, P. Pumpens, A. D. Osterhaus, and M. F. Bachmann. 2010. A VLP-based vaccine targeting domain III of the West Nile virus E protein protects from lethal infection in mice. *Virol J* 7:146.

**Sreepian A**, Srisurapanon S, Horthongkham N, Tunsupasawasdikul S, Kaoriangudom S, Khusmith S, Sutthent R. Conserved neutralizing epitopes of HIV type 1 CRF01\_AE against primary isolates in long-term nonprogressors. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2004 May;20(5):531-42.

**Stamatatos, L.**, Morris L., Burton D.R., Mascola J.R. 2009. Neutralizing antibodies generated during natural HIV-1 infection: good news for an HIV-1 vaccine? *Nat. Med.*, 15: 866-870.

**Stephens JC**, Reich DE, Goldstein DB, Shin HD, Smith MW, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Allikmets R, Schriml L, et al. Dating the origin of the CCR5-Delta32 AIDS-resistance allele by the coalescence of haplotypes. *Am J Hum Genet*. 1998 Jun;62(6):1507-15.

**Suresh P**, Wanchu A, Bhatnagar A, Sachdeva RK, Sharma M. Spontaneous and antigen-induced chemokine production in exposed but uninfected partners of HIV type 1-infected individuals in North India. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2007 Feb;23(2):261-8.

**Temin HM** 1993. Retrovirus variation and reverse transcription: abnormal strand transfers result in retrovirus genetic variation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6900-6903.

**Tiemessen CT**, Shalekoff S, Meddows-Taylor S, Schramm DB, Papathanasopoulos MA, Gray GE, Sherman GG, Coovadia AH, Kuhn L. Cutting Edge: Unusual NK cell responses to HIV-1 peptides are associated with protection against maternal-infant transmission of HIV-1. *J Immunol*. 2009 May 15;182(10):5914-8.

**Tissot, A. C.**, R. Renhofa, N. Schmitz, I. Cielens, E. Meijerink, V. Ose, G. T. Jennings, P. Saudan, P. Pumpens, and M. F. Bachmann. 2010. Versatile virus-like particle carrier for epitope based vaccines. *PLoS One* 5:e9809.

**Tolstrup M**, Laursen AL, Gerstoft J, Pedersen FS, Ostergaard L, Duch M. Cysteine 138 mutation in HIV-1 Nef from patients with delayed disease progression. *Sex Health*. 2006 Dec;3(4):281-6.

**Tonegawa, S.** Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302, 575–581 (1983).

**Tudor D**, Derrien M, Diomedede L, Drillet AS, Houimel M, Moog C, Reynes JM, Lopalco L, Bomsel M. HIV-1 gp41-specific monoclonal mucosal IgAs derived from highly exposed but IgG-seronegative individuals block HIV-1 epithelial transcytosis and neutralize CD4(+) cell infection: an IgA gene and functional analysis. *Mucosal Immunol*. 2009 Sep;2(5):412-26.

**Tudor, D., and M. Bomsel.** 2011. The broadly neutralizing HIV-1 IgG 2F5 elicits gp41-specific antibody-dependent cell cytotoxicity in a FcγRI-dependent manner. *AIDS* 25:751-9.



- Vázquez-Pérez JA**, Ormsby CE, Hernández-Juan R, Torres KJ, Reyes-Terán G. APOBEC3G mRNA expression in exposed seronegative and early stage HIV infected individuals decreases with removal of exposure and with disease progression. *Retrovirology*. 2009 Mar 2;6:23.
- Viellard V**, Fausther-Bovendo H, Samri A, Debré P; and French Asymptomatiques à Long Terme (ALT) ANRS-CO15 Study Group. Specific phenotypic and functional features of natural killer cells from HIV-infected long-term nonprogressors and HIV controllers. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2010 Apr;53(5):564-73.
- Visciano ML**, Diomedea L, Tagliamonte M, Tornesello ML, Asti V, Bomsel M, Buonaguro FM, Lopalco L, Buonaguro L. Generation of HIV-1 Virus-Like Particles expressing different HIV-1 glycoproteins. *Vaccine*. 2011 Jul 12;29(31):4903-12.
- Walker L. M. et al** Broad neutralization coverage of HIV by multiple highly potent antibodies. *Nature* 477, 466 (2011). doi:10.1038/nature10373 pmid:21849977
- Walker L. M. et al.** Broad and potent neutralizing antibodies from an African donor reveal a new HIV-1 vaccine target. *Science* 326, 285 (2009). doi:10.1126/science.1178746 pmid:19729618
- Walker LM, Burton DR. Rational antibody-based HIV-1 vaccine design: current approaches and future directions. *Curr. Opin. Immunol.*22(3),358–366 (2010).
- Wanchu A**, Sachdev R, Bagga R, HIV-1 gag-specific mucosal antibodies in a cohort of exposed but uninfected heterosexual partners of HIV-infected individuals in north India. CROI 2008; Boston, MA,USA; 3-6 February 2008, abstract 430.
- Wang B**, Mikhail M, Dyer WB, Zaunders JJ, Kelleher AD, Saksena NK. First demonstration of a lack of viral sequence evolution in a non progressor, defining replication-incompetent. *Virology*. 2003 Jul 20;312(1):135-50.
- Watkins JD**, Siddappa NB, Lakhashe SK *et al.* An anti-HIV-1 V3 loop antibody fully protects cross-clade and elicits T-cell immunity in macaques mucosally challenged with an R5 clade C SHIV. *PLoS ONE*6(3),e18207 (2011).
- Weiss RA 1993.** Cellular receptors and viral glycoproteins involved in retrovirus entry. In: Levy J.A. (Ed.) *The Retroviridae* (vol.2), New York, U.S.A.: p. 1-108.
- Wright PF**, Kozlowski PA, Rybczyk GK, Goepfert P, Staats HF, VanCott TC, Trabattoni D, Sannella E, Mestecky J. Detection of mucosal antibodies in HIV type 1-infected individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2002 Nov 20;18(17):1291-300.
- Wu JQ**, Wang B, Belov L, Chrisp J, Learmont J, Dyer WB, Zaunders J, Cunningham AL, Dwyer DE, Saksena NK. Antibody microarray analysis of cell surface antigens on CD4+ and

CD8+ T cells from HIV+ individuals correlates with disease stages. *Retrovirology*. 2007 Nov 26;4:83.

**Wu X**, Yang ZY, Li Y, Hogerkorp CM, Schief WR, Seaman MS, Zhou T, Schmidt SD, Wu L, Xu L, Longo NS, McKee K, O'Dell S, Louder MK, Wycuff DL, Feng Y, Nason M, Doria-Rose N, Connors M, Kwong PD, Roederer M, Wyatt RT, Nabel GJ, Mascola JR. Rational design of envelope identifies broadly neutralizing human monoclonal antibodies to HIV-1. *Science*. 2010 Aug 13;329(5993):856-61.

**Wu X. et al.**, Focused evolution of HIV-1 neutralizing antibodies revealed by structures and deep sequencing. *Science* 333, 1593 (2011). doi:10.1126/science.1207532 pmid:21835983

**Wu X. et al.**, Rational design of envelope identifies broadly neutralizing human monoclonal antibodies to HIV-1. *Science* 329, 856 (2010). doi:10.1126/science.1187659 pmid:20616233

**Wyatt R.**, J. Sodroski . The HIV-1 envelope glycoproteins: Fusogens, antigens, and immunogens. *Science* 280, 1884 (1998). doi:10.1126/science.280.5371.1884 pmid:9632381

**Yamada T**, Watanabe N, Nakamura T, Iwamoto A. Antibody-dependent cellular cytotoxicity via humoral immune epitope of Nef protein expressed on cell surface. *J Immunol*. 2004 Feb 15;172(4):2401-6.

**Zanussi S**, Simonelli C, D'Andrea M, Caffau C, Clerici M, Tirelli U, DePaoli P. CD8+ lymphocyte phenotype and cytokine production in long-term non-progressor and in progressor patients with HIV-1 infection. *Clin Exp Immunol*. 1996 Aug;105(2):220-4.

**Zhang PF**, Chen X, Fu DW, Margolick JB, Quinnan GV Jr .Primary virus envelope cross-reactivity of the broadening neutralizing antibody response during early chronic human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol*. 1999 Jun;73(6):5225-30.

**Zwick, M. B.**, A. F. Labrijn, M. Wang, C. Spencehauer, E. O. Saphire, J. M. Binley, J.P. Moore, G. Stiegler, H. Katinger, D. R. Burton, and P. W. Parren. 2001. Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp41. *J Virol* 75:10892-905.