



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA
Dipartimento di Biochimica e Biologia Molecolare

Dottorato di Ricerca in Biotecnologie
XXIII ciclo

Verso un vaccino autoadiuvante multivalente contro il virus del papilloma umano

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Nelson Marmioli

Tutor:

Chiar.mo Prof. Simone Ottonello

Dottoranda:

Dott.ssa Elena Canali

'Torna a eterno merito della scienza l'aver liberato l'uomo
dalle insicurezze su se stesso e sulla natura agendo sulla sua mente.'

Albert Einstein

Indice

1. INTRODUZIONE

1.1 HPV e tumore	11
HPV come causa di tumore – Le fasi storiche della ricerca	
Tassonomia e patobiologia di HPV	
La patogenesi - Dall'infezione allo sviluppo del tumore cervicale	
Dati epidemiologici	
1.2 Biologia di HPV	27
Caratteristiche genomiche e strutturali	
Storia molecolare del processo infettivo	
Aspetti immunologici	
1.3 Diagnosi e profilassi	44
L'importanza della prevenzione	
I test diagnostici	
I vaccini	

2. RAZIONALE, CONTESTO E OBIETTIVI DELLA RICERCA

Perché sviluppare vaccini di II° generazione?	69
Limiti e svantaggi dei vaccini profilattici attualmente in commercio	
Vaccini alternativi – Le potenzialità della proteina capsidica L2	71
Obiettivi e fasi sperimentali della ricerca	73

3. MATERIALI E METODI

Ceppi batterici, terreni di crescita e plasmidi	77
Procedure sperimentali	78

4. RISULTATI E DISCUSSIONI

4.1 IDENTIFICAZIONE DELL'ANTIGENE

CANDIDATO PER LO SVILUPPO DI UN NUOVO VACCINO ANTI-HPV

Progettazione ed espressione dei polipeptidi di fusione Trx-L2	93
La risposta immunitaria generata dalla vaccinazione	
L'attività neutralizzante HPV omologhi degli antisieri	
L'attività cross-neutralizzante HPV eterologhi dell'antisiero anti-Trx-L2(20-38)	

Discussione

4.2 STRATEGIE MOLECOLARI PER L'OTTIMIZZAZIONE DELL'EPITOPO

Riduzione dell'epitopo alla sola regione immunodominante	104
Caratterizzazione degli anticorpi monoclonali diretti contro l'epitopo	
Il pattern di legame degli anticorpi non neutralizzanti e (cross-) neutralizzanti	
Progettazione ed espressione degli antigeni 'miniaturizzati'	
Titoli anticorpali anti-Trx-L2(20-31) e attività neutralizzante HPV16	
Combinazione di epitopi da differenti sierotipi virali	110
Divergenze nella sequenza di L2 come causa di limitata cross-neutralizzazione	
Progettazione ed espressione di antigeni potenzialmente multivalenti	

Variazione dello stato di ossido-riduzione	114
Residui critici per il legame degli anticorpi monoclonali K4 e K18	
Determinazione dello stato di ossidazione dell'antigene Trx-L2(20-38)	
Caratterizzazione dei ponti disolfuro	
Verifica dell'immunoreattività dei mAb K4 e K8 in relazione allo stato redox	
Discussione	
4.3 VALUTAZIONE DI SCAFFOLD ALTERNATIVI	
La Tioredossina di <i>Methenosaeta thermophila</i>	121
Progettazione e preparazione dei costrutti genici	
Valutazione della stabilità conformazionale	
La Tioredossina di <i>Pyrococcus furiosus</i>	123
Progettazione e preparazione dei costrutti genici	
Valutazione della stabilità conformazionale	
Discussione	
4.4 VACCINI TDMI ALTERNATIVI POTENZIALMENTE AUTOADIUVANTI	
La Flagellina come immunopotenziatore naturale	129
La fusione dell'antigene alla Flagellina di <i>Escherichia coli</i>	
Modificazione del costrutto commerciale pFLITRX™	
Espressione dei polipeptidi di fusione	
La fusione dell'antigene alla Flagellina di <i>Salmonella typhi</i>	
Isolamento e modificazione del gene FliC	
Espressione dei polipeptidi di fusione	
Salmonella: un vaccino 'vivo'	135
Progettazione del sistema eterologo di espressione	
Verifica della stabilità e dell'espressione dell'antigene	
La parete dei batteri lattici come sistema di display dell'antigene	139
Preparazione e verifica del supporto strutturale	
Espressione dell'antigene di ancoraggio	
Strutture sovramolecolari esponenti multiple copie dell'antigene	
Discussione	
5. CONCLUSIONI	149
6. BIBLIOGRAFIA	155
7. APPENDICE	165
Tabelle e figure supplementari	
Sequenze aminoacidiche e nucleotidiche	
Pubblicazioni	

Introduzione

1.

HPV E TUMORE

Il legame tra il virus del papilloma umano (HPV) e il tumore della cervice uterina è stato postulato per la prima volta più di 30 anni fa. Da allora, studi molecolari ed epidemiologici hanno portato alla definizione del ruolo causale di alcuni tipi di HPV nel processo carcinogenico.

In questo capitolo verranno illustrati gli aspetti storici della ricerca, il ruolo dei differenti sierotipi nella patogenesi e il contributo fornito dagli studi epidemiologici nella comprensione di questo fenomeno di impatto mondiale.

HPV COME CAUSA DI TUMORE – Le fasi storiche della ricerca

Le prime ricerche per un'eziologia infettiva del tumore cervicale

In un documento ora famoso, il fisico italiano Rigoni-Stern (1842) analizzò i certificati di morte di donne durante il periodo 1760-1839 a Verona e notò un'alta frequenza di carcinoma cervicale in donne sposate, vedove e prostitute, ma una bassa incidenza in vergini e suore. Egli concluse che questo tipo di cancro doveva essere correlato ai contatti sessuali.

Il rapido sviluppo della batteriologia nella seconda metà del XIX° secolo ha portato alle prime prove della correlazione tra il tumore cervicale e gli eventi infettivi trasmessi sessualmente, senza però dati riproducibili sino alla fine degli anni '60. A questi anni risale il primo documento in cui un'infezione virale, da Herpes simplex di tipo 2, è candidata come agente eziologico del tumore. Nonostante all'inizio siano stati pubblicati un certo numero di dati confermativi, uno studio su larga scala condotto in Cecoslovacchia non permise la conferma dei risultati attesi.

E' all'inizio degli anni '70 che venne postulato per la prima volta un possibile legame tra il virus del papilloma umano (HPV) e lo sviluppo del tumore¹.

Una breve storia della ricerca sul virus del papilloma

Alla fine del XIX° secolo Payne (1891) riportò per primo la natura infettiva delle comuni verruche. La prima inequivocabile dimostrazione si ebbe con gli esperimenti di trasmissione di Ciuffo (1907) in Italia. Questi permisero di stabilire allo stesso tempo anche la natura virale dell'agente responsabile. Entro gli anni '20 fu confermata la natura infettiva anche delle verruche genitali e

della papillomatosi della laringe. Anche se nei successivi anni '30 si ebbero importanti sviluppi, dimostranti per la prima volta il potenziale carcinogenico del virus del papilloma nel coniglio, l'interesse nell'eziologia delle verruche umane rimase limitato. Nel 1965 venne pubblicato il primo resoconto sulla caratterizzazione del DNA a doppio filamento del virus del papilloma umano. Negli anni '70 la pluralità dei tipi di HPV divenne evidente. Un primo indizio sulle differenze antigeniche tra il virus del papilloma cutaneo e genitale si ebbe da studi di microscopia elettronica delle particelle virali, condotto da Almeida e collaboratori nel 1969. L'antisiero contro i virus causa di verruche cutanee reagiva con entrambi, sia i virus cutanei che genitali, mentre l'antisiero contro i virus causa di verruche genitali reagiva solo con le particelle responsabili di quest'ultime. Un chiaro indizio dell'eterogeneità della famiglia del virus del papilloma umano si ebbe nel 1974 da studi di ibridazione condotti con l'RNA del virus plantare trascritto in vitro e il DNA proveniente da biopsie di verruche cutanee, genitali e di cancro della cervice uterina. Nonostante alcuni risultati positivi, solo un numero limitato di DNA provenienti da verruche cutanee e nessuno dei DNA da verruche genitali reagirono con la sonda a RNA. Studi successivi rivelarono l'eterogeneità intratipica dei virus causa di verruche plantari e i pattern di restrizione tipo-specifica di varie particelle isolate stabilirono chiaramente la pluralità dei tipi del virus del papilloma umano.

Il virus del papilloma e il tumore cervicale

Gli esperimenti volti a stabilire una relazione tra le infezioni provocate dal virus del papilloma e il carcinoma cervicale iniziarono nel 1972. Essi si basarono su riferimenti presenti nella letteratura medica di rare conversioni maligne delle verruche genitali (condylomata acuminata) in carcinomi, risultanti nell'ipotesi che il tumore cervicale potesse derivare da infezioni con il virus identificato nelle lesioni genitali. L'isolamento di nuovi tipi di HPV dalle verruche genitali (HPV6) e da papillomi della laringe (HPV11) fornì una risposta diretta a questo interrogativo. Nel 1976 e nel 1977, Meisels e Fortin postularono che cellule coilocitiche trovate nello striscio di cellule cervicali di pazienti con lesioni displastiche rappresentavano il cambiamento citopatogenico dell'infezione da virus del papilloma. Inizialmente, questi autori ipotizzarono che la scoperta di queste cellule avrebbe permesso una differenziazione tra proliferazioni benigne "coilociti-positive" e proliferazioni maligne "coilociti-negative". La dimostrazione di tipiche particelle virali all'interno delle cellule coilocitiche da parte di Della Torre (1978) e di Hills e Laverty (1979) confermò l'effetto citopatico mediato da HPV, come proposto da Meisels e Fortin.

Nel 1982 furono pubblicati i primi tre rapporti sulla presenza di HPV nei tumori umani. All'inizio di quell'anno, Gissmann documentò la presenza di sei DNA diversi in biopsie di condylomata acuminata (tumori di Busche-Löwenstein). Questo è stato confermato alla fine dello stesso anno da Zachow in una serie di tumori aggiuntivi di Busche-Löwenstein. In un terzo documento redatto da Green fu dimostrata la presenza di HPV in altre biopsie di carcinoma cervicale.

Ibridazioni Southern Blot con il DNA di HPV11 permise nel 1983 l'individuazione di questo DNA in una di 24 biopsie di tumore cervicale. Utilizzando il DNA di HPV11 come sonda, fu possibile isolare

il DNA di un nuovo HPV, successivamente classificato come HPV16. Entro breve tempo, lo stesso gruppo isolò e caratterizzò parzialmente il DNA di HPV18. Nello stesso anno fu possibile dimostrare la presenza di HPV16 in tipiche lesioni precursori del cancro anogenitale e un anno dopo in neoplasie cervicali intraepiteliali.

Senza esaminare in dettaglio i dati molecolari ed epidemiologici che si ottennero negli anni successivi, alcuni eventi meritano di essere menzionati. All'inizio del 1985, fu dimostrata la trascrizione selettiva dei geni E6 ed E7 nei carcinomi invasivi e specifiche delezioni nel corso dell'integrazione del DNA virale nel DNA della cellula ospite. La scoperta dell'interazione della proteina E6 con p53, risultante nella degradazione di questa proteina, e di E7 con pRb, in grado di bloccare la funzione di quest'ultima, furono fondamentali per l'inizio della comprensione degli eventi intracellulari risultanti nell'immortalizzazione ed eventualmente nel fenotipo trasformato delle cellule recanti il genoma virale. La trasformazione cellulare causata da questi oncogeni virali fu inizialmente mostrata per cellule di roditore e poco dopo anche per cheratinociti umani. Studi epidemiologici globali identificarono HPV16, 18 e pochi altri come i principali fattori di rischio per lo sviluppo del cancro cervicale.

L'interruzione di specifiche vie metaboliche come preconditione per la conversione maligna, il ruolo essenziale delle oncoproteine virali per il mantenimento del fenotipo maligno, così come la serologia dell'infezione da HPV, sono solo alcune delle importanti tappe che sono state compiute per la definizione del ruolo di HPV nella progressione oncogenica¹.

Il virus del papilloma e i tumori anogenitali

Poco dopo la scoperta di HPV16 e 18 nelle biopsie di carcinomi cervicali, questi così come altri tipi di HPV furono identificati in altri tumori anogenitali. I primi studi, condotti nel 1983, rivelarono che la papulosi Bowenoides della vulva e del pene, lesioni precursori del cancro nei siti genitali esterni, erano frequentemente positive per il DNA di HPV16. Ad oggi è ben stabilito che solo il 50% dei carcinomi vulvari è positivo all'HPV, principalmente HPV16. Allo stesso modo, solo il 30-50% dei casi di carcinoma del pene contiene DNA di HPV.

Al contrario dei tumori della vulva e del pene, i casi di carcinoma della vagina positivi alla presenza di HPV rappresentano il 60-90%. Lo stesso sembra essere vero per i tumori anali e perianali. La prima dimostrazione della presenza di HPV16 nei carcinomi anali risale al 1986. Nello stesso anno, un documento dimostrava l'elevata frequenza di lesioni displastiche intraepiteliali anali in soggetto omosessuali.

Il virus del papilloma e i tumori di testa e collo

Tra gli anni '40 e '50 furono pubblicati numerosi documenti in cui veniva ipotizzata la conversione maligna di ricorrenti papillomatosi della laringe in carcinomi. Nel 1983, la dimostrazione della presenza degli antigeni del virus del papilloma in lesioni premaligne dell'orofaringe fornì la prima dimostrazione del possibile ruolo delle infezioni da HPV nei tumori orali. Il primo inequivocabile

resoconto di specifici tipi di HPV nei tumori della lingua e dell'orofaringe fu pubblicato nel 1985 da de Villiers. Tre dei 13 carcinomi testati conteneva il DNA di HPV16, uno era positivo ad HPV11, ed uno conteneva il DNA di HPV27. Negli anni successivi un ampio numero di studi confermarono questo dato, nonostante il tasso di positività variasse comunemente tra il 25 e il 60%. In un'analisi più dettagliata Weinberger e collaboratori (2006) dimostrarono che oltre il 61% dei carcinomi dell'orofaringe erano positivi al DNA di HPV16.

Alcuni aspetti sono interessanti da notare: in accordo con alcune indagini statistiche, negli Stati Uniti l'incidenza annuale di tumore della lingua e delle tonsille, in uomini e donne di età compresa tra 20 e 44 anni, è aumentata dal 2.1% al 3.9% rispettivamente dal 1973 al 2001. Le pratiche sessuali sembrano essere parzialmente responsabili dell'acquisizione dell'infezione da HPV nella cavità orale. Un numero limitato di carcinomi verrucosi della laringe potrebbe svilupparsi dopo prolungati episodi di papillomatosi ricorrente. I primi documenti riguardanti i tipi di HPV che spontaneamente inducono il tumore della laringe (HPV16 e 30) furono pubblicati nel 1986. Ad oggi, sembra che la maggiorparte di questi tumori siano negativi alla presenza di HPV e che la percentuale di casi positivi non ecceda il 5%.

Il virus del papilloma e i tumori della pelle

Nonostante non siano stati riconosciuti a quel tempo, la storia delle infezioni del virus del papilloma e del cancro della pelle risale al 1922, quando Lewandowsky e Lutz descrissero una rara condizione ereditaria, l'epidermodysplasia verruciformis. Particolarmente in siti esposti alla luce, larghe aree della pelle erano coperte da lesioni piatte papillomatose, alcune delle quali potevano convertire in carcinomi squamosi dopo una o due decadi di persistenza.

Negli anni '60 tipiche particelle di HPV furono individuate mediante microscopia elettronica all'interno della lesioni papillomatose, ma non nei tessuti maligni. Nel 1978, Orth e collaboratori riportarono la presenza di specifici tipi di HPV (8, 12, 14, 17 e 20) in lesioni maligne di pazienti affetti da epidermodysplasia. Dati sperimentali supportarono il ruolo di questi virus nella conversione delle cellule epiteliali verso la crescita maligna. In particolare, questo è supportato dallo sviluppo di tumori della pelle in topi transgenici esprimenti i geni precoci di HPV8 e di HPV20. Le verruche e i carcinomi cellulari squamosi (SCC) della pelle si sviluppano come frequente complicazione nei soggetti che hanno subito trapianti di organi. Nonostante sia studiato da più di due decadi, il ruolo di HPV nell'induzione di SCC rimane non chiaro.

Dagli anni '90, è stata più volte dimostrata la pluralità dei tipi di HPV trovati in queste lesioni ma il basso numero di copie di genoma per cellula tumorale e l'alto tasso di casi positivi da campioni di pelle normali rendono difficile l'interpretazioni di questi dati. Così, il ruolo del virus del papilloma nel carcinoma cellulare squamoso della pelle non è ancora del tutto chiarito.

TASSONOMIA E PATOBIOLOGIA DI HPV

Classificazione dei virus del papilloma

I papillomavirus sono un'antica famiglia di patogeni, in grado di infettare i tessuti epiteliali di anfibi, rettili, uccelli e mammiferi. Quasi tutti sono strettamente specifici per il loro ospite naturale e non infettano specie diverse, persino se strettamente correlate.

I papillomavirus umani sono ampiamente diffusi e rappresentano patogeni importanti dal punto di vista medico. Le infezioni possono rimanere sub-cliniche oppure possono essere attive e indurre lesioni epiteliali iperproliferative benigne, denominate verruche, papillomi o condilomi, in base al sito anatomico dell'infezione. Ad oggi, sono stati isolati dalle lesioni, sequenziati e caratterizzati dal punto di vista filogenetico oltre 120 differenti genotipi di HPV². Ogni genotipo è caratterizzato dall'essere differente da un altro per almeno il 10% nella loro sequenza di DNA. Tipi strettamente associati (identici per circa l'80-90%) sono classificati come membri della stessa specie, e tendono a condividere alcune importanti proprietà biologiche come il tropismo tissutale, la manifestazione della malattia e la patogenicità.

A livello evolutivo, gli HPV possono essere classificati in gruppi o generi distinti (Figura1). I due principali generi sono Alpha e Beta, a cui appartengono oltre il 90% dei papillomavirus attualmente caratterizzati.

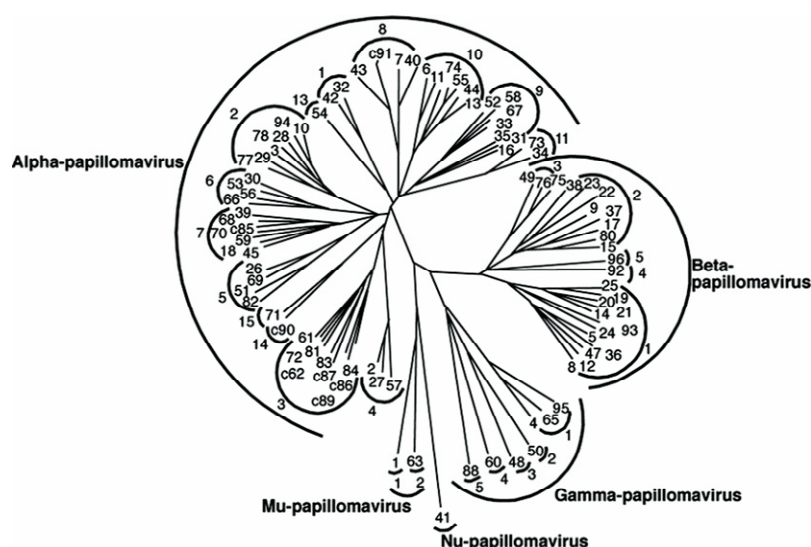


Figura1 | **Albero filogenetico dei virus del papilloma**⁴³.

I Beta papillomavirus sono tipicamente associati ad infezioni cutanee non evidenti ma, in soggetti immunocompromessi e in pazienti affetti da EV (epidermodysplasia verruciformis), questi virus possono portare allo sviluppo di tumore della pelle³. I tipi di HPV appartenenti al genere Alpha, costituito da 15 specie caratterizzate sino ad oggi, infettano il tratto anogenitale, orofaringeo e altre mucose di testa e collo. Questi virus hanno ricevuto la preponderanza di attenzione clinica e di

ricerca perché possono essere trasmessi sessualmente e causare rilevanti patologie. L'Agenzia Internazionale per la Ricerca su Cancro (IARC) ha recentemente stilato una classificazione epidemiologica dei tipi di HPV in base al loro potenziale oncogeno, sulla base dei dati ottenuti da 11 studi caso-controllo condotti tra il 1985 e il 1997 in 9 paesi (Marocco, Mali, Colombia, Brasile, Paraguay, Perù, Thailandia, Filippine, Spagna) che hanno coinvolto 1918 donne con SCC istologicamente confermato e 1928 controlli. Quindici HPV mucosotropici (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82) possono essere considerati ad alto rischio oncogeno (High Risk types, HR); tre sono considerati a probabile rischio oncogeno (26, 53 e 66); e dodici a basso rischio oncogeno (Low Risk types, LR) (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, CP6108)⁴. I tipi LR, come HPV6 e 11, non si integrano nel genoma della cellula ospite e sono associati a verruche benigne e lesioni intraepiteliali squamose (SIL) di basso grado. I tipi a rischio intermedio possono causare SIL di alto grado, ma che raramente progrediscono ad uno stadio invasivo, mentre i tipi HR, come HPV16 e 18, sono fortemente associati a SIL di alto grado e al carcinoma invasivo. I rimanenti HPV sono classificati nei generi Gamma, Mu e Nu e generalmente causano papillomi cutanei e verruche che non progrediscono in tumore.

L'incidenza dei sierotipi nei processi patologici

I tipi di papillomavirus ad alto rischio più frequentemente associati all'insorgenza di tumore appartengono ai gruppi Alpha e Beta (Figura1), tra i quali HPV16 e 18 sono i predominanti. Questi virus sono stati identificati in donne prive di anomalie citologiche, così come in donne affette da lesioni intraepiteliali squamose di basso (LSIL) ed alto grado (HSIL) e/o tumore^{5,6}. Mediante PCR è stato possibile individuare il DNA di HPV16 nel 26% dei casi di LSIL⁷ e nel 63% dei casi di SCC della cervice⁸. HPV18 è il secondo tipo di papillomavirus più comunemente associato a questa patologia (è causa del 10-14% dei casi di SCC della cervice), ma è il primo tipo associato all'adenocarcinoma cervicale (ADC), causa del 37-41%. La prevalenza di infezioni da tipi ad alto rischio tra le giovani donne (età media di 25 anni) è tipicamente del 20-40% in base alla localizzazione geografica. Le infezioni da HPV sono molto comuni in questa fascia di età, con incidenze cumulative di infezione superiore al 60% in alcune popolazioni.

La maggiorparte (80%) delle donne infettate con uno specifico tipo, comunque, non mostreranno nessuna evidenza di quel tipo dopo 18 mesi e generalmente si pensa che un'infezione successiva con lo stesso tipo avvenga con bassa frequenza. Data la prevalenza di tipi genitali di HPV nella popolazione e l'elevato tempo di vita di un'infezione, l'incidenza del cancro cervicale è bassa (circa 0.03%), con la maggiorparte delle infezioni che vengono risolte con successo⁹. Le lesioni cervicali di basso grado (LSIL o CIN di grado 1) causate da tipi ad alto o a basso rischio sono simili alle infezioni produttive nel tipo di espressione genica virale, e le proteine di superficie virale possono normalmente essere individuate nelle cellule della superficie epiteliale. Le lesioni di alto grado (HSIL o CIN di grado 2 o 3) hanno invece una fase proliferativa più estesa.

E' stato stimato che circa il 20% di CIN1 progredirà a CIN2, e che approssimativamente il 30% di queste lesioni progredirà a neoplasie più severe se non trattata. Circa il 40% delle lesioni CIN3 può progredire a cancro, generando neoplasie cervicali all'interno della zona di trasformazione dove le cellule dell'endocervice incontrano le cellule epiteliali squamose dell'ectocervice. E' stato proposto che la zona di trasformazione potrebbe essere un sito sub-ottimale per il completamento del ciclo vitale di tipi ad alto rischio come HPV16. Da notare che le infezioni da HPV ad alto rischio possono essere individuate in diversi siti del tratto anogenitale, incluso la vagina, la vulva e il pene, ma nonostante questa distribuzione, l'incidenza di cancro in queste zone è generalmente bassa (0.001%). Solo nell'ano, in uomini che hanno rapporti sessuali con altri uomini, l'incidenza di cancro associato ad HPV raggiunge livelli che sono simili a quelli trovati nella cervice (0.035%)¹⁰, ed è interessante che in entrambi questi siti suscettibili ci sia una zona di trasformazione. Nella cervice, le cellule di riserva della zona di trasformazione eventualmente formanti l'epitelio squamoso stratificato, e la più alta frequenza di tumori in questi siti potrebbe riflettere il fatto che il virus può accedere a queste cellule basali più rapidamente che in quelle protette da uno strato epiteliale stratificato. Nonostante questa possibilità, sembra che la zona di trasformazione possa in effetti essere un sito dove HPV ad alto rischio non possono propriamente regolare il loro ciclo produttivo, e che la variazione sia nei livelli che nel tempo di espressione delle proteine virali possa sottolineare lo sviluppo del tumore in questi siti.

LA PATOGENESI - Dall'infezione allo sviluppo del tumore cervicale

A livello globale, il tumore cervicale è il secondo tumore più comune nella popolazione femminile. Si stima che nel 2010 si verificheranno 585.278 casi e 327.899 decessi¹¹. Questo tumore, che si origina da un'infezione persistente con tipi di HPV ad alto rischio oncogeno, è il primo ad essere riconosciuto dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) come attribuibile al 100% ad un'infezione. L'incidenza di tumore cervicale è sproporzionatamente alta (>80%) nei paesi in via di sviluppo¹². Non solo è il più comune e importante tumore nella donna in diversi paesi del terzo mondo, ma l'importanza sociale di questa patologia è accentuata dalla giovane età media di morte.

La patogenesi del carcinoma cervicale inizia con l'infezione dell'epitelio cervicale (Figura2). I virioni penetrano nell'epitelio attraverso microabrasioni e invadono le cellule basali dell'epitelio stratificato della zona di trasformazione della cervice uterina, stabilendo il loro genoma come stabili episomi a basso numero di copie (50-100 genomi per cellula). La successiva espressione delle proteine precoci e tardive, insieme alla replicazione del DNA virale dagli episomi, porta all'assemblaggio di una nuova progenie virale che viene rilasciata nello strato superiore dell'epitelio squamoso. Nonostante studi epidemiologici mostrino che la maggiorparte delle infezioni sono benigne e

vengono eliminate entro 12-18 mesi, una frazione delle infezioni può persistere e dare inizio alla trasformazione cellulare. E' l'infezione persistente con tipi di HPV ad alto rischio che è necessaria (ma non sufficiente) per lo sviluppo di carcinoma squamoso della cervice. Questo tumore è caratterizzato da una ben definita fase pre-maligna che può essere identificata mediante esame citologico delle cellule cervicali e confermata dall'esame istologico del materiale cervicale (Figura3). I cambiamenti pre-maligni rappresentano uno spettro di anomalie istologiche caratterizzate da una architettura cellulare ed epiteliale anomala nell'area circostante la giunzione tra l'epitelio squamoso e la zona di trasformazione della cervice uterina.

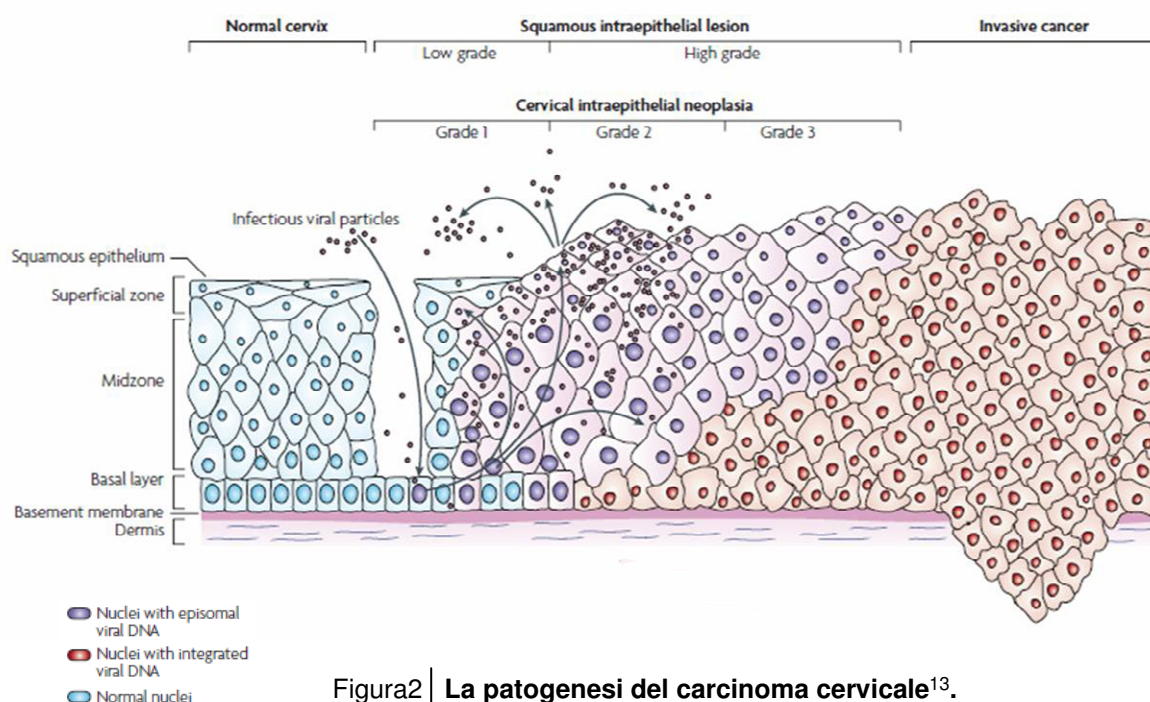


Figura2 | **La patogenesi del carcinoma cervicale**¹³.

L'ingrandimento del nucleo, l'ipercromasia, la binucleazione, la presenza di mitosi anomale, l'orientazione cellulare irregolare, la differenziazione epiteliale alterata e l'aumentata attività mitotica sono alcune delle caratteristiche tipiche di questa displasia. La prima lesione pre-maligna è denominata SIL di basso grado (LSIL o CIN1) e raramente progredisce a tumore invasivo. In questo stadio, il DNA di HPV è ancora episomale. In donne immunocompetenti, la maggiorparte dei LSIL regredisce senza intervento medico. Al contrario, pazienti con SIL di alto grado (HSIL o CIN2, 3), in particolare quelli affetti da immunodeficienze (e.g., positivi all'HIV) o immunosoppressi, mostrano patologie persistenti correlate ad HPV. Le HSIL sono associate ad un elevato tasso di progressione a carcinoma cervicale invasivo, caratterizzato dall'integrazione del genoma virale in quello della cellula ospite, e una meno frequente regressione spontanea¹⁴.

Lo sviluppo del tumore della cervice uterina può essere suddivisa in quattro fasi principali – la trasmissione di HPV, la persistenza virale, la progressione a lesione precancerose e l'invasione –

che possono essere chiaramente distinte tra di loro (Figura3). In alcuni casi possono avvenire step all'indietro, principalmente dovuti all'eliminazione dell'infezione e meno frequentemente alla regressione della lesione pretumorale ad una situazione di normalità. La virologia molecolare sottolinea che la persistenza di HPV, la progressione e l'invasione non sono completamente comprese, ma questo modello causale è supportato da dati epidemiologici e sperimentali e non richiede meno affidabili distinzioni basate sulle anomalie citologiche visualizzabili al microscopio.

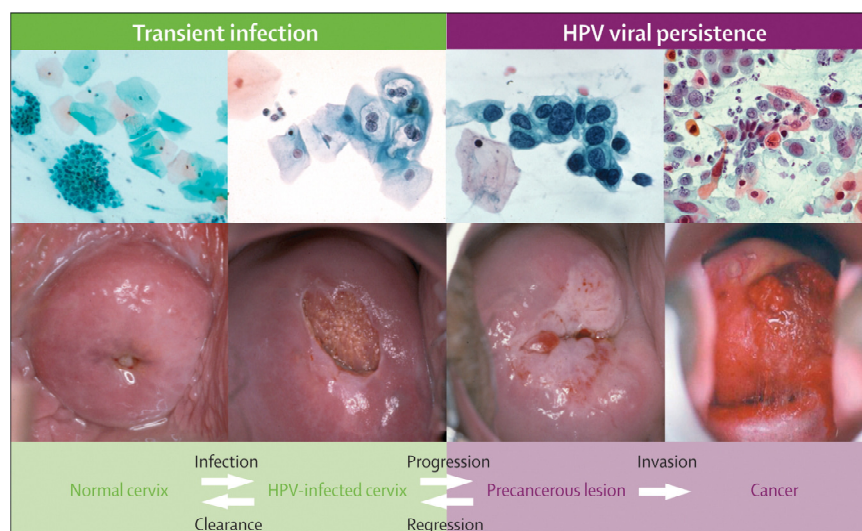


Figura3 | **Le fasi principali dello sviluppo del carcinoma cervicale**¹⁶.

La trasmissione di HPV

Le infezioni anogenitali sono trasmesse principalmente mediante contatto pelle-pelle o mucosa-mucosa. La probabilità di infezione attraverso l'atto sessuale non è conosciuta ma è chiaramente alta, con nessuna differenza riscontrata tra i diversi sierotipi di HPV.

Data la loro comune via di trasmissione, gli HPV tendono ad essere trasmessi insieme, risultante in una elevata proporzione (20-30%) di infezioni simultanee. Gli uomini sono spesso infettati da diversi tipi di HPV contemporaneamente, e questo implica che un atto sessuale potrebbe trasmettere diversi sierotipi alla volta.

In modo indipendente dal tipo, le particelle virali infettive raggiungono le cellule germinali dello strato basale presumibilmente mediante piccole lacerazioni della mucosa. La maggiorparte delle donne nel mondo sono infettate con almeno uno dei numerosi sierotipi durante la loro vita sessuale¹⁵. La totale esposizione è però difficile da misurare perché l'individuazione del DNA è transiente e la serologia è poco accurata. Così, una sostanziale proporzione di donne risultate negative sia per la presenza di DNA di HPV che per i livelli anticorpali generati, potrebbe comunque essere stata esposta al virus.

Eliminazione o persistenza dell'infezione

La maggiorparte delle infezioni cervicali da HPV sono eliminate o sopresse dall'immunità cellulo-mediata entro 1-2 anni dall'esposizione¹⁷ (Figura4). I tipi di HPV più persistenti tendono ad essere i più comuni. Questa corrispondenza è attesa in quanto la prevalenza è uguale all'incidenza moltiplicata per la durata (i.e., la persistenza). In caso di prolungata persistenza con un dato tipo, la probabilità di una successiva eliminazione oltre un dato intervallo diminuisce e il rischio di diagnosi di lesioni pretumorali aumenta¹⁸.

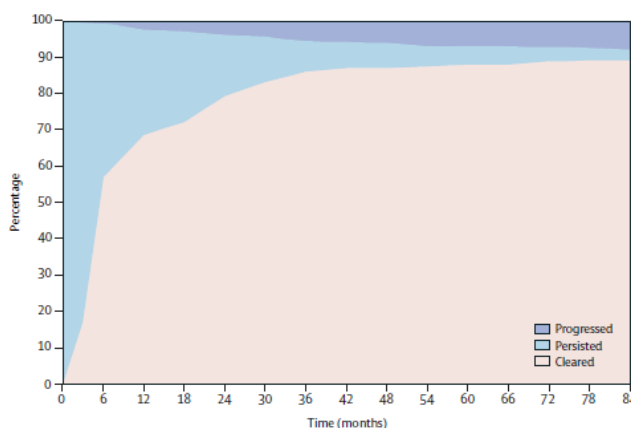


Figura4 | **Eliminazione, persistenza e progressione dell'infezione da HPV¹⁶.**

Le infezioni più diffuse persistono più a lungo in donne di età avanzata rispetto alle più giovani, probabilmente perché loro sono più adatte a sostenere infezioni già di lunga durata. Il tempo medio di eliminazione di infezioni da HPV è di circa 6-18 mesi¹⁸. Non c'è una definizione accettata di persistenza importante dal punto di vista clinico, ma strategie di *follow-up* hanno dimostrato che anomalie persistenti per più di un anno (e specialmente per 2 anni) sembrano fornire al paziente un elevato rischio di progressione dell'infezione. I dati ottenuti da studi con oltre 10 anni di *follow-up* hanno mostrato che, dopo l'eliminazione dell'infezione, può occasionalmente ricomparire lo stesso tipo di papillomavirus¹⁹. Che le infezioni si risolvano mediante la completa eliminazione del patogeno o mediante il mantenimento di uno stato latente nell'epitelio cellulare basale, nel quale il virus si replica a livelli estremamente bassi, non è ancora chiaro. Nelle popolazioni con un picco secondario di infezione da HPV (eg, donne nel periodo post-menopausa), potrebbe avere un ruolo fondamentale la riattivazione dalla latenza dovuta alla senescenza della risposta immunitaria cellulo-mediata, così come nuovi partner sessuali. Tuttavia, donne di età avanzata con un lungo periodo senza segni citologici dell'infezione da HPV mostrano una percentuale di rischio molto basso di sviluppare carcinoma cervicale, suggerendo che la riattivazione dalla latenza generalmente non è nociva²⁰.

Progressione a lesioni precancerose

In termini istopatologici, le lesioni precancerose includono le lesioni CIN3, displasia severa o discariosi, o il carcinoma in situ (Figura3). In queste lesioni, le cellule indifferenziate con anomalie genetiche alterano e sostituiscono la normale compattezza dell'epitelio cervicale. Discutere quali lesioni non rappresentano una fase pretumorale è fondamentale per la specificità della diagnosi. Le lesioni CIN di grado 2 sono eterogenee: a volte sono generate da tipi non carcinogenici di HPV e quindi il potenziale tumorale è spesso equivoco. Al contrario, le lesioni CIN1 sono un segno istopatologico indifferente, e non sono considerate lesioni pretumorali. Un attento studio di casi di CIN1 confermati a livello istologico ha rivelato che queste lesioni attualmente rappresentano un più basso rischio di progressione a tumore cervicale rispetto all'interpretazione citologica di lesioni intraepiteliali squamose di basso grado²¹. La diagnosi di CIN1 incorpora infatti gli errori strumentali, di processazione e interpretazione di biopsie basate su limitati campioni colposcopici, sebbene una diagnosi sia difficilmente riproducibile anche quando fatta su campioni tissutali più ampi.

Il periodo che intercorre tra l'infezione e la comparsa della prima evidenza microscopica di lesione precancerosa può essere sorprendentemente breve, spesso entro i 5 anni²². Di fatto, alcune di queste lesioni sono state diagnosticate entro due anni dall'inizio dell'attività sessuale. Il significato biologico e l'importanza clinica di queste anomalie precoci sono sconosciute. L'età media di diagnosi varia dai 25 ai 35 anni e dipende sia dall'età media di inizio dei rapporti sessuali, che possono servire per il primo contatto diretto con il patogeno, che dalla frequenza con cui vengono condotti gli *screening*.

I fattori di rischio per la persistenza non sono ancora stati completamente chiariti. Il tipo di HPV responsabile dell'infezione è il più importante fattore che influenza il rischio assoluto di persistenza virale e quindi di progressione a lesioni precancerose. HPV16 è straordinariamente carcinogenico, con un rischio assoluto di diagnosi pretumorale di circa il 40% dopo 3-5 anni di infezione persistente²³. Il rischio totale di sviluppare queste lesioni per una donna infettata da diversi tipi di HPV è più elevato se confrontato con quello di donne infettate con un solo tipo, ma non è chiaro se il suo rischio sia più alto della somma dei rischi correlati ai singoli tipi di papillomavirus. Il rischio di carcinoma cervicale è principalmente una funzione dell'infezione da HPV e della mancanza di *screening* efficaci. I fattori esterni, eccetto quest'ultimo, hanno generalmente un impatto minore rispetto al rischio primario estremamente alto correlato alla presenza di un tipo di HPV oncogeno. Il fumo²⁴, l'elevato numero di gravidanze²⁵, l'uso di contraccettivi orali per lunghi periodi²⁶ possono raddoppiare o triplicare il rischio di sviluppare un tumore in donne già infettate con HPV ad alto rischio oncogeno. Il ruolo di infiammazioni croniche²⁷, specialmente dovute a coinfezioni con *Chlamydia trachomatis*, è meno certo. Tra le donne infettate, uno stato socioeconomico basso potrebbe rimanere un fattore di rischio persino quando vengono condotti i controlli medici adeguati. E' interessante notare che alcuni dati preliminari sembrano associare l'uso del preservativo alla regressione della persistenza infettiva²⁸. Il ruolo fondamentale ed essenziale nella risoluzione dell'infezione da HPV è svolto dalla risposta immunitaria (sia umorale

che cellulo-mediata) dell'ospite. Questo verrà trattato in modo approfondito, in tutti i suoi aspetti, nel capitolo 1.2 di questo lavoro.

Il carcinoma cervicale invasivo

In una popolazione in cui non vengono diffusi i programmi di *screening* preventivo, il picco di rischio di sviluppare un carcinoma cervicale si manifesta prima rispetto agli altri tumori dell'adulto, raggiungendo una fase di *plateau* dai 35 ai 55 anni circa. Questa distribuzione è dovuta al fatto che il tumore della cervice si origina principalmente dalle infezioni di HPV trasmesse sessualmente nella tarda adolescenza e all'inizio dell'età adulta.

Il numero di lesioni precancerose è molto più elevato rispetto ai casi di tumore, suggerendo che solo una minoranza di queste risulta invasiva. La precisa importanza e il tempo di rischio di invasione, se le lesioni pretumorali non fossero trattate, rimarranno sconosciute per ovvi motivi etici. A parte l'età, i fattori di rischio per l'invasione sono sconosciuti eccetto per il tipo virale; in particolare, HPV16, HPV18 e HPV45 sono stati individuati in una più elevata percentuale di tumori che in pretumori, rispetto agli altri tipi di HPV²⁹.

DATI EPIDEMIOLOGICI

Il carcinoma cervicale è il secondo cancro più comune nella popolazione femminile a livello mondiale, con una stima di circa 585.278 casi e 327.899 decessi previsti nel 2010¹¹. Circa l'83% dei casi si verificano in paesi in via di sviluppo, dove il cancro cervicale rappresenta il 15% dei tumori femminili, con un rischio pari a 1,5% in donne di età compresa tra 0 e 64 anni. Invece, nei paesi sviluppati, il cervicocarcinoma rappresenta il 3,6% dei nuovi cancro con un rischio cumulativo nella stessa fascia di età pari a 0,8%¹². Le aree con maggiore incidenza sono: Africa Sub-Sahariana, Malesia, America Latina e Caraibica, Asia Sud-Centrale e Asia Sud-Orientale. In generale i tassi più bassi (inferiori a 15 per 100.000) sono rilevati in Nord-America, Giappone ed Europa (Figura5).

La distribuzione dell'infezione in donne con citologia normale

La maggiorparte delle donne sarà infettata dal virus del papilloma nel corso della loro vita. I dati più completi disponibili ad oggi sulla prevalenza dell'infezione da HPV in donne con una normale citologia derivano da una meta-analisi globale della letteratura pubblicata nel 2007 e compilata dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) e dal Centro di Informazione su HPV e cancro cervicale dell'Istituto di Oncologia Catalano (ICO) (<http://www.who.int/hpvcentre/en/>)^{30,31}. Lo studio include pubblicazioni dal 1999 al 2005 su 157.897 donne con una citologia normale, escludendo specificatamente donne con qualsiasi anormalità. La prevalenza stimata è aggiustata secondo il

modello e tiene conto della variabilità nella progettazione dello studio e nei diversi saggi utilizzati per l'individuazione di HPV.

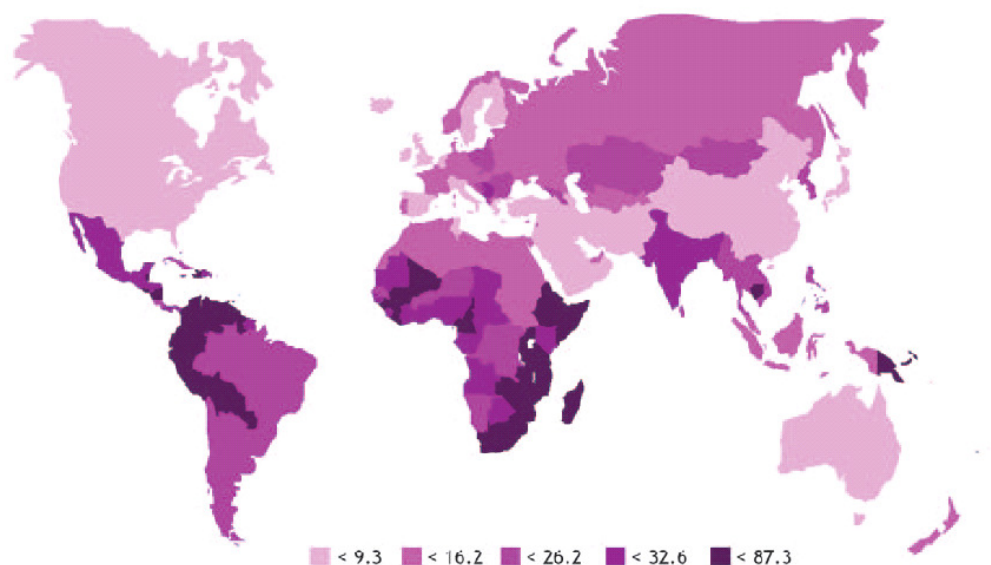


Figura5 | **Incidenza annuale (per 100.000) di carcinoma cervicale nel mondo¹².**

I risultati indicano che in un dato momento, il 10.4% (95% Intervallo di Confidenza, CI:10.2-10.7) delle donne nel mondo saranno positive alla presenza del DNA di HPV nella cervice. La prevalenza di HPV è più alta nei paesi meno sviluppati (13.4%; 95% CI:13.1-13.7) che nelle regioni più sviluppate (8.4%; 95% CI:8.3-8.6). Le donne africane (22.1%; 95% CI:20.9-23.4), in particolare quelle dell'Africa orientale, hanno la più alta prevalenza di HPV (31.6%; 95%CI:29.5-33.8) mentre la più bassa stimata è nell'Asia sud-orientale (6.2%; 95% CI:5.5-7.0).

Risultati simili sono stati osservati in uno studio dell'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) condotto su 15.613 donne di età compresa tra 15 e 74 anni provenienti da 11 paesi del mondo. La prevalenza di HPV era del 10.5% (95% CI:9.9-11)³².

In tutti i continenti, HPV16 è il più comune tipo di papillomavirus, con una prevalenza stimata del 2.6% (95%CI: 2.5-2.8) a livello mondiale, con valori compresi tra il 3.5% (95%CI: 2.8-4.3) nel nord America e il 2.3% (95%CI: 2.0-2.5) in Europa³⁰. HPV18 è il secondo tipo più frequentemente identificato dopo HPV16, in Europa, nel centro e nel sud America. In Africa, HPV52 è il secondo tipo più frequente e HPV18 il terzo. In Asia, HPV18 è il quarto più frequente dopo HPV16, HPV52, HPV58. Anche nel nord America HPV18 è il quarto dopo HPV16, HPV53, HPV52. In Europa, Asia e nord America tutti i tipi individuati, con l'eccezione di HPV16, hanno una prevalenza stimata inferiore all'1%. Al contrario, in Africa e nel sud e centro dell'America diversi altri tipi mostrano una prevalenza superiore o uguale all'1%. In Africa, i tipi 58, 31, 35, 42, 66, 53, 45, 56 e 33 sono

frequentemente osservati, mentre HPV51, 71, 70 e 62 sono frequentemente identificati in altre regioni del Mondo. Da notare che HPV45, un tipo molto comune nell'ICC, è il nono più frequentemente individuato nelle donne con normale citologia.

La Figura6 mostra la prevalenza del DNA di HPV per continenti e per gruppi di età, includendo sia i tipi a basso che ad alto rischio oncogeno. La prevalenza di HPV è alta (oltre il 30%) in giovani donne in tutte le regioni, eccetto in Asia³³. La prevalenza declina nel gruppo di età media mentre un picco di innalzamento si osserva in donne di età compresa tra 35-44 e 45-54 anni. Non è chiaro a questo stadio se il secondo aumento negli anni prossimi alla menopausa sia dovuto ad un aumento nei tipi a basso rischio, come suggerito da alcuni ricercatori^{34,35}.

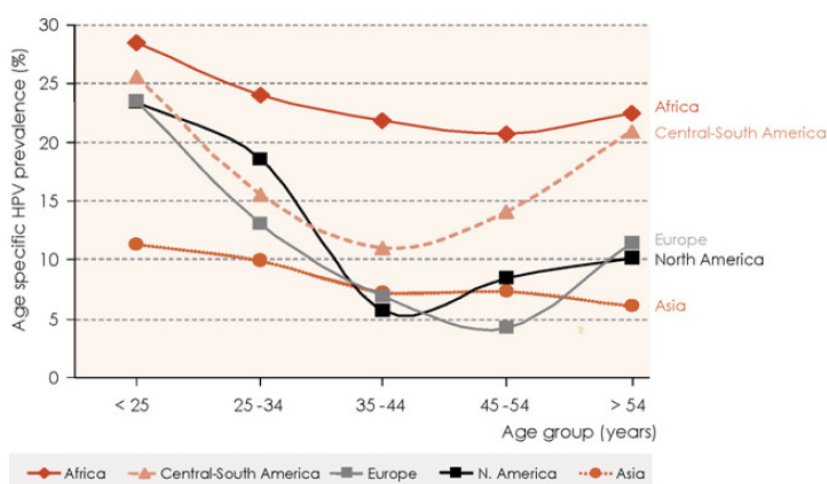


Figura6 | La prevalenza di HPV in base all'età, in cinque regioni del mondo³³.

La distribuzione dell'infezione in donne con lesioni HSIL

Studi di cross-sezione della storia naturale del carcinoma cervicale indicano che il contributo del DNA di HPV nelle lesioni intraepiteliali squamose di alto grado (HSIL), che rappresentano il precursore morfologico dell'ICC, è di oltre l'85%²⁹. Questo è evidente per la neoplasia intraepiteliale di grado 3 (CIN3) che ha una sostanziale variabilità nella diagnosi e nella prognosi. HPV è identificato virtualmente nel 100% dei casi di ICC. Deviazioni da queste stime sono normalmente dovute a variazioni nella qualità dei campioni testati e nella sensibilità dei saggi utilizzati. La valutazione del contributo relativo (la proporzione) di ogni tipo di HPV tra donne positive al saggio tende ad essere meno influenzato dalla sensibilità del test e permette la stima delle variazioni tra geografiche che potrebbero essere indicative di reali differenze a livello mondiale. Studi di meta-analisi presenti in letteratura^{8,29} hanno identificato i dieci tipi più comuni di HPV in HSIL, nei cinque continenti. HPV16 era ancora il tipo più comune con un contributo che va

dal 51.8% (95% CI:50.1-53.5) in Europa al 33.3% (95% CI: 20.4-48.4) in Ocenia. Stime mondiali hanno mostrato che HPV16 era responsabile del 45.4% di tutte le lesioni di alto grado. Mentre in Africa e in Europa HPV31 e HPV33 erano rispettivamente i secondi e i terzi più comuni, queste posizioni corrispondevano a HPV58 e HPV18 in America Latina e Caraibica, HPV6 e HPV18 in nel nord America, HPV58 e HPV52 in Asia e HPV31 e HPV18 in Oceania.

La distribuzione dell'infezione in donne con ICC

La tabella1 mostra l'ordine della distribuzione di HPV nel carcinoma cervicale invasivo (ICC), sulla base di dati disponibili da tre risorse: 1) lo studio condotto dallo IARC su oltre 3.000 casi di ICC³⁶; 2) una meta-analisi coordinata dallo IARC comprendente 14.500 casi²⁹; 3) un'indagine internazionale coordinata dall'ICO comprendente quasi 9000 casi³⁰. Tra le donne affette da ICC, c'è una consistente frequenza tra i tre studi per l'attribuzione delle prime posizioni, occupate da HPV16, 18, 33, 45, 31, 58, 52 e 35. Secondo questi dati, il contributo di HPV16 e 18 all'ICC è di circa il 70%.

Ranking	IARC Study ³⁶ N=3,085 HPV type	IARC Meta-analysis ²⁹ N= 14,500 HPV type	ICO Study ³⁰ N= 8,785 HPV type
1st	-16	-16	-16
2nd	-18	-18	-18
3rd	-45	-33	-45
4th	-31	-45	-31
5th	-33	-31	-33
6th	-52	-58	-52
7th	-58	-52	-35
8th	-35	-35	-58

Tabella1 | **Classifica dei tipi più comuni di HPV da tre differenti analisi³³.**

Diverse meta-analisi condotte tra i cinque continenti^{8,29,31} hanno studiato la distribuzione dei genotipi di HPV in ICC. In aggiunta al dato ormai noto che HPV16 e 18 sono i tipi più diffusi in tutti i continenti, sono stati consistentemente identificati i tipi 33, 45 e 31 tra la terza e la quinta posizione, con l'eccezione dell'Asia, dove i tipi più comuni sono 58, 33, 52. Sulla base di precedenti studi sull'ICC e ignorando temporaneamente l'impatto della cross-protezione tipo specifica degli attuali vaccini contro il virus del papilloma, i vaccini di prossima generazione, volti a coprire oltre il 90% dei tipi oncogeni, dovrebbero focalizzarsi sui tipi 16, 18, 45, 31, 33, 52, 35, 58, 39 (i più prevalenti in America Latina) e 51 (con alta prevalenza in Africa).

La Tabella2 mostra la prevalenza dei genotipi più comuni di HPV in campioni con una citologia normale, HSIL, SCC e ADC^{29,30,31}. I valori rappresentano le infezioni per tipo.

HPV16 è il tipo più comune indipendentemente dalla diagnosi. L'aumentata individuazione di questo sierotipo in donne con una citologia normale rispetto a donne affette da HSIL, SCC o ADC è evidente. HPV18 è il secondo tipo più prevalente tra le lesioni cervicali e domina nell'ADC.

HPV45, un'infezione poco comune tra le donne con una normale citologia, mostra una prevalenza del 2.3% in HSIL e la sua frequenza raddoppia (4.6-5%) in ICC. Al contrario, HPV58 un tipo relativamente comune tra le donne con una normale citologia e lesioni HSIL, ha una bassa frequenza in donne con ICC. Un altro interessante dato è la bassa prevalenza di HPV33 e HPV52 e l'alta prevalenza del gruppo denominato 'altri' tra i casi di ADC.

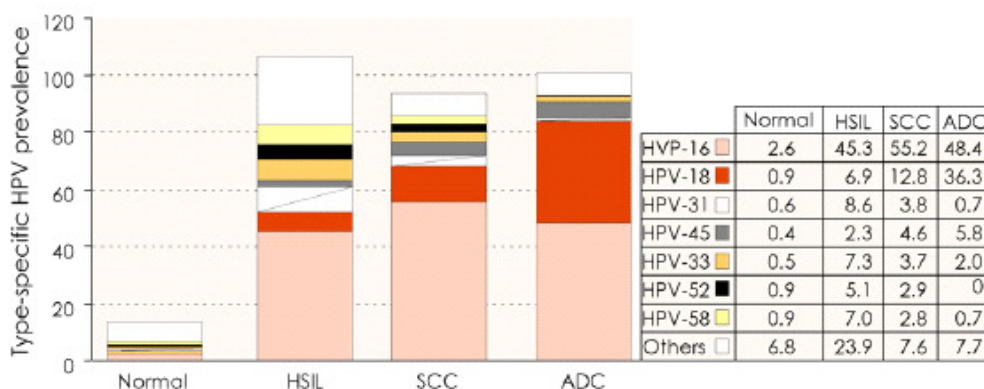


Tabella2 | **Prevalenza di HPV tipo-specifica in patologie cervicali³³.**

Gli adenocarcinomi comprendono circa il 16% di tutti i carcinomi cervicali e questo è consistente con quanto riportato nel registro tumori³⁷. Comunque, i paesi sviluppati che prevedono programmi di *screening* tendono a riferire tassi di incidenza e frequenze relative di ADC crescenti (oltre il 20% dei casi di tumore cervicale registrati). L'aumentato contributo di questi cancro al tumore cervicale è attribuito alla bassa efficacia dei programmi di *screening* basati sulla citologia di identificare i suoi precursori, insieme all'aumento naturale nell'esposizione ad HPV delle generazioni più giovani, seguito da cambiamenti significativi nel comportamento sessuale delle popolazioni.

12.

BIOLOGIA DI HPV

Il ciclo vitale dei virus del papilloma differisce da quello delle altre famiglie virali: l'infezione richiede infatti la disponibilità di cellule ancora in grado di proliferare. In queste cellule, l'espressione di specifici geni virali attiva la fase proliferativa e la conseguente espansione dell'infezione.

Studi recenti sottolineano l'importanza della risposta immunitaria dell'ospite nell'inibizione della persistenza virale. Questi e altri aspetti molecolari della storia naturale dell'infezione da HPV verranno trattati in questo capitolo.

CARATTERISTICHE GENOMICHE E STRUTTURALI

L'organizzazione del genoma

L'organizzazione del genoma è conservata tra i papillomavirus umani e animali, sebbene con alcune differenze. Esso è costituito da una molecola di DNA a doppio filamento, la cui dimensione varia da 7600 a quasi 8000 bp, organizzata in strutture istoniche.

Nella sua struttura si possono individuare una regione regolativa e una regione codificante.

Regione Regolativa – detta Long Control Region (LCR), le sue dimensioni variano notevolmente tra i genomi dei diversi tipi di HPV. In media rappresenta il 5% del genoma virale, con una lunghezza che varia da 400 a 1000 bp. All'interno di questa regione sono concentrate le sequenze regolatorie richieste per la replicazione e la trascrizione virale, tra cui l'origine di replicazione del DNA, i promotori precoci e i siti di legame per i fattori di trascrizione (Figura7).

Regione Codificante - si suddivide in una porzione Early (E) codificante per proteine virali precoci e una regione Late (L) codificante per quelle tardive (Figura7). La prima rappresenta il 45% del DNA virale e contiene sei geni espressi nella fase iniziale del ciclo replicativo, che codificano per proteine non strutturali, denominate da E1 a E8. Questa regione è implicata nella replicazione virale e nell'oncogenesi (produce proteine ad azione trasformante in grado di indurre proliferazione e immortalizzazione delle cellule umane). La seconda corrisponde al 40% del DNA, ed è una regione molto conservata che codifica per le proteine strutturali capsidiche L1 e L2.

Il mantenimento della replicazione del DNA virale a basso numero di copie avviene nei cheratinociti dell'epitelio basale e parabasale. Al contrario, l'amplificazione del DNA ad alto numero di copie e la trascrizione di elevati livelli di RNA avvengono primariamente nelle cellule spinose in fase di differenziazione (Figura7).

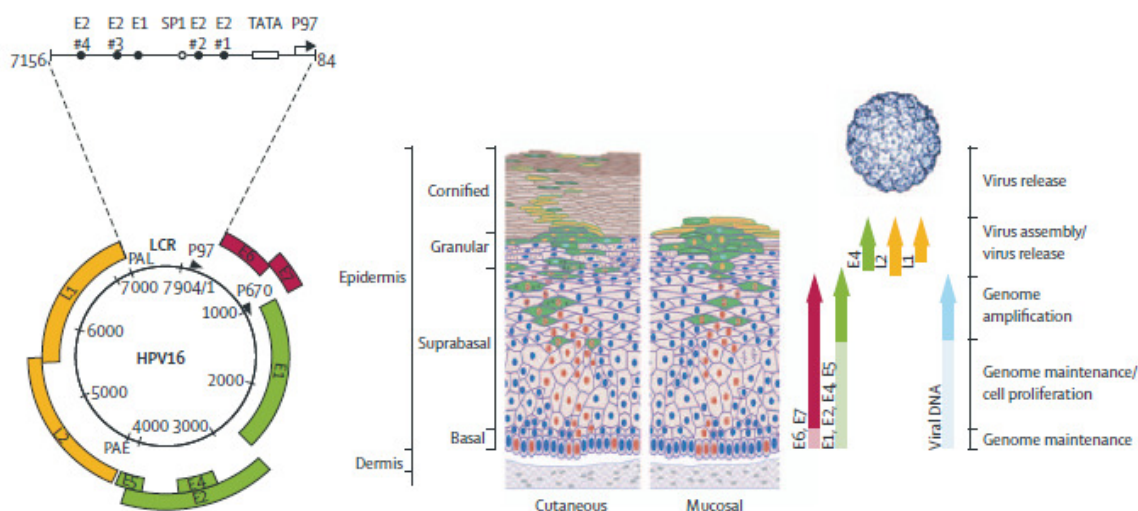


Figura7 | **Organizzazione del genoma di HPV e la sua espressione nell'epitelio**¹⁶.

Dato che queste cellule sono bloccate nel normale ciclo cellulare e non producono più enzimi e substrati che sono essenziali per la replicazione del DNA, il virus deve riattivare la sintesi dei deossiribonucleotidi trifosfati (dNTP) e del macchinario replicativo del DNA per replicare o amplificare il suo genoma. Le proteine E sono deputate a questa funzione. Brevemente, E1 ed E2 sono implicate direttamente nella replicazione del DNA virale, mentre E6 ed E7, e probabilmente E5, le tre oncoproteine virali, condizionano le cellule differenziate a supportare l'amplificazione del DNA di HPV, inattivando i principali soppressori tumorali e attivando la trasduzione del segnale. Le oncoproteine virali, inoltre, modulano l'immuno sorveglianza dell'ospite per stabilire la persistenza dell'infezione. Le proteine strutturali L1 e L2 assemblano il DNA neoreplicato dando origine ad una nuova progenie virale che viene liberata nello strato superficiale dell'epitelio squamoso.

La funzione delle proteine virali

Di seguito è riportato un sommario delle funzioni principali delle proteine virali.

E1 - svolge un ruolo importante nella fase iniziale della replicazione del genoma virale, in collaborazione con E2. Viene codificata a partire dall'ORF E1, che è la più grande e meglio conservata ORF tra i diversi sottotipi degli HPV, a dimostrazione del suo ruolo cruciale durante la replicazione virale. La proteina svolge un'attività ATPasica e 3'-5' elicasica ed è necessaria per

l'inizio della sintesi e per l'allungamento del DNA virale, in quanto riconosce regioni ricche di AT situate all'origine della replicazione. Studi di mutagenesi hanno dimostrato che E1 è indispensabile per il mantenimento del DNA in forma plasmidica e, in assenza di E1, il genoma virale può essere espresso solo in forma integrata.

E1 interagisce, oltre che con E2, con numerose altre proteine cellulari, quali la subunità p180 della DNA polimerasi α cellulare e recluta il macchinario di replicazione cellulare a livello del sito di origine della replicazione del genoma virale. E1 lega inoltre il complesso ciclina E-Cdk2, specifico della fase S del ciclo cellulare, contribuendo ad un'efficiente replicazione virale in associazione alla replicazione cellulare.

E2 - è un'importante regolatore della replicazione e della trascrizione virale; la proteina è conservata tra le diverse sottofamiglie degli HPV, ha un peso molecolare di 50 kD ed è attiva sotto forma di dimeri. E2, così come E1, è espresso a partire da un promotore precoce, svolgendo pertanto un ruolo attivo nel controllare il numero di copie di genoma virale nelle cellule indifferenziate. E2 è importante anche nel regolare la trascrizione virale a livello di promotori precoci; esiste in due forme: a piena lunghezza, E2TA, con attività di attivatore o repressore della trascrizione e troncato, E2TR e E8E2, repressori della trascrizione. Il ruolo di E2TA nel mantenimento dei plasmidi virali è dovuto alla sua capacità di legare tali plasmidi ai cromosomi implicati nella mitosi cellulare, in modo tale che il genoma virale sia racchiuso nel nucleo cellulare quando questo si riforma durante la telofase. I siti di legame per E2 sono localizzati vicino ai siti di legame per i fattori di trascrizione cellulari che attivano i promotori precoci. A bassi livelli, E2 si lega a specifiche sequenze di riconoscimento e attiva i promotori precoci, mentre a concentrazioni elevate reprime la trascrizione bloccando il legame dei fattori di trascrizione. Il ruolo di E2 come repressore è molto importante nel regolare i livelli di E6 e E7, le due principali oncoproteine virali e la sua perdita è il primo stadio di trasformazione neoplastica.

E4 - nonostante la sua inclusione tra le proteine precoci, è espressa tardivamente nel ciclo di replicazione virale ed è una delle proteine più abbondanti presenti durante il ciclo virale. Tuttavia, il suo ruolo non è del tutto chiaro: infatti, nonostante sia espressa ad alti livelli nei tessuti infettati e non sia rilevabile all'interno delle particelle virali mature, non si sa quale sia la sua funzione nel ciclo vitale del virus. Studi di mutagenesi effettuati sul gene E4 in BPV1 (Bovine Papilloma Virus type-1) evidenziano che E4 non è essenziale alla replicazione o alla trasformazione virale. E' stato osservato che E4 di HPV16 svolge un ruolo nell'infezione produttiva: la proteina si trova associata al citoscheletro di citocheratina, di cui induce il collasso, che presumibilmente contribuisce alla liberazione della progenie virale³⁸. Non si è tuttavia osservato il collasso di filamenti intermedi di cheratina in cellule esprimenti E4 di HPV1, mettendo così in discussione la generalità di questi effetti. I dati attualmente disponibili sono compatibili con la possibilità che E4 potrebbe essere

coinvolta nella replicazione del DNA virale, attraverso l'alterazione dell'ambiente extracellulare in modo tale da favorire i processi di sintesi o il rilascio del virus.

E5 – è una piccola proteina di membrana multifunzionale, localizzata principalmente nel reticolo endoplasmico. Essa può avere un ruolo trasformante nelle fasi iniziali dell'infezione, durante le quali il virus è presente in forma episomale, predisponendo la cellula a successivi stimoli mitogeni. E5 contrasta i meccanismi di inibizione della crescita, formando un complesso con il recettore per il fattore di crescita epidermale (EGF). Inoltre la proteina E5 si lega a una subunità dell'ATPasi vacuolare, interferendo con l'acidificazione degli endosomi e alterando così il traffico, il ricambio e la trasduzione di EGF e di recettori tirosina chinasi correlati, e quindi modulando la crescita cellulare³⁹. E5 svolge altre molteplici funzioni: attiva la trasduzione del segnale per la mitosi tramite fattori di trascrizione come c-jun e c-fos, inattiva la p21 e previene inoltre l'apoptosi in seguito ad un danno al DNA. Tuttavia il suo ruolo nei processi di trasformazione è secondario, in quanto la sua espressione viene persa in seguito all'integrazione del genoma virale.

E6 – questa proteina interagisce con numerose proteine cellulari e interferisce con la loro funzione (Figura8). L'attività più studiata di E6 è la sua abilità di indurre la degradazione della proteina p53. E6 forma un complesso con un'altra proteina cellulare, la E6-AP (E6-Associated Protein). Questo complesso si comporta da ubiquitina-ligasi favorendo l'ubiquitinazione della p53 e la sua proteolisi a carico dei proteosomi. Poiché il compito primario di questa anti-oncoproteina è bloccare il ciclo replicativo in fase G1 e promuovere l'apoptosi di cellule che abbiano subito lesioni genomiche, la sua proteolisi indotta da E6 si traduce in una prolungata sopravvivenza delle cellule infettate e in una loro maggiore proliferazione.

Recentemente è stato dimostrato che E6 regola p53 anche indirettamente, associandosi a fattori di regolazione trascrizionale, come p300 e CBP (CREB Binding Protein) per inibirne la trascrizione; E6 può interferire con la via apoptotica grazie alla sua associazione con Bak, un membro della famiglia Bcl-2, che esercita funzioni pro-apoptotiche. Analogamente agli effetti indotti su p53, E6 induce la degradazione di Bak in modo ubiquitina-dipendente⁴⁰. E6 presenta anche un'attività importante per l'immortalizzazione di cellule umane attraverso l'interazione con proteine della famiglia dei PDZ (Protein Domain Z); queste proteine sono importanti per il mantenimento dell'architettura molecolare al fine di rendere possibile la trasmissione del segnale. L'unione all'estremità C-terminale delle proteine E6 ad alto rischio porta alla loro degradazione. Recentemente si è visto che le proteine E6 dei tipi ad alto rischio possono attivare la trascrizione della subunità catalitica della telomerasi hTERT (human Telomerase Reverse Transcriptase) attraverso l'azione combinata di Myc e Sp1, evento chiave nell'immortalizzazione dei cheratinociti primari⁴¹. È stata dimostrata un'ulteriore interazione tra E6 e IRF-3 (Interferon Regulatory Factor-3), un regolatore trascrizionale positivo del promotore dell'interferone, il quale si attiva in risposta ad infezioni virali. Il legame E6/IRF-3 inibisce la funzione di transattivazione di IRF-3 e questo

potrebbe spiegare la capacità degli HPV ad alto rischio di eludere la risposta immunitaria nelle cellule infettate⁴².

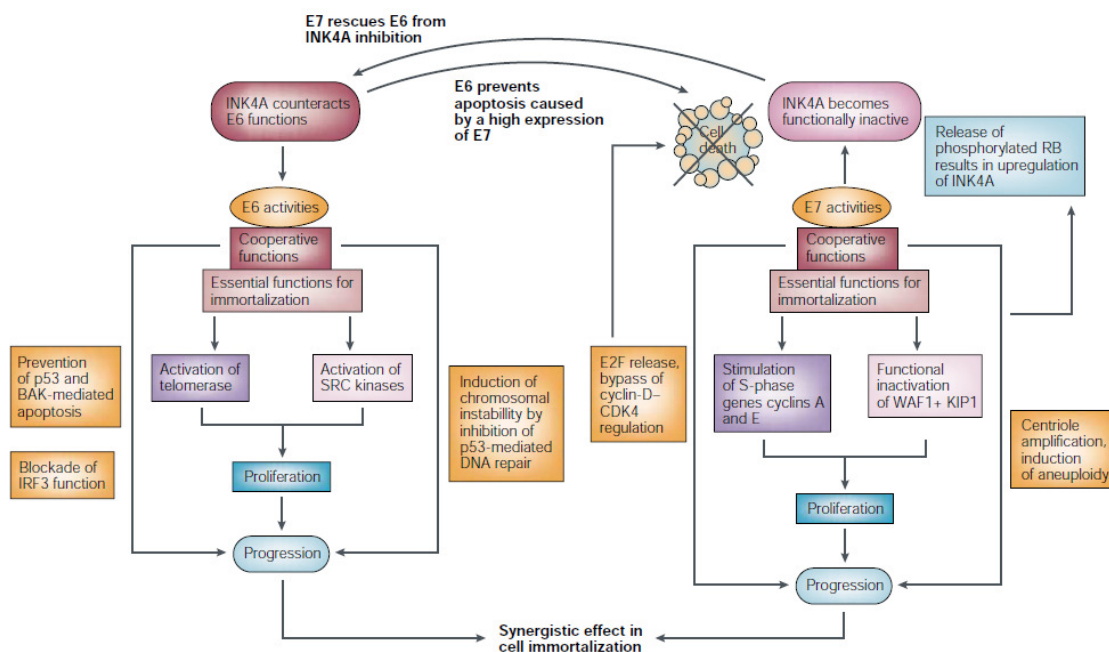


Figura8 | Le funzioni delle oncoproteine E6 ed E7⁴⁸.

E7 - è una fosfoproteina che interagisce con numerose proteine cellulari: fattori di trascrizione e proteine che rimodellano la cromatina, regolatori negativi del ciclo cellulare, e componenti della risposta immunitaria innata.

Il ruolo principale di E7 riguarda la sua capacità di associarsi alle proteine appartenenti alla famiglia del retinoblastoma (Rb): pRb, p107 e p130. Normalmente nel nucleo delle cellule in fase G1 la proteina pRb forma complessi con l'eterodimero E2F e con altri fattori che attivano la trascrizione dei geni richiesti per l'avvio della fase S bloccandone l'azione. Se la cellula riceve uno stimolo proliferativo, la pRb viene iperfosforilata da alcune chinasi ciclindipendenti (Cdk4/6- D) e si distacca dai fattori di trascrizione che, liberi di agire, promuovono la replicazione del DNA. Interagendo con la pRb ipofosforilata, la proteina E7 recluta Rb con conseguente attivazione costitutiva dei geni bersaglio di E2F; queste attivano la trascrizione consentendo alla cellula ospite di procedere lungo il ciclo replicativo anche in assenza di stimoli mitogeni esterni⁴³.

Gli altre due membri della famiglia del retinoblastoma, p107 e p130, sono coinvolti nel controllo di diversi momenti del ciclo cellulare. p130 esercita la sua funzione regolatoria durante la fase G0/G1, mentre p107 è attiva nella transizione G1/S. Analogamente a pRb, il polipeptide E7 si lega a p107 e p130, inattivando diversi punti del ciclo cellulare in cui queste proteine sono coinvolte; ma ancora non è chiaro se l'associazione tra E7 e p107 e p130 porti alla loro degradazione⁴³.

Un altro gruppo di proteine legate da E7 sono le istone-deacetilasi (HDAC): normalmente la proteina Rb lega le HDAC e le recluta a livello di promotori inducibili da E2F. Recentemente si è visto che E7 lega HDAC indipendentemente dal loro legame a RB⁴⁴. Una delle proprietà più particolari delle proteine E7 degli HPV ad alto rischio è la loro capacità di indurre instabilità genomica. Molti tipi di cancro positivi per il papillomavirus umano contengono diverse aneuploidie, ad indicare che variazioni nel numero di cromosomi sono eventi importanti nella progressione tumorale. L'espressione di E7 è sufficiente ad indurre un aumento anomalo nel numero di cromosomi in cheratinociti umani primari.

Inoltre, E7 si associa a IRF1 (Interferon Regulatory Factor-1), la cui espressione è importante per la risposta del sistema immunitario e degli interferoni verso infezioni persistenti di papillomavirus. Analogamente ad altri stimolatori della proliferazione, oltre alla capacità di alterare la regolazione del ciclo cellulare, E7 può promuovere l'apoptosi attraverso la via ubiquitina-dipendente. È interessante notare, inoltre, come la proteina E6 possa bloccare completamente l'attività pro-apoptotica di E7. Anche per questo motivo, per indurre la trasformazione completa delle cellule ospiti è necessaria l'attività sinergica di entrambe le proteine virali⁴⁵ (Figura8).

L1/L2 – sono le proteine capsidiche che, organizzate in 72 capsomeri, costituiscono il capsido virale. Ogni capsomero è un pentamero costituito da proteine L1, la proteina maggiore con peso molecolare di 55-60 Kda, organizzate intorno ad una singola proteina L2, la proteina minore con un peso di circa 70 KDa.

La trascrizione dei geni corrispondenti dipende dallo stato di differenziazione dei cheratinociti. L1 è la proteina maggiormente antigenica di HPV, è scarsamente fosforilata e può essere glicosilata; è coinvolta principalmente nel legame al DNA virale. Dato che le proteine L1 sono legate tra di loro mediante ponti disolfuro, risultano essere eccezionalmente stabili negli ambienti più estremi⁴⁶. Le particelle simili a quelle virali (VLP) costituite dalla sola proteina L1 costituiscono la base degli attuali vaccini contro il virus del papilloma, come descritto in dettaglio nel capitolo 1.3.

L2 svolge principalmente ruoli di tipo strutturale, ma anche diverse funzioni regolatorie durante il ciclo vitale degli HPV, tra le quali il legame a recettori secondari, la determinazione della localizzazione nucleare del virus e l'incapsidazione selettiva del DNA nel capsido virale, aumentando così l'infettività dei virioni. E' stato recentemente dimostrato che durante il processo infettivo il legame dei virioni alla matrice extracellulare induce dei cambiamenti conformazionali che espongono il sito di taglio furinico presente nel dominio amino-terminale di L2. La successiva proteolisi è essenziale per il legame al corecettore sulla superficie cellulare e per la traslocazione delle particelle all'interno della cellula⁴⁸. Presumibilmente, l'ambiente riducente della cellula rompe i ponti disolfuro tra le proteine L1, e il pH acido dell'endosoma dissocia il capsido, determinando il rilascio del genoma virale nel citoplasma dove viene trasportato al nucleo.

STORIA MOLECOLARE DEL PROCESSO INFETTIVO

I papillomavirus hanno un interessante e, in un certo modo, unico processo infettivo. Nuove rivelazioni di questo processo suggeriscono che alcuni dei suoi aspetti inusuali sono modificazioni delle caratteristiche del suo ciclo vitale, cioè la restrizione del ciclo produttivo all'epitelio squamoso stratificato, completamente differenziato, e l'abilità di ritardare l'induzione di una efficace risposta immunitaria per un tempo prolungato⁴⁹. L'inabilità di infettare in modo produttivo cellule in grado di replicarsi in cultura ha fortemente ostacolato gli studi sul meccanismo infettivo. Le nuove scoperte in questo processo sono state quindi dipendenti dagli avanzamenti tecnologici consentiti dall'avvento della moderna biologia molecolare. Questi avanzamenti hanno quindi permesso analisi via via più sofisticate e informative del ciclo vitale di HPV. I primi studi si basavano principalmente su particelle non infettive simili a quelle virali (VLP), che possono essere generate dalla sola espressione della proteina capsidica maggiore L1. Le VLP permettevano studi di interazione con la superficie cellulare, ma era impossibile distinguere tra la traslocazione di particelle infettive e non infettive. Esperimenti recenti hanno iniziato ad esaminare l'infezione di tessuti epiteliali con pseudovirus infettivi (PsV) in vivo e questi hanno rivelato caratteristiche uniche dell'infezione che non erano mai state osservate negli studi di colture cellulari.

Lo stabilimento dell'infezione

La fase di attacco – I primi studi condotti utilizzando le VLP hanno stabilito che gli pseudovirus infettivi legano l'epitelio attraverso un recettore altamente conservato esposto in un elevato numero di copie sulla superficie cellulare. Le VLP composte della sola proteina L1 o entrambe le proteine L1 e L2 si legavano in modo simile, indicando che la proteina L1 contiene il principale determinante per l'attacco iniziale. La maggior parte dei ricercatori è ora concorde nell'affermare che i proteoglicani eparan sulfato (HSPG) sono i fattori primari di attacco, almeno per le cellule epiteliali. Al contrario di quanto accade nelle linee cellulari epiteliali, gli pseudovirioni infettivi costituiti da entrambe le proteine capsidiche (L1/L2) non legano efficientemente o infettano colture primarie di cheratinociti⁵⁰. Inoltre, è stato osservata l'assenza di legame anche nel caso di tessuti epiteliali in vivo: né l'epitelio stratificato squamoso, né quello colonnare del tratto cervicovaginale o di altri organi. In un topo modello, il legame iniziale degli pseudovirioni si è dimostrato essere limitato alla membrana basale (BM). I virioni legano in modo efficiente regioni della membrana solo dopo che queste sono state esposte da un trauma meccanico o chimico dell'epitelio. Diverse ore dopo il legame iniziale, i capsidi erano localizzati sulla superficie delle cellule epiteliali in prossimità della lesione, presumibilmente in seguito al trasferimento dalla membrana basale⁵¹.

L'instillazione di eparina (la forma solubile dell'eparan sulfato) o eparinase nel tratto vaginale previene il legame alla membrana basale e quindi l'infezione nel modello murino cervicovaginale, dimostrando che il legame all'eparan sulfato è una fase iniziale obbligata del processo infettivo⁵².

L'entrata – Il legame dei proteoglicani eparan sulfato alla membrana basale in vivo, o alla superficie cellulare in vitro, induce un cambiamento conformazionale nel capside che espone la regione amino-terminale di L2 al taglio della furina o della proproteina convertasi correlata (PC 5/6)⁵³. Il sito di taglio furinico è assolutamente conservato in tutti gli HPV e il taglio è richiesto per l'infezione. Studi immunoistochimici indicano che sia la furina che PC 5/6 sono abbondanti nei siti di distruzione del tratto cervicovaginale murino, in modo che entrambe le proteasi possano contribuire al taglio di L2 dei capsidi legati alla membrana basale.

Si ritiene che la combinazione dei cambiamenti conformazionali e del taglio furinico di L2 promuovano l'esposizione dei siti di legame per i recettori di superficie che sono implicati nella fase di internalizzazione dell'infezione. Ci sono diverse linee di evidenza che supportano questa teoria. Forse, la migliore evidenza deriva da studi condotti con pseudovirioni che hanno già subito il taglio furinico (FPC). Quando gli pseudovirioni sono liberati dalle cellule produttrici sono in uno stato "immaturo" caratterizzato da una struttura più aperta con pochi ponti disolfuro intercapsomerici. Diversamente dai normali pseudovirioni e dai virioni naturali, i capsidi FPC sono in grado di legare e infettare le cellule che sono prive di HSPG o presentano modificazioni degli eparan sulfato che sono normalmente riconosciuti dal capside, come i cheratinociti primari in coltura⁵⁰. In presenza di un inibitore della furina, gli pseudovirioni inizialmente legano la membrana basale in vivo ma sono successivamente persi⁵⁵. Si ipotizza quindi che l'iniziale cambio conformazionale che espone il sito di taglio furinico riduca anche l'affinità del capside per l'eparan sulfato e quindi faciliti il trasferimento ad un recettore specifico dei cheratinociti, la cui identità è ad oggi sconosciuta. Un candidato che è stato suggerito è l' $\alpha 6$ -integrina, una molecola di adesione delle cellule epiteliali. Le informazioni ottenute da questi studi possono essere rappresentate come in Figura9.

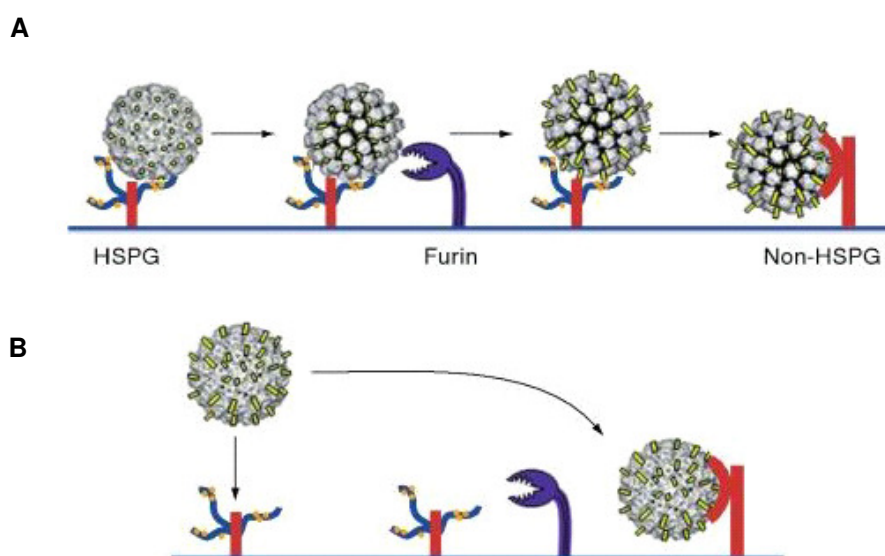


Figura9 | Interazione di pseudovirioni naturali (A) e pre-trattati con taglio furinico (B)⁵⁴.

Gli pseudovirioni maturi costituiti da entrambe le proteine capsidiche legano inizialmente gli HSPG sulla superficie cellulare. Questo legame porta ad un cambiamento conformazionale che espone la regione N-terminale di L2, permettendo l'accesso al sito di riconoscimento e quindi il taglio proteolitico ad opera della furina. Questo taglio espone maggiormente L2, incluso un epitopo cross-neutralizzante localizzato tra gli aminoacidi 17-36. Il capsido in questa conformazione è in grado di interagire con un recettore di superficie cellulare diverso da HSPG. Al contrario, come mostrato nel pannello B, gli pseudovirioni che hanno subito un taglio proteolitico furinico sono in grado di legare direttamente il recettore secondario, senza la necessità di interazione con HSPG⁵⁴.

Il traffico intracellulare – Il processo endocitotico implicato nell'internalizzazione e nel traffico intracellulare dei capsidi virali è stato estensivamente studiato. Nonostante, si sia dimostrato che i diversi genotipi di HPV presentino un processo differente, è stato proposto un modello comune. La maggiorparte degli studi ha ipotizzato un *pathway* endocitotico mediato dalla clatrina per la maggiorparte dei tipi, incluso BPV1 e HPV16⁵⁶. Si è dimostrato che la fase di assorbimento e di infezione sono bloccate da un inibitore della clatrina, come il clorpromazine.

Altri studi hanno suggerito che BPV1 e HPV16 inizialmente entrino sottoforma di vescicole rivestite di clatrina e poi si spostino attraverso i caveosomi per raggiungere eventualmente il reticolo endoplasmico⁵⁷. Uno studio recente, basato sull'inibizione dell'espressione della catena pesante della clatrina e della caveolina1, mediante RNA di interferenza, ha portato alla conclusione che l'internalizzazione di HPV16 è indipendente da entrambe le molecole. Gli autori suggeriscono che i capsidi potrebbero essere internalizzati mediante un nuovo *pathway* dipendente dalla tetraspanina⁵⁸. In generale, i risultati degli studi di inibizione devono essere interpretati con cautela, dato che questi potrebbero avere indotto effetti secondari sulla fisiologia della cellula.

Il traffico intracellulare dell'endosoma tardivo sembra coinvolgere esclusivamente recettori specifici per L1, dato che sia le VLP costituite da L1 che i virioni naturali sono stati localizzati in questa fase. Nell'endosoma tardivo avviene almeno una parziale denudazione dei virioni, osservata circa 8-12 ore dopo il legame alla superficie cellulare. Si è osservato che i genomi di capsidi contenenti la proteina L2 erano in grado di uscire dall'endosoma, evento che non si verificava nel caso di capsidi costituiti dalla sola proteina L1. La scoperta che un peptide conservato localizzato nella sua regione C-terminale può interagire con la membrana e ha un'attività di distruzione in vitro, è consistente con un ruolo critico di L2 in questa fase. Come dimostrato da esperimenti di co-localizzazione con specifici anticorpi, il genoma e L2 formano un complesso stabile.

Dopo l'uscita dall'endosoma, sia il destino di L1 che il meccanismo mediante il quale il complesso L2-genoma si muove nel citoplasma sino a raggiungere il nucleo è ancora poco compreso. E' stato osservato che la distruzione dei microtubuli inibisce la traslocazione del genoma virale nel nucleo, indice del fatto che il trasporto citoplasmico avvenga attraverso queste strutture. Al termine di questa fase, il complesso L2-genoma si localizza nel nucleo della cellula infettata in distinti domini nucleari, designati come corpi ND10.

L'infezione porta all'instaurazione del DNA virale in forma episomale nelle cellule dell'epitelio basale e questo si pensa richieda l'espressione delle proteine di replicazione virale, E1 e E2. La proteina E2 svolge numerosi ruoli durante l'instaurazione dell'infezione e, nelle cellule basali, è richiesta per l'inizio della replicazione del DNA virale e per la segregazione del genoma. Il legame della proteina E2 al DNA è necessario per il reclutamento della elicasi E1 che lega a turno differenti proteine cellulari indispensabili per la replicazione del materiale genetico, tra cui RPA (Replication Protein A) e la DNA polimerasi. Nelle cellule infettate, il genoma virale si replica insieme al DNA cellulare durante la fase S: anche in questa fase il ruolo di E2 è fondamentale in quanto permette l'ancoraggio degli episomi virali ai cromosomi mitotici e quindi favorisce una corretta segregazione. In aggiunta al suo ruolo nella replicazione e nella segregazione del genoma, E2 può fungere da fattore trascrizionale e regolare il promotore precoce (p97 in HPV16; p99 in HPV31) e controllare l'espressione degli oncogeni virali, E6 e E7 (Figura7).

La stimolazione della proliferazione cellulare

Il tempo che intercorre tra l'infezione iniziale e la comparsa di lesioni della pelle dipende dal titolo di virus infettanti e dal tipo di HPV. Nelle lesioni della cervice uterina, l'aumento di proliferazione delle cellule dell'epitelio soprabasale è attribuito all'espressione degli oncogeni virali, E6 e E7 (Figura10). Durante l'infezione, l'attività di questi geni permette l'aumento del numero di cellule infettate, aumentando così il numero di cellule che produrranno virioni.

Normalmente le cellule dell'epitelio basale escono dal ciclo cellulare e iniziano un processo di differenziazione allo scopo di produrre la barriera protettiva che è normalmente fornita dalla cute. Nei cheratinociti infettati da HPV, la limitazione della progressione del ciclo cellulare è persa e il processo di differenziamento non avviene. Il meccanismo mediante il quale i papillomavirus stimolano la progressione del ciclo cellulare è ben nota ed è simile al modo con cui i virus tumorali deregolano la crescita cellulare. La proteina E7 si associa con la proteina del retinoblastoma (pRb) e ne distrugge l'associazione con la famiglia di fattori trascrizionali E2F, indipendentemente dalla presenza di fattori di crescita esterni. Successivamente E2 attiva proteine cellulari richieste per la replicazione del DNA virale, come le cicline A ed E. E7 si associa, inoltre, con altre proteine implicate nella proliferazione cellulare, tra cui l'istone deacetilasi e gli inibitori p21 e p27 della chinasi ciclica-dipendente. Sembra che l'abilità di E7 di guidare le cellule attraverso la mitosi nell'epitelio differenziato e a superare il blocco della progressione del ciclo cellulare possa essere limitato a quelle cellule che esprimono bassi livelli di p21 e p27. Questo fornisce una spiegazione al fatto che l'espressione deregolata degli oncogeni virali sia un fattore predisponente allo sviluppo di tumori associati ad HPV (Figura10).

La funzione della proteina E7 è complementata dalla proteina virale E6. Il ruolo primario di E6 è quello di associarsi alla proteina p53 di cui, negli HPV ad alto rischio, media l'ubiquitinazione e la degradazione. Questo si pensa prevenga l'arresto della crescita o l'apoptosi in risposta all'entrata nel ciclo cellulare mediata da E7, negli strati epiteliali più alti. Il ruolo di E6 assume, quindi, un

significato chiave nello sviluppo del tumore cervicale, considerato anche il fatto che essa compromette per di più l'efficacia dei sistemi di riparazione dei danni al DNA e permette l'accumulazione di mutazioni secondarie.

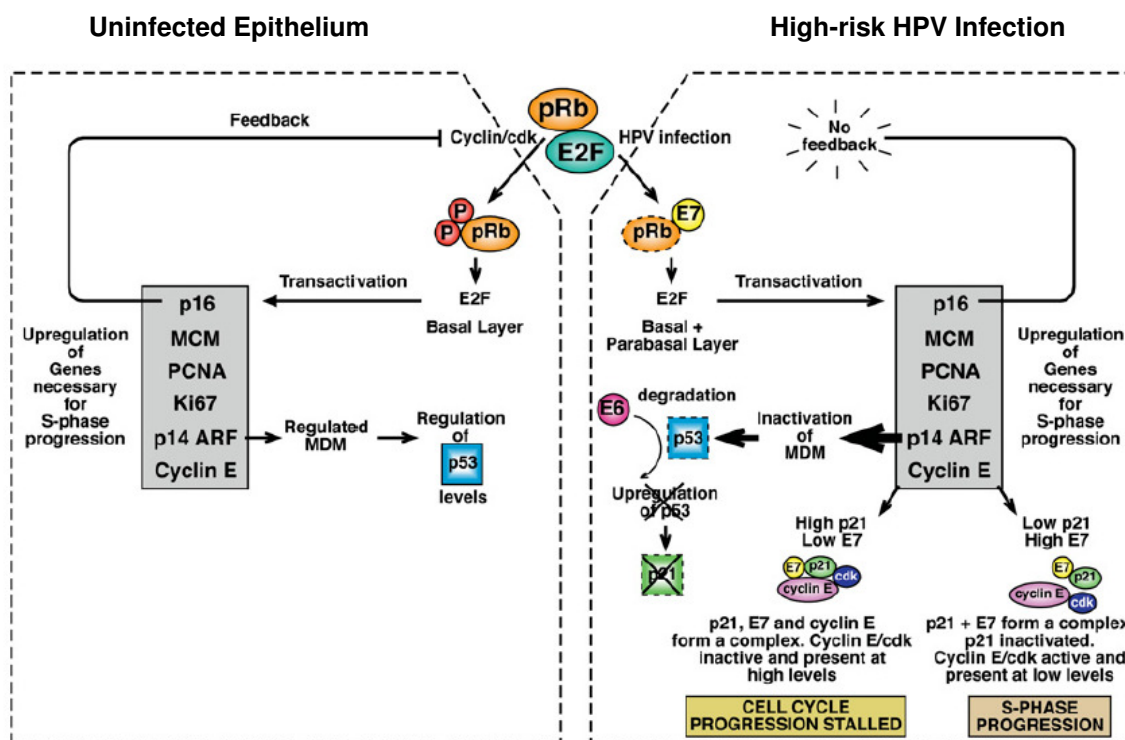


Figura10 | Stimolazione della progressione del ciclo cellulare indotta da HPV ad alto rischio⁴³.

L'amplificazione del genoma

Sebbene la proliferazione cellulare sia richiesta per la formazione di lesioni e per il mantenimento degli episomi virali, tutti i papillomavirus devono amplificare e impacchettare il loro genoma in modo che siano prodotti nuovi virioni infettivi. Cosa dia realmente inizio a questa serie di eventi non è ancora del tutto compreso, ma sembra che dipenda in parte dai cambiamenti nell'ambiente cellulare. Sembra, infatti, che svolga un ruolo critico la regolazione di promotori che controllano il processo di differenziazione e che in molti tipi di HPV sono contenuti all'interno della ORF di E7. L'attivazione di questi promotori dipende dai cambiamenti nella segnalazione cellulare, piuttosto che dall'amplificazione del genoma e porta ad un aumento nei livelli di espressione di proteine virali necessarie per la replicazione (ie, E1, E2, E4 e E5).

Il ruolo di E1 ed E2 nell'amplificazione del genoma virale è ben caratterizzata. Durante l'infezione naturale, E1 è espresso a livelli basali e necessita della presenza di E2 per riconoscere i suoi siti di legame. E2 si associa ad E1 primariamente attraverso il suo dominio N-terminale e lega il DNA come dimero attraverso il suo dominio C-terminale. La formazione del complesso E1-E2 all'origine

della replicazione induce una distorsione localizzata nel DNA virale che facilita il reclutamento di molecole aggiuntive di E1. Inoltre, entrambe le proteine agiscono regolando i promotori precoci (p97 in HPV16 e p99 in HPV31) e controllando l'espressione degli oncogeni E6 ed E7. Sembra che l'aumento dei livelli di E2, che è importante nella stimolazione dell'amplificazione del genoma virale, porti ad una debole inibizione dell'espressione di E6/E7 e ad una eventuale perdita dell'ambiente replicativo necessario per la sintesi del DNA virale. Il curioso legame tra replicazione e trascrizione fornisce un meccanismo mediante il quale il virus può limitare nel tempo e nella durata l'amplificazione del genoma.

Nonostante E1 ed E2 siano gli elementi chiave in questo processo, un buon contributo è fornito anche dalle proteine E4 ed E5. Quest'ultima è una proteina transmembrana localizzata primariamente nel reticolo endoplasmico, ma che può associarsi con l'ATPasi vacuolare e ritardare il processo di acidificazione endosomale. Si pensa che questo influenzi il riciclo dei recettori dei fattori di crescita sulla superficie cellulare e quindi porti ad un aumento nella segnalazione mediata da EGF ed al mantenimento di un ambiente competente alla replicazione in uno strato superiore dell'epitelio. Al contrario, il ruolo di E4 nell'amplificazione del genoma non è ancora del tutto compreso. Questa proteina si accumula nella cellula durante questo processo e sembra che la sua perdita inibisca gli eventi successivi. Lavori recenti hanno mostrato che E4 di HPV16 e HPV18 può inoltre associarsi con E2, suggerendo un addizionale meccanismo di azione mediante il quale questa proteina agisce.

L'assemblaggio dei virioni e il rilascio nell'ambiente

L'ultima fase del ciclo riproduttivo richiede che il genoma replicato venga impacchettato all'interno di nuove particelle infettive. Gli eventi che legano l'amplificazione del genoma con la sintesi delle proteine capsidiche non sono ancora del tutto noti, ma si pensa dipendano da cambiamenti a livello dello *splicing* dell'mRNA e dalla generazione di trascritti che terminano all'ultimo sito di poliadenilazione, piuttosto che al primo (Figura7). Durante la differenziazione delle cellule epiteliali, la sintesi del capside virale è regolata sia a livello di processazione dell'RNA che a livello di sintesi proteica. Elementi regolatori negativi, che controllano la stabilità dell'RNA, sono presenti nelle regioni codificanti e nell'ultima regione non tradotta di HPV16, mentre un silenziatore di *splicing* nel gene L1 di HPV16 induce la sintesi preferenziale dei trascritti precoci nelle cellule in proliferazione. L'assemblaggio dei virioni, nello strato superiore dell'epitelio, richiede, oltre alle proteine capsidiche L1 e L2, la proteina E2 che sembra migliorare l'efficienza di incapsidazione⁵⁹.

L2 è localizzata nel nucleo, grazie alla presenza di un segnale di localizzazione nucleare sia all'estremità ammino- che carbossi-terminale, e qui è associata ai corpi PML (ProMyelocytic Leukaemia). Anche se le proteine L2 di alcuni tipi di papillomavirus sono in grado di associarsi direttamente al DNA, normalmente il reclutamento del genoma virale nei corpi PML richiede l'intervento della proteina E2, che può associarsi con il DNA mediante specifici siti di riconoscimento.

Le proteine L1, invece, si assemblano in capsomeri nel citoplasma prima di essere reintrodotte nel nucleo. Anche se le nuove particelle virali possono essere assemblate in assenza di L2, la sua presenza contribuisce ad aumentare l'efficienza di impacchettamento e aumenta l'infettività del virus. L2 si associa con L1 attraverso una regione idrofobica posizionata all'estremità C-terminale di L2, che si pensa si inserisca all'interno del foro centrale dei capsomeri pentamerici L1⁶⁰. Il fatto che le nuove particelle virali siano mantenute nelle cellule infettate finché queste raggiungano la superficie dell'epitelio permette di limitare l'abilità del sistema immunitario di individuare l'infezione. L'ultima fase consiste nella liberazione dei virioni dalla strato corneo della superficie cellulare (Figura7). Il rilascio dei virus è facilitato dall'azione della proteina E4 che è in grado di distruggere la rete superficiale di cheratine.

ASPETTI IMMUNOLOGICI

La storia naturale dell'infezione da HPV è fortemente condizionata dall'equilibrio che si instaura fra ospite e agente infettante. Esistono tre possibilità di evoluzione dell'infezione: regressione, persistenza e progressione. La maggior parte (70-90%) delle infezioni da papillomavirus è transitoria poiché il virus viene eliminato dal sistema immunitario prima di sviluppare un effetto patogeno. La persistenza dell'infezione virale è, invece, la condizione necessaria per l'evoluzione verso il carcinoma. L'acquisizione di un genotipo virale ad alto rischio aumenta la probabilità di infezione persistente. Al contrario, la probabilità di progressione delle lesioni è correlata anche ad altri fattori, come l'assunzione di contraccettivi orali per un tempo prolungato, il fumo di sigaretta e il cambio di più *partners* sessuali.

Nonostante questi processi siano quasi completamente caratterizzati, studi recenti hanno fatto ulteriore chiarezza sui fattori che influenzano ognuna di queste transizioni. E' stata, infatti, dimostrata l'importanza della risposta immunitaria dell'ospite nell'instaurazione dell'infezione⁶. Nella maggior parte degli individui, fortunatamente, la risposta immunitaria HPV-specifica permette la rimozione delle particelle virali; il carcinoma della cervice si manifesta, invece, in individui che mantengono l'infezione per anni o decenni, senza un' effettiva reazione del sistema immunitario.

La risposta umorale

Sia la risposta umorale che cellulo-mediata sono essenziali per la rimozione dell'agente infettante. La risposta immunitaria a livello della mucosa della cervice svolge un ruolo centrale nella protezione dall'agente infettante, anche se, ad oggi, non è ancora completamente caratterizzata. La presenza di immunoglobuline cervicali IgA e IgG contro il virus del papilloma umano è inversamente correlata alla presenza di carcinoma uterino (Figura11). L'intervento di anticorpi IgG è fortemente associato alla presenza di HPV nei 12 mesi successivi alla prima infezione mentre gli

anticorpi IgA possono essere individuati sino a 4-8 mesi prima dell'identificazione di lesioni intraepiteliali squamose. Questi dati suggeriscono che gli anticorpi mucosali proteggono dall'infezione e dallo sviluppo della patologia correlata.

Uno studio condotto nel 2002 ha dimostrato la generazione di una risposta anticorpale altamente specifica contro differenti tipi di papillomavirus. E' stato infatti riportato che la generazione di anticorpi IgG, in risposta a particelle simili a quelle virali (VLP) di HPV16, era in grado di ridurre il rischio di successive infezioni da HPV16 e da altri tipi di papillomavirus geneticamente correlati, come HPV31, 33, 35, 52 e 58⁶¹.

La risposta cellulo-mediata

L'immunità cellulo-mediata è importante per eliminare le cellule infette e per la generazione della memoria immunitaria. Pertanto è associata alla regressione delle lesioni e alla protezione contro un'infezione successiva con lo stesso genotipo.

Particolarmente rilevante è l'immunità cellulo-mediata diretta contro i prodotti degli oncogeni virali E6 e E7, la cui espressione è responsabile delle lesioni croniche in evoluzione verso il carcinoma cervicale. E' stato dimostrato che le oncoproteine E6 e E7 sono costitutivamente espresse a livello dei carcinomi e rappresentano, quindi, un possibile target per la risposta immunitaria contro il virus. Studi di immunoistochimica per l'espressione di linfociti T helper CD4⁺ (Th1) e linfociti di tipo Th2, hanno mostrato che le cellule Th2 produttrici di citochine erano presenti nei tessuti sub-epiteliali cervicali. Una percentuale significativamente più bassa di cellule Th1, ma una più alta proporzione di cellule esprimenti interleuchina-4 (IL-4) e interleuchina-6 (IL-6) è stata invece osservata il lesioni SIL di alto grado, rispetto ai normali tessuti. La predominanza di cellule di tipo Th2 è stata osservata anche in lesioni cervicali di alto grado.

Anche i fattori immunogenetici influenzano la progressione della patologia associata all'infezione da HPV. Non è chiaro se l'immunità specifica contro questo virus possa funzionare nel controllo della crescita del carcinoma. Uno studio ha dimostrato che i linfociti T citotossici (CTL) sono presenti in modo predominante in donne affette da lesioni di alto grado o carcinoma invasivo. Questi linfociti presenti nelle lesioni tumorali potrebbero rivestire un importante ruolo nella restrizione della progressione patologica. Nonostante si ritenga che l'immunità cellulo-mediata sia importante nel controllo dell'infezione da HPV, la sua rilevanza funzionale e il sito specifico di attivazione non sono ancora completamente chiariti.

Il ruolo delle cellule T – Si ritiene che la risposta immunitaria mediata dalle cellule T rivesta un ruolo fondamentale nella carcinogenesi cervicale. E' stato proposto che le risposte differenziali alla proteina E7 di HPV16 sia correlata con l'eliminazione virale o la persistenza in pazienti affetti da neoplasie cervicali. La risposta Th specifica contro E7 potrebbe svilupparsi come la conseguenza di un'aumentata disponibilità dell'antigene risultante dall'eliminazione e/o progressione delle lesioni cervicali. La produzione di interleuchine di tipo 2 (IL-2) e di anticorpi IgG, a livello del plasma, in

risposta alla proteina capsidica minore L1 di VLP HPV16 (L1-VLP), è associata a lesioni della cervice mentre la risposta Th si riscontra in pazienti che mostrano sia la rimozione che la persistenza del virus. Gli studi sin qui condotti hanno permesso di verificare che i linfociti T CD4+ rivestono un ruolo molto importante per stimolare la risposta immunitaria contro i papillomavirus (Figura11). L'intensa proliferazione di cellule T, osservata in pazienti con infezione persistente da HPV16 e progressive lesioni uterine, indica che l'efficacia di questa risposta non può essere predetta e dipende da fattori addizionali. La naturale risposta immunitaria indotta dal virus genera un profilo misto di citochine prodotte da Th1 e Th2. L'analisi dell'immunità basata sui T helper CD4, in risposta agli antigeni E2, E6 e E7 di HPV16, ha rivelato una risposta specifica contro E2 e E6⁶² (Figura11). Il profilo di espressione della proteina E2, sia nelle infezioni precoci che nelle lesioni di basso grado (CIN), rende questa proteina un plausibile antigene precoce. E' interessante notare come tutti i peptidi di E2 caratterizzati sinora siano raggruppati in un dominio funzionale altamente conservato in tutti i papillomavirus.

Gli studi inoltre confermano la relazione tra il fallimento dell'immunità specifica Th1 contro E6 la neoplasia cervicale indotta da HPV ad alto rischio. Questo suggerisce che la memoria Th1 specifica per HPV e persino la risposta CTL potrebbero esistere precocemente attraverso la cross-reazione con differenti sottotipi di HPV.

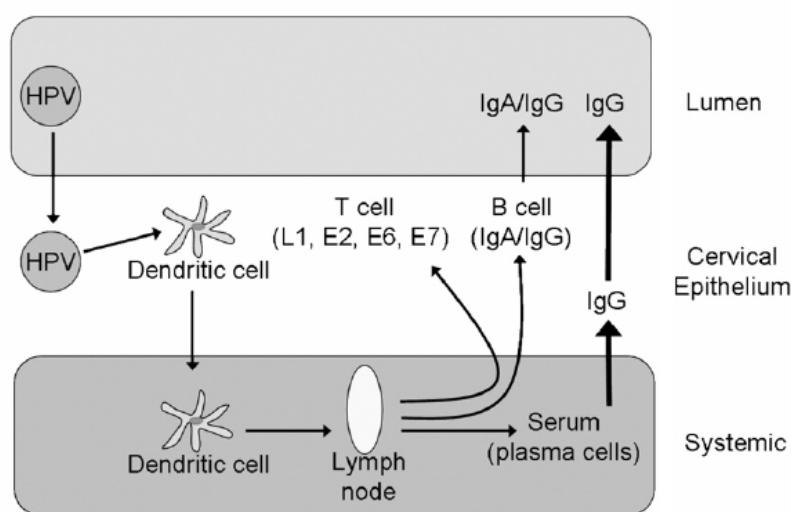


Figura11 | **Schema semplificato della risposta immunologica all'infezione da HPV⁶³.**

Il ruolo delle cellule dendritiche – Le cellule dendritiche (DC) rappresentano le più potenti cellule presentanti l'antigene per la stimolazione di un'efficiente risposta CTL. Generalmente, le DC catturano e processano l'antigene, esprimono le molecole stimolatorie dei linfociti, migrano negli

organi linfoidi e secernono citochine per attivare la risposta immunitaria. I linfociti T e B sono i mediatori chiave dell'immunità cellulare sotto il controllo delle DC.

L'estensione e il tipo di attivazione delle cellule T dipende in modo critico dall'espressione del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) e dalle cellule Langerhans presenti a livello della lesione cervicale. Si pensa che la limitata espressione di molecole di stimolazione e adesione e la natura delle citochine presenti a livello epiteliale possano limitare l'effettiva risposta immunitaria nelle lesioni uterine. La distribuzione di cellule T immunogeniche dipende dalla trasformazione maligna delle lesioni causate da HPV. L'attivazione di cellule T specifiche nel microambiente cervicale ad opera delle cellule dendritiche sembra rivestire un ruolo di fondamentale importanza nella progressione della neoplasia cervicale (Figura11).

Le strategie di immuno-evasione di HPV

La condizione necessaria perché un'infezione evolva verso una forma tumorale è che l'infezione virale persista. I papillomavirus, così come altri virus, hanno evoluto diversi sistemi in modo da eludere la risposta immunitaria della cellula ospite.

Il ciclo infettivo di HPV - Il fallimento dei sistemi di protezione nel riconoscere il virus infettante e la successiva progenie virale è legato in parte al suo stesso ciclo infettivo. La replicazione di HPV e il rilascio delle particelle non causa la morte della cellula infettata, dato che i cheratinociti differenziati sono già programmati per morire, e questa 'morte per cause naturali' non rappresenta un segnale di pericolo per il sistema immunitario. Inoltre, questo virus codifica solo per proteine non secrete, la maggiorparte delle quali sono espresse a bassi livelli e principalmente nel nucleo delle cellule infettate. Insieme con la perdita di segnali pro-infiammatori, questo è insufficiente all'attivazione della risposta anticorpale.

Similarità di sequenza con proteine umane - Per mantenere l'integrità di tessuti ed organi, il sistema immunitario deve essere in grado di distinguere tra le proprie molecole e quelle estranee. Mimare le proteine della cellula ospite e trarre vantaggio dalla tolleranza che i meccanismi protettivi hanno nei confronti di molecole proprie, potrebbe essere un meccanismo adottato dai papillomavirus per eludere i sistemi di controllo. Evidenze di questo tipo provengono dall'analisi della proteina E7 di HPV16 che ha una profonda similarità con diverse proteine umane implicate nella regolazione di processi cruciali.

Modulazione della presentazione degli antigeni - I linfociti T sono importanti per contenere il diffondersi di infezioni. Questi, infatti, sono in grado di riconoscere le cellule infettate mediante l'interazione tra i loro recettori e i peptidi virali legati al complesso maggiore di istocompatibilità (MHC), esposto sulla superficie delle cellule infettate. HPV agisce deregolando il complesso processo di esposizione dell'antigene e protegge le cellule infettate dall'attacco immunitario.

Numerosi studi hanno infatti dimostrato che i tumori causati da HPV mostrano una perdita del complesso MHC di classe I. Esperimenti più recenti hanno indagato il coinvolgimento delle proteine di HPV e i risultati ottenuti hanno dimostrato l'implicazione delle proteine E5 e E7. E5, infatti, interferisce con l'omeostasi del pH del complesso di Golgi e quindi con la stabilità del complesso MHC, che è dipendente dal pH. E7 di HPV16 e 18, invece, agisce reprimendo il promotore che regola l'espressione della catena pesante del complesso MHC di classe I.

Interferenza con gli interferoni - Gli interferoni sono fattori solubili in grado di limitare le infezioni virali sia di tipo litico che non litico e di attivare ed attrarre cellule del sistema immunitario tra cui neutrofili, macrofagi, cellule NK e dendritiche. Saggi condotti sia in vitro che in vivo dimostrano che HPV ha evoluto dei meccanismi per sfuggire l'effetto degli interferoni di tipo I. La proteina E6 di HPV infatti sembra ne influenzi l'espressione: il legame di E6 con l'attivatore IRF-3 previene la trascrizione dell'IFN-beta. Anche E7 sembra inibire l'espressione degli interferoni. Questa proteina si lega a IRF-1 e inibisce l'attivazione del promotore di IFN-beta reclutando l'istone deacetilasi e quindi prevenendone la trascrizione.

Inibizione delle citochine e dei chemoattrattivi - Una delle risposte precoci all'infezione consiste nel rilascio di proteine che mediano la risposta immunitaria. Citochine, chemochine, molecole di adesione e proteasi sono tutte molecole che dirigono la migrazione delle cellule nella risposta anticorpale e che richiamano cellule immunitarie e infiammatorie. Una espressione alterata di queste proteine potrebbe ostacolare ed inibire i sistemi protettivi della cellula ospite. Diversi studi hanno dimostrato che la proteina E6 di HPV inibisce la produzione di questi mediatori: E6 sembra infatti in grado di deregolare l'espressione dell'interleuchina-18.

In sommario, lo scenario che emerge è il seguente: HPV evade efficientemente la risposta immunitaria innata e ritarda l'attivazione della risposta immunitaria adattativa. Le cellule dendritiche dell'ospite sono esposte a bassi livelli delle proteine virali in un ambiente non infiammatorio per un periodo protratto nel tempo e questo determina una locale non responsività immunologica. In questo contesto, le difese dell'ospite risultano irrevocabilmente compromesse e le cellule effettrici specifiche per gli antigeni virali non sono reclutate nell'area infettata. Così, se durante una persistente infezione da HPV avviene la deregolazione delle oncoproteine E6 ed E7 dei virus ad alto rischio, e questo non risulta in una efficace risposta cellulo-mediata, non si assiste al blocco della progressione a lesioni intraepiteliali squamose di alto grado e a carcinoma invasivo.

DIAGNOSI E PROFILASSI

La dimostrazione che l'infezione da HPV ha un ruolo patogenico nello sviluppo del carcinoma cervicale e la comprensione dell'epidemiologia di questo fenomeno sono stati cruciali nello sviluppo di strategie diagnostiche e vaccinali per la prevenzione di questo tumore.

In questo capitolo verranno esaminati i principali test diagnostici alla base dei programmi di screening e i vaccini profilattici attualmente in commercio.

L'IMPORTANZA DELLA PREVENZIONE

Il carcinoma del tratto anogenitale, particolarmente il cancro della cervice, rappresenta il 12% di tutti i tumori che affliggono la popolazione femminile, e così rappresenta la seconda patologia ginecologica più frequente nel mondo.

La conoscenza di un rischio implica l'acquisizione di opportune precauzioni. Il rischio di acquisizione di una malattia oncologica, quali la neoplasia della cervice uterina, può essere minimizzato da specifici interventi profilattici attuati in specifici momenti del corso della vita. D'altra parte, l'identificazione e il trattamento tempestivo di una patologia neoplastica sono fondamentali per evitare che, se invasiva, diventi un grave problema per la salute dell'individuo.

Lo sviluppo e l'implementazione di programmi di screening per l'individuazione di anomalie citologiche o di lesioni precancerose (Figura12) ha portato ad una significativa diminuzione dell'incidenza e del tasso di mortalità per carcinoma cervicale⁶⁴. L'effetto dei programmi citologici (Pap screening) è stato documentato, principalmente nei paesi nordici, dalla correlazione tra i casi di tumori cervicali e le attività di screening proposte alla popolazione. I primi programmi erano indirizzati alle donne di età all'apice del rischio di sviluppare la malattia e questo aveva portato ad una diminuzione nell'incidenza confinata principalmente a soggetti di età compresa tra i 35 e i 70 anni. Quando successivamente la copertura dello screening è stata estesa anche a donne più giovani, si è osservata una diminuzione del tasso di incidenza in tutte le fasce di età.

Il fatto che la totalità dei tumori cervicali sia attribuibile ad infezione da HPV e che la persistenza dell'infezione sia necessaria per lo sviluppo delle lesioni intraepiteliali hanno portato all'introduzione di test molecolari per la ricerca di HPV (HPV test) ad alto rischio oncogeno in

ambito di screening (Figura12). Questi test, in grado di rilevare il DNA virale, sono considerati più efficienti e sensibili rispetto ai tradizionali test citologici. L'elevata riproducibilità di questi test rappresenta un vantaggio addizionale rispetto alle indagini convenzionali. Negli Stati Uniti, il test per HPV è comunemente utilizzato per confermare dati citologici equivoci. Questo test è inoltre approvato come screening primario per donne di età superiore ai 30 anni, che hanno superato il picco di infezione, e per quelle che presentano un rischio predetto superiore di sviluppare la patologia. L' Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) ha approvato l'uso di queste tecnologie per la prevenzione primaria del carcinoma cervicale⁶⁴.

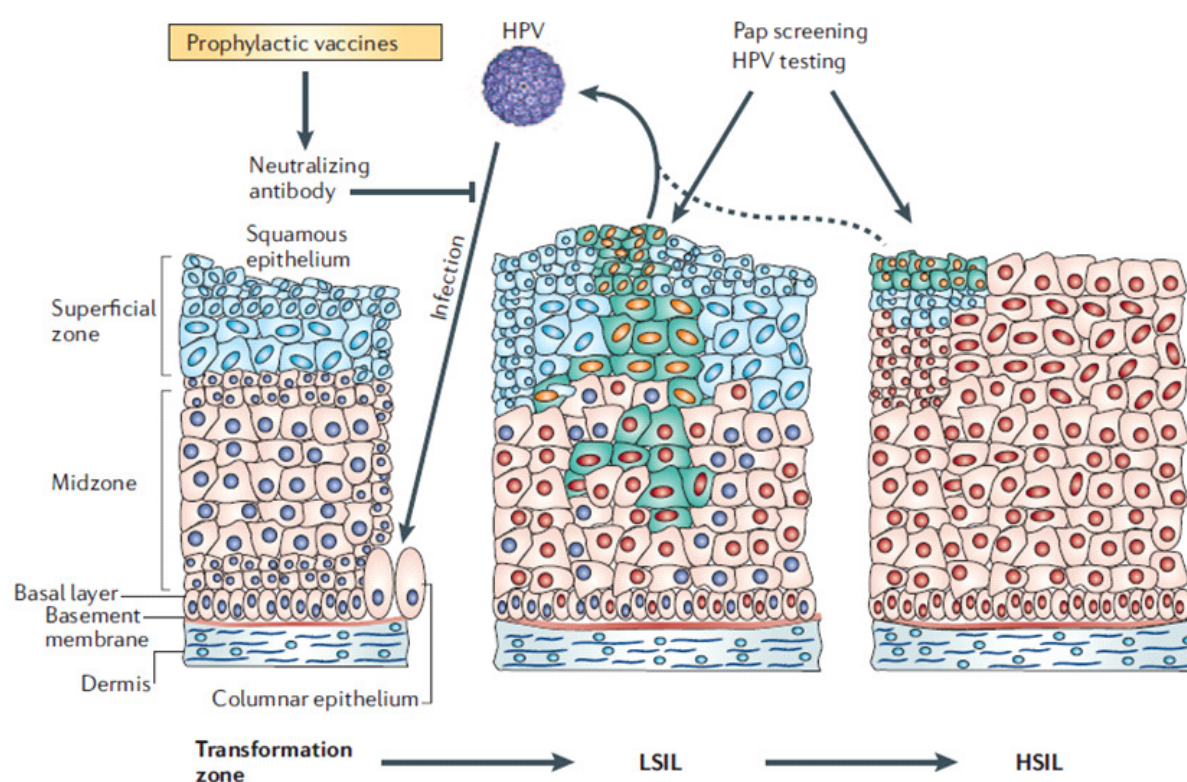


Figura12 | I bersagli delle strategie preventive⁶⁵.

Tradizionalmente, la vaccinazione rappresenta l'approccio con il miglior rapporto costo-effetto per combattere una patologia infettiva. Ad oggi, sono in commercio due vaccini profilattici contro l'infezione da HPV. Per definizione un vaccino profilattico mima a livello immunologico l'infezione che esso deve prevenire e attiva il sistema immunitario adattativo per richiamare specifiche funzioni effettrici ('la memoria') per incontri futuri con l'agente infettivo.

La loro provata efficacia e abilità di ridurre l'incidenza delle lesioni precursori del carcinoma cervicale offrono una speranza che i vaccini abbiano un impatto significativo a livello mondiale e che possano ridurre drammaticamente l'incidenza della patologia. I vaccini correnti, in grado di

proteggere da HPV16 e HPV18 possono potenzialmente prevenire oltre il 70% dei tumori legati al papillomavirus. La loro cross-reattività per HPV31, 33, 45 e 52, seppure limitata, suggerisce che con il loro uso potrebbe essere prevenuta persino una più alta percentuale di patologie.

Nonostante queste strategie vaccinali sembrino costituire un'importante base per la prevenzione delle patologie correlate ad HPV, l'effetto della vaccinazione nell'incidenza della neoplasia non si riconoscerà prima di 20-30 anni dopo l'introduzione di questi programmi a livello mondiale. Proprio per questo motivo, le linee guida di molti paesi indicano come miglior strategia preventiva l'utilizzo combinato di test diagnostici e vaccinazione.

I TEST DIAGNOSTICI

Citologia convenzionale

La citologia cervicovaginale, più comunemente conosciuta come striscio vaginale o Pap test, è un test di screening per il cancro del collo dell'utero, introdotto nella pratica clinica nel 1949 da George Papanicolau. Questo si basa sul prelievo delle cellule cervicovaginali, in modo non invasivo e del tutto indolore, durante una normale visita ginecologica. Mediante l'uso di una piccola spatola viene prelevato dalla cervice uterina del materiale contenente cellule esfoliative che, strisciate su di un vetrino ed appositamente colorate, vengono poi osservate al microscopio. Un'altra modalità di raccolta delle cellule utilizza un mezzo liquido per la conservazione delle cellule (i.e., Thin Prep®). In questo caso le cellule sono raccolte in un apposito contenitore con una soluzione fissativa alcolica. L'allestimento del vetrino avviene in maniera automatica utilizzando il processore Thin Prep. Con questo strumento le cellule in sospensione vengono raccolte tramite aspirazione sulla superficie di una membrana e poi trasferite su vetrino. L'utilizzo di questa metodica permette di raccogliere e preparare un vetrino di alta qualità in monostrato (strato sottile) senza interferenze, cioè un preparato libero da sangue e muco e da strati di materiale sovrapposto. Inoltre è possibile allestire un secondo campione dal liquido rimasto per effettuare ulteriori indagini di approfondimento senza dover richiamare la paziente.

La terminologia per classificare le alterazioni del Pap test si è sviluppata e modificata nel tempo. Oggi la diagnosi citologica delle cellule cervico-vaginali viene effettuata secondo il Sistema Bethesda del 2001⁷⁰, che stabilisce una terminologia diagnostica uniforme. Tra le anomalie cellulari si distinguono le lesioni SIL (lesioni squamose intraepiteliali di basso grado) caratterizzate da gruppi di cellule presentanti nuclei ingranditi, ipercromasia, un pattern cromatinico a macchie e persino alcune coilocitosi, e le lesioni HSIL (lesioni squamose intraepiteliali di alto grado) contraddistinte da nuclei allargati, ipercromasia associata con cromatina alterata e membrane nucleari irregolari (Figura13).

I programmi di screening basati sulla citologia hanno portato alla riduzione dell'incidenza del carcinoma cervicale e della mortalità associata ad esso di circa il 70-80% in paesi più industrializzati. I risultati diagnostici della citologia cervicale sono stati valutati da diversi studi presenti in letteratura, il cui risultato è stato riproposto e riassunto in una recente meta-analisi. Questi studi hanno dimostrato che un singolo saggio di questo tipo ha una sensibilità di circa il 50% nell'identificazione di donne con lesioni precancerose di alto grado o tumore invasivo⁷¹. In particolare, una recente meta-analisi su otto studi condotti in nord America e in Europa, su 60.000 donne sottoposte sia all'HPV test che al saggio di citologia, hanno verificato che la sensibilità relativa di quest'ultima metodologia per l'individuazione di CIN2+ era del 53% (95% CI, 48.6-57.4%). Inoltre, la sensibilità del saggio variava considerevolmente tra gli studi, dal 18.6% al 76.7%. Di fatto, l'analisi citologica ha mostrato avere una limitata riproducibilità inter-laboratorio e inter-operatore. La meta-analisi ha inoltre mostrato che la sensibilità del saggio aumenta con l'età del paziente ed è significativamente più alta in donne di età superiore ai 50 anni rispetto alle più giovani (79.3% contro 59.6%, rispettivamente).

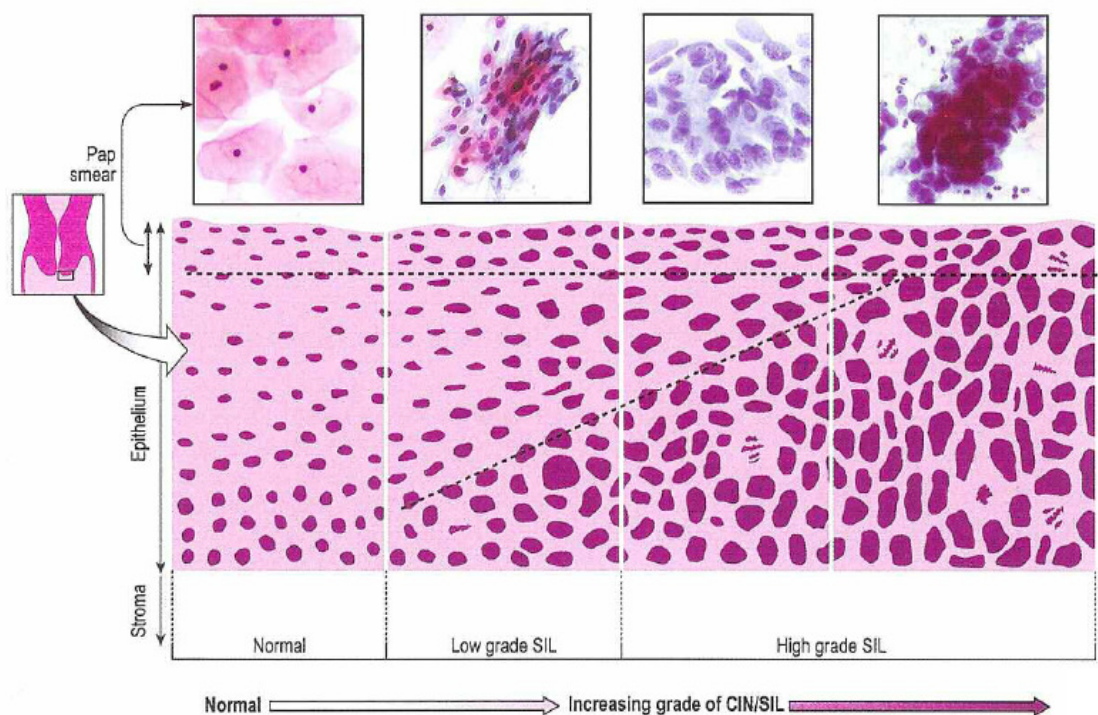


Figura13 | **Caratterizzazione morfologica mediante citologia convenzionale (Pap test).**

Test molecolari

La diagnostica per la ricerca e la tipizzazione degli HPV si basa principalmente sulla ricerca del DNA virale con metodiche di tipo molecolare. Le principali metodiche che possono essere utilizzate sono l'ibridazione diretta, l'amplificazione del segnale e l'amplificazione del target⁷³.

Ibridazione diretta - Utilizza sonde opportunamente marcate che si legano in modo specifico a sequenze omologhe contenute nel campione da analizzare; la reazione può avvenire o su supporto solido contenente DNA estratto dal campione o direttamente sul campione appoggiato su un vetrino. Il legame sonda-DNA del campione viene poi rivelato in base al tipo di marcatore utilizzato per la sonda. Le tecniche principali che sfruttano il principio dell'ibridazione diretta sono il "Southern blot" e "l'ibridazione in situ". Queste tecniche risultano poco utilizzate ai fini diagnostici e non applicabili su larga scala per la scarsa sensibilità e riproducibilità.

Amplificazione del segnale – La metodica più conosciuta di amplificazione del segnale non radioattiva è il kit commerciale Hybrid Capture II (HC2, Diogene Corp., USA). Questo test si basa su un'ibridazione in soluzione con mix di sonde per diversi tipi di HPV; permette di evidenziare, a seconda della mix usata, o 13 HPV ad alto rischio (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68) o 5 HPV a basso rischio (6, 11, 42, 43, 44). Ad oggi, è l'unico test approvato dalla FDA per lo screening del cancro cervicale, in combinazione con la citologia, dopo i 30 anni di età. Nonostante presenti diversi vantaggi, HC2 non permette l'identificazione di uno specifico tipo di HPV, dato che la rilevazione è condotta con una miscela combinata di sonde, e fornisce una stima semi-quantitativa della carica virale.

Amplificazione del target - La PCR (Polymerase Chain Reaction) è un'amplificazione enzimatica in vitro di una definita sequenza di DNA. In base alla sequenza di DNA che si vuole amplificare, indicata come DNA target, vengono sintetizzati differenti primers, complementari ai due estremi del segmento target. La PCR è una metodica molto sensibile, e permette di rivelare quantità minime di genoma virale. I primer possono riconoscere o sequenze conservate tra diversi tipi di HPV (primer consenso) o sequenze specifiche di singoli tipi che identificano i tipi di HPV sulla base di polimorfismi, generalmente nelle regioni E6 e E7 (primer tipo-specifici). Se la reazione di amplificazione viene condotta utilizzando primers consenso, l'identificazione dei genotipi di HPV può essere eseguita con vari metodi quali l'RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), l'ibridazione inversa o il sequenziamento. In generale, queste tecniche presentano un'elevata accuratezza nella definizione del sierotipo virale ma una bassa sensibilità nei casi di co-infezioni.

Nuovi test molecolari

A causa della relativa bassa specificità dei test molecolari tradizionali, descritti in precedenza, e dell'alto tasso di risultati falsi negativi forniti dal Pap test, sono stati proposti nuovi test molecolari per l'identificazione di donne con un più alto rischio di progressione a tumore invasivo⁷⁴.

Analisi dei trascritti di E6/E7 – Il cancro cervicale è caratterizzato dalla sovraespressione dei geni E6 ed E7 dei sierotipi ad alto rischio di HPV. E' stato sviluppato un sistema di amplificazione multiplo di acidi nucleici per l'identificazione dell'RNA messaggero di E6/E7 dei tipi 16, 18, 31, 33 e 45 (PreTect® HPV Proofer Kit, NorChip AS).

L'analisi dell'espressione dell'mRNA con questo saggio in 204 carcinomi cervicali invasivi, già confermati a livello istologico, ha dimostrato la presenza di trascritti oncogenici nel 97% dei casi, confermando l'espressione di questi geni nei tumori invasivi. Uno studio comparativo tra la PCR tradizionale e questo saggio ha mostrato che quest'ultimo ha una sensibilità uguale ma una specificità significativamente più alta per le lesioni CIN2+ rispetto alla tecnica tradizionale.

Tipizzazione di HPV – Le donne infettate da HPV16 e HPV18 hanno una probabilità maggiore di sviluppare un tumore rispetto a quelle infettate da altri tipi ad alto rischio. La ricerca di varianti intratipiche di HPV, che sono definite da una differenza nella sequenza del gene L1 di meno del 2% rispetto ad un prototipo di riferimento, ha dimostrato di essere utile in studi epidemiologici. In popolazioni multietniche, varianti asiatiche-americane e altre non europee di HPV16 e 18 sono associate ad un più alto rischio di infezione persistente e di sviluppo di lesioni precancerose. Anche l'indagine di varianti di E6 ed E7 ad alto rischio ha fornito interessanti risultati. La variante T350G del gene E6 di HPV16 è associata ad una aumentata persistenza virale e oncogenicità. Il cambiamento aminoacidico causato da questa mutazione potrebbe incidere con la sua attività degradativa su p53, oltre a variare la sua immunogenicità. Inoltre, la mutazione L83V di HPV16 aumenta l'attivazione del pathway MAPK e coopera con Notch1 nella tumorigenesi. Così, la tipizzazione di oncogeni virali potrebbe essere utile per scopi epidemiologici e anche come marcatori prognostici.

Analisi dell'espressione di INK4A – Nelle infezioni da HPV ad alto rischio, E7 lega e degrada RB, e questo risulta in un sostanziale aumento della sintesi di INK4A (Figura8). Gli anticorpi che sono diretti contro questa proteina permettono l'identificazione selettiva, mediante la colorazione del campione, di sezioni istologiche o di strisci vaginali infettati da HPV ad alto rischio (Figura14). Questo suggerisce che l'individuazione di questo marcatore può fornire un supporto diagnostico per distinguere lesioni CIN da metaplasie immature o altri cambiamenti non neoplastici della cervice. Uno studio recente ha dimostrato che l'individuazione di HPV mediante questa tecnica migliora la specificità per le lesioni CIN2+. Di fatto, la rilevazione di INK4A permette il mantenimento dei vantaggi in sensibilità dei test molecolari rispetto alla citologia convenzionale, ma con referenza alla colposcopia simile a quella della citologia.

Analisi dell'integrazione del DNA – L'integrazione del DNA di HPV16 e di altri HPV ad alto rischio nel genoma della cellula infettata è un importante fase della tumorigenesi, dato che essa promuove l'espressione degli oncogeni E6/E7. Studi clinici hanno dimostrato che l'integrazione del DNA è associato ad un più alto rischio di fallimento del trattamento e ad un più breve tempo di sviluppo della patologia, rispetto ai casi senza integrazione. Così, la valutazione dell'integrazione

mediante Southern-blot o analisi quantitativa del rapporto E2/E6 mediante rt-PCR (real time-PCR), potrebbe rappresentare un buon marcatore prognostico.

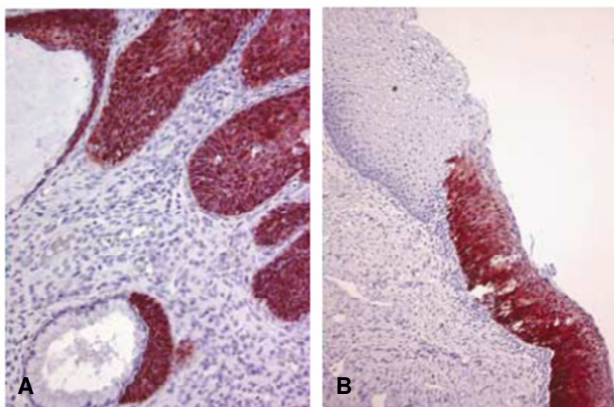


Figura14 | **Rilevazione dell'espressione di INK4A in campioni citologici di adenocarcinoma (A) e neoplasia cervicale (B)⁴⁸.**

I programmi di screening

I programmi di screening per la prevenzione del carcinoma cervicale derivano dalla conoscenza della storia naturale di questa patologia e del ruolo dell'infezione da HPV nello sviluppo del tumore. Questi programmi, che variano drasticamente da paese a paese, includono saggi per l'individuazione precoce del cancro, così come strategie gestionali per le fasi di trattamento e post-trattamento. Diverse società scientifiche nazionali e internazionali hanno redatto le linee guida per la prevenzione e lo screening di questo tumore. Tutte queste linee guida enfatizzano l'utilità di incorporare i test per l'individuazione di HPV come complemento alla citologia cervicale in donne di età superiore ai 30 anni e per il controllo di donne con un Pap test anormale.

Le linee guida della Società Americana per il Cancro⁶⁶ raccomanda che lo screening debba essere approssimativamente iniziato entro 3 anni dall'inizio dell'attività sessuale, ma non dopo i 21 anni. L'indagine dovrebbe essere fatta ogni anno con un Pap test convenzionale oppure ogni due anni con il test citologico in liquido. A 30 anni di età o più tardi, le donne che hanno avuto tre risultati normali di seguito possono sottoporsi ogni 2 o 3 anni al solo saggio citologico, oppure ogni 3 anni al saggio citologico e al test per l'individuazione del DNA di HPV (HPV test). Donne di età superiore a 70 anni che sono risultate negative a tre Pap-test e che non hanno avuto un risultato anormale negli ultimi 10 anni, o che hanno subito una totale isterectomia possono scegliere di non sottoporsi più a questi controlli. Speciali raccomandazioni vengono fornite alle categorie ad alto rischio. Simili linee guida sono state proposte dal Collegio Americano di Ostetricia e Ginecologia nel 2003 (<http://www.acog.org>), dai Servizi Preventivi Americani nello stesso anno

(<http://www.preventiveservices.ahrq.gov>) e, più recentemente, nel 2006, dalla Società Americana per la Colposcopia e la Patologia Cervicale⁶⁷.

Negli stati membri dell'Unione Europea, i programmi di screening per la prevenzione del tumore della cervice sono organizzati in accordo con il Concilio Europeo⁶⁸ e le Linee Guida Europee⁶⁹, che raccomandano di avviare gli screening come un programma sanitario pubblico, con invito personale ad ogni donna appartenente alla popolazione target. In accordo con queste linee, la citologia cervicale è il test classico raccomandato, che dovrebbe iniziare nella fascia di età compresa tra i 20 e i 30 anni. La ripetizione dello screening è raccomandato ogni 3-5 anni sino all'età di 60-65 anni. In donne più anziane, che hanno avuto tre o più risultati negativi, la sospensione dei controlli è considerata appropriata, mentre una speciale attenzione deve essere prestata a quelle che non hanno mai aderito all'invito.

Il saggio per identificare la presenza di HPV è proposto (i) nello screening primario per tipi di HPV oncogeni solo o in combinazione con l'esame citologico, (ii) in donne che hanno presentato risultati citologici ambigui, (iii) come supplemento in donne trattate per CIN per predire il successo o il fallimento del trattamento. Le opzioni di trattamento di cellule squamose atipiche di significato non determinato (ASC-US) includono l'HPV test, la ripetizione del Pap test dopo 6-12 mesi, o la colposcopia. La ripetizione dell'esame citologico o la colposcopia (opzione preferita) sono invece considerate opzioni accettabili per la gestione iniziale di LSIL, mentre l'HPV test è considerato non sufficientemente selettivo.

I VACCINI

Lo sviluppo dei vaccini profilattici

La scoperta che HPV è il principale agente eziologico del carcinoma cervicale e di altre patologie del tratto ano-genitale implica che con lo sviluppo di un vaccino efficace possa essere possibile prevenire l'infezione, offrendo un'opportunità senza precedenti.

Tradizionalmente i vaccini profilattici, il cui meccanismo di azione si esercita attraverso l'induzione di anticorpi neutralizzanti l'agente infettante, hanno rappresentato un modo efficace per il controllo delle malattie virali. Il tropismo tissutale e la complessa biologia del papilloma virus lo differenzia però dalla maggior parte degli altri microrganismi verso i quali la vaccinazione ha avuto successo. Il ciclo vitale di HPV, come è stato detto in precedenza, è esclusivamente intraepiteliale e solo l'epitelio squamoso differenziato è capace di consentire il ciclo infettivo completo e la produzione di particelle infettanti. In un'infezione naturale non c'è una viremia, le particelle neosintetizzate sono rilasciate dalla superficie delle mucose lontano dai vasi linfatici e vascolari e i livelli sierici di anticorpi neutralizzanti sono bassi. Inoltre, le progenie virale è assemblata nelle cellule degli strati

superficiali, lontano dalla maggior parte delle cellule che presentano gli antigeni e dai macrofagi e quindi non viene generata alcuna risposta infiammatoria o citolisi.

Nonostante la localizzazione superficiale della maggiorparte degli antigeni virali non stimoli sufficientemente il sistema immunitario, durante il processo infettivo naturale, la vaccinazione con proteine strutturali in sistemi animali permise l'induzione di una efficace risposta immunitaria. Studi pionieristici compiuti da Jarrett e collaboratori⁷⁵, utilizzando virioni del papillomavirus bovino come vaccino, mostrarono che la vaccinazione poteva essere utilizzata per indurre anticorpi specifici contro HPV e prevenirne l'infezione. Pochi anni dopo, venne dimostrato che vaccini costituiti da virioni inattivati mediante trattamento con formalina proteggevano gli animali dall'acquisizione naturale di verruche⁷⁶. Nonostante queste scoperte avessero generato fermento nella comunità scientifica, rimaneva il problema della difficoltà di coltura dei virioni di HPV e della presenza di tre potenti oncogeni nel suo genoma.

In questo contesto, il profilo di sicurezza e di efficacia del vaccino contro il virus dell'epatite B galvanizzò l'interesse nello sviluppo di un vaccino basato sull'antigene capsidico maggiore L1. I primi studi indicarono che gli epitopi protettivi di L1 erano probabilmente dipendenti dalla loro conformazione nativa, dato che la vaccinazione con molecole di L1 denaturate era poco efficace⁷⁷. La prima comunicazione che l'espressione ricombinante di L1 in cellule di mammifero poteva risultare nella formazione di particelle simili a quelle virali (VLP)⁷⁸ (Figura15), che esponevano epitopi conformazionali riconosciuti dagli anticorpi monoclonali neutralizzanti, fu seguita rapidamente da altri lavori che riportavano dell'efficiente produzione di VLP su larga scala in sistemi di espressione eucariotici, in cellule di insetto trasformate con baculovirus⁷⁹ e in lievito⁸⁰.

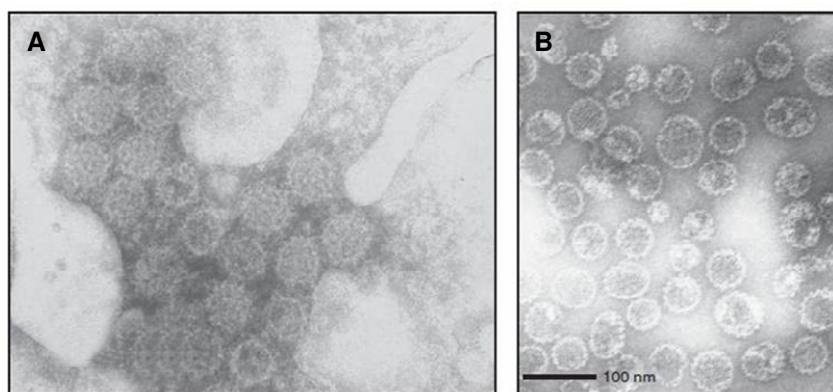


Figura15 | **Confronto al microscopio elettronico di particelle virali naturali (A) e di VLP (B)**⁸³.

In assenza di un modello per l'infezione da HPV, gli animali modello cane, mucca e coniglio fornirono la prova di concetto preclinica che le VLP prodotte in cellule di insetto o in lievito potevano proteggere dall'infezione di HPV. GlaxoSmithKline e MedImmune si basarono sul

modello canino di infezione orale da COPV per mostrare che le VLP prodotte in cellule di insetto proteggevano dall'attacco virulento. Questi studi mostrarono un'induzione dose dipendente di anticorpi protettivi e confermano che gli anticorpi neutralizzanti erano sufficienti per l'immunità utilizzando esperimenti di trasferimento passivo⁸¹. In modo simile, Jansen e collaboratori mostrarono che VLP prodotte in lievito potevano indurre un'immunità protettiva in coniglio⁸². Gli studi clinici sull'uomo seguirono rapidamente la prova di concetto degli studi preclinici e portarono alla pubblicazione dei primi documenti attestanti l'efficacia di entrambe le preparazioni, nonostante queste differissero notevolmente per la tecnologia di produzione, per la composizione e per l'adiuvante addizionato. Il superamento dei trial clinici previsti, per dimostrarne l'immunogenicità (risposta B e T), la tollerabilità (reazioni locali e sistemiche), la sicurezza (eventi negativi a breve e a lungo termine) e l'efficacia (protezione fornita contro la malattia) portarono all'entrata in commercio del vaccino prodotto in lievito (GlaxoSmithKline) nel 2006 e del vaccino prodotto in baculovirus (Merck&Co) l'anno successivo.

I vaccini in commercio

Il vaccino quadrivalente Gardasil[®] (Merck&Co) e il vaccino bivalente Cervarix[®] (GlaxoSmithKline), autorizzati in Europa rispettivamente nel settembre 2006 e nel settembre 2007, sono le uniche preparazioni profilattiche attualmente in commercio per la prevenzione dell'infezione da HPV. Entrambi sono basati sulla proprietà della proteina capsidica maggiore L1 di autoassemblarsi in VLP, particelle prive di DNA virale, simili ai virioni naturali sia dal punto di vista morfologico (Figura15) che immunologico. In termini di composizione, il vaccino bivalente include VLP di HPV16 e 18, responsabili di oltre il 70% dei casi di carcinoma uterino, mentre il quadrivalente contiene, oltre ad esse, VLP di HPV6 e 11, responsabili del 90% dei condilomi genitali. Oltre al differente sistema di espressione utilizzato per la produzione delle particelle e alla loro differente composizione, descritta in dettaglio nella Tabella3, ogni compagnia ha optato per un diverso adiuvante e per una dissimile schedula di immunizzazione.

La componente adiuvante - Nonostante le VLP siano altamente immunogeniche, i vaccini a subunità proteica normalmente richiedono la presenza di adiuvanti per raggiungere il picco di immunogenicità. Nel vaccino quadrivalente gli antigeni sono combinati con l'adiuvante esclusivo AAHS (Amorphous Aluminum HydroxySulfate). Questo adiuvante, brevettato dalla GlaxoSmithKline, è stato utilizzato in diversi vaccini dalla ditta produttrice ed è stato somministrato a milioni di individui con nessuna evidenza di tossicità. Il vaccino bivalente prevede invece la combinazione degli antigeni proteici con l'adiuvante ASO4, composto da idrossido di alluminio e monofosforil lipide A (MPL), una endotossina modificata e agonista di TLR4 (Toll-Like Receptor 4). ASO4 è uno degli adiuvanti di nuova generazione. Ad oggi è stato somministrato a circa 90.000 individui, nel vaccino per l'epatite B (Fendrix[®]) e nella sperimentazione del vaccino per l'herpes simplex virus⁶³, ma non è stato riportato nessun caso di tossicità.

	Cervarix®	Gardasil®
Ditta produttrice	Merck & Co	GlaxoSmithKline
Tipi di HPV	16, 18	16, 18, 6, 11
Antigene per dose	20µg HPV16 L1 20µg HPV18 L1	40µg HPV16 L1 20µg HPV18 L1 20µg HPV6 L1 40µg HPV11 L1
Tecnologia di produzione	Hi-5 Baculovirus	Lievito
Adiuvante	ASO4 (500µg idrossido di alluminio + 50µg monosfosforil-lipideA)	AAHS (225µg alluminio idrossifosfato solfato amorfo)
Via di somministrazione	intramuscolare	intramuscolare
Schedula	0, 1, 6 mesi	0, 2, 6 mesi

Tabella3 | **Caratteristiche dei vaccini profilattici anti-HPV in commercio.**

L'immunità protettiva indotta dai vaccini dipende principalmente dall'attivazione delle appropriate cellule Th2 CD4+ antigene-specifiche, che 'aiutano' le cellule B attivate dall'antigene a differenziarsi in plasma cellule secernenti gli anticorpi e in cellule B memoria. Nell'uomo, i sali di alluminio sono gli adiuvanti più comuni, in grado di indurre la generazione di anticorpi e una risposta di tipo Th2. Il meccanismo di azione non è completamente compreso ma è stato generalmente assunto che l'assorbimento degli antigeni al sale formi un deposito nel sito di vaccinazione dal quale l'antigene può essere rilasciato, trasformando un antigene solubile in particolato e quindi favorendo alte concentrazioni locali di antigene e quindi l'assunzione da parte delle APC (Antigen Presenting Cell). L'idrossido di alluminio ha inoltre effetti diretti sui macrofagi, attivandoli per la presentazione dell'antigene. Recentemente, è stato mostrato che questo composto attiva la caspasi-1 e induce la secrezione di IL-18 e IL-1 β dalle APC stimulate dagli agonisti dei TLR⁸⁴. Queste citochine sono esse stesse potenti adiuvanti e la combinazione dell'attivazione di TLR induce una risposta anticorpale T-dipendente con la predominante generazione di anticorpi serici IgG1.

ASO4, l'adiuvante presente nel vaccino bivalente, combina l'idrossido di alluminio alle MPL, anch'esse agoniste di TLR4. Questa combinazione aumenta fortemente l'immunogenicità delle VLP in confronto al solo idrossido di alluminio. Così, un mese dopo la terza somministrazione, soggetti immunizzati con le VLP di HPV16 o 18 addizionate ad ASO4 mostravano una concentrazione anticorpale significativamente più alta rispetto alle particelle adiuivate con il solo idrossido di alluminio, e due o tre volte il numero di cellule B memoria circolanti. ASO4 rappresenta quindi una nuova generazione di adiuvanti che sono progettati razionalmente sulla base della comprensione della risposta immunitaria e combinando componenti con differenti funzioni.

La via di somministrazione - L'aumentata immunogenicità di questi preparati rispetto alle infezioni naturali è correlata probabilmente anche alla metodica di somministrazione utilizzata. In un'infezione naturale non c'è una viremia, le particelle virali sono rilasciate dalla superficie delle mucose lontano dai vasi linfatici e vascolari e i livelli sierici di anticorpi neutralizzanti sono bassi. Inoltre, data la mancanza di un ambiente infiammatorio, sia i macrofagi che le cellule di Langerhans saranno relativamente inefficaci. Al contrario, i vaccini VLP attualmente in commercio sono somministrati mediante iniezione intramuscolare che favorisce l'accesso immediato degli antigeni ai vasi linfatici e vascolari. Essi incontrano rapidamente le cellule dendritiche stromali che, in un ambiente infiammatorio indotto dalla vaccinazione, sono fortemente attivate e migrano ai linfonodi, dove attivano la risposta T helper. Allo stesso tempo, le VLP, sia legate alla superficie delle APC che ad altri immunociti locali, sono trasportate ai linfonodi dove incontrano e attivano le cellule B immature e inizia così la cascata di eventi che risulterà nell'immunità protettiva.

Efficacia clinica

La valutazione dei vaccini viene condotta mediante trials clinici, che sono classificati in tre fasi: fase I, II e III. Negli studi clinici di fase I, il vaccino viene testato su un piccolo numero di adulti sani (circa 20) per valutarne le proprietà, la tollerabilità e i parametri farmacologici e clinici; fondamentalmente gli studi della fase I servono per valutarne la sicurezza. Gli studi della fase II coinvolgono un numero più ampio di soggetti e hanno lo scopo di ottenere informazioni preliminari sulla capacità del vaccino di produrre l'effetto desiderato (l'immunogenicità) nella popolazione target e la sicurezza. Gli studi clinici della fase III sono quelli su cui si basa la licenza e devono produrre dati sufficienti per poter dimostrare che il nuovo prodotto è sicuro ed efficace per l'obiettivo programmato.

Gli studi di fase I e II condotti su entrambi i vaccini profilattici contro il papillomavirus hanno dimostrato un'elevata sicurezza, tollerabilità e immunogenicità. In termini di immunogenicità, entrambi hanno mostrato la capacità di indurre una specifica seroconversione verso i tipi di HPV inclusi nel vaccino in almeno il 99% dei destinatari^{85,86}. Questi vaccini hanno conferito il 100% di protezione da infezioni persistenti tipo-specifiche da HPV16 e 18 e dalle lesioni cervicali associate. I risultati pubblicati mostrano inoltre che il picco di anticorpi (al settimo mese, trenta giorni dopo la somministrazione della terza dose di ciascun vaccino) indotto nel 99.8% dei riceventi è risultato 50-100 volte più alto rispetto a quello misurato in seguito ad infezione naturale.

Entrambi i vaccini sono stati quindi valutati in trial clinici di fase III, condotti in diversi paesi e saggiati su gruppi etnici differenti. Nonostante la tecnologia delle VLP costituisca la base di entrambi i vaccini, i risultati non possono essere completamente confrontati dato che sono presenti alcune differenze come l'adiuvante utilizzato, la progettazione dello studio, l'età dei partecipanti, i criteri di inclusione ed esclusione per la partecipazione, la proporzione di soggetti provenienti da differenti aree etniche e geografiche, l'incidenza dell'infezione da HPV e della malattia, il numero di

casi analizzati, i parametri di valutazione finali e i saggi utilizzati per misurare i risultati. Da notare inoltre che sono state utilizzate differenti analisi, sia per l'individuazione del DNA di HPV che per la misurazione dei titoli anticorpali, così come una differente nomenclatura.

Ad esempio, mentre per il vaccino quadrivalente è stata usata un'analisi 'According To Protocol' (ATP), volta a valutare l'efficacia teorica del vaccino e ad analizzare i dati relativi alle donne che risultano negative per i tipi di HPV contenuti nel vaccino al momento dell'arruolamento e fino ad un mese dopo aver ricevuto la terza dose e che non hanno violato il protocollo di studio, per il vaccino bivalente è stata usata un'analisi 'Per Protocol Population' (PPP), che valuta l'efficacia del vaccino quando utilizzato nella realtà, includendo nell'analisi i dati relativi a tutte le donne arruolate, purché abbiano ricevuto almeno una dose di vaccino o placebo, indipendentemente dalla positività per i tipi di HPV contenuti nel vaccino e dalla loro aderenza al protocollo di studio. Complessivamente, questi trial clinici hanno mostrato che i vaccini di questa generazione presentano un buon profilo di sicurezza, un'eccellente immunogenicità e un'elevata efficacia contro lesioni pretumorali attribuibili a ceppi di HPV correlati al vaccino contro i quali le rispettive preparazioni coprono. Gli end-points clinici con cui si valuta l'efficacia di un vaccino, l'incidenza della malattia, non sono applicabili nel caso del carcinoma cervicale sia per ragioni pratiche (il carcinoma cervicale compare dopo molti anni dall'infezione iniziale) che etiche. In linea di principio, l'efficacia dei vaccini HPV dovrebbe essere misurata in termini di casi di cancro invasivo cervicali dovuti ai tipi vaccinali prevenuti nei riceventi il vaccino rispetto ai riceventi il placebo. E' evidente che, visti gli ovvi problemi etici di un approccio di tale tipo, si sia stabilito di trovare un risultato di efficacia che rappresenti un surrogato accettabile. Poiché molti dati mostrano come l'individuazione e il trattamento della neoplasia cervicale intraepiteliale di alto grado (CI2/3) riduce l'incidenza e la mortalità del carcinoma cervicale, l'individuazione di CIN2/3 accompagnata dall'individuazione del DNA di HPV è attualmente considerato un end-point intermedio.

Vaccino bivalente

L'efficacia del Cervarix[®] è stata valutata in due studi clinici di fase II e III, randomizzati, controllati con placebo^{87,88}. Lo studio di Fase III, 'PApi'lloma TRIal against Cancer In young Adults' (PATRICIA), ha arruolato donne appartenenti a 14 paesi in Asia, Europa, America Latina e Nord America, di età compresa tra 15 e 25 anni, senza tener conto della citologia basale, dello stato sierologico e della presenza del DNA di HPV. Donne con una precedente storia di colposcopia, gravide, affette da malattie croniche o autoimmuni sono state invece escluse dallo studio.

L'obiettivo primario era quello di verificare l'efficacia del vaccino verso lesioni CIN2+ associate ad HPV16 e 18 in donne risultate sieronegative all'inizio della sperimentazione. Obiettivi aggiuntivi ed esploratori includevano la verifica dell'efficacia verso infezioni persistenti da HPV16, 18 o altri tipi oncogenici e l'efficacia verso CIN associate ad HPV16, 18 o altri tipi ad alto rischio.

Nella popolazione ATP (nessuna violazione al protocollo) è stata rilevata un'efficacia elevata verso CIN2+ associate a HPV16 e 18. In particolare l'efficacia è risultata essere del 98.1% (96.1%, CI

88.4-100) verso HPV16/18, 100% (91-100) verso HPV16, 92.3% (45.7-99.9) verso HPV18 (Tabella4). Risultati simili sono stati osservati nella popolazione totale in studio (TVC).

	N	HPV-16 or HPV-18 DNA in lesion				HPV-16 or HPV-18 DNA in lesion and in preceding cytology samples (HPV type assignment algorithm)*			
		n	Event rate (96-1% CI)†	Vaccine efficacy (96-1% CI)	p value	n	Event rate (96-1% CI)†	Vaccine efficacy (96-1% CI)	p value
ATP-E									
CIN2+									
HPV-16/18‡									
Vaccine	7344	4	0.02 (0.01 to 0.06)	92.9% (79.9 to 98.3)	<0.0001	1	0.01 (0.00 to 0.03)	98.1% (88.4 to 100)	<0.0001
Control	7312	56	0.32 (0.24 to 0.42)	..	..	53	0.30 (0.22 to 0.40)	..	..
HPV-16									
Vaccine	6303	2	0.01 (0.00 to 0.05)	95.7% (82.9 to 99.6)	<0.0001	0	0.00 (0.00 to 0.03)	100% (91.0 to 100)	<0.0001
Control	6165	46	0.31 (0.22 to 0.42)	..	..	45	0.30 (0.22 to 0.41)	..	..
HPV-18									
Vaccine	6794	2	0.01 (0.00 to 0.05)	86.7% (39.7 to 98.7)	0.0013	1	0.01 (0.00 to 0.04)	92.3% (45.7 to 99.9)	0.0009
Control	6746	15	0.09 (0.05 to 0.16)	..	..	13	0.08 (0.04 to 0.14)	..	..
CIN3+									
HPV-16/18‡									
Vaccine	7344	2	0.01 (0.00 to 0.04)	80.0% (0.3 to 98.1)	0.0221	0	0.00 (0.00 to 0.02)	100% (36.4 to 100)	0.0038
Control	7312	10	0.06 (0.03 to 0.11)	..	..	8	0.05 (0.02 to 0.09)	..	..
HPV-16									
Vaccine	6303	2	0.01 (0.00 to 0.05)	67.2% (-97.1 to 97.2)	0.1749	0	0.00 (0.00 to 0.03)	100% (8.8 to 100)	0.0146
Control	6165	6	0.04 (0.01 to 0.09)	..	..	6	0.04 (0.01 to 0.09)	..	..
HPV-18									
Vaccine	6794	0	0.00 (0.00 to 0.02)	100% (-19.3 to 100)	0.0307	0	0.00 (0.00 to 0.02)	100% (-170.5 to 100)	0.1236
Control	6746	5	0.03 (0.01 to 0.07)	..	..	3	0.02 (0.00 to 0.06)	..	..
TVC-E									
CIN2+									
HPV-16/18‡									
Vaccine	8040	5	0.02 (0.01 to 0.05)	94.5% (86.2 to 98.4)	<0.0001	2	0.01 (0.00 to 0.03)	97.7% (91.0 to 99.8)	<0.0001
Control	8080	91	0.39 (0.31 to 0.48)	..	..	87	0.37 (0.30 to 0.47)	..	..
HPV-16									
Vaccine	6921	3	0.01 (0.00 to 0.05)	95.9% (87.0 to 99.3)	<0.0001	1	0.00 (0.00 to 0.03)	98.6% (91.5 to 100)	<0.0001
Control	6923	73	0.37 (0.28 to 0.46)	..	..	71	0.36 (0.27 to 0.45)	..	..
HPV-18									
Vaccine	7455	2	0.01 (0.00 to 0.04)	91.6% (64.6 to 99.2)	<0.0001	1	0.00 (0.00 to 0.03)	95.4% (70.1 to 99.9)	<0.0001
Control	7480	24	0.11 (0.07 to 0.17)	..	..	22	0.10 (0.06 to 0.16)	..	..
CIN3+									
HPV-16/18‡									
Vaccine	8040	2	0.01 (0.00 to 0.03)	90.9% (60.8 to 99.1)	<0.0001	0	0.00 (0.00 to 0.02)	100% (78.1 to 100)	<0.0001
Control	8080	22	0.09 (0.06 to 0.15)	..	..	20	0.09 (0.05 to 0.13)	..	..
HPV-16									
Vaccine	6921	2	0.01 (0.00 to 0.04)	87.5% (43.8 to 98.8)	0.0013	0	0.00 (0.00 to 0.02)	100% (72.1 to 100)	<0.0001
Control	6923	16	0.08 (0.04 to 0.13)	..	..	16	0.08 (0.04 to 0.13)	..	..
HPV-18									
Vaccine	7455	0	0.00 (0.00 to 0.02)	100% (24.2 to 100)	0.0156	0	0.00 (0.00 to 0.02)	100% (-20.3 to 100)	0.0625
Control	7480	7	0.03 (0.01 to 0.07)	..	..	5	0.02 (0.01 to 0.06)	..	..

Tabella4 | **Efficacia del vaccino Cervarix® verso lesioni CIN2+ e CIN3+ nei gruppi ATP-E e TVC-E⁸⁸.**

Tra i 60 casi di lesioni CIN2+ sono state individuate 12 lesioni CIN3+ contenenti il DNA di HPV16/18, due nel gruppo vaccinato e dieci nel gruppo di controllo. Mediante l'algoritmo di assegnazione del tipo di HPV non è stato identificato nessun caso di CIN3+ associato ad HPV16/18 e quindi l'efficacia del vaccino si è dimostrata del 100%. Risultati simili si sono ottenuti nella popolazione TVC (Tabella4).

	N	n	Vaccine efficacy (96-1% CI)	p value
6-month persistent infection				
HPV-31				
Vaccine	7394	45	77.5% (68.3 to 84.4)	<0.0001
Control	7398	199	..	..
HPV-33				
Vaccine	7527	55	45.1% (21.7 to 61.9)	0.0003
Control	7496	100	..	..
HPV-45				
Vaccine	7587	19	76.1% (59.1 to 86.7)	<0.0001
Control	7540	79	..	..
HPV-52				
Vaccine	7280	293	7.4% (-9.9 to 22.0)	0.3201
Control	7221	315	..	..
HPV-58				
Vaccine	7512	111	-10.3% (-48.0 to 17.7)	0.5337
Control	7494	101	..	..
HPV-31/33/45/52/58				
Vaccine	7664	486	29.2% (19.9 to 37.5)	<0.0001
Control	7640	679	..	..
Any oncogenic type except HPV-16/18*				
Vaccine	7665	1207	11.3% (3.7 to 18.3)	0.0013
Control	7640	1351	..	..
Any oncogenic type				
Vaccine	7665	1233	25.3% (19.2 to 31.0)	<0.0001
Control	7640	1607	..	..
12-month persistent infection†				
HPV-31				
Vaccine	7248	17	80.5% (66.1 to 89.5)	<0.0001
Control	7252	87	..	..
HPV-33				
Vaccine	7375	23	41.0% (-4.0 to 67.3)	0.0422
Control	7347	39	..	..
HPV-45				
Vaccine	7435	8	60.0% (1.5 to 85.5)	0.0236
Control	7388	20	..	..
HPV-52				
Vaccine	7134	137	-7.8% (-40.1 to 17.1)	0.6193
Control	7078	127	..	..
HPV-58				
Vaccine	7361	41	-17.7% (-95.1 to 28.6)	0.5656
Control	7346	35	..	..
HPV-31/33/45/52/58				
Vaccine	7508	216	24.4% (8.6 to 37.5)	0.0017
Control	7488	285	..	..
Any oncogenic type except HPV-16/18*				
Vaccine	7509	532	10.9% (-0.9 to 21.4)	0.0441
Control	7488	596	..	..
Any oncogenic type				
Vaccine	7509	549	28.9% (20.1 to 36.8)	<0.0001
Control	7488	760	..	..

(Continues in next column)

	N	n	Vaccine efficacy (96-1% CI)	p value
(Continued from previous column)				
CIN2+				
HPV-31				
Vaccine	7583	2	92.0% (66.0 to 99.2)	<0.0001
Control	7599	25	..	..
HPV-33				
Vaccine	7720	12	51.9% (-2.9 to 78.9)	0.0332
Control	7706	25	..	..
HPV-45†				
Vaccine	7782	0	100% (-67.8 to 100)	0.0619
Control	7745	4	..	..
HPV-52				
Vaccine	7461	12	14.3% (-108.1 to 65.4)	0.7000
Control	7414	14	..	..
HPV-58				
Vaccine	7709	6	64.5% (1.5 to 89.2)	0.0225
Control	7702	17	..	..
HPV-31/33/45/52/58				
Vaccine	7862	30	53.0% (24.7 to 71.3)	0.0004
Control	7853	64	..	..
Any oncogenic type except HPV-16/18*				
Vaccine	7863	50	54.0% (34.0 to 68.4)	<0.0001
Control	7853	109	..	..
Any oncogenic type				
Vaccine	7863	54	61.9% (46.7 to 73.2)	<0.0001
Control	7853	142	..	..

Tabella5 | Efficacia del vaccino Cervarix® verso infezioni persistenti e lesioni CIN2+ nel gruppo ATP-E⁸⁸.

La capacità cross-protettiva del vaccino è stata valutata sia verso infezioni persistenti che lesioni CIN2+. Le donne sono state incluse in questa analisi solo se erano risultate negative alla presenza del DNA di HPV al mese 0 (e al mese 6 per il gruppo ATP), indipendentemente dallo stato serico iniziale. Una significativa efficacia del vaccino è stata osservata verso infezione persistenti di 6 e 12 mesi, così come CIN2+ da HPV31, in tutti i gruppi (ATP-E, TVC-E, TVC) (Tabella5). Per HPV45, è stata verificata la cross-protezione per infezioni di 6 e 12 mesi, in tutti i gruppi. Allo stesso modo, è stata verificata la protezione anche verso HPV33. L'efficacia del vaccino verso CIN2+ con una composita origine (HPV31, 33, 45, 52 e 58) era maggiore del 50% nel gruppo ATP-E. Nel caso di lesioni CIN2+ associate a 14 tipi oncogeni combinati l'efficacia era maggiore del 60% (Tabella5). Risultati simili si sono ottenuti nel gruppo TVC e TVC-E.

In conclusione, quanto emerso da questo studio dimostra la capacità di questo vaccino di fornire protezione verso lesioni CIN2+ che sono associate ad HPV16 e 18 così come lesioni che sono associate ai tipi HPV31, 33 e 45, seppure con una efficienza notevolmente più limitata.

Vaccino quadrivalente

L'efficacia di Gardasil® è stata valutata in donne di età compresa tra 16 e 26 anni, in 4 studi clinici di Fase II e III, randomizzati, controllati con placebo^{89,90,91,92}. Il recente trial clinico di fase III (FUTURE I e II), condotto su 15000 donne di età compresa tra 16 e 26 anni provenienti da Nord America, America Latina, Asia ed Europa, ha mostrato l'elevata efficienza del vaccino quadrivalente nella prevenzione della neoplasia intraepiteliale cervicale, vaginale o vulvare correlata a HPV6, 11, 16, 18 così come dell'adenocarcinoma in situ in donne che non presentavano infezioni preesistenti da HPV al momento dell'arruolamento. E' stata inoltre osservata un'elevata efficacia contro condilomi genitali correlati ad HPV6 e 11. I dati da questi trial indicavano che donne che non erano mai entrate in contatto con nessuno dei tipi di HPV inclusi nella formulazione prima della vaccinazione godevano dei benefici completi (ie, la protezione dalla malattia causata dai quattro sierotipi di HPV), mentre le donne che era già state infettate da uno o più dei tipi virali potevano trarre vantaggio solo di benefici limitati (i.e., la protezione dai tipi con cui non erano ancora entrate in contatto al momento della vaccinazione).

L'obiettivo della più recente fase III era invece quello di verificare l'efficacia, la sicurezza, e l'immunogenicità del Gardasil® in donne di età compresa tra 24 e 45 anni⁹³. Sulla base di precisi criteri di selezione sono state arruolate 3819 donne provenienti da Colombia, Francia, Germania, Filippine, Spagna, Thailandia. Donne con una precedente storia di isterectomia, gravide, affette da malattie croniche o autoimmuni, infettate da HIV o comunque immunocompromesse sono state invece escluse dallo studio.

Per quanto riguarda l'aspetto immunologico, i dati forniti dal trial clinico dimostrano che il vaccino quadrivalente induceva titoli anticorpali contro HPV6, 11, 16 e 18 simili, sia nella fascia di età 24-34 che 35-45 (Figura16A). Confrontati con i dati immunologici ottenuti da donne di 16-23 anni, che

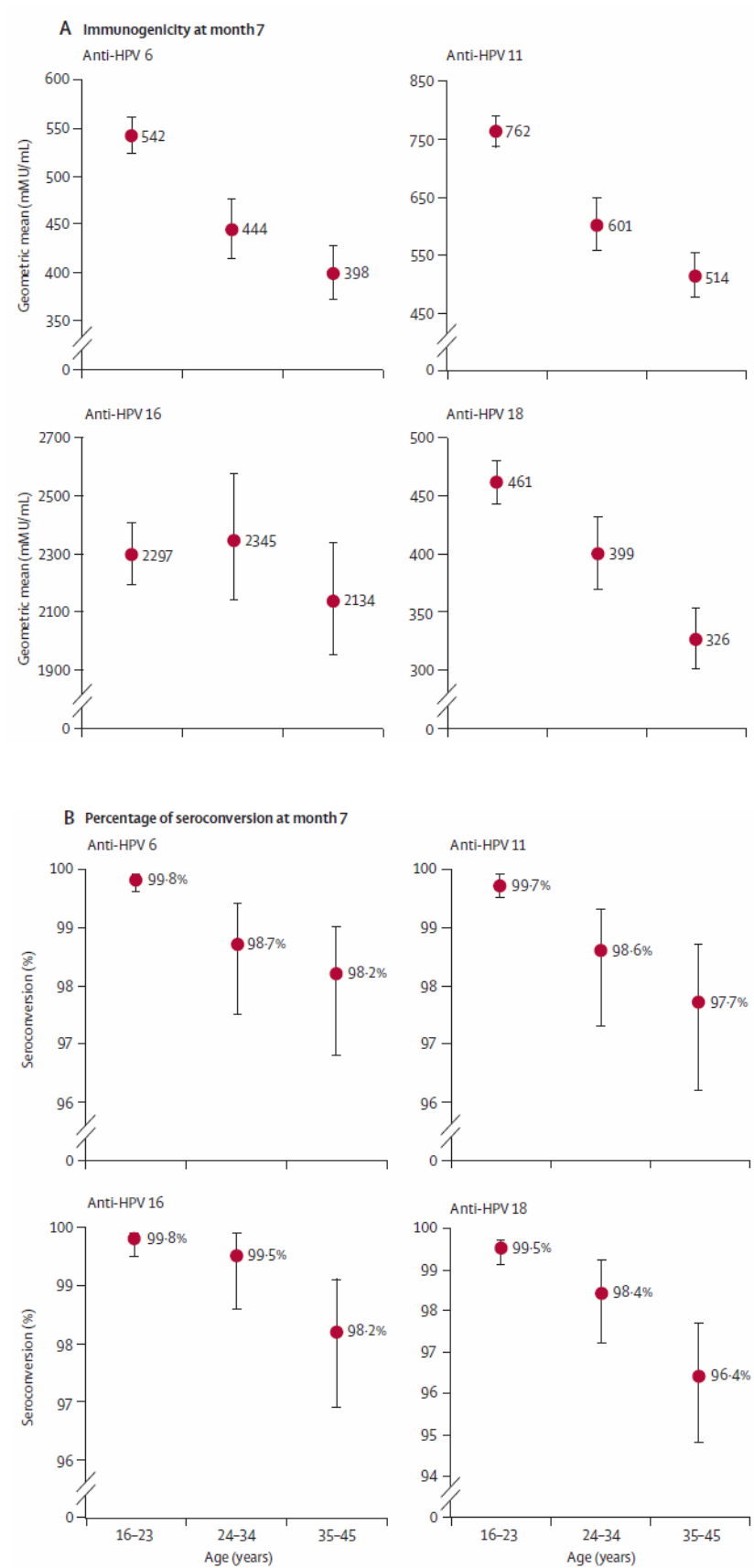


Figura16 | Immunogenicità (A) e seroconversione (B) in soggetti vaccinati con Gardasil[®]93.

erano arruolate nel programma del vaccino, si è potuto notare che la risposta anticorpale in donne di 25-45 anni era comparabile per HPV16, e leggermente inferiore per HPV6, 11, 18 (Figura16A). Quasi tutte le donne di 24-45 anni seroconvertivano per i tipi di HPV inclusi nella formulazione, verso il settimo mese. Complessivamente, in questo gruppo il 98% delle donne presentava anticorpi diretti contro HPV6, il 98% contro HPV11, il 99% contro HPV16 e il 97% contro HPV18 (Figura16B). In generale, donne che erano positive ad un particolare tipo di HPV all'inizio della sperimentazione presentavano titoli anticorpali più alti per quel tipo dopo 24 mesi, rispetto a coloro che invece era risultate negative al saggio, probabilmente a causa della memoria immunitaria. In donne di 25-45 anni, nella popolazione secondo il protocollo (PPE), l'efficacia del vaccino contro una combinata incidenza di infezione della durata di almeno 6 mesi e patologie genitali associate ad HPV6, 11, 16, 18 era del 90.5% (95%CI 73.7-97.5) (Tabella6). Simili risultati sono stati ottenuti per gli altri gruppi. L'efficacia del vaccino nella prevenzione della sola infezione o della sola patologia, nella popolazione PPE, era del 92.6% (95% CI 76.9-98.5) e 92.4% (49.6-99.8), rispettivamente. L'efficacia del vaccino contro una combinata incidenza di infezione della durata di almeno 6 mesi e patologie genitali associate ad HPV16 e 18 era dell'83.1% (50.6-95.8) (Tabella6).

	Vaccine (n=1910)			Placebo (n=1907)			Efficacy (95% CI)	p value
	n	Cases	Rate	n	Cases	Rate		
Per-protocol population*								
HPV 6/11/16/18-related (all women)	1615	4	0.1	1607	41	1.5	90.5% (73.7 to 97.5)	<0.0001
Women aged 24-34 years	792	2	0.2	792	24	1.8	91.8% (67.1 to 99.1)	..
Women aged 35-45 years	823	2	0.1	815	17	1.3	88.6% (51.9 to 98.7)	..
HPV 16/18-related (all women)	1601	4	0.1	1579	23	0.9	83.1% (50.6 to 95.8)	0.0001
Women aged 24-34 years	784	2	0.2	774	13	1.0	85.0% (33.8 to 98.4)	..
Women aged 35-45 years	817	2	0.1	805	10	0.7	80.6% (9.1 to 97.9)	..
HPV 6/11-related (all women)	1329	0	0.0	1323	19	0.9	100% (79.0 to 100)	<0.0001
Women aged 24-34 years	636	0	0.0	653	12	1.1	100% (63.7 to 100)	..
Women aged 35-45 years	693	0	0.0	670	7	0.6	100% (33.6 to 100)	..
Naïve to the relevant type population†								
HPV 6/11/16/18-related (all women)	1841	20	0.5	1833	77	2.0	74.6% (58.1 to 85.3)	..
Women aged 24-34 years	914	11	0.6	920	54	2.8	79.8% (61.0 to 90.5)	..
Women aged 35-45 years	927	9	0.4	913	23	1.2	62.3% (15.4 to 84.6)	..
HPV 16/18-related (all women)	1823	14	0.4	1803	48	1.2	71.6% (47.6 to 85.5)	..
Women aged 24-34 years	904	9	0.5	901	33	1.7	73.0% (42.3 to 88.6)	..
Women aged 35-45 years	919	5	0.2	902	15	0.8	68.0% (7.3 to 90.9)	..
HPV 6/11-related (all women)	1514	6	0.2	1514	30	0.9	80.2% (51.7 to 93.3)	..
Women aged 24-34 years	735	2	0.1	770	22	1.3	90.6% (61.7 to 98.9)	..
Women aged 35-45 years	779	4	0.2	744	8	0.5	52.8% (-76.1 to 89.6)	..
Intention-to-treat population‡								
HPV 6/11/16/18-related (all women)	1886	108	2.7	1883	154	3.9	30.9% (11.1 to 46.5)	..
Women aged 24-34 years	937	71	3.7	944	94	4.9	23.7% (-4.9 to 44.7)	..
Women aged 35-45 years	949	37	1.8	939	60	3.0	40.7% (9.2 to 61.7)	..
HPV 16/18-related (all women)	1886	90	2.2	1883	115	2.9	22.6% (-2.9 to 41.9)	..
Women aged 24-34 years	937	57	2.9	944	70	3.6	17.7% (-18.4 to 43.0)	..
Women aged 35-45 years	949	33	1.6	939	45	2.2	28.9% (-13.9 to 56.1)	..
HPV 6/11-related (all women)	1886	24	0.6	1883	45	1.1	47.1% (11.4 to 69.2)	..
Women aged 24-34 years	937	17	0.8	944	28	1.4	38.4% (-16.5 to 68.4)	..
Women aged 35-45 years	949	7	0.3	939	17	0.8	60.1% (-1.3 to 86.0)	..

Tabella6 | Efficacia del vaccino Cervarix® nei gruppi PPP, NTP, ITT, in base all'età⁹³.

Questi risultati erano simili anche per gli altri gruppi di età. Nel caso invece di una combinata incidenza di infezione e di patologie correlate ad HPV6 e 11, l'efficacia del vaccino era del 100% (95%CI 79.0-100.0). Come si può osservare nella Tabella6, dati di efficacia significativamente più bassi si registrano nelle popolazioni NRT (Naive to the Relevant Type) e ITT (Intention To Treat). In conclusione, questo trial clinico dimostra l'efficacia del vaccino quadrivalente in donne di 24-45 anni non infettate con tipi correlati di HPV al momento della vaccinazione.

Immunogenicità e durata della protezione

L'assunzione attuale è che gli anticorpi neutralizzanti siano alla base della protezione indotta dai vaccini basati sulle VLP, e questa ipotesi è supportata dagli studi condotti sugli animali modello che dimostrano protezione dall'infezione in animali immunizzati mediante trasferimento passivo di anticorpi. Comunque, ad oggi non è conosciuto un correlato sierologico di protezione, cioè un titolo anticorpale considerato protettivo contro l'infezione.

E' stato dimostrato che quando la prima dose di vaccino quadrivalente viene iniettata per via intramuscolare, i livelli anticorpali aumentano sino al raggiungimento di un picco di concentrazione dopo la terza e ultima dose (Figura17). La concentrazione diminuisce nei successivi 12-18 mesi ma poi si stabilizza ad un livello di *plateau*. Sessanta mesi dopo la prima dose si verifica una rapida risposta anamnestic, con un innalzamento entro 3-5 giorni dei livelli anticorpali superiori a quelli registrati nella fase iniziale, dimostrando la presenza di cellule B memoria⁹⁴. Una simile risposta anticorpale è stata mostrata nel trial clinico di fase III del vaccino bivalente⁹⁵.

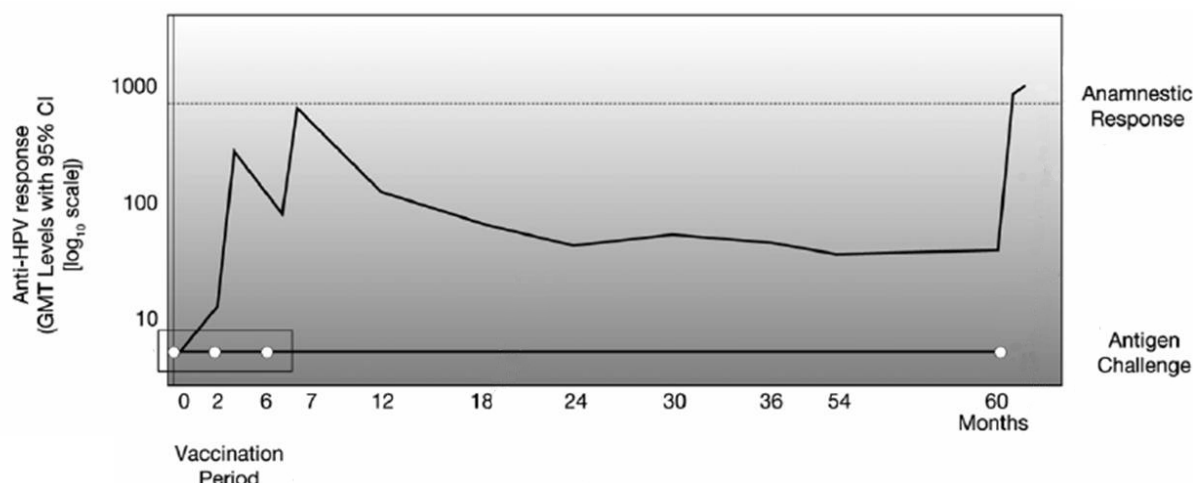


Figura17 | La risposta anticorpale al vaccino quadrivalente Gardasil^{®96}.

Nel trial di fase II condotto per valutare l'immunogenicità del vaccino quadrivalente, si è mostrato che gli anticorpi persistono negli individui vaccinati ad un livello di *plateau* oltre i 5 anni di sperimentazione e i modelli matematici sulla cinetica del decadimento del livello anticorpale suggeriscono che gli anticorpi potrebbero persistere per diverse decadi. In uno studio nel quale sono stati selezionati un sottogruppo di partecipanti al trial clinico di fase III, la concentrazione di anticorpi diretti contro HPV18 è scesa a livelli minimi nel 40% dei soggetti vaccinati con il vaccino quadrivalente, ma l'efficacia contro le neoplasie intraepiteliali cervicali è rimasta del 100% per un periodo di oltre 4 anni, indipendentemente dal livello anticorpale.

Nel caso del vaccino bivalente, la fase II del trial per valutarne l'immunogenicità ha mostrato che i livelli di anticorpi diretti contro HPV16 e 18, oltre 6 anni dopo l'immunizzazione, erano circa dodici volte maggiori rispetto a quelli osservati nell'infezione naturale. I modelli matematici per questo vaccino suggeriscono che una percentuale di anticorpi potrebbe persistere per oltre 50 anni. In uno studio recente è stato effettuato un confronto diretto tra i due vaccini in commercio per valutare l'immunogenicità indotta dalla somministrazione delle tre dosi in donne tra i 18 e i 45 anni. Dallo studio è emerso che il Cervarix induce titoli di anticorpi neutralizzanti significativamente più elevati del Gardasil in tutte le fasce di età. La media geometrica dei titoli anticorpali è risultata 2-5 volte più elevata per HPV 16 e 7-9 volte per HPV 18 nelle donne vaccinate con il bivalente rispetto a quelle vaccinate con il quadrivalente. Inoltre, nelle donne vaccinate con il bivalente appaiono significativamente più elevati anche i titoli anticorpali nelle secrezioni cervico-vaginali e la popolazione di linfociti B memoria⁹⁷. Tali dati supportano l'ipotesi che la durata protettiva di Cervarix possa essere più lunga nel tempo, probabilmente merito anche del potente adiuvante di nuova generazione miscelato agli antigeni proteici.

Tuttavia, solo il tempo ci dirà quanto è lunga l'immunità indotta da questi vaccini e se sarà eventualmente necessaria una dose di richiamo.

Reattogenicità e sicurezza

Non c'è una ragione a priori per aspettarsi particolari problemi di sicurezza legati ai vaccini attualmente in commercio, dato che essi non sono vaccini vivi e non contengono il DNA di HPV. Ciò è dimostrato dal fatto che entrambi i vaccini sono stati ben tollerati nei trial clinici condotti. I soli eventi avversi statisticamente significativi registrati sono stati la febbre e le reazioni locali nella sede di iniezione (dolore, gonfiore e arrossamento). In particolare, le donne vaccinate con il Gardasil hanno presentato queste reazioni nel 60-80% dei casi mentre nel caso del Cervarix si sono registrate con una frequenza del 70%. Tra le reazioni locali, la più segnalata è stata il dolore nel sito di iniezione, per lo più di intensità lieve-moderata, mentre la febbre è stata riportata nel 9-14% dei casi⁹⁷. Come per tutti i farmaci, sono state comunicate raramente anche reazioni di possibile natura allergica (broncospasmo e orticaria). In casi molto rari (<0,2%) il ciclo vaccinale è stato interrotto per una reazione avversa grave⁹².

Nel Giugno del 2007 la Commissione per la Sicurezza dei Vaccini (GACVS) dell'Organizzazione Mondiale della Sanità ha concluso che entrambi i vaccini presentano un buon profilo di sicurezza. Nel Dicembre dell'anno successivo, dopo il termine di ulteriori studi di sorveglianza per la sicurezza dei farmaci, la stessa commissione non ha reputato necessario modificare le precedenti raccomandazioni fornite.

I programmi di vaccinazione

I dati forniti dai trial clinici erano basati su una popolazione di femmine adolescenti che erano leggermente più vecchie (15-26 anni) della fascia di età a cui era raccomandata la vaccinazione per ottenere un beneficio massimo sulla salute pubblica. Inoltre, gli studi condotti hanno dimostrato che il titolo di anticorpi neutralizzanti generati in seguito alla vaccinazione era relativamente più alto in adolescenti di 9-14 anni rispetto a quelle di oltre 15 anni. Questi dati hanno quindi portato all'approvazione dei vaccini profilattici contro HPV in donne più giovani di quelle che hanno partecipato alla fase III dei trial clinici.

Nel Giugno 2006, la FDA ha approvato il programma di vaccinazione con il vaccino quadrivalente in ragazze di 11-12 anni, intensificando la vaccinazione nella fascia di età 13-26 anni e proponendo il programma anche a bambine di 9-10 anni, a discrezione del medico. Più recentemente (Ottobre 2009) negli USA la Commissione Consultiva sulle Pratiche di Immunizzazione (ACIP) ha approvato il vaccino bivalente per la prevenzione del tumore cervicale in donne di 10-26 anni, come per il vaccino quadrivalente. Inoltre, l'ACIP ha concesso una approvazione provvisoria per il vaccino quadrivalente per uomini di età compresa tra 9 e 26 anni in modo da ridurre la probabilità di acquisire condilomi genitali⁹⁸.

Simili raccomandazioni sull'età di vaccinazione per il vaccino quadrivalente sono state implementate in Canada dal Settembre 2007, mentre l'Australia ha registrato lo stesso vaccino nel Giugno 2007 per giovani uomini di 9-15 anni e giovani donne di 9-26 anni. Successivamente, a partire dall'Aprile 2008, è iniziato un programma di vaccinazione, sostenuto da fondi governativi, rivolto alle adolescenti di 12-13 anni.

I vaccini profilattici contro HPV sono stati inoltre approvati in diversi paesi dell'Unione Europea, la maggiorparte dei quali ha raccomandato la vaccinazione a partire dai 11-12 anni, con alcune differenza nell'età massima (11 anni in Austria e 23 in Francia). In Italia, il primo paese europeo a pianificare una strategia di vaccinazioni pubblica gratuita contro l'HPV, il Ministro della Salute ha indicato la necessità di intervenire con una campagna di vaccinazione gratuita per ragazze in età prepubere (12 anni), a partire dal 2007. Nel Regno Unito, è stato iniziato nell'estate 2008 un programma con il vaccino bivalente, sostenuto dai fondi governativi e realizzato in collaborazione con le scuole. In Spagna, alcune province hanno adottato programmi per la diffusione del vaccino bivalente mentre altre hanno adottato programmi per quello quadrivalente.

Gli attuali approcci per l'implementazione dei programmi di vaccinazione variano tuttavia notevolmente tra i diversi paesi. Ad esempio, Australia, Regno Unito e Canada hanno predisposto i

programmi di vaccinazione nel settore pubblico, basati sulla collaborazione con le scuole, e sostenendoli ampiamente con fondi pubblici⁹⁹. Questi programmi sono risultati in un tasso relativamente alto di copertura della vaccinazione. Ad esempio, la copertura tra adolescenti in età scolara in Australia è stata stimata essere oltre l'80%. Al contrario, l'implementazione del vaccino negli Stati Uniti d'America è stato primariamente basato su programmi sia nei settori pubblici che privati, con il supporto di cliniche pediatriche, ostetriche e ginecologiche. Il tasso di copertura delle adolescenti qui è risultato essere di circa il 25-30%. I dati più recenti di sorveglianza nazionale negli USA indicano che oltre il 35% delle adolescenti di 13-17 anni hanno ricevuto almeno una dose di vaccino.

Modello di proiezione sull'impatto e sul rapporto costo-efficacia della vaccinazione

Per entrambi i vaccini sono stati recentemente stimati l'impatto sulla popolazione dei programmi di vaccinazione nella prevenzione delle lesioni precancerose cervicali e del tumore, utilizzando modelli animali come prototipo. I modelli predicono che i programmi di vaccinazione previsti per le giovani adolescenti (10-13 anni) ridurranno sostanzialmente l'incidenza di tumori cervicali associati ad HPV inclusi nelle formulazioni, solo se la copertura sarà alta (>70%) e la protezione indotta dai vaccini durerà almeno 10 anni. Una considerevole riduzione nell'incidenza è inoltre attesa per i meno frequenti tumori della vagina, della vulva e dell'ano associati ad HPV16 e 18. Sulla base dei presupposti relativi alla vaccinazione e ai programmi di screening, la vaccinazione potrebbe ridurre il periodo di rischio di sviluppare un tumore cervicale dal 35 all'80%¹⁰⁰.

I modelli stimano che la riduzione nell'incidenza del carcinoma cervicale e della mortalità sarà maggiore nei paesi con un basso-medio reddito dove non sono presenti programmi di screening. Se l'assunzione del vaccino è più alta nelle popolazioni che tendono a sottoporsi a screening, la riduzione dei casi di cancro associati alla vaccinazione sarà inferiore a quella attesa perché le patologie prevenute dalla vaccinazione sarebbero comunque state individuate e trattate. I modelli inoltre predicono che la vaccinazione con il vaccino quadrivalente ridurrà sostanzialmente l'incidenza di condilomi anogenitali associati a HPV6 e 11, e probabilmente di papillomatosi respiratorie ricorrenti, se la copertura sarà alta e il vaccino proteggerà per almeno 10 anni. I modelli di costo-efficacia si basano su non definite assunzioni e parametri che potrebbero fortemente influenzare i risultati e quindi dovrebbero essere interpretati con cautela. In generale, i modelli mostrano che i programmi che raggiungono un'alta copertura nelle giovani adolescenti potrebbero ridurre i costi associati allo screening per il carcinoma cervicale, il *follow-up* di risultati anomali, la diagnosi e il trattamento di lesioni precancerose e cancro. Una recente *review* di articoli pubblicati prima dell'Agosto 2007 ha analizzato il rapporto costo-efficacia dei programmi di vaccinazione confrontandoli con i programmi di screening citologico¹⁰¹. Sulla base delle linee guida dell'Organizzazione Mondiale della Sanità che confrontano l'incremento del rapporto costo-efficacia con il prodotto lordo pro-capite (GDP), si è concluso che l'amministrazione nazionale dei programmi di vaccinazione sarebbe costo-efficace solo nei paesi in cui il GDP è alto. Diversi

modelli indicano che la vaccinazione anti-HPV in paesi a basso-medio reddito, dove gli screening non sono molto diffusi, potrebbe essere costo-efficace solo se il costo per adolescente vaccinata (incluso le 3 dosi e i costi programmatici) fosse inferiore a 20-25\$, che è sostanzialmente più basso degli attuali costi nei paesi ad alto reddito (circa 500\$).

Razionale, contesto e obiettivi della ricerca

PERCHE' SVILUPPARE VACCINI DI II° GENERAZIONE?

Limiti e svantaggi dei vaccini profilattici attualmente in commercio

Il virus del papilloma umano (HPV) è stato per lungo tempo considerato un agente infettivo di scarsa importanza, causa di verruche che, nonostante fossero sgradevoli dal punto di vista estetico, erano considerate di significato clinico limitato. Tuttavia, questa ampia famiglia di piccoli virus a DNA si è dimostrata includere specifici tipi che oggi sono riconosciuti come i principali carcinogeni a livello globale, causa del 3.7% dei tumori principalmente ma non esclusivamente nel tratto ano-genitale. Persino i condilomi, prima considerate lesioni banali, possiedono una significativa morbosità se presenti nell'epitelio ano-genitale e nella laringe, e il loro trattamento riveste un importante ruolo economico.

Alla fine degli anni '80 divenne evidente l'enorme importanza delle patologie associate ad HPV e quindi lo sviluppo di vaccini profilattici per la prevenzione o la riduzione delle infezioni divenne un obiettivo primario per la salute pubblica. Questo non è stato un compito semplice, dato che i papillomavirus non possono essere propagati su larga scala in tessuti in coltura e quindi non sono realizzabili i convenzionali vaccini vivi o attenuati. Tuttavia, oltre due decenni di notevoli progressi sono culminati nello sviluppo di due vaccini profilattici, attualmente commercializzati in oltre cento paesi del mondo, costituiti da particelle simili a quelle virali (VLP). I trial clinici a cui sono stati sottoposti questi vaccini hanno mostrato per entrambi un buon profilo di sicurezza, tollerabilità e immunogenicità. In termini di immunogenicità, entrambi hanno mostrato la capacità di indurre una specifica seroconversione verso i tipi di HPV inclusi nel vaccino in almeno il 99% dei destinatari^{85,86}. Questi vaccini hanno conferito il 100% di protezione da infezioni persistenti tipo-specifiche da HPV16 e 18, responsabili di oltre il 70% dei casi di carcinoma uterino, e dalle lesioni cervicali associate. Tuttavia, in entrambi i casi si è osservata una limitata capacità di neutralizzazione dei sierotipi non inclusi nelle formulazioni. Il vaccino bivalente Cervarix[®] ha mostrato una efficacia del 59.9% contro infezioni persistenti da HPV45, appartenente come HPV18 al gruppo 7 del genere Alpha, e alcune indicazioni di efficacia contro infezioni dai sierotipi HPV31, 33, 52 (36.1%, 36.5%, 31.6%, rispettivamente)¹⁰². L'efficacia del vaccino quadrivalente Gardasil[®] si è invece dimostrata essere del 94% contro infezioni da HPV45 e del 54% da HPV31, mentre la protezione contro HPV33, 52, 58, meno correlati dal punto di vista evolutivo, non è risultata statisticamente significativa⁸⁵.

Da questi dati emerge quindi che la protezione fornita dalla vaccinazione con le VLP induce una risposta genotipo-specifica e che gli anticorpi prodotti neutralizzano efficientemente solo il genotipo che ha stimolato la loro generazione, cioè quelli inclusi nella formulazione vaccinica. La spiegazione più accreditata per questo fenomeno è legata alla natura della proteina capsidica maggiore L1, l'elemento base delle VLP. Nonostante la sequenza amminoacidica di L1 sia conservata tra alcuni genotipi di HPV, la maggiorparte dei genotipi sembra essere sierotipicamente distinta. La giustificazione di questa osservazione è stata fornita dalla definizione della struttura

della molecola L1 assemblata nelle strutture pentameriche presenti sulla superficie delle particelle virali. La variabilità tra i genotipi è concentrata tra pochi aminoacidi localizzati nelle regioni esposte al solvente di tre loop della catena peptidica di L1; questi loop contengono i siti ai quali sono diretti gli anticorpi neutralizzanti¹⁰³. In questa regione, il sierotipo evolutivamente più vicino ad HPV16 tra quelli saggiati è il 31 (gruppo 7, genere Alpha) mentre quello più vicino ad HPV18 è il 45 (gruppo 9, genere Alpha), come dimostrato dai dati di cross-neutralizzazione forniti per entrambi i vaccini. Se, come dimostrato, la protezione fornita dai vaccini attualmente in commercio è specifica solo per alcuni genotipi, questi preverranno solo due-terzi delle patologie cervicali nelle donne che hanno completato le tre dosi di trattamento.

Ma come superare questa protezione tipo-specifica? Una potenziale strategia potrebbe essere semplicemente la combinazione di diversi tipi di VLP. Assumendo una specificità per i singoli tipi e un'efficacia del 100%, un vaccino polivalente contenente VLP dei tipi 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52, 58 potrebbe potenzialmente prevenire il 96% dei casi di carcinoma cervicale negli Stati Uniti. La Merck, la ditta produttrice del vaccino bivalente Cervarix[®], ha condotto trial clinici con un vaccino VLP ottavalente, che include i tipi benigni HPV6, 11 e sei tipi oncogeni (HPV16, 18, 31, 45, 52 e 58). Tuttavia, i dati non sono ancora stati comunicati e non è chiaro come questi programmi progrediranno. Possibili svantaggi di queste preparazioni potrebbero essere la potenziale interferenza immunitaria tra i tipi di VLP, che potrebbe essere minimizzata ottimizzando la formulazione, e la necessità di somministrare maggiori quantità di proteine. Un altro importante limite è rappresentato dalla complessa metodica di produzione di queste VLP polivalenti e quindi dal costo che queste preparazioni potrebbero assumere. Lo stesso problema riguarda anche i vaccini attualmente in commercio, data la complessa e dispendiosa procedura necessaria per l'espressione delle proteine L1 in sistemi eucarioti come cellule di insetto (Cervarix[®]) e lieviti (Gardasil[®]). La questione dei costi per dose risulta di fondamentale importanza se si considera che più dell'80% dei casi di morte per carcinoma cervicale avviene nei paesi in via di sviluppo, che mancano delle infrastrutture necessarie per eseguire gli screening preventivi e per il trattamento delle lesioni. E' ironico il fatto che noi oggi abbiamo a disposizione due vaccini in grado di prevenire le patologie associate ai due tipi di HPV (16 e 18) più prevalenti nei tumori ano-genitali, e che uno di questi previene quasi tutti i casi di condilomi genitali, ma che questi siano per lo più non usufruibili dai sistemi sanitari delle regioni del mondo dove la frequenza delle patologie associate ad HPV è più elevata. Nell'Africa sub-Sahariana, dove l'incidenza di infezioni da HIV nella popolazione supera il 10%, la frequenza di malattie causate dal papillomavirus è estremamente alta dato che gli individui che sono positivi all'HIV possiedono una compromessa abilità di risolvere le infezioni da HPV. Che prospettive esistono dunque per la distribuzione della profilassi anti-HPV a popolazioni che frequentemente sono prive di un'adequata nutrizione, di vaccini per i bambini e di profilassi anti-malarica? Chiaramente solo un vaccino prodotto a bassi costi potrà essere adottato dalle agenzie sanitarie pubbliche di questi paesi¹⁰².

Le attuali formulazioni vacciniche richiedono una costante refrigerazione, e questo rappresenta un'ulteriore limitazione per la distribuzione nei paesi più remoti e con risorse limitate.

Entrambi i vaccini, sia il bivalente che il quadrivalente, sono basati su particelle simili a quelle infettive naturali ma rispetto a queste sono completamente prive di materiale genetico e quindi non presentano nessun rischio di infezione. Ironicamente, se da un lato l'assenza di DNA è una garanzia di sicurezza, dall'altro è essa stessa una potenziale limitazione. Infatti, diversamente dai vaccini vivi, le sole VLP non sono in grado di stabilire una prolungata stimolazione del sistema immunitario. Così, gli antigeni sono miscelati ad un adiuvante per attivare la risposta iniziale. Anche il protocollo di somministrazione, che prevede iniezioni intramuscolari in tre tempi, è stato studiato per favorire l'accesso immediato degli antigeni ai vasi linfatici e vascolari e quindi attivare in breve tempo la cascata di eventi che risulterà nell'immunità protettiva. La necessità di somministrare questi vaccini mediante iniezione rappresenta un ulteriore ostacolo alla diffusione della profilassi nei paesi più disagiati. Nella maggiorparte dei paesi in via di sviluppo, l'uso ripetuto di siringhe senza appropriati interventi di sterilizzazione potrebbe infatti aumentare il rischio di trasmissione di altri agenti infettivi, come i virus dell'epatite B e C, e il virus HIV.

Nonostante la dimostrata efficacia dei vaccini attualmente in commercio per la prevenzione di infezioni associate ai sierotipi più comuni di HPV, la limitata multivalenza contro tipi virali non inclusi nella formulazione, l'elevato costo di ciascuna dose e la necessità di personale paramedico per la somministrazione, rendono dunque necessario lo sviluppo di vaccini di seconda generazione. La sfida oggi è quella di produrre un vaccino economico, stabile e che possa essere somministrato mediante metodi alternativi che forniscano una protezione a lungo termine a livello mucosale contro la maggiorparte dei tipi oncogeni di HPV.

VACCINI ALTERNATIVI – Le potenzialità della proteina capsidica L2

Nonostante la proteina capsidica maggiore L1 sia l'antigene immunodominante nella generazione di anticorpi neutralizzanti in vivo, l'immunizzazione con la proteina capsidica minore L2 rappresenta uno degli approcci più promettenti per lo sviluppo di un vaccino di seconda generazione, multivalente e a basso costo.

Gli anticorpi contro L2 non possono essere individuati nelle infezioni naturali di animali o uomini e la loro generazione non è stimolata dall'immunizzazione con VLP miste, costituite da entrambe le proteine capsidiche. Tuttavia, più di dieci anni fa è stato dimostrato che la vaccinazione profilattica di bestiame con un peptide appartenente alla regione aminoterminale di L2 del virus del papilloma bovino di tipo 4 (BPV-4) preveniva completamente l'infezione del tratto oro-faringeo da BPV-4 e che questo era attribuibile alla generazione di anticorpi neutralizzanti diretti verso L2¹⁰⁴. I determinanti neutralizzanti della proteina L2 di BPV-4 sono stati mappati ad una risoluzione di 30

aminoacidi e si è dimostrato che gli anticorpi elicitati da alcuni di questi peptidi erano in grado di riconoscere gli equivalenti peptidi di L2 di HPV16 e 6. Infatti, gli anticorpi prodotti contro la proteina di HPV6, 16 o 18, espressa in batterio, neutralizzano non solo i virioni di tipo omologo ma anche quelli di tipo eterologo¹⁰⁵.

Gli epitopi cross-neutralizzanti sono localizzati nella regione N-terminale (aminoacidi 1-120) di L2 e la capacità di cross-neutralizzazione degli anticorpi generati si estende a molti tipi di HPV genitali e cutanei, a BPV e CRPV (Cottontail Rabbit Papillomavirus). La cross-neutralizzazione indotta da questi epitopi è legata all'estensiva omologia dell'N-terminale di L2 tra diversi tipi di papillomavirus appartenenti a diverse specie. Considerate nell'insieme, gli studi di protezione condotti sul bestiame e sui conigli e i saggi di neutralizzazione in vitro suggeriscono che, diversamente dai vaccini VLP, i vaccini L2 potrebbero fornire una protezione ad ampio spettro. Questi dati sono validati da due importanti osservazioni in vivo¹⁰⁶. Conigli vaccinati con la regione N-terminale di L2 di HPV16 erano immuni all'infezione da CRPV o ROPV (Rabbit Oral Papilloma Virus), una scoperta sconcertante dato che questi tre virus sono evolutivamente distanti. Secondo, un vaccino candidato profilattico/terapeutico basato sulla proteina di fusione L2-E6-E7 di HPV16 induceva nei volontari umani specifici anticorpi anti-L2 che neutralizzavano divergenti tipi di HPV. Nonostante questo, in animali infettati non vaccinati i livelli di anticorpi anti-L2 sono sotto la soglia di individuazione e molti epitopi di L2 non sono esposti sulla superficie dei virioni.

La questione dunque è come questi anticorpi possano neutralizzare il virus. La soluzione è stata presentata da un eccellente lavoro di Roden e collaboratori¹⁰⁷. L'epitopo neutralizzante definito dall'anticorpo monoclonale RG-1 è interno al capsido; tuttavia, esso diventa esposto quando il virus lega la superficie cellulare e cambia la sua conformazione. L'infezione richiede la rimozione di una sequenza all'N-terminale di L2 ad opera della proteasi cellulare furina, e questo processo è associato al legame e all'entrata nei cheratinociti. Il taglio furinico rende L2 accessibile sulla superficie capsidica ed espone l'epitopo RG-1. Il legame di anticorpi anti-L2 all'epitopo esposto blocca il trasferimento del virus dalla matrice extracellulare alla superficie cellulare e quindi previene l'infezione.

La proteina L2, oltre a possedere diversi epitopi in grado di indurre una potente risposta cross-neutralizzante nei soggetti immunizzati, presenta il notevole vantaggio di poter essere espressa a basso costo nel batterio *Escherichia coli*. Questo ovviamente rappresenta un importante vantaggio nella prospettiva di sviluppare un vaccino di seconda generazione che non richieda particolari procedure di preparazione, in modo che possa essere commercializzato con un costo contenuto. Tuttavia, questa proteina presenta una limitata immunogenicità se confrontata con le VLP, in cui la struttura ripetuta altamente organizzata induce una efficace risposta di tipo B risultante in un'elevata concentrazione anticorpale. Ma in che modo è possibile aumentare i titoli anticorpali anti-L2? Negli ultimi anni sono state proposte numerose alternative, di cui poche però presentavano un'effettiva applicazione per lo sviluppo di un vaccino con le caratteristiche richieste, precedentemente descritte. Ad esempio, un'opportunità proposta era quella di inserire gli epitopi

neutralizzanti sulla superficie delle VLP, aumentando così i titoli di anticorpi neutralizzanti di approssimativamente 10 volte. Tuttavia, questa soluzione non risolve il problema della costosa produzione delle particelle artificiali.

In questo contesto, si rende dunque necessaria l'ideazione di nuove strategie che permettano di aumentare l'immunogenicità dei peptidi di L2, in modo da poter sfruttare le proprietà intrinseche di questa proteina, che si prospetta come un eccellente candidato per la generazione di un vaccino in grado di fornire una protezione più ampia rispetto ai vaccini di prima generazione.

OBIETTIVI E FASI SPERIMENTALI DELLA RICERCA

Nonostante la dimostrata efficacia dei vaccini attualmente in commercio per la prevenzione di infezioni dai sierotipi più comuni di HPV, la limitata multivalenza contro tipi virali non inclusi nella formulazione, l'elevato costo di ciascuna dose e la necessità di personale paramedico per la somministrazione rendono necessario lo sviluppo di vaccini di seconda generazione. La presente ricerca, nata dalla collaborazione tra il Dipartimento di Biochimica e Biologia Molecolare dell'Università degli Studi di Parma, 'International Agency for Research on Cancer', WHO (Lione) e 'German Cancer Research Center' (Heidelberg), si è posta come obiettivo primario lo sviluppo di un vaccino economico, stabile e che fornisca una protezione a lungo termine a livello mucosale contro la maggioranza dei tipi oncogeni di HPV.

Come discusso nel paragrafo precedente, l'immunizzazione con la proteina capsidica minore L2 rappresenta uno degli approcci più promettenti per lo sviluppo di un vaccino di seconda generazione. Essa unisce il vantaggio di indurre una potente risposta cross-neutralizzante, grazie alla presenza di particolari epitopi localizzati nella regione N-terminale, al vantaggio di poter essere prodotta in batterio, senza richiedere complesse e costose procedure di preparazione. La sua ridotta immunogenicità rappresenta d'altra parte il principale limite di questo approccio. Il presente lavoro si è posto dunque come obiettivo primario l'identificazione di strategie che permettessero di aumentare la capacità di questa proteina di indurre una risposta immune. La strategia 'Thioredoxin Displayed Multi-peptide Immunogens' (TDMI), già applicata con successo alla realizzazione di prototipi di vaccini diretti contro il peptide A β 42¹⁰⁸, il più accreditato agente causale della malattia di Alzheimer, è stata utilizzata per conferire una maggiore immunogenicità ad alcuni peptidi candidati, selezionati da lavori precedenti. Questi peptidi sono stati dunque inseriti in forma multimerica all'interno della Tiorredossina (Trx) di *Escherichia coli* e iniettati in animali da laboratorio, i cui sieri sono stati utilizzati per valutare l'intensità della risposta immunitaria generata e il potenziale di neutralizzazione virale. Mediante questa tecnologia è stato dunque possibile individuare l'antigene ricombinante trimetrico Trx-L2(20-38) come il miglior candidato per lo sviluppo di un vaccino cross-protettivo. Questo infatti si è rivelato un eccellente immunogeno, in

grado di indurre non solo una forte risposta immunitaria, ma anche la produzione di anticorpi a protezione crociata in grado di neutralizzare quattro diversi sierotipi virali (HPV 16, 18, 58, 45). Avendo identificato l'antigene più promettente, l'obiettivo successivo ha riguardato l'ulteriore ottimizzazione dello stesso in vista di una sua utilizzazione come vaccino peptidico ricombinante. La dimostrazione che la porzione di epitopo effettivamente riconosciuta dagli anticorpi monoclonali, prodotti a partire dai topi precedentemente immunizzati, è quella compresa tra gli aminoacidi 20 e 31, ha portato alla generazione di antigeni 'miniaturizzati' costituiti dalla fusione della Trx con più copie dell'epitopo ridotto, con l'obiettivo di indurre una maggiore focalizzazione del sistema immunitario e quindi di potenziare ulteriormente la *performance* del vaccino in termini di cross-neutralizzazione. Con lo stesso scopo, sono state progettate proteine potenzialmente multivalenti, presentanti diverse combinazioni strutturali dell'epitopo candidato di differenti sierotipi virali. Dati recentemente pubblicati in letteratura sottolineano l'importanza dello stato di ossido-riduzione per il processo infettivo. La presenza di un ponte disolfuro tra due cisteine localizzate all'interno del peptide candidato sembra infatti essere fondamentale per l'infettività dei virioni, come dimostrato da esperimenti condotti su virioni mutati in uno o entrambi i residui. Sempre con l'obiettivo di incrementare il potere neutralizzante degli anticorpi generati, è stata valutata l'immunoreattività dei monoclonali verso la forma ossidata o artificialmente ridotta dell'antigene in esame.

L'ulteriore miglioramento dell'immunogeno candidato è stato diretto alla realizzazione di derivati ad elevata stabilità termica e conformazionale, con costi di produzione il più possibile ridotti, in grado di garantire una risposta immunitaria di lunga durata, con un numero minimo di somministrazioni. Tali obiettivi sono stati perseguiti valutando, da una parte, le proprietà di *scaffold* molecolare di varianti della Tiorredossina provenienti da batteri ipertermofili, dall'altra esaminando la *performance* immunologica – soprattutto in termini di immunogenicità e *self-adiuvancy* – di proteine chimeriche contenenti forme modificate della Trx fuse alla Flagellina (Fli), uno dei più potenti stimolatori dell'immunità innata. Oltre alla fusione Fli-Trx di *E. coli* già disponibile, sono stati realizzati costrutti chimerici della Flagellina di *Salmonella typhi*, con la Trx posta in una posizione più apicale e quindi verosimilmente più esposta. Le corrispondenti proteine di fusione verranno somministrate in animali da laboratorio in diverse formulazioni (con e senza adiuvante) per valutare l'effettiva potenzialità adiuvante della Flagellina. La presente ricerca si è inoltre posta come obiettivo secondario e futuro la valutazione di vaccini TDMI alternativi, potenzialmente auto-adiuvanti, tra i quali i vaccini 'vivi' in ospiti batterici approvati per uso umano (e.g., *Salmonella typhi*) e strutture sovramolecolari ottenute utilizzando la parete di batteri lattici, non viventi e non geneticamente modificati, come sistemi di display di multiple copie dell'antigene. Questi esperimenti potrebbero inoltre fornire importanti indicazioni sull'efficacia di differenti metodiche di somministrazione (orale ed intranasale) nell'attivazione di una potente e duratura risposta anticorpale anti-HPV, specialmente a livello mucosale, con un numero minimo di trattamenti.

Materiali e Metodi

Ceppi batterici, terreni di crescita e plasmidi

Ceppi batterici

Escherichia coli - BL21 Codon Plus (DE3)

si veda catalogo 'Invitrogen' per le caratteristiche del ceppo.

Salmonella typhi - Ty21a Berna

ceppo attenuato, privo di potere patogeno per modificazione irreversibile di geni coinvolti nella biosintesi della parete cellulare. Utilizzato come vaccino antitifoide (Vivotif[®], Berna Biotech Ltd).

Lactococcus lactis – IL1403

si veda Bolotin et al.¹¹⁴ per le caratteristiche del ceppo.

Gentilmente fornito dal Dott. Marco Ventura (Università di Parma).

Terreni di crescita

Luria-Bertani (LB)

si veda il manuale Sambrook and Russell¹¹¹ per la composizione. Il terreno solido è ottenuto mediante addizione di 15g/l di agar.

Utilizzato per la crescita di *Escherichia coli* e *Salmonella typhi*, condotta a 37°C in agitazione.

M17

si veda il catalogo 'Difco' per la composizione. Dopo sterilizzazione è addizionato con 1% glucosio e 1% lattosio. Il terreno solido è ottenuto mediante addizione di 11g/l di agar.

Utilizzato per la crescita di *Lactococcus lactis*, condotta a 30°C in agitazione.

Plasmidi

pET28b

si veda catalogo 'Novagen' per le caratteristiche del plasmide.

pFliTrx

si veda catalogo 'Invitrogen' per le caratteristiche del plasmide.

Gentilmente fornito dal Prof. Antonio Puccetti (Università di Genova).

pFS14nsdKan

si veda Fraillery et al.¹¹² per le caratteristiche del plasmide.

Gentilmente fornito dalla Prof.ssa Denise Nardelli-Haeffliger (Università di Losanna, Svizzera)

pKK233-2

si veda catalogo 'Pharmacia LKB Biotechnology Inc.' per le caratteristiche del plasmide.

Procedure sperimentali

Espressione dei polipeptidi di fusione

Nel vettore pET28, in cui sono state clonate le sequenze geniche codificanti per i polipeptidi di interesse, l'espressione delle proteine è regolata da un promotore forte riconosciuto dalla RNA polimerasi del fago T7, regolato negativamente dall'operatore *lac* (Figura18). Il ceppo di *Escherichia coli* utilizzato contiene una copia cromosomale del gene per la T7 RNA polimerasi controllato dal promotore inducibile *lac*, per cui è stato possibile indurre l'espressione delle proteine aggiungendo IPTG (isopropyl- β -D-tiogalattopiranoside), un analogo del lattosio, al terreno di crescita.

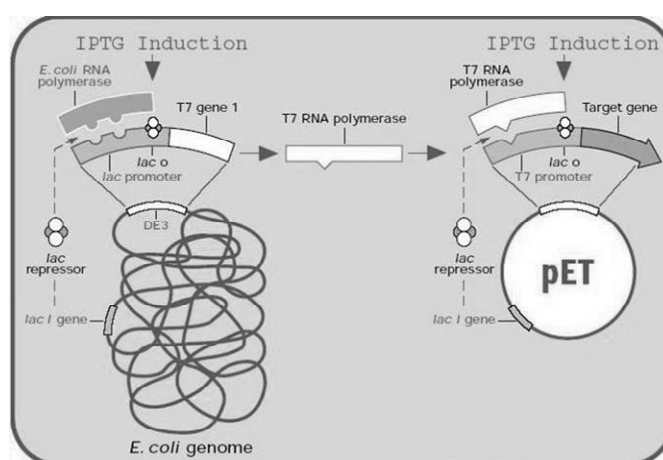


Figura18 | **Rappresentazione schematica del sistema pET¹¹¹.**

Il clone batterico di interesse è stato inoculato in 10 ml di terreno LB, addizionato degli opportuni antibiotici, e fatto crescere tutta la notte. Questa coltura è stata quindi usata per inoculare un litro di terreno fresco. Al raggiungimento di un OD_{600 nm} pari a 0.5-0.7 è stato addizionato IPTG ad una concentrazione finale di 1mM e la coltura è stata incubata 12 ore a 30°C o 96 ore a 4°C in base alla proteina da produrre (TabellaS2). I batteri sono stati raccolti mediante centrifugazione a 5000rpm per 15' a 4°C. Il pellet batterico è stato lavato con 200 ml di 10mM Tris-HCl pH 8 e risospeso in 100 ml di tampone di lisi (25mM Tris-HCl pH 8, 0.3M NaCl, 0.5mM PMSF, 0.5mM Benzamidina, 1 μ M Leupeptina, 1 μ M Pepstatina). Dopo l'addizione di 'Fast Break Cell Lysis Reagent' (Promega), il campione è stato incubato 10 minuti a temperatura ambiente, 20 minuti in ghiaccio e infine lisato mediante sonicazione con 10-15 impulsi da 20 secondi, con pause di 3 secondi tra un impulso e quello successivo. La centrifugazione a 10000 rpm per 30 minuti ha quindi permesso di separare la frazione solubile da quella insolubile. Un'aliquota di entrambe le frazioni è stata caricata su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti (SDS-PAGE) per valutare la solubilità della proteina ricombinante.

Purificazione proteica mediante cromatografia di affinità

Il vettore pET28 permette di produrre proteine ricombinanti fuse ad una coda di sei istidine (6xHis Tag) sia nella regione N- che C-terminale. Questo permette di purificare la proteina sfruttando la capacità delle istidine di chelare ioni metallici. Per tale motivo la purificazione delle proteine presenti nei sovranatanti ottenuti dai lisati delle colture batteriche indotte è stata effettuata mediante cromatografia d'affinità utilizzando una matrice al cobalto (Co^{2+}) (TALON Metal Affinity Resins, Clontech). Considerando l'estrema specificità dell'interazione tra la coda poli-istidinica ed il supporto cromatografico (Figura19), è possibile ottenere una purificazione completa dei polipeptidi di interesse in un unico passaggio anche da miscele proteiche molto complesse.

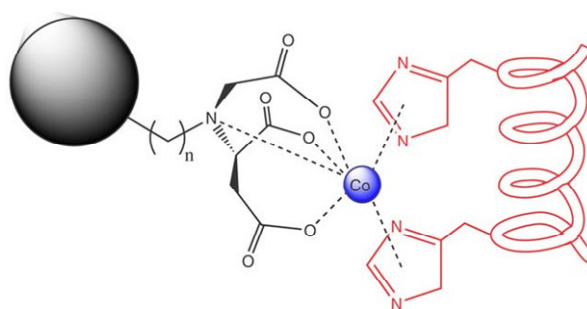


Figura19 | **Rappresentazione del legame tra istidine e ioni Co^{+} .**

Un volume di resina (circa 2 ml per ogni litro di coltura batterica) è stato equilibrato effettuando 2 lavaggi con 10 volumi di tampone colonna (tampone di lisi addizionato di 10% glicerolo). La resina è stata addizionata al sovranatante ottenuto dopo sonicazione della coltura batterica indotta, che è stato successivamente posto in incubazione per 1 ora a 4°C in rotazione costante. La resina è stata poi raccolta mediante centrifugazione a 3000 rpm per 5 minuti, trasferita in colonna e lavata con 5 volumi di tampone di colonna.

L'eluizione delle proteine aspecifiche è stata condotta mediante lavaggio con 3 volumi di tampone colonna addizionato di 10mM imidazolo. La proteina ricombinante è stata invece eluita in frazioni da 0.5 ml utilizzando tampone colonna addizionato di 100mM imidazolo.

Infine, la concentrazione è stata stimata mediante saggio Bradford (metodo Coomassie Brilliant Blue G-250, Bio-Rad), utilizzando la Siero Albumina Bovina (BSA) come standard. La purezza delle frazioni è stata verificata mediante SDS-PAGE e quelle risultate più pure sono state unite.

Purificazione proteica dai corpi di inclusione

Le proteine risultate insolubili dopo la lisi della coltura batterica sono state recuperate mediante una procedura di denaturazione e successiva rinaturazione dai corpi di inclusione.

Il pellet ottenuto dopo la sonicazione dei batteri è stato risospeso in 3 ml di una soluzione di lavaggio (2M urea, 20mM Tris-HCl, 0.5M NaCl, 2 % Triton X-100 pH 8) e sottoposto nuovamente a sonicazione. Il lisato è stato quindi centrifugato a 10000 rpm per 10 minuti e il pellet è stato risospeso in 5 ml di una soluzione che permette la denaturazione delle proteine presenti nei corpi di inclusione (8M urea, 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 6 M guanidinio idrocloruro, 10 mM 2-mercaptoetanololo). Si è posto in rotazione per 30-60 minuti a temperatura ambiente e si è centrifugato 15 minuti a 10000 rpm a 4 °C. La rinaturazione delle proteine viene effettuata creando un gradiente con una soluzione tampone precedentemente ottimizzata¹¹³ (0.8M L-arginina) mediante dialisi. La proteina rinaturata è stata quantificata tramite saggio di Bradford (metodo Coomassie Brilliant Blue G-250, Bio-Rad), utilizzando la Siero Albumina Bovina (BSA) come standard.

Preparazione dei campioni da iniettare

Le proteine di fusione Trx-L2 espresse e purificate sono state estensivamente dializzate contro PBS pH7 mediante Amicon, diluite ad una concentrazione finale di circa 1µg/µl con lo stesso tampone e sterilizzate mediante filtrazione su filtri di acetato di cellulosa con pori di 0.2µm.

Procedura di immunizzazione

I polipeptidi (100µg ciascuno, corrispondenti a 1.7-4.3 nmoli in base alla taglia del peptide inserito) sono stati miscelati all'adiuvante di Freund (completo e incompleto) in un volume finale di 200µl. Questi sono stati somministrati mediante iniezione sottocutanea a topi Balb/c di 6-8 mesi di età (suddivisi in gruppi di 4-5 per ciascuno dei polipeptidi). Gli animali (Charles River Laboratories; Sulzfeld, Germany) sono stati tenuti in condizioni asettiche nello stabulario del 'German Cancer Research Center', in conformità alle normative europee relative all'utilizzo di animali nelle sperimentazioni *in vivo*. Il protocollo di immunizzazione ha previsto una prima somministrazione al giorno 0 e due iniezioni di richiamo al giorno 14 e 28, seguita dal prelievo dei campioni ematici dieci giorni dopo l'ultima immunizzazione (giorno 38).

Saggio GST-ELISA

La determinazione dei titoli anticorpali è stata valutata mediante GST-ELISA. A questo scopo, i pozzetti di una piastra multipozzetto sono stati riempiti con 50µl di tampone contenente glutatione-caseina e si è incubato tutta la notte a 4°C. Dopo aver lavato con PBS addizionato di 0.3% Tween20, bloccato con 0.2% caseina in PBS, sono stati addizionati 50µl di GST-L2 (aa 1-120) e si è incubato per 1 ora a 37°C. Le piastre sono state nuovamente lavate con PBS addizionato di 0.3% Tween20 prima dell'addizione di 50µl di siero dei topi immunizzati (diluito serialmente sino a 1:3276800) o di sovrantante degli ibridomi, in base all'esperimento, e si è incubato per 1 ora a 37°C. Le piastre sono state quindi lavate ancora e incubate per 1 ora a 37°C con 50µl per pozzetto

di anticorpo secondario policlonale anti-IgG murine coniugato ad una perossidasi (Sigma-Aldrich), diluito 1:3000 in PBS-0.3% Tween20 addizionato di 0.2% caseina. Dopo un rapido lavaggio, in ogni pozzetto sono stati aggiunti 100µl di substrato cromogenico 2,2'-azino-bis(3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS; 1mg/ml in 100 mM sodio acetato-tampone fosfato, pH 4.2, contenente 0.015% H₂O₂) e dopo 10-20 minuti è stata misurata l'assorbanza a 405 nm, con un lettore di piastre automatico (Titertek).

Nell'esperimento di titolazione del siero dei topi immunizzati, il legame non specifico è stato determinando incubando il siero in pozzetti contenenti solo GST e mediante il saggio ELISA condotto parallelamente con il siero dei topi immunizzati con la Trx nativa (controllo negativo). I titoli anticorpali sono stati calcolati come il reciproco della massima diluizione dell'antisiero che presentava un valore di assorbanza a 405 nm più alto della media dell'assorbanza più quattro volte la deviazione standard dei sieri dei topi immunizzati con il controllo negativo.

Preparazione degli pseudovirioni

Gli pseudovirioni sono stati preparati mediante cotrasfezione della linea cellulare di fibroblasti umani 293TT con un plasmide recante la versione umanizzata dei geni L1 e L2 di HPV16 e l'origine di replicazione di SV40 (pCDNA4-HPV16L1h-L2h/SV40ori) e con un secondo plasmide recante il gene codificante per l'enzima reporter fosfatasi alcalina (SEAP) sotto il controllo del promotore CMV (pCMVSEAP). La cotrasfezione è stata normalmente condotta con 7×10^6 cellule 293TT, precedentemente coltivate in terreno DMEM (Sigma-Aldrich) supplementato con 10% siero fetale bovino (Gibco-BRL), 1% penicillina-streptomicina (Life Technologies) e 125µg/ml igromicina (Roche), mediante PolyFectR (Qiagen) seguendo le istruzioni fornite dalla ditta produttrice. Brevemente, 8µg di ciascun plasmide sono stati miscelati con 80µl di PolyFectR in 800µl di terreno di coltura, e si sono aggiunte le cellule, che sono state poi incubate a 37°C per 3-4 giorni.

Per l'estrazione degli pseudovirioni, le cellule sono state raccolte mediante tripsinizzazione, lavate una volta con PBS, e risospese con 1ml/5 x 10⁷ cellule di PBS contenente 1mM CaCl₂ e 5.6 mM MgCl₂. Dopo l'addizione di 4µl di benzonase (250U/ml, Sigma-Aldrich) e 50µl di Brij 58, le cellule sono state incubate a 37°C tutta la notte per indurre la maturazione degli pseudovirioni. Queste sono state poi supplementate con NaCl ad una concentrazione finale di 710mM e incubate a 4°C per 10 minuti. Il risultante lisato è stato purificato mediante centrifugazione (10 minuti a 3500g), gli pseudovirioni sono stati suddivi in aliquote e conservate a -70°C.

Saggio di neutralizzazione

Le cellule 293TT sono state seminate 24 ore prima dell'infezione ad una densità di 15.000 cellule per pozzetto, in una piastra da 96 pozzetti ciascuno dei quali è stato precedentemente riempito con terreno DMEM supplementato con 10% FCS, 1% penicillina-streptomicina e 125µg/ml igromicina. Il giorno successivo, gli pseudovirioni sono stati diluiti 1:5000 in DMEM e miscelati al

siero dei topi immunizzati a differenti diluizioni. Dopo 15 minuti a temperatura ambiente, il terreno di coltura è stato sostituito con 200 μ l della soluzione di pseudovirioni, preparata come riportato in precedenza. L'attività SEAP nel sovrantante della coltura è stata determinata 5 giorni dopo l'infezione utilizzando il saggio chemiluminescente Gene Reporter SEAP (Roche), come riportato dal manuale d'uso. In ciascun saggio di neutralizzazione (e cross-neutralizzazione), sono stati inclusi i seguenti controlli: cellule non trattate, cellule trattate con i soli pseudovirioni (senza l'antisiero), cellule trattate con pseudovirioni preincubati con anticorpi monoclonali neutralizzanti specifici per HPV31 (H31.A6, diluito 1:1000), HPV45 (H45.L10, diluito 1:1000), HPV16 (Ritti01, diluito 1:1000), o con anticorpi policlonali contro HPV18 (rat#2, diluito 1:2000) e HPV58 (human 109, diluito 1:1000), come richiesto da ciascuno degli esperimenti di neutralizzazione.

L'efficienza di neutralizzazione è stata determinata in base al controllo costituito dalle cellule trattate con i soli pseudovirioni (0% neutralizzazione) e dalle cellule trattate con anticorpi monoclonali neutralizzanti specifici (100% neutralizzazione), che sono stati condotti parallelamente. I dati per i mono-peptidi e le forme multi-peptidiche di ciascun immunogeno Trx-L2 sono stati espressi come il reciproco della massima diluizione che genera più del 70% di neutralizzazione.

Analisi statistica

L'analisi statistica per la valutazione dei dati ottenuti dall'analisi del siero dei topi immunizzati con ciascuno dei polipeptidi di fusione Trx-L2 (saggio ELISA e di neutralizzazione) è stata condotta con il programma GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc.). Il test non parametrico di Kruskal-Wallis ANOVA è stato usato in combinazione con il test per il confronto a coppie di Dunn per valutare più di due serie di dati, o con il test di Mann-Whitney-Wilcoxon per due serie di dati. Le differenze tra i gruppi sono state considerate significative per valori di $P < 0.05$. Risultati qualitativamente simili, con valori di P consistentemente più bassi, sono stati ottenuti dall'analisi dei dati di immunogenicità e neutralizzazione virale, entrambi trasformati in $\log_{10}$, con test parametrici (ANOVA e t-test di Bonferroni).

Isolamento degli anticorpi monoclonali

I topi immunizzati con i polipeptidi Trx-L2(20-38) che sono risultati più immuno reattivi a livello sierico sono stati selezionati per la produzione di anticorpi monoclonali (mAb). Brevemente, gli splenociti sono stati fusi a cellule di mieloma SP2/0 e mantenute in terreno selettivo contenente 'Hypoxanthine Aminopterin Thymidine' (HAT) supplementato con 'Hybridoma Fusion and Cloning Supplement' (HFCS, Roche). I cloni positivi, selezionati mediante GST-ELISA, sono stati sub-clonati quattro volte e l'immunoreattività dei sovrantanti dei corrispondenti ibridomi è stata valutata tramite immunofluorescenza (IF), immunoblot (IB) e l'abilità di neutralizzare pseudovirioni.

Identificazione dell'isotipo delle immunoglobuline

Le linee cellulari produttrici di anticorpi monoclonali sono state tipizzate utilizzando il kit 'Hybridoma Sub-isotyping' (Calbiochem Novagen). Brevemente, i pozzetti di una piastra multipozzetto sono stati riempiti con 100µl di IgG anti-mouse diluito 1:1000 in tampone contenente glutatione-caseina. La piastra è stata incubata tutta la notte a 4°C e, dopo tre lavaggi con PBS-0.3% Tween20, si sono aggiunti 200µl di blocking serum diluito 1:4 in PBS-0.1% Tween20 e si è incubato a temperatura ambiente per 1 ora. In ogni pozzetto sono stati quindi addizionati 50µl di sovrnatante degli ibridomi e si è incubato 1 ora a temperatura ambiente. I singoli sovrnatanti sono stati saggiati con 100µl di anticorpi anti-IgM, anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b, anti-IgG3 e anti-IgGA, utilizzando il PBS come controllo negativo. Dopo un'incubazione di 1 ora a temperatura ambiente, le reazioni sono state sviluppate aggiungendo 100µl di anticorpo secondario policlonale anti-IgG murine coniugato ad una perossidasi (Sigma-Aldrich), diluito 1:3000 in PBS-0.3% Tween20 addizionato di 0.2% caseina. Dopo un rapido lavaggio, in ogni pozzetto sono stati aggiunti 100µl di substrato cromogenico 2,2'-azino-bis(3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS; 1mg/ml in 100 mM sodio acetato-tampone fosfato, pH 4.2, contenente 0.015% H₂O₂) e dopo 10-20 minuti è stata misurata l'assorbanza a 405 nm, con un lettore di piastre automatico (Titertek).

Immunofluorescenza indiretta

Un giorno prima della trasfezione con un plasmide recante la sequenza di L2 di HPV16, 1.5×10^5 cellule 293TT/ml sono state seminate in piastre da 12 pozzetti. Le cellule sono state lavate due volte con PBS e fissate con 1ml di etanolo assoluto a -20°C per 10 minuti; queste sono state quindi re-idratate mediante due lavaggi con PBS e bloccate con una soluzione di PBS 5% latte tutta la notte a 4°C. I pozzetti sono stati quindi incubati con il sovrnatante degli ibridomi per 1 ora a temperatura ambiente e lavati tre volte con PBS. Dopo i lavaggi, si è incubato per 1 ora al buio con un anticorpo anti-mouse coniugato ad un fluorocromo diluito 1:400. Le cellule sono state lavate 3 volte con PBS-0.3% Tween20, addizionato di Fluorprep (Biomérieux), e analizzate con un microscopio Leica-DMRD.

Immunoblotting per la caratterizzazione dei mAb anti-Trx-L2(20-38)

Come descritto prima per l'esperimento di immunofluorescenza, cellule 293TT trasfettate sono state lavate con PBS, risospese in 200µl PBS-tampone di lisi contenente SDS e β-mercaptoetanolo, e bollite a 100°C per 10 minuti. I campioni sono stati frazionati su un gel di poliacrilammide al 12.5% e trasferiti su una membrana di nitrocellulosa, che è stata bloccata tutta la notte a 4°C in PBS-0.1% Tween20 contenente 5% latte in polvere (soluzione di bloccaggio) e incubata per un'ora a temperatura ambiente con i sovrnatanti contenenti i monoclonali. La membrana è stata lavata tre volte per 5 minuti con PBS-0.3% Tween20 e poi incubata per 1 ora a temperatura ambiente con un anticorpo secondario policlonale anti-IgG murine coniugato ad una

perossidasi (Sigma-Aldrich), diluito 1:3000 in PBS-0.3% Tween20 addizionato di 5% latte. Dopo i lavaggi, la proteina L2 è stata rilevata con un kit a chemiluminescenza (Applichem).

Quantificazione delle immunoglobuline

La concentrazione delle immunoglobuline nel sovranatante degli ibridomi è stata determinata mediante ELISA. Piastre da 96 pozzetti sono state incubate tutta la notte a 4°C con 50µl di anticorpo IgG anti-mouse diluito in PBS (1.6µg/µl). Le piastre sono state lavate tre volte con PBS 0.3% Tween20 e bloccate con 3% latte in PBS per 1 ora a 37°C. Come standard sono state usate dieci diluizioni seriali di un anticorpo IgG commerciale (1mg/ml), a partire da 1:1000. 50µl di calibratori e sovrinatanti diluiti 1:100, 1:200, 1:400 sono stati aggiunti nei pozzetti e incubate a 37°C per 1 ora. Dopo tre lavaggi con PBS-0.3% Tween20, le piastre sono state incubate con 50µl di anticorpo secondario policlonale anti-IgG murine coniugato ad una perossidasi (Sigma-Aldrich), diluito 1:3000 in PBS-0.3% Tween20 addizionato di 3% latte. Dopo i lavaggi, le piastre sono state trattate come descritto in precedenza. Le curve di calibrazione sono state usate per calcolare la concentrazione di IgG.

Analisi Biacore

L'analisi di 'Surface Plasmon Resonance' (SPR) è stata condotta mediante uno strumento Biacore T100 equipaggiato con sensori CM5 (Biacore, Uppsala, Svezia) utilizzando 10 mM Hepes pH7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.05% Tween20 e 1 mM DTT come tampone di corsa a 25°C. Anticorpi policlonali anti-mouse (BR-1005-14, Biacore) sono stati immobilizzati seguendo le istruzioni fornite dalla ditta produttrice. Gli anticorpi monoclonali (K4L2₂₀₋₃₈, K15L2₂₀₋₃₈ e K18L2₂₀₋₃₈) sono stati prelevati dai sovrinatanti non diluiti degli ibridomi e posizionati su un flusso. Due diluizioni seriali di Trx-L2(1-120) a partire da 0.98-1000 nM sono state iniettate oltre i monoclonali catturati e gli anticorpi di riferimento. La rigenerazione della superficie tra i differenti mAb (sovrinatanti) è stata condotta con 10mM glicina pH 2.0 ad un flusso di 30µl/min per 30s. I sensogrammi sono stati processati utilizzando un doppio riferimento e le costanti di dissociazione sono state determinate mediante il programma 'Biacore T100'.

Preparazione dei peptidi

I peptidi biotinilati lunghi 15 aminoacidi coprenti la regione aa 1-120 di L2, ciascuno con uno scarto di 4 aa rispetto al successivo, sono stati prodotti mediante sintesi chimica. Gli altri peptidi sovrapposti alla regione aa 20-38 sono stati generati mediante accorciamento di un aminoacido per volta sia dall'N- che dal C-terminale sino al raggiungimento della taglia corrispondente a 8 aa. Per l'esperimento di 'alanine-scanning', le varianti della regione aa 20-31 di L2 di HPV16 sono state prodotte sostituendo ciascun aminoacido con un residuo di alanina. Tutti i peptidi sono stati sintetizzati da Mimotopes (Australia). I peptidi biotinilati sovrapposti alla regione aa 20-31 di L2 di

HPV31 e HPV16, così come i peptidi con residui aminoacidici varianti rispetto alla sequenza originale di HPV16 sostituiti con residui di glicina, sono stati sintetizzati nel centro interno al DKFZ.

Peptide-ELISA

Piastre multipozzetto sono state coperte con 50µl di streptavidina (Sigma S4762; 1mg/ml) diluita 1:400 in acqua distillata. Le piastre sono state incubate tutta la notte a 37°C; bloccate con PBS-caseina 0.2% e incubate nuovamente 1 ora a temperatura ambiente. Dopo ogni fase le piastre sono state lavate ogni volta con PBS-0.3% Tween20. I peptidi precedentemente risospesi in 50% acetonitrile e 5% acido acetico (o DMSO) sono stati diluiti ad una concentrazione di 1µg/µl in PBS; 50µl di ogni diluizione sono stati infine aggiunti ai pozzetti e incubati per 1 ora a temperatura ambiente. 50µl di ciascun sovrinatante diluito 1:10 è stato aggiunto alle piastre ELISA e incubate per 1 ora a temperatura ambiente. Le piastre sono state quindi lavate, incubate per 1 ora a temperatura ambiente con 50µl/pozzetto di anti-IgG murine coniugato ad una perossidasi (Sigma-Aldrich), diluito 1:3000 in PBS-0.3% Tween20 addizionato di 0.2% caseina e trattate come descritto in precedenza.

Saggio per la determinazione dei gruppi sulfidrilici

La determinazione dei gruppi sulfidrilici presenti nella Tiorredossina nativa e nel polipeptide di fusione Trx-L2(20-38)₃ è stata condotta mediante l'uso del reagente DTNB (3,3'-dithio-bis(6-nitrobenzoic acid) (Sigma, D8130), noto come reagente di Ellman. Questo reagisce con i gruppi sulfidrilici delle catene laterali delle cisteine per formare un ponte disolfuro e viene rilasciata una mole di 2-nitro-5-thiobenzoato (TNB) per mole di gruppo sulfidrilico della proteina (Figura20).

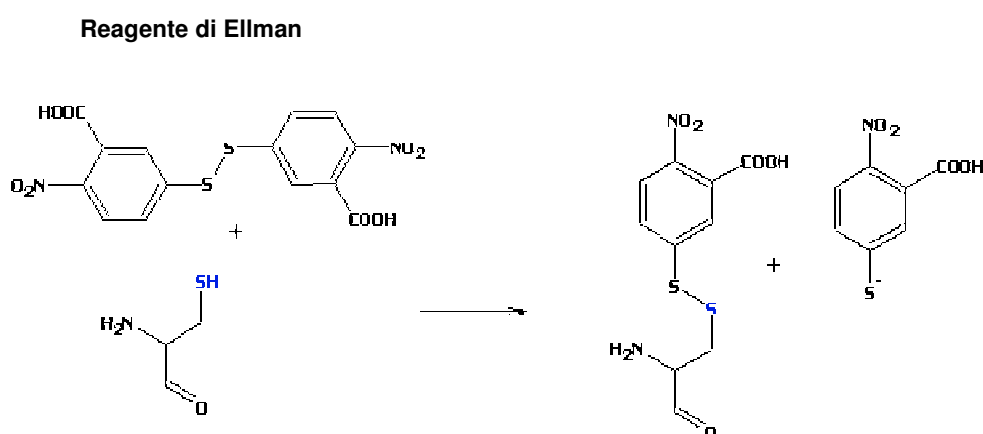


Figura20 | Meccanismo di reazione tra il DTNB e i gruppi sulfidrilici delle proteine.

Il DTNB non ha assorbimento ma quando reagisce con i gruppi –SH delle proteine in condizioni alcaline (pH 7-8), l'anione TNB^{2-} assorbe a 412 nm. Il decorso della reazione può dunque essere seguito mediante lettura a questa lunghezza d'onda allo spettrofotometro.

Il protocollo sperimentale ha previsto le seguenti fasi. Alla miscela di reazione (5 mM DTNB, 0.6 M sodio fosfato pH 8, SDS 2%), è stata aggiunta la proteina di interesse alla concentrazione finale di 7 μM , si è incubato a temperatura ambiente per 5 minuti e si è proceduto alla lettura della densità ottica a 412 nm mediante uno spettrofotometro. La determinazione del numero di cisteine libere per molecola è stata calcolata secondo la formula:

$$\text{N. Cys} = \frac{\text{OD}_{412 \text{ nm}} / \epsilon_{412 \text{ nm}} \text{ TNB}}{C_M \text{ proteina}}$$

dove il coefficiente di estinzione molare (ϵ) del TNB è $13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e la concentrazione molare della proteina (C_M) è mantenuta costante a 7 μM . L'esperimento è stato ripetuto tre volte per ciascuna proteina, per verificare la riproducibilità dei valori di assorbanza misurati.

La retta di calibrazione è stata costruita misurando l'assorbanza di quantità crescenti di acetilcisteina (10 μM , 20 μM , 40 μM , 80 μM) disciolta in PBS.

Immunoblotting per la verifica dell'immunoreattività dei mAb K4 e K18

Preparazione dei campioni

La riduzione dei ponti disolfuro intramolecolari presenti nella proteina Trx-L2(20-38)_3 è stata condotta incubando 100 μg (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) di campione proteico con 0.3M β -mercaptoetanol per 30 minuti a temperatura ambiente. Successivamente, l'agente riducente è stato eliminato dal campione mediante gel filtrazione (Micro BioSpin6, Biorad), seguendo le indicazioni della ditta produttrice, ed è stata verificata la presenza di eventuali gruppi sulfidrilici mediante saggio DTNB.

Immunoblotting

5ng del campione ossidato e artificialmente ridotto e della proteina Trx-L2(20-38)_3 sono stati frazionati su un gel di poliacrilammide all'11% e trasferiti su una membrana di nitrocellulosa (Biorad), che è stata bloccata tutta la notte in tampone di bloccaggio (PBS 0.3% Tween20) addizionato di 5% latte. Dopo alcuni lavaggi con lo stesso tampone, la membrana è stata incubata 1 ora a temperatura ambiente con i monoclonali K4L2₂₀₋₃₈ e K18L2₂₀₋₃₈ (diluiti 1:2000). Infine, la membrana è stata lavata tre volte per 5 minuti con PBS 0.3% Tween e incubata con un anticorpo secondario policlonale anti-IgG murine chemiluminescente (IRDye 680LT, LI-COR) diluito 1:15000 nello stesso tampone. La rilevazione del legame dei monoclonali alla proteina Trx-L2(20-38) è stata condotta mediante scansione a infrarossi (Odyssey Infrared Imaging System, LI-COR).

Purificazione proteica mediante trattamento termico

Verificata la presenza delle proteine di fusione Fli-Trx nella frazione sedimentabile del lisato batterico, il pellet è stato inizialmente lavato con PBS pH 7 e centrifugato a 5000 rpm per 10 minuti. Dopo averlo risospeso in 10 ml dello stesso tampone, il campione è stato incubato in tre differenti condizioni: 65°C per 30 minuti, 65°C per 60 minuti e 90°C per 30 minuti. Al termine del trattamento, il campione è stato nuovamente centrifugato a 12000 rpm per 30 minuti e il surnatante è stato trasferito in un nuovo tubo e addizionato di inibitori di proteasi (0.5 mM PMSF, 0.5 mM Benzamidina). La purezza del campione proteico è stata infine valutata mediante SDS-PAGE. Stimata la concentrazione mediante saggio di Bradford, ciascuna proteina è stata sterilizzata mediante filtrazione e conservata a -80°C.

Estrazione del DNA genomico da *Salmonella typhi*

La coltura batterica (15 ml) di *S. typhi*, cresciuta tutta la notte in terreno LB a 37°C in agitazione, è stata centrifugata e successivamente risospesa in 900 µl di tampone STET (8% saccarosio, 5% Triton X-100, 50mM Tris-HCl pH 8, 50mM EDTA pH 8). Sono stati aggiunti 30 µl di una miscela RNasi/Lisozima (10mg/ml lisozima, 1mg/ml RNasi, 50mM Tris-HCl pH 8) e si è bollito per 1 minuto e 45 secondi. Dopo aver centrifugato per 15 minuti, il sovrinatante è stato miscelato a 150 µl di STET saturato con fenolo. Dopo un'ulteriore centrifugazione, il sovrinatante è stato addizionato con 1/10 del volume di 4M litio cloruro e si è incubato in ghiaccio per 5-10 minuti. La fase superiore del centrifugato è stata addizionata di ugual volume di isopropanolo e incubata a temperatura ambiente per 5 minuti. Il campione è stato centrifugato e il pellet di DNA è stato lavato con 80% etanolo. Eliminato il residuo di alcool mediante evaporazione, il DNA genomico è stato risospeso in 50µl di acqua DNasi free e quantificato mediante lettura allo spettrofotometro (260nm).

Immunoblotting per la verifica dell'espressione in *Salmonella typhi*

Preparazione dei campioni

I cloni di *S. typhi* Ty21a e di *E. coli* trasformati con il plasmide pKK233-Trx-L2(20-38)₃, insieme alla *Salmonella wild-type* come controllo negativo, sono stati posti a crescere in terreno LB a 37°C in agitazione. Il giorno dopo, 100 µl della coltura sono stati utilizzati per inoculare 10 ml di terreno fresco. Al raggiungimento della fase esponenziale, un'aliquota di ciascun batterio è stata bollita per 10 minuti in tampone di caricamento (100 mM Tris-HCl pH 7, 4% SDS, 0.2% Blu di Bromofenolo, 20% glicerolo, 200 mM β-mercaptoetanolo) per elettroforesi.

Immunoblotting

I campioni sono stati frazionati su un gel di poliacrilammide all'11% e trasferiti su una membrana di nitrocellulosa (Biorad), che è stata bloccata tutta la notte in tampone di bloccaggio (PBS 0.3% Tween20) addizionato di 5% latte in polvere. Dopo alcuni lavaggi con lo stesso tampone, la membrana è stata incubata 1 ora a temperatura ambiente con un anticorpo policlonale anti-Trx

diluito 1:10000 in PBS 5% latte. Infine, la membrana è stata lavata tre volte per 5 minuti con PBS 0.3% Tween e incubata con un anticorpo secondario policlonale anti-IgG murine chemiluminescente (IRDye 680LT, LI-COR) diluito 1:15000 nello stesso tampone. La rilevazione del legame dell'anticorpo alla proteina Trx-L2(20-38)₃ è stata condotta mediante scansione a infrarossi (Odyssey Infrared Imaging System, LI-COR).

Preparazione delle particelle GEM

Cellule di *Lactococcus lactis* IL1403, cresciute in 100 ml di terreno M17 addizionato di 1% glucosio e 1% lattosio a 30°C tutta la notte in staticità, sono state raccolte mediante centrifugazione per 15 minuti a 5000 rpm e lavate con 50 ml di acqua distillata sterile. Il campione è stato suddiviso in tre aliquote, ciascuna delle quali è stata risospesa in 10 ml di soluzione acida (0.6M TCA, 0.1M acido cloridrico, 5.6M acido acetico) a pH1. Dopo aver risospeso con attenzione il pellet cellulare, i tubi sono stati bolliti per 30 minuti. Trascorso questo tempo, sono stati effettuati 3 lavaggi con 50 ml di PBS sterile. Al termine dell'ultimo lavaggio i gusci batterici sono stati risospesi in 10 ml dello stesso tampone e contati al microscopio mediante una camera Bürker-Turk. I tre campioni sono stati aliquotati in stock da 10U/ml (1 unità (U) è definita come 2.5×10^9 particelle) e conservati a -20°C. Nota: l'intera procedura è stata condotta in condizioni di sterilità.

Estrazione del DNA genomico da *L. lactis*

Le cellule di *L. lactis* IL1403 sono state cresciute tutta la notte in terreno M17 addizionato di 1% glucosio e 1% lattosio, a 30°C in condizioni di staticità. 1ml di questa coltura in fase stazionaria è stato centrifugato a 14000 rpm per 1 minuto, risospeso in 100 µl di tampone TES (10% saccarosio, 25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 10 mg/ml lisozima e 40 µg/ml Rnasi) e incubato per 30 minuti a 37°C. I protoplasti sono stati immediatamente lisati aggiungendo 600 µl di tampone di lisi (100 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM EDTA, 10 mM NaCl e 1% SDS) e incubando per 10 minuti a temperatura ambiente. Successivamente, il campione è stato posto a 80°C per 5 minuti e raffreddato a temperatura ambiente per 5 -10 minuti per aumentare l'efficienza di lisi e per inattivare eventuali enzimi litici presenti. Dopo aver addizionato 200 µl di sodio acetato 3M pH 5.2, si è mescolato mediante vortex per 15 secondi e si incubato in ghiaccio per 10 minuti. Il sovranatante ottenuto dopo centrifugazione a 14000 rpm per 10 minuti è stato precipitato aggiungendo un ugual volume di isopropanolo e centrifugando a 14000 rpm per 5 minuti. Il pellet di DNA è stato lavato con 1 ml di 70% etanolo e asciugato a temperatura ambiente. Infine, è stato risospeso in 50 µl di acqua Dnasi *free* e quantificato mediante elettroforesi su gel di agarosio. Il grado di purezza è stato valutato sulla base del rapporto dell'assorbanza misurata a 260 e 280 nm.

Il legame delle proteine di fusione alle particelle GEM

Differenti quantità (2 µg, 4 µg, 10 µg, 20 µg, 50 µg) della proteina di fusione LysM-Trx-L2(20-38)₃, recuperata dai corpi di inclusione e dializzata contro PBS 0.8 M arginina pH 7, sono state addizionate a 2×10^8 particelle GEM in 1 ml dello stesso tampone. Dopo un'incubazione in rotazione costante per 30 minuti a temperatura ambiente, i gusci lattici sono stati separati dal sovrinatante mediante centrifugazione a 14000 rpm per 10 minuti. Dopo 2 lavaggi del sedimento con PBS, la quantità di molecole antigeniche ancorate sulla superficie delle particelle GEM è stata valutata mediante SDS-PAGE.

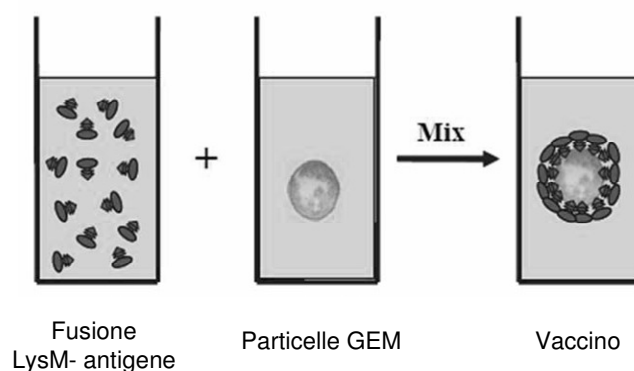


Figura21 | **La produzione del vaccino: il legame dell'antigene alle particelle GEM¹³².**

Risultati e Discussioni

41.

IDENTIFICAZIONE DELL'ANTIGENE CANDIDATO PER LO SVILUPPO DI UN NUOVO VACCINO ANTI-HPV

L'immunizzazione con la proteina capsidica minore L2 rappresenta uno degli approcci più promettenti per lo sviluppo di un vaccino di seconda generazione. Diversi studi hanno mostrato la presenza nella regione N-terminale di epitopi in grado di indurre la generazione di anticorpi neutralizzanti. Oltre alla protezione omologa, la somministrazione di alcuni polipeptidi induceva protezione da sierotipi virali eterologhi. Quale sia l'identità della regione di L2 implicata nell'interazione tra la superficie cellulare e HPV è ancora materia di dibattito. Questa è stata inizialmente proposta come la regione compresa tra gli aminoacidi (aa) 108-120, e gli anticorpi diretti contro questa particolare regione avevano infatti mostrato la capacità di bloccare l'infezione virale *in vitro*, sebbene a bassi titoli¹¹⁵. Studi successivi hanno identificato ulteriori epitopi neutralizzanti nella regione aa 1-88¹¹⁶ così come nelle regioni più estese comprese tra gli aa 11-200¹¹⁷ e 18-144¹¹⁸. Forse il più rilevante di questi epitopi ammino-terminali, localizzato tra gli aminoacidi 17-36, è stato identificato come il target di un anticorpo monoclonale neutralizzante e cross-protettivo (RG-1), e come il principale determinante dell'attività neutralizzante verificata nel siero di conigli e uomini immunizzati con le versioni più vaste di L2 (aa 1-88, 11-200)¹¹⁷. Nonostante la vaccinazione con L2 presenti il vantaggio di indurre una potente risposta cross-neutralizzante, oltre al vantaggio di poter essere prodotta in batterio senza richiedere complesse e costose procedure di preparazione, la sua limitata immunogenicità rappresenta d'altra parte il principale limite di questo approccio.

La presente ricerca ha utilizzato una strategia innovativa, denominata 'Thioredoxin Displayed Multi-peptide Immunogens' (TDMI), per aumentare l'immunogenicità dei peptidi di L2 ed esaminare in modo sistematico il potere neutralizzante di alcuni peptidi localizzati nella regione aa 1-120 di L2 di HPV16. Questa tecnologia, già applicata con successo alla realizzazione di prototipi di vaccini contro la malattia di Alzheimer¹⁰⁸, si basa sull'uso della Tioredossina (Trx) batterica come *scaffold* strutturale. La Tioredossina di *Escherichia coli* è una piccola proteina (12kDa), la cui struttura è definita da un cuore centrale di cinque filamenti β , tre paralleli e due antiparalleli, circondato da quattro α -eliche (Figura22). Il sito attivo (Cys-Gly-Pro-Cys), localizzato nel loop tra il filamento centrale del foglietto β e l' α -elica 2, è mantenuto in una struttura stabile dal ponte disolfuro tra le cisteine 32 e 35. La definizione della struttura terziaria ha rivelato che il sito attivo protrude dal corpo della proteina come loop di superficie, senza interagire con il resto della molecola. Questa regione non sembra contribuire alla stabilità complessiva della Tioredossina, e così l'inserzione di

qualunque peptide nel sito naturale di restrizione *CpoI* (5'...CG/GT(A)CCG...3') permette la sua esposizione in modo strutturalmente corretto al solvente.

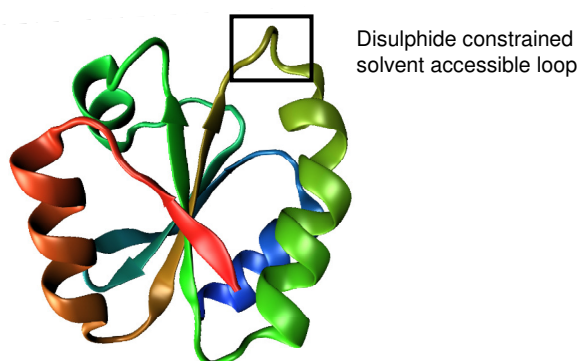


Figura22 | **Struttura terziaria della Tiorredossina di *Escherichia coli*.**

Le Tiorredossine, oltre a rivestire un ruolo cruciale nella difesa dallo stress ossidativo e nella regolazione dello stato ossidativo delle funzioni cellulari, promuovono il *folding* delle proteine sia direttamente che favorendo l'attività di altri *chaperone* molecolari¹¹⁹. Queste hanno recentemente assunto notevole importanza per la produzione di proteine di fusione solubili nel citoplasma di *E. coli*. La Trx covalentemente legata ad un'altra proteina agisce come *chaperone*, mantenendo gli intermedi strutturali in soluzione per il tempo necessario perché questi adottino la loro conformazione finale corretta, e prevenendone quindi l'aggregazione e la precipitazione¹¹⁹. Nonostante la Tiorredossina non contribuisca alla stimolazione anticorpale, poiché non è citotossica, si prospetta dunque come *carrier* efficace che permette il *folding* corretto di peptidi ad essa associati, la loro esposizione al solvente esterno e quindi un riconoscimento potenzialmente facilitato da parte del sistema immunitario.

Progettazione ed espressione dei polipeptidi di fusione Trx-L2

I peptidi appartenenti al dominio N-terminale di L2 di HPV16, incluso un polipeptide rappresentante l'intera regione 1-120, sono stati selezionati da studi precedenti¹¹⁵⁻¹¹⁸, con una modificazione nel caso del peptide 20-38. Questa è consistita nella riduzione dell'N-terminale rispetto ai peptidi 17-36¹¹⁷ e 18-38¹¹⁸, per rimuovere i residui aminoacidici (17, 18, 19) che si è dimostrato essere non essenziali per il legame dell'anticorpo monoclonale neutralizzante RG-1 ai virioni HPV16¹¹⁷. Allo scopo di aumentare l'immunogenicità dei peptidi prescelti (20-38, 28-42, 56-75, 64-81, 96-115, 108-120) e del polipeptide 1-120, questi sono stati inseriti in singola e in multipla copia all'interno del loop del sito attivo della Tiorredossina (Figura23). La procedura sperimentale ha previsto una fase iniziale di costruzione dei vettori per l'espressione delle corrispondenti proteine di fusione.

Il frammento di DNA codificante per ognuno dei sei peptidi è stato ottenuto mediante appaiamento degli oligonucleotidi sintetici fosforilati (TabellaS1), o come prodotto di amplificazione (PCR) nel caso di L2(1-120), progettati in modo da conferire alla sequenza di interesse estremità adesive compatibili con quelle generate dal taglio con l'enzima di restrizione *CpoI*. Gli oligonucleotidi utilizzati inoltre presentavano ad una estremità due residui di Guanina che permettono di inserire una Glicina vicino alla coppia Glicina-Prolina, già codificata nel sito *CpoI*. Questi tre amminoacidi costituiscono un *linker* flessibile che dovrebbe permettere il corretto *folding* dei singoli monomeri. I frammenti sintetici, 5' *protruding CpoI*, sono stati clonati nel vettore di espressione pET28-Trx, già disponibile presso il nostro laboratorio, precedentemente digerito con lo stesso enzima di restrizione e defosforilato. Il sito non completamente palindromico di *CpoI* ha un duplice vantaggio: permette il clonaggio direzionato utilizzando un solo enzima di restrizione e inoltre consente l'inserimento sempre direzionato di più frammenti uguali, peculiarità che favorisce la multimerizzazione.

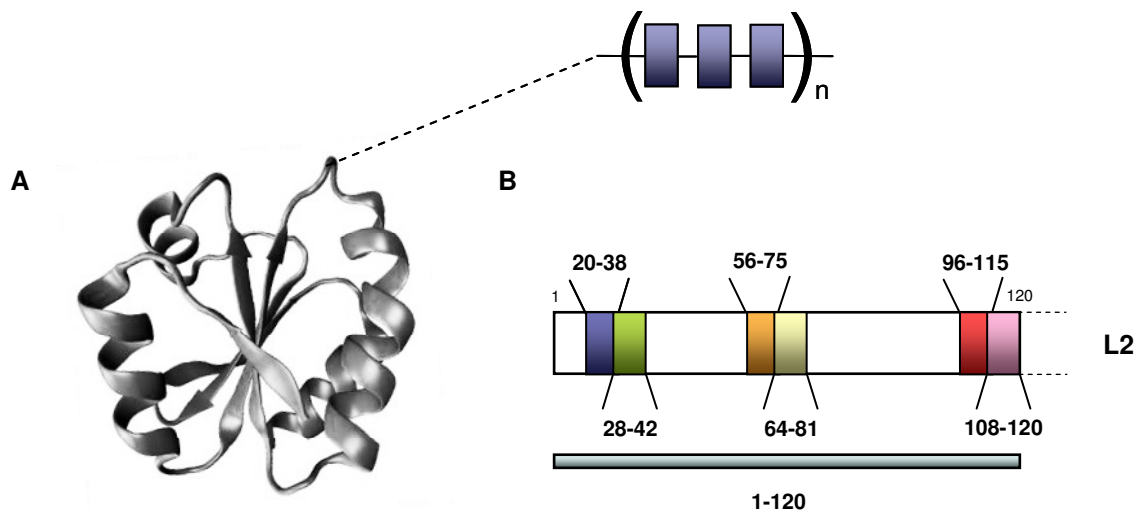


Figura23 | **Rappresentazione grafica dell'inserzione di più copie dei peptidi nella Trx (A) e la loro localizzazione nella regione N-terminale di L2(B).** [n indica il grado di multimerizzazione dei peptidi; i numeri rappresentano la posizione aminoacidica dei peptidi nella regione N-terminale di L2.]

I prodotti di ligazione, condotta con un rapporto vettore:inserto 1:50 per favorire l'inserzione di multiple copie di frammenti, sono stati trasformati nel ceppo di espressione di *Escherichia coli* BL21 Codon Plus (DE3). I risultanti cloni, designati come pTrx-L2(peptide)_n (dove n indica il numero di inserti ripetuti), sono stati sottoposti ad analisi di restrizione per la verifica del grado di multimerizzazione, accertata in seguito anche mediante sequenziamento.

I cloni selezionati, recanti da 1 a 15 copie dei peptidi L2 fusi alla Trx, sono stati utilizzati per l'espressione dei corrispondenti polipeptidi chimerici (Figura24, A). L'espressione è stata indotta aggiungendo IPTG al terreno di coltura dei batteri e incubando in differenti condizioni (TabellaS2) a

seconda del multimeri da esprimere, in modo da favorire il corretto *folding* delle proteine e quindi aumentare la loro solubilità. Dopo la lisi dei batteri, questa è stata verificata analizzando un'aliquota della frazione solubile e della frazione sedimentabile mediante SDS-PAGE (Figura24, B). Utilizzando appropriate condizioni di induzione, determinate precedentemente su piccola scala, è stato recuperato dal 40% al 90% dei polipeptidi Trx-L2 dal citoplasma di *E. coli* ed è quindi stato possibile purificarli in condizioni non denaturanti, sfruttando la coda esaistidinica (6xHisTag) presente sia all'N- che al C-terminale delle proteine, mediante cromatografia di affinità.

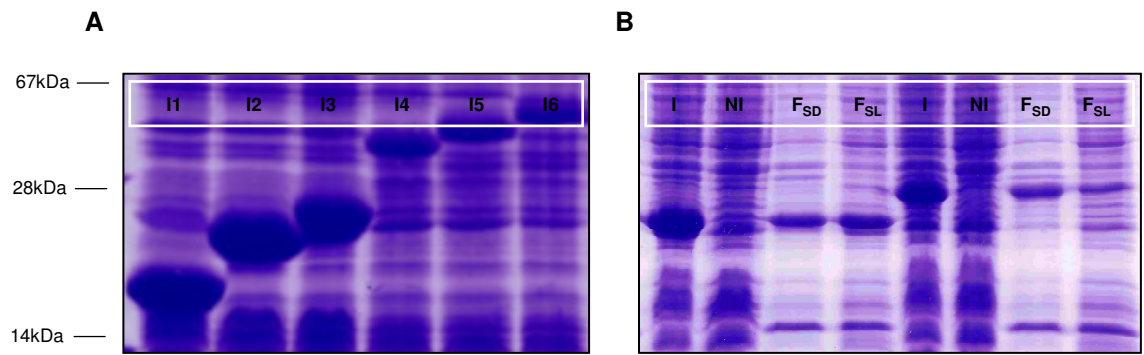


Figura24 | **Esempio di analisi dell'espressione (A) e della solubilità di multimeri (B).** [La posizione dei marcatori di peso molecolare (kDa) è indicata a sinistra; le sigle indicano: (I) campione indotto, (NI) campione non indotto, (F_{SD}) frazione sedimentabile, (F_{SL}) frazione solubile; i numeri indicano i cloni analizzati esprimenti differenti multimeri.]

L'unica eccezione riguarda il polipeptide Trx-L2(1-120), che è risultato essere completamente insolubile nonostante l'espressione sia stata condotta a basse temperature e per un tempo prolungato, per favorire l'assunzione del corretto *folding*. In questo caso, le proteine sono state solubilizzate dai corpi di inclusione, in condizioni denaturanti. Le proteine di fusione espresse, riassunte in Figura25 B, sono state dializzate contro PBS pH7 e sterilizzate.

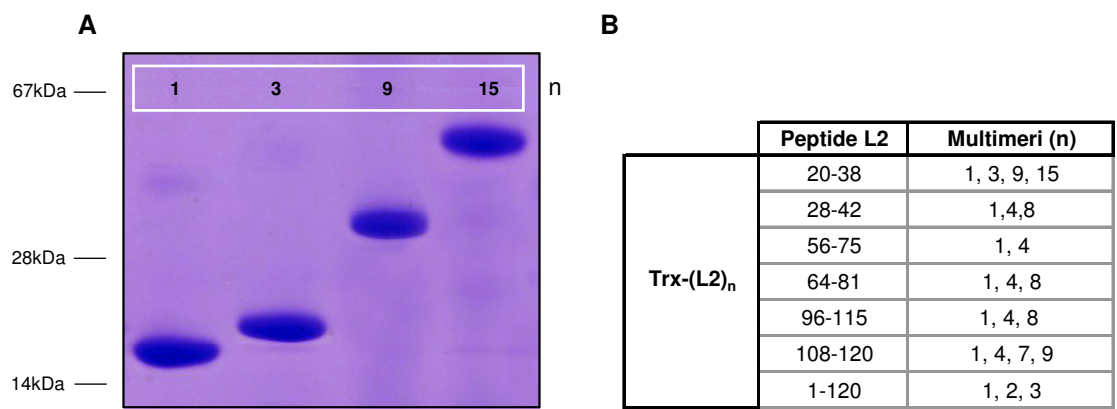


Figura25 | **SDS-PAGE di proteine di fusione Trx-L2(20-38)_n purificate (A); elenco delle proteine Trx-L2 prodotte (B)** [la posizione dei marcatori di peso molecolare (kDa) è indicata a sinistra; i numeri (n) indicano il grado di multimerizzazione dei peptidi.]

La risposta immunitaria generata dalla vaccinazione

Le proteine di fusione Trx-L2 prodotte (100µg ciascuna, corrispondenti a 1.7-4.3 nmoli in base alla dimensione del peptide inserito) sono state miscelate all'adiuvante di Freund e somministrate mediante iniezione sottocutanea secondo il protocollo di immunizzazione descritto nella sezione 'Materiali e Metodi'. Parallelamente un gruppo di controllo costituito da 2 topi è stato immunizzato con la Tioredossina batterica nativa. Terminato il ciclo di immunizzazione, il siero dei topi è stato saggiato per verificare la presenza di anticorpi diretti contro L2 di HPV16 mediante GST-ELISA. Come mostrato in Figura26, tutti i polipeptidi di fusione Trx-L2 hanno presentato una elevata immunogenicità e tutte le risposte anticorpali specifiche anti-L2 elicitate dalla vaccinazione si sono mostrate significativamente differenti da quelle generate dal controllo 'Trx nativa' ($P < 0.001$). L'immunogenicità del polipeptide di riferimento Trx-L2(1-120) era più alta di quella dei peptidi di fusione Trx-L2 ($P < 0.0001$), il più immunogenico dei quali è risultato essere Trx-L2(20-38) ($P < 0.0001$). Questo era seguito da Trx-L2(28-42) ($P < 0.01$) e dalle rimanenti proteine di fusione la cui immunogenicità non differiva dalle altre in modo statisticamente significativo.

L'analisi della risposta immunitaria indotta dalle proteine recanti una singola copia o multiple copie dei vari peptidi L2 ha mostrato che, con la sola eccezione di Trx-L2(96-115), l'immunogenicità dei derivati moltipetidici era significativamente più alta delle corrispondenti forme mono-peptidiche (vedi valori P in Figura26). Ad esempio, il titolo della media geometrica (GMT) per Trx-L2(20-38)₁ è risultata essere 3676 rispetto a 34.455 per la forma multimerica dello stesso peptide, alcuni dei quali hanno generato titoli anticorpali dell'ordine di 102.400 (Figura26). Inoltre, l'immunogenicità aumentava passando dal mono-peptide alle forme moltipetidiche di ciascun peptide, nonostante la riduzione nel numero di molecole immunogene (eg, 4.2 nmoli di Trx-L2(20-38)₁ rispetto a 2.3 nmoli di Trx-L2(20-38)₉). Tuttavia, sebbene la risposta immunitaria aumentasse gradualmente all'aumentare della molteplicità dei peptidi L2, la maggiorparte delle differenze in termini di immunogenicità tra le varie forme moltipetidiche dello stesso peptide (eg, Trx-L2(28-42)₄ rispetto a Trx-L2(28-42)₈) non erano significative. La perdita di un simile aumento multimerizzazione-dipendente in immunogenicità per l'antigene di riferimento Trx-L2(1-120) è presumibilmente dovuta all'ampia dimensione del polipeptide fuso, che probabilmente eccede la capacità di *constraining* della Tioredossina.

L'attività neutralizzante HPV omologhi degli antisieri

L'attività neutralizzante dei vari antisieri Trx-L2 è stata misurata mediante esperimenti di titolazione condotti contro pseudovirioni HPV16, utilizzando uno specifico anticorpo monoclonale (mAb) diretto verso la proteina L1 di HPV16 come controllo interno. La lettura dei dati è stata condotta sulla base della diminuzione dell'attività della fosfatasi alcalina secreta (SEAP), causata

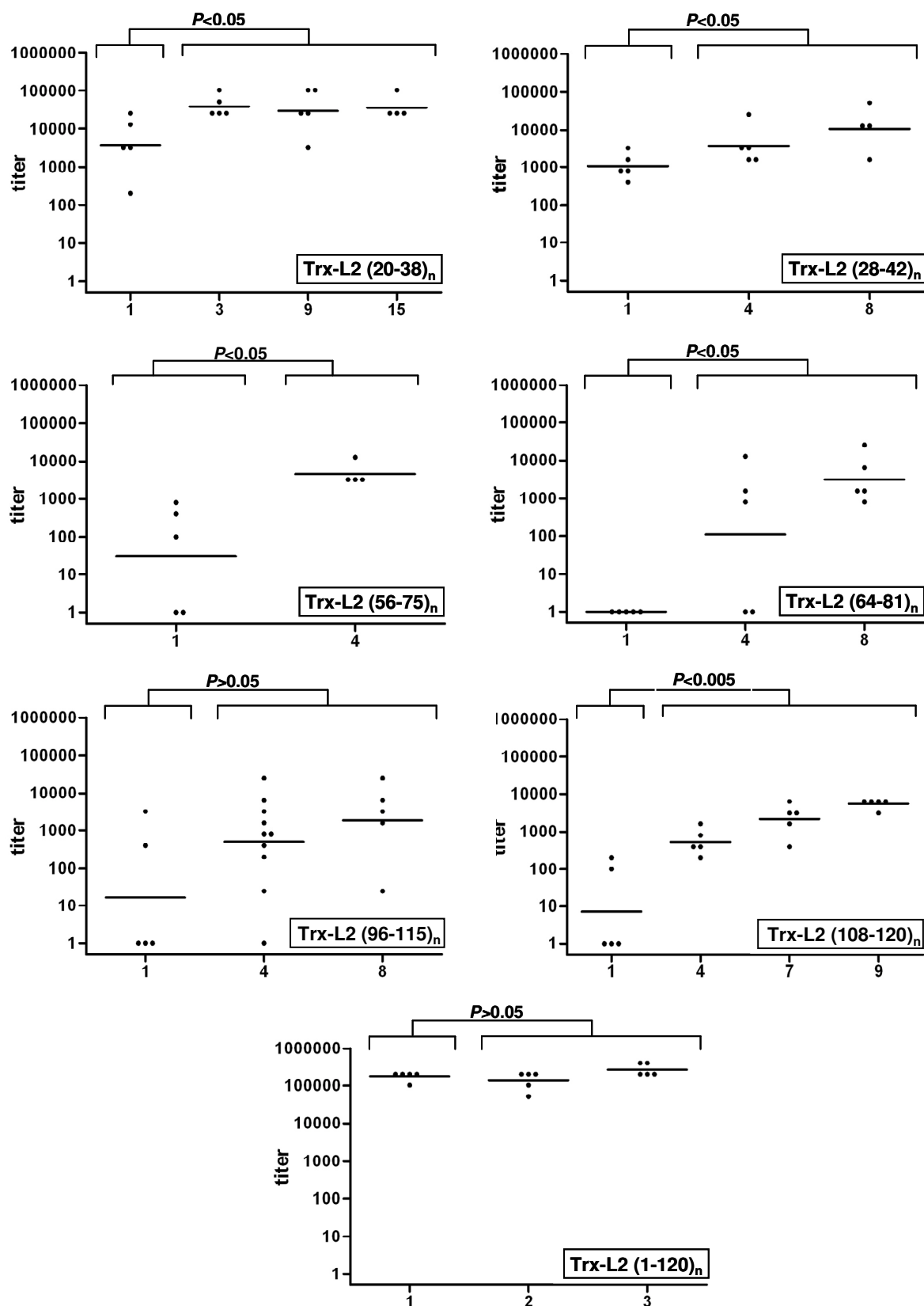


Figura26 | **Titoli anticorpali dei topi vaccinati con le proteine di fusione Trx-L2¹⁰⁹.** [I dati sono presentati come log₁₀ dei titoli; le barre orizzontali rappresentano la media geometrica dei titoli per ciascuno dei sottogruppi indicati; il valore n riportato nell'asse delle ascisse indica il grado di multimerizzazione dei peptidi; il valore P in ogni pannello indica la significatività statistica delle differenze tra la risposta immunitaria indotta dai mono-peptidi e dai multi-peptidi Trx-L2 in ciascun gruppo.]

dall'inibizione dell'infezione delle cellule 293TT da pseudovirioni HPV16 recanti un plasmide SEAP (vedi 'Materiali e Metodi' per i dettagli). Come mostrato in Figura27, il siero dei topi vaccinati con le differenti forme di Trx-L2(20-38) e con l'antigene di riferimento Trx-L2(1-120) mostravano la più forte attività neutralizzante. I loro titoli, con valori di GMT cumulativi pari a 904 e 1330 rispettivamente per i sieri anti-Trx-L2(20-38) e anti-Trx-L2(1-120) non differivano in modo statisticamente significativo dagli altri, ma erano entrambi più alti di quelli di tutti i restanti sieri ($P < 0.0001$). Gli antisieri Trx-L2(28-42) e Trx-L2(64-81) presentavano un'attività neutralizzante leggermente migliore rispetto a quella degli antisieri rimanenti, con una differenza statisticamente significativa solo tra l'ultimo antisiero e l'anti-Trx-L2 (108-120) ($P < 0.05$). Nonostante le differenze in attività neutralizzante tra gli antisieri dei mono-peptidi e dei multi-peptidi Trx-L2 non fossero statisticamente significative, si è osservata una tendenza ad una maggiore attività neutralizzante degli anticorpi generati dai multi-peptidi di tutti gli immunogeni, eccetto per Trx-L2(1-120).

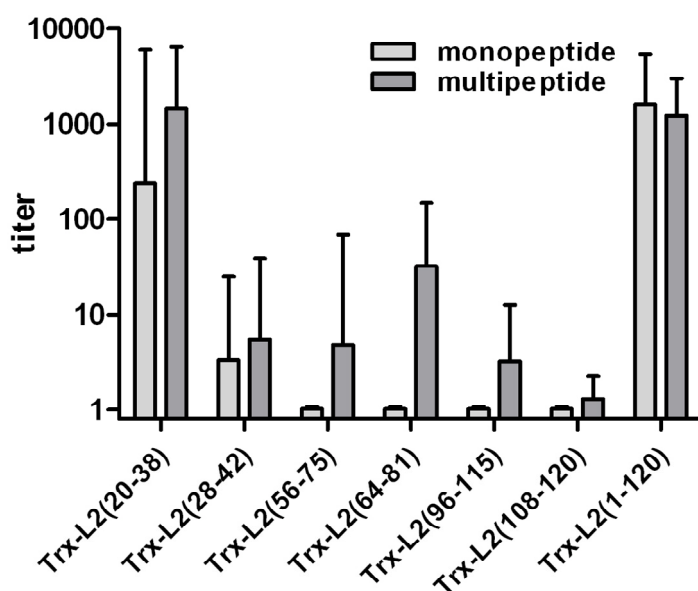


Figura27 | **L'attività neutralizzante pseudovirioni HPV16 dell'antisiero Trx-L2¹⁰⁹.**
 [La media geometrica dei titoli e gli intervalli di confidenza del 95% per ciascun gruppo di antisieri anti-Trx-L2 (incluso l'anti-Trx-L2(1-120) di riferimento) sono rappresentati in scala logaritmica.]

L'attività cross-neutralizzante HPV eterologhi dell'antisiero anti-Trx-L2(20-38)

I tre antisieri che nel saggio precedente hanno presentato un maggiore potere neutralizzante pseudovirioni HPV16, incluso l'antisiero Trx-L2(1-120), sono stati quindi analizzati per la loro abilità di indurre una risposta neutralizzante pseudovirioni eterologhi ad alto rischio (HPV45, 31 e 58), che condividono un diverso grado di similarità della sequenza aminoacidica di L2 con HPV16. Come rivelato dall'analisi esploratoria riportata in Figura28, che è stata condotta ad una diluizione fissa (1:200) di antisiero, tutti gli pseudovirioni eterologhi saggiati sono stati neutralizzati

dall'antisiero Trx-L2(20-38), che è stato invece il meno efficace contro HPV31. Con ogni pseudovirione, gli antisieri indotti dagli immunogeni multipeptidici Trx-L2(20-38) erano più efficaci rispetto a quelli indotti dalle forme mono-peptidiche ($P>0.05$) e la loro attività cross-neutralizzante era simile a quella dell'antisiero Trx-L2(1-120). Confrontandoli, gli anticorpi anti-Trx-L2(28-42) e anti-Trx-L2(64-81) mostravano una più bassa capacità cross-neutralizzante indifferentemente dalla molteplicità peptidica degli immunogenici (dato non mostrato). In particolare, entrambi gli antisieri non raggiungevano un'efficienza maggiore del 50% con tutti gli pseudovirioni eterologhi testati. Da notare, tuttavia, che gli antisieri anti-Trx-L2(64-81) inibivano l'infezione da HPV31 a livelli comparabili a quelli dell'anti-Trx-L2(20-38), nonostante i loro bassi titoli di neutralizzazione contro HPV16 (vedi Figura27) e i loro titoli estremamente bassi contro HPV58 ($<13\%$; $P<0.0001$ rispetto all'anti-Trx-L2(20-38)).

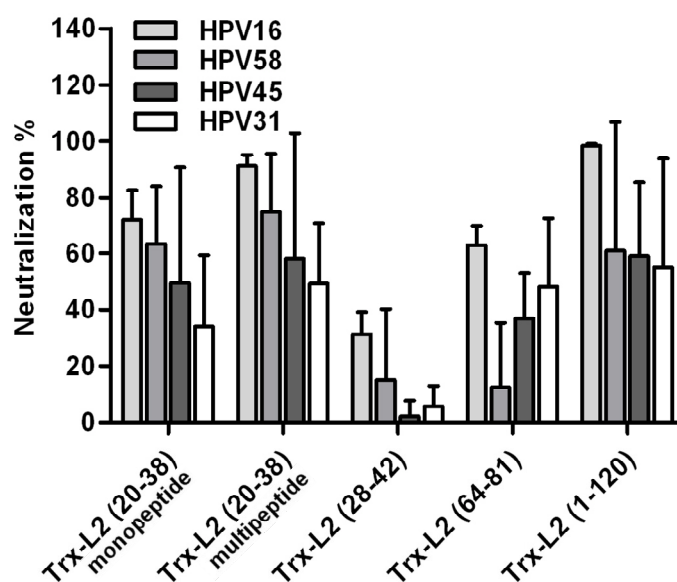


Figura28 | **Cross-neutralizzazione degli pseudovirioni 31, 45, 58¹⁰⁹.** [I dati sono presentati come la media più la deviazione standard dei valori di neutralizzazione per i vari antisieri relativi a quelli ottenuti con anticorpi HPV tipo-specifici.]

Le analisi condotte hanno quindi mostrato che L2(20-38) sembra essere il migliore epitopo peptidico, non solo per la produzione di anticorpi neutralizzanti ma anche rispetto alla cross-neutralizzazione. Questo è stato investigato più nel dettaglio in un esperimento dedicato in cui gli antisieri anti-Trx-L2(20-38)_n, dai topi che avevano reagito meglio in ogni gruppo di molteplicità peptidica (n: 1, 3, 9, 15), sono stati titolati contro un più vasto gruppo di pseudovirioni eterologhi, comprendente HPV18. Come mostrato in Figura29, gli anticorpi generati dalla forma trimerica e nonamerica di Trx-L2(20-38) mostravano una maggiore attività cross-neutralizzante rispetto all'antisiero indotto dal monopeptide e dal decapentepeptide dello stesso immunogeno. La più bassa attività neutralizzante dell'antisiero Trx-L2(20-38)₁ è in linea con la risposta generalmente inferiore di (cross-) neutralizzazione indotta dalla forma monomerica di questo peptide (vedi

Figura26 e 27). L'inferiore attività cross-neutralizzante dell'antisiero indotto da Trx-L2(20-38)₁₅ potrebbe invece essere spiegata dall'ampia taglia di questo inserto multipeptidico, che probabilmente eccede la capacità di constraining della Tioredossina. In Figura29 si può notare inoltre la limitata inibizione di HPV31, che potrebbe riflettere una maggiore divergenza di sequenza e/o la presenza di sostituzioni aminoacidiche critiche nella regione 20-38 di L2 di questo particolare tipo di HPV rispetto a HPV16 (vedi capitolo 4.2).

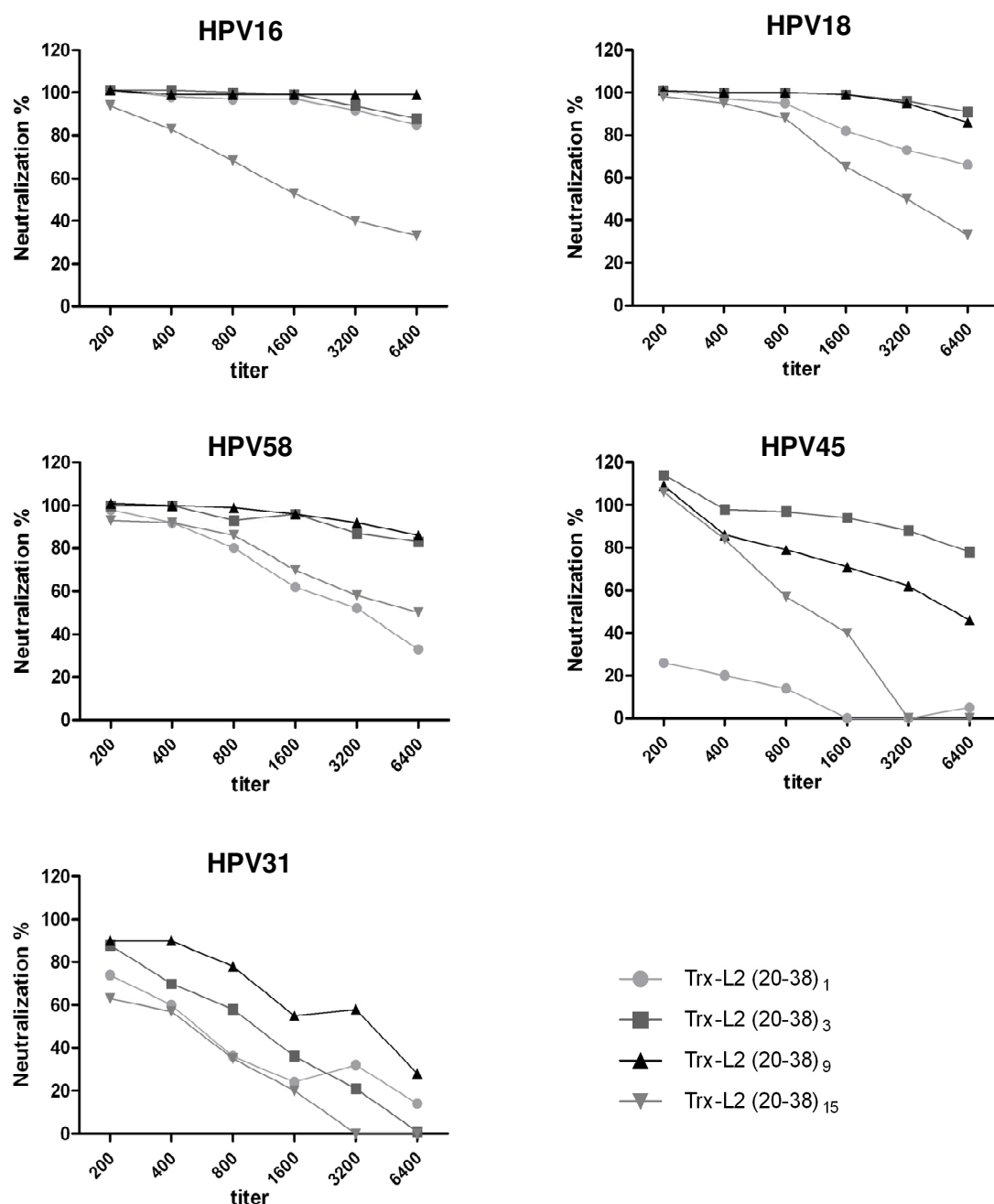


Figura29 | L'attività neutralizzante pseudovirioni omologhi ed eterologhi dell'antisiero Trx-L2(20-38)_n¹⁰⁹.

Discussione

L'inserzione nella Tioedossina, come rivelato da questo studio, si è dimostrata un'efficiente strategia per conferire una forte immunogenicità ai peptidi L2 di HPV16 che diversamente presentano un basso potere immunogeno. Come nel caso degli anticorpi anti- β amiloidi indotti dall'immunizzazione con i polipeptidi Trx-peptidi A β ¹⁰⁸, sembra che il *constraining* strutturale imposto dalla fusione con il *display site* della Tioedossina sia cruciale per la presentazione e l'immunogenicità dei peptidi di L2. La presente scoperta valida così la fusione di epitopi con la Trx come una strategia per la costruzione di immunogeni peptidici ricombinanti. Inoltre, dati preliminari indicano che è possibile ottenere un'immunogenicità comparabile a quella ottenuta con l'antigene Trx-L2(20-38) somministrato con l'adiuvante di Freund quando lo stesso antigene (privato delle endotossine) è miscelato con l'allume, un adiuvante meno potente approvato per uso umano (dato non mostrato). Questi risultati sono tutt'altro che scontati data la limitata immunogenicità intrinseca di L2 e le deboli risposte immunogeniche precedentemente ottenute con altri tipi di immunogeni peptidici di L2¹²⁰. Gli anticorpi indotti da tre dei peptidi testati (20-38, 28-42 e 64-81; l'ultimo solo nella forma multipeptidica) erano in grado di bloccare l'infezione virale omologa e di cross-neutralizzare almeno uno dei tipi eterologhi di HPV saggiati. Da quanto osservato, sembra che multipli epitopi presenti nella regione aa 1-120 di L2 siano in grado di indurre una risposta neutralizzante, ma con differente efficacia. Il più efficiente di questi è risultato essere di gran lunga il peptide 20-38, il cui tripeptide di fusione con la Trx elicitava anticorpi in grado di neutralizzare tre differenti pseudovirioni eterologhi (HPV18, 45, 58) a titoli maggiori di 1600. Risultati simili riguardo al potenziale di cross-neutralizzazione di anticorpi indotti dall'epitopo peptidico parzialmente sovrapposto 17-36, identificato mediante un approccio basato su anticorpi monoclonali, sono stati recentemente pubblicati¹¹⁷. I nostri dati, ottenuti confrontando multipli epitopi presenti nella regione 1-120 di L2 utilizzando un nuovo approccio di presentazione dell'antigene, forniscono una conferma indipendente alla nozione che una sequenza localizzata tra gli aa 20-36 rappresenta effettivamente il maggiore epitopo neutralizzante della regione N-terminale di L2. Da notare, tuttavia, che un altro peptide correlato, esteso dall'aminoacido 18 al 38, era risultato poco neutralizzante in uno studio precedente¹¹⁸. Questo enfatizza ulteriormente l'importanza della presentazione degli antigeni peptidici e l'eccellente prestazione della Trx non solo in immunogenicità, ma anche a livello di capacità neutralizzante degli anticorpi risultanti.

Nonostante sia sottodominante in termini di immunogenicità, la proteina capsidica minore L2 gioca un ruolo chiave nell'interazione tra il virus e la cellula bersaglio. Infatti, gli anticorpi neutralizzanti elicitati dalla vaccinazione con VLP costituite da L1 hanno dimostrato di bloccare l'infezione virale prevenendo un cambio conformazionale di L2 che è critica per questa interazione¹⁰⁷. Da notare che questa interazione è centrata su una regione nell'N-terminale di L2 (aa 13-31) che si sovrappone al peptide 20-38, identificato come il più potente epitopo cross-neutralizzante nel presente studio. L'elevata attività neutralizzante dell'antisiero generato dalla vaccinazione con Trx-L2(20-38) è in accordo con la natura precedentemente riconosciuta dell'epitopo correlato

L2(17-36)¹¹⁷. Questo potrebbe includere una più elevata accessibilità, e/o una migliorata presentazione strutturale sulla superficie virale, come indicato dal fatto che il peptide 13-31 parzialmente sovrapposto all'epitopo 20-38 lega un recettore di superficie implicato nell'internalizzazione di HPV, e che mutazioni in questo peptide interferiscono con l'interazione tra il virus e la cellula. Rispetto ad altre strategie di immunizzazione, incluso quella basata sull'uso del lipopeptide Pam2Cys-T helper P25-L2(17-36) recedentemente descritta, i principali vantaggi della strategia presentata includono la facilità di preparazione e di successiva ottimizzazione dell'antigene, il basso costo di produzione e la versatilità d'uso. Sulla base dei dati ottenuti, il multipeptide di fusione Trx-L2(20-38) e in modo particolare la forma tripeptidica, data la sua elevata solubilità e facilità di espressione (vedi TabellaS2), si prospetta dunque come il miglior candidato per lo sviluppo di un vaccino di seconda generazione contro il virus del papilloma.

42.

STRATEGIE MOLECOLARI PER L'OTTIMIZZAZIONE DELL'EPITOPO L2(20-38)

La strategia TDML utilizzata nella prima fase della ricerca per aumentare l'immunogenicità di alcuni peptidi della proteina capsidica minore L2 ha portato all'identificazione dell'antigene trimetrico Trx-L2(20-38) come il miglior candidato per lo sviluppo di un nuovo vaccino multivalente. Questo infatti si è rivelato un eccellente immunogeno, in grado di indurre non solo una forte risposta immunitaria, ma anche la produzione di anticorpi a protezione crociata in grado di neutralizzare quattro diversi sierotipi virali (HPV16, 18, 58, 45)¹⁰.

Avendo identificato l'antigene più promettente, la fase successiva ha riguardato l'ulteriore ottimizzazione dello stesso in vista di una sua utilizzazione come vaccino peptidico ricombinante.

Riduzione dell'epitopo alla sola regione immunodominante

Come discusso nel capitolo precedente, l'analisi dei sieri dei topi immunizzati con ciascuno dei polipeptidi Trx-(L2)_n ha evidenziato una forte risposta anticorpale diretta contro L2. Tuttavia, i titoli neutralizzanti si erano dimostrati generalmente inferiori rispetto ai titoli misurati in ELISA, suggerendo che la maggiorparte degli anticorpi diretti contro la regione N-terminale di L2 non era in grado di legare le particelle virali. In un più ampio lavoro, realizzato in collaborazione con il 'German Cancer Research Center' di Heidelberg, è stato analizzato in dettaglio il *pattern* di riconoscimento di tre differenti popolazioni anticorpali (non neutralizzanti, neutralizzanti e cross-neutralizzanti) generate dalla somministrazione di ciascuno dei polipeptidi ricombinanti Trx-L2. Nonostante i risultati ottenuti forniscano importanti informazioni sulle basi molecolari dell'immunità cross-protettiva mediata da L2, in questo contesto verranno descritti unicamente i risultati che si sono dimostrati funzionali al miglioramento dell'epitopo candidato.

Caratterizzazione degli anticorpi monoclonali diretti contro l'epitopo

I topi precedentemente immunizzati con le proteine di fusione Trx-L2 sono stati utilizzati per isolare un pannello di 46 anticorpi monoclonali, di cui 11 erano diretti contro la regione aminoacidica 20-38. La caratterizzazione iniziale è consistita nella isotipizzazione delle IgG e nella verifica della loro attività neutralizzante e cross-neutralizzante, i cui risultati sono riportati in Tabella 7. Tutti gli anticorpi analizzati si sono dimostrati reattivi in GST-ELISA e in grado di legare la proteina L2 di HPV16 espressa dalle cellule 293TT trasfettate sia nel saggio di immunoblotting che di immunofluorescenza, dimostrando che i cambiamenti strutturali di L2 indotti dalle differenti

procedure analitiche non influenzavano il riconoscimento antigene-anticorpo. Solo due dei mAb isolati (K4L2₂₀₋₃₈, K18L2₂₀₋₃₈) erano in grado di neutralizzare pseudovirioni HPV16 (Tabella7).

Antigen	mAb	Ig isotype	Neutralization capacity (HPV16)	Cross-neutralization capacity	Targeted peptide (aa)	GST-ELISA	IB	IF
Trx-L2 (20-38)	K2L2 (20-38)	IgG1	-	-	30-35	+	+	+
	K4L2 (20-38)	IgG2b	+	+	21-30	+	+	+
	K6L2 (20-38)	IgG1	-	-	30-35	+	+	+
	K7L2 (20-38)	IgG2b	-	-	27-34			
	K8L2 (20-38)	IgG2b	-	-	27-35	+	+	+
	K9L2 (20-38)	IgG1	-	-	28-35	+	+	+
	K11L2 (20-38)	IgG2b	-	-	30-35	+	+	+
	K12L2 (20-38)	IgG2b	-	-	27-35	+	+	+
	K14L2 (20-38)	IgG2b	-	-	29-35	+	+	+
	K15L2 (20-38)	IgG1	-	-	22-31	+	+	+
	K18L2 (20-38)	IgG1	+	+	22-30	+	+	+

Tabella7 | **Caratterizzazione degli anticorpi monoclonali (mAb) anti-Trx-L2(20-38)¹¹⁰.**
Per ogni mAb è riportato l'isotipo, la capacità neutralizzante (+/-), il peptide legato e la reattività (+/-) in GST-ELISA, immunoblot (IB) e immunofluorescenza (IF).

L'abilità di questi anticorpi di cross-neutralizzare i tipi ad alto rischio HPV18, 31, 45, 58 e BPV-1, così come i tipi causa di condilomi HPV57 e 27, è stata determinata utilizzando il mAb K15L2₂₀₋₃₈ come controllo. Come mostrato in Tabella8, gli anticorpi K4L2₂₀₋₃₈ e K18L2₂₀₋₃₈ erano in grado di cross-neutralizzare tipi di papillomavirus diversi da HPV16, sebbene con differente efficienza.

PSV	Associated disease	Monoclonal antibodies		
		aa 20-38		
		K4	K18	K15
		$K_D = 1.7 \cdot 10^{-8}$	$K_D = 3.3 \cdot 10^{-8}$	$K_D = 8.9 \cdot 10^{-7}$
HPV16	Cervical cancer	3125	625	<5
HPV18	Cervical cancer	625	3125	<5
HPV31	Cervical cancer	<5	50	<5
HPV45	Cervical cancer	625	625	<5
HPV58	Cervical cancer	625	3125	<5
HPV57	Common warts	625	625	<5
HPV27	Common warts	625	625	<5
BPV-1	Bovine fibropapilloma	625	125	<5

Tabella8 | **Attività neutralizzanti degli anticorpi monoclonali K4L2₂₀₋₃₈ e K18L2₂₀₋₃₈¹¹⁰.**
Le attività sono espresse come titoli di (cross-) neutralizzazione, i.e., il reciproco della massima diluizione che causa neutralizzazione >70% dello pseudovirione indicato. [K_D indica la costante di dissociazione, unità in molare.]

Pattern di legame degli anticorpi non neutralizzanti e (cross-) neutralizzanti

I risultati precedentemente descritti indicano che la regione 20-38 di L2 è riconosciuta da entrambe le popolazioni anticorpali, sia (cross-) neutralizzanti che non neutralizzanti. Nell'ottica di identificare la regione immunodominante dell'epitopo in questione, sono stati condotti esperimenti volti a definire più precisamente il *pattern* di riconoscimento dei differenti tipi di mAb. In particolare, tutti i mAb anti-Trx-L2(20-38) sono stati saggiati in ELISA utilizzando come target peptidi costituiti da 15 aminoacidi, la cui sequenza ricopriva l'intera regione aminoterminale (aa 1-120) di L2 (vedi 'Materiali e Metodi' per i dettagli). E' stato osservato che gli anticorpi diretti contro la regione 20-38 mostravano un differente *pattern* di riconoscimento, che ha permesso di distinguere tra risposte neutralizzanti e non neutralizzanti. In particolare, i mAb cross-neutralizzanti K4L2₂₀₋₃₈ e K18L2₂₀₋₃₈ riconoscevano un paio di peptidi rappresentanti le regioni aa 17-31 e 21-35, mentre i corrispondenti anticorpi non neutralizzanti (K2L2₂₀₋₃₈, K6L2₂₀₋₃₈, K7L2₂₀₋₃₈, K8L2₂₀₋₃₈, K11L2₂₀₋₃₈, K12L2₂₀₋₃₈ e K14L2₂₀₋₃₈) reagivano con i peptidi 21-35 e 25-39 e in un caso (K9L2₂₀₋₃₈) con il peptide 29-43 ma non con il peptide 17-31 (FiguraS1). Da notare che l'anticorpo K15L2₂₀₋₃₈ mostrava un pattern di legame simile a quello dei due anticorpi cross-neutralizzanti, ma non era efficace nella neutralizzazione. Come suggerito dai risultati dell'analisi Biacore, questo è probabilmente dovuto ad una ridotta affinità di legame di questo particolare anticorpo ($K_D=8.9 \times 10^{-7}$, Tabella8), che è da 30 a 50 volte più bassa rispettivamente di quelle di K4L2₂₀₋₃₈ e K18L2₂₀₋₃₈. La regione riconosciuta dagli anticorpi neutralizzanti è stata successivamente mappata a più alta risoluzione e confrontata con quella riconosciuta dagli anticorpi non neutralizzanti, utilizzando peptidi ridotti di un aminoacido per volta dall'N- o dal C-terminale sino al raggiungimento della taglia minima di 8 aa. Come mostrato nella Figura30, i mAb neutralizzanti K4L2₂₀₋₃₈ e K18L2₂₀₋₃₈ reagivano rispettivamente con i peptidi 21-30 e 22-30, mentre i corrispondenti anticorpi non neutralizzanti riconoscevano la regione di L2 compresa tra gli aa 27 e 35.

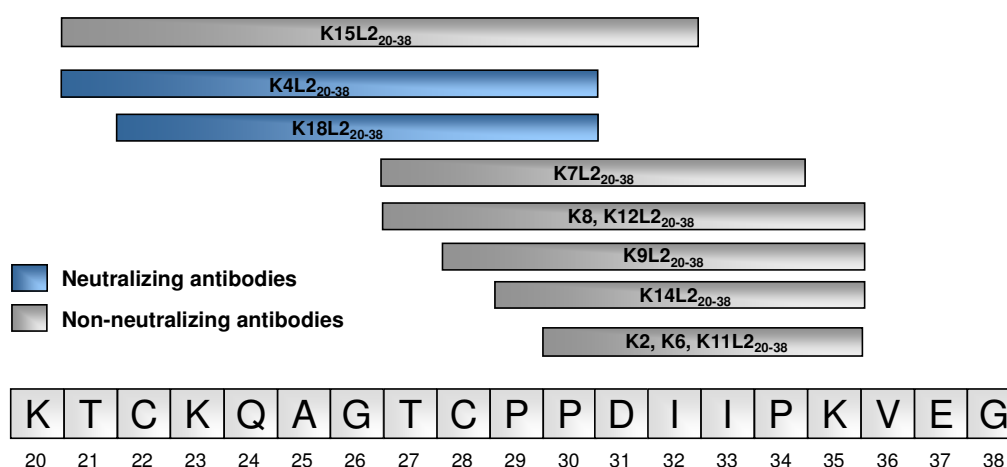


Figura30 | **Pattern di legame dei mAb neutralizzanti e non neutralizzanti**¹¹⁰.
[I numeri indicano la posizione dei residui aminoacidici nella regione 20-38 di L2 di HPV16.]

I dati ottenuti dimostravano che, nonostante l'epitopo 20-38 in esame rappresentasse già una limitata regione della proteina L2, la porzione effettivamente riconosciuta dagli anticorpi monoclonali (cross-) neutralizzanti era quella compresa tra gli aminoacidi 20 e 31. Sulla base di queste osservazioni si è dunque ipotizzato che la somministrazione di antigeni recanti più copie dell'epitopo 'miniaturizzato' potesse focalizzare il sistema immunitario sul solo epitopo immunodominante e quindi potenziare ulteriormente la *performance* del vaccino in termini di cross-neutralizzazione.

Progettazione ed espressione degli antigeni 'miniaturizzati'

Gli antigeni Trx-L2(20-31), il cui epitopo risulta ridotto degli aminoacidi 32-38 rispetto all'originale, sono stati ottenuti seguendo lo stesso protocollo sperimentale utilizzato per la produzione dei polipeptidi Trx-L2 di prima generazione (capitolo 4.1). Anche in questo caso il frammento di DNA codificante per il peptide 20-31 di L2 di HPV16 è stato ottenuto mediante appaiamento di una coppia di oligonucleotidi sintetici fosforilati (TabellaS1) progettati in modo che l'oligonucleotide a doppio filamento presentasse estremità adesive compatibili con quelle generate dal taglio con l'enzima di restrizione *CpoI*. Inoltre, l'inserzione ad una estremità di due residui di Guanina ha permesso di introdurre una Glicina vicino alla coppia Glicina-Prolina già codificata dal sito di restrizione e quindi un linker GGP che dovrebbe permettere il corretto folding dei singoli monomeri. I frammenti sintetici sono quindi stati clonati nel vettore pET28-Trx, precedentemente digerito con *CpoI* e defosforilato, utilizzando un rapporto vettore:inserto (1:50) che favorisse l'entrata di multiple copie di inserto. L'analisi di restrizione condotta sul DNA plasmidico di alcuni cloni trasformanti di *Escherichia coli* ha portato all'identificazione di diversi multimeri. La scelta di esprimere i polipeptidi Trx-L2(20-31)₃ e Trx-L2(20-31)₅ è stata dovuta al fatto che il trimero rappresentava lo stesso grado di multimerizzazione dell'antigene candidato Trx-L2(20-38), e quindi si ipotizzava che gli epitopi potessero assumere una conformazione simile tra i due residui di cisteine del sito attivo della Tioredossina, mentre il pentamero ne era equivalente in peso molecolare (circa 23 kDa) (Figura31). I cloni selezionati sono stati utilizzati per l'espressione dei corrispondenti polipeptidi chimerici, condotta aggiungendo IPTG al terreno di coltura dei batteri e incubando nelle stesse condizioni utilizzate per l'espressione dell'antigene trimero candidato (12 ore a 30 °C, TabellaS2). Le proteine presenti nella frazione solubile del lisato batterico, verificate mediante SDS-PAGE, sono state purificate tramite cromatografia di affinità, sfruttando la coda esaistidinica (6xHisTag) presente sia all'N- che al C-terminale (vedi 'Materiali e Metodi' per i dettagli). Il grado di purezza delle proteine espresse è stato verificato mediante SDS-PAGE (Figura31). Dopo la dialisi condotta contro PBS pH7, queste sono state diluite ad una concentrazione di circa 1 µg/µl con lo stesso tampone e sterilizzate mediante filtrazione.

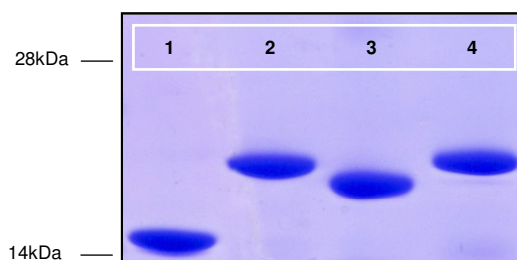


Figura31 | **SDS-PAGE di proteine Trx-L2 ‘miniaturizzate’ purificate.**
[la posizione dei marcatori di peso molecolare (kDa) è indicata a sinistra; i numeri indicano: (1) Trx, (2) Trx-L2(20-38)₃, (3) Trx-L2(20-31)₃, (4) Trx-L2(20-31)₅.

Titoli anticorpali anti-Trx-L2(20-31) e attività neutralizzante HPV16

Le proteine ‘miniaturizzate’ Trx-L2(20-31) prodotte sono state miscelate all’adiuvante di Freund e somministrate mediante iniezione sottocutanea secondo il protocollo di immunizzazione descritto nella sezione ‘Materiali e Metodi’. Parallelamente un gruppo di controllo costituito da 5 topi è stato immunizzato con l’antigene trimerico Trx-L2(20-38), rappresentante il controllo positivo, mentre ad un gruppo di 2 topi è stata somministrata la Trx nativa, come controllo negativo. Terminato il ciclo di immunizzazione, il siero dei topi è stato saggiato per verificare la presenza di anticorpi diretti contro L2 di HPV16 mediante GST-ELISA. Come mostrato in Figura32, sia il trimero che il pentamero Trx-L2(20-31) hanno presentato un’elevata immunogenicità, paragonabile a quella del controllo positivo Trx-L2(20-38)₃. In tutti i casi infatti il titolo della media geometrica è risultata essere dell’ordine di 102.400, a conferma dei dati ottenuti nella prima fase del progetto. Tuttavia, in questo caso la risposta immunitaria non è aumentata all’aumentare della molteplicità dell’inserito 20-31; come si nota infatti non sembra esserci una differenza significativa in termini di immunogenicità tra trimero e pentamero dell’antigene ‘miniaturizzato’.

I tre antisieri sono quindi stati saggiati per la loro abilità di neutralizzare pseudovirioni HPV16, utilizzando uno specifico anticorpo monoclonale (mAb) diretto verso la proteina L1 di HPV16 come controllo interno. Anche in questo caso, la lettura dei dati è stata condotta sulla base della diminuzione dell’attività della fosfatasi alcalina secreta (SEAP), causata dall’inibizione dell’infezione delle cellule 293TT da pseudovirioni HPV16 recanti un plasmide SEAP (vedi ‘Materiali e Metodi’ per i dettagli). Come mostrato in Figura33, l’antisiero Trx-L2(20-38) mostrava un’attività neutralizzante chiaramente superiore rispetto a quella generata dalla somministrazione degli antigeni di seconda generazione Trx-L2(20-31). Infatti, mentre l’antisiero di riferimento presentava un’attività neutralizzante superiore al 90%, l’antisiero di entrambi i multipeptidi 20-31 presentavano una percentuale di neutralizzazione inferiore (circa 40%) a quella considerata accettabile (>70%). Il confronto tra l’efficienza di neutralizzazione degli anticorpi generati dalla

forma tripeptidica e pentapeptidica di Trx-L2(20-31) non sembra mostrare una differenza significativa.

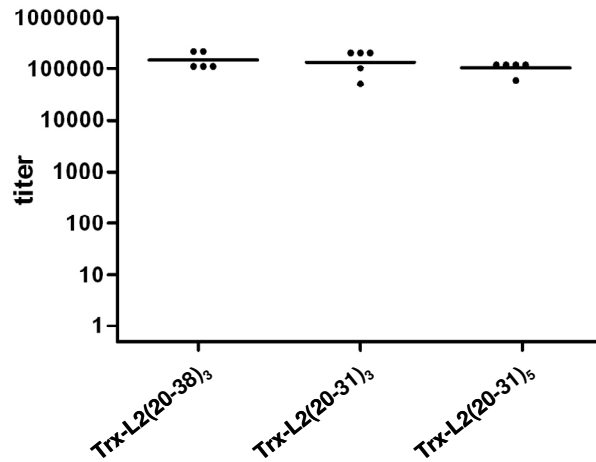


Figura32 | **Titoli anticorpali dei topi vaccinati con le proteine Trx-L2(20-31).** [I dati sono presentati come $\log_{10}$ dei titoli; le barre orizzontali rappresentano la media geometrica dei titoli per ciascuno degli antigeni indicati.]

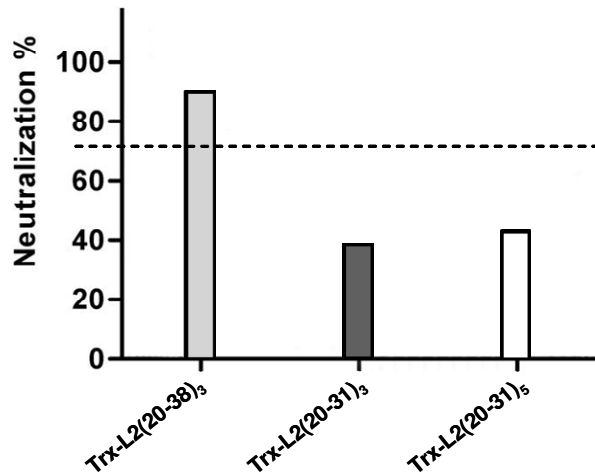


Figura33 | **Confronto dell'attività neutralizzante dell'antisiero anti-Trx-L2(20-38) e anti-Trx-L2(20-31).** [L'attività è considerata neutralizzante quando superiore al 70%, come indicato dalla linea tratteggiata.]

Un simile risultato si è ottenuto quando gli antisieri Trx-L2(20-31) sono stati incubati con pseudovirioni eterologhi (dato non mostrato). Anche in questo caso infatti la capacità cross-neutralizzante degli anticorpi generati si è dimostrata nettamente inferiore al valore soglia del 70%.

I dati preliminari ottenuti non sembrano dunque confermare quanto atteso. Infatti, nonostante gli esperimenti di mappatura dei siti di legame dei monoclonali K4L2₂₀₋₃₈ e K18L2₂₀₋₃₈ all'epitopo 20-38 avessero mostrato che la regione effettivamente immunodominante fosse quella delimitata dagli aminoacidi 20 e 31, la somministrazione degli antigeni recanti multiple copie di questo peptide ridotto non ha stimolato la generazione di anticorpi con aumentata attività (cross-) neutralizzante. Al contrario, gli antisieri anti-Trx-L2(20-31) sembrano neutralizzare con efficienza inferiore al controllo positivo.

E' plausibile ritenere che questo fenomeno sia legato al fatto che l'epitopo ridotto non riesca ad assumere una conformazione tale da indurre la generazione di anticorpi in grado di bloccare i virioni prima che questi inizino il processo infettivo. Sembra dunque che nonostante gli aa 32-38 non siano legati dai due anticorpi monoclonali cross-neutralizzanti questa regione sia però necessaria per il mantenimento della conformazione dell'epitopo. E' infatti nota l'importanza della conformazione assunta da un epitopo nella stimolazione di una risposta anticorpale neutralizzante¹²¹. Sulla base di queste osservazioni le successive fasi di ottimizzazione del vaccino peptidico si sono focalizzate sull'epitopo originale 20-38.

Combinazione di epitopi da differenti sierotipi virali

Come mostrato nella prima fase della ricerca, l'antigene trimerico Trx-L2(20-38) ha generato una potente risposta anticorpale in grado di neutralizzare gli pseudovirioni eterologhi ad alto rischio HPV18, 45 e 58 (Figura29). Tuttavia, l'antisiero ha mostrato una ridotta attività neutralizzante pseudovirioni HPV31. Un simile risultato si è ottenuto nella fase di caratterizzazione dei monoclonali K4L2₂₀₋₃₈ e K18L2₂₀₋₃₈. L'esperimento di (cross-) neutralizzazione condotto con i mAb (Tabella8) aveva infatti mostrato che questi erano in grado di inibire il processo infettivo dei sierotipi virali HPV18, 27, 31, 45, 57, 58 e BPV-1, ma solo con bassa efficienza HPV31. L'ipotesi formulata è che questo comportamento potesse riflettere una maggiore divergenza di sequenza e/o la presenza di sostituzioni aminoacidiche critiche nella regione 20-38 di L2 di questo particolare tipo di HPV rispetto a HPV16. La fase successiva della ricerca si è quindi concentrata sull'analisi di questo fenomeno, al fine di progettare una versione multivalente dell'antigene candidato in grado di elicitare una risposta anticorpale ad ampio spettro, incluso il sierotipo 31.

Divergenze nella sequenza di L2 come causa di limitata cross-neutralizzazione

E' noto che nella proteina L2 gli aminoacidi nelle posizioni 20 (Q→K), 24 (A→Q), 30 (S→P) differiscono tra i sierotipi HPV31 e 16. Per verificare se queste sostituzioni aminoacidiche fossero la reale causa della mancata neutralizzazione di pseudovirioni HPV31 da parte degli anticorpi generati in seguito alla vaccinazione con l'antigene recante il peptide 20-38 di L2 di HPV16, è stato condotto un esperimento di peptide-ELISA che è consistito nell'incubare i due mAb K4L2₂₀₋₃₈ e K18L2₂₀₋₃₈ con peptidi sintetici, progettati in modo che presentassero combinazioni di aminoacidi

ibride rispetto alla sequenza 20-31 originale di HPV16 e 31 (vedi 'Materiali e Metodi'). Come è illustrato nella Figura34, revertendo la Serina in posizione 30 nel peptide di L2 di HPV31 a Prolina (come in L2 di HPV16), il legame di K4L2₂₀₋₃₈ al peptide di HPV31 aumentava di circa tre volte. La sostituzione aggiuntiva A→Q in posizione 24 ripristinava quasi completamente la reattività con il mAb K4L2₂₀₋₃₈. A differenza della sostituzione S→P in posizione 30, singoli cambiamenti in posizione 20 o 24 non influenzavano in modo apprezzabile il legame dell'anticorpo, nonostante si sia osservato un leggero aumento di reattività quando i due residui sono stati sostituiti simultaneamente. Al contrario di K4L2₂₀₋₃₈, che necessitava di una sequenza definita per il legame, l'anticorpo K18L2₂₀₋₃₈ riconosceva tutti i peptidi indipendentemente dalle modificazioni aminoacidiche apportate.

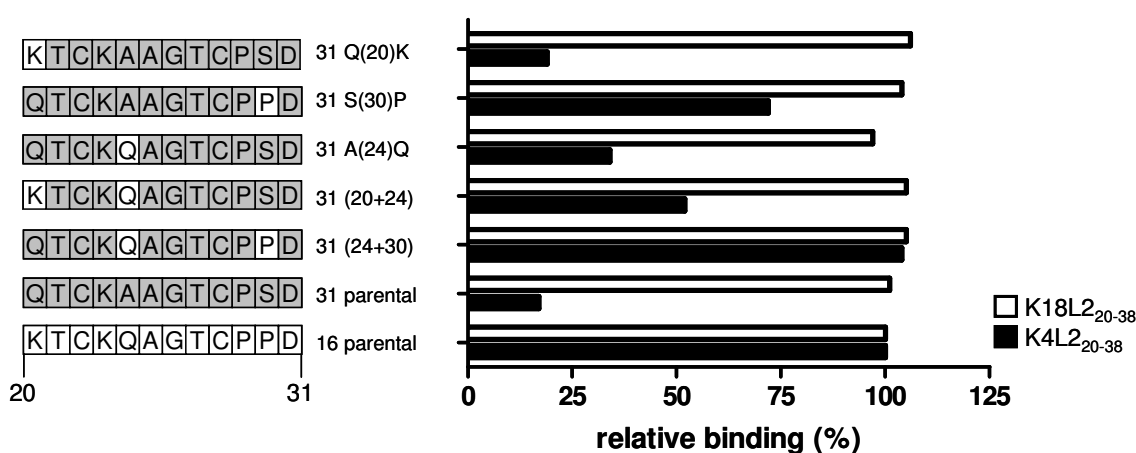


Figura34 | Reattività dei mAb K4L2₂₀₋₃₈ e K18L2₂₀₋₃₈ con peptidi 20-31 ibridi (HPV16/31)¹¹⁰.

I dati ELISA confermavano l'ipotesi formulata e cioè che l'inabilità degli anticorpi generati dalla vaccinazione con peptidi di L2 di HPV16 di neutralizzare pseudovirioni HPV31 era dovuta alla differente struttura primaria di questa regione di L2 tra i sierotipi in esame.

La regione aminoacidica 20-31 di L2 presenta un'elevata omologia di sequenza tra differenti sierotipi di HPV. Come mostrato nella Figura35, gli aminoacidi nelle posizioni 21-23 (TCK), 26-29 (GTCP) e 31 (D) sono altamente conservati nei sierotipi analizzati, che comprendono la maggiorparte degli HPV considerati ad alto rischio. Tuttavia, le posizioni aa 24 e 30 differiscono notevolmente tra le sequenze in analisi. Sulla base dell'aminoacido presente in queste posizioni è stato possibile definire tre gruppi evolutivi: una serie di sierotipi che presentano un'alta omologia con HPV16 (Q24, P30), altri sierotipi che invece presentano un pattern di aa solo parzialmente conservato rispetto al precedente (A24, P30), e HPV31 che invece mostra una combinazione totalmente differente rispetto ad HPV16 (A24, S30).

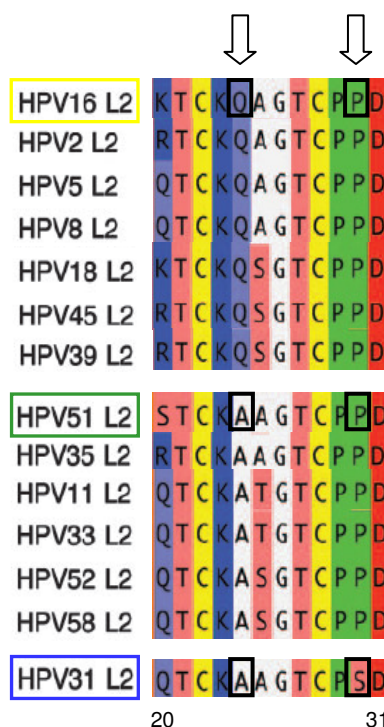


Figura35 | **Confronto di omologia di sequenza dei residui 20-31 di differenti tipi di HPV** (Clustal W). [Gli aminoacidi nelle posizioni 24 e 30 sono evidenziati in nero; la posizione dei residui è riportata in basso.]

Progettazione ed espressione di antigeni potenzialmente multivalenti

In base alle osservazioni precedenti si è ipotizzato che la vaccinazione con antigeni misti, costituiti dalla fusione della Tiorredossina con più copie dell'epitopo candidato 20-38 di differenti sierotipi virali (16, 31, 51), potesse attivare una risposta anticorpale con aumentato potere cross-neutralizzante. Per verificare se la combinazione strutturale dei differenti epitopi potesse influenzare la risposta di tipo B, sono state progettate differenti formulazioni di antigeni (Figura36). La prima, denominata 'omotrimero' è costituita dalla ripetizione del tripeptide 20-38 di HPV16, seguito dal tripeptide di HPV31 e da quello di HPV51. La seconda, denominata 'eterotrimero', è invece costituita dalla ripetizione del tripeptide eterologo, in cui ogni monopeptide 20-38 appartiene ad un diverso sierotipo. L'ultima è basata sulla miscela di quantità equimolari di tre proteine costituite dalla fusione della Trx con il trimero 20-38 di ciascun HPV.

I geni codificanti per le differenti combinazioni di epitopi, generati mediante sintesi chimica (Mr. Gene GmbH), sono stati progettati in modo che presentassero ad entrambe le estremità i siti di restrizione *CpoI*, per favorire il successivo clonaggio nel vettore di espressione pET-Trx digerito con lo stesso enzima. Come per i polipeptidi di prima generazione, tra un epitopo e il successivo è stato inserito un linker GGP per permettere il corretto *folding* dei singoli monomeri. I prodotti di ligazione sono quindi stati trasformati nel ceppo di espressione di *Escherichia coli* BL21 Codon Plus (DE3) e un clone trasformante per ogni costrutto è stato utilizzato per la prova di espressione

e di solubilità. Come atteso, i trimeri Trx-L2(20-38) dei sierotipi 31 e 51 sono risultati quasi completamente solubili nelle stesse condizioni del corrispondente trimero di HPV16 (12 ore a 30°C), mentre sia l'omotrimerico che l'eterotrimerico, presentanti 9 copie di epitopo ripetuto, sono risultati solubili al 60%, così come il corrispondente nonamero Trx-L2(20-38) (Tabella S2).

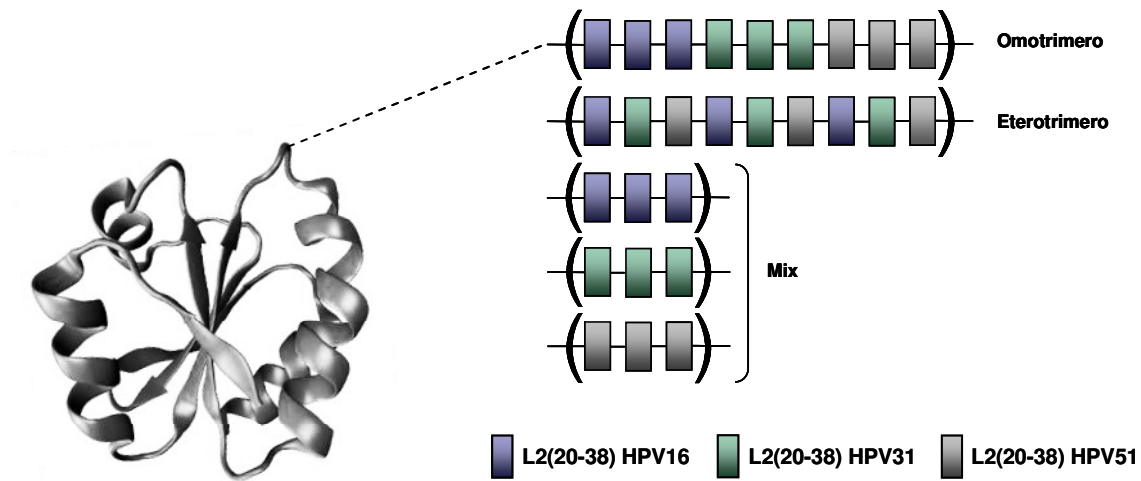


Figura36 | **Rappresentazione grafica degli antigeni potenzialmente multivalenti.**
[I rettangoli di diverso colore riproducono i peptidi 20-38 dei sierotipi HPV16, 31, 51.]

La procedura sperimentale ha quindi previsto le stesse fasi già descritte in precedenza. Brevemente, l'espressione dei 5 polipeptidi è stata indotta mediante addizione di IPTG al terreno di coltura dei trasformanti selezionati, che sono stati successivamente lisati tramite sonicazione. La purificazione delle proteine dal sovrinatante del lisato è stata condotta mediante cromatografia di affinità sfruttando la coda di istidine presente sia all' N- che al C-terminale di ogni polipeptide di fusione. Dopo aver verificato il grado di purezza della frazione eluita dalla colonna (Figura37), le proteine sono state dializzate contro PBS pH7, quantificate e sterilizzate.

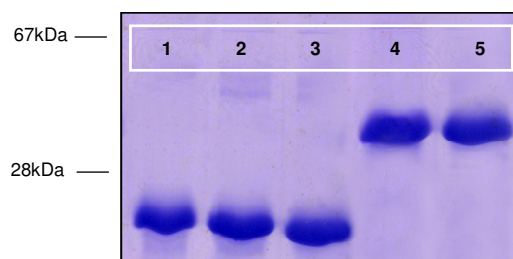


Figura37 | **SDS-PAGE di proteine Trx-L2(20-38) potenzialmente multivalenti.**
[La posizione dei marcatori di peso molecolare (kDa) è indicata a sinistra; i numeri indicano: (1, 2, 3) Trx-L2(20-38)₃ HPV16, 31, 51, (4) Trx-L2(20-38) omotrimerico, (5) Trx-L2(20-38) eterotrimerico.]

I nuovi antigeni prodotti, l'omotrimerico, l'eterotrimerico e la miscela di quantità equimolari delle tre proteine costituite dalla fusione della Trx con il trimerico 20-38 dei sierotipi 16, 31 e 51, sono stati somministrati ai topi mediante iniezione sottocutanea secondo il protocollo di immunizzazione descritto nella sezione 'Materiali e Metodi'. I successivi saggi di cross-neutralizzazione a cui verrà sottoposto il siero degli animali, forniranno importanti informazioni circa il potenziale di multivalenza di questi antigeni. Confrontando la percentuale di neutralizzazione degli pseudovirioni ad opera dei differenti antisieri sarà dunque possibile verificare se la combinazione dell'epitopo 20-38 di differenti sierotipi induce la generazione di una maggiore risposta anticorpale cross-neutralizzante, anche verso tipi virali non inclusi nella formulazione, e se l'ordine di presentazione di questi peptidi influenzi in qualche modo la risposta generata.

Variatione dello stato di ossido-riduzione

Residui critici per il legame dei mAb K4 e K18

Come descritto in precedenza, nella fase di caratterizzazione dei monoclonali anti-Trx-L2(20-38) è stato mostrato che i due anticorpi cross-neutralizzanti K4L2₂₀₋₃₈ e K18L2₂₀₋₃₈ riconoscevano e legavano specificatamente la regione compresa tra gli aa 20 e 31. Al fine di identificare i residui di L2 criticamente implicati nel legame, è stato condotto un ulteriore saggio di peptide-ELISA, utilizzando come target una serie di peptidi ciascuno dei quali presentava un differente aminoacido sostituito con un residuo di alanina. Come mostrato in Figura38 A, la sostituzione di ciascun aminoacido situato tra le posizioni 21-23 (TCK) e 28-29 (CP) è risultata in una forte riduzione della capacità di legame del mAb K4L2₂₀₋₃₈. Al contrario, la perdita del legame di K18L2₂₀₋₃₈ è stata osservata solo quando le cisteine in posizione 22 e 28 sono state sostituite (Figura38 B).

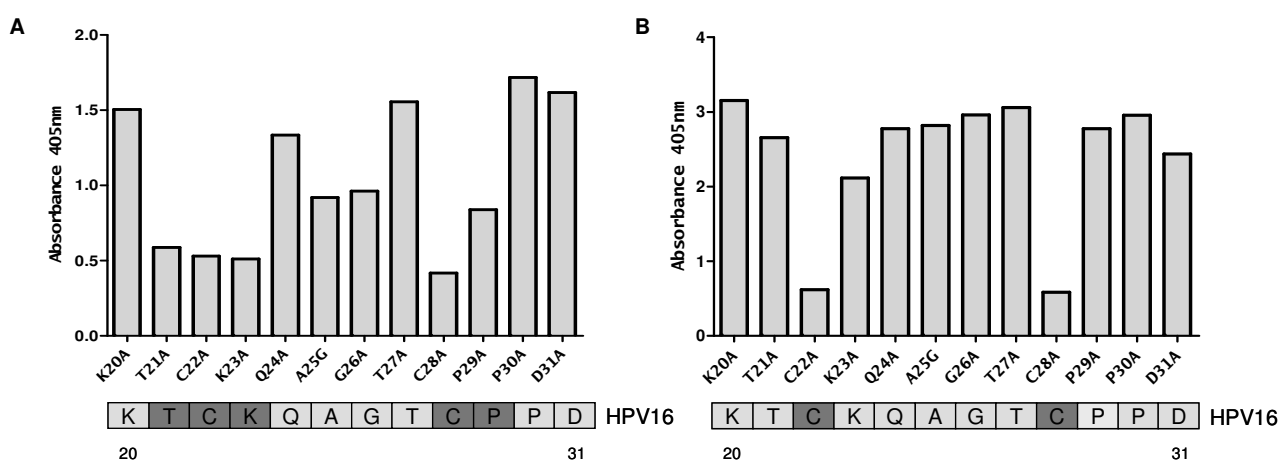


Figura38 | **Profilo di legame dei mAb K4L2₂₀₋₃₈ (A) e K18L2₂₀₋₃₈ (B)**¹¹⁰. [I residui aminoacidici richiesti per il legame di entrambi gli anticorpi sono evidenziati in grigio scuro.

E' stato recentemente dimostrato che queste cisteine, che sono importanti anche per il legame di K4L2₂₀₋₃₈, sono presenti nella forma ossidata nelle particelle infettive di HPV¹²². Lo stato di ossido-riduzione di questi residui, che sono altamente conservati nella famiglia dei *Papillomaviridae*, sembra essere fondamentale per l'infettività dei virioni, come dimostrato da esperimenti condotti su virioni mutati in uno o entrambi i residui¹²².

Data la specificità di legame dei monoclonali cross-neutralizzanti K4L2₂₀₋₃₈ e K18L2₂₀₋₃₈ a questi residui, è stato valutato lo stato di ossidazione dell'antigene candidato Trx-L2(20-38)₃ al fine di verificare il suo ruolo nella generazione di anticorpi dotati di attività cross-neutralizzante.

Determinazione dello stato di ossidazione dell'antigene Trx-L2(20-38)

La valutazione dello stato di ossido-riduzione delle due cisteine presenti in posizione 22 e 28 del peptide 20-38 presente in triplice copia nell'antigene candidato è stata condotta utilizzando la Tiorredossina nativa come riferimento. E' noto che nella Trx le due cisteine (C32, C35) presenti nel loop del sito attivo (Cys-Gly-Pro-Cys), coinvolte nella riduzione dei ponti disolfuro dei substrati proteici, in condizioni fisiologiche formano un ponte disolfuro. Nel polipeptide Trx-L2(20-38)₃ lo stato ossido-riduttivo di questi residui era meno prevedibile. Era possibile che le due cisteine della proteina carrier fossero mantenute in uno stato ossidato, giustificando la notevole stabilità strutturale dei peptidi ad essa associati, ma non era possibile prevedere lo stato di ossido-riduzione dell'intero polipeptide che presenta, oltre alle due cisteine della Tiorredossina, sei cisteine aggiuntive, due per ogni epitopo ripetuto (Figura39).

```
MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMGDKIIHLTDDSFDTDLKADGAILVDFWAEWCGPKTCK
QAGTCPPDIIPKVEGGPKTCKQAGTCPPDIIPKVEGGPKTCKQAGTCPPDIIPKVEGGPC
KMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNIDQNPGTAPKYGIRGIPTLLLFKNGEVAATKVGALSKGQ
LKEFLDANLRDPNSSSVDKLAAALEHHHHHH
```

Figura39 | **Sequenza aminoacidica dell'antigene candidato Trx-L2(20-38)₃.**
[Le cisteine del sito attivo della Trx (C32, C35) sono colorate in blu; le cisteine degli epitopi ripetuti (C22, C28) sono colorate in viola. I tre peptidi 20-38 sono sottolineati.]

Il saggio DTNB condotto (vedi 'Materiali e Metodi') ha mostrato che nel caso della Trx nativa erano presenti 0.20 gruppi tiolici per molecola (rispetto ai 2 gruppi -SH/molecola attesi) mentre nel caso del polipeptide Trx-L2(20-38)₃ erano presenti 0.27 gruppi tiolici per molecola (rispetto agli 8 gruppi -SH/molecola attesi). Per entrambi i campioni, i valori di assorbanza misurati prossimi allo zero hanno dunque dimostrato che oltre il 90 % delle cisteine dei campioni analizzati erano impegnate in ponti disolfuro.

Caratterizzazione dei ponti disolfuro

Nonostante si sia dimostrato che i residui cisteinici 22 e 28 erano nella forma ossidata nell'antigene candidato, non era chiaro se i ponti disolfuro presenti nei campioni analizzati fossero di tipo intermolecolare, portando alla formazione di dimeri Trx-Trx o Trx-L2-L2-Trx, oppure di tipo intramolecolare, cioè tra cisteine presenti sulla stessa molecola. Non si poteva comunque escludere che fossero presenti entrambe le possibilità. Per determinare la natura di questi legami, i campioni di interesse sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE) sia in condizioni denaturanti che non denaturanti. Nel primo caso, i campioni sono stati incubati con 0.3 M β -mercaptoetanolo per 30 minuti a temperatura ambiente prima di essere caricati nei pozzetti, mentre nel secondo caso i campioni sono stati caricati in assenza di agente riducente. Come si osserva nella Figura 40 A, in presenza di riducente è presente una sola banda per ogni campione corrispondente al peso molecolare della proteina analizzata. Al contrario, in assenza di β -mercaptoetanolo (Figura 40 B), per ogni campione si osserva una serie di bande oltre a quella principale. Sembra dunque che in assenza di riducente i ponti disolfuro si mantengano e le proteine migrino nel gel sottoforma di aggregati. In particolare, mentre nel caso della Trx la prevalenza di specie ad alto peso molecolare dimostra che in questo campione la maggior parte dei ponti disolfuro sono di tipo intermolecolare, nel caso del polipeptide di fusione, data la bassa percentuale di aggregati, la quasi totalità dei legami è di tipo intramolecolare.

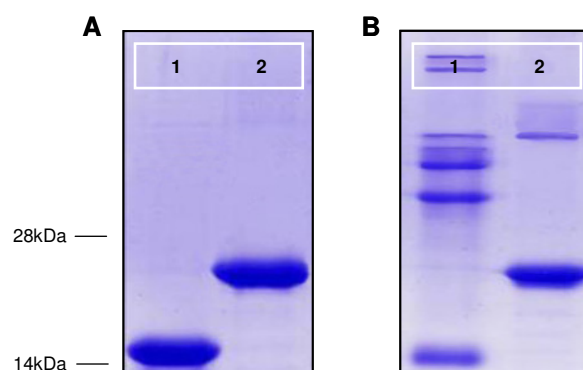


Figura 40 | **SDS-PAGE in condizioni denaturanti (A) e non denaturanti (B).**
[La posizione dei marcatori di peso molecolare (kDa) è indicata a sinistra; i numeri indicano: (1) Trx, (2) Trx-L2(20-38)₃.]

I dati ottenuti dimostrano dunque lo stato completamente ossidato dell'antigene candidato Trx-L2(20-38)₃. Data l'importanza dello stato di ossidazione delle cisteine 22 e 28 per l'infettività dei virioni e dimostrata la presenza di ponti disolfuro intramolecolari nell'antigene che, somministrato in topo, induce la generazione di anticorpi con attività cross-neutralizzante, si è ritenuto plausibile verificare la specificità di legame dei mAb K4L2₂₀₋₃₈ e K18L2₂₀₋₃₈ alla forma ossidata o artificialmente ridotta del polipeptide di fusione.

Verifica dell'immunoreattività dei mAb K4 e K8 in relazione allo stato redox

L'affinità di legame dei mAb cross-neutralizzanti per la forma ossidata o ridotta della proteina Trx-L2(20-38) è stata verificata mediante un esperimento di Western blotting. Dimostrata la presenza di ponti disolfuro intermolecolari tra le cisteine 22 e 28, il campione ridotto è stato ottenuto incubando un'aliquota della proteina con β -mercaptoetanololo, come descritto nella sezione 'Materiali e Metodi'. Il successivo saggio DTNB, condotto sulla proteina dopo la rimozione dell'agente riducente avvenuto mediante gel filtrazione, ha dimostrato la presenza di 6 ± 1 gruppi $-SH$ /molecola rispetto agli 8 attesi. Questo valore indicava che, nonostante il trattamento sia stato condotto con alte concentrazioni di riducente e per un tempo prolungato, il 25% dei residui di cisteina era rimasto nella forma ossidata. Al contrario, il saggio condotto parallelamente sulla proteina non trattata ha mostrato che oltre il 97% dei residui era nella forma ossidata e solo il 3% nella forma ridotta. Entrambi i campioni proteici sono stati caricati in doppio su un gel di poliaccrilammide (SDS-PAGE), trasferito in seguito su una membrana di nitrocellulosa che è stata incubata con entrambi i monoclonali. La successiva rilevazione dei segnali ha mostrato che entrambi i mAb legavano preferenzialmente la forma ossidata dell'antigene (Figura41). In entrambi i casi, la presenza di un debole segnale in corrispondenza della proteina ridotta è attribuibile a quel 25% che è rimasto ossidato nonostante il trattamento di riduzione.

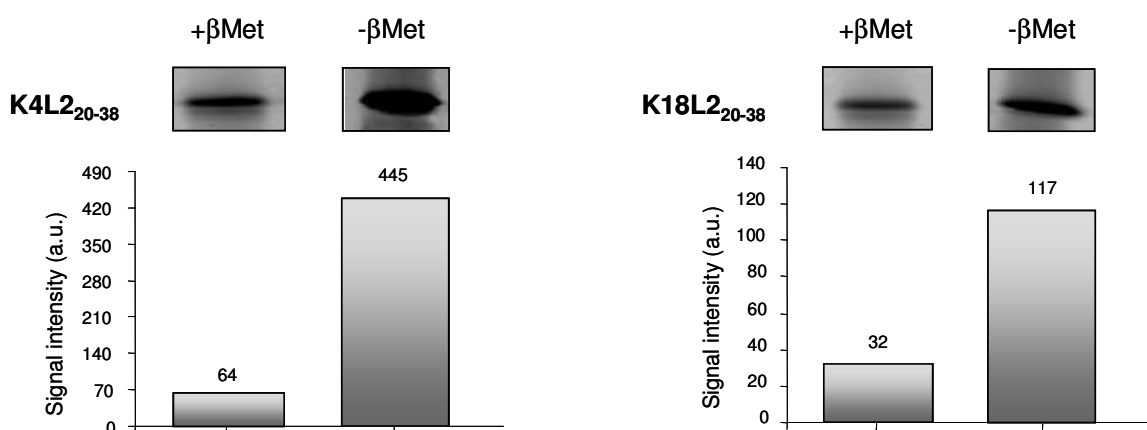


Figura41 | Il legame dei mAb K4 e K18 in relazione allo stato di ossidazione di Trx-L2(20-38)₃¹¹⁰.
[Il legame dei mAb alla forma parzialmente (>75%) ridotta (+βMet) o completamente ossidata (-βMet) della proteina è stata determinata mediante western blotting. I valori di intensità del segnale, riportati sopra agli istogrammi, è espressa in unità arbitrarie (a.u.).]

Questo dato, in accordo con quanto riportato in letteratura, dimostra l'importanza dello stato di ossidazione dei residui cisteinici 22 e 28 e quindi dell'antigene Trx-L2(20-38)₃ nella generazione di anticorpi dotati di attività cross-neutralizzante. Data la presenza di ponti disolfuro naturalmente presenti in condizioni fisiologiche nella proteina di fusione, non è richiesto quindi nessun trattamento dell'antigene prima della sua somministrazione.

Discussione

La fase di ottimizzazione dell'antigene trimerico Trx-L2(20-38), risultato il miglior candidato per lo sviluppo di un vaccino di seconda generazione contro il virus del papilloma umano, ha previsto l'utilizzo di diverse strategie molecolari. Inizialmente, la caratterizzazione di 11 monoclonali isolati da topi immunizzati con l'antigene candidato ha rivelato che solo due di questi erano effettivamente in grado di neutralizzare particelle virali. Nonostante un particolare sottogruppo di anticorpi monoclonali potrebbe non necessariamente riflettere la reattività del siero totale, i dati sono in linea con la nostra precedente dimostrazione che solo una frazione di anticorpi diretti contro l'epitopo selezionato è effettivamente neutralizzante¹⁰⁹. L'osservazione che gli anticorpi diretti contro l'epitopo 20-38 possono essere sia non-neutralizzanti che neutralizzanti evidenzia la questione circa i determinanti di queste differenti risposte immunitarie. Il fallimento nella neutralizzazione può essere spiegato dall'inabilità di questi anticorpi di legare il peptide target quando questo è esposto nel contesto delle particelle virali. Alternativamente, gli anticorpi non neutralizzanti potrebbero non essere in grado di interferire con processi chiave dell'infezione come l'entrata dei virioni o il trasporto nel citoplasma della cellule infettata, nonostante il legame all'epitopo. Il meccanismo di neutralizzazione diretto contro L2 non è ancora completamente stato chiarito. Per il monoclonale RG-1 è stato proposto che l'esposizione dell'epitopo aa 17-36 in HPV16 avviene solo dopo il legame dei virioni alla superficie cellulare e il taglio di L2 ad opera della proteasi furina⁵⁰. In presenza di RG-1 i virioni sono rilasciati dalle cellule e riattaccati alla matrice extracellulare perché l'anticorpo previene l'interazione con un recettore secondario⁵⁰. L'esperimento di mappatura dell'epitopo 20-38, condotto verificando il legame dei mAb isolati ha permesso di definire che le due popolazioni anticorpali, quella neutralizzante (K4, K18) e quella non neutralizzante (K2, K6, K7, K8, K9, K11, K12, K14, K15), legavano differenti regioni. Infatti, mentre gli anticorpi dotati di attività neutralizzante presentavano un'elevata affinità per la regione aminotermine dell'epitopo (aa 20-31), gli anticorpi non neutralizzanti riconoscevano la regione più a valle, delimitata dagli aa 27 e 35. Questo dato suggerisce che la regione C-terminale dell'epitopo 20-38 potrebbe rimanere inaccessibile persino dopo il taglio furinico. Da notare, tuttavia, che una sequenza immediatamente più a valle della regione riconosciuta da questi mAb non neutralizzanti è stata mostrata interagire con la syntaxina 18, sebbene ad uno stadio successivo del ciclo infettivo¹²³. L'obiettivo era dunque quello di indirizzare la risposta di tipo B in modo da produrre principalmente anticorpi dotati di attività cross-neutralizzante, con un pattern di reattività simile a quello dei monoclonali K4L2₂₀₋₃₈ e K18L2₂₀₋₃₈. Ma cosa definisce un epitopo cross-neutralizzante? Come suggerito da un più ampio studio, svolto in collaborazione con il 'German Cancer Research Center' di Heidelberg, i più importanti requisiti sono un'alta conservazione di sequenza, un'elevata accessibilità e una prossimità spaziale a regioni funzionalmente critiche di L2, a cui il legame degli anticorpi ostacola l'interazione con i componenti cellulari implicati nell'internalizzazione dei virus¹¹⁰. La regione aa 20-31, legata con elevata affinità da entrambi i mAb cross-neutralizzanti, sembrava dunque rispondere a tutti i criteri sovraccitati, dato che essa è la seconda sequenza più conservata

della regione N-terminale di L2, ed è localizzata tra il sito di taglio furinico e il sito di legame della syntaxina 18 e quindi probabilmente è sovrapposta al putativo sito di legame del recettore. Tuttavia, la vaccinazione con antigeni 'miniaturizzati', costituiti dalla fusione di multiple copie dell'epitopo ridotto 20-31 con la Tiodrossina, ha mostrato che la capacità (cross-) neutralizzante degli anticorpi generati era notevolmente più bassa di quella degli anticorpi indotti dalla somministrazione con l'antigene candidato Trx-L2(20-38). E' quindi ipotizzabile che, nonostante gli aa 32-38 non siano riconosciuti dai due anticorpi monoclonali cross-neutralizzanti e che quindi la porzione 20-31 si sia dimostrata la regione effettivamente immunodominante dell'intero epitopo, la porzione aminoacidica eliminata nell'epitopo 'miniaturizzato' sia necessaria per il mantenimento della conformazione dell'epitopo. E' infatti nota l'importanza della conformazione assunta da un epitopo nella stimolazione di una risposta anticorpale neutralizzante¹²¹.

Un'altra importante questione è cosa distingue gli anticorpi in grado di neutralizzare virioni HPV16 da quelli in grado di neutralizzare virioni eterologhi. La più semplice possibilità potrebbe essere che gli anticorpi tipo-specifici falliscono nella neutralizzazione di differenti tipi di HPV a causa della loro inabilità di reagire con varianti della stessa sequenza target di L2. E' ugualmente possibile, tuttavia, che non la proteina L2 ma piuttosto il *constraining* strutturale imposto dalla proteina capsidica maggiore L1 limiti l'accesso di certi tipi di anticorpi al loro epitopo target. Nel caso degli pseudovirioni HPV31, che parzialmente (o totalmente) sfuggono la neutralizzazione da parte dei due mAb cross-neutralizzanti K4L2₂₀₋₃₈ e K18L2₂₀₋₃₈, i dati ottenuti indicano che questo fenomeno è dovuto a precise differenze tra la sequenza aminoacidica 20-31 di HPV16 e il sierotipo in esame. In particolare, gli amminocidi in posizione 24 e 30 dell'epitopo 20-31 sono risultati altamente divergenti tra i sierotipi ad alto rischio esaminati. Sulla base di questi dati di allineamento si è dunque ipotizzato che la vaccinazione con epitopi di differenti sierotipi, presentanti una differente combinazione di amminocidi nelle posizioni identificate come le meno conservate, possa attivare una risposta anticorpale con aumentato potere cross-neutralizzante. Inoltre, sulla base della nozione che la conformazione dell'epitopo è fondamentale per la generazione della risposta immunitaria, sono stati progettati polipeptidi potenzialmente multivalenti, in cui gli epitopi dei differenti sierotipi sono stati organizzati in modi diversi all'interno del sito attivo della proteina carrier. I saggi che verranno condotti sul siero dei topi vaccinati forniranno importanti indicazioni sul potenziale cross-neutralizzante degli antigeni progettati e sull'importanza della presentazione degli epitopi sulla molecola antigenica.

L'ultima fase di ottimizzazione ha invece avuto come oggetto di studio lo stato di ossido-riduzione dell'antigene candidato. Nella fase di caratterizzazione dei mAb era stato dimostrato che i residui cisteinici localizzati nelle posizioni 22 e 28 dell'epitopo 20-31 erano fondamentali per il legame degli anticorpi cross-neutralizzanti K4L2₂₀₋₃₈ e K18L2₂₀₋₃₈. La successiva dimostrazione che nell'antigene Trx-L2(20-38)₃, in grado di indurre la generazione di una potente risposta cross-neutralizzante, i residui di cisteine erano presenti nella forma ossidata e che i mAb K4L2₂₀₋₃₈ e K18L2₂₀₋₃₈ riconoscevano preferenzialmente la versione ossidata dell'antigene rispetto a quella

artificialmente ridotta, è in linea con il dato presentato nel 2009 da Campos e Ozburn¹²². Lo stato di ossidazione di queste cisteine, presenti nella forma ossidata negli pseudovirioni naturali, è stata dimostrata essere fondamentale per il processo infettivo. Si è infatti dimostrato che virioni mutati in uno dei due residui, nonostante mostrassero una normale capacità di legame alla cellula e un regolare processo di internalizzazione, non erano in grado di progredire verso il compartimento lisosomiale. I dati presentati dimostravano che l'epitopo RG-1, parzialmente sovrapposto al nostro epitopo candidato, è mantenuto in uno stato ossidato e che l'esposizione di questa regione potrebbe dipendere non soltanto dal taglio furinico ma anche dalla riduzione del ponte disolfuro tra i residui C22 e C28. L'elevata conservazione di questa regione e delle cisteine tra i diversi sierotipi potrebbe essere il risultato di una pressione selettiva, sia per mantenere la capacità di interazione necessaria per l'evasione dall'endosoma che per nascondere questa regione all'immunosorveglianza nella forma di una struttura organizzata attorno ad un ponte disolfuro. La vaccinazione con antigeni presentanti le due cisteine nella forma ossidata, e quindi riproducenti la struttura del virione infettivo, sembra dunque essere fondamentale per l'induzione di una risposta anticorpale neutralizzante sia virioni omologhi che eterologhi. Data la presenza di ponti disolfuro naturalmente presenti in condizioni fisiologiche nella proteina di fusione prodotta, non è quindi necessario nessun trattamento dell'antigene prima della sua somministrazione.

4
3.**VALUTAZIONE DI SCAFFOLD ALTERNATIVI**

I risultati presentati nella prima parte del lavoro dimostrano che l'utilizzo della Tioredossina di *Escherichia coli* come proteina carrier per aumentare l'immunogenicità dei peptidi di L2 rappresenta un'efficiente strategia. Infatti, nonostante essa non contribuisca alla stimolazione anticorpale, il *constrain* strutturale imposto dalla fusione con il suo display site si è dimostrato cruciale per la presentazione e l'immunogenicità dei diversi peptidi. Oltre al vantaggio immunologico, la Tioredossina si è dimostrata un carrier efficace nel prevenire la formazione di corpi di inclusione durante l'espressione in *Escherichia coli*. L'introduzione di multiple copie dei peptidi nel loop del sito attivo ha permesso che questi assumessero la giusta conformazione strutturale e quindi ha reso possibile la loro successiva purificazione dalla frazione citoplasmatica dei batteri. L'unica eccezione si era osservata nella procedura di espressione della proteina di fusione recante l'intera regione N-terminale di L2. In questo caso, infatti, nonostante siano state saggiate differenti condizioni di induzione (per tempi e a temperature differenti), non era stato possibile recuperare il polipeptide in forma solubile. L'inserzione di un peptide di elevate dimensioni sembra dunque eccedere la sua capacità di *constraining* e quindi la proteina di fusione risultante, quando espressa ad alti livelli in batterio, non riesce ad acquisire la giusta conformazione e si aggrega nei corpi di inclusione, rendendo lunga e difficoltosa la procedura di purificazione. Una valida alternativa alla Tioredossina di *Escherichia coli* potrebbe essere rappresentata dalla medesima proteina di un organismo termofilo: è infatti noto che le proteine di organismi colonizzatori di ambienti meno ospitali sono dotate di una maggiore stabilità conformazionale e quindi si è supposto che queste potessero conferire un maggiore *constrain* a polipeptidi di elevate dimensioni ad essa fusi, mantenendoli quindi in forma solubile.

La Tioredossina di *Methanosaeta thermophila*

La scelta di *Methanosaeta thermophila* come organismo di cui saggiare le proprietà di scaffold molecolare della Tioredossina termofila è stata prevalentemente dettata dall'elevata omologia di sequenza del suo 'display site' con quello della stessa proteina di *Escherichia coli* (Figura42). Infatti, anche nella sequenza nucleotidica codificante per la proteina di questo organismo è presente un sito naturale di restrizione *CpoI* (5'...CG/GT(A)CCG...3'), che si è dimostrato un ottimo punto di inserzione di sequenze codicanti peptidi che devono essere esposti in modo strutturalmente corretto al solvente.

E.coli Trx	3	DKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEW CGPC KMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNID	62
		D+ + +TD S D + + +VD WAEWCGPC+ IAP++DE+A E +G++ KLN+D	
M.thermophila Trx	33	DRPVLVTDDSSIDAGI-RQYPVFVDCWAEW CGPC RAIAPVIDEMARELKGRVVFGLNVD	91
E.coli Trx	63	QNPGTAPKYGIRGIPTLLLFKNGEVAATKVGALSK----GQLKEFLD	105
		QNP T+ KYGI IPTLL+F+NG + VGA K +++++LD	
M.thermophila Trx	92	QNPLTSRKYGITAIPTLLVFRNGRLVDRLVGAYPKQILMSRVRKYLD	138

Figura42 | **Allineamento della sequenza aminoacidica della Trx di *E. coli* e di *M. thermophila*.** (BLASTp, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Il sito attivo 'CGPC' conservato tra i due organismi è evidenziato.

Progettazione e preparazione dei costrutti genici

La sequenza codificante per la Tioredossina di *Methanosaeta thermophila* (Acc. No. YP_843141.1) è stata ottenuta dalla banca dati 'GenBank' (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) utilizzando come *query* la sequenza aminoacidica della Tioredossina di *Escherichia coli*. La sequenza nucleotidica corrispondente è stata adattata al *codon usage* di *E. coli*, in modo da garantirne alti livelli di espressione in questo organismo. Inoltre, ad entrambe le estremità sono stati inseriti i siti di restrizione riconosciuti dall'enzima *NdeI*, utilizzati per il sub-clonaggio nel vettore di espressione pET28. Il gene progettato, generato mediante sintesi chimica (Mr. Gene GmbH), è stato clonato nel vettore precedentemente digerito con lo stesso enzima di restrizione e defosforilato. Il risultante plasmide è stato trasformato nel ceppo di espressione di *Escherichia coli* BL21 Codon Plus (DE3). La prova di induzione a cui sono stati sottoposti alcuni trasformanti ha permesso di verificare il livello di espressione della proteina met-Trx, che è risultata espressa a livelli paragonabili a quelli della Trx di *Escherichia coli* (dato non mostrato).

La successiva verifica delle sue proprietà di scaffold molecolare è stata condotta valutando la sua capacità di mantenere in soluzione il polipeptide L2(1-120), quando espresso in batterio. Il costrutto genico codificante per la proteina di fusione met-Trx-L2(1-120) è stato ottenuto ligando il frammento genico L2(1-120), ottenuto mediante digestione del corrispondente plasmide costruito nella prima parte del lavoro, nel sito *CpoI* del vettore pET-met-Trx.

Valutazione della stabilità conformazionale

Verificata la correttezza della sequenza mediante sequenziamento, il clone trasformante selezionato è stato sottoposto alla prova di espressione e di solubilità (vedi 'Materiali e Metodi'). La prova iniziale è stata condotta incubando i batteri, il cui terreno di crescita è stato addizionato con IPTG, per 12 ore a 30°C. Dopo la lisi, la solubilità della proteina di fusione è stata verificata analizzando un'aliquota della frazione solubile e sedimentabile mediante SDS-PAGE. Come si può osservare in Figura43, la proteina risultava espressa a buoni livelli ma in seguito alla lisi era presente esclusivamente nella frazione sedimentabile (*lane* 3). La presenza di una banda nella

corsia 4 è infatti riconducibile ad una proteina costitutiva del batterio, di uguale peso molecolare (circa 35 kDa), presente anche nel campione non indotto (*lane 1*).

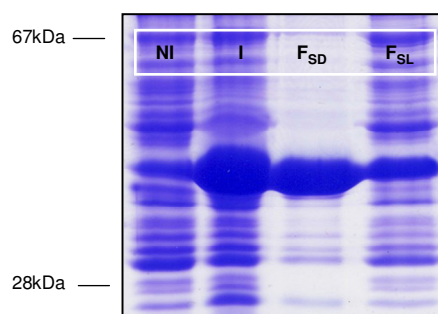


Figura43 | **Espressione e solubilità della proteina met-Trx-L2(1-120).** [La posizione dei marcatori di peso molecolare (kDa) è indicata a sinistra; le sigle indicano: (NI) campione non indotto, (I) campione indotto, (F_{SD}) frazione sedimentabile, (F_{SL}) frazione solubile.]

La prova condotta rallentando il tempo di induzione e diminuendo la temperatura (96 ore a 4°C), condizioni utilizzate per l'espressione di polipeptidi Trx-L2 recanti multiple copie di inserti (TabellaS1), non ha portato ad un aumento della solubilità di met-Trx-L2(1-120). Anche in questo caso, infatti, la proteina era presente esclusivamente nella frazione sedimentabile.

La Tiorredossina di *Methanosaeta thermophila* non sembra dunque possedere una capacità di *constraining* migliore di quella di *Escherichia coli*. Il fatto che anch'essa non riesca a mantenere in soluzione il polipeptide rappresentante l'intera regione N-terminale di L2 potrebbe essere dovuto alla sua 'limitata' stabilità. Proprio per il fatto di essere la proteina di un organismo termofilo, le cui condizioni di crescita si discostano relativamente poco da quelle del mesofilo *coli*, questa non sembra presentare una maggiore rigidità conformazionale.

Sulla base di queste osservazioni, si è deciso di valutare le proprietà di *scaffold* della Tiorredossina di un organismo estremofilo, le cui proteine presentano caratteristiche molecolari uniche tra le quali una nota integrità strutturale, frutto di una risposta adattativa a condizioni di crescita estreme.

La Tiorredossina di *Pyrococcus furiosus*

Tra gli organismi più studiati per questo tipo di applicazioni rientra *Pyrococcus furiosus*, un microorganismo ipertermofilo appartenente al dominio degli Archaea, in grado di crescere e di riprodursi a temperature comprese tra i 70°C e i 100°C e ad un pH tra 5 e 9. Nota l'estrema stabilità termica e conformazionale delle proteine di questo organismo e la loro resistenza alla denaturazione, ai solventi organici e alla digestione proteolitica si è deciso di verificare la capacità di *constraining* della sua Tiorredossina utilizzandola come *scaffold* alternativo a quella di *coli* per l'espressione della proteina di fusione Trx-L2(1-120).

Progettazione e preparazione dei costrutti genici

L'analisi della sequenza genica codificante, ottenuta dalla banca dati 'GenBank' (Acc. No. NP_578470.1), ha rivelato la presenza di una divergenza nel sito attivo di questa proteina rispetto a quella di *E. coli* e di *M. thermophila*. In questo caso il sito era costituito dalla sequenza aminoacidica 'Cys-Pro-Pro-Cys' rispetto alla sequenza 'Cys-Gly-Pro-Cys' presente nella Tioredossina dell'organismo mesofilo e termofilo (Figura44). La progettazione del gene ha quindi previsto la ricostruzione del sito *CpoI* (Gly-Pro), mediante sostituzione della Prolina in posizione 26 con un residuo di Glicina. Anche in questo caso, la sequenza nucleotidica corrispondente è stata adattata al *codon usage* di *E. coli*, in modo da garantirne alti livelli di espressione in questo organismo, e modificata mediante inserzione ad entrambe le estremità dei siti di restrizione *NdeI*.

E.coli Trx	12	SFDTDVLKADGAILVDFWAEW CGPC KMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNI DQNP GTAPKY	71
		+D ++ G +++ F C PC+++ + E++ EY + + +N + K+	
P. furiosus Trx	4	EYDGEIDFTKGRVVLWFSIPG CP CRLVERFMTELS-EYFEDIQIVHINAGKWKNIVDKF	62
E.coli Trx	72	GIRGIPTLLLFKNGEVAATKVGALS KGQL	100
		I +PTL+ K+G + SK ++	
P. furiosus Trx	63	NILNVPTLVYLKDGREVG RQNLI RSKEEI	91

Figura44 | **Allineamento della sequenza aminoacidica della Trx di *E. coli* e di *P. furiosus*.** (BLASTp, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Il sito attivo 'CGPC' è evidenziato in blu; la Prolina non conservata in posizione 26 della Trx di *P. furiosus* è evidenziata in viola.

Il gene progettato, generato mediante sintesi chimica (Mr. Gene GmbH), è stato clonato nel vettore precedentemente digerito con lo stesso enzima di restrizione e defosforilato. Le fasi sperimentali successive sono state le stesse descritte in precedenza. Brevemente, il prodotto di ligazione è stato trasformato nel ceppo di espressione di *E. coli* e alcuni cloni trasformanti sono stati sottoposti alla prova di espressione su piccola scala. Come osservato per la met-Trx, la Tioredossina di *Pyrococcus furiosus* è risultata espressa ad alti livelli paragonabili a quelli della coli-Trx.

Anche in questo caso, la verifica della stabilità conformazionale di questo polipeptide è stata condotta inserendo l'intero frammento aa 1-120 nel suo sito attivo e valutando la sua solubilità nella frazione citoplasmatica di *coli*. Il frammento genico codificante per la regione N-terminale terminale di L2, recante ad entrambe le estremità i siti di restrizione *CpoI*, è stato clonato nel vettore di espressione pET-pyr-Trx digerito con lo stesso enzima. Il plasmide è stato dunque trasformato in batterio.

Valutazione della stabilità conformazionale

La verifica della capacità di *constraining* della Tioredossina di *Pyrococcus furiosus* è stata valutata sottoponendo un clone trasformante pET-pyr-Trx-L2(1-120) alla prova di induzione e di solubilità su piccola scala. Come si può osservare nella Figura45, incubando i batteri con IPTG per 12 ore a

30°C è stato possibile ottenere un buon livello di espressione della proteina (*lane 2*). La prova di solubilità ha inoltre mostrato che il 50% del polipeptide di fusione era presente nella frazione solubile del lisato (*lane 4*).

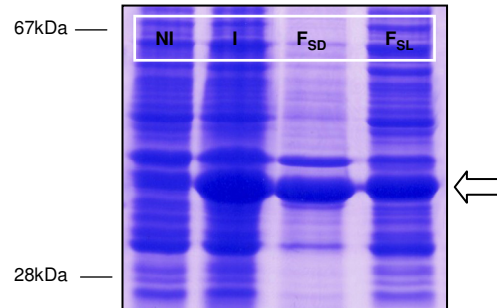


Figura45 | **Espressione e solubilità della proteina pyr-Trx-L2(1-120).** [La posizione dei marcatori di peso molecolare (kDa) è indicata a sinistra; le sigle indicano: (NI) campione non indotto, (I) campione indotto, (F_{SD}) frazione sedimentabile, (F_{SL}) frazione solubile.]

Quest'ultimo esperimento sembra dunque confermare la maggiore stabilità conformazionale della Tioredossina dell'organismo estremofilo rispetto a quella del mesofilo e del termofilo. Come convalida di questo dato, la proteina pyr-Trx-L2(1-120) è stata espressa su larga scala per verificare la resa di tale preparazione. Al termine dell'induzione, condotta nelle stesse condizioni della prova di espressione, i batteri sono stati lisati mediante sonicazione e la proteina è stata purificata dalla frazione solubile mediante cromatografia di affinità, sfruttando la coda esaistidinica presente sia all'N- che al C-terminale. La quantificazione mediante lettura della densità ottica allo spettrofotometro e la successiva verifica mediante SDS-PAGE hanno dimostrato il recupero di circa 10 mg di polipeptide da un litro di coltura batterica iniziale. Considerando la completa insolubilità del polipeptide 1-120 quando espresso come proteina di fusione con la Trx di *E. coli* e di *M. thermophila*, questo dato sottolinea l'elevata stabilità strutturale della Tioredossina di *Pyrococcus furiosus*, che si dimostra dunque un ottimo candidato per la formulazione di un vaccino ricombinante facile da produrre e a basso costo.

Discussione

Come già discusso nella prima parte del lavoro, l'utilizzo della Tioredossina di *Escherichia coli* come proteina carrier si è dimostrata un'efficiente strategia per conferire una forte immunogenicità ai peptidi L2 che diversamente presentano un basso potere immunogeno. L'inserzione degli antigeni peptidici nel loop del suo sito attivo ha infatti favorito la presentazione delle molecole, che sono risultate correttamente esposte al solvente. Studi termodinamici hanno infatti dimostrato la stabilità strutturale di questa proteina, in cui più del 90% della struttura primaria è implicata nella

formazione di robusti elementi della struttura secondaria. Questo dato fornisce una spiegazione dell'elevata stabilità termica della Trx e suggerisce che la molecola presenta la giusta stabilità conformazionale per poter essere utilizzata come un buon partner di fusione. Numerosi lavori hanno infatti dimostrato che questa proteina, esercitando la sua funzione di *chaperone* molecolare e quindi promuovendo il corretto folding di polipeptidi ad essa associati, permette l'espressione di proteine ricombinanti in *E. coli* evitando la formazione di corpi di inclusione. Tuttavia, il polipeptide di fusione Trx-L2(1-120) prodotto nella prima parte della ricerca era risultato completamente insolubile nonostante l'espressione fosse stata condotta a basse temperature e per un tempo prolungato, per favorire l'assunzione del corretto *folding*. In questo caso, la proteina era stata solubilizzata dai corpi di inclusione, in condizioni denaturanti. La perdita di solubilità che porta alla formazione di corpi di inclusione in *E. coli* è un complesso fenomeno a cui contribuiscono diversi fattori: la semplice insolubilità come risultato di un'espressione ad alti livelli, la solubilità degli intermedi di *folding*, la perdita di appropriati *chaperoni* batterici e la mancanza di meccanismi di glicosilazione nel citoplasma batterico. Un altro importante fattore che contribuisce alla formazione di questi aggregati è l'incapacità di formare ponti disolfuro, essenziali nell'ambiente riducente del citoplasma di *coli*, che porta ad una instabilità conformazionale. La mancata solubilità del polipeptide Trx-L2(1-120) potrebbe dunque essere dovuta alla perdita del legame disolfuro tra i due residui cisteinici (C32, C35) localizzati alle estremità del sito attivo, in seguito all'inserzione del polipeptide 1-120. Come rivelato da studi di termostabilità, la temperatura di melting (T_m) della Trx nella forma ridotta è significativamente più bassa (161 μ M Trx a pH 7.0, T_m =75.84°C) rispetto a quella nella forma ossidata (189 μ M Trx a pH 7.0, T_m =85.13°C)¹²⁴. Un recente studio ha mostrato che all'aumentare della dimensione dei peptidi inseriti all'interno del sito attivo della Trx, aumenta la destabilizzazione dello *scaffold* che diventa più flessibile, come indicato dalla diminuzione della T_m ¹²⁵. In particolare, in uno dei casi indicati l'inserzione di un peptide di soli 20 aminoacidi induceva una riduzione della T_m di circa 20°C.

Come dimostrato dai dati presentati in questo capitolo, l'utilizzo della Tiorredossina di un organismo estremofilo si è dimostrata un'efficiente strategia per conferire una maggiore stabilità conformazionale al polipeptide 1-120, risultato completamente insolubile quando espresso come proteina di fusione con la Trx di *E. coli* o di *M. thermophila*. La nota rigidità strutturale, dovuta principalmente alla presenza di forti interazioni idrofobiche intramolecolari, delle proteine di *Pyrococcus furiosus* ha imposto al polipeptide 1-120 il giusto *constrain*, favorendo così la sua solubilizzazione nel citoplasma del batterio. La prova di solubilità condotta su un clone esprimente la versione dimerica del polipeptide in esame ha tuttavia mostrato il limite di questo *scaffold*. Infatti, la proteina pyr-Trx-L2(1-120)₂ è risultata esclusivamente nella frazione sedimentabile del lisato batterico, sebbene l'induzione fosse stata condotta nelle condizioni ottimali (96 ore a 4°C). Oltre alla dimostrata stabilità conformazionale di questa proteina, esperimenti preliminari sembrano mostrare la sua elevata stabilità termica. L'incubazione a differenti temperature e per diversi tempi

non ha infatti determinato la denaturazione del campione proteico, che è rimasto in soluzione mantenendo la sua conformazione nativa (dato non mostrato).

Le dimostrate caratteristiche di stabilità termica e strutturale della Tiorredossina di *P. furiosus* rendono dunque questa proteina un carrier ottimale per lo sviluppo di un vaccino di seconda generazione che non richiede costose e laboriose procedure di preparazione e che potrebbe essere distribuito senza particolari condizioni di refrigerazione.

4.

**VACCINI TDMI ALTERNATIVI
POTENZIALMENTE AUTOADIUVANTI**

E' noto che nella progettazione di un vaccino oltre all'antigene è necessario considerare la componente adiuvante. Con questo termine deve essere inteso sia il metodo di somministrazione, che promuove l'interazione dell'antigene con le cellule chiave del sistema immunitario innato, che gli immunopotenziatori, che attivano direttamente le cellule della risposta innata fornendo il contesto pro-infiammatorio per il riconoscimento dell'antigene. L'utilizzo di proteine ricombinanti purificate, che nonostante siano sicure, sono poco immunogeniche, richiede l'aggiunta di potenti adiuvanti che permettano di ridurre la quantità di antigene necessario, inducano una rapida risposta protettiva e ne prolunghino la durata attivando la risposta di tipo B e T. Tuttavia, la maggiorparte degli immunopotenziatori presenti in commercio presentano un basso profilo di tollerabilità e una limitata biodegradabilità, che determina la persistenza di residui per lungo tempo nel sito di iniezione. Inoltre, l'elevato costo dei complessi processi di preparazione influenzano fortemente il costo finale del vaccino.

La via di somministrazione rappresenta un altro importante fattore che deve essere considerato nella formulazione di preparati profilattici, specialmente nell'ottica di una futura distribuzione nei paesi meno sviluppati. Nonostante l'immunizzazione mediante iniezione presenti il vantaggio di favorire l'accesso immediato degli antigeni ai vasi linfatici e quindi attivi in breve tempo la cascata di eventi che risulterà nell'immunità protettiva, la necessità di personale paramedico e il rischio di trasmissione di altri agenti infettivi a causa dell'uso ripetuto di siringhe senza appropriati interventi di sterilizzazione rappresentano d'altra parte i principali limiti di questo approccio. E' stata recentemente sottolineata l'importanza della somministrazione per via mucosale di preparati per la generazione di un'immunità protettiva contro patogeni il cui meccanismo di infezione richiede il contatto diretto con le mucose dell'ospite, come il virus del papilloma. Inoltre, data la possibilità di auto-somministrazione, questa metodica risulta particolarmente vantaggiosa nei paesi in via di sviluppo, dove l'accesso a cure mediche professionali è spesso problematico.

In questo capitolo finale verranno descritte differenti strategie per lo sviluppo di molecole, basate sull'antigene trimerico candidato Trx-L2(20-38), dotate di potenzialità auto-adiuvante, che non richiedono l'aggiunta di immunopotenziatori esterni all'antigene stesso, e somministrabili per via orale o intranasale e quindi in grado di elicitarne una risposta anticorpale a livello delle mucose.

La flagellina come immunopotenziatore naturale

Risale a soli dieci anni fa la scoperta che la Flagellina, la principale proteina strutturale dei flagelli dei batteri gram-negativi, è un potente attivatore di più tipi di cellule implicate sia nell'immunità innata che adattativa. L'interazione dei monomeri di Flagellina con il recettore TLR5 (Toll-like Receptor 5) promuove l'attivazione di numerosi processi immunitari innati, tra i quali l'induzione di citochine e chemochine proinfiammatorie dalle cellule linfoidi e non linfoidi, il reclutamento generalizzato dei linfociti T e B ai siti linfoidi secondari, l'attivazione delle cellule dendritiche (DC) e l'attivazione diretta dei linfociti T. La scoperta del potenziale adiuvante di questa proteina ha portato allo sviluppo di un'ampia varietà di proteine di fusione Flagellina-antigene, che si sono dimostrate essere efficaci vaccini in animali modello. Questa proteina, infatti, oltre alla sua intrinseca potenzialità 'immunostimolante', presenta numerosi altri vantaggi che la rendono un eccellente candidato come adiuvante. Essa è efficace a dosi molto basse (e.g., 1-10 µg in primati non umani), non promuove una risposta IgE, la sequenza dell'antigene può essere inserita all'N-, al C-terminale o nella regione ipervariabile della proteina, senza influenzare la sua interazione con il recettore TLR5, non ha mostrato tossicità quando somministrata sia per via intranasale che sottocutanea e può essere espressa ad alti livelli e a basso costo come proteina ricombinante in batterio¹²⁶. Durante l'ultima decade, un numero in continuo aumento di studi ha descritto le proprietà adiuvanti della Flagellina nel contesto di un'ampia varietà di vaccini. In alcuni casi, la Flagellina e l'antigene sono stati utilizzati separatamente, mentre in altri sono stati usati come proteine di fusione. Tuttavia, la dimostrazione che la fusione dei componenti in un'unica molecola attiva una risposta circa dieci volte maggiore rispetto a quella elicitata dai due componenti separati, probabilmente dovuta ad una più efficiente traslocazione dell'antigene e dell'adiuvante sullo stesso TLR5, porta a preferire la prima formulazione. La flessibilità di questo immunopotenziatore naturale si è dimostrata anche nella possibilità di somministrare le proteine di fusione Flagellina-antigene mediante differenti metodiche (sottocutanea o intranasale). Studi recenti hanno mostrato che la somministrazione mucosale della Flagellina è associata ad una forte risposta immunitaria adattativa, principalmente di tipo Th2, che porta alla generazione di IgA mucosali e sistemiche. Le proprietà adiuvanti mucosali correlano con la capacità della Flagellina di attivare i recettori TLR5 posti sulla superficie di cellule dendritiche, neutrofili o cellule epiteliali. Ad esempio, la somministrazione intranasale di derivati della flagellina fusi ad un epitopo del virus dell'influenza si è dimostrata particolarmente efficace nell'indurre la generazione di anticorpi, in grado di neutralizzare l'agente virale in vitro, a livello delle mucose¹²⁸.

Data la potenzialità adiuvante della Flagellina e la sua capacità di indurre una protezione immunitaria a livello delle mucose quando somministrata per via intranasale, questa è stata utilizzata come proteina di fusione all'antigene trimerico candidato Trx-L2(20-38), per la formulazione di un vaccino 'auto-adiuvante' contro il virus del papilloma umano.

La fusione dell'antigene alla Flagellina di *Escherichia coli*

La prima progettazione di un polipeptide costituito dalla fusione della Tiorredossina di *Escherichia coli* con la Flagellina dello stesso organismo, è stata realizzata nel 1995 da Lu e collaboratori¹²⁷. Il sistema originale preveda l'inserzione di una libreria di dodecapeptidi random nel loop del sito attivo della Tiorredossina, la quale era a sua volta inserita nella regione dispensabile del gene della Flagellina (FliC). Quando indotta, la proteina di fusione (Fli-Trx) era esportata e assemblata nei flagelli sulla superficie cellulare batterica, permettendo l'esposizione dei peptidi associati. La libreria è stata usata per studiare diversi tipi di interazione proteina-proteina implicate nel legame recettore-ligando, nella specificità enzima-substrato e nel riconoscimento antigene-anticorpo. Nonostante il costrutto Fli-Trx, oggi disponibile nel vettore commerciale pFLITRXTM (Invitrogen), non sia stato progettato per scopi vaccinali, è stato utilizzato nel presente lavoro come base per la creazione di antigeni di fusione con potenzialità autoadiuvante.

Modificazione del costrutto commerciale pFLITRXTM

La prima fase della preparazione dei costrutti genici codificanti per i polipeptidi di fusione Fli-Trx è consistita nella rimozione della sequenza codificante per il peptide inserito nel loop del sito attivo della Tiorredossina. Il plasmide pFLITRXTM, gentilmente fornito dal Prof. A. Puccetti (Università di Genova), è stato utilizzato come template per una reazione di amplificazione (PCR), progettata in modo da rimuovere la sequenza codificante per il peptide, clonata nel sito naturale *CpoI* della Trx, ma mantenendo inalterato il sito di restrizione. I primer utilizzati, denominati 1 e 2 (TabellaS3), sono stati disegnati in modo che il primo si appaiasse subito a valle della sequenza da rimuovere, introducendo un sito *CpoI*, mentre il secondo si appaiasse all'interno della sequenza della Trx, introducendo un sito *KpnI*. Il risultante amplicone è stato digerito con gli enzimi *CpoI* e *KpnI* e clonato nello stesso vettore pFLITRXTM, precedentemente digerito con gli stessi enzimi e defosforilato. La successiva reazione di PCR condotta sul vettore risultante, utilizzando i primer 3 e 4 (TabellaS3), ha permesso di amplificare l'intera regione Fli-Trx, inserendo ad entrambe le estremità i siti di restrizione *NcoI*. Il risultante amplicone è stato successivamente ligado nello stesso sito di restrizione, presente nel vettore di espressione pET28.

Il costrutto codificante per il polipeptide di fusione Fli-Trx, recante l'epitopo trimerico candidato L2(20-38) di HPV16, è stato ottenuto mediante clonaggio diretto del frammento di interesse nel vettore pET28Fli-Trx. Brevemente, la sequenza genica codificante per l'epitopo è stata ottenuta mediante digestione *CpoI* del vettore pET28Trx-L2(20-38)₃, preparato nella prima parte del lavoro. Il corrispondente frammento è stato clonato nel vettore pET28Fli-Trx, digerito con lo stesso enzima di restrizione e defosforilato. Il prodotto di ligazione è stato infine trasformato mediante elettroporazione nel ceppo di espressione di *Escherichia coli* BL21 Codon Plus (DE3).

Espressione dei polipeptidi di fusione

Verificata la correttezza delle sequenze geniche, la fase successiva ha previsto l'analisi dell'espressione e della solubilità delle proteine di fusione Fli-Trx, che verrà somministrata come controllo negativo parallelamente all'antigene candidato, e Fli-Trx-L2(20-38)₃. Come per i polipeptidi espressi nelle fasi precedenti della ricerca, l'espressione delle proteine è stata indotta in diverse condizioni di temperatura e per tempi differenti, al fine di identificare la condizione migliore per la purificazione delle proteine in forma solubile. Tuttavia, l'analisi della solubilità condotta sulla frazione solubile e sedimentabile del lisato batterico, condotta mediante SDS-PAGE, ha mostrato la totale insolubilità di entrambe le proteine di fusione (Figura46).

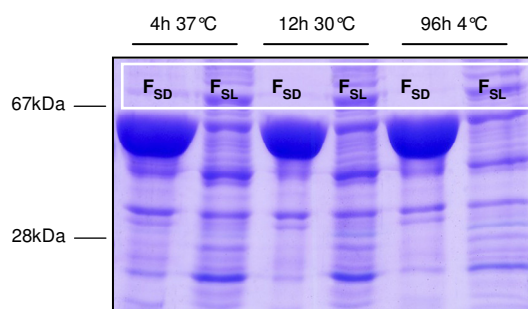


Figura46 | **Analisi della solubilità della proteina Fli-Trx-L2(20-38)₃**. [La posizione dei marcatori di peso molecolare (kDa) è indicata a sinistra; le condizioni di espressione sono descritte in alto; le sigle indicano: (NI) campione non indotto, (I) campione indotto, (F_{SD}) frazione sedimentabile, (F_{SL}) frazione solubile.]

La dimostrazione che la sostituzione della regione ipervariabile della Flagellina con la sequenza antigenica può in alcuni casi portare alla aggregazione delle proteine di fusione¹²⁶, ci ha portato ad ipotizzare che le proteine risultate presenti esclusivamente nella frazione sedimentabile del lisato batterico non fossero veri e propri corpi di inclusione, bensì aggregati proteici formati durante l'accumulazione delle proteine nel citoplasma. Al fine di verificare questa ipotesi, è stata eseguita una prova di solubilizzazione, incubando le frazioni sedimentabili in condizioni normalmente utilizzate per la depolimerizzazione dei flagelli in monomeri (65°C per 30 minuti, 65°C per 60 minuti, 90°C per 30 minuti). Come si può osservare nella Figura47, il trattamento di riscaldamento ha permesso la solubilizzazione della quasi totalità del campione proteico. In particolare, la condizione più estrema di trattamento, che prevedeva un'incubazione a 90°C per 30 minuti, ha permesso il recupero della totalità della proteina di fusione.

Verificate le condizioni ottimali di espressione e purificazione dei polipeptidi di fusione Fli-Trx, si è proceduto alla preparazione su larga scala di ciascun antigene. Brevemente, i cloni selezionati sono stati sottoposti ad induzione con IPTG per 4 ore a 37°C e successivamente lisati mediante sonicazione. Come indicato dalle prove condotte su piccola scala, le proteine sono state purificate

dalla frazione sedimentabile del lisato batterico mediante incubazione a 90°C per 30 minuti. Grazie al fatto che il trattamento termico del campione è stato condotto in tampone fosfato (PBS) non si è resa necessaria la successiva fase di dialisi. Dopo averne verificato il grado di purezza, le proteine purificate sono state quantificate, sterilizzate mediante filtrazione e conservate a -80°C.

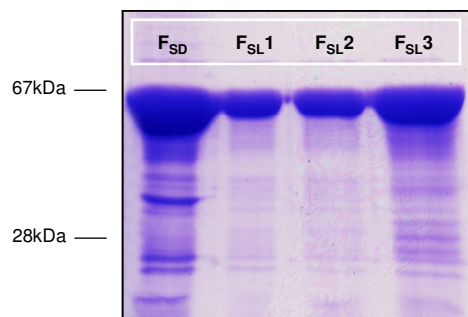


Figura47 | **Prove di trattamento al calore della frazione sedimentabile di Fli-Trx-L2(20-38)₃**. [La posizione dei marcatori di peso molecolare (kDa) è indicata a sinistra; le sigle indicano: (F_{SD}) frazione sedimentabile, (F_{SL}) frazione solubile; i numeri corrispondono ai trattamenti: (1) 65°C 30min, (2) 65°C 60min, (3) 90°C 30min.]

Nota la tendenza delle proteine di fusione Fli-Trx ad aggregare e formare precipitati dopo un'incubazione prolungata a 4°C o dopo alcuni passaggi di congelamento-scongelo, un'aliquota di entrambe le proteine è stata sottoposta a quest'ultimo trattamento, al fine di verificare la stabilità dei campioni. La successiva analisi SDS-PAGE ha tuttavia mostrato l'elevata stabilità delle proteine prodotte, che sono risultate presenti esclusivamente nel sovrantante del campione trattato centrifugato (dato non mostrato). La quantificazione mediante saggio di Bradford ha confermato l'inalterata concentrazione proteica.

La fusione dell'antigene alla Flagellina di *Salmonella typhi*

Parallelamente alla preparazione degli antigeni di fusione basati sulla Flagellina di *Escherichia coli*, sono stati progettati ed espressi gli stessi polipeptidi utilizzando la Flagellina di *Salmonella typhi* come immunostimolatore naturale. Infatti, nonostante le proteine dei due batteri gram-negativi presentino una similarità di sequenza pari all'87% (BLASTp, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), la maggiorparte delle pubblicazioni scientifiche descrive le proprietà adiuvanti della Flagellina di *Salmonella*, la cui fusione con diversi tipi di antigeni si è dimostrata un eccellente vaccino. Inoltre, la proteina di quest'ultimo organismo è attualmente in fase II di sperimentazione clinica come vaccino contro l'influenza (Vaxinnate).

Isolamento e modificazione del gene FliC

Il gene codificante per la Flagellina di *S. typhi* è stato isolato direttamente dal DNA del ceppo Ty21a, disponibile in commercio come vaccino vivo tifoideo per uso orale (Vivotif[®], Berna Biotech

Ltd). Il batterio, privo di potere patogeno per modificazione irreversibile di geni coinvolti nella biosintesi della parete cellulare¹²⁹, è stato reidratato e posto in coltura in terreno di crescita per una notte. Dalla coltura è stato estratto il DNA genomico, utilizzato successivamente come template per l'amplificazione del gene *FliC*. I primer 5 e 6 (TabellaS3) utilizzati, sono stati progettati sulla sequenza disponibile in banca dati (Acc. No. AAA27067.1, GenBank). L'amplicone ottenuto, dotato ad entrambe le estremità dei siti di restrizione *NcoI*, è stato clonato nel vettore di espressione batterico pET28, precedentemente digerito con lo stesso enzima di restrizione e defosforilato. Il prodotto di ligazione è stato infine trasformato nel ceppo di espressione BL21 Codon Plus (DE3). Verificata la correttezza della sequenza mediante sequenziamento del DNA plasmidico, un clone trasformante è stato utilizzato per esaminare l'espressione della proteina, che è risultata prodotta ad alti livelli dal batterio.

Nota la possibilità di rimuovere la regione centrale dispensabile della Flagellina, perché non coinvolta nell'interazione con il recettore TLR5, la successiva fase sperimentale ha previsto la rimozione di questa regione dal gene *FliC* e la sostituzione con la sequenza codificante per la Tioredossina di *E. coli*. Inoltre, la sequenza codificante la proteina di fusione è stata progettata in modo da inserire un linker aminoacidico (SGGGGSGGGGS) tra le due proteine, per favorire il corretto ripiegamento della Trx. Come si osserva in Figura48, la predizione di struttura condotta sulla sequenza progettata ha dimostrato il corretto *folding* della proteina di *E. coli*, che risulta in posizione apicale e quindi potenzialmente esposta al solvente esterno.

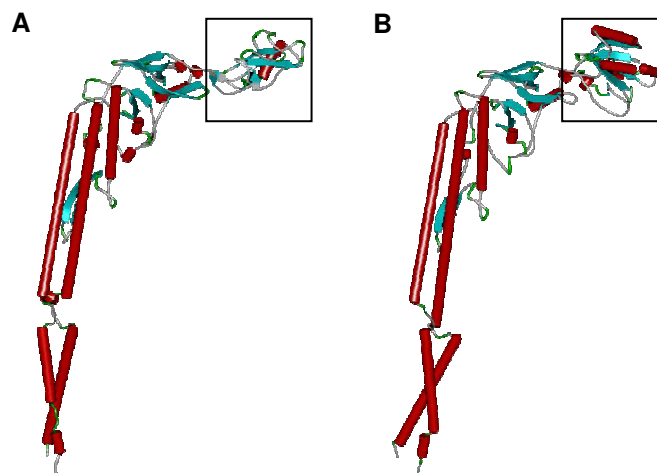


Figura48 | Confronto della struttura terziaria della Fli naturale (A) e della Fli-Trx (B).
 [Le regioni evidenziate corrispondono rispettivamente alla porzione ipervariabile della Fli e alla Trx di *E. coli*. La predizione della struttura della proteina di fusione è stata realizzata con il programma CPHmodels 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels/>).]

L'eliminazione della regione ipervariabile, compresa tra gli aminoacidi 199 (T) e 328 (T), è stata realizzata mediante tre reazioni di amplificazione successive. Una PCR è stata condotta con il primer 7 che si appaia al 5' della sequenza ed inserisce il sito *NcoI*, e il primer 10 che si appaia

internamente alla sequenza, a monte della regione da rimuovere ed introduce il sito *Bam*HI, utilizzando come template il vettore pET28-FliC. Contemporaneamente, è stata condotta una seconda PCR sullo stesso template, utilizzando il primer 9 che si appaia internamente alla FliC, a valle della regione da rimuovere, e il primer 8 che si appaia al 3' della sequenza e introduce il sito *Xho*I. I prodotti genici ottenuti da queste amplificazioni sono stati usati in concentrazioni equimolari come template per una reazione di PCR finale, condotta con i primer più esterni (7 e 8). L'amplicone ottenuto, corrispondente al gene FliC deletato della regione centrale ipervariabile, è stato digerito con gli enzimi di restrizione *Nco*I e *Xho*I, in modo da ottenere estremità adesive compatibili per il successivo clonaggio nel vettore pET28 digerito con gli stessi enzimi.

Il sito *Bam*HI, inserito in posizione centrale della sequenza codificante la FliC deleta, è stato successivamente utilizzato per il clonaggio del gene TrxA. La sequenza genica codificante è stata ottenuta mediante amplificazione del template pET28-Trx, preparato nella prima fase della ricerca, con i primer 11 e 12 che hanno introdotto i siti *Bgl*II, utilizzati per il successivo clonaggio, ad entrambe le estremità dell'amplicone e la prima parte della sequenza codificante il linker aminoacidico. La successiva PCR sull'amplicone ottenuto, utilizzando la coppia di primer 13 e 14, ha permesso l'introduzione delle sequenze complete codificanti per i linker. La sequenza genica risultante, digerita con l'enzima *Bgl*II, è stata ligata nel sito *Bam*HI del gene della Flagellina deleta. In seguito, il costrutto genico codificante per la proteina di fusione FliC(del)-Trx-L2(20-38)₃ è stato semplicemente ottenuto mediante ligazione della sequenza codificante l'epitopo, già disponibile dalla prima parte del lavoro, nel sito *Cpo*I della Tiorredossina.

Espressione dei polipeptidi di fusione

Modificato opportunamente il gene FliC, i costrutti genici codificanti per le proteine di fusione FliC(del)-Trx e FliC(del)-Trx-L2 sono stati trasformati in *coli*. La successiva prova di espressione (condotta a 37°C per 4 ore) e di solubilità a cui sono stati sottoposti alcuni trasformanti ha mostrato l'induzione ad alti livelli delle proteine e la loro quasi completa solubilità (Figura49).

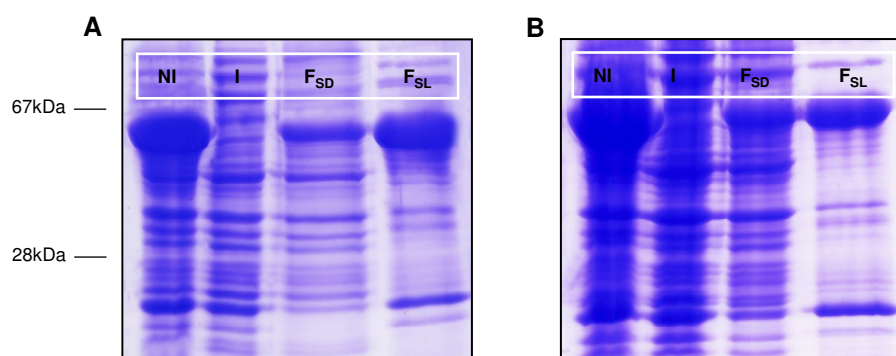


Figura49 | **Espressione e solubilità delle proteine Fli-Trx (A) e Fli-Trx-L2(20-38)₃ (B).**
[La posizione dei marcatori di peso molecolare (kDa) è indicata a sinistra; le sigle indicano: (NI) campione non indotto, (I) campione indotto, (F_{SD}) frazione sedimentabile, (F_{SL}) frazione solubile.]

Verificata la presenza di entrambe le proteine nella frazione solubile del lisato batterico, si è resa necessaria l'introduzione di una coda esaistidinica (6xHisTag) che consentisse la loro purificazione mediante cromatografia di affinità. La sequenza genica corrispondente è stata introdotta al posto della sequenza codificante il linker più a monte, riamplicando il gene *TrxA* con il primer 15, che introduce la sequenza di interesse, e il primer 14 già utilizzato per la PCR precedente. Il successivo clonaggio dell'amplicone risultante nel sito *BamHI* della *FliC* deleta ha permesso l'ottenimento di un costrutto codificante per la proteina di fusione *FliC(del)-Trx* dotata di una coda istidinica interna. Come prima, la ligazione del frammento $L2(20-38)_3$ nel sito *CpoI* della sequenza codificante per la Tioredossina ha portato alla generazione del costrutto *FliC(del)-Trx-L2(20-38)₃*. I corrispondenti batteri trasformati sono stati utilizzati per l'espressione e la purificazione delle proteine di fusione su larga scala. Scambiato il solvente mediante dialisi contro PBS pH7, le proteine sono state quantificate, sterilizzate e conservate a -80 °C.

La dimostrazione della reale potenzialità adiuvante della Flagellina di *E. coli* e di *S.typhi*, verrà condotta valutando la risposta immunitaria generata in animali da laboratorio vaccinati con gli antigeni preparati, somministrati in differenti formulazioni (con e senza adiuvante). Confrontando la risposta anticorpale generata nelle due condizioni, sarà dunque possibile avere un'indicazione diretta della possibilità di utilizzare questo immunostimolatore naturale come sostituto di adiuvanti commerciali. La verifica di tale ipotesi risulterebbe di fondamentale importanza per la formulazione di un preparato vaccinicco contro il virus del papilloma umano, che racchiude in sé sia la componente adiuvante che antigenica, e producibile a basso costo in batterio.

In questo contesto verranno valutate differenti metodiche di somministrazione, tra cui quella intranasale, per identificare l'approccio più idoneo alla stimolazione anticorpale mucosale e meno invasivo, nell'ottica di una futura distribuzione del preparato in paesi meno sviluppati, dove la presenza di personale paramedico è spesso scarsa.

Salmonella: un vaccino 'vivo'

La vasta conoscenza della patogenesi, della regolazione genica e dei meccanismi di virulenza, insieme alla lunga esperienza nell'utilizzare *Salmonella* in vaccini umani e in vari sistemi sperimentali, rendono questo batterio gram-negativo uno dei più promettenti organismi per la generazione di preparati profilattici vivi attenuati. *Salmonella enterica* è un importante patogeno di animali e uomini che causa un'ampia varietà di patologie infettive. Oltre al suo utilizzo come vaccino per la prevenzione delle patologie ad essa associate, *Salmonella* rappresenta anche un interessante organismo che può agire come carrier vivo attenuato per la presentazione di antigeni eterologhi ricombinanti. *S. typhi* e *S. enterica* serovar *typhimurium* (*S. typhimurium*) sono tra i più promettenti candidati per l'ingegnerizzazione di vaccini mucosali ricombinanti¹³⁰. Questi ceppi sono di particolare interesse perché possono essere facilmente somministrati per via intranasale e orale,

il sito naturale di entrata del patogeno, e possono attivare una risposta immunitaria sia a livello sistemico che delle mucose. L'attivazione dell'immunità innata è prevalentemente mediata dall'interazione dei flagelli del batterio con il recettore TLR5, meccanismo già discusso nella prima parte di questo capitolo. Questo legame induce una rapida cascata del segnale che porta all'attivazione di NF- κ B e della MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) che stimolano la secrezione di molecole pro-infiammatorie tra le quali diverse citochine, interleuchine (IL-6, IL-12) e interferoni. Inoltre, anche l'attivazione dei macrofagi ad opera dei lipopolisaccaridi (LPS) di *Salmonella* risulta nel rilascio di citochine infiammatorie, come IL-6 e IFN- β . La fase dell'immunità innata precoce è rapidamente seguita dall'attivazione di una complessa risposta immunitaria che sopprime la crescita dei batteri nei tessuti. Parallelamente ad un'immunità cellulo-mediata, il patogeno induce una forte risposta umorale che porta al rilascio di immunoglobuline sia a livello sistemico che mucosale. Diversi studi hanno dimostrato la possibilità di indurre una potente risposta anticorpale vaccinando animali da laboratorio con salmonelle opportunamente ingegnerizzate per l'espressione di epitopi protettivi specifici per il patogeno di interesse. Oltre alla capacità di stimolare una risposta umorale protettiva, questa tipologia di vaccino che prevede una somministrazione per via orale o intranasale, rispetto ai vaccini iniettabili, presenta il notevole vantaggio di poter essere auto-somministrato facilmente. Inoltre, la sicurezza di questa formulazione è dimostrata da oltre vent'anni di esperienza con il vaccino vivo Vivotif[®] (Berna Biotech Ltd), disponibile in commercio per la profilassi della febbre tifoide.

Sulla base di queste osservazioni, è stata progettata e sviluppata una versione alternativa dell'antigene trimerico candidato Trx-L2(20-38), come proteina eterologa espressa da un ceppo di *Salmonella* opportunamente ingegnerizzato, per la formulazione di un vaccino auto-adiuvante e somministrabile con metodiche alternative all'iniezione contro il virus del papilloma umano.

Progettazione del sistema eterologo di espressione

La fase sperimentale iniziale per lo sviluppo di un prototipo di vaccino mucosale ricombinante contro il virus del papilloma ha previsto la progettazione di un adeguato vettore di espressione, associato ad un conveniente marcatore di selezione, e all'identificazione di un ceppo di *Salmonella* sicuro ma sufficientemente immunogenico. La scelta di utilizzare il vettore pFSnsd, già utilizzato per l'espressione della proteina capsica maggiore L1 di HPV16, è stata dovuta a precedenti evidenze sperimentali riportate in letteratura che ne dimostravano l'elevata stabilità quando trasformato in diversi ceppi di *Salmonella* e la capacità di esprimere in modo costitutivo quantità sufficiente di antigene ad innescare una risposta anticorpale di lunga durata sia a livello sistemico che mucosale¹¹². L'analisi dei sieri dei topi vaccinati per via intranasale con due dosi di batteri trasformati con questo vettore aveva mostrato la presenza di elevati titoli anticorpali non solo nel siero ma anche nelle secrezioni vaginali, che potrebbero essere critici per la protezione dall'infezione genitale da HPV. Il contemporaneo controllo della stabilità di pFSnsd, condotta valutando la percentuale di salmonelle, recuperate dal polmone di topi vaccinati per via

intranasale, che ancora possedevano il plasmide, aveva dimostrato la presenza del vettore nel 100% dei batteri analizzati¹¹². Il vettore pFSnsd-Kan, gentilmente fornito dalla Prof. Denise Nardelli-Haeffliger (Università di Losanna, Svizzera), rappresenta una versione modificata del vettore originale, in cui il marcatore di selezione ampicillina è stato sostituito con il gene per la resistenza alla Kanamicina. La scelta di questo marcatore è stata principalmente dovuta alla sua dimostrata biosicurezza e al fatto che il suo uso è stato approvato dalla 'Food and Drug Administration' (FDA) per applicazioni in piante ricombinanti. Nonostante questo non garantisca che esso possa essere approvato per l'uso in vaccini ricombinanti, è da notare che il marcatore di resistenza kanamicina non fornirà agli organismi nessun vantaggio al di fuori del laboratorio, e che questo fenotipo è già abbastanza ubiquitario in natura. Infatti, la diffusa resistenza dei batteri alla kanamicina ha limitato l'uso di questo antibiotico nella medicina umana, e l'elevata specificità di substrato dell'enzima inattivante dimostra la difficoltà di sviluppo di fenomeni di resistenza e di interferenza con le moderne terapie antibiotiche.

La sequenza codificante l'antigene trimerico candidato Trx-L2(20-38)₃ è stata ottimizzata per l'espressione in *Salmonella*, il cui utilizzo dei codoni è molto simile a quello di *Escherichia coli*. Uno studio riportato in letteratura ha dimostrato l'importanza della sequenza di un gene per la stabilità dell'intero plasmide. La somministrazione per via orale o nasale di salmonelle trasformate con il vettore pFSnsd recante la sequenza genica di interesse ottimizzata per l'espressione in questo batterio, ha infatti permesso l'induzione di alti titoli di anticorpi neutralizzanti. Come dimostrato in seguito, l'elevata immunogenicità di questi batteri non correlava con un'aumentata espressione dell'antigene ma con una maggiore stabilità del plasmide esprimente in vitro e in vivo in assenza di antibiotico. Il frammento genico codificante per il nostro antigene candidato è stato ottenuto mediante amplificazione del vettore pET28-Trx-L2(20-38)₃, preparato nella prima parte del lavoro, con i primer 16 e 17 (TabellaS3). L'amplicone è stato successivamente digerito con gli enzimi *NcoI* e *HindIII*, e clonato negli stessi siti del vettore pFSnsd-Kan. L'immunogenicità e la sicurezza sono stati i criteri fondamentali di scelta del ceppo di *Salmonella* da utilizzare come carrier dell'antigene. Le dimostrate caratteristiche del ceppo Ty21a di *S. typhi*, utilizzato come vaccino vivo attenuato per la profilassi delle febbre tifoide, ci hanno indotto ad utilizzare questo batterio nella formulazione di questo prototipo di vaccino mucosale anti-HPV. Il ceppo attenuato Ty21a è stato generato mediante mutagenesi chimica del ceppo parentale virulento Ty2¹²⁹. *S. typhi* Ty21a è stata inizialmente isolata e caratterizzata come mutante GalE, contraddistinto da un blocco nell'enzima uridina difosfato (UDP)-galattosio-4-epimerasi. Quando il mutante assorbe galattosio da fonti esogene, accumula quantità sufficienti di galattosio-1-fosfato e uridina difosfato galattosio da causare la lisi della cellula, un evento che risulta nell'avirulenza del ceppo. Lo zucchero è comunque incorporato in quantità sufficienti da permettere la sintesi dei lipopolisaccaridi che sono fondamentali per le proprietà immunogeniche del ceppo¹²⁹. Mentre la ragione della forte attenuazione di Ty21a non è ancora completamente compresa, la presenza di mutazioni multiple

rendono questo ceppo molto stabile e sicuro, due caratteristiche essenziali per un efficiente vaccino vivo.

Verifica della stabilità e dell'espressione dell'antigene

Il ceppo Ty21a di *S. typhi*, ottenuto reidratando il contenuto di una capsula di vaccino Vivotif® (Berna Biotech Ltd), è stato trasformato con il plasmide pFSnsd-Kan recante la sequenza codificante Trx-L2(20-38)₃ utilizzando il protocollo di elettroporazione comunemente impiegato per *E. coli*. Data l'espressione costitutiva e a bassi livelli garantita da questo plasmide, la valutazione dell'espressione della proteina di interesse è stata condotta mediante un esperimento di Western blotting. Un'aliquota di coltura in fase di crescita esponenziale è stata frazionata su un gel di poliacrilammide, trasferito in seguito su una membrana di nitrocellulosa che è stata incubata con un anticorpo policlonale anti-Trx, ottenuto nella prima parte della ricerca. La successiva rilevazione ha però mostrato assenza di segnale. Le prove condotte in seguito cambiando alcuni parametri hanno confermato questo dato. Per verificare se la mancanza di immunoreattività fosse dovuta ad un'eventuale perdita del plasmide, i batteri trasformanti sono stati cresciuti per circa 50 generazioni in assenza di antibiotico. La successiva piastratura in terreno addizionato di Kanamicina ha tuttavia dimostrato la stabilità del vettore. Parallelamente, la presenza della sequenza codificante è stata dimostrata sottoponendo il DNA plasmidico estratto da *Salmonella* a restrizione con gli enzimi *NcoI* e *HindIII*, precedentemente utilizzati per il clonaggio.

Dato l'esito negativo di questi esperimenti, di cui tuttora non sono note le cause, si è deciso di verificare l'espressione di un vettore alternativo a pFSnsd. Il plasmide pKK233-2, utilizzato per l'espressione di proteine eterologhe sia in *E. coli* che in *Salmonella*, ha rappresentato una valida alternativa. La sequenza codificante l'antigene candidato è stata amplificata dal vettore pET28-Trx-L2(20-38)₃, utilizzando i primer 18 e 19. Il frammento genico è stato clonato nel sito *NcoI*, sotto il controllo del promotore *trc*, ad una distanza ottimale dalla sequenza di Shine-Dalgarno. Il plasmide ricombinante è stato trasformato parallelamente sia nel ceppo di espressione BL21 Codon Plus (DE3) di *E. coli* che nel ceppo Ty21a di *S. typhi*. Un'aliquota delle colture dei batteri trasformanti in fase di crescita esponenziale, insieme ad un campione di *Salmonella* non trasformata come controllo negativo interno, sono state analizzate mediante Western blotting, secondo la procedura descritta precedentemente. Come è possibile osservare nella Figura 50, nonostante la proteina fosse espressa a più alti livelli in *coli*, è stato possibile rilevare un segnale di immunoreattività della taglia attesa nel lisato batterico del ceppo Ty21a trasformato. La presenza di una banda di maggiore peso molecolare in tutti i campioni è probabilmente riconducibile ad una proteina espressa dai batteri riconosciuti dal policlonale anti-Trx utilizzato per la rilevazione.

Nella fase sperimentale successiva, le salmonelle trasformate con i vettori pKK233-2 recanti la sequenza genica sia della Trx che dell'antigene Trx-L2(20-38)₃ verranno somministrate per via intranasale in animali da laboratorio. La successiva analisi della risposta immunitaria generata verrà condotta saggiando parallelamente i titoli anticorpali mediante ELISA e valutando il

potenziale neutralizzante degli anticorpi generati mediante appositi saggi di neutralizzazione virale condotti sia con pseudovirioni omologhi che eterologhi. Parallelamente, la valutazione dei titoli di immunoglobuline IgA nelle secrezioni genitali degli animali vaccinati fornirà importanti indicazioni della capacità di protezione mucosale di questo prototipo di vaccino auto-adiuvante contro il virus del papilloma umano.

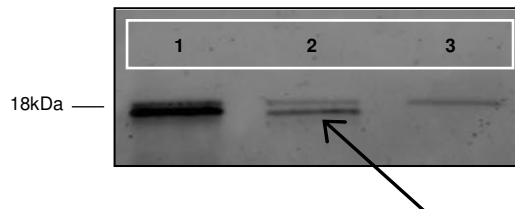


Figura50 | **Verifica dell'espressione di Trx-L2(20-38)₃ in pKK233-2.** L'espressione della proteina è stata verificata sia in *E.coli* che in *S.typhi* mediante western blotting. [La posizione del marcatore di peso molecolare (kDa) è indicata a sinistra; i numeri indicano: (1) pKK233-Trx-L2 in *E.coli*; (2) pKK233-Trx-L2 in *S. typhi*; (3) *S.typhi* wt.]

La parete dei batteri lattici come sistema di display dell'antigene

L'esposizione eterologa di proteine o peptidi sulla superficie dei batteri rappresenta un utile strumento di ricerca ed è stato associato ad una ampia varietà di interessanti applicazioni, incluso lo sviluppo di vaccini 'vivi'. Varie proteine di ancoraggio sono state utilizzate per il *display* di superficie, ma in tutti i casi le proteine espresse sono state ancorate alle cellule produttrici, rendendo così il ceppo ospite utilizzato per l'esposizione dell'antigene un organismo geneticamente modificato (OGM). Tuttavia, l'uso degli OGM nelle applicazioni che implicano il rilascio nell'ambiente (e.g., negli alimenti e nei vaccini) è meno desiderabile o comunque dibattuto. E' stato recentemente sviluppato un nuovo sistema di distribuzione dell'antigene, denominato MimoPath, basato sull'uso della parete di cellule di *Lactococcus lactis* non geneticamente modificate¹³². Queste particelle, definite come GEM (Gram-positive Enhancer Matrix), sono prodotte mediante trattamento acido di cellule di *L. lactis*, un processo che rimuove il DNA e la maggior parte delle proteine batteriche ma mantiene intatto l'involucro di peptidoglicano (PNG). Multiple copie di un antigene possono essere esposte sulla superficie di queste strutture utilizzando proteine ricombinanti e una tecnologia di affinità: proteine di fusione ricombinanti contenenti un antigene e un dominio di ancoraggio al PNG che lo lega con elevata affinità possono essere prodotte in una cellula batterica appositamente ingegnerizzata e poi combinate con le particelle GEM. Il risultato è un vaccino la cui struttura sovramolecolare mima il patogeno. Un importante vantaggio di questo sistema è il suo elevato profilo di sicurezza. *L. lactis* è un batterio gram-positivo non patogeno, generalmente riconosciuto come sicuro (GRAS) e ampiamente utilizzato nella dieta. Inoltre, le particelle GEM non contengono DNA e quindi non esiste nessun rischio di potenziale reversione alla forma virulenta. La composizione di queste strutture

contribuisce alle loro proprietà immuno-stimolatorie. Come particelle sferiche, le GEM possono essere efficientemente assorbite dalle cellule M nell'epitelio al di sopra dei follicoli linfoidi della mucosa e gli antigeni possono essere distribuiti direttamente alle cellule dendritiche nei siti induttivi mucosali. Inoltre, il peptidoglicano è un potente stimolatore dell'immunità innata. Uno studio pubblicato lo scorso anno ha dimostrato che l'immunizzazione intranasale di topi infanti con particelle GEM rivestite di un particolare antigene di *Yersinia pestis* era ben tollerata ed elicitava una potente immunità sia a livello sistemico che mucosale in grado di conferire protezione dalle infezioni successive¹³³. In particolare, i topi immunizzati presentavano un elevato livello di anticorpi specifici contro l'antigene sia nel siero che a livello delle mucose, e una robusta risposta T. L'antigene era risultato particolarmente immunogenico quando associato alle particelle GEM ma non quando somministrato da solo, che è probabilmente il risultato di una maggiore efficienza dei processi chiave, incluso l'attivazione dell'immunità innata attraverso l'interazione con il recettore TLR2, l'attivazione delle cellule dendritiche e la stimolazione diretta delle cellule B. Questi dati dimostrano il potenziale utilizzo di queste particelle come vaccini mucosali, la cui somministrazione può essere effettuata anche nei primi anni di vita di un individuo. Oltre al vantaggio di non essere viventi e non geneticamente modificate, queste strutture sovramolecolari presentano numerosi vantaggi come vettori ricombinanti: (i) la quantità di antigene esposto e somministrato in vivo è nota e rimane costante; (ii) l'antigene è esposto sulla superficie delle particelle ad elevata densità ed in forma multimerica, peculiarità che favorisce l'attivazione delle cellule B; (iii) più tipi di antigeni possono essere esposti simultaneamente; (iv) le particelle GEM sono molto stabili e possono essere conservate a temperatura ambiente, senza necessitare di una catena del freddo¹³³.

La semplicità e l'economicità del processo di produzione di queste strutture, la possibilità di somministrazione senza metodiche invasive, insieme alla capacità di indurre una potente protezione mucosale senza addizione di adiuvanti, rendono questo sistema un eccellente candidato per la formulazione di un vaccino auto-adiuvante contro il virus del papilloma umano.

Preparazione e verifica del supporto strutturale

L'ottenimento delle strutture sovramolecolari esponenti multiple copie del nostro antigene candidato ha previsto una fase iniziale di preparazione delle particelle GEM. Cellule di *L. lactis* IL1403, gentilmente fornite dal Dott. M. Ventura (Università di Parma) sono state trattate con differenti tipi di acidi al fine di rimuovere il contenuto genetico e la maggiorparte delle proteine batteriche ma mantenendo intatto l'involucro di peptidoglicano, necessario per il successivo legame dell'antigene di fusione. In accordo con quanto descritto in letteratura, secondo cui non è il tipo di acido bensì il pH il fattore critico per la produzione di queste particelle¹³², sono state utilizzate tre differenti soluzioni acide (TCA, acido cloridrico, acido acetico) a pH 1 al fine di identificare il trattamento migliore per la completa rimozione delle proteine endogene del batterio. La successiva analisi dei tre campioni mediante SDS-PAGE ha dimostrato la notevole rimozione e/o degradazione delle proteine dei lattococchi. In particolare, come si può osservare in Figura 51

B, tra i trattamenti utilizzati quello con acido acetico (HAc) ha permesso l'eliminazione della quasi totalità del contenuto proteico dei batteri (Figura51 A). Inoltre, sebbene la fase di incubazione in soluzione acida sia stata seguita da estensivi lavaggi in tampone fosfato per la completa rimozione di ogni residuo, il limitato profilo di tossicità di questo acido rispetto al TCA e all'acido cloridrico lo rendono il trattamento migliore per questo tipo di applicazione.

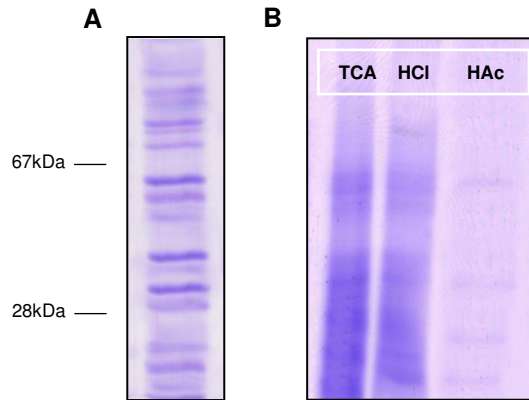


Figura51 | **Il contenuto proteico di *L. lactis* non trattato (A) e trattato con acidi (B).** [La posizione dei marcatori di peso molecolare (kDa) è indicata a sinistra; le sigle indicano i trattamenti condotti con: (TCA) acido tricloro acetico; (HCl) acido cloridrico; (HAc) acido acetico.]

L'assenza di colonie in piastre seminate con un'aliquota dei tre campioni ha dimostrato l'assenza di eventuali batteri sopravvissuti al trattamento. Verificata la rimozione del contenuto proteico e l'assenza di batteri vivi, è stata valutata la morfologia delle particelle GEM preparate. La visualizzazione dei gusci lattici mediante Microscopia a Forza Atomica (AFM) ha mostrato in tutti i casi una morfologia cellulare intatta rispetto alle cellule di *L. Lactis* non trattate (Figura52). Il trattamento eseguito ha dunque permesso l'ottenimento di microparticelle sferiche di peptidoglicano, con un diametro di approssimativamente 1 μm , morfologicamente identiche alle cellule del batterio gram-positivo non trattate e con un basso contenuto proteico.

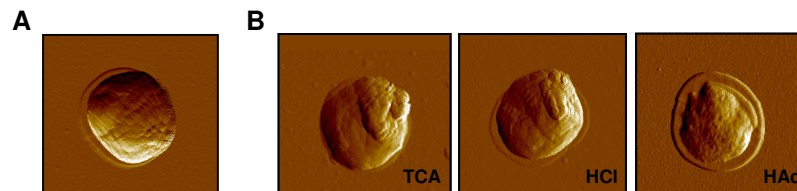


Figura52 | **La morfologia di *L. lactis* non trattato (A) e trattato con acidi (B).** [La visualizzazione dei campioni è stata condotta mediante Microscopia a Forza Atomica (AFM) ; le sigle indicano i trattamenti condotti con: (TCA) acido tricloro acetico; (HCl) acido cloridrico; (HAc) acido acetico.]

Espressione dell'antigene di ancoraggio

Parallelamente alla preparazione del supporto strutturale, è stata progettata ed espressa una versione alternativa dell'antigene candidato, come proteina di fusione con un dominio di legame al peptidoglicano. La scelta di utilizzare il dominio LysM dell'autolisina AcmA di *L. lactis* deriva da precedenti evidenze sperimentali che hanno dimostrato l'elevata affinità con cui questa proteina lega il PNG e la stabilità di questa interazione non covalente. Le prove condotte avevano infatti mostrato la stabilità delle corrispondenti particelle GEM-proteina di ancoraggio, che erano risultate inalterate dopo un periodo di 12 mesi a temperatura ambiente così come a 4°C o a -80°C¹³². Il dominio di ancoraggio dell'enzima AcmA è costituito da tre motivi LysM di circa 45 aminoacidi, separati da tra regioni spaziatrici. Questo motivo è un modulo comune trovato in diversi enzimi degradanti la parete cellulare e in proteine implicate nella patogenesi batterica, ed è spesso presente in ripetizioni multiple. E' stato proposto che questo dominio leghi non covalentemente il peptidoglicano di vari batteri gram-positivi. In *L. lactis*, in seguito alla secrezione dell'idrolasi AcmA, il dominio di ancoraggio dirige la proteina sulla parete cellulare.

Il gene codificante per LysM di AcmA è stato isolato direttamente dallo stesso batterio utilizzato per la preparazione del supporto strutturale. Dalla coltura di *L. lactis* è stato estratto il DNA genomico, utilizzato successivamente come template per l'amplificazione del gene, utilizzando i primer 20 e 21 (Tabella S3) progettati sulla sequenza disponibile in banca dati (Acc. No. ZP_05745122.1, GenBank). Il costrutto genico codificante per la proteina di fusione LysM-Trx-L2(20-38)₃ è stato ottenuto mediante ligazione dell'amplicone nel sito *BamHI* del vettore pET28-Trx-L2(20-38)₃ preparato nella prima parte del progetto. Il clonaggio del gene LysM in questo sito ha permesso l'entrata in *frame* con il costrutto codificante l'antigene, situato poco più a monte. Il prodotto di ligazione è stato infine trasformato nel ceppo di espressione BL21 Codon Plus (DE3). Verificata la correttezza della sequenza mediante sequenziamento del DNA plasmidico, un clone trasformante è stato utilizzato per esaminare l'espressione della proteina, che è risultata prodotta ad alti livelli. Tuttavia, la sua completa insolubilità ha reso necessaria la purificazione della proteina di fusione dai corpi di inclusione del batterio.

Strutture sovramolecolari esponenti multiple copie dell'antigene

La proteina di fusione LysM-Trx-L2(20-38)₃ è stata utilizzata per determinare la massima capacità di legame delle particelle GEM precedentemente prodotte. Quantità crescenti (2 µg, 4 µg, 10 µg, 20 µg, 50 µg) di polipeptide sono state addizionate a 2x10⁸ particelle ottenute mediante trattamento con acido acetico, risultate più pure rispetto alle altre. Al fine di verificare la specificità di legame del dominio LysM al peptidoglicano, i gusci sono stati contemporaneamente miscelati alla proteina Trx-L2(20-38)₃ priva del dominio di ancoraggio. Dopo il legame, condotto nelle condizioni descritte nella sezione 'Materiali e Metodi', i gusci lattici sono stati separati mediante centrifugazione e la quantità di molecole antigeniche legate al peptidoglicano è stata valutata mediante SDS-PAGE. Come è possibile osservare in Figura53, la proteina di fusione è risultata legata alle particelle

GEM. A dimostrazione della specificità del legame tra LysM e il peptidoglicano, la proteina priva del dominio di ancoraggio è risultata presente esclusivamente nel sovranatante del campione centrifugato. Nella prima e nella seconda prova, in cui sono stati incubati rispettivamente 2 μ g e 4 μ g di LysM-Trx-L2(20-38)₃ con lo stesso numero di particelle, tutta la proteina è risultata legata ai gusci lattici, come dimostrato dalla totale assenza nel sovrinatante del centrifugato.

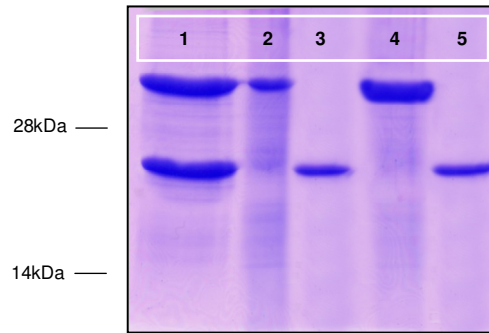


Figura52 | **Verifica del legame di LysM-Trx-L2(20-38)₃ alle particelle GEM.**
[La posizione dei marcatori di peso molecolare (kDa) è indicata a sinistra; i numeri indicano: (1) LysM-Trx-L2(20-38)₃ e Trx-L2(20-38)₃, (2-3) frazione sedimentabile e solubile della prova I, (4-5) frazione sedimentabile e solubile della prova II.]

Le prove preliminari condotte con aumentate quantità di LysM-Trx-L2(20-38)₃ hanno tuttavia mostrato una quantità crescente di proteina di fusione nel sovrinatante del centrifugato (dato non mostrato), indice di un probabile raggiungimento della saturazione dei siti di legame presenti sulla superficie del peptidoglicano. Sulla base di questi dati, ovvero il legame massimo di 4 μ g di proteina a 2×10^8 particelle, è possibile stimare il legame di circa 1.6×10^6 molecole di antigene per ogni guscio. La verifica delle proprietà immunogeniche di queste strutture sovramolecolari verrà condotta somministrando queste particelle per via intranasale ad animali da laboratorio. La successiva analisi dei titoli anticorpali a livello sistemico, ma soprattutto a livello delle mucose, fornirà importanti indicazioni circa il potenziale auto-adiuvante di questa versione alternativa e ottimizzata dell'antigene candidato.

Discussione

La progettazione razionale di un vaccino richiede la considerazione di alcuni importanti fattori. L'identificazione di antigeni in grado di indurre una risposta immune contro il patogeno di cui si vuole prevenire l'infezione deve essere seguita dalla selezione di appropriate molecole immunostimolatorie, che aumentano o modulano l'immunogenicità intrinseca dell'antigene ed elicitano una forte e duratura risposta immunitaria, e di metodiche di somministrazione del preparato che devono favorire l'interazione dell'antigene con le cellule chiave del sistema immunitario innato. Come ribadito più volte in letteratura, persino con il più appropriato antigene il problema critico

resta come questo è presentato al sistema immunitario. Questo concetto sottolinea l'importanza e il bisogno di identificare un appropriato adiuvante e un sistema di distribuzione idoneo per ottimizzare la potenzialità profilattica del preparato.

Identificato l'antigene trimerico Trx-L2(20-38) come il più promettente, e potenziato ulteriormente la *performance* del vaccino in termini di cross-neutralizzazione mediante l'uso di differenti metodiche molecolari, l'ultima fase della ricerca ha avuto come obiettivo lo sviluppo di molecole dotate di potenzialità auto-adiuvante, che non richiedono l'aggiunta di immunopotenziatori esterni all'antigene stesso. La progettazione delle differenti formulazioni antigeniche, come fusione all'immunopotenziatore naturale Flagellina, come proteina eterologa espressa da un ceppo di *Salmonella* opportunamente ingegnerizzato o come struttura sovramolecolare esponente multiple copie dell'antigene, si è basata sulla nota importanza che l'immunità innata riveste nella modulazione della risposta adattativa. Tra i pattern molecolari associati al patogeno (PAMP), i recettori Toll-like (TLR) rivestono un ruolo cruciale nella prima fase della risposta immunitaria all'infezione. Oltre ad attivare le cellule presentanti l'antigene (APC) e a modulare la risposta adattativa, spostando l'equilibrio a favore della risposta Th1 o Th2, essi assumono un ruolo fondamentale nella presentazione dell'antigene. La presenza di entrambi questi elementi, l'immunopotenziatore e l'antigene, è richiesta per un'ottimale presentazione e attivazione di quest'ultimo: i TLR controllano la generazione di ligandi ai recettori delle cellule T dal fagosoma, assicurando che il contenuto derivato dai patogeni microbici sia preferenzialmente presentato alle cellule T da cellule APC attivate. Esperimenti sia *in vitro*¹³⁴ che *in vivo*¹³⁵ sottolineano la necessità per l'antigene e per gli agonisti TLR di essere co-somministrati, in modo che siano presenti nello stesso fagosoma e inducano un'ottimale presentazione dell'antigene e una potente stimolazione della successiva risposta cellulare. Ad esempio, è stato mostrato come la fusione di un determinato antigene alla Flagellina attivi una risposta immune circa dieci volte maggiore rispetto a quella elicitata dai due componenti separati.

Il potenziale auto-adiuvante dei vaccini TDMI alternativi descritti in questo capitolo dovrebbe essere garantito dalla fusione dell'antigene candidato con differenti molecole dotate di proprietà immunostimolatorie. Sono infatti note le proprietà adiuvanti della proteina strutturale dei flagelli batterici che, mediante l'interazione con il recettore TLR5, promuove l'induzione di citochine e chemochine proinfiammatorie dalle cellule linfoidi e non linfoidi, il reclutamento generalizzato dei linfociti T e B ai siti linfoidi secondari, l'attivazione delle cellule dendritiche (DC) e l'attivazione diretta dei linfociti. E' quindi ipotizzabile che la fusione dell'antigene alla Flagellina di *Escherichia coli* o di *Salmonella typhi* possa garantire una potente attivazione della risposta immune precoce e quindi di una forte risposta adattativa, principalmente di tipo Th2, specifica contro il virus del papilloma. La progettazione di una versione alternativa dell'antigene candidato, come proteina espressa da un ceppo attenuato di *Salmonella* si è basata sugli stessi principi. Si è infatti dimostrato il potenziale di questo vaccino 'vivo' nella stimolazione dell'immunità innata, prevalentemente mediata dall'interazione dei flagelli del batterio con il recettore TLR5, e

nell'attivazione di una risposta immunitaria sia a livello sistemico che delle mucose. Inoltre, la sicurezza di questa formulazione è dimostrata da oltre vent' anni di esperienza con il vaccino vivo Vivotif[®], disponibile in commercio per la profilassi della febbre tifoide. La dimostrata attivazione dell'immunità innata attraverso l'interazione con il recettore TLR2, l'attivazione delle cellule dendritiche e la stimolazione diretta delle cellule B da parte di particelle GEM derivate dal trattamento acido di *L. lactis*, ha sostenuto il loro utilizzo nella formulazione di un vaccino alternativo auto-adiuvante contro HPV. L'esposizione di multiple copie di antigene ad alta densità sulla superficie di questo supporto strutturale potrebbe favorire l'attivazione delle cellule B e quindi indurre una potente risposta anticorpale nei soggetti vaccinati. Uno studio pubblicato lo scorso anno ha infatti dimostrato che l'immunizzazione di topi con particelle GEM rivestite di un particolare antigene era ben tollerata ed elicitava una potente immunità sia a livello sistemico che mucosale, in grado di conferire protezione dalle infezioni successive¹³³.

Oltre al fattore immunologico, la progettazione di queste versioni potenzialmente auto-adiuvanti dell'antigene è stata condotta considerando l'importanza della metodica di somministrazione di un vaccino per la generazione di una risposta protettiva. Noto il meccanismo di infezione del virus del papilloma, che richiede il contatto diretto con le mucose dell'ospite, le formulazioni descritte in questo capitolo sono state progettate in modo da poter essere somministrate per via mucosale (orale e/o intranasale), al fine di elicitare preferenzialmente una risposta IgA a livello delle mucose. Inoltre, data la possibilità di auto-somministrazione e il costo ridotto di ciascuna dose, la cui preparazione richiede semplici ed economiche procedure, questi vaccini TDMI alternativi potrebbero risultare particolarmente vantaggiosi nei paesi in via di sviluppo, dove l'accesso a cure mediche professionali è spesso problematico e le risorse sono limitate.

Conclusioni

La scoperta che l'infezione persistente da tipi oncogeni del virus del papilloma umano (HPV) è causa necessaria per l'insorgenza di neoplasia cervicale, il secondo tumore più comune nella popolazione femminile, ha guidato lo sviluppo di strategie di prevenzione primaria. Da alcuni anni sono disponibili in commercio due vaccini profilattici costituiti da particelle simili a quelle virali (VLP) ottenute per autoassemblaggio della proteina capsidica maggiore L1 di HPV16 e 18, nel caso del Cervarix[®] (GlaxoSmithKline), e di HPV16, 18, 6, 11 nel caso del Gardasil[®] (Merck). Nonostante entrambi abbiano mostrato la capacità di indurre una specifica sierconversione verso i tipi più comuni di HPV, la limitata multivalenza contro tipi virali non inclusi nella formulazione rappresenta la principale ragione della continua ricerca di strategie vaccinali alternative. Vari studi hanno mostrato che la proteina capsidica minore L2 rappresenta uno degli approcci più promettenti per lo sviluppo di un vaccino di seconda generazione. Essa unisce il vantaggio di indurre una potente risposta cross-neutralizzante, grazie alla presenza di particolari epitopi localizzati nella regione N-terminale, al vantaggio di poter essere prodotta in batterio, senza richiedere complesse e costose procedure di preparazione. La sua limitata immunogenicità rappresenta d'altra parte il principale limite di questo approccio.

Il *constraining* strutturale imposto dalla fusione con il *display site* della Tioredossina, principio su cui si basa la strategia 'Thioredoxin Displayed Multi-peptide Immunogens' (TDMI) utilizzata nella prima fase della ricerca, si è dimostrato cruciale per la presentazione e il potere immunogeno di questi peptidi, la cui somministrazione in animali da laboratorio ha generato elevati titoli anticorpali. Mediante questa tecnologia è stato possibile individuare l'antigene trimerico ricombinante Trx-L2(20-38) come il migliore candidato per lo sviluppo di un vaccino cross-protettivo. Questo infatti si è rivelato un eccellente immunogeno, in grado di indurre non solo una forte risposta immunitaria, ma anche la produzione di anticorpi a protezione crociata in grado di neutralizzare quattro diversi sierotipi virali (HPV 16, 18, 58, 45). La successiva fase di ottimizzazione, volta ad incrementare ulteriormente la *performance* del vaccino in termini di cross-neutralizzazione, si è basata su differenti strategie molecolari. Nonostante la riduzione dell'antigene alla sola regione immunodominante 20-31 non si sia dimostrata una strategia efficace, probabilmente a causa dell'importanza della regione 32-38 nel mantenimento della conformazione dell'epitopo, l'analisi dei pattern di legame dei monoclonali cross-neutralizzanti isolati ha fornito importanti indicazioni sulla strategia da utilizzare per questo scopo. I dati sperimentali ottenuti hanno infatti sottolineato l'importanza del grado di conservazione della sequenza primaria dell'epitopo nella generazione di una popolazione anticorpale cross-neutralizzante. L'esposizione di epitopi provenienti da differenti sierotipi virali (HPV16, 31, 51) sulla stessa molecola antigenica potrebbe rappresentare un'efficiente strategia per l'ottenimento di una versione multivalente dell'antigene candidato. I saggi di neutralizzazione che verranno condotti sui sieri dei topi vaccinati con il nuovo set di polipeptidi forniranno importanti indicazioni a riguardo. Con lo stesso fine, ovvero indirizzare la risposta di tipo B in modo da produrre principalmente anticorpi dotati di attività cross-neutralizzante, nell'ultima fase di ottimizzazione dell'epitopo peptidico è stata valutata l'importanza dello stato di ossido-

riduzione dell'antigene candidato. In particolare, data la specificità di legame dei monoclonali cross-neutralizzanti ai residui cisteinici presenti nell'epitopo 20-38, e noto il ruolo fondamentale che il loro stato di ossidazione assume nell'infettività dei virioni, è stata verificata l'immunoreattività dei monoclonali cross-neutralizzanti con la forma ossidata o ridotta dell'antigene candidato Trx-L2(20-38)₃. La verifica del legame preferenziale per la forma ossidata ha dimostrato l'importanza della vaccinazione con antigeni riproducenti la struttura del virione infettivo per l'induzione di una risposta anticorpale neutralizzante sia virioni omologhi che eterologhi. Data la presenza di ponti disolfuro naturalmente presenti in condizioni fisiologiche nella proteina di fusione, non si è reso necessario nessun trattamento dell'antigene per il potenziamento della sua multivalenza.

Oltre la genotipo-specificità, l'elevato costo di ciascuna dose rappresenta un altro importante limite dei vaccini anti-HPV attualmente in commercio. L'espressione delle proteine L1 in sistemi eucarioti necessita infatti di complesse e costose procedure di preparazione che incidono notevolmente sul costo finale del farmaco. La strategia TDMI utilizzata in questa ricerca, oltre ad aver aumentato notevolmente il potere immunogeno dei peptidi associati alla Tiorredossina, presenta il vantaggio di essere basata sui batteri come sistema di espressione di proteine eterologhe. In questo modo, la preparazione degli antigeni richiede semplici e veloci fasi sperimentali, il cui costo è notevolmente ridotto. La versatilità di questa strategia si è dimostrata anche nell'utilizzo della Trx di un batterio ipertermofilo, quale *Pyrococcus furiosus*, per rendere solubile e quindi facilmente purificabili anche polipeptidi di elevate dimensioni. La maggiore capacità di *constraining* di questa proteina rispetto a quella di *Escherichia coli*, utilizzata nella prima fase della ricerca, è risultata fondamentale per conferire una maggiore stabilità conformazionale al polipeptide rappresentante l'intera regione N-terminale di L2, che è stato purificato direttamente dalla frazione citoplasmatica del batterio, senza richiedere addizionali procedure di estrazione. La preliminare dimostrazione della stabilità termica, oltre che strutturale, di questa Tiorredossina e dei suoi derivati, la rendono un *carrier* ottimale per lo sviluppo di un vaccino di seconda generazione che non richiede costose e laboriose procedure di preparazione e che potrebbe essere distribuito senza particolari condizioni di refrigerazione. Le attuali formulazioni vacciniche richiedono infatti una costante catena del freddo, e questo rappresenta un'ulteriore limitazione per la distribuzione nei paesi più remoti e con risorse limitate. La stessa metodica di somministrazione rappresenta un limite intrinseco all'attuale profilassi anti-HPV. Nonostante l'immunizzazione mediante iniezione presenti il vantaggio di favorire l'accesso immediato degli antigeni ai vasi linfatici e quindi attivi in breve tempo la cascata di eventi che risulterà nell'immunità protettiva, la necessità di personale paramedico e il rischio di trasmissione di altri agenti infettivi, a causa dell'uso ripetuto di siringhe senza appropriati interventi di sterilizzazione, rappresentano d'altra parte i principali limiti di questo approccio. Le formulazioni alternative dell'antigene candidato, come fusione all'immunopotenziatore naturale Flagellina, come proteina eterologa espressa da un ceppo di *Salmonella* opportunamente ingegnerizzato o come struttura sovramolecolare esponente multiple copie dell'antigene, potrebbero rappresentare efficienti soluzioni. La loro progettazione è stata infatti basata sulla necessità di formulare un

preparato stabile, a basso costo e somministrabile mediante metodiche alternative all'iniezione. L'immunizzazione per via mucosale (orale e/o intranasale) di questi preparati, oltre a non richiedere personale paramedico, presenta il notevole vantaggio di indurre una risposta anticorpale sia a livello sistemico che delle mucose, risposta che si è dimostrata fondamentale per la protezione da patogeni il cui meccanismo di infezione richiede un contatto diretto con le mucose dell'ospite, come il virus del papilloma. La fusione dell'antigene candidato con differenti molecole dotate di proprietà immunostimolatorie, che agiscono principalmente come agonisti dei recettori TLR, dovrebbe inoltre garantire un potenziale autoadiuvante dei vaccini TDMI alternativi, la cui somministrazione non dovrebbe richiedere l'aggiunta di adiuvanti esterni all'antigene stesso. La presente ricerca, oltre ad aver portato all'identificazione di un antigene candidato dotato di elevato potere immunogeno e in grado di indurre una risposta protettiva multivalente, ha proposto e vagliato differenti metodiche molecolari per l'ottimizzazione della *performance* del vaccino stesso. La futura valutazione delle formulazioni vacciniche TDMI alternative, insieme alla valutazione delle differenti metodiche di somministrazione proposte, forniranno importanti indicazioni circa l'approccio migliore per fornire una protezione più efficace e duratura contro il virus del papilloma umano, con l'obiettivo finale di sviluppare un vaccino di seconda generazione, multivalente, auto-adiuvante e a basso costo.

Bibliografia

- 1 zur Hausen, H., Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology* 384, 260-5 (2009).
- 2 de Villiers, E.M., et al., Classification of papillomaviruses. *Virology* 324, 17-27 (2004).
- 3 Pfister, H., Chapter 8: Human papillomavirus and skin cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 52-6 (2003).
- 4 Munoz, N., et al., Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 348, 518-27 (2003).
- 5 Clifford, G.M., et al., Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet* 366, 991-8 (2005).
- 6 Woodman, C.B., et al., Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *Lancet* 357, 1831-6 (2001).
- 7 Clifford, G.M., et al., Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14, 1157-64 (2005).
- 8 Clifford, G.M., et al., Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer* 88, 63-73 (2003).
- 9 Parkin, D.M., et al., Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55, 74-108 (2005).
- 10 Bosch, F.X. and S. de Sanjose, Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer--burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 3-13 (2003).
- 11 Ferlay, J., et al., GLOBOCAN 2008, Cancer incidence and mortality worldwide: IARC Cancer Base number 10. Lyon, France:International Agency for Research on Cancer (2010). <http://globocan.iarc.fr> (accessed Aug 10, 2010).
- 12 Parkin, D.M. and F. Bray, Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine* 24 Suppl 3, S3/11-25 (2006).
- 13 Woodman, C.B., S.I. Collins, and L.S. Young, The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 7, 11-22 (2007).
- 14 Trimble, C.L., et al., Spontaneous regression of high-grade cervical dysplasia: effects of human papillomavirus type and HLA phenotype. *Clin Cancer Res* 11, 4717-23 (2005).
- 15 Baseman, J.G. and L.A. Koutsky, The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol* 32 Suppl 1, S16-24 (2005).
- 16 Schiffman, M., et al., Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 370, 890-907 (2007).
- 17 Stanley, M., Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine* 24 Suppl 1, S16-22 (2006).
- 18 Plummer, M., et al., A 2-year prospective study of human papillomavirus persistence among women with a cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance or low-grade squamous intraepithelial lesion. *J Infect Dis* 195, 1582-9 (2007).
- 19 Schiffman, M. and S.K. Kjaer, Chapter 2: Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 14-9 (2003).
- 20 Sawaya, G.F., et al., Risk of cervical cancer associated with extending the interval between cervical-cancer screenings. *N Engl J Med* 349, 1501-9 (2003).
- 21 Cox, J.T., M. Schiffman, and D. Solomon, Prospective follow-up suggests similar risk of subsequent cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 among women with cervical intraepithelial neoplasia grade 1 or negative colposcopy and directed biopsy. *Am J Obstet Gynecol* 188, 1406-12 (2003).

- 22 Woodman, C.B., S.I. Collins, and L.S. Young, The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 7, 11-22 (2007).
- 23 Khan, M.J., et al., The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst* 97, 1072-9 (2005).
- 24 International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer, Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: Collaborative reanalysis of individual data on 13541 women with carcinoma of the cervix and 23017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. *Int J Cancer* 118, 1481-95 (2006).
- 25 International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer, Cervical carcinoma and reproductive factors: Collaborative reanalysis of individual data on 16563 women with cervical carcinoma and 33542 women without cervical carcinoma from 25 epidemiological studies. *Int J Cancer* 119, 1108-24 (2006).
- 26 Smith, J.S., et al., Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: a systematic review. *Lancet* 361, 1159-67 (2003).
- 27 Smith, J.S., et al., Chlamydia trachomatis and invasive cervical cancer: a pooled analysis of the IARC multicentric case-control study. *Int J Cancer* 111, 431-9 (2004).
- 28 Hogewoning, C.J., et al., Condom use promotes regression of cervical intraepithelial neoplasia and clearance of human papillomavirus: a randomized clinical trial. *Int J Cancer* 107, 811-6 (2003).
- 29 Smith, J.S, et al., Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesion: a meta-analysis update. *Int J Cancer* 121, 621-32 (2007).
- 30 de Sanjose, S., et al., Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 7, 453-9 (2007).
- 31 Castellsague, X. and F.X. Bosch, Advances in cervical cancer prevention: HPV vaccines. *Fam Hosp* 31, 261-3 (2007).
- 32 Clifford, G.M., et al., Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International agency for Research on cancer HPV prevalence survey: a pooled analysis. *Lancet* 366, 991-8 (2005).
- 33 Bosch, F.X., et al., Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine* 26 Suppl 10, K1-16 (2008).
- 34 Castle, P.E., et al., Age-related changes of the cervix influence human papillomavirus type distribution. *Cancer Res* 66, 1218-24 (2006).
- 35 Franceschi, S., et al., Variations in the age-specific curves of human papillomavirus prevalence in women worldwide. *Int J Cancer* 119, 2677-84 (2006).
- 36 Munoz, N., et al., Incidence, duration, and determinants of cervical human papillomavirus infection in a cohort of Colombian women with normal cytological results. *J Infect Dis* 190, 2077-87 (2004).
- 37 Parkin, D.M., et al., Cancer incidence in five continents. *IARC Sci Publ* VIII, (2003).
- 38 Chow, L.T., et al., A highly efficient system to produce infectious human papillomavirus: Elucidation of natural virus-host interactions. *Cell Cycle* 8, 1319-23 (2009).
- 39 Kivi, N., et al., Genes involved in cell adhesion, cell motility and mitogenic signaling are altered due to HPV 16 E5 protein expression. *Oncogene* 27, 2532-41 (2008).
- 40 Heideman, D.A., et al., Oncolytic adenovirus expressing a p53 variant resistant to degradation by HPV E6 protein exhibits potent and selective replication in cervical cancer. *Mol Ther* 12, 1083-90 (2005).

- 41 Veldman, T., et al., Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *J Virol* 75, 4467-72 (2001).
- 42 Garnett, T.O. and P.J. Duerksen-Hughes, Modulation of apoptosis by human papillomavirus (HPV) oncoproteins. *Arch Virol* 151, 2321-35 (2006).
- 43 Doorbar, J., Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)* 110, 525-41 (2006).
- 44 Longworth, M.S. and L.A. Laimins, The binding of histone deacetylases and the integrity of zinc finger-like motifs of the E7 protein are essential for the life cycle of human papillomavirus type 31. *J Virol* 78, 3533-41 (2004).
- 45 Zwerschke, W. and P. Jansen-Durr, Cell transformation by the E7 oncoprotein of human papillomavirus type 16: interactions with nuclear and cytoplasmic target proteins. *Adv Cancer Res* 78, 1-29 (2000).
- 46 Conway, M.J. and C. Meyers, Replication and assembly of human papillomaviruses. *J Dent Res* 88, 307-17 (2009).
- 47 Day, T. and C. Vaziri, HPV E6 oncoprotein prevents recovery of stalled replication forks independently of p53 degradation. *Cell Cycle* 8, 2138 (2009).
- 48 zur Hausen, H., Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2, 342-50 (2002).
- 49 Schiller, J.T., P.M. Day, and R.C. Kines, Current understanding of the mechanism of HPV infection. *Gynecol Oncol* 118, S12-7 (2010).
- 50 Day, P.M., D.R. Lowy, and J.T. Schiller, Heparan sulfate-independent cell binding and infection with furin-precleaved papillomavirus capsids. *J Virol* 82, 12565-8 (2008).
- 51 Roberts, J.N., et al., Genital transmission of HPV in a mouse model is potentiated by nonoxynol-9 and inhibited by carrageenan. *Nat Med* 13, 857-61 (2007).
- 52 Johnson, K.M., et al., Role of heparan sulfate in attachment to and infection of the murine female genital tract by human papillomavirus. *J Virol* 83, 2067-74 (2009).
- 53 Richards, R.M., et al., Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 1522-7 (2006).
- 54 Day, P.M. and J.T. Schiller, The role of furin in papillomavirus infection. *Future Microbiol* 4, 1255-62 (2009).
- 55 Kines, R.C., et al., The initial steps leading to papillomavirus infection occur on the basement membrane prior to cell surface binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 20458-63 (2009).
- 56 Day, P.M., D.R. Lowy, and J.T. Schiller, Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology* 307, 1-11 (2003).
- 57 Laniosz, V., K.A. Holthusen, and P.I. Meneses, Bovine papillomavirus type 1: from clathrin to caveolin. *J Virol* 82, 6288-98 (2008).
- 58 Spoden, G., et al., Clathrin- and caveolin-independent entry of human papillomavirus type 16-involvement of tetraspanin-enriched microdomains (TEMs). *PLoS One* 3, e3313 (2008).
- 59 Buck, C.B., et al., Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors. *J Virol* 78, 751-7 (2004).
- 60 Finnen, R.L., et al., Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins. *J Virol* 77, 4818-26 (2003).
- 61 Ho, G.Y., et al., Risk factors for subsequent cervicovaginal human papillomavirus (HPV) infection and the protective role of antibodies to HPV-16 virus-like particles. *J Infect Dis* 186, 737-42 (2002).

- 62 de Jong, A., et al., Human papillomavirus type 16-positive cervical cancer is associated with impaired CD4+ T-cell immunity against early antigens E2 and E6. *Cancer Res* 64, 5449-55 (2004).
- 63 Stanley, M., Immunobiology of HPV and HPV vaccines. *Gynecol Oncol* 109, S15-21 (2008).
- 64 Anon, Cervix Cancer Screening. *IARC Handbooks of cancer Prevention* (2005).
- 65 Roden, R. and T.C. Wu, How will HPV vaccines affect cervical cancer? *Nat Rev Cancer* 6, 753-63 (2006).
- 66 Smith, J.S., et al., Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer* 121, 621-32 (2007).
- 67 Wright, T.C., Jr., et al., 2006 consensus guidelines for the management of women with abnormal cervical cancer screening tests. *Am J Obstet Gynecol* 197, 346-55 (2007).
- 68 Council of the European Union: Council Recommendation of 2 December on Cancer Screening. *Off J Eur Union* (2003).
- 69 Arbyn, M., et al., European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening. Second edition-summary document. *Ann Oncol* 21, 448-58 (2008).
- 70 Solomon, D., et al., The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *Jama* 287, 2114-9 (2002).
- 71 Nanda, K., et al., Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review. *Ann Intern Med* 132, 810-9 (2000).
- 72 Cuzick, J., et al., Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int J Cancer* 119, 1095-101 (2006).
- 73 Hubbard, R.A., Human papillomavirus testing methods. *Arch Pathol Lab Med* 127, 940-5 (2003).
- 74 Barzon, L., et al., Guidelines of the Italian Society for Virology on HPV testing and vaccination for cervical cancer prevention. *Infect Agent Cancer* 3, 14 (2008).
- 75 Jarrett, W.F., et al., Studies on vaccination against papillomaviruses: a comparison of purified virus, tumour extract and transformed cells in prophylactic vaccination. *Vet Rec* 126, 449-52 (1990).
- 76 Bell, J.A., et al., A formalin-inactivated vaccine protects against mucosal papillomavirus infection: a canine model. *Pathobiology* 62, 194-8 (1994).
- 77 Breitburd, F., et al., Immunization with viruslike particles from cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) can protect against experimental CRPV infection. *J Virol* 69, 3959-63 (1995).
- 78 Zhou, J., et al., Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles. *Virology* 185, 251-7 (1991).
- 79 Kirnbauer, R., et al., Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 12180-4 (1992).
- 80 Hofmann, K.J., et al., Sequence determination of human papillomavirus type 6a and assembly of virus-like particles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Virology* 209, 506-18 (1995).
- 81 Ghim, S., et al., Spontaneously regressing oral papillomas induce systemic antibodies that neutralize canine oral papillomavirus. *Exp Mol Pathol* 68, 147-51 (2000).
- 82 Jansen, K.U., et al., Vaccination with yeast-expressed cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) virus-like particles protects rabbits from CRPV-induced papilloma formation. *Vaccine* 13, 1509-14 (1995).

- 83 Garland, S.M. and J.S. Smith, Human papillomavirus vaccines: current status and future prospects. *Drugs* 70, 1079-98 (2010).
- 84 Li, H., S. Nookala, and F. Re, Aluminum hydroxide adjuvants activate caspase-1 and induce IL-1 β and IL-18 release. *J Immunol* 178, 5271-6 (2007).
- 85 Harper, D.M., et al., Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial. *Lancet* 367, 1247-55 (2006).
- 86 Villa, L.L., et al., High sustained efficacy of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus types 6/11/16/18 L1 virus-like particle vaccine through 5 years of follow-up. *Br J Cancer* 95, 1459-66 (2006).
- 87 Paavonen, J., et al., Efficacy of a prophylactic adjuvanted bivalent L1 virus-like-particle vaccine against infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: an interim analysis of a phase III double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 369, 2161-70 (2007).
- 88 Paavonen, J., et al., Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by oncogenic HPV types (PATRICIA): final analysis of a double-blind, randomised study in young women. *Lancet* 374, 301-14 (2009).
- 89 Villa, L.L., et al., Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. *Lancet Oncol* 6, 271-8 (2005).
- 90 Villa, L.L., Prophylactic HPV vaccines: reducing the burden of HPV-related diseases. *Vaccine* 24 Suppl 1, S23-8 (2006).
- 91 The FUTURE II Study group., Effect of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like-particle vaccine on risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2, grade 3, and adenocarcinoma in situ: a combined analysis of four randomised clinical trials. *Lancet* 369, 1861-8 (2007).
- 92 The FUTURE II Study group., Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent high-grade cervical lesions. *N Engl J Med* 356, 1915-27 (2007).
- 93 Munoz, N., et al., Safety, immunogenicity, and efficacy of quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, 18) recombinant vaccine in women aged 24-45 years: a randomised, double-blind trial. *Lancet* 373, 1949-57 (2009).
- 94 Olsson, S.E., et al., Induction of immune memory following administration of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus (HPV) types 6/11/16/18 L1 virus-like particle (VLP) vaccine. *Vaccine* 25, 4931-9 (2007).
- 95 Harper, D.M., et al., Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. *Lancet* 364, 1757-65 (2004).
- 96 Stanley, M., Potential mechanisms for HPV vaccine-induced long-term protection. *Gynecol Oncol* 118, S2-7 (2010).
- 97 Einstein, M.H., et al., Comparison of the immunogenicity and safety of Cervarix and Gardasil human papillomavirus (HPV) cervical cancer vaccines in healthy women aged 18-45 years. *Hum Vaccin* 5, 705-19 (2009).
- 98 FDA licensure of quadrivalent human papillomavirus vaccine (HPV4, Gardasil) for use in males and guidance from the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 59, 630-2.
- 99 Shefer, A., et al., Early experience with human papillomavirus vaccine introduction in the United States, Canada and Australia. *Vaccine* 26 Suppl 10, K68-75 (2008).
- 100 WHO position on HPV vaccines. *Vaccine* 27, 7236-7 (2009).

- 101 Techakehakij, W. and R.D. Feldman, Cost-effectiveness of HPV vaccination compared with Pap smear screening on a national scale: a literature review. *Vaccine* 26, 6258-65 (2008).
- 102 Palmer, K.E., et al., Recombinant vaccines for the prevention of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Exp Mol Pathol* 86, 224-33 (2009).
- 103 Chen, X.S., et al., Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Mol Cell* 5, 557-67 (2000).
- 104 Gaukroger, J.M., et al., Vaccination of cattle with bovine papillomavirus type 4 L2 elicits the production of virus-neutralizing antibodies. *J Gen Virol* 77 (Pt 7), 1577-83 (1996).
- 105 Roden, R.B., et al., Minor capsid protein of human genital papillomaviruses contains subdominant, cross-neutralizing epitopes. *Virology* 270, 254-7 (2000).
- 106 Campo, M.S. and R.B. Roden, Papillomavirus prophylactic vaccines: established successes, new approaches. *J Virol* 84, 1214-20 (2010).
- 107 Day, P.M., et al., Mechanisms of human papillomavirus type 16 neutralization by I2 cross-neutralizing and I1 type-specific antibodies. *J Virol* 82, 4638-46 (2008).
- 108 Moretto, N., et al., Conformation-sensitive antibodies against alzheimer amyloid-beta by immunization with a thioredoxin-constrained B-cell epitope peptide. *J Biol Chem* 282, 11436-45 (2007).
- 109 Rubio, I., et al., Potent anti-HPV immune responses induced by tandem repeats of the HPV16 L2 (20-38) peptide displayed on bacterial thioredoxin. *Vaccine* 27, 1949-56 (2009).
- 110 Rubio, I., et al., The N-terminal region of the human papillomavirus L2 protein contains overlapping binding sites for neutralizing, cross-neutralizing and non-neutralizing antibodies. *Virology* 409, 348-59 (2010).
- 111 Sambrook, J. and Russel, D.W., Molecular Cloning, a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, third edition.
- 112 Fraillery, D., et al., Salmonella enterica serovar Typhi Ty21a expressing human papillomavirus type 16 L1 as a potential live vaccine against cervical cancer and typhoid fever. *Clin Vaccine Immunol* 14, 1285-95 (2007).
- 113 Vincentelli, R., et al., High-throughput automated refolding screening of inclusion bodies. *Protein Sci* 13, 2782-92 (2004).
- 114 Bolotin, A., et al., The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res* 11, 731-53 (2001).
- 115 Kawana, Y., et al., Human papillomavirus type 16 minor capsid protein I2 N-terminal region containing a common neutralization epitope binds to the cell surface and enters the cytoplasm. *J Virol* 75, 2331-6 (2001).
- 116 Pastrana, D.V., et al., Cross-neutralization of cutaneous and mucosal Papillomavirus types with anti-sera to the amino terminus of L2. *Virology* 337, 365-72 (2005).
- 117 Gambhira, R., et al., A protective and broadly cross-neutralizing epitope of human papillomavirus L2. *J Virol* 81, 13927-31 (2007).
- 118 Kondo, K., et al., Neutralization of HPV16, 18, 31, and 58 pseudovirions with antisera induced by immunizing rabbits with synthetic peptides representing segments of the HPV16 minor capsid protein L2 surface region. *Virology* 358, 266-72 (2007).
- 119 Berndt, C., C.H. Lillig, and A. Holmgren, Thioredoxins and glutaredoxins as facilitators of protein folding. *Biochim Biophys Acta* 1783, 641-50 (2008).
- 120 Kawana, K., et al., Safety and immunogenicity of a peptide containing the cross-neutralization epitope of HPV16 L2 administered nasally in healthy volunteers. *Vaccine* 21, 4256-60 (2003).

- 121 Christensen, N.D., et al., Hybrid papillomavirus L1 molecules assemble into virus-like particles that reconstitute conformational epitopes and induce neutralizing antibodies to distinct HPV types. *Virology* 291, 324-34 (2001).
- 122 Campos, S.K. and M.A. Ozbun, Two highly conserved cysteine residues in HPV16 L2 form an intramolecular disulfide bond and are critical for infectivity in human keratinocytes. *PLoS One* 4, e4463 (2009).
- 123 Bossis, I., et al., Interaction of tSNARE syntaxin 18 with the papillomavirus minor capsid protein mediates infection. *J Virol* 79, 6723-31 (2005).
- 124 Ladbury, J.E., et al., Thermodynamic effects of reduction of the active-site disulfide of Escherichia coli thioredoxin explored by differential scanning calorimetry. *Biochemistry* 33, 3688-92 (1994).
- 125 Brown, C.J., et al., Rational design and biophysical characterization of thioredoxin-based aptamers: insights into peptide grafting. *J Mol Biol* 395, 871-83 (2010).
- 126 Mizel, S.B. and J.T. Bates, Flagellin as an adjuvant: cellular mechanisms and potential. *J Immunol* 185, 5677-82 (2010).
- 127 Lu, Z., et al., Expression of thioredoxin random peptide libraries on the Escherichia coli cell surface as functional fusions to flagellin: a system designed for exploring protein-protein interactions. *Biotechnology (N Y)* 13, 366-72 (1995).
- 128 Skountzou, I., et al., Salmonella flagellins are potent adjuvants for intranasally administered whole inactivated influenza vaccine. *Vaccine* 28, 4103-12 (2009).
- 129 Germanier, R. and E. Fuer, Isolation and characterization of Gal E mutant Ty 21a of Salmonella typhi: a candidate strain for a live, oral typhoid vaccine. *J Infect Dis* 131, 553-8 (1975).
- 130 Cheminay, C. and M. Hensel, Rational design of Salmonella recombinant vaccines. *Int J Med Microbiol* 298, 87-98 (2008).
- 131 Baud, D., et al., Improved efficiency of a Salmonella-based vaccine against human papillomavirus type 16 virus-like particles achieved by using a codon-optimized version of L1. *J Virol* 78, 12901-9 (2004).
- 132 van Roosmalen, M.L., et al., Mucosal vaccine delivery of antigens tightly bound to an adjuvant particle made from food-grade bacteria. *Methods* 38, 144-9 (2006).
- 133 Ramirez, K., et al., Neonatal mucosal immunization with a non-living, non-genetically modified Lactococcus lactis vaccine carrier induces systemic and local Th1-type immunity and protects against lethal bacterial infection. *Mucosal Immunol* 3, 159-71 (2009).
- 134 Blander, J.M. and R. Medzhitov, Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. *Nature* 440, 808-12 (2006).
- 135 Yarovsky, F., et al., Toll-like receptor recognition regulates immunodominance in an antimicrobial CD4⁺ T cell response. *Immunity* 25, 655-64 (2006).

Appendice

Tabelle e figure supplementari

Tabella S1

Oligonucleotidi utilizzati per la costruzione dei vettori di espressione pTrx-L2(peptide)_n

Peptidi L2	Polarità	Oligonucleotidi ^a
1-120	Forward	5'-T ACGGTCCG ATGCGACACAAACGTTCTGC-3'
	Reverse	5'-AT CGGACCG CCTGGTGCACCAGCATCAATAA-3'
20-38	Forward	5'- GTCCG AAAACCTGCAAACAGGCGGGCACCTGCCCGCCGGATATTATTCGAAAGTGAAGGCGG CG -3'
	Reverse	5'- GACCG CCCGCCTTCCACTTTTCGAATAATATCCGGCGGGCAGGTGCCCGCCTGTTTGCAGGTTTT CG -3'
28-42	Forward	5'- GTCCG TGCCCGCCGGATATTATTCGAAAGTGAAGGCAAAACCATTGCGGG CG -3'
	Reverse	5'- GACCG CCCGCAATGGTTTTGCCTTCCACTTTTCGAATAATATCCGGCGGGC ACG -3'
56-75	Forward	5'- GTCCG GGCGGCCTGGGCATTGGCACCGGCAGCGGCACCGCGGCCGCACCGGCTATATTCGCTGGG CG -3'
	Reverse	5'- GACCG CCCAGCGGAATATAGCCGGTGCGGCCGCCGGTGCCGCTGCCGGTGCCAATGCCAGGCCGCC CG -3'
64-81	Forward	5'- GTCCG TCGGGTACAGGCGGACGCACTGGGTATATTCCATTGGGAACAAGGCCTCCACAGG CG -3'
	Reverse	5'- GACCG CGCTGTGGGAGGCCTTGTTCGAATGAATATACCCAGTGCGTCCGCCTGTACCCG ACG -3'
96-115	Forward	5'- GTCCG GATCCGGTGGGCCCGCTGGATCCGAGCATTGTGAGCCTGGTGAAGAAAGCAGCTTTATTGG CG -3'
	Reverse	5'- GACCG CCAATAAAGCTGCTTTCTTCCACCAGGCTCACAATGCTCGGATCCAGCGGGCCACCGGAT CG -3'
20-31	Forward	5'- GTCCG AAAACCTGCAAACAGGCGGGCACCTGCCCGCCGGATGG CG -3'
	Reverse	5'- GACCG CCATCCGGCGGGCAGGTGCCCGCCTGTTTGCAGGTTTT CG -3'

^aTutti gli oligonucleotidi (eccetto quelli utilizzati come primer per la reazione di amplificazione del frammento 1-120) codificano per i peptidi L2 di HPV16 indicati; le sequenze in grassetto corrispondono alle estremità protrudenti del sito *Cpol*.

Tabella S2

Solubilità e temperature ottimali di espressione dei polipeptidi Trx-L2

Trx-L2	n ^a	Solubilità (%) ^b	T di espressione (°C) ^c
1-120 ^d	1	0	30
	2	0	30
	3	0	30
20-38	1	90	30
	3	80	30
	9	60	30
	15	40	4
28-42	1	90	30
	4	90	30
	8	80	30
56-75	1	80	30
	4	40	4
64-81	1	90	30
	4	90	30
	8	80	30
96-115	1	80	30
	4	70	30
	8	40	4
108-120	1	90	30
	4	90	30
	7	70	30
	9	60	30

^aMolteplicità degli inserti L2.

^bLa solubilità è stata stimata mediante analisi densitometrica delle singole bande corrispondenti ai polipeptidi Trx-L2 nel lisato totale, nel sovranatante e nella frazione sedimentabile della corrispondente coltura batterica dopo induzione con IPTG; è espressa come percentuale di proteina recuperata dalla frazione sovranatante 'solubile'.

^cDopo induzione con IPTG, le cellule di *E. coli* esprimenti i polipeptidi indicati sono state cresciute per 12 ore a 30 °C o per 96 ore a 4 °C.

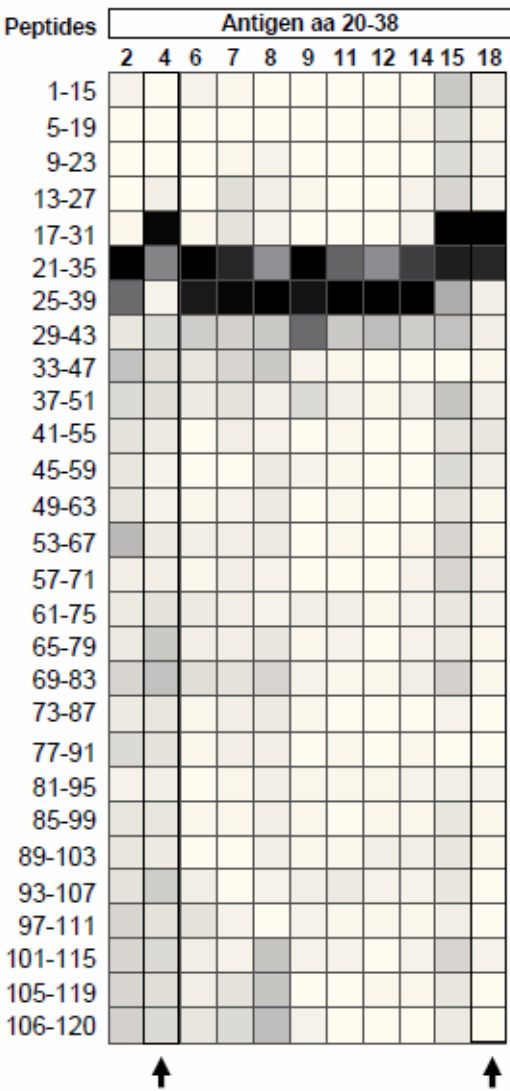
^dLe proteine di fusione Trx-L2(1-120)_n sono state solubilizzate e purificate dai corpi di inclusione in condizioni denaturanti e successivamente rinaturate, come descritto nella sezione 'Materiali e Metodi'.

Tabella S3

Oligonucleotidi utilizzati come primer per le reazioni di amplificazione

No. Rif.	Nome primer	Sequenza (5'-3')
1	FLITRX_Cpol_Fw	CGCGGTCCGTGCAAAATGATCGC
2	FLITRX_KpnI_Re	CAGAACCTGCTGCGGTACC
3	Fli_plus	CATATGACCATGGCACAAGTCATTAATACCA
4	Fli_minus	CCATGGCATATGTTAACCCCTGCAGCAGAGACA
5	FliC-Salm-plus	TAAATATAAACCATGGCACAAGTCATTAATACAAAC
6	FliC-Salm-Minus	AATTATTTTACCATGGTTAACGCAGTAAAGAGAGGACG
7	FliC-Salm-NcoI-plus	TAAATATAAACCATGGCACAAGTCATTAATACAAAC
8	FliC-Salm-XhoI-minus	AATTATTTTACTCGAGTTAACGCAGTAAAGAGAGGACG
9	FliC-SalmCterm-BamHI-plus	ACAGATCCTGGATCCACAAAAGAGGGTGTGATACGA
10	FliC-SalmNterm-BamHI-minus	CTCTTTTGTGGATCCAGGATCTGTACCATTTTTATAGG
11	TRX-Coli-linker1-plus	CGGCAGCGGCGGCGGCGGATCCGCGGATAAAATTATT
12	TRX-Coli-linker1-minus	CACCAGAACCACCACCACCGGATCCCGCTAGGTTAGC
13	TRX-Coli-linker2-plus	TAAATATAAAGATCTAGCGGCGGCGGCGGAGCGGCGGCGGC
14	TRX-Coli-linker2-minus	AATTATTTTAAGATCTTGAACCACCACCACCAGAACCACCACCACC
15	TRX-HIStaglinker-plus	TAAATATAAAGATCTCATCATCATCATCATAGCGGCGGCGGCGGATC
16	Trx-NcoI-Hind-plus	CGCCATGGGCGATAAAATTATTACCC
17	Trx-NcoI-Hind-minus	GGAAGCTTTTACGCCAGGTTAGCGTCGAGGAACT
18	TRXL2(20-38)3-NcoI-plus2	TAAATATAAACCATGGGCGATAAAATTATTCA
19	TRXL2(20-38)3-NcoI-minus2	AATTATTTTACCATGGTTACGCCAGGTTAGCGTCG
20	LysM-AcmA-BamHI-plus	TAAATATAAAGGATCCCGGTGCTTCTCTGCTGGTA
21	LysM-AcmA- BglII-minus	AATTATTTTAAGATCTTTATTTAATACGAAGATATTGACCA

FiguraS1
Pattern di legame dei mAb anti-Trx-L2(20-38) a epitopi peptidici della regione N-terminale di L2 di HPV16



Il legame di differenti mAb, isolati dai topi immunizzati con l'antigene Trx-L2(20-28), a peptidi di 15 aminoacidi sovrapposti alla regione aa 1-120 di L2 di HPV16, è stato verificato mediante ELISA. La reattività dei vari anticorpi con ogni singolo peptide è rappresentata come un quadrato colorato, in cui il nero corrisponde alla più elevata reattività mentre il giallo pallido indica la perdita di reattività; gli anticorpi cross-neutralizzanti K4L2₂₀₋₃₈ e K18L2₂₀₋₃₈ sono evidenziati dalle frecce.

Sequenze nucleotidiche e aminoacidiche

Tioredoxina (Trx) di *Escherichia coli* (Acc. No. YP_003038425.1, GenBank)

[Sequenza nt clonata nei siti *NdeI* *BamHI* di pET28b]

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGGGCGATAAAA
TTATTACCTGACTGACGACAGTTTTGACACGGATGTACTCAAAGCGGACGGGGCGATCCTCGTCGATTTCTG
GGCAGAGTGGTGCGGTCCGTGCAAAATGATCGCCCCGATTCTGGATGAAATCGCTGACGAATATCAGGGCAAA
CTGACCGTTGCAAACTGAACATCGATCAAAACCCTGGCACTGCGCCGAAATATGGCATCCGTGGTATCCCGA
CTCTGCTGCTGTTCAAAAACGGTGAAGTGGCGGCAACCAAAGTGGGTGCACTGTCTAAAGGTCAGTTGAAAGA
GTTCTCGACGCTAACCTGCGGGATCCGAATTGAGCTCCGTGACAAGCTTGCGGCCGCACTCGAGCACCAC
CACCACCACCACTGA

[Sequenza aa]

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMGDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWCGPCKMIAPILDEIADEYQGK
LTVAKLNIDQNPGTAPKYGIRGIPTLLLLFKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLRDPNSSSVDKLAAALEHH
HHHH

Trx-L2(20-31)₃ HPV16

[Sequenza nt clonata nei siti *NdeI* *BamHI* di pET28b]

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGGGCGATAAAA
TTATTACCTGACTGACGACAGTTTTGACACGGATGTACTCAAAGCGGACGGGGCGATCCTCGTCGATTTCTG
GGCAGAGTGGTGCGGTCCGAAAACCTGCAAACAGGCGGGCACCTGCCCCCGGATGGCGGTCCGAAAACCTGC
AAACAGGCGGGCACCTGCCCCCGGATGGCGGTCCGAAAACCTGCAAACAGGCGGGCACCTGCCCCCGGATG
GCGGTCCGTGCAAAATGATCGCCCCGATTCTGGATGAAATCGCTGACGAATATCAGGGCAAACCTGACCGTTGC
AAAACCTGAACATCGATCAAAACCCTGGCACTGCGCCGAAATATGGCATCCGTGGTATCCCGACTCTGCTGCTG
TTCAAAAACGGTGAAGTGGCGGCAACCAAAGTGGGTGCACTGTCTAAAGGTCAGTTGAAAGAGTTCCTCGACG
CTAACCTGCGGGATCCGAATTGAGCTCCGTGACAAGCTTGCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCA
CTGA

[Sequenza aa]

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMGDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWCGPKTKQAGTCPPDGGPKTC
KQAGTCPPDGGPKTKQAGTCPPDGGPCKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNIDQNPGTAPKYGIRGIPTLLLL
FKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLRDPNSSSVDKLAAALEHHHHHHH

Trx-L2(20-38)₃ HPV16

[Sequenza nt clonata nei siti *NdeI* *BamHI* di pET28b]

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGGGCGATAAAA
TTATTACCTGACTGACGACAGTTTTGACACGGATGTACTCAAAGCGGACGGGGCGATCCTCGTCGATTTCTG
GGCAGAGTGGTGCGGTCCGAAAACCTGCAAACAGGCGGGCACCTGCCCCCGGATATTATTCCGAAAGTGGAA
GGCGGCGGTCCGAAAACCTGCAAACAGGCGGGCACCTGCCCCCGGATATTATTCCGAAAGTGGAAAGGCGGGC
GTCCGAAAACCTGCAAACAGGCGGGCACCTGCCCCCGGATATTATTCCGAAAGTGGAAAGGCGGGCGGTCCGTG
CAAAATGATCGCCCCGATTCTGGATGAAATCGCTGACGAATATCAGGGCAAACCTGACCGTTGCAAACTGAAC
ATCGATCAAAACCCTGGCACTGCGCCGAAATATGGCATCCGTGGTATCCCGACTCTGCTGCTGTTCAAAAACG
GTGAAGTGGCGGCAACCAAAGTGGGTGCACTGTCTAAAGGTCAGTTGAAAGAGTTCCTCGACGCTAACCTGCG
GGATCCGAATTGAGCTCCGTGACAAGCTTGCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCACTGA

[Sequenza aa]

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSH**MGDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWC****GP****KTCKQAGT****CPPDIIPKVE**
GGP**KTCKQAGT****CPPDIIPKVE****GGP****KTCKQAGT****CPPDIIPKVE****GGPCKMIAPILDEIADEYQ****GKLT****VAKLNIDQ**
NP**GTAPKYGIRGIPTLLLF****KN****GEVAATKVGALSKG****QLKEFL****DANLRDPNSSSVDKLAAALEHHHHHH**

Trx-L2(20-38)₃ HPV31

[Sequenza nt clonata nei siti *NdeI* *BamHI* di pET28b]

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGGGCGATAAAA
TTATTACCTGACTGACGACAGTTTTGACACGGATGTACTCAAAGCGGACGGGGCGATCCTCGTCGATTTCTG
GGCAGAGTGGTGCGGTCCGCAAACCTGTAAGGCAGCCGGGACCTGCCCCAGTGATGTCATCCCGAAAATTGAA
CATGGTGGGCCACAGACATGTAAAGCCGCGGGCACTTGTCCTTCCGATGTTATCCCTAAGATCGAGCATGGGG
GCCCTCAGACTTGCAAAGCGGCAGGTACTTGCCCATCTGACGTGATTCCAAAAATCGAGCACGGCGGTCCGTG
CAAAATGATCGCCCCGATTCTGGATGAAATCGCTGACGAATATCAGGGCAAATGACCGTTGCAAACTGAAC
ATCGATCAAAACCTTGGCACTGCGCCGAAATATGGCATCCGTGGTATCCCGACTCTGCTGCTGTTCAAAACG
GTGAAGTGGCGGCAACCAAAGTGGGTGCACTGTCTAAAGGTCAGTTGAAAGAGTTCCTCGACGCTAACCTGCG
GGATCCGAATTCGAGCTCCGTGACAAGCTTGCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCACTGA

[Sequenza aa]

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSH**MGDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWC****GP****QTCKAAGT****CP****SDVIPKIE**
HGGP**QTCKAAGT****CP****SDVIPKIE****HGGP****QTCKAAGT****CP****SDVIPKIE****HGGPCKMIAPILDEIADEYQ****GKLT****VAKLN**
IDQ**NP****GTAPKYGIRGIPTLLLF****KN****GEVAATKVGALSKG****QLKEFL****DANLRDPNSSSVDKLAAALEHHHHHH**

Trx-L2(20-38)₃ HPV51

[Sequenza nt clonata nei siti *NdeI* *BamHI* di pET28b]

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGGGCGATAAAA
TTATTACCTGACTGACGACAGTTTTGACACGGATGTACTCAAAGCGGACGGGGCGATCCTCGTCGATTTCTG
GGCAGAGTGGTGCGGTCCGAGTACCTGCAAAGCAGCGGGCACTTGCCCGCTGACGTGTTAATAAAGTCGAG
GGTGGGGGCCCTTCTACTTGTAAGGCGCGGGCACTTGTCACCGGATGTGGTCAACAAGGTGGAGGGCGGTG
GGCCGTCCACATGCAAGGCCGAGGTACCTGCCCTCCAGATGTTGTGAATAAAGTTGAAGGGGCGGTCCGtG
CAAAATGATCGCCCCGATTCTGGATGAAATCGcTGACGAATATCAAGGCAAATGACCGTTGCAAACTGAAC
ATCGATCAAAACCTTGGCACTGCGCCGAAATATGGCATCCGTGGTATCCCGACTCTGCTGCTGTTCAAAACG
GTGAAGTGGCGGCAACCAAAGTGGGTGCACTGTCTAAAGGTCAGTTGAAAGAGTTCCTCGACGCTAACCTGCG
GGATCCGAATTCtAgCTCCGTGACAAGCTTGCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCACTGA

[Sequenza aa]

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSH**MGDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWC****GP****STCKAAGT****CPPDVVNKVE**
GGGP**STCKAAGT****CPPDVVNKVE****GGGP****STCKAAGT****CPPDVVNKVE****GGGPCKMIAPILDEIADEYQ****GKLT****VAKLN**
IDQ**NP****GTAPKYGIRGIPTLLLF****KN****GEVAATKVGALSKG****QLKEFL****DANLRDPNSSSVDKLAAALEHHHHHH**

Trx-L2(20-38) omotrimero

[Sequenza nt clonata nei siti *NdeI* *BamHI* di pET28b]

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGGGCGATAAAA
TTATTACCTGACTGACGACAGTTTTGACACGGATGTACTCAAAGCGGACGGGGCGATCCTCGTCGATTTCTG
GGCAGAGTGGTGCGGTCCGAAAACCTGCAAACAAGCAGGTACTTGTCGCCCGGATATCATCCCGAAGGTCGAG
GGTGGTGGTCCGAAGACTTGTAAGCAGGCGGGCACCTGTCCACCAGACATTATTCCAAAAGTGGAAGGCGGCG
GCCCCAAAACATGTAAACAGGCCGGGACTTGCCCTCCTGACATCATCCCTAAAGTTGAAGGGGGGGGGCCTCA
AACCTGTAAGGCAGCCGGGACCTGCCCCGAGTGATGTCATCCCGAAAATTGAACATGGTGGGCCACAGACTTGC

AAAGCGGCAGGTACTTGCCCATCTGACGTGATTCCAAAAATCGAGCACGGCGGTCCTCAGACATGTAAAGCCG
CGGGCACTTGTCCTTCCGATGTTATCCCTAAGATCGAGCATGGGGGCCCCGAGTACCTGCAAAGCAGCGGGCAC
TTGCCCCGCTGACGTCGTTAATAAAGTCGAGGGTGGGGGCCCTTCTACTTGTAAGGCGGCCGGGACTTGTTCCA
CCGGATGTGGTCAACAAGGTGGAGGGCGGTGGGCCGTCCACATGCAAGGCCGAGGTACCTGCCCTCCAGATG
TTGTGAATAAAGTTGAAAGGGGCGGTCCGTGCAAAATGATCGCCCCGATTCTGGATGAAATCGCTGACGAATA
TCAAGGCAAACCTGACCGTTGCAAACTGAACATCGATCAAAACCCTGGCACTGCGCCGAAATATGGCATCCGT
GGTATCCCGACTCTGCTGCTGTTCAAAAACGGTGAAGTGGCGGCAACCAAAGTGGGTGCACTGTCTAAAGGTC
AGTTGAAAGAGTTCTCTGACGCTAACCTGCGGGATCCGAATTCTAGCTCCGTGACAAGCTTGCGGCCGCACT
CGAGCACCACCACCACCACCCTGA

[Sequenza aa]

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSH**MGDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWC****GP****KTCKQAGT****CPPDIIPKVE**
GGGP**KTCKQAGT****CPPDIIPKVEGGGP****KTCKQAGT****CPPDIIPKVEGGGP****Q****TCKAAGT****CP****SDVIPKIEHGGP****Q****T**
KAAGT**CP****SDVIPKIEHGGP****Q****TCKAAGT****CP****SDVIPKIEHGGP****STCKAAGT****CPPDVVNKVEGGGP****STCKAAGT****CP**
PDVVNKVEGGGP**STCKAAGT****CPPDVVNKVEGGGP****CKMIAPILDEIADEYQ****GKLT****VAKLNIDQNP****GTAPKYGIR**
GIPTLLLLFKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLRDPNSSSV**DKLAAALEHHHHHH**

Trx-L2(20-38) eterotrimerico

[Sequenza nt clonata nei siti *NdeI* *Bam**HI* di pET28b]

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGGGCGATAAAA
TTATTACCTGACTGACGACAGTTTTTGACACGGATGTACTCAAAGCGGACGGGGCGATCCTCGTCGATTTCTG
GGCAGAGTGGTGCGGTCCGAAAACCTGCAAACAAGCAGGTACTTGTCCGCCGGATATCATCCCGAAGGTCGAG
GGTGGTGGTCCGCAAACCTGTAAGGCAGCCGGGACCTGCCCAGTGATGTCATCCCGAAAATTGAACATGGTG
GGCCAAGTACCTGCAAAGCAGCGGGCACTTGCCCGCTGACGTCGTTAATAAAGTCGAGGGTGGGGGCCCTAA
GACTTGTAAGCAGGCGGGCACCTGTCCACCAGACATTATTCAAAAGTGAAGGCGGCGGGCCACAGACTTGC
AAAGCGGCAGGTACTTGCCCATCTGACGTGATTCCAAAAATCGAGCACGGCGGTCCTTCTACTTGTAAGGCGG
CCGGGACTTGTCCACCGGATGTGGTCAACAAGGTGGAGGGCGGTGGGCCGAAAACATGTAAACAGGCCGGGAC
TTGCCCTCCTGACATCATCCCTAAAGTTGAAGGGGGGGGGCCTCAGACATGTAAAGCCGCGGGCACTTGTCTT
TCCGATGTTATCCCTAAGATCGAGCATGGGGGCCGTCCACATGCAAGGCCGAGGTACCTGCCCTCCAGATG
TTGTGAATAAAGTTGAAGGGGCGGTCCGTGCAAAATGATCGCCCCGATTCTGGATGAAATCGCTGACGAATA
TCAAGGCAAACCTGACCGTTGCAAACTGAACATCGATCAAAACCCTGGCACTGCGCCGAAATATGGCATCCGT
GGTATCCCGACTCTGCTGCTGTTCAAAAACGGTGAAGTGGCGGCAACCAAAGTGGGTGCACTGTCTAAAGGTC
AGTTGAAAGAGTTCTCTGACGCTAACCTGCGGGATCCGAATTCTAGCTCCGTGACAAGCTTGCGGCCGCACT
CGAGCACCACCACCACCACCCTGA

[Sequenza aa]

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSH**MGDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWC****GP****KTCKQAGT****CPPDIIPKVE**
GGGP**Q****TCKAAGT****CP****SDVIPKIEHGGP****STCKAAGT****CPPDVVNKVEGGGP****KTCKQAGT****CPPDIIPKVEGGGP****Q****T**
KAAGT**CP****SDVIPKIEHGGP****STCKAAGT****CPPDVVNKVEGGGP****KTCKQAGT****CPPDIIPKVEGGGP****Q****TCKAAGT****CP**
SDVIPKIEHGGP**STCKAAGT****CPPDVVNKVEGGGP****CKMIAPILDEIADEYQ****GKLT****VAKLNIDQNP****GTAPKYGIR**
GIPTLLLLFKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLRDPNSSSV**DKLAAALEHHHHHH**

Tioredoxina (Trx) di *Methanosaeta thermophila* (Acc. No. YP_843141.1, GenBank)

[Sequenza nt clonata nel sito *NdeI* di pET28b]

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGGATGAACTGG
ATGAAATTCGTGCTGTAAGAACTGGAAGAACTGAAACGTGAACTGGCGGCGCGTAGCCAGGGCACCCCGACCAT
TGAATATCCGGATCGTCCGGTGCTGGTGACCGATAGCAGCATTGATGCGGGCATTGCTCAGTATCCGGTGTTT
GTGGTGGATTGCTGGGCGGAATGGTGCGGTCCGTGCCGTGCGATTGCGCCGGTGATTGATGAAATGGCGCGTG
AACTGAAAGGCCGTGTGGTGTGTTGGCAAACCTGAACGTGGATCAGAACCCGCTGACCAGCCGTAAATATGGCAT
TACCGCGATTCCGACCCTGCTGGTGTTTCGTAACGGCCGTCTGGTGGATCGTCTGGTGGGCGCGTATCCGAAA
CAGATTCTGATGAGCCGTGTGCGTAAATATCTGGATAAGCTTCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAA
TGGGTGCGGATCCGAATTCGAGCTCCGTGACAAGCTTGCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACC

[Sequenza aa]

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSH**MDELDEIRRKLEELKRELAARSQGTPTIEYPDRPVLVTDSSIDAGIRQYPVF**
VVDCWAEWCGPCRAIAPVIDEMARELKGRVVFGLNVDQNPLTSRKYGITAIPTLLVFRNGRLVDRLVGAYPK
QILMSRVRKYLDKLHMASMTGGQQMGRDPNSSSVDKLAAALEHHHHHH

Tioredoxina (Trx) di *Pyrococcus furiosus* (Acc. No. NP_578470.1, GenBank)
(hypothetical protein)

[Sequenza nt clonata nel sito *NdeI* di pET28b]

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGATTATCGAGT
ATGACGGCGAAATCGACTTCACCAAAGGTCGTGTTGTACTGTGGTTTAGCATTCCGGGATGCGGTCCGTGTCG
TCTGGTTGAACGCTTCATGACCGAACTGAGCGAGTATTTTGAGGATATCCAAATTGTCCATATCAATGCCGGC
AAATGGAAAAACATCGTAGACAAATTCAATATTCTGAACGTGCCGACCCTGGTATATCTGAAAGATGGCCGTG
AGGTTGGACGCCAAAACCTGATTCTGTTCTAAAGAAGAGATTCTGAAAAACTGAAAGAGCTGCAGGAGAAACA
TATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAATGGGTGCGGATCCGAATTCGAGCTCCGTGACAAGCTTGCGGCC
GCACTCGAGCACCACCACCACCACCAC

[Sequenza aa]

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSH**MIIEYDGEIDFTKGRVVLWFSIPGCGPCRLVERFMTELSEYFEDIQIVHINAG**
KWKNIVDKFNILNVPTLVYLKDGREVGRRQNLIIRSKEEILKKLKELOEKHMASMTGGQQMGRDPNSSSVDKLAA
ALEHHHHHH

Flagellina di *Escherichia coli* fusa alla Tioredoxina (pFLITRX, Invitrogen)

[Sequenza nt clonata nel sito *NcoI* di pET28b]

CATATGACCATGGCACAAGTCATTAATACCAACAGCCTCTCGCTGATCACTCAAAATAATATCAACAAGAACC
AGTCTGCGCTGTCGAGTTCTATCGAGCGTCTGTCTTCTGGCTTGCGTATTAACAGCGCGAAGGATGACGCAGC
GGGTCAGGCGATTGCTAACC GTTTACCTCTAACATTAAAGGCCTGACTCAGGCGGCCCGTAACGCCAACGAC
GGTATCTCCGTTGCGCAGACCACCGAAGGCGCGCTGTCCGAAATCAACAACAACCTTACAGCGTGTGCGTGAAC
TGACGGTACAGGCCACTACCGGTACTAACTCTGAGTCTGATCTGTCTTCTATCCAGGACGAAATTAAATCCCG
TCTGGATGAAATTGACCGCGTATCTGGTCAGACCCAGTTCAACGGCGTGAACGTGCTGGCAAAAAATGGCTCC
ATGAAAATCCAGGTTGGCGCAAATGATAACCAGACTATCACTATCGATCTGAAGCAGATTGATGCTAAACTC
TTGGCCTTGATGGTTTTAGCGTTAAAAATAACGATACAGTTACCACTAGTGCTCCAGTAACTGCTTTTGGTGC
TACCACCACAAACAATATTAACTTACTGGAATTACCCTTTCTACGGAAGCAGCCACTGATACTGGCGGAACT
AACCCAGCTTCAATTGAGGGTGTTTATACTGATAATGGTAATGATTACTATGCGAAAATCACCGGTGGTGATA
ACGATGGTATGAGCGATAAAATTATTCACCTGACTGACGACAGTTTTGACACGGATGTACTCAAAGCGGACGG
GGCGATCCTCGTCGATTTCTGGGCAGAGTGGTGCGGTCCGTGCAAAATGATCGCCCCGATTCTGGATGAAATC
GCTGACGAATATCAGGGCAAACCTGACCGTTGCAAACTGAACATCGATCAAAACCTGGCACTGCGCCGAAAT
ATGGCATCCGTGGTATCCCGACTCTGCTGCTGTTCAAAAACGGTGAAAGTGGCGGCAACCAAAGTGGGTGCACT
GTCTAAAGGTCAGTTGAAAAGAGTTCTCGACGCTAACCTGGCCTGTGCCGCCAGTTCTCCAACCGCGGTCAAA
CTGGGCGGAGATGATGGCAAAACAGAAAGTGGTGCATATTGATGGTAAAACATACGATTCTGCCGATTTAAATG
GCGGTAATCTGCAACAGGTTTGACTGCTGGTGGTGAGGCTCTGACTGCTGTTGCAATGGTAAAACACCGGA
TCCGCTGAAAGCGCTGGACGATGCTATCGCATCTGTAGACAAATTCCGTTCTTCCCTCGGTGCGGTGCAAAAC
CGTCTGGATTCCGCGGTTACCAACCTGAACAACACCACTACCAACCTGTCTGAAGCGCAGTCCCGTATTACAG
ACGCCGACTATGCGACCGAAGTGTCCAATATGTCGAAAGCGCAGATCATCCAGCAGGCCGGTAACTCCGTGTT
GGCAAAAGCTAACCAGGTACCGCAGCAGGTTCTGTCTCTGCTGCAGGGTTAACATATG

[Sequenza aa]

HMT**MAQVINTNSLSLITQNNINKNQSALSSSIERLSSGLRINSKDDAAGQAIANRFTSNIKGLTQAARNANDGISVAQT**
TEGALSEINNQLQVRRELTQATTGTNSESDLSSIQDEIKSRLDEIDRVSGQTQFNGVNVLAKNGSMKIQVGANDNQIT
IDLKQIDAKTLGLDGFVKNNDTVTTSAPVTAFGATTTNNIKLTGITLSTEAATDTGGTNPASIEGVYTDNGNDYYAKIT
GGDNDGMSDKIIHLTDDSFDTDLKADGAILVDFWAEWCGPCMKIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNIDQNPGTAPKYGIR
GIPTLLLLFKNGEVAATKVGALESKGQLKEFLDANLACAASSPTAVKLGDDGKTEVVDIDGKTYDSADLNGGNLQGTGTAG

GEALTAVANGKTTDPLKALDDAIASVDKFRSSLGAVQNRLLDSAVTNLNNNTTTLNLSEAQSRIQDADYATEVSNMSKAQIIQ
QAGNSVLAKANQVPQVLSLLQG

Flagellina di *Salmonella typhi* fusa alla Tiorredossina
(Acc. No. AAA27067.1, GenBank)

[Sequenza nt clonata nei siti *NcoI* e *XhoI* di pET28b]

CCATGGCACAAGTCATTAATACAAACAGCCTGTCGCTGTTGACCCAGAATAACCTGAACAAATCCCAGTCCGCACTGGGC
ACTGCTATCGAGCGTTTGTCTTCCGGTCTGCGTATCAACAGCGCGAAAGACGATGCGGCAGGACAGGCGATTGCTAACCG
TTTACC CGCAACATCAAAGGTCTGACTCAGGCTTCCCCTAACGCTAACGACGGTATCTCCATTGCGCAGACCACTGAAG
GCGCGCTGAACGAAATCAACAACAACCTGCAGCGTGTGCGTGAAGTGGCGGTTTCACTCTGCGAATGGTACTAACTCCCAG
TCTGACCTCGACTCCATCCAGGCTGAAATCACCCAGCGCCTGAACGAAATCGACCGTGTATCCGGCCAGACTCAGTTCAA
CGGCGTGAAAGTCTTGGCGCAGGACAACACCCTGACCATCCAGGTTGGTGCCAACGACGGTGAAACTATCGATATTGATT
TAAAAGAAATCAGCTCTAAAACACTGGGACTTGATAAGCTTAATGTCCAAGATGCCTACACCCCGAAAGAAACTGCTGTA
ACCGTTGATAAACTACCTATAAAAATGGTACAGATCCTGGATCTCATCATCATCATCATAGCGGCGGGCGGCGGATC
CGGCGATAAAATTATTACCTGACTGACGACAGTTTTGACACGGATGTACTCAAAGCGGACGGGGCGATCCTCGTCGATT
TCTGGGCAGAGTGGTGGGTCGGTGC AAAATGATCGCCCCGATTCTGGATGAAATCGCTGACGAATATCAGGGCAAACCTG
ACCGTTGCAAACTGAACATCGATCAAAACCCTGGCACTGCGCCGAAATATGGCATCCGTGGTATCCCGACTCTGCTGCT
GTTCAAAAACGGTGAAGTGGCGGCAACCAAAAGTGGGTGCACTGTCTAAAGGTCAGTTGAAAGAGTTCTCGACGCTAACCC
TAGCGGGATCCGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCAAGATCCACAAAAGAGGGTGTGATACGACCACAGTTGCG
GCTCAACTTGCTGCAGCAGGGGTTACTGGCGCCGATAAGGACAATACTAGCCTTGTA AAAACTATCGTTTGAGGATAAAAA
CGGTAAGGTTATTGATGGTGGCTATGCAGTGAAAATGGGCGACGATTTCTATGCCGCTACATATGATGAGAAAACAGGTG
CAATTACTGCTAAAACCACTACTTATACAGATGGTACTGGCGTTGCTCAAACCTGGAGCTGTGAAATTTGGTGGCGCAAAT
GGTAAATCTGAAGTTGTTACTGCTACCGATGGTAAGACTTACTTAGCAAGCGACCTTGACAAACATAACTTCAGAACAGG
CGGTGAGCTTAAAGAGGTTAATACAGATAAGACTGAAAACCCACTGCAGAAAATTGATGCTGCCTTGGCACAGGTTGATA
CACTTCGTTCTGACCTGGGTGCGGTTCAGAACCGTTTCAACTCCGCTATCACCACCTGGGCAATACCGTAAATAACCTG
TCTTCTGCCCCTAGCCGTATCGAAGATTCGCACTACGCAACCGAAGTCTCCAACATGTCTCGCGCGCAGATTCTGCAGCA
GGCCGGTACCTCCGTTCTGGCGCAGGCGAACAGGTTCCGCAAAACGTCCTCTCTTTACTGCGTTAACTCGAG

[Sequenza aa]

MAQVINTNSLSLLTQNNLNKSQSALGTAIERLSSGLRINSKDDAAGQAIANRFTANIKGLTQASRNANDGIS
IAQTTEGALNEINNNLQRVRELAVQSANGTNSQSDLSIQAEITQRLNEIDRVSGQTQFNGVKVLAQDNTLTI
QVGANDGETIDIDLKEISSKTLGLDKLNVQDAYTPKETAVTVDKTTYKNGTDPGSHHHHHHSGGGSGDKIIH
LTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWCGPCKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNIDQNPGTAPKYGIRGIPTLL
LFKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLAGSGGGGSGGGGSRSTKEGVDTTTVAAQLAAAGVTGADKDNTSLV
KLSFEDKNGKVIDGGYAVKMGDDFYAATYDEKTGAITAKTTTTYTDGTGVAQTGAVKFGGANGKSEVVTATDGK
TYLASDLDKHNFRGTGGELKEVNTDKTENPLQKIDAALAQVDTLRSDLGAVQNRFNSAITNLGNTVNNLSSARS
RIEDSDYATEVSNMSRAQILQQAGTSVLAQANQVPQNVLSLLR

LysM di *Acma* di *L. lactis* fuso alla Tiorredossina
(Acc. No. ZP_05745122.1, GenBank)

[Sequenza nt clonata nel sito *BamHI* di pET28-Trx-L2(20-38)₃]

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGGGCGATAAAATTATTCA
CCTGACTGACGACAGTTTTGACACGGATGTACTCAAAGCGGACGGGGCGATCCTCGTCGATTTCTGGGCAGAGTGGTGCG
GTCCGAAAACCTGCAACAGGCGGGCACCTGCCGCGCGGATATTATTCCGAAAGTGGAAGGCGGCGGTCCGAAAACCTGC
AAACAGGCGGGCACCTGCCGCGCGGATATTATTCCGAAAGTGGAAGGCGGCGGTCCGAAAACCTGCAACAGGCGGGCAC
CTGCCGCGCGGATATTATTCCGAAAGTGGAAGGCGGCGGTCCGTGCAAAATGATCGCCCCGATTCTGGATGAAATCGCTG
ACGAATATCAGGGCAAACCTGACCGTTGCAAACTGAACATCGATCAAAACCCTGGCACTGCGCCGAAATATGGCATCCGT
GGTATCCCGACTCTGCTGCTGTTCAAAAACGGTGAAGTGGCGGCAACCAAAAGTGGGTGCACTGTCTAAAGGTCAGTTGAA
AGAGTTCTCTGACGCTAACCTGCGGGATCCCGGTGCTTCTTCTGCTGGTACTTCTAATTCCGGTGGTTCAACAGCTACAA
ATACCAATAATAATTCAAATACAAGCTCAACCACTTATACAGTTAAATCTGGCGATACACTTTGGGGAATTTGCAAAAA
TATGGAATTAGTGTTGCTCAAATCAAAGCGCAAACAATCTTAAAGTACAGTCATCTATATTGGGCAAAAGCTTGTATT
GACAACTTCAAGTTCTTCGTCTAATACAAATAGTTCAACTTCTTCAGGAAATCTGCGGAACTACAACGCCTACTACTT
CGGTCACTCCTGCCAAACCAGCTTCACAGACGACGATTAAGGTTAAATCTGGTGATACGCTTTGGGGACTCTCTGTCAA
TATAAACGACGATTGCTCAACTCAAGAGTTGGAATCATTTGAATTCTGATACAATTTTCATTGGACAAAACCTTGATTGT
TTCACAACTGCCGGTTCTTCAAGTTCTTCAACAGGTTCAAGCTCAGCCTCTACGAGTTCAACTTCTAACTCTTCTGCAG

Appendice

CTTCAAATACCTCTATCCATAAGGTTGTTAAAGGAGATACGCTTTGGGGACTTTCACAAAAATCTGGTAGCCCAATTGCT
TCAATTAAGGCTTGGAATCATTATCAAGTGATACCATTTAATTGGTCAATATCTTCGTATTAAATAAAGATCT

[Sequenza aa]

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMGDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWCGPKTCKQAGTCPPDIIPKVE
GGGPKTCKQAGTCPPDIIPKVEGGGPKTCKQAGTCPPDIIPKVEGGPCKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLN
IDQNPGTAPKYGIRGIPTLLLFKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLRDPGASSAGTSNSGGSTATNTNNNS
NTSSTTYTVKSGDTLWGISQKYGISVAQIQSANNLKSTVIYIGQKLVLTSSSSSNTNSSTSSGNSAGTTTPT
TSVTPAKPASQTTIKVKSGDTLWGLSVKYKTTIAQLKSWNHLNSDTIFIGQNLIVSQSAGSSSSSTGSSSAST
SSTSNSSAASNTSIHKVVKGDTLWGLSQKSGSPIASIKAWNHLSSDTILIGQYLRIK

Pubblicazioni

Rubio, I., Bolchi, A., Moretto, N., **Canali, E.**, Gissmann, L., Tommasino, M., Müller, M., Ottonello, S., Potent anti-HPV immune responses induced by tandem repeats of the HPV16 L2(20-38) peptide displayed on bacterial thioredoxin. *Vaccine* 27,1949-56 (2009).

Rubio, I., Seitz, H., **Canali, E.**, Sehr, P., Bolchi, A., Tommasino, M., Ottonello, S., Müller, M., The N-terminal region of the human papillomavirus L2 protein contains overlapping binding sites for neutralizing, cross-neutralizing and non-neutralizing antibodies. *Virology* 409, 348-59 (2010).