



Relazione scientifica LABORATORIO CONGIUNTO ITALIA-BRASILE

Titolo del Progetto:

"New vaccines against poverty related and neglected tropical diseases"

Relazione sull'attività svolta nel terzo anno (Settembre 2020-Settembre 2021)

Le attività sono state fortemente penalizzate dalle chiusure forzate dei laboratori (soprattutto in Brasile) e dalla necessità di contingentare le presenze in laboratorio con turni (in Italia). Nonostante le restrizioni e le ri-pianificazioni che hanno portato a focalizzare l'interesse scientifico sul SARS-CoV-2, i due laboratori hanno prodotto relazioni scientifiche che sono state pubblicate su riviste internazionali.

Durante il periodo in cui le attività sperimentali sono state rallentate o completamente bloccate sono state scritte 4 reviews sulla vaccinazione. Per celebrare i cento anni della vaccinazione con BCG, che coincidono con i 30 anni del BCG ricombinante, è stata prodotta una review che riassume la storia del BCG e del rBCG, i principali approcci contro HIV e per una più efficace vaccinazione contro la tubercolosi, e le nuove prospettive di protezione eterologa (Marquez-Neto et al. 2021). Le altre tre reviews sono state dedicate alle varie strategie di sviluppo di vaccini, incluso l'uso di BCG come vettore vaccinale (de Queiroz et al. 2020), le strategie vaccinali in corso di sviluppo in Brasile (Kanno et al. 2021) e la risposta antivirale mediata dai TLR analizzata allo scopo di migliorare le strategie vaccinali esistenti (Sartorius et al. 2021).

Inoltre due partners dei Laboratori Congiunti (Luciana C.C. Leite e Diana Boraschi) sono guest editors, insieme a due colleghi, di uno special issue della rivista Vaccines dedicato al centenario del BCG: "100 Years of BCG Immunization: Past, Present and Future" (https://www.mdpi.com/journal/vaccines/special_issues/TB_vaccines).

Le attività proposte nel progetto erano le seguenti:

- 1. Nuovi costrutti ricombinanti basati su BCG;**
- 2. Nuovi vettori di espressione per antigeni di Schistosoma in BCG ricombinante;**
- 3. Espressione di epitopi "citotossici" di *T. cruzi* e ZIKV in batteriofagi filamentosi;**
- 4. Analisi delle risposte immuni adattative;**
- 5. Caratterizzazione delle risposte immuni innate.**

Attività 1: Nuovi costrutti ricombinanti basati su BCG



L'attività di disamina delle proprietà del BCG utilizzato come carrier vaccinale è continuata in questo ultimo anno con lo studio della capacità di BCG di indurre memoria innata protettiva a largo spettro. Per esplorare la possibilità di stimolare memoria immune innata protettiva verso SARS-CoV-2, abbiamo utilizzato un sistema *in vitro*, basato su monociti primari umani. Il modello, già descritto in precedenza, consiste nell'esporre monociti, isolati dal sangue di donatori sani, ad agenti microbici per 24 ore *in vitro* (inducendo una risposta infiammatoria), poi allontanare gli agenti attivanti e continuare la coltura per 7 giorni (in modo da permettere lo spegnimento dell'attivazione infiammatoria) e poi ristimolare le cellule con gli stessi o altri agenti microbici. L'attivazione dopo ristimolazione può variare, rispetto alla risposta delle cellule che non avevano visto agenti microbici nelle prime 24 ore, se gli agenti microbici sono stati in grado di indurre una memoria. La risposta di memoria si misura con la produzione di una serie di citochine, chemochine e fattori di crescita correlati all'attivazione infiammatoria e alla sua regolazione. Lo studio condotto ha valutato la capacità di SARS-CoV-2 e di alcune sue proteine (la proteina nucleocapsidica N, le due subunità della proteina Spike S1 e S2) di indurre memoria innata, capace di alterare la risposta delle cellule a un successivo agente microbico. I risultati ottenuti hanno dimostrato che il virus intero inattivato e le sue proteine S1 e S2 non sono in grado di indurre memoria innata, né in risposta a una seconda stimolazione di tipo batterico (LPS) né a una di tipo virale (R848). Invece il priming con la proteina N ha indotto una risposta di memoria sia a stimoli batterici che virali, che consiste essenzialmente in una significativa riduzione della produzione della citochina infiammatoria IL-6 e a un parallelo aumento della citochina anti-infiammatoria IL-1Ra. Dunque i risultati hanno suggerito che l'esposizione alla proteina N possa indurre una memoria innata non specifica in grado di ridurre il livello della reazione infiammatoria a reinfezioni batteriche o virali (Urbán-Lopez et al. 2021). Un altro studio, basato sull'ipotesi che la vaccinazione con BCG possa risultare in una memoria innata protettiva, ha dimostrato che l'immunizzazione con BCG è in grado di amplificare, nel topo, la risposta immune alla vaccinazione anti-pertosse e di ridurre l'incidenza della malattia in uno studio ecologico epidemiologico (Broset et al. 2021a). Infine, una specifica valutazione è stata condotta sulla differente capacità di indurre memoria innata da parte di batteri inattivati o loro componenti in paragone a batteri vivi come BCG (Swartzwelter et al. 2020).

- **Attività 2: Sviluppo di nuovi vettori e carriers per l'espressione di antigeni vaccinali**

Gli studi si sono focalizzati su diversi aspetti: studio di OMV batteriche per delivery di antigeni vaccinali, studio e caratterizzazione di vettori di espressione vecchi e nuovi per micobatteri, espressione di antigeni eterologhi in *Mycobacterium* per la costruzione di nuovi vaccini. L'uso di carriers batterici bioattivi o vivi (OMV di *Neisseria lactamica*, BCG) è stato sperimentato per antigeni vaccinali diversi espressi sul carrier con tecnologie diverse (coniugazione chimica, espressione genica), messe a punto *ex novo* o sviluppate sulla base di esperienze pregresse. Le OMV sono state usate per la coniugazione chimica di antigeni di *Schistosoma mansoni*, selezionati con uno studio di epitope mapping (Farias et al. 2021) ed espressi come proteine di



fusione con la rizavidina (Ferrari Barbosa et al. 2021a). Le OMV coniugate all'antigene TSP-2 sono risultate capaci di indurre una forte risposta anticorpale specifica nel topo (Ferrari Barbosa et al. 2021b) e anche di indurre un potente memoria innata, più forte di quella indotta da LPS (Ferrari Barbosa et al. 2021c).

- Lo studio dei vettori di espressione si è diretto all'ottimizzazione di vettori specifici per l'espressione di antigeni eterologhi in BCG e nei ceppi attenuati di *Mycobacterium tuberculosis* (Nascimento et al. 2020; Broset et al. 2021b).

- **Attività 3 Espressione di epitopi "citotossici" di *T.cruzi* e ZIKV in batteriofagi filamentosi**, A causa delle restrizioni imposte dalla pandemia questa attività ha subito un forte rallentamento e si è proceduto esclusivamente alla caratterizzazione delle microparticelle incapsulanti i batteriofagi e alla definizione della somministrazione mediante microaghi.

I batteriologi filamentosi fd OVA, fd PA8, fd TSKB20 fd ZIKV (precedentemente prodotti) sono stati incapsulati in una matrice di PLGA vuota e si è misurata la stabilità di tali particelle liofilizzate allo scopo di simulare la conservazione delle formulazioni vacciniche. Le formulazioni sono risultate stabili fino a 60 giorni dalla loro produzione e sono state utilizzate per la produzione di microaghi allo scopo di somministrare le formulazioni vacciniche per via intradermica.

L'induzione della risposta immune cellulo-mediata da parte di tali microparticelle è stata misurata al momento esclusivamente per la formulazione fd OVA, per la quale esiste un sistema modello in vitro. Il sistema modello prevede la misura della risposta T indotta dall'antigene OVA mediante l'utilizzo dell'ibridoma T B3Z OVA specifico: tale ibridoma infatti secreta IL-2 in seguito al legame del recettore T con l'antigene OVA presentato nel contesto del MHC I. In questo sistema le cellule presentanti l'antigene sono Bone Marrow Derived Dendritic Cells (BMDC) e sono cimentate con le microparticelle contenenti il batteriofago presentante l'antigene. Le BMDC processano e presentano l'antigene all'ibridoma B3Z che, in seguito all'attivazione, produce IL-2, misurata con il saggio ELISA. E' stato dimostrato che anche dopo 60 giorni le particelle fagiche liofilizzate sono integre e inducono una risposta immunitaria T.

- **Attività 4: Analisi delle risposte immuni adattative.**

Gli studi sulla risposta adattativa, programmati prima della pandemia come studi diretti all'analisi della risposta contro malattie causate da zikv e DENV virus sono stati ri-programmati, come descritto nella relazione scientifica del II anno di attività, per lo studio della risposta a SARS-CoV-2. Durante questo anno di attività si è proceduto quindi alla produzione di lentivirus



pseudotipizzati per l'espressione sia della proteina Spike di SARS-CoV-2 wild type (sequenza isolata a Whuan nel 2020) che della proteina Spike mutata sostituendo alcuni aminoacidi della sequenza wild type allo scopo di riprodurre le VOI (variant of interest) o VOC (variant of concern) scelte tra le numerose varianti del SARS-CoV-2 sequenziate e indicate dal WHO. Abbiamo prodotto le Spike mutate che riproducono le varianti Inglese (alpha), Sud Africana (beta), Brasiliana (gamma) e Indiana (delta). Abbiamo inoltre prodotto cellule sovraesprimenti le proteine ACE2 (recettore del virus SARS-CoV-2) e TMPRSS2 (proteasi in grado di favorire infezione virale), trasducendo la linea cellulare HEK293. Tali cellule sono state utilizzate come target per l'infezione del lentivirus pseudotipizzato per la Spike. Le cellule target, quando trasdotte con il lentivirus pseudotipizzato per la proteina Spike wt o variante sono indotte ad esprimere il gene reporter luciferasi, e questo consente di ottenere una misura quantitativa dell'infezione. Usando il sistema da noi prodotto di virus-cellula target abbiamo messo a punto un test di neutralizzazione che consente di misurare l'efficienza della risposta immunitaria umorale (indotta in seguito all'infezione o alla vaccinazione) e di valutarne la potenza anche contro le varianti del virus.

Risultati preliminari ottenuti su sieri di volontari vaccinati hanno mostrato che la risposta umorale indotta dal ciclo di vaccinazione completo è in genere consistente contro lo pseudovirus WT ma molto meno efficiente contro alcune delle varianti prodotte. Sono attualmente incorso studi su un campione significativo di volontari vaccinati per validare questi risultati preliminari.

Caratterizzazione delle risposte immuni innate.

Come già discusso nella precedente relazione, il batteriofago filamentoso è in grado di indurre una risposta immunitaria forte in assenza di adiuvante, risultando quindi un'importante piattaforma per la produzione di vaccini. Come già dimostrato per le cellule dendritiche murine, esperimenti di sequenziamento genico (NGS) su cellule dendritiche umane, isolate da donatori sani cimentati con i batteriofagi hanno dimostrato che i batteriofagi sono in grado di indurre la trascrizione di citochine, recettori di citochine e chemochine. Tra i geni che sono attivamente trascritti dopo la coltura con batteriofagi abbiamo identificato geni del pathway dei Toll Like Receptor, geni coinvolti del sistema di signaling mediato da JAK STAT e geni che sono attivati in seguito al sensing per il DNA intracellulare. Questi risultati confermano quanto già pubblicato nel modello animale, dimostrando che le cellule professionali presentanti l'antigene rispondono alla presenza del vettore fagico attivando i meccanismi della risposta immunitaria innata che favoriscono ed innescano la risposta immunitaria secondaria. Questi risultati preliminari, ottenuti su un numero limitato di campioni, necessitano di essere confermati incrementando il numero di campioni usati nello studio.

Pubblicazioni

Le attività del terzo anno hanno portato alle seguenti pubblicazioni:



Marques-Neto LM, Piwowarska Z, Kanno AI, Moraes L, Trentini MM, Rodriguez D, Silva JLSC, Leite LCC. Thirty years of recombinant BCG: new trends for a centenary vaccine. *Expert Rev. Vaccines* 13:1-11. doi: 10.1080/14760584.2021.1951243

Sartorius R, Trovato M, Manco R, D'Apice L, De Berardinis P.
Exploiting viral sensing mediated by Toll-like receptors to design innovative vaccines
NPJVACCINES in press

Urbán-Lopez P, Italiani P, Boraschi D, Gioria S. 2021. The SARS-CoV-2 nucleoprotein induces innate memory in human monocytes. *Cells*, submitted.

Broset E, Pardo-Seco J, Kanno AI, Aguilo N, Dacosta AI, Rivero-Calle I, Gonzalo-Asensio J, Lochter C, Leite LCC, Martin C, Martín-Torres F. 2021a. BCG vaccination improves DTaP immune responses in mice and is associated with lower pertussis incidence in ecological epidemiological studies. *EBioMedicine* 65: 103254. doi: 10.1016/j.ebiom.2021.103254

Swartzwelter BJ, Fux AC, Johnson L, Swart E, Hofer S, Hofstätter N, Geppert M, Italiani P, Boraschi D, Duschl A, Himly M. 2020. The impact of nanoparticles on innate immune activation by live bacteria. *Int. J. Mol. Sci.* 21: 9695. doi: 10.3390/ijms21249695

Barbosa MMF, Kanno AI, Pancakova V, Gonçalves VM, Malley R, Faria LP, Leite LCC. 2021a. Optimization of expression and purification of *Schistosoma mansoni* antigens in fusion with rhizavidin. *Mol. Biotechnol.* 24:1–9. doi: 10.1007/s12033-021-00355-2

Barbosa MMF, Kanno AI, Barazzone G, Rodrigues D, Pancakova V, Trentini M, Faquim-Mauro EL, Freitas AP, Ivo Khouri M, Lobo da Silva J, Gonçalves VM, Schenkman RPF, Tanizaki MM, Boraschi D, Malley R, Farias LP, Leite LCC. 2021b. Robust immune response induced by *Schistosoma mansoni* TSP-2 antigen coupled to bacterial outer membrane vesicles. *Int. J. Nanomedicine*, in press

Barbosa MMF, Kanno AI, Farias LP, Madej M, Sipos G, Sbrana S, Romani L, Boraschi D, Leite LCC, Italiani P. 2021c. Primary and memory response of human monocytes to vaccines: role of nanoparticulate antigens in inducing innate memory. *Nanomaterials* 11: 931

doi: 10.3390/nano11040931



Consiglio Nazionale delle Ricerche
Istituto di Biochimica e Biologia Cellulare
Institute of Biochemistry and Cell Biology

Napoli, 29-09-2021

Dr Luciana D'Apice

Luciano D'Apice