

5. Discussione

Il genere *Simplexvirus* comprende due specie, HSV-1 e HSV-2, che, oltre che dal punto di vista sierologico, si distinguono anche per il tipo di malattia ad essi associata. HSV-1 è principalmente responsabile di infezioni oro-facciali, come la gengivo-stomatite primaria e l'*herpes labialis*, mentre HSV-2 si ritrova prevalentemente in infezioni a livello ano-genitale, come l'*herpes genitalis*. Oggi tuttavia tale distinzione non è più così netta, a causa dei cambiamenti nelle abitudini sessuali, soprattutto nei Paesi sviluppati. HSV si trasmette attraverso intimo contatto tra individuo suscettibile e infetto. Le infezioni ad esso associate costituiscono un disagio sia per il soggetto immunocompetente a causa della durata delle lesioni, dei sintomi e delle complicanze (come encefalite erpetica e meningite), sia soprattutto per il soggetto immunocompromesso in cui le manifestazioni sono più severe e gravi. Se contratte in gravidanza, le infezioni per il feto possono essere invalidanti (nel caso di infezioni localizzate) o addirittura letali (nei casi di malattia disseminata ed encefalite erpetica) (cfr. § 1.6). Le terapie oggi disponibili possono ridurre la severità dei sintomi, favorire la guarigione delle lesioni e prevenire le ricorrenze, tuttavia non sono in grado di eradicare il virus (§ 1.8) che, una volta acquisito, permane tutta la vita. HSV ha una prevalenza elevata nella popolazione mondiale (§ 1.7), soprattutto nei Paesi in via di sviluppo. Qui aumenta l'incidenza delle infezioni da HIV a causa della maggior suscettibilità nei soggetti HSV positivi ad altre STD e, in particolare, all'acquisizione di HIV. In un contesto simile è auspicabile un vaccino, che per essere realmente efficace dovrebbe prevenire l'infezione piuttosto che la malattia, per impedire la diffusione del virus da parte di eventuali soggetti con malattia asintomatica. I vaccini ad oggi sperimentati non si sono dimostrati protettivi perché incapaci di stimolare la componente cellulo-mediata del

sistema immune, principale protagonista nel controllo dell'infezione (§ 1.9). Un nuovo approccio nel panorama della vaccinazione è rappresentato dai vettori virali, capaci di veicolare geni eterologhi in cellule bersaglio specifiche, così che l'espressione degli antigeni corrispondenti da parte di queste possa evocare una risposta cellulo-mediata.

I vettori lentivirali, con la loro capacità di integrarsi nel genoma della cellula ospite, permettono un'espressione genica più duratura. Inoltre, a differenza dei vettori retrovirali, sono capaci di trasdurre sia cellule in attiva proliferazione che quiescenti. Su queste premesse, nel nostro laboratorio è stato utilizzato un vettore FIV-derivato, LAW34-gB1. Esso rappresenta un vantaggio in termini di sicurezza, poiché FIV non è patogeno per l'uomo. In LAW34-gB1 è stato clonato il gene gB1 per l'utilizzo in esperimenti di vaccinazione contro HSV-1 e HSV-2. La sua produzione richiede un sistema *split-component*, in cui *packaging* ed *envelope* sono forniti da plasmidi separati dal costrutto veicolante il gene di interesse per diminuire la probabilità di formazione di ricombinanti. La presenza in 5' di un promotore eterologo, che nel nostro caso è quello di CMV, permette la produzione del vettore in cellule non feline. Essendo il nostro un vettore SIN viene ridotto anche il rischio di mutagenesi inserzionali. LAW34-gB1 è stato precedentemente caratterizzato *in vitro*, dove si è rivelato efficace nel trasdurre vari istotipi cellulari compresi cellule del sistema immunitario, quali linfociti e cellule dendritiche murine. Dopo la caratterizzazione *in vitro* è stato allestito, come prima valutazione, un protocollo vaccinale contro HSV-1 testando in parallelo LAW34-gB1 pseudotipizzato con VSV-G e con RD114/TR, ma con quest'ultimo non sono stati ottenuti buoni risultati in termini di protezione. Questo ha dimostrato come i vettori pseudotipizzati con VSV-G siano maggiormente impiegabili in esperimenti *in vivo*, nonostante il

maggior tropismo cellulare (§ 1.11) e ne ha permesso l'utilizzo anche nel protocollo contro HSV-2. Il protocollo vaccinale è stato allestito dividendo i topi in tre gruppi: vaccinati con il vettore esprime la gB1, trattati con il vettore vuoto e *naïve*. Sono stati eseguiti due inoculi a distanza di una settimana tra loro e a livello della pianta del piede e un terzo intradermico a due settimane dal secondo inoculo. La strategia vaccinale è stata scelta sulla base di altri protocolli presenti in letteratura (Pack et al., 2008) ed in considerazione della maggior presenza di cellule presentanti l'antigene in questi siti (Jazayeri et al., 2009; Kim et al., 2004). È seguito poi il *challenge* con HSV-1 a tre settimane dall'ultima vaccinazione e il monitoraggio dei topi per circa 15 giorni. La vaccinazione con LAW34-gB1 ha dimostrato di conferire una buona protezione, poiché la malattia si è manifestata solo in pochi soggetti e con sintomi più lievi rispetto ai gruppi di controllo. Basandosi su tali esperimenti, è stato allestito un protocollo vaccinale simile su HSV-2 utilizzando ancora gB1, che può dare risposta immunocrociata verso HSV-2 (Gierynska et al., 2002). Sono state inoltre valutate le risposte cellulo-mediata e umorale e la protezione conferita in seguito al *challenge*. La risposta cellulo-mediata e in particolare la risposta dei CD8⁺, che sono i maggiori responsabili nel controllo dell'infezione da HSV (Aurelian, 2004), è stata valutata mediante *intracellular staining*, effettuato su linfociti prelevati dalle milze di topi LAW34-gB1 e LAW34 sacrificati dopo ogni inoculo. Nei topi vaccinati è stato osservato un aumento dei linfociti T CD8⁺ specifici per gB1 fino al raggiungimento di un *plateau* a 7 giorni dal secondo inoculo, per lo stabilizzarsi di una popolazione fissa di cellule della memoria nella milza, in accordo con altri lavori passati (Andersen et al., 2000). La stimolazione non ha sortito alcun effetto né per i topi trattati con LAW34, né in seguito a stimolazione con lo *scramble* nei vaccinati stessi, ad ulteriore conferma della specificità della risposta osservata verso gB1. Il siero prelevato dagli stessi

topi ha permesso di valutare anche l'andamento della risposta umorale, che ha evidenziato come la vaccinazione con LAW34-gB1 si sia dimostrata efficace nello stimolare la produzione di IgG anti-HSV. Le Ig-G, infatti, sono poco rilevabili dopo il primo inoculo, ma aumentano in maniera progressiva dopo gli inoculi successivi, come avviene nelle normali risposte primaria e secondaria alle infezioni naturali. Questo è in accordo con i risultati di altri esperimenti di vaccinazione in cui sono state impiegate glicoproteine di HSV, ma che purtroppo non si sono rivelate efficaci in termini di protezione, perchè incapaci di sviluppare una altrettanto adeguata risposta cellulo-mediata (cfr. § 1.9) (Aurelian, 2004).

A circa tre settimane dal terzo inoculo è stato effettuato il *challenge* con HSV-2. Come atteso dai risultati ottenuti dalla risposta immunitaria, LAW34-gB1 ha mostrato protezione nel 50% degli animali e la media dello score delle lesioni non è andata oltre lo stadio 1, dal momento che nei malati i sintomi sono stati lievi. I due morti possono essere stati causati da errori durante gli inoculi o da caratteristiche individuali che possono in qualche modo avere impedito lo sviluppo di una risposta immune a seguito della vaccinazione. Nei topi trattati con LAW34, in cui le risposte cellulo-mediata e umorale non hanno mostrato aumenti significativi dopo ogni inoculo, non si è avuta invece protezione, come dimostrato dalla media dello score delle lesioni che si è portata quasi fino allo stadio 3, con un andamento equiparabile a quello che si è avuto nel caso dei topi *naïve*. A 13 giorni dal *challenge* è stato eseguito un tampone vaginale da topi positivi e negativi al *challenge* e scelti casualmente da ciascun gruppo. Sulle cellule di sfaldamento dell'epitelio vaginale è stato ricercato il genoma di HSV-2 per verificare l'assenza o la presenza dell'infezione indipendentemente dai sintomi. Nei topi vaccinati con LAW34-gB1 e risultati negativi al *challenge*, l'assenza di malattia e quindi la

protezione ha trovato conferma anche dai test *in vitro*, compreso il *western blot* eseguito 24 giorni dopo il *challenge* e che ha mostrato anticorpi verso la sola gB1. Il topo di controllo trattato con LAW34 e risultato non infetto all'analisi macroscopica ha dato, come atteso, anche una PCR negativa, confermando che il topo ha effettivamente resistito al *challenge* per cause che non sono state indagate. A conferma dell'assenza di infezione il *western blot* ha dato risultato negativo. Il *naïve* di controllo, positivo all'analisi macroscopica, ha dato come atteso sia PCR positiva, sia un *western blot* con anticorpi verso HSV-2.

Dai nostri esperimenti, che tuttavia necessitano di ulteriori conferme con un numero più elevato di animali, si può concludere che LAW34-gB1 ha dimostrato di poter indurre risposta immunocrociata e protezione anche verso HSV-2. La risposta immune ha coinvolto sia la componente umorale che cellulo-mediata. L'analisi macroscopica effettuata sui topi sfidati con HSV-2 si è rivelata un utile mezzo per valutare l'esito del *challenge*, ed ha trovato conferma sia nella PCR volta a rilevare la presenza o assenza di genoma virale, sia nel *western blot* volto a cercare eventuali anticorpi verso HSV-2. Il *western blot* ha evidenziato inoltre un pattern anticorpale diverso nei vaccinati con LAW34-gB1 e negativi al *challenge* (anticorpi verso la sola gB1) rispetto al topo LAW34 su cui il virus non ha attecchito (*western blot* negativo) o all'animale *naïve* che ha contratto l'infezione ed ha sviluppato anticorpi contro più proteine di HSV. Questo risultato ha confermato ancora una volta come la vaccinazione sia stata in grado di dare protezione proprio in virtù della capacità di indurre risposta specifica verso gB1.

In conclusione possiamo affermare quindi che il vettore da noi sperimentato si è dimostrato capace di proteggere efficacemente sia dall'infezione da HSV-1 che da HSV-2. I risultati ottenuti stimolano l'allestimento di nuovi test con un

numero maggiore e statisticamente più significativo di campioni. Esperimenti futuri saranno volti inoltre alla produzione di un vettore maggiormente immunogeno. Abbiamo già prodotto ed avviato una serie di test su un vettore bicistronico, capace di esprimere contemporaneamente sia il gene codificante gB1 sia il gene codificante ICP27, proteina IE coinvolta nelle prime fasi di replicazione virale e altamente immunogena.