

Donatella Negri
Dipartimento di Malattie Infettive
Reparto IMMUNOLOGIA
Istituto Superiore di Sanità
Viale Regina Elena, 299 - ROMA
Tel: 06/4990 2734-3588
dontella.negri@iss.it

La ricerca del nostro laboratorio è volta allo **sviluppo, validazione e ottimizzazione di nuovi approcci vaccinali in modelli preclinici**. A tale scopo vengono utilizzati diversi sistemi di veicolazione di antigeni virali (HIV-1, Influenza, HPV, Ebola) o tumorali (antigeni modello e di melanoma) in presenza o assenza di adiuvanti, somministrati a livello sistemico o mucosale in modelli preclinici. **Il progetto principale del nostro gruppo di ricerca riguarda lo sviluppo di vaccini genetici basati su vettori lentivirali integrasi-difettivi (IDLV) per la veicolazione degli antigeni vaccinali.** Grazie a mutazioni introdotte nella proteina integrasi, IDLV non si integra nella cellula bersaglio, rimanendo in forma episomale (E-DNA) [1]. Il materiale genetico inserito nel vettore consiste solo del gene codificante l'antigene di interesse (transgene) che rimane espresso per lungo tempo in cellule non proliferanti [2, 3], quali cellule dendritiche e macrofagi, essenziali per l'induzione della risposta immunologica o nelle cellule muscolari, sito preferenziale di inoculo dei vaccini. Abbiamo dimostrato l'efficacia di IDLV in diverse strategie vaccinali preventive e terapeutiche, in modelli preclinici murini e nei primati non umani [5-13].

Progetto: Ci proponiamo di ottimizzare la piattaforma vaccinale basata su IDLV mediante strategie volte all'aumento del livello di espressione dell'antigene, soprattutto nell'ambito di antigeni poco immunogenici e antigeni self, come nel caso di antigeni tumorali. Una delle strategie riguarda l'utilizzo di una classe di farmaci già in uso in clinica come antitumorali (*histone deacetylases inhibitors*, HDACi), in grado di aumentare significativamente l'espressione del transgene *in vitro* nelle cellule trasdotte con IDLV. L'espressione dell'antigene veicolato da IDLV sarà quindi valutata *in vivo* mediante tecniche di imaging (IVIS), a diversi tempi dall'inoculo. I topi saranno inoculati per via intramuscolare o sottocutanea con IDLV da solo o in combinazione con diversi farmaci HDACi, somministrati nello stesso sito o per via sistemica. Animali inoculati con vettori lentivirali integrasi-competenti saranno utilizzati come controllo positivo di alta espressione dell'antigene. La presenza della risposta immunologica antigene-specifica sarà valutata nel sangue degli animali immunizzati per tutta la durata dello studio.

Metodologie: Per lo svolgimento del progetto verranno utilizzate metodiche di biologia molecolare, quali estrazione di DNA e RNA, clonaggi, trasfezioni e PCR. Tecniche di biologia cellulare, quali mantenimento di cellule di linea, produzione dei vettori IDLV, isolamento di cellule del sistema immunitario dagli animali in sperimentazione. Verranno effettuati saggi *in vitro* per la valutazione delle risposte immunitarie specifiche, quali ELISA per la risposta anticorpale e ELISPOT per la risposta cellulare. Acquisizione delle immagini mediante lo strumento IVIS Lumina III per valutare l'espressione del transgene *in vivo* nei topi inoculati con IDLV.

Bibliografia

1. Vargas J Jr, Gusella GL, Najfeld V, Klotman ME, Cara A. Novel integrase-defective lentiviral episomal vectors for gene transfer. *Hum Gene Ther.* 2004 Apr;15(4):361-72.
2. Cara A, Klotman ME. Retroviral E-DNA: persistence and gene expression in nondividing immune cells. *J Leukoc Biol.* 2006 Nov;80(5):1013-7.
3. Negri DR, Bona R, Michelini Z, Leone P, Macchia I, Klotman ME, Salvatore M, Cara A. Transduction of human antigen-presenting cells with integrase-defective lentiviral vector enables functional expansion of primed antigen-specific CD8(+) T cells. *Hum Gene Ther.* 2010 Aug;21(8):1029-35.
4. Wanisch K, Yanez-Munoz RJ. Integration-deficient lentiviral vectors: a slow coming of age. *Mol Ther*2009;17:1316-32.
5. Negri DR, Michelini Z, Baroncelli S, Spada M, Vendetti S, Buffa V, Bona R, Leone P, Klotman ME, Cara A. Successful immunization with a single injection of non-integrating lentiviral vector. *Mol Ther.* 2007 Sep;15(9):1716-23.
6. Negri DR, Michelini Z, Bona R, Blasi M, Filati P, Leone P, Rossi A, Franco M, Cara A. Integrase-defective lentiviral-vector-based vaccine: a new vector for induction of T cell immunity. *Expert Opin Biol Ther.* 2011 Jun;11(6):739-50.
7. Fontana JM, Christos PJ, Michelini Z, Negri D, Cara A, Salvatore M. Mucosal immunization with integrase-defective lentiviral vectors protects against influenza virus challenge in mice. *PLoS One.* 2014 May 13;9(5):e97270.
8. Grasso F, Negri DR, Mochi S, Rossi A, Cesolini A, Giovannelli A, Chiantore MV, Leone P, Giorgi C, Cara A. Successful therapeutic vaccination with integrase defective lentiviral vector expressing nononcogenic human papillomavirus E7 protein. *Int J Cancer.* 2013 Jan 15;132(2):335-44.
9. Rossi A, Michelini Z, Leone P, Borghi M, Blasi M, Bona R, Spada M, Grasso F, Gugliotta A, Klotman ME, Cara A, Negri D. Optimization of mucosal responses after intramuscular immunization with integrase defective lentiviral vector. *PLoS One.* 2014 Sep 11;9(9):e107377.
10. Gallinaro A, Borghi M, Bona R, Grasso F, Calzoletti L, Palladino L, Cecchetti S, Vescio MF, Macchia D, Morante V, Canitano A, Temperton N, Castrucci MR, Salvatore M, Michelini Z, Cara A, Negri D. Integrase Defective Lentiviral Vector as a Vaccine Platform for Delivering Influenza Antigens. *Front Immunol.* 2018 Feb 5;9:171. doi: 10.3389/fimmu.2018.00171. eCollection 2018.
11. Negri D, Blasi M, LaBranche C, Parks R, Balachandran H, Lifton M, Shen X, Denny T, Ferrari G, Vescio MF, Andersen H, Montefiori DC, Tomaras GD, Liao HX, Santra S, Haynes BF, Klotman ME, Cara A. Immunization with an SIV-based IDLV Expressing HIV-1 Env 1086 Clade C Elicits Durable Humoral and Cellular Responses in Rhesus Macaques. *Mol Ther.* 2016 Nov;24(11):2021-2032.
12. Blasi M, Negri D, LaBranche C, Alam SM, Baker EJ, Brunner EC, Gladden MA, Michelini Z, Vandergrift NA, Wiehe KJ, Parks R, Shen X, Bonsignori M, Tomaras GD, Ferrari G, Montefiori DC, Santra S, Haynes BF, Moody MA, Cara A, Klotman ME. IDLV-HIV-1 Env vaccination in non-human primates induces affinity maturation of antigen-specific memory B cells. *Commun Biol.* 2018 Sep 5;1:134. doi: 10.1038/s42003-018-0131-6. eCollection 2018.
13. Cousin C, Oberkamp M, Felix T, Rosenbaum P, Weil R, Fabrega S, Morante V, Negri D, Cara A, Dadaglio G and Leclerc C. Persistence of Integrase-Deficient Lentiviral Vectors correlates with the induction of STING-independent CD8+ T cell responses. *Cell Rep.* 2019 Jan 29;26(5):1242-1257.e7.