



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

Estudo da resposta imune contra o antígeno Gag de HIV-1 no trato genital feminino murino induzida pela administração de adenovírus recombinantes

LARISSA HERKENHOFF HAUT

Orientador: Prof. Dr. Aguinaldo R. Pinto

**Florianópolis
2010**

LARISSA HERKENHOFF HAUT

Estudo da resposta imune contra o antígeno Gag de HIV-1 no trato genital feminino murino induzida pela administração de adenovírus recombinantes

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia aplicada à saúde.

ORIENTADOR: PROF. DR. AGUINALDO R. PINTO

Florianópolis
2010

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

H379e Haut, Larissa Herkenhoff

Estudo da resposta imune contra o antígeno Gag de HIV-1 no trato genital feminino murino induzida pela administração de adenovirus recombinantes [tese] / Larissa Herkenhoff Haut ; orientador, Aguinaldo Roberto Pinto. - Florianópolis, SC, 2010.

150 p.: il., grafs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Inclui referências

1. Biotecnologia. 2. AIDS (Doença) - Vacinas. 3. Adenovirus. 4. Imunidade celular. 5. Membrana mucosa. I. Pinto, Aguinaldo Roberto. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU 577.23

À minha mãe Rosemari Herkenhoff Haut (*in memoriam*).

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia Aplicada da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil e no Instituto Wistar, Filadélfia, PA, EUA com recursos financeiros do Programa Nacional de DST/AIDS – Ministério da Saúde, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado de Santa Catarina (FAPESC), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), *National Institutes of Health (NIH)* e *The Bill and Melinda Gates Foundation*.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Aguinaldo Roberto Pinto pelo apoio, confiança, oportunidade de desenvolvimento deste trabalho e, sobretudo, por proporcionar meios para o meu crescimento científico.

À Dr. Hildegund Ertl pela acessibilidade, liberdade no desenvolvimento dos experimentos e por proporcionar aos seus estudante contato estreito com pesquisadores renomados.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Zanetti pelos conselhos, espirituosidade e contribuição na realização deste trabalho.

Ao Prof. Mário Steindel pela confiança e suporte durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos Profs. Célia Barardi, Cláudia Simões, Carlos Pinto e Edmundo Grisard pela utilização dos equipamentos e agradável convivência.

À Lauren DiMenna, Shin-Wen Lin, Nia Tatsis, Wynetta Giles-Davis e Brian Latimer pelo auxílio nas etapas iniciais deste trabalho, amizade e momentos de descontração no laboratório.

À Christina Cole pelo auxílio nos processos burocráticos, conselhos e companhia dentro e fora do laboratório.

À minha família, principalmente meus pais e meu irmão, por serem meus principais incentivadores, apoiarem minhas decisões e entenderem a minha ausência.

Aos componentes do LIA e do Laboratório da Dr. Ertl pelos momentos agradáveis proporcionados durante a realização deste trabalho.

RESUMO

HAUT, L. H. **Estudo da resposta imune contra o antígeno Gag de HIV-1 no trato genital feminino murino induzida pela administração de adenovírus recombinantes**. 2010. 145 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina.

AIDS é um dos principais problemas de saúde pública atuais e acredita-se que a epidemia somente será controlada com uma vacina capaz de impedir ou controlar a infecção causada pelo HIV. Inúmeras estratégias vacinais têm sido investigadas experimentalmente, dentre elas o uso de vírus recombinantes como vetores vacinais, para indução de resposta imune no trato genital, uma das mais importantes portas de entrada do HIV. Neste estudo avaliou-se a indução de células T no trato genital feminino de camundongos BALB/c mediante a administração de vetores adenovirais expressando a proteína Gag de HIV-1. Diferentes protocolos de imunização utilizando vetores adenovirais símios foram avaliados quanto à indução de resposta imune celular Gag-específica em tecidos sistêmicos e de mucosas. A imunização por via intranasal induziu baixa frequência de células T $CD8^+$ Gag-específicas no trato genital e em tecidos sistêmicos. A imunização por via intramuscular foi capaz de induzir frequência de células T $CD8^+$ Gag-específicas de maior magnitude do que a administração por vias de mucosa, sendo esta resposta detectada em diversos tecidos, inclusive no trato genital feminino, por ao menos um ano após a administração da vacina. As células T $CD8^+$ Gag-específicas de origem genital apresentaram elevada expressão de diversos marcadores de ativação celular e secretaram IFN- γ . A administração intramuscular do vetor adenoviral alterou também a frequência e o fenótipo de células T $CD4^+$ e $CD8^+$ de origem genital. Foi observado que apesar de anticorpos neutralizantes representarem a principal forma de interferência da imunidade pré-existente ao vetor vacinal na indução de células transgene-específicas em tecidos sistêmicos e sangue, no tecido mucoso esta situação é provavelmente também mediada por mecanismos celulares. Em conjunto, estes resultados sugerem que a administração intramuscular de vetores adenovirais símios expressando a proteína Gag de HIV-1 induz resposta imune celular transgene-específica capaz de residir no trato genital feminino por longos períodos, sendo que esta resposta pode ser alterada pela presença de imunidade pré-existente contra o vetor vacinal.

Descritores: Vacinas; HIV-1; Adenovírus recombinante; Imunidade celular; Imunidade de mucosas; Trato genital.

ABSTRACT

HAUT, L. H. **Immune responses against HIV-1 Gag at the murine female genital tract upon administration of recombinant adenoviral vectors**. 2010. 145 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina.

AIDS is a major public health concern worldwide and it is presently understood that only a vaccine capable of controlling or clearing the initial infection could control the HIV epidemic. Several strategies have been developed in order to obtain a vaccine against HIV, including the use of recombinant viral vectors. Most studies have focused on the induction of systemic immunity although it is believed that immune responses against HIV should reside at the mucosal ports of entry. In the present study, we evaluated the induction of HIV-specific T cells at the genital tract upon administration of adenoviral vectors expressing the Gag protein of HIV-1. Prime-boost regimens using vectors based on simian serotypes of adenovirus were evaluated for the induction of Gag-specific cellular immune responses in systemic and mucosal tissues. Intranasal or intravaginal immunization induced only low frequencies of Gag-specific CD8⁺ T cells in the genital tract as well as systemic compartments. Conversely, intramuscular immunization induced higher and more sustained frequencies of Gag-specific CD8⁺ T cells than mucosal routes, with frequencies of these cells being detected at least one year after immunization. Gag-specific CD8⁺ T cells of genital origin showed expression of cellular activation markers and secreted IFN- γ . Viral vectors given through the intramuscular route also altered the frequency and phenotype of genital CD4⁺ and CD8 T⁺ cells. It was observed that AdHu5-specific antibodies interfere with the induction of transgene product-specific CD8⁺ T cell responses in systemic compartments, while mechanisms other than antibodies seem to affect those that home to the genital tract. Results presented here suggest that intramuscular immunization with adenoviral vectors expressing HIV-1 Gag induces transgene-specific cellular immune responses that reside long-term in the murine female genital tract, and that this response can be influenced by pre-existing immunity to the vaccine carrier.

Keywords: Vaccines; HIV-1; Recombinant adenovirus; Cellular immunity; Mucosal immunity; Genital tract.

LISTA DE PUBLICAÇÕES

- HAUT, L. H.;** ERTL, H. C. Obstacles to the successful development of an efficacious T cell-inducing HIV-1 vaccine. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 86, n. 4, p. 779-793, 2009. 106
- HAUT, L. H.;** LIN, S. W.; TATSIS, N.; DiMENNA, L. J.; GILES-DAVIS, W.; PINTO, A. R.; ERTL, H. C. Robust genital Gag-specific CD8⁺ T cell responses in mice upon intramuscular immunization with simian adenoviral vectors expressing HIV-1-gag. **European Journal of Immunology**, v. 40, n. 12, p. 3426-3438, 2010. 122
- HAUT, L. H.;** RATCLIFFE, S.; PINTO, A. R.; ERTL, H. C. Effect of pre-existing immunity to adenovirus on transgene product-specific genital T cell responses upon vaccination of mice with a homologous vector. **Journal of Infectious Diseases**, v. 203, n. 8, p. 1073-1081, 2011. 136

LISTA DE ABREVIATURAS

- AcN - Anticorpos neutralizantes
- Ad - Adenovírus
- AdC - Adenovírus símio
- AdC6 - Adenovírus símio do sorotipo 6
- AdC68 - Adenovírus símio do sorotipo 68
- AdC6gag Adenovírus símio recombinante do sorotipo 6 que expressa
- o gene *gag* do HIV-1
- AdC68gag Adenovírus símio recombinante do sorotipo 68 que
- expressa o gene *gag* do HIV-1
- AdHu5 - Adenovírus humano do sorotipo 5
- AdHu5gag Adenovírus humano recombinante do sorotipo 5 que
- expressa o gene *gag* do HIV-1
- AIDS - Síndrome da imunodeficiência adquirida
- APC - Alofococianina
- APCs - Células apresentadoras de antígeno, do inglês *Antigen-presenting cells*
- BSA - Albumina bovina sérica
- cDNA - DNA complementar
- DMEM - Meio *Dubelcco's modified Eagle's medium*
- ELISA - Ensaio imunoenzimático, do inglês *Enzyme-linked immunosorbent assay*
- ELISpot - Ensaio imunoenzimático, do inglês *Enzyme-linked immunosorbent spot*
- FITC - Isotiocianato de fluoresceína
- HIV - Vírus da imunodeficiência humana
- IELs - Linfócitos intraepiteliais, do inglês *Intraepithelial lymphocytes*
- IFN - Interferon
- i.m. - Intramuscular
- i.n. - Intranasal
- i.vag. - Intravaginal
- LNI - Linfonodos ilíacos

VIII

- LTNP - Indivíduos progressores lentos, do inglês *Long-term non-progressors*
- LTR - Longas sequências terminais repetitivas, do inglês *Long terminal repeats*
- MIF - Mediana da intensidade de fluorescência
- MLC - DMEM suplementado com 2% de SFB e 10^{-6} M de 2-mercaptoetanol
- MVA - Vírus da vaccínia Ankara modificado
- NALT - Tecido linfóide associado à mucosa nasal, do inglês *Nasal-associated lymphoid tissue*
- NHP - Primatas não-humanos, do inglês *Non-human primates*
- OUTC - Ovários, útero, trompas uterinas e cerviz
- PE - Ficoeritrina-R
- PerCP - Proteína clorofila peridínina
- PerCP Cy-5.5 - Proteína clorofila peridínina cianina-5.5
- PMA - Formol-meristato-acetato
- PSA - Penicilina, streptomomicina e anfotericina B
- p.v. - Partículas virais
- RT - Transcriptase reversa
- SFB - Soro fetal bovino
- SHIV - Vírus quimérico que expressa proteínas estruturais do SIV e envelope viral do HIV-1
- SIV - Vírus da imunodeficiência símia
- TG - Trato genital
- UFF - Unidades formadoras de foco
- Vaccag - Vírus da vaccínia recombinante que expressa o gene *gag* de HIV-1

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ensaio de dose-resposta para avaliação da resposta imune celular Gag-específica após imunização i.n. com AdC6gag.	33
Figura 2. Ensaio de dose-resposta para avaliação da resposta imune humoral após imunização i.n. com AdC6gag.	34
Figura 3. Ensaio de cinética para avaliação da resposta imune celular Gag-específica após imunização i.n. com AdC6gag.	36
Figura 4. Ensaio de cinética para avaliação da resposta imune humoral anti-AdC6 após imunização i.n. com AdC6gag.	38
Figura 5. Isotipagem de anticorpos anti-vetor induzidos pela imunização i.n. com AdC6gag.	39
Figura 6. Ensaio de cinética para avaliação de resposta imune humoral anti-Gag após imunização i.n. com AdC6gag.	40
Figura 7. Avaliação da resposta imune celular Gag-específica após imunização i.n. seguida de reforço i.vag. com vetores adenovirais símios.	41
Figura 8. Avaliação da funcionalidade de células T CD8 ⁺ Gag-específicas após imunização i.n. com AdC6gag, seguida de reforço pela via i.vag. com AdC68gag.	43
Figura 9. Avaliação de protocolos de imunização dose-reforço heterólogo por vias de mucosa para indução de resposta imune celular.	44
Figura 10. Ensaio de desafio utilizando vírus da vaccínia recombinante expressando a proteína gag do HIV-1 (Vacgag).	46
Figura 11. Ensaio de cinética para avaliação da resposta imune celular Gag-específica após imunização com AdC6gag por diferentes vias.	47
Figura 12. Avaliação da funcionalidade de células T CD8 ⁺ Gag-específica após imunização i.m. com AdC6gag.	49
Figura 13. Efeito da estimulação <i>in vitro</i> nas frequências de células T CD8 ⁺ viáveis provenientes do TG feminino de animais imunizados com AdC6gag.	50

Figura 14. Avaliação da resposta imune celular Gag-específica após imunização i.m. com AdC6gag seguida de reforço com AdC68gag por diferentes vias.	51
Figura 15. Análise fenotípica de células T CD8 ⁺ Gag-específicas após administração de vetores adenovirais símios por vias de mucosa.	54
Figura 16. Fenótipo das células T CD8 ⁺ Gag-específicas após imunização i.m. com vetores adenovirais símios.	57
Figura 17. Análise fenotípica de células T CD8 ⁺ Gag-específicas induzidas por imunização i.m. com vetores adenovirais símios.	59
Figura 18. Análise de marcadores de fase efetora em células T CD8 ⁺ Gag-específicas induzidas por imunização i.m. com vetores adenovirais símios.	62
Figura 19. Migração de células T CD8 ⁺ Gag-específicas após transferência adotiva de linfócitos.	64
Figura 20. Frequência de células T no TG feminino após imunização i.m. com o vetor AdHu5gag.	65
Figura 21. Fenótipo de células T provenientes do TG feminino após imunização i.m. com o vetor AdHu5gag.	68
Figura 22. Efeito da imunidade pré-existente contra o vetor AdHu5 sobre a frequência de células T CD8 ⁺ Gag-específicas após imunização i.m. com AdHu5gag.	71
Figura 23. Fenótipo de células T CD8 ⁺ Gag-específicas induzidas mediante administração de AdHu5gag por via i.m.	72
Figura 24. Efeito da presença de anticorpos pré-existentes contra AdHu5 na indução de células T CD8 ⁺ Gag-específicas após imunização i.m. com AdHugag.	74

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Vírus da imunodeficiência humana	2
1.2 Infecção de mucosas por HIV-1	4
1.2.1 Trato genital feminino	6
1.3 Estratégias vacinais contra HIV-1	8
1.3.1 Adenovírus como vetor vacinal	10
1.3.2 Protocolos vacinais de dose-reforço	14
1.3.3 Imunização por vias de mucosa	16
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo geral	19
2.2 Objetivos específicos	19
3 METODOLOGIA	21
3.1 Considerações éticas	21
3.2 Modelo Animal	21
3.3 Linhagens celulares	21
3.4 Vírus recombinantes	21
3.5 Peptídeo	22
3.6 Imunização de camundongos	22
3.7 Obtenção e purificação de células	23
3.8 Coleta de amostras de soro, saliva, lavado vaginal e fezes para ensaios de neutralização e ELISA	24
3.9 Ensaio de dose-resposta para imunização por vias de mucosa	24
3.10 Avaliação do protocolo de dose-reforço heterólogo	25
3.11 Avaliação da resposta imune celular de memória	25
3.12 Ensaio de proteção	25
3.13 Avaliação do padrão migratório de células T CD8 ⁺ Gag-específicas de origem sistêmica	26
3.14 Avaliação de resposta imune HIV-específica induzida por AdHu5gag na presença de imunidade pré-existente contra o vetor adenoviral	26

3.15 Avaliação da interferência de AcN na indução de resposta imune Gag-específica	26
3.16 Ensaio de neutralização viral	27
3.17 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos contra vetor vacinal e proteína Gag do HIV-1	27
3.18 Isotipagem de anticorpos contra o vetor viral e a proteína Gag de HIV-1	28
3.19 Ensaio ELISpot para detecção de secreção de IFN- γ	28
3.20 Ensaio de tetrâmero, análise fenotípica e citometria de fluxo	29
3.21 Análise estatística	31
4 RESULTADOS	32
4.1 Avaliação de dose-resposta e cinética da resposta imune adaptativa após administração intranasal de AdC6gag	32
4.2 Estudo da resposta imune celular induzida através da administração de vetores adenovirais símios em esquemas de imunização dose-reforço heterólogo por vias de mucosa	40
4.3 Ensaio de proteção com vírus da vaccínia recombinante expressando a proteína Gag do HIV-1	44
4.4 Avaliação da resposta imune celular Gag-específica após administração intramuscular de vetores adenovirais símios	46
4.5 Análise do fenótipo das células T CD8 ⁺ Gag-específicas provenientes de tecidos sistêmicos e de mucosas	52
4.6 Origem das células T CD8 ⁺ presentes na mucosa genital	63
4.7 Efeito da imunização intramuscular com AdHu5gag sobre linfócitos residentes na mucosa genital	64
4.8 Cinética da resposta de células T CD8 ⁺ induzida por administração intramuscular de AdHu5gag na presença de imunidade contra o vetor viral	69
3 DISCUSSÃO	75
4 CONCLUSÕES	84
REFERÊNCIAS	85
APÊNDICES	101
PUBLICAÇÕES	106

1 INTRODUÇÃO

Logo após a identificação, em 1983, do vírus da imunodeficiência humana (HIV) como agente causador da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS), a secretária do Serviço de Saúde Humana dos Estados Unidos Margaret Heckler anunciou que uma vacina preventiva contra o vírus estaria disponível em cerca de 2 anos (WALKER; BURTON, 2008). Entretanto, até o presente momento, várias formulações vacinais contra HIV-1 foram avaliadas em ensaios clínicos de fase I mas poucas progrediram para ensaios de larga escala.

Apesar da pandemia de HIV-1 apresentar tendência de estabilização, estima-se que 33.4 milhões de indivíduos estejam atualmente infectados com o vírus (UNAIDS, 2009). Em 2008, foram registrados 2,7 milhões de novas infecções, sendo que mais de 70% dos casos ocorreram na África Sub-saariana (UNAIDS, 2009). Segundo o Ministério da Saúde, o Brasil possui 630 mil soropositivos, sendo que 35 mil novos casos foram diagnosticados em 2008 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Santa Catarina é o terceiro estado da Federação em casos cumulativos de infecções por HIV, sendo que Florianópolis é a segunda capital brasileira em número de novos casos diagnosticados por habitante (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

A alta capacidade de mutação e recombinação que o HIV apresenta, principalmente nas regiões hipervariáveis dos genes que codificam as glicoproteínas de superfície, levou à emergência de diversas linhagens virais, classificadas de acordo com tipo, grupo e subtipo (RAMBAUT et al., 2004). Dois tipos de vírus foram identificados: HIV-1 e HIV-2. O vírus responsável por causar AIDS na maior parte da África ocidental é denominado HIV-2, encontrado quase que exclusivamente naquele continente, possuindo menor incidência na Europa e Ásia. HIV-1 tem ampla distribuição mundial, sendo classificado em três grupos: M, N e O. O grupo M está amplamente distribuído pelo mundo, sendo dividido em nove subtipos, designados de A-D, F-H, J e K. No Brasil, como nos Estados Unidos e Europa, o subtipo B é responsável pelo maior número de infecções (KOMNINAKIS et al., 2007). O vírus pode ainda sofrer processo de recombinação dando origem às formas recombinantes circulantes, responsáveis por pelo menos 15% das infecções em determinadas regiões do globo (RAMBAUT et al., 2004).

Apesar de haver a disponibilidade de tratamento por meio da utilização de terapia antiretroviral altamente ativa, o custo destes fármacos, bem como os efeitos adversos por eles induzidos, a

emergência de resistência viral aos medicamentos e seus complexos esquemas terapêuticos dificultam sua utilização em países menos desenvolvidos, que são atingidos mais drasticamente pela epidemia (MARTINEZ-PICADO et al., 2000; ROSENBERG et al., 2000). Considerando a modesta eficácia de tratamentos disponíveis e a manutenção de reservatórios virais, a pandemia do HIV provavelmente só será controlada quando for desenvolvida uma vacina eficaz, capaz de prevenir ou controlar a infecção viral (BHARDWAJ; WALKER, 2003)

1.1 Vírus da imunodeficiência humana

O HIV é um vírus envelopado, pertencente à família Retroviridae, incluído no grupo dos lentívirus devido ao curso gradual da doença que causa. Cada partícula viral contém duas cópias de fita simples de RNA, com aproximadamente 10 mil nucleotídeos (SLEASMAN; GOODENOW, 2003). O envelope viral, de natureza bilipídica e derivado da membrana plasmática da célula hospedeira, possui um complexo trimérico composto por duas glicoproteínas não-covalentemente associadas: gp120, presente na porção externa do complexo glicoprotéico, e gp41, proteína transmembrânica, inserida no envelope viral. Este complexo apresenta-se como uma saliência do envelope viral, sendo composto por três monômeros de gp120, cada um associado a uma subunidade de gp41 (HARTLEY et al., 2005).

No interior do envelope viral estão contidas três proteínas estruturais: p24, p16 e p9 (SLEASMAN; GOODENOW, 2003). A p16 é uma proteína de matriz e está ancorada à face interna do envelope, enquanto a p24 forma o capsídio cônico, que contém em seu interior o genoma viral e as enzimas virais (transcriptase reversa, integrase e protease). A p9 é uma proteína do capsídio não-covalentemente associada ao RNA viral. O genoma viral é composto por 9 genes ladeados por longas sequências terminais repetitivas (LTRs), necessárias à integração do vírus e servindo como sítios de ligação para proteínas regulatórias da expressão de genes virais. Os três genes principais dos retrovírus são *gag*, *pol* e *env*. O gene *gag* codifica as proteínas estruturais do capsídio, sendo condutor do processo de organização de novas partículas virais (FREED, 1998). O gene *env* contém a sequência para síntese das glicoproteínas de superfície e *pol* é responsável pelas enzimas virais. O HIV possui ainda os genes acessórios *tat*, *rev*, *nef*, *vpu*, *vpr* e *vif*, que codificam seis proteínas regulatórias que agem em inúmeros processos virais, como regulação da transcrição gênica, transporte intracelular de componentes virais e mecanismos de escape viral (SLEASMAN; GOODENOW, 2003).

Após a entrada do HIV no hospedeiro, a infecção de células-alvo é iniciada pela interação entre uma ou mais subunidades de gp120 com a molécula CD4, que é expressa em linfócitos T CD4⁺, células dendríticas, macrófagos e monócitos (MOSIER, 2009). Em seguida, ocorre interação com os receptores de quimiocinas CCR5 ou CXCR4, os quais atuam como co-receptores para o vírus (MOSIER, 2009). Esta associação resulta em uma alteração conformacional que expõe a gp41 e induz sua ligação ao heparan-sulfato presente na superfície celular. A porção amino-terminal hidrofóbica da gp41 é então inserida na membrana plasmática da célula, iniciando assim a fusão do envelope viral à membrana celular (WYATT; SODROSKI, 1998). Após a entrada na célula, o capsídeo libera o genoma e as enzimas virais no citoplasma. O RNA viral é transcrito em DNA complementar (cDNA) por ação da transcriptase reversa (RT), utilizando um RNA transportador de lisina como iniciador, enquanto a atividade da ribonuclease II associada à RT promove a degradação do RNA viral. O cDNA recém-sintetizado, juntamente com enzimas virais e fatores celulares, é transportado para o núcleo por processo dependente de actina e microtúbulos. O cDNA viral pode integrar-se à cromossomo da célula hospedeira ou sofrer circularização, permanecendo como complexo de pré-ativação não-integrado no núcleo celular (WARRILOW; TACHEDJIAN; HARRICH, 2009).

A forma de persistência viral mais comumente encontrada em indivíduos infectados é a latência viral pós-integração. O material genético viral é integrado no genoma da célula hospedeira, por meio do uso de fatores celulares como emerina (JACQUE; STEVENSON, 2006) e proteína LEDGF (LLANO et al., 2006) em uma reação catalisada pela enzima integrase (MITCHELL et al., 2004). Esta reação envolve a ligação covalente entre os LTRs que flanqueiam o cDNA viral e o cromossomo da célula hospedeira. Após integração, a porção 5'LTR age como promotor eucariótico, enquanto a porção 3'LTR atua como sítio de terminação e poliadenilação (GUNTAKA, 1993). Por estar integrado ao genoma celular, o cDNA viral é estável e o ciclo de replicação viral é iniciado quando a célula hospedeira é ativada (COIRAS et al., 2009).

Mediante ativação da célula hospedeira, fatores transcricionais celulares e virais são capazes de iniciar a transcrição do cDNA viral, produzindo várias cópias de RNA mensageiro (mRNA) (RAMIREZ DE ARELLANO; SORIANO; HOLGUIN, 2005). Estes transcritos dirigem a síntese das proteínas regulatórias necessárias à replicação viral. A proteína viral Tat liga-se ao terminal 5' da sequência de DNA, aumentando a taxa de transcrição do material genético viral, enquanto a

proteína Rev exporta para o citoplasma tanto o mRNA parcialmente processado para a síntese de polipeptídeos, quanto o mRNA não-segmentado que constitui o material genético das novas partículas virais. Os polipeptídeos sintetizados são posteriormente clivados pela enzima protease dando origem às proteínas virais. Após este processo, há tráfego de componentes virais para organização e posterior liberação de novas partículas virais, processo este coordenado e regulado por interações entre proteínas virais e fatores celulares. Novas partículas virais brotam da célula hospedeira em processo dependente de energia que envolve fatores celulares não identificados (BENAROCH et al., 2010).

1.2 Infecção de mucosas por HIV-1

A transmissão do HIV pode ocorrer através de relação sexual desprotegida, uso de hemoderivados, compartilhamento de seringas e pela via materno-fetal durante o parto ou amamentação. A infecção por mucosas, atualmente responsável por mais de 80% dos contágios, ocorre pela mucosa cervicovaginal e retal (KOZLOWSKI; NEUTRA, 2003) e prepúcio e/ou epitélio uretral (GIRARD; HABEL; CHANEL, 1999).

Superfícies mucosas são os locais de entrada do vírus, de replicação e amplificação inicial, bem como de início da depleção de células T CD4⁺ (VEAZEY et al., 1998). O HIV pode ser transmitido como vírion ou associado à células provenientes de indivíduos infectados. Partículas virais livres ou liberadas por células infectadas interagem com células epiteliais e alcançam o tecido submucoso por diferentes mecanismos, incluindo endocitose, transcitose, infecção produtiva ou penetração através de espaços entre células que formam a barreira epitelial (HLADIK; MCEL RATH, 2008). No caso de partículas virais associadas à células, é possível que o vírus seja transportado para linfonodos do hospedeiro por células infectadas de origem do doador (PHILLIPS et al., 1998).

Na ausência de ruptura da mucosa devido a trauma, as rotas propostas para a entrada do HIV na lâmina própria são as células M, células dendríticas e células epiteliais (STAHL-HENNIG et al., 1999). Acredita-se que as células M, células epiteliais especializadas da mucosa intestinal, capturem e transportem o vírus para o tecido linfóide associado à mucosa. Alternativamente, células dendríticas podem auxiliar na disseminação do vírus pela sua capacidade de trafegar entre células epiteliais. As partículas virais podem se fixar através da gp120 à DC-SIGN, uma molécula de adesão específica de células dendríticas, sendo o vírus então transportado na superfície celular e sendo a infecção

de células susceptíveis promovida através do contato célula-célula (GEIJTENBEEK et al., 2000). Células epiteliais possuem o receptor galactosilceramida, o qual pode ser utilizado pelo vírus para realizar transcitose e assim alcançar a lâmina própria (BELYAKOV; BERZOFSKY, 2004).

Células de langerhans presentes na mucosa genital expressam as moléculas CD4 e CCR5 e estão acessíveis ao vírus (SAIDI et al., 2007). Apesar destas células apresentarem dendritos que podem estender e retrair entre espaços celulares, atingindo o epitélio e possibilitando interação com partícula de HIV na superfície mucosa, ainda é controverso se este tipo celular é realmente infectado pelo HIV. Curiosamente, o vírus escapa do reconhecimento por langerina em células de Langerhans vaginais, resultando na localização do vírus em compartimentos endocíticos e aumentando assim a taxa de disseminação viral (DE WITTE et al., 2007).

Independente da via de entrada, partículas virais cruzam a barreira mucosa em 2-6 horas e a infecção é disseminada localmente nos primeiros três a seis dias, quando células dendríticas, macrófagos e células T CD4⁺ contendo partículas virais migram para tecidos linfóides regionais (POPE; HAASE, 2003). Este processo pode ocorrer mais rapidamente se houver ulceração, trauma ou inflamação do tecido mucoso, infecções adicionais ou exposição a altas cargas virais. O contato entre células carreadoras de partículas virais e células susceptíveis à infecção nos centros germinativos de tecidos linfóides leva a uma taxa de replicação viral expressiva nos quatorze dias após a exposição. A primeira linha de defesa é constituída por componentes do sistema imune inato e mecanismos antivirais, como a liberação de interferon (IFN). A resposta inflamatória local provocada pela infecção auxilia na replicação viral, levando à disseminação da infecção para órgãos e tecidos linfóides distais do local de infecção inicial (SLEASMAN; GOODENOW, 2003). Disseminação sistêmica ocorre de seis a vinte e cinco dias, com dispersão viral ocorrendo provavelmente pelo transporte do vírus pelas APCs para tecidos linfóides, onde células T CD4⁺ são infectadas (HU; GARDNER; MILLER, 2000).

As células T CD4⁺ do trato gastrointestinal são o alvo primário de HIV, sendo o local onde ocorre depleção inicial de células T CD4⁺ (SANKARAN et al., 2005). Este processo talvez se deva a interações entre gp120 da partícula viral e integrina $\alpha_4\beta_7$ presente nas células-alvo, molécula esta responsável pela migração e retenção de células T na mucosa intestinal (CICALA et al., 2009). Esta interação resulta na

formação de sinapses célula-célula, aumentando a taxa de distribuição do vírus (ARTHOS et al., 2008). Estudos em primatas não-humanos (NHP) demonstram que a depleção de células T CD4⁺ no trato gastrointestinal e linfonodos associados resulta em ruptura da barreira protetora do intestino, possibilitando a penetração de antígenos bacterianos no organismo e posterior distribuição por meio da corrente sanguínea (BRENCHLEY; DOUEK, 2008b). Este processo resulta em ativação generalizada de células T CD4⁺, o que promove a disseminação do vírus observada na fase aguda por disponibilidade de células-alvo ativadas (BRENCHLEY; DOUEK, 2008a). Acredita-se que a prevenção da depleção inicial de células T CD4⁺ no intestino possa preservar a barreira mucosa, prevenindo a elevada viremia e posterior progressão para AIDS (SILVESTRI, 2008). De fato, a velocidade de progressão para AIDS tem sido relacionada com a perda de células T CD4⁺ no trato gastrointestinal durante fase aguda, onde a depleção de grandes números de linfócitos leva à redução do tempo de incubação viral (BRENCHLEY; DOUEK, 2008b).

1.2.1 Trato genital feminino

HIV é geralmente transmitido pelas vias de mucosa, sendo que indivíduos do sexo feminino estão em maior risco de aquisição de infecção por exposição do trato genital (TG) ao vírus que indivíduos do sexo masculino. Atualmente, mulheres compreendem 60% dos indivíduos HIV-positivos, sendo que 30-40% das novas infecções ocorrem neste grupo (WIRA; FAHEY, 2008; UNAIDS, 2009). Este fato é de grande importância, visto que o vírus pode ser facilmente transmitido por mulheres infectadas para a prole durante gestação, parto ou amamentação (MOFENSON, 2010). De fato, estima-se que mais de 2,2 milhões de infantes tenham sido infectados com HIV devido à transmissão vertical (UNAIDS, 2009).

O TG feminino é um microambiente exposto a uma grande variedade de estímulos antigênicos e inflamatórios, associados ao ato sexual e à presença constante de microorganismos. Este sistema de órgãos é composto externamente pela vulva e cavidade vaginal, conectadas sequencialmente ao cérvix uterino, cavidade uterina revestida por endométrio, tubas uterinas e ovários (NASU; NARAHARA, 2010). O TG inferior, formado pela vagina e ectocérvix, é revestido por epitélio escamoso, enquanto epitélio colunar constitui o revestimento do TG genital superior, que abrange a região compreendida entre o endocérvix e as tubas uterinas.

Ao contrário do observado em outros tecidos mucosos, o TG feminino não possui tecido linfóide organizado a ele associado (NASU; NARAHARA, 2010). Entretanto, é sabido que este aparelho possui defesas tanto físicas, como epitélio escamoso ou colunar, movimento ciliar e produção de muco, como aquelas conferidas pelo sistema imune inato, pela ação de células *natural killer* e liberação de proteínas, citocinas e quimiocinas (WIRA et al., 2005). A resposta imune celular na mucosa do TG é mediada por linfócitos intraepiteliais (IELs) que estão presentes em grande quantidade nas mucosas, apresentando perfis variados e capacidade citolítica e imunorregulatória (HAYDAY et al., 2001). Acredita-se que estas células estejam envolvidas na proteção contra infecções variadas, bem como na manutenção da integridade dos tecidos epiteliais. IELs podem ser ativados no próprio epitélio por células apresentadoras de antígeno (APCs) ou por células epiteliais vizinhas, bem como nos linfonodos ilíacos (LNI), drenantes da cavidade vaginal (HAYDAY et al., 2001).

Apesar do TG feminino não possuir tecido linfóide organizado a ele associado, foi demonstrado que a região de transição entre o sistema reprodutivo inferior e o superior é um tecido linfóide induzível. Durante infecção crônica por algum patógeno ou após administrações repetitivas de um mesmo antígeno, é observado acúmulo de IELs específicos no epitélio do TG (ARSTILA et al., 2000), formando um agregado denso celular que se assemelha a centros germinativos de linfonodos (KOBAYASHI et al., 2002). Apesar da retenção de tais células no tecido epitelial decair continuamente após a imunização, muitas delas são mantidas na lâmina própria e apresentam capacidade de retornar rapidamente ao epitélio e desempenhar atividade citolítica em resposta à infecções locais (MASOPUST et al., 2001).

Tem sido proposto que a flutuação hormonal observada durante o ciclo menstrual pode tornar o TG feminino especialmente vulnerável à infecção por HIV. Fatores envolvendo resposta imune inata e adaptativa são suprimidos em torno de dez dias após ovulação, favorecendo a infecção de células susceptíveis ao HIV neste período (WIRA; FAHEY, 2008). As moléculas CD4, CCR5 e CXCR4 são constitutivamente expressas na face apical das células epiteliais que revestem a cavidade vaginal, sendo expressas de maneira elevada durante a ovulação (YEAMAN et al., 2003). A formação de agregados linfóides associados ao endométrio durante a fase secretora do ciclo menstrual, associada à supressão da atividade de linfócitos citotóxicos no útero e tubas uterinas neste mesmo período (WHITE et al., 1997), torna o TG feminino especialmente vulnerável ao HIV pela presença aumentada de células-

alvo concomitante com a diminuição de resposta imune específica contra o vírus.

Apesar do tecido vaginal e ectocérvix serem mais resistentes à infecção por possuírem diversas camadas de epitélio escamoso em comparação à camada única de epitélio colunar do endocérvix, a maior área de contato e possível microabrasão causada pelo ato sexual torna aquela região particularmente susceptível à infecção pelo HIV (SHACKLETT, 2009). Embora células-alvo para HIV serem abundantes e igualmente distribuídas no TG feminino, ainda é necessária uma caracterização minuciosa dos outros tipos celulares e processos relacionados à resposta imune neste tecido mucoso (SHACKLETT, 2009).

1.3 Estratégias vacinais contra HIV-1

Desde a identificação do HIV como agente etiológico da AIDS, muitos progressos foram alcançados no entendimento das interações entre o vírus e o sistema imune do hospedeiro, o que possibilitou o desenvolvimento de terapias antiretrovirais cada vez mais eficazes e direcionou a pesquisa de vacinas. Entretanto, os processos envolvidos no controle da infecção pelo HIV ainda não foram completamente desvendados e até o presente momento, vacinas experimentais testadas falharam na indução de proteção contra infecção.

Relatos sugerem a presença de imunidade protetora natural em indivíduos expostos ao vírus e acredita-se que a chave para entender este processo está em examinar a pequena parcela de indivíduos resistente à infecção ou às suas manifestações (MARMOR et al., 2006). A ausência de infecção pelo HIV, apesar de repetidas exposições ao vírus, foi observada em profissionais do sexo africanas (FOWKE et al., 1996), indivíduos que mantém relações sexuais sem proteção com parceiros soropositivos (GOH et al., 1999), infantes nascidos de mães infectadas (KUHN et al., 2001), profissionais da saúde com exposição acidental ao vírus (PINTO et al., 1995), usuários de drogas injetáveis que compartilham agulhas (MAKEDONAS et al., 2002) e hemofílicos expostos a sangue contaminado (BARRETINA et al., 2000). Por fim, uma pequena proporção (cerca de 5%) de indivíduos soropositivos permanece assintomática e mantém contagens estáveis de células T CD4⁺ por mais de 15 anos após o contágio (WAGNER et al., 1999). Estes indivíduos, denominados progressores lentos (LTNP) ou controladores de elite, mantêm a competência imunológica no combate à viremia por períodos prolongados, apresentando resposta imune celular e humoral contra o vírus.

Em modelos experimentais, anticorpos contra HIV administrados por transferência passiva protegeram NHP contra infecção (RUPRECHT et al., 2001) e por este motivo o desenvolvimento de vacinas contra o vírus foi inicialmente focado na indução de anticorpos contra a proteína viral Env (HOXIE, 2010). Entretanto, tem sido infrutífera a indução de anticorpos neutralizantes (AcN) por meio de vacinas. Vacinas contendo gp120 recombinante foram exaustivamente testadas, mas este tipo de imunógeno demonstrou limitada eficácia na indução de imunidade vírus-específica mesmo quando administrado em presença de adjuvantes, tanto em chimpanzés (BERMAN et al., 1988) quanto em ensaios clínicos de fase III (COHEN, 2003). Esforços recentes no desenvolvimento de vacinas indutoras de AcN têm se concentrado no desenvolvimento de imunógenos que induzem resposta humoral neutralizante semelhante à observada em alguns indivíduos infectados, capaz de neutralizar variados isolados virais de diferentes subtipos (MASCOLA; MONTEFIORI, 2010). Entretanto, as vacinas atuais ainda induzem anticorpos com diversidade de reconhecimento limitada, não tendo sido possível o desenvolvimento de imunógeno que fosse capaz de neutralizar o HIV, impedindo sua entrada na célula.

Há evidências de que células T são cruciais para o controle da infecção pelo HIV e acredita-se que a resistência à infecção observada em alguns indivíduos expostos não-infectados ou LTNP seja resultado da ação de células T específicas contra o vírus (NORRIS; ROSENBERG, 2001). Além disso, o controle da replicação viral e soroconversão observadas na fase aguda da infecção por HIV possui correlação temporal com o aparecimento de resposta de células T CD8⁺ contra o vírus (PANTALEO; FAUCI, 1995). Considerando o fracasso das vacinas tradicionais e o papel da resposta imune celular antiviral no controle da replicação de HIV, têm-se pesquisado vacinas que induzam a ativação de células T capazes de reconhecer regiões internas, conservadas entre isolados virais. Vacinas de DNA e vacinas baseadas em vetores virais têm sido extensivamente estudadas com o intuito de induzir resposta imune celular contra o HIV.

A manipulação genética permitiu a modificação de vírus para sua utilização como vetores virais recombinantes, método no qual o gene de interesse é inserido em um vetor viral, deletado ou não de algumas regiões do seu genoma. Inúmeros vírus têm sido exaustivamente estudados como vetores virais, incluindo Adenovírus (Ad), poxvírus, alphavírus, poliovírus e herpesvírus (SOUZA et al., 2005). Os vetores com maior sucesso pré-clínico foram vírus da

vaccínia Ankara modificado (MVA) e adenovírus humano sorotipo 5 (AdHu5), sendo que ambos conferiram proteção em NHP desafiados com uma quimera SIV/HIV altamente patogênica, denominada SHIV89.6 (BAROUCH et al., 2001; SHIVER et al., 2002). Vários estudos utilizam regimes de dose-reforço, possibilitando a utilização de menores doses individuais, assim reduzindo a toxicidade relacionada ao vetor viral. Estes protocolos geralmente combinam vacinas de DNA ou de subunidades com outras modalidades (LIU et al., 2008; YU et al., 2008) ou diferentes sorotipos de um mesmo vírus (HAGLUND et al., 2002; PINTO et al., 2003).

1.3.1 Adenovírus como vetor vacinal

Ad têm sido utilizados para vacinação desde a década de 70, empregando-se Ad humano sorotipos 4 e 7 atenuados na imunização de recrutas norte-americanos contra doença respiratória aguda (TOP et al., 1971). Como consequência dos resultados satisfatórios alcançados neste procedimento, bem como por atenderem os requisitos de segurança e estabilidade, Ad foram posteriormente considerados na construção de vetores virais recombinantes. Desde a década de 80, inúmeros sorotipos de Ad, humanos e de outras espécies, têm sido extensivamente avaliados tanto como vetores vacinais quanto em terapia gênica para diversas enfermidades (VIJALA; LARSEN; RASKO, 2009; LIU et al., 2010). Ad transduzem APCs de forma eficiente e induzem potente resposta imune inata (ZHANG et al., 2001; LANZA et al., 2010), o que potencializa a resposta imune adaptativa subsequente. Seu material genético não se integra aos cromossomos da célula hospedeira, eliminando o risco de mutagênese por inserção, e quando deletados das regiões E1 ou E4 não há temores quanto à transmissão horizontal (BANGARI; MITTAL, 2006).

Ad pertencem à família Adenoviridae e têm sido isolados de grande variedade de espécies animais. Atualmente, são agrupados em quatro gêneros de acordo com sua organização genômica, propriedades sorológicas e crescimento em cultura celular (BANGARI; MITTAL, 2006). O gênero *Mastadenovirus* é responsável pela infecção de diversos mamíferos, sendo que Ad que infectam seres humanos são classificados em 6 subgrupos de A a F. Membros do gênero *Aviadenovirus* infectam aves, enquanto o gênero *Atadenovirus* consiste de um grupo de vírus isolados de ovinos, bovinos e algumas aves (BANGARI; MITTAL, 2006). Recentemente foi proposto um quarto gênero, denominado *Siadenovirus*, que engloba vírus isolados de

anfíbios e outros invertebrados (DAVISON; BENKO; HARRACH, 2003).

Ad são vírus líticos, não-envelopados, icosaédricos, com 70 nm de diâmetro (PINTO; ERTL, 2002). O capsídeo de Ad consiste em três proteínas principais, denominadas hexon, penton e fibra, além de cinco proteínas adicionais (PARKS, 2005). Um total de 240 hexons formam a maior parte da estrutura do capsídeo, enquanto 12 vértices consistem em bases penton ligadas a fibras (SUMIDA et al., 2005). O genoma viral é constituído por DNA linear dupla-fita, com cerca de 35 mil nucleotídeos divididos em dois grupos. Regiões *early* (E) do genoma codificam os chamados eventos precoces, que podem ocorrer antes da replicação do material genético e atuam regulando a transcrição. Regiões *late* (L) são responsáveis pelos eventos que ocorrem durante ou após a replicação do genoma viral e sintetizam a maior parte das proteínas estruturais. Três regiões do genoma, consideradas não-essenciais para a viabilidade viral, são utilizadas para a inserção de material genético exógeno. Ad recombinantes do gênero *Mastadenovirus* podem ser obtidos pela deleção das regiões E1, E3 ou E4, ou através de dupla deleção para grandes insertos (SOUZA et al., 2005). Uma vez que as regiões E1 e E4 são necessárias para a replicação viral, mutantes destes genes resultam em partículas replicantes-incompetentes, consideradas seguras para administração e expressão de genes *in vivo*. Vírus E1-deletados são facilmente propagados em cultura celular, pela utilização de células complementares que expressam o produto do gene deletado E1 (PINTO; ERTL, 2002).

Na via clássica de infecção, Ad interagem com receptor na superfície celular e induzem endocitose mediada por vesículas de clatrina (ZIELLO; HUANG; JOVIN, 2010). Este processo pode ocorrer por duas vias: interação de alta afinidade do hexon com receptor de Coxsackie e Adenovirus ou por ligação de penton à integrina na célula hospedeira. Após endocitose, o baixo pH do endossomo induz alterações no capsídeo viral que resultam na lise da bicamada lipídica e escape viral para o citosol (MUDHAKIR; HARASHIMA, 2009). Através de interação entre o capsídeo viral e dineína celular, a partícula viral é translocada para o núcleo por meio da rede de microtúbulos, onde o capsídeo é liberado por associação estável com proteínas nucleares (LEOPOLD; CRYSTAL, 2007). O material genético viral então permanece como DNA circular não-integrado ao genoma da célula hospedeira.

AdHu5 recombinante, deletado da região E1, induz potente resposta imune celular e humoral e por este motivo tem sido

considerado como um dos principais candidatos para uma vacina contra grande quantidade de patógenos, incluindo HIV-1 (SOUZA et al., 2005; LASARO; ERTL, 2009). A maioria dos Ad recombinantes utilizados como vacina anti-HIV tem sido construída com o gene codificador da proteína Gag, pois esta é um alvo primário de células T CD8⁺ em indivíduos não-progressores (LETVIN, 2005). Dada a relativa conservação das proteínas estruturais internas, tais como Gag, estes antígenos representam um conjunto de prováveis alvos de reconhecimento para células T, além de terem sido associados à relatos de imunidade cruzada entre os diferentes subtipos de HIV. Por este motivo, tem-se dado bastante atenção ao desenvolvimento de vacinas visando a indução de células T capazes de reconhecer proteínas internas do HIV. Uma vacina baseada em AdHu5 contendo o gene *gag* do SIV foi capaz de induzir proteção em NHP contra desafio de uma cepa de SHIV virulenta, bem como proporcionou controle mais eficiente da carga viral e manutenção das contagens de células T CD4⁺ quando comparada com vacinas de DNA ou vetores poxvirus (SHIVER et al., 2002). O ensaio clínico STEP, que utilizou o vetor AdHu5 expressando *gag*, *pol* e *nef* de HIV-1, foi a primeira vacina indutora de resposta imune celular a ser submetida à ensaio clínico de eficácia contra HIV (BUCHBINDER et al., 2008).

Entretanto, humanos são infectados por sorotipos comuns de Ad desde o início da vida e possuem AcN contra este vírus. Esta imunidade pré-existente contra o vetor é capaz de reduzir a expressão do transgene em NHP, limitando a eficácia da imunização em animais que possuem anticorpos contra o vetor (ZAISS et al., 2009). Acredita-se que 40% a 75% da população mundial possua AcN contra AdHu5 (CHIRMULE et al., 1999; VOGELS et al., 2003). No Brasil, a soroprevalência de AcN contra AdHu5 é de 70% (ERSCHING et al., 2010), sendo que na África Sub-saariana, região com maior índice de infecções pelo HIV, a população com altos títulos destes anticorpos chega a cerca de 90% (SUMIDA et al., 2005). Na presença de anticorpos contra o vetor, há aumento de sequestro do complexo vírus-anticorpo por APCs por interações de seus receptores para a porção constante de anticorpos (ZAISS et al., 2009). Apesar da presença aumentada de partículas virais no interior celular, este processo resulta na destruição da partícula viral e menor taxa de expressão do transgene devido à ativação e maturação de APCs por estimulação de mecanismos intracelulares (MERCIER et al., 2004; ZAISS et al., 2009).

Para evitar esta interferência e preservar as vantagens da utilização de Ad recombinantes, diferentes abordagens têm sido

empregadas. Uma delas consiste na modificação de epítomos de superfície reconhecidos por AcN, através da substituição das regiões hipervariáveis do hexon de AdHu5, onde reside a maioria das diferenças entre sorotipos (CRAWFORD-MIKSZA; SCHNURR, 1996), por correspondentes provenientes de sorotipos que pouco circulam nas populações humanas (ROBERTS et al., 2006). Esta modificação permite a substituição das regiões reconhecidas por AcN sem perturbação da estrutura do capsídeo, preservando assim a estabilidade da partícula viral. Uma segunda abordagem consiste na construção de vetores a partir de novos sorotipos de Ad, entre eles sorotipos humanos de baixa prevalência como AdHu11 e AdHu35 (THORNER et al., 2006; LIU et al., 2008), ou adenovírus símios (AdC), que não circulam em populações humanas e não compartilham epítomos com sorotipos humanos (XIANG et al., 2002).

Nosso grupo tem desenvolvido vetores adenovirais baseados em sorotipos isolados de chimpanzés (FARINA et al., 2001). Estes AdC são classificados filogeneticamente dentro dos sorotipos humanos (RUX; KUSER; BURNETT, 2003), possuindo similar organização genética e funcional (TATSIS; ERTL, 2004; HENSLEY et al., 2005). Apesar destas similaridades, a taxa de neutralização de AdC por AcN gerados em infecção com Ad humanos é baixa. Nove sorotipos de AdC são conhecidos, os quais transduzem de forma eficiente células humanas em cultura (BANGARI; MITTAL, 2006). Foram construídos vetores derivados de 5 isolados: AdC1, AdC5, AdC6, AdC7 e AdC68 (FITZGERALD et al., 2003; PINTO et al., 2003; TATSIS; ERTL, 2004; TATSIS et al., 2007a). Estes Ad estão agrupados em 3 sorotipos distintos e estão incluídos no subgrupo E por homologia de sequência ao sorotipo humano 4, com exceção de AdC1, pertencente ao subgrupo B (HAUT; ERTL, 2009). AdC5 e AdC7 pertencem ao mesmo sorotipo e possuem neutralização cruzada; AdC7 e AdC68 são intimamente relacionados e possuem neutralização cruzada parcial quando em presença de altos títulos de AcN.

Os vetores AdC foram desenvolvidos por meio de deleção da região E1 de seus genomas e posterior inserção do gene que codifica a forma truncada da proteína p37 de Gag (p16 e p24) do HIV-1, sob controle de promotor viral proveniente de citomegalovírus. Os vetores resultantes, denominados AdC6gag e AdC68gag, foram capazes de induzir resposta imune celular quando administrados em camundongos por via intramuscular (i.m.) (FITZGERALD et al., 2003; PINTO et al., 2003), via oral (PINTO et al., 2004) e via intravaginal (i.vag.) (DE SOUZA et al., 2007). Ensaio em NHP também demonstraram a

habilidade de vetores símios na indução de resposta imune celular (REYES-SANDOVAL et al., 2004; TATSIS et al., 2009). A resposta imune induzida por AdC pode ser aumentada com a utilização de reforço com sorotipo distinto, vacinas de DNA ou vetores virais preparados a partir de diferentes vírus (FITZGERALD et al., 2003; PINTO et al., 2003; REYES-SANDOVAL et al., 2004; MCCOY et al., 2007).

Ensaio de imunogenicidade em roedores, NHP e seres humanos demonstraram que Ad induzem frequências de células T CD8⁺ e que essa resposta é sustentada (FEINBERG; MOORE, 2002; SHIVER; EMINI, 2004), possivelmente pela persistência do vetor em baixos níveis (TATSIS et al., 2007b). Durante persistência, Ad permanecem transcricionalmente ativos, resultando em ativação constante de células T e assim diminuindo a contração da população de células específicas observada ao final da fase efetora. Esta situação pode apresentar vantagens por manter células efetoras circulantes; entretanto, a presença constante de células T ativadas pode retardar o desenvolvimento de células T de memória (HAUT; ERTL, 2009).

1.3.2 Protocolos vacinais de dose-reforço

Diferentes estratégias têm sido avaliadas com o objetivo de induzir resposta imune celular contra HIV-1. Muitas pesquisas foram realizadas com o intuito de melhorar a eficácia das vacinas existentes; atualmente, é realizada administração combinada de iguais ou distintas classes de vacinas. Estes protocolos, denominados *prime-boost* ou dose-reforço, consistem na administração de uma dose inicial de vacina seguida por dose de reforço, sendo capazes de induzir resposta imune de forma mais eficiente quando comparados à regimes de aplicação única (LI et al., 1993). Nestes protocolos de dose-reforço podem ser empregadas combinações de diferentes sistemas de expressão codificantes para os mesmos epítopos de um determinado antígeno, possibilitando o desenvolvimento de resposta imune celular e/ou humoral contra um determinado patógeno (FALKENSAMMER et al., 2009; TATSIS et al., 2009).

Apesar de muitas classes de vacinas serem capazes de induzir resposta imune, nem todas são efetivas como dose de reforço. Resposta primária ao antígeno requer indução de células T que persistam como células de memória e determina a habilidade da segunda dose em recrutar a resposta imune adaptativa. Em geral, vacinas de DNA, proteínas e lipopeptídeos são eficientes na primeira dose, mas ineficazes como agentes de reforço. Vírus recombinantes e atenuados são capazes

de induzir resposta imune específica em qualquer das duas doses se utilizados em protocolos heterólogos. Acredita-se que este perfil distinto de resposta à vacina seja efeito de imunodominância do transgene em relação às proteínas do vetor viral (DUNACHIE; HILL, 2003). A dose de reforço utilizando vetor viral distinto da primeira dose de vacina pode resultar em aumento da resposta imune adaptativa contra o transgene, enquanto induz resposta primária às proteínas do vetor viral. Desta forma, a utilização de um carreador altamente imunogênico e heterólogo na dose de reforço favorece a amplificação da resposta imune transgene-específica em detrimento da resposta imune contra o carreador (DUNACHIE; HILL, 2003).

Considerando vetores virais, a administração do vetor na dose inicial leva ao desenvolvimento de imunidade não só contra o transgene, mas também contra componentes protéicos da partícula viral (NAYAK; HERZOG, 2010). Acredita-se que mediante utilização de uma segunda dose do mesmo vetor, ou seja, dose-reforço homólogo, a imunidade gerada na primeira administração poderia neutralizar a partícula viral antes da expressão da proteína de interesse. Protocolos de dose-reforço utilizando administração de diferentes vetores seriam capazes de amplificar a resposta gerada contra o transgene na primeira aplicação, sem a interferência da imunidade pré-existente contra o vetor. Essa abordagem de imunização sequencial empregando diferentes vetores é conhecida como dose-reforço heterólogo, sendo capaz de induzir frequências superiores de células transgene-específicas quando comparada à protocolos utilizando duas doses do mesmo vetor vacinal. Um estudo em camundongos utilizando AdC6gag, AdC68gag e AdHu5gag em regimes homólogos ou heterólogos demonstrou que imunizações consecutivas, utilizando diferentes vetores pela via oral e i.m., induzem maior frequência de resposta imune celular que duas administrações do mesmo vetor (PINTO et al., 2004). AdC6gag, AdC7gag e AdHu5gag foram utilizados em NHP em um regime de vacinação i.m. de dose-reforço heterólogo de três doses, demonstrando que esses vetores são capazes de induzir células transgene-específicas quando administrados por via i.m., ultrapassando as barreiras de imunidade pré-existente contra AdHu5 (REYES-SANDOVAL et al., 2004).

A vantagem da utilização de protocolos de dose-reforço na indução de resposta imune específica contra HIV foi observada em um ensaio clínico recente (RERKS-NGARM et al., 2009). Neste ensaio, foram empregadas duas classes de vacinas que falharam previamente em regime de administração única: vetor viral canarypox expressando *gag*,

pol e *nef* (ALVAC-HIV), seguido de reforço com gp120 bivalente (AIDSVAX). Neste estudo, o protocolo vacinal demonstrou eficácia modesta, sendo insuficiente para o licenciamento da vacina, porém sugerindo que o desenvolvimento de uma vacina contra infecção por HIV pode ser possível (RERKS-NGARM et al., 2009). Este estudo é interessante por demonstrar que duas classes de vacinas que falharam em ensaios de eficácia quando administradas individualmente podem conferir resultados promissores quando consideradas dentro de um mesmo regime vacinal, demonstrando o efeito sinérgico de resposta imune humoral e celular no combate à infecção.

1.3.3 Imunização por vias mucosas

O sistema imune de mucosas é responsável pela mediação da relação entre o hospedeiro e microorganismos, tais como bactérias e fungos, e forma a primeira linha de defesa física e imunológica contra patógenos invasores (HOLMGREN; CZERKINSKY, 2005). O tecido linfóide associado à mucosa compreende os linfócitos do epitélio e da lâmina própria, sendo não só o alvo primário na maioria das infecções virais ou bacterianas, mas também um grande reservatório para a persistência de alguns vírus (DOUEK; PICKER; KOUP, 2003). O tecido linfóide associado à mucosa nasal (NALT) é o principal tecido linfóide associado à mucosa do trato respiratório de roedores, sendo drenado por linfonodos cervicais. É composto por células linfóides e apresenta pequenos folículos, altamente irrigados por vasos linfáticos e vênulas endoteliais, além de células dendríticas e macrófagos (ASANUMA et al., 1997). Além do seu papel na defesa do trato respiratório superior e inferior, o sistema linfóide nasal coopera com o sistema imune sistêmico e influencia a resposta imune em sítios de mucosa distais, como intestino, ouvidos, cavidade oral, trato gastrointestinal e urogenital. Desta forma, é compreensível que o NALT também possua um papel crucial na defesa destes tecidos adjacentes. De fato, a mesma subpopulação de células $CD3^{low}CD45R/B220^{low}$ têm sido identificada como reguladora de funções efetoras tanto no NALT (ASANUMA et al., 1997) como no trato gastrointestinal (BARRETT et al., 1992) e TG (JOHANSSON; LYCKE, 2003).

O sistema imune de mucosa possui desenvolvimento independente do sistema imune sistêmico. Como maior consequência deste fato, é tradicionalmente postulado que somente a resposta imune iniciada em sítios de mucosa pode levar à imunidade efetiva nestes tecidos (HOLMGREN; CZERKINSKY, 2005). Sendo assim, estratégias vacinais baseadas na administração de antígenos por vias de mucosa têm

sido desenvolvidas para prevenir doenças causadas por agentes infecciosos que utilizam sítios mucosos como porta de entrada. Como a grande parte das novas infecções com HIV ocorre pela mucosa do trato reprodutivo ou intestinal, acredita-se que vacinas capazes de proteger contra HIV devam induzir imunidade persistente em tecidos mucosos (BELYAKOV; BERZOFSKY, 2004). A aplicação de antígenos no tecido mucoso foi capaz de induzir resposta de células T CD8⁺ contra HIV-1 em tecidos linfóides sistêmicos e de mucosa em camundongos, enquanto imunizações por via parenteral estimularam predominantemente resposta imune celular em tecidos sistêmicos (BELYAKOV et al., 1998; BERZOFSKY; AHLERS; BELYAKOV, 2001). Com o intuito de induzir imunidade nas mucosas contra diversa gama de patógenos, grande variedade de vias de administração têm sido testadas, tais como imunização intra-retal (BELYAKOV et al., 1998), oral (PINTO et al., 2004), intranasal (i.n.) (PORGADOR et al., 1997) e i.vag. (KWANT; ROSENTHAL, 2004).

A imunização i.n. é capaz de induzir não somente imunidade local no trato respiratório, mas também em sítios de mucosa distais, tais como trato reprodutivo feminino (MESTECKY; RUSSELL, 2000). Diversos estudos demonstram a indução de resposta imune no TG contra diversos antígenos após imunização i.n. (RUSSELL, 2002; YOSHIZAWA et al., 2003; BURKE; WEN; KING, 2004; MILLIGAN et al., 2004; JIANG et al., 2005). Entretanto, a situação contrária não é observada; imunização i.vag. induz imunidade no trato reprodutivo feminino, mas falha na indução de resposta em tecidos adjacentes (HOLMGREN; CZERKINSKY, 2005). Embora a dispersão da resposta imune celular induzida pela aplicação de antígenos na mucosa vaginal seja restrita, a presença de células T HIV-específicas neste tecido é crucial para o controle inicial da maior parte das novas infecções por HIV.

Um grande número de estudos têm sido realizados em NHP para avaliar a indução de resposta imune específica contra HIV-1 mediante imunização por vias de mucosa. Estes estudos fazem uso de diferentes classes de vacinas em protocolos de dose-reforço, na sua maioria utilizando vetores virais conjuntamente com vacinas de DNA ou proteínas recombinantes, comumente administrados por via i.n., oral/intra-traqueal ou retal (JIANG et al., 2005; FALKENSAMMER et al., 2009; VAGENAS et al., 2009). Recentemente, a imunização i.n. tem sido a via de mucosa preferencialmente utilizada em ensaios de vacinas profiláticas contra HIV, por si só ou em combinação com outras vias de administração. A administração de vetores adenovirais por vias

de mucosa em combinação com vacinas de subunidades resultou na indução tanto de resposta imune celular (ZHOU et al., 2007; HIDAJAT et al., 2009) quanto humoral (FALKENSAMMER et al., 2009) contra o transgene, sendo que a resposta imune adaptativa detectada apresentou correlação com a redução da carga viral após desafio com SIV. Em contraste, a administração de AdHu5 recombinante e vacina de DNA por via i.m., seguidos de reforço com proteína recombinante pela via i.n., não conferiu proteção após desafio com SIV por via retal (DEMBERG et al., 2008). Imunização por vias de mucosa foram também utilizadas para a avaliação da eficácia de vacinas baseadas em vírus atenuados (VAGENAS et al., 2009), vacinas de DNA seguidas de reforço com vetor MVA (MANRIQUE et al., 2008; STOLTE-LEEB et al., 2008; MANRIQUE et al., 2009) ou vacinas de subunidades (BARNETT et al., 2008; WANG et al., 2009), resultando na diminuição da carga viral pós-infecção com SIV por via de mucosa. Porém, nestes estudos de proteção foram administrados desafios homólogos e por este motivo não fornecem informação quanto à proteção contra distintos isolados virais.

Considerando que a maioria das infecções por HIV e a depleção inicial de células T ocorrem em tecidos mucosos, a distribuição anatômica da resposta induzida por uma vacina contra HIV é crítica. Desta maneira, acredita-se que uma vacina contra HIV deva induzir AcN na superfície mucosa, com o intuito de prevenir a infecção, e resposta celular na área submucosa, caso o vírus escape da neutralização e ultrapasse a camada epitelial. A resposta imune celular de memória deve residir na mucosa ou em seus linfonodos drenantes, agindo dentro de horas após a infecção. Resposta específica contra HIV, presente na porta de entrada do vírus, pode ser decisiva no controle da infecção primária, prevenindo o estabelecimento de reservatório viral em tecidos linfóides e no trato gastrointestinal e consequentemente impedindo o estabelecimento da infecção persistente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar em camundongos BALB/c a indução e estado de ativação de células T CD8⁺ efectoras e de memória Gag-específicas, induzidas pela administração intramuscular ou por vias de mucosas de adenovírus recombinantes expressando o gene *gag* de HIV-1.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a dose ideal de adenovírus símios recombinantes e a cinética de indução de resposta imune celular Gag-específica sistêmica e de mucosas, bem como de resposta imune humoral, através da administração intranasal do vetor AdC6gag;
- Avaliar a indução de células T CD8⁺ Gag-específicas em tecidos mucosos e sistêmicos por administração de AdC6gag e AdC68gag pelas vias intranasal e intravaginal em esquema de imunização dose-reforço heterólogo;
- Determinar a cinética de produção e isotipos de anticorpos contra os vetores adenovirais e proteína Gag de HIV-1 após administração de vetores adenovirais por vias de mucosa;
- Avaliar a indução de células T CD8⁺ Gag-específicas em tecidos mucosos e sistêmicos através da administração de AdC6gag e AdC68gag pela via intramuscular em esquema de imunização dose-reforço heterólogo;
- Determinar o fenótipo de linfócitos T CD8⁺ Gag-específicos provenientes do trato genital feminino após imunização intramuscular ou por vias de mucosas;
- Avaliar a presença e o fenótipo de linfócitos T CD8⁺ de memória no trato genital feminino 1 ano após administração intramuscular de vetores adenovirais símios;
- Avaliar o efeito da imunização intramuscular com AdHu5gag em populações totais de células T CD4⁺ e CD8⁺, ou linfócitos T CD8⁺ Gag-específicos residentes no trato genital feminino, em presença de imunidade pré-existente contra o vetor adenoviral;
- Analisar o efeito de imunidade pré-existente contra o vetor vacinal sobre a expressão de marcadores fenotípicos relacionados à ativação e proliferação celular em linfócitos T CD8⁺ Gag-específicas de origem genital após administração de AdHu5gag;
- Determinar se células T residentes na mucosa genital possuem origem distinta de linfócitos presentes em órgão linfóide secundário;

- Determinar a relevância de anticorpos neutralizantes na interferência da indução de resposta imune celular ao produto do transgene após imunização intramuscular com AdHu5gag na presença de resposta imune adaptativa contra o vetor viral.

3 METODOLOGIA

3.1 Considerações éticas

Este projeto foi aprovado pela Comissão Interna de Biossegurança (CIBio – Protocolo 250/03) e pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (PP00068/CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina. Aprovação adicional foi obtida junto ao Comitê Institucional de Uso e Cuidado Animal do Instituto Wistar (Filadélfia, PA, EUA).

3.2 Modelo animal

Nos ensaios de imunização foram utilizados camundongos *Mus musculus*, linhagem BALB/c, fêmeas, isogênicos, haplótipo H-2k^d. Para ensaios de transferência adotiva de linfócitos foram utilizados camundongos *Mus musculus*, fêmeas, linhagem Thy1.1 (CD90.1). Os animais, de 6 a 8 semanas de idade, foram mantidos com água e alimento *ad libitum* no Biotério Setorial do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, sob padrão sanitário convencional, ou no Biotério Central do Instituto Wistar, sob padrão sanitário com barreiras e livre de patógenos específicos.

3.3 Linhagens celulares

Células HEK293 (ATCC número CRL-1573), fibroblastos humanos embrionários isolados de epitélio renal, aderentes, transfectados com a região E1 de adenovírus humano sorotipo 5, e células 143B TK⁻ (ATCC número CRL-8303), osteosarcoma humano, aderentes, foram utilizadas neste estudo. As células foram mantidas em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Cellgro Mediatech), tamponado com 3,6 g de bicarbonato de sódio (Merck), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco) e 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 0,25 µg/ml de anfotericina B (PSA) (Sigma), e mantidas a 37°C em atmosfera de 95% de umidade e 5% de CO₂.

3.4 Vírus Recombinantes

Neste estudo foram utilizados vetores adenovirais deletados da região E1 e expressando a forma truncada do gene *gag* do HIV-1 subtipo B (PINTO et al., 2004). Nos ensaios de cinética e dose-reforço, foram utilizados adenovírus símio sorotipos 6 e 68 (AdC6gag e AdC68gag, respectivamente). Nos ensaios de desafio, adenovírus símios expressando glicoproteína do vírus rábico (AdC6rab.gp e AdC68rab.gp)

(ZHOU et al., 2006) foram utilizados como controle. Para a indução de imunidade pré-existente ao vetor vacinal e posterior avaliação de resposta imune celular e humoral, foram utilizados adenovírus humano sorotipo 5 (AdHu5) expressando a forma truncada do gene *gag* do HIV-1 subtipo B (AdHu5gag), a glicoproteína do vírus rábico (AdHu5rab.gp) (XIANG et al., 2003) ou proteína verde fluorescente (GFP) (AdHu5GFP) (PICHLA-GOLLON et al., 2007). Vírus da vaccínia recombinante que expressa a forma truncada do gene *gag* do HIV-1 subtipo B (Vacgag) (PINTO et al., 2004), expressando a proteína repórter LacZ, foi utilizado no ensaio de desafio.

Os vetores adenovirais foram propagados em células HEK293, purificados por gradiente de cloreto de céσιο e o número de partículas virais (p.v.) foi determinado por espectrofotometria. Os lotes virais continham aproximadamente 10^{13} p.v./ml, com razão de multiplicidade de infecção (MOI) : p.v. de 1:50-200 e foram armazenados a -80°C . Vírus da vaccínia recombinante foi propagado e tutilado em células 143B TK⁻. Estoques virais continham aproximadamente 10^8 unidades formadoras de placas (pfu)/ml e foram armazenados a -80°C . Para ensaios de imunização, os estoques foram descongelados e diluídos em solução salina tamponada de fosfato com pH 7,4 (PBS) (Cellgro Mediatech) estéril. Os lotes de vetores virais foram regularmente submetidos a controle de qualidade para MOI, presença de transgene e ausência de contaminantes (PINTO et al., 2003; ROY et al., 2004).

3.5 Peptídeo

O peptídeo AMQMLKETI, que contém o epítipo imunodominante da proteína Gag do HIV-1 subtipo B para MHC de classe I de camundongos BALB/c (DOE; WALKER, 1996), foi utilizado neste estudo. O peptídeo foi sintetizado, purificado por cromatografia líquida de alta eficiência e sua seqüência foi verificada por espectrofotometria de massa (Anaspec). Para utilização nos ensaios posteriormente descritos, o peptídeo foi suspenso em dimetilsulfóxido (Sigma) na concentração de 1 mg/ml e mantido a -20°C .

3.6 Imunização de camundongos

Grupos de 5 a 20 camundongos BALB/c foram imunizados por via i.m. ou através de mucosas com vetores virais recombinantes. A imunização i.m. foi aplicada no músculo quadríceps, inoculando-se de 10^{10} a 10^{11} p.v. num volume de 100 μl (PINTO et al., 2003). A imunização i.n. ou i.vag. foi realizada através da administração, utilizando pipeta automática, de 10 μl contendo 10^8 a 10^{10} p.v. (DE

SOUZA et al., 2007). Para administração pelas vias de mucosa, os animais foram primeiramente anestesiados com 2,78 mg de cloridrato de cetamina (Phoenix Pharmaceutical) e 0,12 mg de cloridrato de xilazina (Vedco) administrados intraperitonealmente. Cinco dias antes de imunização pela via i.vag., animais receberam 3 mg de acetato de medroxiprogesterona (Sigma) pela via intraperitoneal (i.p.) para sincronização do ciclo estral. Em ensaios de dose-reforço, os animais receberam a segunda dose do mesmo ou distinto vetor adenoviral 6 semanas após a dose inicial.

3.7 Obtenção e purificação de células

Os animais foram sacrificados em câmara de dióxido de carbono. O sangue foi coletado através de punção cardíaca em presença de citrato de sódio 4% e posteriormente submetido a gradiente de densidade utilizando Histopaque (Sigma) por 20 minutos a 600 xg. Após centrifugação, a camada celular na interface foi recolhida, adicionada a 5 ml de meio L-15 (Cellgro Mediatech) contendo 2mM de EDTA (Gibco) e centrifugada por 5 minutos a 350 xg. O processo foi repetido, o sobrenadante descartado e o precipitado foi suspenso em meio L-15.

Baço e LNI foram removidos cirurgicamente e submetidos à dissociação mecânica para liberação de células. Alternativamente, amostras de sangue foram coletadas na presença de heparina (Wallcur). As amostras foram então submetidas à lise de hemácias com solução de lise ACK (Invitrogen). A suspensão celular proveniente deste procedimento foi submetida a três centrifugações a 350 xg por 5 minutos em meio L-15. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram descartados e o precipitado suspenso em meio L-15.

A remoção do NALT foi realizada conforme descrito por Heritage e colaboradores (HERITAGE et al., 1997). Após sacrifício e exsanguinação dos animais, foi realizada decapitação e remoção da pele, língua e mandíbula. Em seguida, a região contendo os dentes incisivos e nostrilas foi removida, sendo realizada nova incisão na linha dos olhos. O fragmento restante foi acomodado dorsalmente em placa de Petri e o palato então removido, revelando o NALT bilateralmente, envolto por tecido colagenoso. A estrutura foi removida com pinças de microcirurgia e mantida em meio L-15, sendo realizada etapa de dissociação mecânica, como previamente descrito para baço e linfonodos.

Para obtenção de IELs da mucosa vaginal, o trato reprodutivo feminino foi removido cirurgicamente e fragmentado em pedaços de 0,5 cm. Os fragmentos foram submetidos à agitação constante de 130 rpm

por 1 hora em meio RPMI-1640 (Cellgro Mediatech) suplementado com 5% SFB e 1% PSA. O sobrenadante foi coletado e a amostra então submetida à dissociação enzimática com 1,4 mg/ml de colagenase tipo I (Gibco) em meio RPMI 1640 suplementado 5% SFB e 1% PSA por 15 minutos, sob agitação a 37°C. O sobrenadante proveniente da dissociação enzimática foi adicionado ao resultante do primeiro ciclo de agitação e a amostra centrifugada por 10 minutos a 350 xg. Os linfócitos foram então purificados por centrifugação em gradiente de Percoll (Sigma) a 600 xg por 20 minutos, sendo suspensos em fração 40% Percoll e adicionados sobre fração 70% Percoll. Após centrifugação, a camada resultante na interface foi recolhida e lavada em meio RPMI-1640. As células obtidas a partir de diferentes tecidos e órgãos foram contadas utilizando-se corante vital azul de tripan a 0,2% (Sigma), sendo suspensas em densidade e meio adequados para os ensaios subsequentes.

3.8 Coleta de amostras de soro, saliva, lavado vaginal e fezes para ensaios de neutralização e ELISA

Sangue foi coletado individualmente através de punção mandibular e incubado à temperatura ambiente por 2 horas. Os lavados vaginais foram obtidos individualmente mediante lavagem da cavidade vaginal com volume total de 150 µl de PBS (Cellgro Mediatech) estéril, utilizando pipeta automática. As amostras foram centrifugadas a 300 xg por 10 minutos, o sobrenadante recolhido e submetido a nova centrifugação a 16.000 xg por 10 minutos. O sobrenadante resultante do segundo ciclo de centrifugação foi utilizado nos ensaios de neutralização ou ELISA.

Amostras de saliva e fezes foram obtidas de 5 animais pertencentes ao mesmo grupo. Fezes frescas foram coletadas, pesadas e incubadas por 12 horas em PBS contendo 0,3% de azida de sódio. Após maceração, a solução resultante foi centrifugada a 16.000 xg por 20 minutos. Para coleta de saliva, camundongos foram inoculados i.p. com 100 µg de cloridrato de pilocarpina (Sigma). A saliva foi coletada e centrifugada por 20 minutos a 16.000 xg. Nas amostras de saliva e fezes, o precipitado foi descartado e o sobrenadante utilizado nos ensaios ELISA. Amostras foram mantidas a -20°C até a realização dos experimentos abaixo descritos.

3.9 Ensaio de dose-resposta para imunização por vias de mucosa

Ensaio de dose-resposta foram realizados para determinação da dose mais adequada de AdC68gag a ser utilizada nos ensaios de imunização. Grupos de 5 camundongos BALB/c foram imunizados i.n.

com duas concentrações do vetor viral (10^8 e 10^{10} p.v.). Os animais foram sacrificados 14 dias após a imunização para análise da resposta imune celular Gag-específica presente no NALT, TG, LNI, sangue e baço através de ensaios de tetrâmero e ELISpot abaixo descritos.

3.10 Avaliação do protocolo de dose-reforço heterólogo

A fim de avaliar a resposta imune celular induzida pelo protocolo de dose-reforço heterólogo, grupos de animais foram imunizados com AdC6gag e AdC68gag por diferentes vias e em combinações distintas. Grupos de 5 camundongos BALB/c foram imunizados pela via i.m. ou através da mucosa com 10^{10} p.v. de AdC6gag. Após 6 semanas, administrou-se reforço com vetor viral distinto da primeira dose, através de diferente ou de mesma via de imunização. Para análise do fenótipo de células T $CD8^+$ Gag-específicas, grupos de 20 camundongos BALB/c foram imunizados com o mesmo protocolo. Duas e 4 semanas após imunização, sangue, baço, LNI e TG foram analisados quanto à presença de resposta imune utilizando-se ensaio de tetrâmero e ELISpot, abaixo descritos, para determinar o melhor esquema de imunização.

3.11 Avaliação da resposta imune celular de memória

Grupos de 5 camundongos BALB/c foram imunizados por via i.m. com 10^{10} p.v. de AdC6gag e receberam reforço i.m. com 10^{10} p.v. de AdC68gag 6 semanas após a primeira imunização. Doze meses após o reforço, os animais foram sacrificados e baço, sangue, LNI e TG foram removidos e analisados quanto à presença de células T $CD8^+$ Gag-específicas através do ensaio de tetrâmero e fenotipagem abaixo descrito.

3.12 Ensaio de proteção

Grupos de 5 camundongos BALB/c foram imunizados com 10^{10} p.v. de AdC6gag pela via i.n., seguido de reforço i.vag. com 10^{10} p.v. de AdC68gag 6 semanas após a primeira imunização. Quatro semanas após o reforço, os animais foram desafiados com 10^6 pfu de Vacgag pela via i.vag. Neste ensaio foram incluídos grupos-controle recebedores do mesmo regime de imunização, entretanto utilizando vetores expressando glicoproteína do vírus rábico (AdC6rab.gp e AdC68rab.gp), bem como animais que receberam somente uma dose da vacina por diferentes vias (i.n. ou i.m.) ou de AdC6rab.gp pela via i.n.. Cinco dias após o desafio, os ovários foram removidos de forma cirúrgica e tratados individualmente. A estrutura foi dissociada mecanicamente e o

sobrenadante livre de células foi titulado em monocamada confluyente de células 143B TK-. Após 18 horas de incubação, as células foram recobertas com agarose de baixo ponto de fusão 2% em meio *Minimum Essential Eagle's Medium* (Gibco) contendo X-galactose (Roche). As placas foram examinadas 24 horas após, sendo as placas azuis contadas em microscópio estereoscópico para determinação do título viral presente em cada par de ovários.

3.13 Avaliação do padrão migratório de células T CD8⁺ Gag-específicas de origem sistêmica

Grupos de 10 camundongos BALB/c foram imunizados com 10^{10} p.v. de AdC6gag e após 6 semanas receberam reforço com 10^{10} p.v. de AdC68gag por via i.m. Esplenócitos foram isolados 14 dias após o reforço, sendo 5×10^7 células transferidas por via endovenosa para camundongos Thy1.1 *naïve*. Diferentes compartimentos foram analisados 7 dias após a transferência quanto à presença de células T CD8⁺ Gag-específicas provenientes do grupo doador utilizando-se o ensaio de tetrâmero abaixo descrito.

3.14 Avaliação de resposta imune HIV-específica induzida por AdHu5gag na presença de imunidade pré-existente contra o vetor adenoviral

Para a indução de imunidade pré-existente ao vetor vacinal, 10^{11} p.v. de AdHu5rab.gp foram administradas por via i.n. ou i.m. em grupos de 5 camundongos BALB/c, sendo amostras de sangue coletadas 2 semanas após a administração do vetor viral a fim de determinar o título de AcN. Animais com títulos de AcN contra o vetor AdHu5 ≥ 20 (i.n.) ou ≥ 40 (i.m.) foram imunizados com 10^{10} p.v. de AdHu5gag pela via i.m. 3 semanas após a pré-exposição ao vetor vacinal. Grupos controle consistiram em animais *naïve* ou imunizados com o vetor AdHu5gag na ausência de imunidade pré-existente. A resposta imune induzida foi avaliada em diversos intervalos de tempo utilizando-se ensaio de tetrâmero e fenotipagem abaixo descrito.

3.15 Avaliação da interferência de AcN na indução de resposta imune Gag-específica

Grupos de 10 camundongos BALB/c foram inoculados com 10^{11} p.v. de AdHu5rab.gp por via i.m., recebendo adicionalmente uma dose deste mesmo vetor com 6 semanas de intervalo. Duas semanas após o reforço, o sangue foi coletado por punção mandibular e uma alíquota de soro foi utilizada para determinar o título de AcN contra

AdHu5. O restante do soro foi transferido por via endovenosa para camundongos *naïve* (500 μ l por animal). Uma semana após a transferência do soro, foi coletado sangue para confirmar a presença de AcN, sendo então que os animais que possuíam anticorpos anti-AdHu5 foram imunizados com AdHu5gag por via i.m. Duas semanas após a imunização os animais foram sacrificados e a presença de células T CD8⁺ Gag-específicas em diversos tecidos foi avaliada através do ensaio de tetrâmero abaixo descrito.

3.16 Ensaio de neutralização viral

Soro proveniente de animais imunizados com AdHu5rab.gp foi coletado individualmente e inativado a 56°C por 30 minutos em banho-maria. O ensaio de neutralização fez uso de vetores adenovirais expressando GFP, na concentração de 500 p.v. por célula. Aliquotas de soro foram diluídas de forma seriada, na razão 2, a partir da diluição 1:10 até 1:1.280 em volume de 50 μ l de meio de cultura e incubadas com 1 volume do vetor AdHu5GFP (totalizando 100 μ l de volume de reação) por 1 hora à temperatura ambiente. Monocamadas de células HEK293 foram tripsinizadas e 3×10^4 células foram adicionadas à mistura soro-vetor, totalizando 200 μ l. As amostras foram então incubadas em placas de 96 cavidades (Nunc) por 24 horas a 37°C em presença de 5% CO₂. Controle viral consistiu no uso de soro proveniente de animais *naïve*, enquanto células incubadas com meio de cultura, sem adição da solução viral, foram utilizadas como controle celular. Cinco campos escolhidos aleatoriamente foram analisados quanto à presença de células positivas para GFP em microscópio de fluorescência (Olympus IX71) e comparados ao número de células fluorescentes no controle viral. Amostras foram consideradas positivas para AcN mediante a redução de 50% no número de células expressando GFP. Os resultados foram expressos em título de AcN, que corresponde à recíproca da última diluição que apresentou positividade. Amostras com título maior que 20 foram consideradas positivas.

3.17 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos contra vetor vacinal e proteína Gag do HIV-1

Placas de 96 cavidades (Nunc) foram revestidas com antígeno (5×10^8 p.v. de vetor viral expressando transgene não-relacionado ou 0,1 μ g de proteína Gag p24 purificada (ImmunoDiagnostic) por cavidade) por 12 horas a 4°C. Após lavagem e bloqueio com albumina bovina sérica (BSA) a 3% em PBS (Cellgro Mediatech) por 12 horas a 4°C, soro, lavados vaginais, saliva ou fezes coletadas de animais imunizados

foram diluídas serialmente em BSA 3% em PBS e testadas em duplicata. Amostras de soro foram avaliadas em diluições entre 1:100 e 1:12.800, enquanto lavados vaginais, saliva e fezes foram avaliados puros ou diluídos entre 1:2 e 1:128. Placas com saliva, fezes ou lavados vaginais foram incubadas por 12 horas a 4°C, enquanto placas contendo amostras de soro foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente. Após lavagem com BSA 3% em PBS, adicionou-se anticorpo secundário anti-imunoglobulina murina conjugado com fosfatase alcalina (ICC Cappel) por 1 hora à temperatura ambiente. Após adição de substrato para a enzima (Sigma) seguido de solução de parada da reação (Sigma), a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 405 nm (Biotek EL-311SX).

3.18 Isotipagem de anticorpos contra o vetor viral e a proteína Gag de HIV-1

Para isotipagem de anticorpos anti-AdC6 e anti-Gag foi utilizado *Hybridoma Subtyping Kit* (Calbiochem). Placas de 96 cavidades (Nunc) foram revestidas com antígeno conforme descrito no item anterior por 12 horas a 4°C. Após lavagem e bloqueio com BSA 3% em PBS por 12 horas a 4°C, soro, lavados vaginais, saliva e fezes coletadas de animais imunizados foram adicionadas em duplicata na diluição previamente determinada durante titulação por ELISA. Placas contendo saliva, fezes ou lavados vaginais foram incubadas por 12 horas a 4°C, enquanto placas contendo amostras de soro foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente. Após lavagem com BSA 3% em PBS, adicionou-se separadamente anticorpos secundários anti-imunoglobulina murina (anti-IgG1, -IgG2a, -IgG2b, -IgG3, -IgA, -IgM) provenientes de coelho por 1 hora à temperatura ambiente. Após lavagem com BSA 3% em PBS, foi adicionado anticorpo anti-imunoglobulina de coelho conjugado com peroxidase de raiz-forte por 1 hora à temperatura ambiente. Após adição de tetrametilbenzidina como substrato para a enzima e posterior utilização de solução de parada da reação (Sigma), a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 450 nm (Biotek EL-311SX).

3.19 Ensaio ELISpot para detecção de secreção de IFN- γ

Ensaio ELISpot de captura para interferon-gamma (IFN- γ) foram realizados como previamente descrito (REYES-SANDOVAL et al., 2004). Resumidamente, placas de difluoreto de polivinilideno (Millipore) de 96 cavidades foram sensibilizadas com 20 μ g de

anticorpos anti-IFN- γ de camundongo (BD Pharmingen) diluídos em PBS estéril e incubadas por 12 horas a 4^oC. As placas foram submetidas a 6 lavagens com PBS e bloqueadas com meio MLC 10% (DMEM suplementado com 10⁻⁶ M de 2-mercaptoetanol (Sigma) e 10% SFB) por 2 horas a 37^oC. Células provenientes de baço, sangue, LNI, TG e NALT foram plaqueadas em triplicatas (2x10⁵ células por cavidade em meio MLC 10%) e estimuladas com 5 μ g/ml do peptídeo AMQMLKETI, em presença de 0,1 μ g de anticorpo anti-CD28 e 0,1 μ g de anti-CD49d (BD Pharmingen) por 16 horas a 37^oC em presença de 10% de CO₂. As células foram então removidas, as placas lavadas com PBS/Tween 0,01%, sendo posteriormente adicionado anticorpo anti-IFN- γ marcado com biotina (BD Pharmingen) por 2 horas à temperatura ambiente. Após lavagens com PBS Tween 0,01%, estreptavidina conjugada com fosfatase alcalina (MATBECH AB) foi adicionada e incubada por 1 hora à temperatura ambiente. Focos foram revelados por adição de solução de 4-nitro-azul de tetrazolio/5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (NBT/BCIP) (Pierce) por 5 minutos à temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de água e os focos foram contados utilizando C.T.L. Series 3A Analyzer e ImmunoSpot 3.2 (Cellular Technology Ltd). Dados provenientes da incubação de células em meio MLC 10% na ausência de peptídeo foram utilizados como controles negativos e os valores subtraídos das amostras estimuladas, enquanto controles positivos foram estimulados com meio MLC 10% contendo anticorpos anti-CD28 e -CD49d, 0,1 μ g de ionomicina e 25 ng de formol-meristato-acetato. Os resultados dos ensaios ELISpot são apresentados como o número de unidades formadoras de focos (UFF) por 10⁶ células, ou normalizados por 10⁶ células CD8⁺. Controles negativos apresentaram números de UFF inferiores ou iguais a 12 UFF/10⁶ células. Resultados de células estimuladas compreendendo menos de 55 UFF/10⁶ células foram consideradas negativas.

3.20 Ensaio de tetrâmero, análise fenotípica e citometria de fluxo

Marcação de MHC classe I foi realizada utilizando tetrâmero específico para haplótipo H-2K^d, conjugado com peptídeo AMQMLKETI e marcado com alofococianina (APC) (NIAID Tetramer Facility). Para avaliação da resposta imune celular induzida pelos vetores adenovirais, células foram incubadas com corante aqua (*Live/Dead Fixable Dead Cell Stain Kit*, Invitrogen) para distinção de células viáveis, tetrâmero específico e anticorpo anti-CD8 α conjugado com PerCP (BD Bioscience) em PBS contendo 1% SFB por 1 hora a

4°C. Para análise de fenótipo, as células provenientes de animais imunizados por vias de mucosa foram submetidas à marcação com anticorpos listados no apêndice A e analisadas em citômetro de fluxo FACScalibur (Becton-Dickinson). Para fenotipagem de células provenientes de animais imunizados pela via i.m., células foram incubadas com anticorpos listados no apêndice B. O apêndice C demonstra os anticorpos utilizados para a fenotipagem de células provenientes de animais imunizados com AdHu5gag. Nos experimentos nos quais foi realizada transferência adotiva de linfócitos, células provenientes de animais imunizados foram marcadas com anticorpo anti-CD90.1 conjugado com FITC em adição aos anticorpos listados no apêndice B. Estas análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD LSRII (Becton-Dickinson).

Os ensaios de citometria de fluxo utilizaram células purificadas provenientes de animais imunizados com diferentes protocolos vacinais, incubadas com os diferentes painéis de anticorpos listados nos apêndices. As células purificadas foram adicionadas ao coquetel de anticorpos de superfície em presença do corante aqua, diluídos em PBS contendo 1% SFB, por 1 hora a 4°C. Após esta etapa, as células foram centrifugadas 2 vezes em PBS a 350 xg e permeabilizadas com *BD Cytofix/Cytoperm™ Fixation and Permeabilization Solution* (BD Bioscience) por 20 minutos a 4°C. Em seguida, as células foram incubadas por 30 minutos a 4°C em presença de anticorpos contra marcadores intracelulares diluídos na solução *Perm/Wash™* (BD Bioscience). Ao final da incubação, células foram centrifugadas 2 vezes em PBS a 350 xg, fixadas e mantidas em 200 µl de solução *BD Stabilizing Fixative* (BD Bioscience) até o momento da análise.

Partículas de compensação contra IgG de rato e hamster (BD Bioscience) foram utilizadas para ajuste dos parâmetros da citometria de fluxo. Eventos contidos em 100 µl de partículas negativas foram adquiridos no citômetro de fluxo e utilizados para determinação de voltagens e populações negativas para cada fluorocromo. Para a determinação do pico de fluorescência dos anticorpos utilizados no ensaio, 20 µl de partículas positivas foram adicionadas a anticorpos individualmente diluídos em 80 µl de PBS contendo 1% SFB. Esta suspensão foi então analisada em citômetro de fluxo e resultados utilizados para determinação da matriz de compensação para os fluorocromos utilizados nos experimentos. Dados provenientes destes experimentos foram analisados utilizando o programa *FlowJo V8.8* (Tree Star Inc.). Apêndice D demonstra a sequência de análise utilizada

para avaliação de células T CD4⁺ totais e células T CD8⁺ totais ou Gag-específicas.

3.21 Análise estatística

Os experimentos apresentados neste estudo foram repetidos no mínimo 2 vezes e no máximo 4 vezes, utilizando grupos de 5 a 20 camundongos. Para ensaios utilizando vetores AdC, as diferenças entre os distintos grupos experimentais foram calculadas quanto à significância estatística utilizando-se Teste *t* de Student, de duas amostras não pareadas. Para ensaios de imunização utilizando AdHu5gag, as diferenças entre grupos experimentais tratados com diferentes protocolos de imunização foram analisadas utilizando Teste *ANOVA* Bicaudal seguido de correções de Bonferroni. Para ambos os testes estatísticos, valores $p < 0,05$ ou $p < 0,01$ foram considerados significantes.

Nos ensaios de fenotipagem celular, a mediana da intensidade de fluorescência (MIF) de cada marcador celular foi utilizada para realização de Teste *t* de Student de amostras não pareadas. A diferença em MIF de cada amostra em relação ao controle foi comparada entre replicatas de diferentes repetições para determinação de significância estatística de $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa *GraphPad Prism* (GraphPad Software).

4 RESULTADOS

Este estudo foi originalmente concebido com o intuito de avaliar a magnitude e a qualidade da resposta imune de células T CD8⁺ específicas contra Gag de HIV-1 induzida mediante administração de vetores adenovirais símios expressando proteína conservada entre isolados virais. Os esforços foram concentrados na indução de resposta imune celular contra HIV-1 no TG feminino, resposta esta capaz de residir como células de memória e ultrapassar obstáculos associados à imunidade pré-existente contra sorotipos humanos de adenovírus. Tradicionalmente, é aceito que resposta imune residente em tecidos mucosos deve ser estimulada na própria mucosa; por este motivo, esforços iniciais se concentraram na administração dos vetores vacinais por vias de mucosa. Entretanto, como observado no decorrer do estudo, protocolos de imunização utilizando as vias i.n. e i.vag. são inferiores na indução de resposta imune celular específica contra HIV-1 quando comparados à imunização i.m. Por este motivo, os experimentos foram posteriormente focados no estudo da resposta induzida por administração i.m.

4.1 Avaliação de dose-resposta e cinética da resposta imune adaptativa após administração intranasal de AdC6gag

O vetor adenoviral símio AdC6gag foi avaliado quanto à sua capacidade de induzir resposta imune humoral, celular sistêmica e de mucosas após administração i.n. deste vetor. Inicialmente, foi realizado ensaio de dose-resposta através da imunização de grupos de cinco camundongos BALB/c pela via i.n. utilizando 10⁸ p.v. de AdC6gag, dose previamente utilizada em estudos anteriores realizados em nosso laboratório, ou 10¹⁰ p.v. de AdC6gag, dose ideal conhecida para imunização por via i.m. A resposta induzida foi avaliada duas semanas após a imunização através de ELISpot para detecção da secreção de IFN- γ em diferentes tecidos.

Números detectáveis de células produtoras de IFN- γ (isto é, >55 UFF/10⁶ células) foram observados em populações isoladas de baço e sangue para ambas as doses administradas (Figura 1). Resposta de células T CD8⁺ Gag-específicas no TG e NALT foi somente detectável mediante administração de 10¹⁰ p.v. de AdC6gag, enquanto secreção de IFN- γ nos LNI apresentou-se abaixo do limite de positividade para as duas doses avaliadas. Foi determinado que a dose de 10¹⁰ p.v. de AdC6gag é superior na indução de células T CD8⁺ Gag-específicas em

baço, sangue, NALT e IELs isolados do TG feminino de camundongos quando comparada à dose de 10^8 p.v. do vetor ($p < 0,05$) (Figura 1).

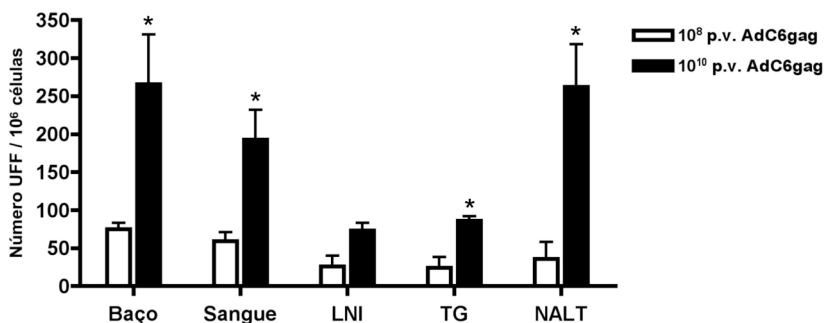


Figura 1. Ensaio de dose-resposta para avaliação da resposta imune celular Gag-específica após imunização i.n. com AdC6gag. Grupos de cinco camundongos BALB/c foram imunizados por via i.n. com 10^8 p.v. ou 10^{10} p.v. de AdC6gag. Os animais foram sacrificados após duas semanas e as células analisadas por ELISpot quanto à secreção de IFN- γ . Como controle, animais receberam PBS no lugar de vírus recombinantes (grupo *naïve*). Gráfico demonstra número de UFF/ 10^6 células após 16 horas de incubação com peptídeo específico AMQMLKETI. O símbolo (*) denota significância estatística de $p < 0,05$.

A resposta imune humoral induzida após a administração de diferentes doses do vetor foi também avaliada. Animais foram imunizados com 10^8 p.v. ou 10^{10} p.v. de AdC6gag por via i.n. e quatro semanas após imunização, amostras de sangue, lavados vaginais, saliva e fezes foram coletadas e a presença de anticorpos contra a proteína Gag ou contra o vetor AdC6 foi avaliada através de ELISA. Como demonstrado na figura 2, a dose de 10^{10} p.v. foi superior na indução de anticorpos contra o vetor adenoviral em soro e lavados vaginais ($p < 0,01$). Anticorpos anti-Gag foram detectados somente no soro, sendo a resposta imune humoral comparável entre as duas doses para as diluições testadas ($p > 0,05$) (Figura 2). Tomando em conjunto resultados provenientes da avaliação de resposta imune celular e humoral, foi determinado que a dose de 10^{10} p.v. de AdC6gag, ideal para imunização i.m., é adequada para administração por vias de mucosa, sendo então utilizada nos experimentos posteriores. Devido à similaridades estruturais e no ciclo viral, vetores símios adicionais posteriormente

utilizados neste estudo (AdC68gag, AdC6rab.gp, AdC68rab.gp) foram também administrados nesta mesma dose.

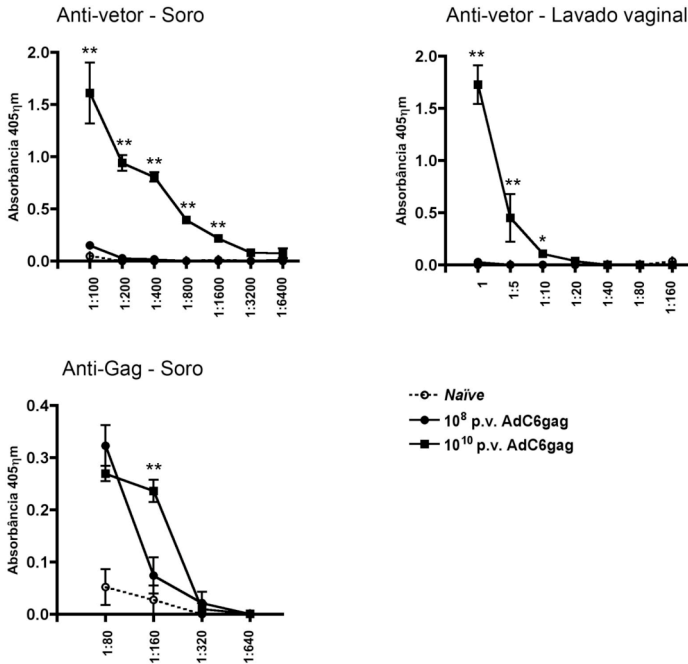


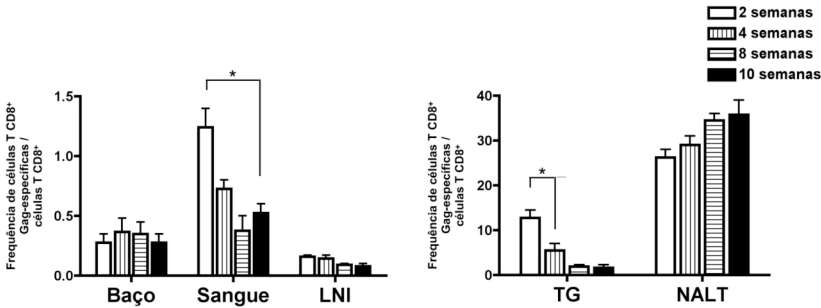
Figura 2. Ensaio de dose-resposta para avaliação da resposta imune humoral após imunização i.n. com AdC6gag. Grupos de cinco camundongos BALB/c foram imunizados por via i.n. com 10⁸ p.v. ou 10¹⁰ p.v. de AdC6gag. Quatro semanas após a imunização, sangue e lavado vaginal foram coletados e analisados por ELISA quanto à presença de anticorpos anti-vetor e anti-Gag. Como controle, animais receberam PBS no lugar de vírus recombinantes (grupo *naïve*). Gráficos demonstram absorbância a 405 nm para as diferentes diluições testadas. Significância estatística de $p < 0,05$ (*) ou $p < 0,01$ (**) é mostrada na figura.

Posteriormente, realizou-se ensaio de cinética para determinar o pico da resposta imune celular induzida por AdC6gag através de ensaios com tetrâmero específico para haplótipo H-2K^d, conjugado com peptídeo AMQMLKETI, ou por ELISpot. Ensaios de tetrâmero permitem a detecção de células T específicas mediante análise de receptor, utilizando moléculas de MHC tetramerizadas e conjugadas com o peptídeo de interesse, possibilitando assim a detecção de células

específicas mesmo fora da fase efetora (na ausência da secreção de citocinas) e análise de fenótipos *ex vivo*, sem a interferência que a estimulação *in vitro* pode gerar na expressão de marcadores de ativação e/ou receptores celulares.

Após imunização i.n. de camundongos BALB/c com 10^{10} p.v. de AdC6gag, animais foram sacrificados após 2, 4, 8 e 10 semanas para análise da resposta Gag-específica. A administração i.n. de AdC6gag induziu baixa frequência de células T CD8⁺ específicas em baço (em média 0,35% de linfócitos T CD8⁺ tetrâmero-específicos) no decorrer das dez semanas de experimentação (Figura 3A). Apesar de frequências de células tetrâmero⁺CD8⁺ terem sido observadas de forma estável no baço, o número de UFFs em células isoladas deste tecido decaiu de aproximadamente 150 para 50 unidades ($p < 0,05$) (Figura 3B). No NALT, a frequência de células T CD8⁺ Gag-específicas se mantiveram estáveis entre a segunda e décima semana após imunização, com média de frequências de 35% de linfócitos T CD8⁺ Gag-específicos (Figura 3A). Porém, houve diminuição na secreção de IFN- γ observada no ensaio de ELISpot para este tecido ($p < 0,05$) (Figura 3B). A discrepância dos valores obtidos entre o ensaio de tetrâmero e ELISpot para estes dois tecidos demonstra a interrupção da secreção de citocinas por células T CD8⁺ Gag-específicas apesar da frequência de células específicas se manter constante. Em sangue, foi observada frequência de 1,2% de células T CD8⁺ Gag-específicas duas semanas após a imunização (cerca de 240 UFFs). Apesar de resposta Gag-específica ser detectada no final de dez semanas pós-imunização, a frequência destas células diminuiu em populações isoladas de sangue ($p < 0,05$) (Figura 3A), sendo acompanhada pela queda na secreção de IFN- γ em células isoladas deste tecido ($p < 0,01$) (Figura 3B).

3A.



3B.

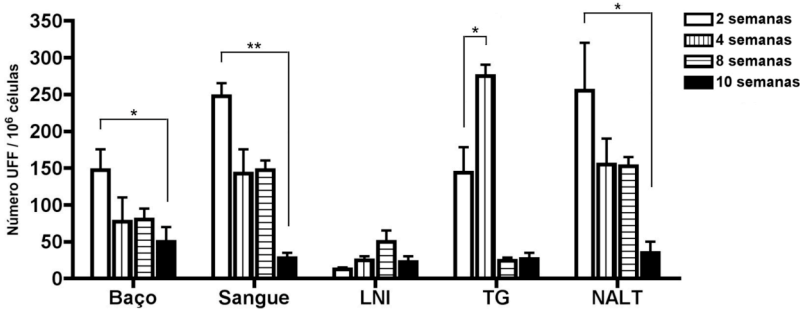


Figura 3. Ensaio de cinética para avaliação da resposta imune celular Gag-específica após imunização i.n. com AdC6gag. Grupos de vinte camundongos BALB/c foram imunizados i.n. com 10^{10} p.v. de AdC6gag e sacrificados após 2, 4, 8 e 10 semanas para análise de células T CD8⁺. Como controle, animais receberam PBS no lugar de vírus recombinantes (grupo *naïve*). A figura 3A refere-se a ensaios de tetrâmero específico, analisados por citometria de fluxo. Resultados são expressos em frequência de células tetrâmero⁺CD8⁺ sobre números totais de células CD8⁺. A figura 3B expressa a quantidade de UFF/10⁶ células após 16 horas de incubação com peptídeo específico AMQMLKETI obtida em ensaios de ELISpot para detecção da secreção de IFN- γ . Significância estatística de $p < 0,05$ (*) ou $p < 0,01$ (**) é mostrada na figura.

Foi possível detectar alta frequência de células T CD8⁺ Gag-específicas (em média 13% de linfócitos T CD8⁺ tetrâmero-específicos) em amostras provenientes do TG duas semanas após a imunização i.n. com AdC6gag (Figura 3A). Entretanto, a frequência de linfócitos funcionais demonstrou-se menor do que a detectada por meio do ensaio

de tetrâmero, visto que os dados de ELISpot para detecção de IFN- γ demonstraram cerca de 150 UFF/10⁶ células isoladas do TG no primeiro ponto de análise (Figura 3B). Na análise realizada quatro semanas após a imunização i.n., detectou-se diminuição na frequência de células T CD8⁺ Gag-específicas (4,5% de linfócitos T CD8⁺ tetrâmero-específicos) em amostras provenientes do TG ($p < 0,05$) (Figura 3A). Entretanto, apesar do declínio observado na frequência de células T CD8⁺ Gag-específicas isoladas deste tecido, houve aumento no número de focos de IFN- γ detectados por ELISpot para aproximadamente 280 UFF/10⁶ células ($p < 0,05$) (Figura 3B). Porém, dez semanas após a imunização, não foi detectada secreção de IFN- γ em células isoladas desta mucosa. Células provenientes de LNI apresentaram ausência de células T CD8⁺ Gag-específicas detectáveis por ambos os ensaios utilizados. Através da análise conjunta dos dados provenientes do ensaio de tetrâmero e ELISpot, pode-se considerar que o pico da resposta imune celular após imunização i.n. com AdC6gag ocorreu duas semanas após a administração do vetor.

A resposta imune humoral também foi determinada na quarta e décima semanas após a administração i.n. de AdC6gag. Apesar de dados concernentes à resposta humoral contra Gag não fornecerem informação quanto à possibilidade de neutralização da partícula de HIV, visto que Gag é parte da estrutura interna do vírus, podem fornecer informações quanto à resposta do organismo contra o transgene, abrindo caminho para a utilização do vetor para expressão de antígenos adicionais. Informações quanto à resposta humoral contra o vetor pode ser de grande valia em ensaios de dose-reforço, considerando subsequentes doses de vetores adenovirais. Outro aspecto importante é a avaliação da imunogenicidade do vetor viral, como confirmação de que as proteínas virais altamente imunogênicas não resultam em diminuição da resposta imune humoral contra o transgene.

Foi detectada presença de anticorpos contra o vetor em todas as amostras analisadas, com maiores títulos em amostras provenientes de soro, lavado vaginal ($p < 0,01$) e fezes ($p < 0,05$) (Figura 4). O maior título de anticorpos nas fezes após dez semanas de imunização pode ser reflexo do período em que células B secretoras de anticorpos anti-vetor levam para atingir a mucosa intestinal, e que o elevado título de anticorpos séricos observado no mesmo período seja reflexo deste maior tráfego celular. É possível que os menores títulos de anticorpos presentes na saliva quando comparados às outras amostras analisadas (Figura 4) sejam resultado do método de coleta. Neste procedimento, os

animais são injetados com cloridrato de pilocarpina, substância que estimula a secreção de grandes quantidades de saliva e consequentemente causam diluição dos anticorpos presentes na cavidade bucal. Com exceção de saliva e fezes, os títulos de anticorpos contra o vetor foram equivalentes nos dois pontos de análise ($p>0,05$), demonstrando resposta sustentada de células B contra o vetor.

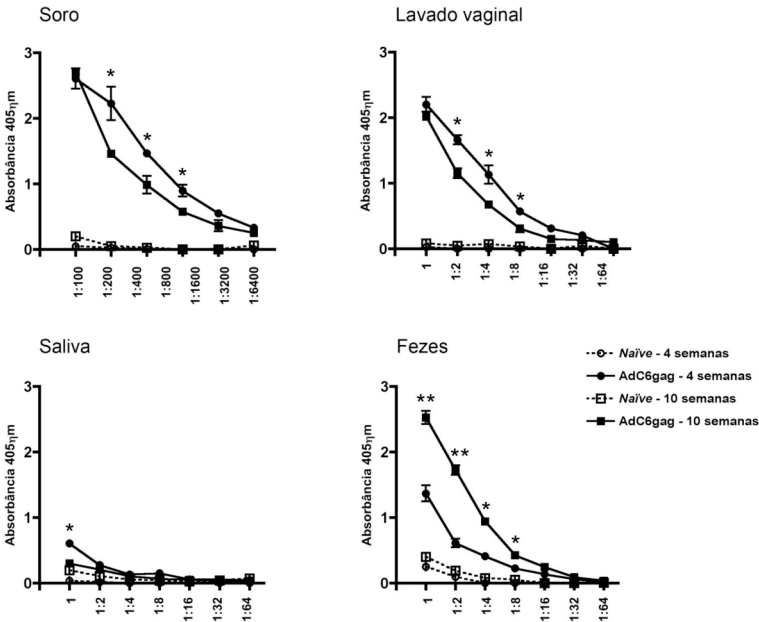


Figura 4. Ensaio de cinética para avaliação da resposta imune humoral anti-AdC6 após imunização i.n. com AdC6gag. Grupos de vinte camundongos BALB/c foram imunizados i.n. com 10^{10} p.v. de AdC6gag. Como controle, animais receberam PBS no lugar de vírus recombinantes (grupo *naïve*). Quatro e dez semanas após a imunização, soro, lavado vaginal, saliva e fezes foram coletados e analisados por ELISA para detecção de anticorpos anti-vetor nas diferentes amostras. Gráficos demonstram absorbância a 405 nm para as diferentes diluições de amostras avaliadas. Significância estatística de $p<0,05$ (*) ou $p<0,01$ (**) é mostrada na figura.

Os isotipos de anticorpos envolvidos na resposta contra o vetor foram avaliados através de ensaios de ELISA. Os isotipos mais abundantes envolvidos nesta resposta anti-AdC6 foram IgA em fezes ($p<0,05$), lavado vaginal e saliva ($p<0,01$), seguidos por IgG2a em fezes

($p < 0,05$) e IgG2a e IgG2b em lavado vaginal ($p < 0,01$) (Figura 5A), enquanto no soro IgG2a tenha sido o isotipo mais abundante, seguido por IgG1 e IgG2b ($p < 0,05$) (Figura 5B).

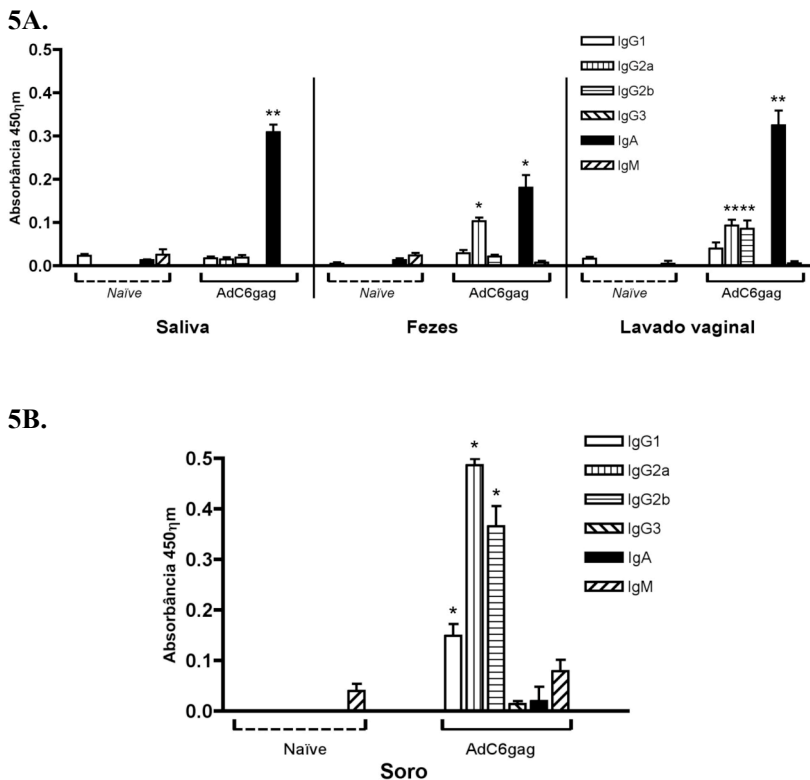


Figura 5. Isotipagem de anticorpos anti-vetor induzidos pela imunização i.n. com AdC6gag. Grupos de vinte camundongos BALB/c foram imunizados i.n. com 10^{10} p.v. de AdC6gag. Quatro e dez semanas após a imunização, soro, lavado vaginal, saliva e fezes foram coletados e determinou-se os isotipos de anticorpos produzidos contra o vetor adenoviral através de ELISA. Gráficos demonstram absorbância a 450 nm para os diferentes isotipos de anticorpos avaliados. Significância estatística de $p < 0,05$ (*) ou $p < 0,01$ (**) é mostrada na figura.

Em contrapartida ao observado na resposta humoral contra o vetor vacinal, a presença de anticorpos contra a proteína Gag foi detectada somente em amostras de soro, presente de forma mais

abundante dez semanas após imunização ($p<0,01$) (Figura 6A) e sendo composta predominantemente pelos isotipos IgM e IgG2a ($p<0,05$) (Figura 6B).

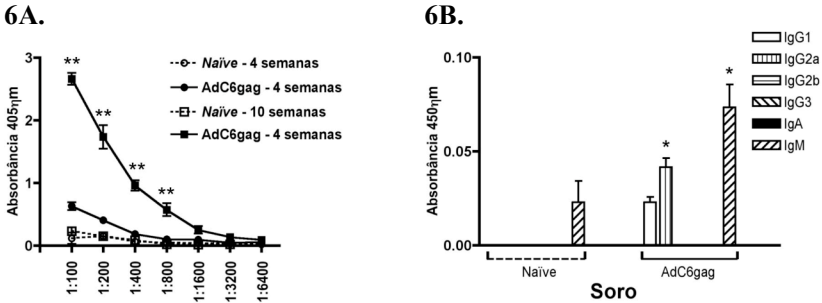


Figura 6. Ensaio de cinética para avaliação de resposta imune humoral anti-Gag após imunização i.n. com AdC6gag. Grupos de vinte camundongos BALB/c foram imunizados i.n. com 10^{10} p.v. de AdC6gag. Quatro e dez semanas após a imunização, sangue foi coletado e o soro foi analisado por ELISA para detecção de anticorpos anti-Gag. A amostra de soro, considerada positiva para a presença destes anticorpos (6A), foi então submetida ao ensaio de isotipagem, também realizado pela técnica de ELISA (6B). Gráficos demonstram absorbância a 405 nm ou 450 nm para os ensaios de ELISA. Significância estatística de $p<0,05$ (*) ou $p<0,01$ (**) é mostrada na figura.

4.2 Estudo da resposta imune celular induzida pela administração de vetores adenovirais símios em esquemas de imunização dose-reforço heterólogo por vias de mucosa

Conforme observado no ensaio de cinética, é possível detectar resposta imune Gag-específica em baço, sangue, TG e NALT duas semanas após imunização i.n. com AdC6gag. Entretanto, a resposta de células T $CD8^+$ no TG tem rápido decréscimo, contraindo de aproximadamente 12% para 4,5% quatro semanas após a imunização (Figura 3A). Com o intuito de aumentar a frequência de células T $CD8^+$ Gag-específicas nos diferentes tecidos e criar ambiente mais favorável para a manutenção de células de memória, animais recebedores da primeira dose de AdC6gag por via i.n. receberam dose de reforço heterólogo com 10^{10} p.v. de AdC68gag pela via i.vag. seis semanas após a primeira administração de vetor viral. Grupos de cinco animais foram submetidos a este protocolo de imunização e a resposta de células T $CD8^+$ Gag-específicas analisada duas e quatro semanas após a primeira

dose e após reforço. Em células provenientes dos LNI, passou-se a detectar células T CD8⁺ Gag-específicas após a administração do reforço i.vag. ($p<0,05$, em média 0,3%) (Figura 7). Para células isoladas de baço, não houve aumento da frequência de células T CD8⁺ Gag-específicas após reforço ($p>0,05$). No sangue, apesar de não ser observada frequência superior à induzida por imunização i.n., a resposta de células T CD8⁺ demonstrou ser mais sustentada após o reforço i.vag. ($p<0,05$) (Figura 7).

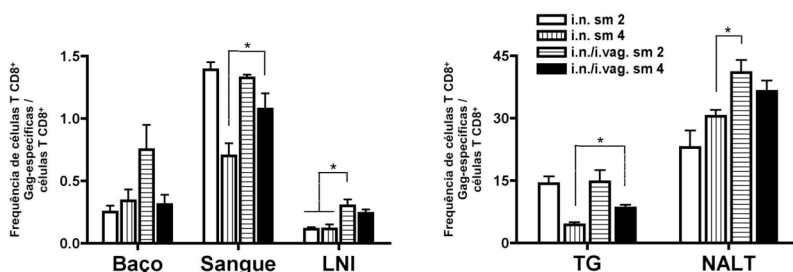


Figura 7. Avaliação da resposta imune celular Gag-específica após imunização i.n. seguida de reforço i.vag. com vetores adenovirais símios. Grupos de cinco ou vinte camundongos BALB/c foram imunizados i.n. com 10^{10} p.v. de AdC6gag, recebendo dose de reforço com 10^{10} p.v. de AdC68gag pela via i.vag. seis semanas após a primeira aplicação de vetor. Como controle, animais receberam PBS no lugar de vírus recombinantes (grupo *naïve*). Animais foram sacrificados duas e quatro semanas após a primeira dose ou após reforço. Células T CD8⁺ foram analisadas através da utilização de tetrâmero específico e anticorpo anti-CD8 α , sendo analisadas por citometria de fluxo. Resultados são expressos em frequência de células tetrâmero⁺CD8⁺ sobre números totais de células CD8⁺. O símbolo (*) denota significância estatística de $p<0,05$.

Em seguida, foi avaliada a indução de células Gag-específicas nos tecidos de mucosa mediante dose-reforço heterólogo. Para tanto, grupos de vinte animais foram imunizados por via i.n., seguido de reforço seis semanas depois por via i.vag. utilizando os vetores acima descritos. Como pode ser observado na figura 7, houve aumento na frequência de células T CD8⁺ Gag-específicas isoladas do NALT mediante reforço i.vag ($p<0,05$). No TG, não foi observado aumento da resposta Gag-específica, com a frequência destas células atingindo somente patamares similares à primeira imunização (Figura 7). Entretanto, a resposta Gag-específica demonstrou ser mais sustentada ($p>0,05$), contraindo de 15% para 8% neste tecido (Figura 7). Assim,

apesar de não causar aumento na frequência de células T CD8⁺ Gag-específicas em todos os tecidos, o reforço por via i.vag. com AdC68gag em animais imunizados por via i.n. é capaz de induzir resposta imune celular mais sustentada em determinados tecidos quando comparado à administração única, incluindo o TG feminino.

A fim de analisar a funcionalidade de células induzidas pela administração dupla de vetores adenovirais símios, animais submetidos ao protocolo de dose-reforço heterólogo acima descrito foram sacrificados e células isoladas de diferentes tecidos foram analisadas por ELISpot quanto à secreção de IFN- γ . A análise foi realizada duas semanas após a primeira dose de AdC6gag por via i.n. ou após reforço i.vag. com AdC68gag (Figura 8). Não foi observado aumento de UFFs após o reforço em células isoladas de baço ou sangue, sendo conhecido que imunização i.vag. é ineficiente na indução de resposta imune celular sistêmica. Também não foi observado aumento na resposta de células T CD8⁺ Gag-específicas isoladas do NALT neste protocolo. Após o reforço, observou-se aumento da secreção de IFN- γ em células isoladas de LNI ($p < 0,01$) e TG ($p < 0,05$), demonstrando que a aplicação i.vag. do vetor adenoviral aumenta não somente a frequência, mas também a funcionalidade de células T CD8⁺ Gag-específicas isoladas destes dois tecidos.

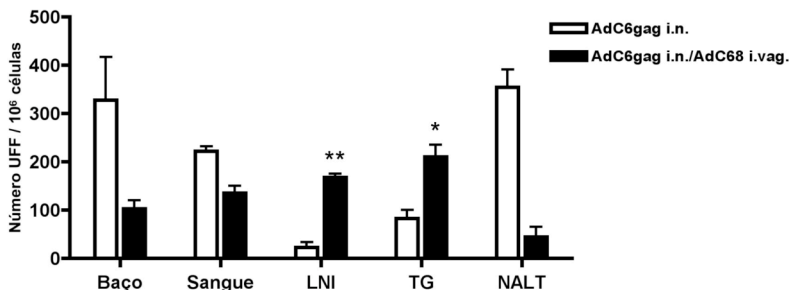


Figura 8. Avaliação da funcionalidade de células T CD8⁺ Gag-específicas após imunização i.n. com AdC6gag, seguida de reforço pela via i.vag. com AdC68gag. Grupos de cinco camundongos BALB/c foram imunizados i.n. com 10¹⁰ p.v. de AdC6gag, recebendo reforço pela via i.vag. com 10¹⁰ p.v. de AdC68gag seis semanas após a primeira aplicação de vetor. Os animais foram sacrificados duas semanas após a primeira dose ou reforço. Células foram analisadas por ELISpot para detecção da secreção de IFN- γ . Gráfico demonstra números de UFF/10⁶ células após 16 horas de incubação com peptídeo específico AMQMLKETI. Significância estatística de $p < 0,05$ (*) ou $p < 0,01$ (**) é mostrada na figura.

Após determinar a dose ideal e o efeito de protocolos de dose-reforço heterólogo com vetores adenovirais símios, foram analisados regimes de imunização utilizando diferentes combinações de vias de mucosas. Para tanto, grupos de cinco camundongos BALB/c foram imunizados pela via i.n. ou i.vag. com AdC6gag, recebendo reforço após 6 semanas com AdC68gag pela mesma via ou via distinta de imunização. Duas semanas após o reforço, avaliou-se a secreção de IFN- γ por células T CD8⁺ Gag-específicas por ensaio ELISpot (Figura 9). A resposta de células T CD8⁺ Gag-específicas no NALT foi equivalente para os grupos imunizados por via i.n. ($p > 0,05$) (Figura 9). As respostas mais expressivas em células provenientes de baço e sangue foram observadas nos regimes que envolveram duas doses de vetores adenovirais por diferentes vias de mucosa ($p < 0,05$), enquanto células Gag-específicas isoladas de LNI só puderam ser detectadas nos grupos recebedores de reforço por via i.vag. ($p < 0,05$) (Figura 9). Pelo fato da resposta no TG para os grupos i.vag./i.vag., i.n./i.vag. e i.vag./i.n. ser equivalente ($p > 0,05$) e considerando balanceamento entre resposta sistêmica e de mucosas, bem como indução de células específicas nos LNI, considerou-se que o melhor regime de imunização com vetores adenovirais símios por vias de mucosa compreende primeira dose por via i.n., seguida de reforço pela via i.vag.

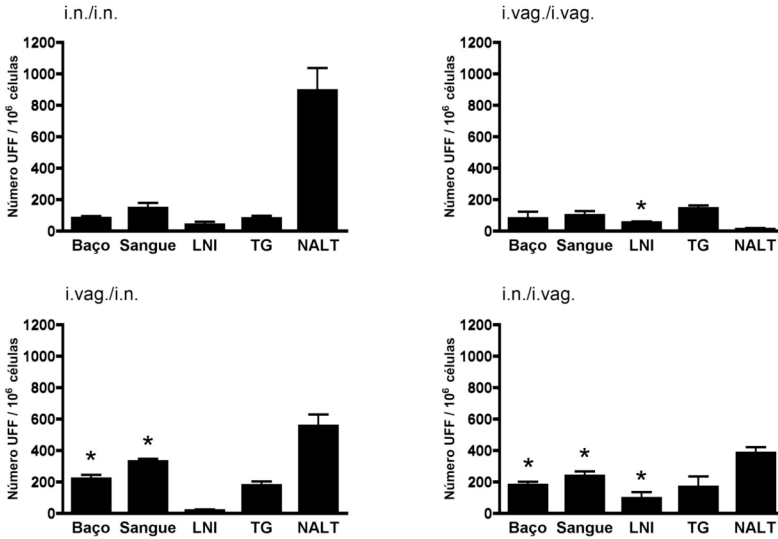


Figura 9. Avaliação de protocolos de imunização dose-reforço heterólogo por vias de mucosa para indução de resposta imune celular. Grupos de cinco camundongos BALB/c foram imunizados pela via i.n. ou i.vag. com 10^{10} p.v. de AdC6gag, recebendo reforço com 10^{10} p.v. de AdC68gag por mesma via ou via distinta de imunização após seis semanas. Duas semanas após o reforço, células foram analisadas por ELISpot quanto à secreção de IFN- γ . Como controle, animais receberam PBS no lugar de vírus recombinantes (grupo *naïve*). Gráficos demonstram números de UFF/ 10^6 células após 16 horas de incubação com peptídeo específico AMQMLKETI. O símbolo (*) denota significância estatística de $p < 0,05$.

4.3 Ensaio de proteção com vírus da vaccínia recombinante expressando a proteína Gag do HIV-1

Com o intuito de determinar a capacidade da resposta imune induzida pela vacina em proteger animais de uma infecção por vírus não-relacionado expressando o mesmo transgene, animais imunizados foram submetidos ao desafio com vírus da vaccínia recombinante expressando a proteína Gag do HIV-1 (Vacgag), contendo a proteína-repórter LacZ. Grupos de cinco camundongos receberam AdC6gag pela via i.n., seguido de reforço i.vag. com AdC68gag seis semanas depois. Estes animais foram desafiados por via i.vag. com 10^6 pfu de Vacgag quatro semanas após o reforço. Neste ensaio foram incluídos grupos-controle recebedores do mesmo regime de imunização, entretanto

utilizando vetores expressando glicoproteína do vírus rábico (AdC6rab.gp e AdC68rab.gp) para avaliação da interferência da resposta imune e inflamação induzidas pelo vetor adenoviral. Para análise do efeito da dose de reforço na proteção de animais contra infecção, grupos receberam somente uma dose de AdC6gag por diferentes vias (i.n. ou i.m.) ou de AdC6rab.gp pela via i.n. Os animais controle foram desafiados seguindo o mesmo protocolo dos grupos experimentais. Cinco dias após o desafio, animais foram sacrificados e determinou-se o título viral de Vacgag nos ovários de cada animal.

Todos os grupos-controle imunizados com vetores expressando rab.gp apresentaram altos títulos de Vacgag, demonstrando que o desafio foi bem sucedido (Figura 10). Pode-se observar que o protocolo de dose-reforço com vetores expressando Gag do HIV-1 é mais efetivo na proteção que a administração única da vacina, sendo que quatro dos cinco animais desafiados pertencentes a este grupo não apresentaram títulos de Vacgag detectáveis ($p < 0,05$). Entretanto, ao considerarmos os grupos recebedores de somente uma dose da vacina, não há diferenças significativas entre os grupos que receberam o vetor pela via i.n. ou i.m. ($p > 0,05$). Este resultado foi intrigante pois, em teoria, imunização i.m. não é capaz de induzir imunidade no sistema de mucosas. Na tentativa de esclarecer a proteção parcial detectada neste ensaio, os estudos foram então focados na indução de resposta imune após a administração dos vetores por via i.m. em comparação à resposta alcançada com imunização por vias de mucosa.

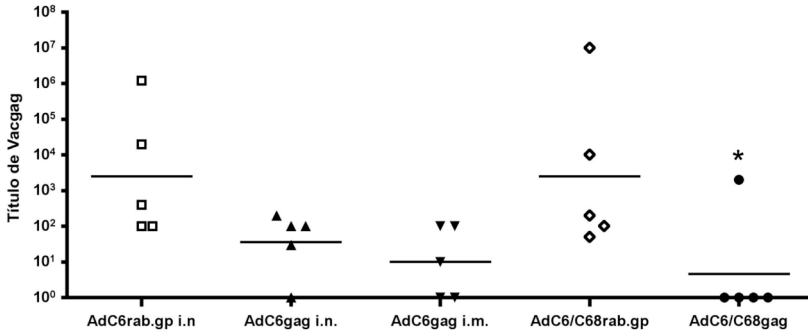


Figura 10. Ensaio de desafio utilizando vírus da vaccinia recombinante expressando a proteína gag do HIV-1 (Vacgag). Grupos de 5 camundongos BALB/c receberam AdC6gag pela via i.n., seguido de reforço i.vag. com AdC68gag após seis semanas. Neste ensaio foram incluídos grupos-controle recebedores de vetores expressando glicoproteína do vírus rábico (AdC6rab.gp e AdC68rab.gp) no mesmo regime de dose-reforço, bem como animais recebedores de somente uma dose da vacina por diferentes vias (i.n. e i.m.) ou de AdC6rab.gp pela via i.n. Quatro semanas após a dose de reforço, todos os grupos foram desafiados com 10⁶ pfu de Vacgag. Cinco dias após o desafio, os animais foram sacrificados, os ovários removidos, dissociados e o sobrenadante livre de células titulado em monocamada confluyente de células TK-. Pontos ilustrados no gráfico demonstram o título de Vacgag para animais analisados individualmente, enquanto marcação horizontal denota média de títulos virais dentro de cada grupo. O símbolo (*) denota significância estatística de $p < 0,05$.

4.4 Avaliação da resposta imune celular Gag-específica após administração intramuscular de vetores adenovirais símios

Com o intuito de analisar a resposta imune induzida pela administração de vetores adenovirais por via i.m., realizou-se ensaio de cinética com grupos de vinte camundongos BALB/c imunizados com AdC6gag por diferentes vias. Na figura 11 é possível observar que, em comparação às vias i.n e i.vag., a imunização i.m. é a mais eficaz na indução de células T CD8⁺ Gag-específicas em baço, sangue e LNI ($p < 0,05$). A resposta em células isoladas do NALT foi maior no grupo imunizado i.n., seguido da imunização i.m. Considerando os resultados obtidos para imunização pelas duas vias de mucosa, acredita-se que a imunização i.n. é mais eficaz que a imunização i.vag. na indução de resposta imune no TG feminino ($p < 0,05$). Surpreendentemente, a frequência de células T CD8⁺ específicas obtida após administração i.m. (39%) foi aproximadamente 2,5 vezes a observada após imunização i.n.

(14,5%), sendo detectada ao longo de todo o experimento. A imunização i.vag. induziu frequências detectáveis somente em células provenientes do TG (após duas semanas de imunização com AdC6gag) e NALT (quatro semanas após a imunização), contraindo posteriormente. É importante ressaltar que as imunizações por vias de mucosa induziram menores frequências de células T CD8⁺ Gag-específicas no TG que a administração i.m. do vetor AdC6gag ($p<0,05$). Diferenças em frequências alcançadas com imunização i.m. em comparação com administração i.vag. ou i.n. foram estatisticamente significantes ($p<0,05$) em sangue, baço, LNI e TG em todos os pontos analisados.

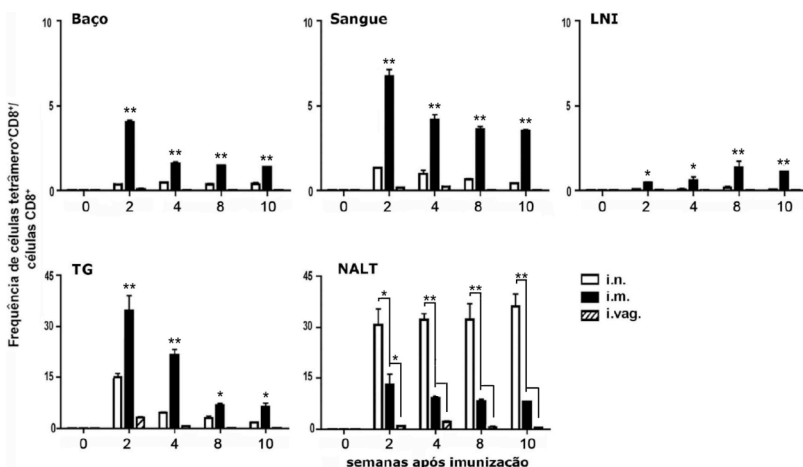


Figura 11. Ensaio de cinética para avaliação da resposta imune celular Gag-específica após imunização com AdC6gag por diferentes vias. Grupos de vinte camundongos BALB/c foram imunizados pelas vias i.n, i.m. ou i.vag. com 10^{10} p.v. de AdC6gag. Estes animais foram sacrificados 2, 4, 8 e 10 semanas após imunização para análise de células T CD8⁺ em diferentes tecidos através de incubação com tetrâmero específico e anticorpo anti-CD8 α , sendo a análise realizada por citometria de fluxo. A semana zero corresponde à média das frequências de células tetrâmero-positivas em amostras isoladas do grupo *naïve*, receptor de PBS no lugar de vírus recombinantes. Significância estatística de $p<0,05$ (*) ou $p<0,01$ (**). É mostrada na figura.

A elevada frequência de células T CD8⁺ Gag-específicas observada no TG após imunização i.m. levou a receios quanto à funcionalidade destas células, visto que a ativação exacerbada de células T pode resultar em anergia ou exaustão desta população celular. Por este

motivo, células provenientes de animais imunizados com AdC6gag pela via i.m. foram analisadas quanto à habilidade de secretar IFN- γ utilizando-se ensaio ELISpot duas semanas após a administração deste vetor. Estas células foram também analisadas por citometria de fluxo para determinação da frequência de células tetrâmero⁺CD8⁺, sendo os resultados de UFFs provenientes de ensaios ELISpot normalizados para refletir o número total de células CD8⁺ de cada amostra. Com exceção de células provenientes de NALT, foi observada aumentada secreção de IFN- γ em linfócitos Gag-específicos derivados de diferentes tecidos após imunização i.m. ($p < 0,05$) (Figura 12). Neste estudo foi possível detectar maior número de UFFs não somente nas amostras provenientes de TG, mas também nas amostras provenientes de linfonodos drenantes após imunização i.m. ($p < 0,05$) (Figura 12). Apesar de amostras do TG apresentarem secreção de IFN- γ em resposta ao antígeno, o número de UFFs observado para este tecido sugere frequência de células T CD8⁺ Gag-específicas aproximadamente 32 vezes menor que a observada no ensaio de tetrâmero (Figura 11). Convém ressaltar, entretanto, que os distintos perfis de secreção de IFN- γ em células do TG, após administração i.n. ou i.m. do vetor, foram equivalentes às diferenças observadas na frequência de células T CD8⁺ Gag-específicas obtidas no ensaio de tetrâmero para este mesmo tecido (Figura 11). Células provenientes de sangue apresentaram maior secreção de IFN- γ quando comparadas a células provenientes do TG para o grupo imunizado i.n. ($p < 0,05$), enquanto que o número de UFFs foi comparável para estes dois tecidos no grupo imunizado por via i.m.

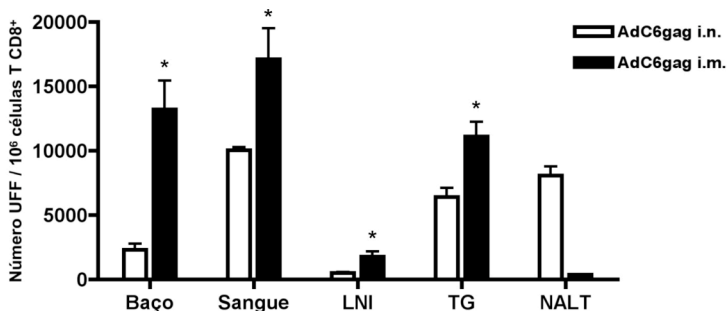


Figura 12. Avaliação da funcionalidade de células T CD8⁺ Gag-específica após imunização i.m. com AdC6gag. Grupos de cinco camundongos BALB/c foram imunizados i.n. ou i.m. com 10¹⁰ p.v. de AdC6gag. Duas semanas após a imunização, células provenientes de diferentes tecidos foram analisadas por ELISpot para detecção da secreção de IFN- γ . Gráfico demonstra números de UFF/10⁶ células CD8⁺ após 16 horas de incubação com peptídeo específico AMQMLKETI. O símbolo (*) denota significância estatística de $p < 0,05$.

É provável que células isoladas de mucosas, como TG e NALT, secretem citocinas diferentes de IFN- γ e por este motivo escaparam da detecção no ensaio ELISpot. Outra possibilidade é a fragilidade de células T provenientes de TG ou NALT neste tipo de ensaio, sendo consequentemente detectáveis através de ensaios que não requeiram longas incubações. Para testar esta hipótese, animais foram imunizados i.m. com AdC6gag e as células do TG foram coletadas duas semanas após a administração do vetor viral. Estas células foram submetidas à análise de frequência de células T CD8⁺ Gag-específicas por ensaio de tetrâmero logo após isolamento, ou mantidas por 8 horas na presença ou ausência do peptídeo AMQMLKETI. Células foram então incubadas com tetrâmero específico, anticorpo anti-CD8 α e corante aqua para determinação da frequência de células T CD8⁺ Gag-específicas e porcentagem de morte celular. Como demonstrado na figura 13, observou-se pronunciada morte celular após incubação de células provenientes da mucosa do TG. Apesar do simples processo de incubação promover morte celular ($p < 0,05$), esta situação é intensificada na presença do peptídeo específico ($p < 0,01$); o número de células CD8⁺ viáveis decaiu 25% ou 75% mediante cultura em meio ou estimulação com peptídeo, respectivamente.

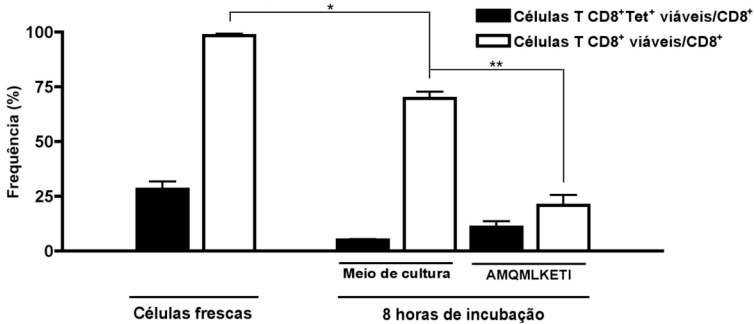


Figura 13. Efeito da estimulação *in vitro* nas frequências de células T CD8⁺ viáveis provenientes do TG feminino de animais imunizados com AdC6gag. Animais foram imunizados com 10^{10} p.v. de AdC6gag por via i.m. Duas semanas após a administração, células foram isoladas do TG e analisadas quanto à frequência de células tetrâmero⁺CD8⁺. O restante das células foi submetido à incubação a 37°C em presença de 5% de CO₂ por 8 horas, em presença ou ausência do peptídeo específico. Após este processo, células foram incubadas com tetrâmero específico, anticorpo anti-CD8 α e corante aqua para determinação das populações de células viáveis e mortas. Gráfico demonstra frequências de células tetrâmero⁺CD8⁺ viáveis sobre células CD8⁺ viáveis (colunas preenchidas) e frequência de células T CD8⁺ viáveis sobre células CD8⁺ totais (colunas abertas). Significância estatística de $p < 0,05$ (*) ou $p < 0,01$ (***) é mostrada na figura.

Em seguida, teve-se como objetivo determinar se após administração de AdC6gag por via i.m., uma dose de reforço heterólogo poderia exercer influência distinta sobre as células T CD8⁺ Gag-específicas quando administrada por via i.m. ou de mucosa. Para tanto, grupos de 20 animais foram imunizados por via i.m. e após seis semanas receberam reforço com AdC68gag por via i.m. ou i.vag., sendo a resposta analisada duas e quatro semanas após o reforço (Figura 14). Neste experimento foram incluídos grupos-controle recebedores de dose-reforço por duas vias de mucosa. Dose de reforço i.vag. não induziu aumento da frequência de células T CD8⁺ Gag-específicas em tecidos sistêmicos de animais imunizados por via i.m. Apesar do regime i.n./i.vag. resultar em aumento da frequência de células T CD8⁺ Gag-específicas em baço e sangue, este aumento foi inferior ao observado no protocolo utilizando duas doses i.m. ($p < 0,05$). O aumento na frequência de células T CD8⁺ Gag-específicas foi mais pronunciado em baço, sangue, LNI e TG dos animais que receberam duas doses por via i.m. em comparação aos grupos que receberam ao menos uma dose por via

de mucosa ($p < 0,05$). No TG, observou-se aumento da frequência de células T CD8⁺ Gag-específicas após administração i.n./i.vag. ou i.m./i.m., sendo o aumento mais pronunciado no grupo que recebeu duas doses i.m. dos vetores virais ($p < 0,01$). A frequência de células T CD8⁺ Gag-específicas no TG excedeu a detectada no sangue duas e quatro semanas após reforço no protocolo i.m./i.m. ($p < 0,05$). Dessa maneira, concluiu-se que ao utilizar a via i.m. para a primeira imunização, as vias de reforço i.m. ou i.vag. são equivalentes na indução de resposta imune específica no TG. Com base nestes dados, concluiu-se que regimes que utilizam imunização i.m. são superiores aos esquemas de imunização por vias de mucosa para indução de resposta imune adaptativa em tecido sistêmicos e no TG feminino de camundongos.

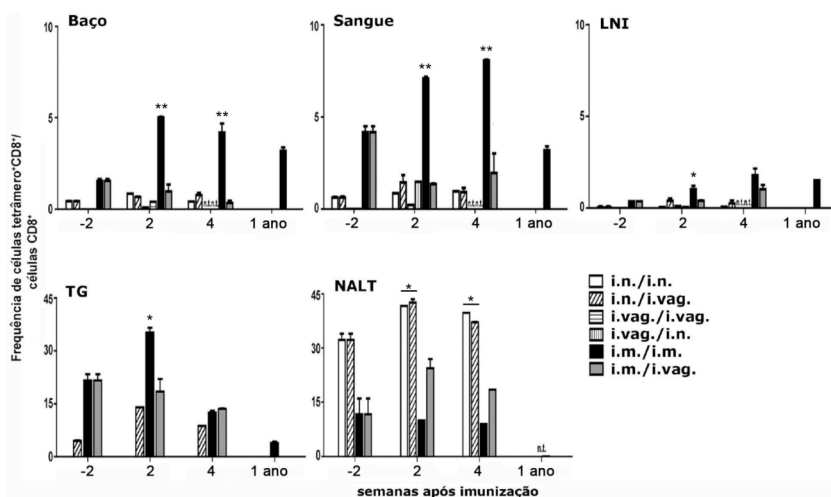


Figura 14. Avaliação da resposta imune celular Gag-específica após imunização i.m. com AdC6gag seguida de reforço com AdC68gag por diferentes vias. Grupos de vinte camundongos BALB/c foram imunizados i.m. com 10^{10} p.v. de AdC6gag e após seis semanas receberam reforço com 10^{10} p.v. AdC68gag pela via i.vag. ou i.m. Para efeito de comparação, foram incluídos grupos recebedores de duas doses por vias de mucosa com os mesmos vetores acima descritos. Os animais foram sacrificados duas ou quatro semanas após o reforço, ou um ano após o reforço para o grupo i.m./i.m. Os dados para a semana -2 são referentes à frequência de células T CD8⁺ Gag-específicas observadas duas semanas antes do reforço. Células foram analisadas através de incubação com tetrâmero específico e anticorpo anti-CD8 α , sendo analisadas por citometria de fluxo. Significância estatística de $p < 0,05$ (*) ou $p < 0,01$ (**) é mostrada na figura.

Com o intuito de avaliar a duração da resposta imune celular mediada por linfócitos T CD8⁺ Gag-específicos, a frequência desta população celular foi avaliada em grupos de 10 animais um ano após administração de AdC6gag por via i.m., seguida por dose de reforço i.m. com AdC68gag. Células T CD8⁺ Gag-específicas foram identificadas em todos os tecidos analisados (Figura 14); NALT não foi avaliado neste experimento. A frequência de células T CD8⁺ Gag-específicas no TG diminuiu em comparação à observada neste tecido 4 semanas após o reforço ($p<0,05$), sendo estatisticamente comparável à frequência observada no sangue 1 ano após o reforço i.m. Frequência de células T CD8⁺ Gag-específicas em baço e LNI permaneceram estáveis, enquanto no sangue houve decréscimo desta população celular ($p<0,05$). Uma vez que sangue apresenta população composta por células em trânsito entre diferentes tecidos, é possível que a diminuição da frequência de células T CD8⁺ Gag-específicas observada neste tecido reflita a perda de células efetoras, ou sua transição para estágios de memória.

4.5 Análise do fenótipo das células T CD8⁺ Gag-específicas provenientes de tecidos sistêmicos e de mucosas

A expressão de marcadores celulares em células T CD8⁺ Gag-específicas isoladas de diferentes tecidos foi avaliada a fim de elucidar o fenótipo das células induzidas pela administração de vetores adenovirais símios. Células foram isoladas de camundongos BALB/c imunizados por via i.n. com AdC6gag e receptores de reforço por via i.vag. com AdC68gag após seis semanas. Células T CD8⁺ Gag-específicas foram analisadas utilizando tetrâmero específico e anticorpo anti-CD8 α , bem como anticorpos contra marcadores clássicos de ativação linfocitária (CD44 e CD27), marcador de endereçamento celular para linfonodos (CD62L) e integrina facilitadora de migração e retenção celular na mucosa gastrointestinal ($\alpha_4\beta_7$). Em todos os experimentos de fenotipagem, células tetrâmero-negativas de animais imunizados foram analisadas e seus fenótipos espelharam os observados para células provenientes de animais *naïve*.

A figura 15 apresenta dados de fenotipagem de células T CD8⁺ Gag-específicas isoladas de diferentes tecidos quatro e dez semanas após a administração de uma única dose i.n. de AdC6gag, ou quatro semanas após dose de reforço com AdC68gag por via i.vag. Quatro semanas após imunização i.n. com AdC6gag, houve aumento da expressão da molécula CD44 em células T CD8⁺ Gag-específicas

isoladas de baço, sangue, LNI e NALT em comparação às células provenientes de animais controle. Este aumento foi menos pronunciado em células isoladas do TG. Apesar de uma pequena população de células T tetrâmero⁺CD8⁺ isoladas do TG apresentar aumento da expressão do marcador CD62L, a maioria das células provenientes deste tecido apresentaram expressão desta molécula comparáveis à células provenientes de animais controle. Deve ser ressaltado que a expressão da molécula CD62L foi baixa na maioria das células T provenientes do TG de animais *naïve*, o que pode dificultar a análise das amostras provenientes deste tecido. Foi detectado aumento da expressão da molécula $\alpha_4\beta_7$ somente em células T tetrâmero⁺CD8⁺ presentes no baço. Houve variação na expressão da molécula CD62L dez semanas após imunização, estando esta diminuída no NALT e aumentada no TG e LNI. A molécula CD27 teve expressão também diminuída em sangue e NALT, demonstrando a presença de células efectoras nestes tecidos. A dose de reforço i.vag. não teve efeito pronunciado na expressão dos marcadores avaliados.

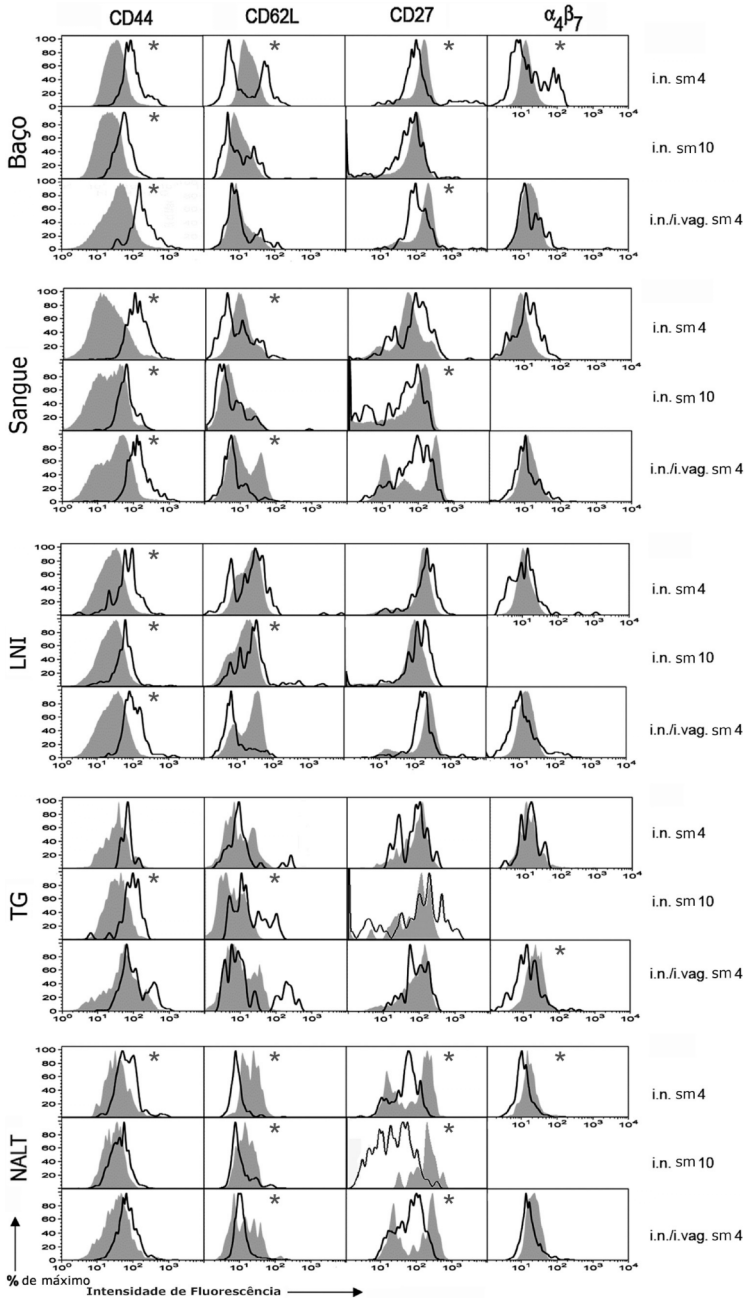


Figura 15. Análise fenotípica de células T CD8⁺ Gag-específicas após administração de vetores adenovirais símios por vias de mucosa. Grupos de vinte camundongos BALB/c foram imunizados i.n. com 10¹⁰ p.v. de AdC6gag e sacrificados após quatro (sm 4) e dez (sm 10) semanas para análise de células T CD8⁺ Gag-específicas. Células foram também isoladas de animais imunizados com AdC6gag por via i.n. seguido de reforço por via i.vag. com AdC68gag 6 semanas após a primeira imunização. Células foram incubadas com tetrâmero específico, anticorpo anti-CD8 α e anticorpos contra os marcadores CD44, CD27, CD62L e $\alpha_4\beta_7$, sendo analisadas por citometria de fluxo. Os histogramas derivados de um experimento representativo apresentam a expressão dos diferentes marcadores em células tetrâmero⁺CD8⁺ de animais imunizados (linhas pretas) e células tetrâmero⁻CD8⁺ de animais *naïve* (áreas hachuradas). O símbolo (*) denota significância estatística de $p < 0,05$ através de Teste *t* de Student de diferenças de MIF entre o grupo vacinado e o controle.

Após a determinação do perfil fenotípico de células T CD8⁺ Gag-específicas induzidas por imunizações através de mucosas, buscou-se identificar o fenótipo das células T CD8⁺ induzidas por imunização i.m. com AdC6gag seguida de reforço com AdC68gag por via i.m. ou de mucosa. Análises foram realizadas quatro semanas após a primeira dose ou reforço, e um ano após reforço i.m. com AdC68gag (Figura 16). Quatro semanas após imunização i.m. com AdC6gag, houve aumento da expressão da molécula CD44 em células T CD8⁺ Gag-específicas isoladas de baço e LNI (Figura 16). Foi observada diminuição da expressão da molécula CD62L em células T CD8⁺ Gag-específicas isoladas de baço, sangue e TG, mas não nos LNI ou NALT. Expressão do marcador CD27 diminuiu em células tetrâmero⁺CD8⁺ provenientes de sangue, baço e TG. Não foi observada alteração na expressão do marcador $\alpha_4\beta_7$ em células T CD8⁺ Gag-específicas isoladas dos tecidos analisados. Na quarta semana após o reforço, o fenótipo das células Gag-específicas provenientes de baço, TG e NALT refletiram o observado após a administração inicial do vetor. Nos LNI, houve tendência de diminuição na expressão do marcador CD62L em células T CD8⁺ Gag-específicas, possivelmente devido à recirculação de IELs. No sangue, houve aumento da expressão do marcador CD44 e diminuição da expressão de $\alpha_4\beta_7$. Após reforço i.vag. ou i.m., a expressão das moléculas CD44, CD62L, CD27 e integrina $\alpha_4\beta_7$ refletiram os perfis observados dez semanas após a primeira dose, não havendo diferenças expressivas no fenótipo de células provenientes de animais que receberam reforço por via de mucosa ou i.m. Um ano após o reforço, a expressão do marcador CD44 apresentou-se aumentada em células T CD8⁺ Gag-específicas isoladas de baço e LNI, enquanto retornou aos

valores basais observados no controle *naïve* para os outros tecidos analisados (Figura 16). Células T CD8⁺ Gag-específicas isoladas de LNI e TG apresentaram aumento na expressão da molécula CD62L, o que foi inesperado para o tecido mucoso. Esta informação novamente sugere tráfego celular entre TG e LNI. Houve aumento da expressão do marcador CD27 em células provenientes de LNI, sugerindo que células T CD8⁺ Gag-específicas deste tecido se diferenciaram em células de memória.

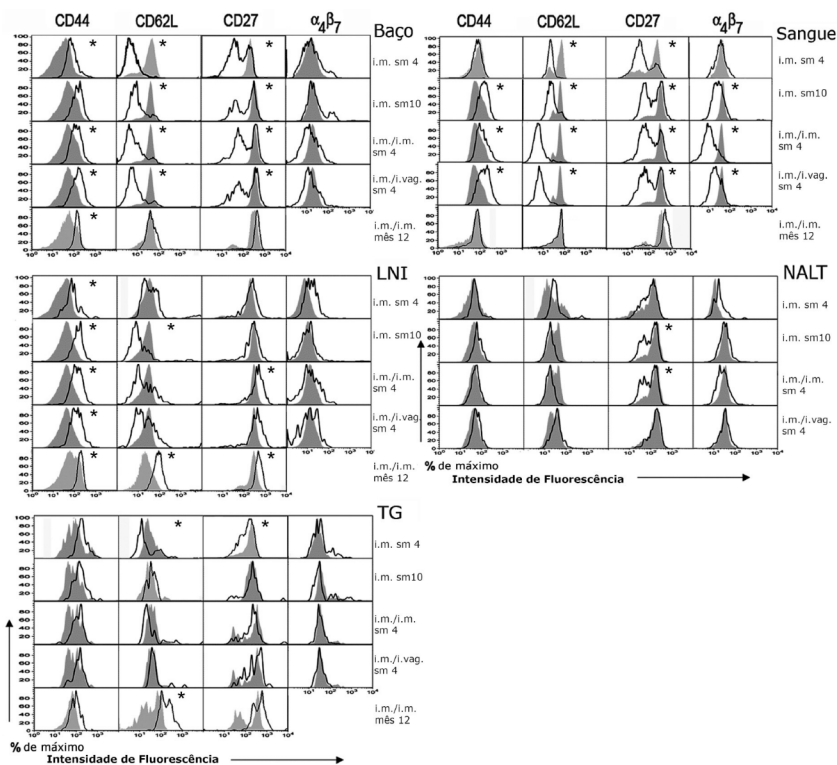


Figura 16. Fenótipo das células T CD8⁺ Gag-específicas após imunização i.m. com vetores adenovirais símios. Grupos de cinco camundongos BALB/c foram imunizados i.m. com 10¹⁰ p.v. de AdC6gag e sacrificados após quatro (sm 4) e dez (sm 10) semanas para análise de células T CD8⁺ Gag-específicas. Animais imunizados com AdC6gag por via i.m. seguido de reforço por via i.m. ou i.vag. com 10¹⁰ p.v. de AdC68gag seis semanas após a primeira imunização foram sacrificados após quatro semanas ou um ano do reforço. Células T CD8⁺ Gag-específicas foram incubadas com tetrâmero específico, anticorpo anti-CD8 α e anticorpos contra os marcadores de superfície CD44, CD27, CD62L e $\alpha_4\beta_7$, sendo analisadas por citometria de fluxo. Os histogramas derivados de um experimento representativo apresentam a expressão dos diferentes marcadores em células tetrâmero⁺CD8⁺ de animais imunizados (linhas pretas) e tetrâmero⁻CD8⁺ de animais *naïve* (áreas hachuradas). O símbolo (*) denota significância estatística de $p < 0,05$ através de Teste *t* de Student de diferenças de MIF entre o grupo vacinado e o controle.

Quatro semanas após a primeira dose ou dose de reforço heterólogo por via i.m., foi analisado o fenótipo de células provenientes do OUTC (ovário, útero, trompas uterinas e cérvix) separadamente das células provenientes da mucosa vaginal. Na figura 17 é possível observar a expressão de CD69 (marcador de ativação celular precoce), CD127 (receptor de IL-7), CD103 (também referido como $\alpha_E\beta_7$, integrina associada à infiltração celular no tecido epitelial) e NKG2D (receptor de ativação em células NK e co-estimulador para células CD8⁺) em células T CD8⁺ Gag-específicas isoladas de sangue, baço, LNI, OUTC e tecido vaginal. Como controle para a avaliação dos marcadores acima citados, células T Gag-específicas foram primeiramente analisadas quanto à expressão das moléculas CD44, CD62L e CD27, sendo esta expressão similar aos fenótipos observados na figura 16 (dados não mostrados).

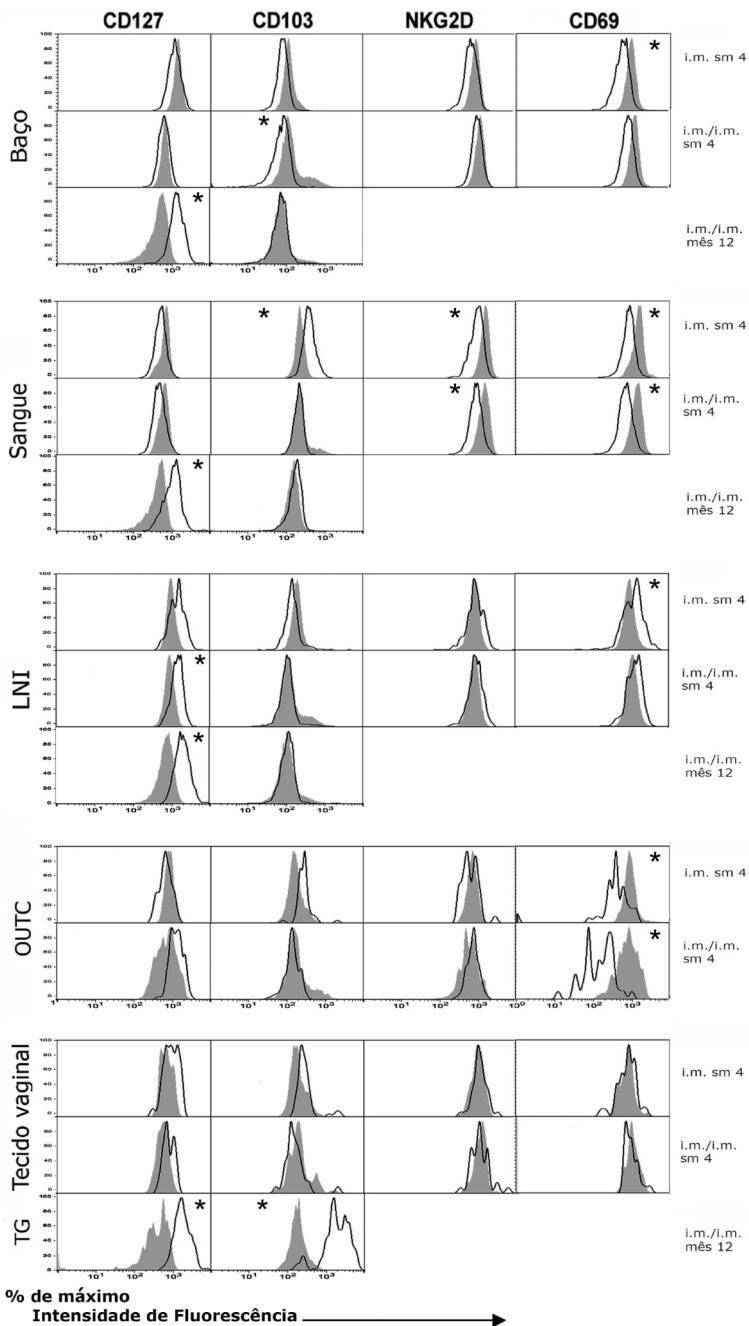


Figura 17. Análise fenotípica de células T CD8⁺ Gag-específicas induzidas por imunização i.m. com vetores adenovirais símios. Grupos de cinco camundongos BALB/c foram imunizados i.m. com 10¹⁰ p.v. de AdC6gag e sacrificados após quatro semanas (sm 4) para análise de células T CD8⁺. Animais imunizados com AdC6gag por via i.m. seguido de reforço por via i.m. com 10¹⁰ p.v. de AdC68gag seis semanas após a primeira imunização foram sacrificados quatro semanas ou um ano após o reforço. A figura demonstra expressão dos marcadores CD127, CD103, NKG2D e CD69 em células T tetrâmero⁺CD8⁺, analisadas por citometria de fluxo. Os histogramas derivados de um experimento representativo apresentam a expressão dos diferentes marcadores em células tetrâmero⁺CD8⁺ de animais imunizados (linhas pretas) e tetrâmero⁻CD8⁺ de animais *naïve* (áreas hachuradas). O símbolo (*) denota significância estatística de $p < 0,05$ através de Teste *t* de Student de diferenças de MIF entre o grupo vacinado e o controle.

Quatro semanas após administração da primeira dose, a expressão do marcador CD69 esteve diminuída em relação ao controle *naïve* em células T CD8⁺ de provenientes de baço, sangue e OUTC, apresentando o mesmo padrão de expressão nestes tecidos na quarta semana após o reforço (Figura 17). A expressão da molécula CD127 aumentou em células isoladas de LNI quatro semanas após a dose de reforço, estando aumentada em células T CD8⁺ Gag-específicas provenientes de todos os tecidos analisados um ano após o reforço. A elevada expressão da molécula CD103 em células T CD8⁺ Gag-específicas isoladas do TG um ano após o reforço sugere a atuação de CD103 na retenção desta população celular no TG. Foi observada alteração transiente no padrão da expressão da molécula NKG2D somente em células provenientes de sangue.

A figura 18 demonstra a expressão dos marcadores granzima B (enzima proteolítica indutora de apoptose caspase-dependente) e perforina (proteína formadora de poro) em células T CD8⁺ Gag-específicas isoladas de sangue, baço, LNI e TG. Também observa-se na figura a expressão de CTLA-4 (importante na regulação negativa de respostas celulares), PD-1 (regulador negativo da sinalização de células T e sua função efetora) e Ki-67 (proteína associada à proliferação celular). Um ano após o reforço, as moléculas granzima B e perforina apresentaram perfil de expressão similar, estando aumentadas em células tetrâmero⁺CD8⁺ isoladas do TG. Apesar da expressão de enzimas proteolíticas, a expressão de outros marcadores, como CD62L (Figura 16), sugere que células T isoladas do TG tenham se diferenciado em células de memória quiescentes. Houve diminuição da expressão da molécula CTLA-4 em células T CD8⁺ Gag-específicas isoladas de LNI

quatro semanas após a administração de AdC6gag, havendo aumento da expressão deste marcador em células isoladas de OUTC no mesmo período. Células T CD8⁺ Gag-específicas provenientes do TG apresentaram aumento da expressão de CTLA-4 e Ki-67, não tendo sido detectada variação na expressão da molécula PD-1 um ano após o reforço.

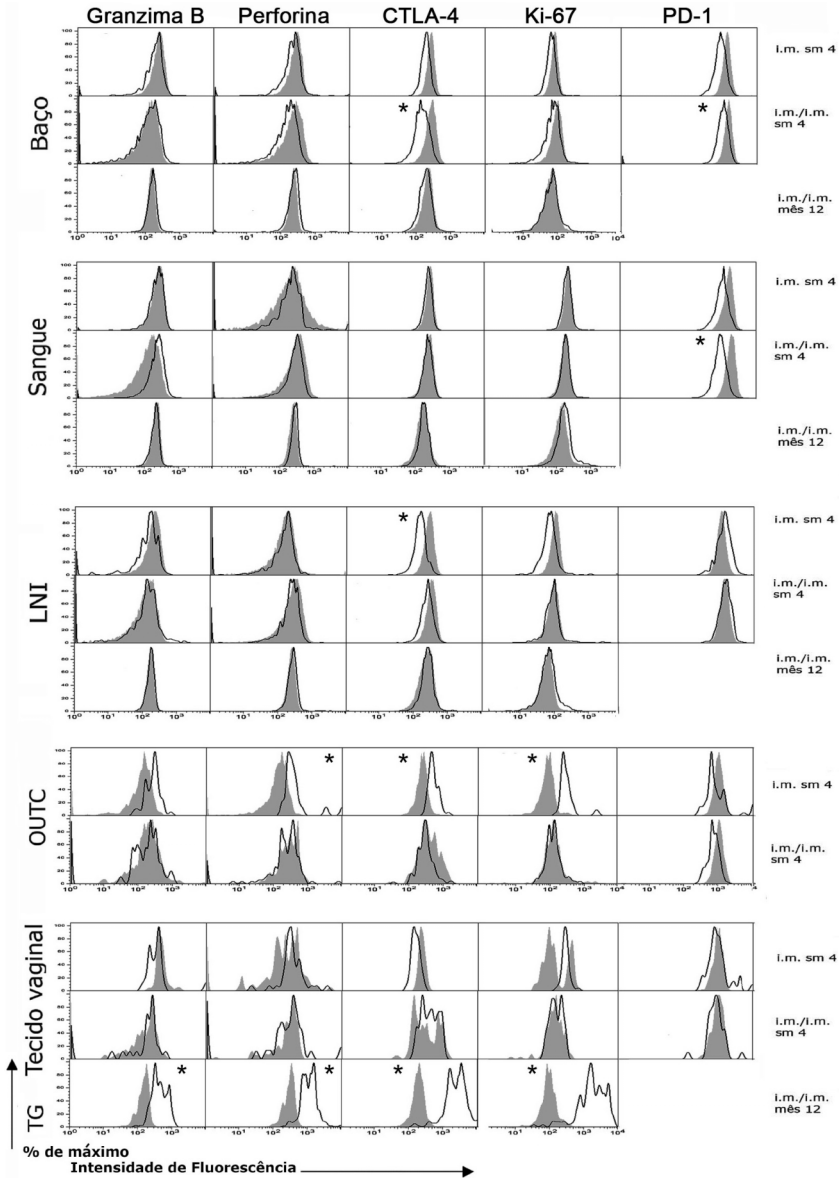


Figura 18. Análise de marcadores de fase efetora em células T CD8⁺ Gag-específicas induzidas por imunização i.m. com vetores adenovirais símios. Grupos de cinco camundongos BALB/c foram imunizados i.m. com 10¹⁰ p.v. de

AdC6gag e sacrificados após quatro semanas (sm 4) para análise de células T CD8⁺ Gag-específicas. Animais imunizados com AdC6gag por via i.m. seguido de reforço por via i.m. com 10¹⁰ p.v. de AdC68gag seis semanas após a primeira imunização foram sacrificados após quatro semanas ou um ano do reforço. A figura demonstra níveis de expressão das moléculas granzima B, perforina, CTLA-4, PD-1 e Ki-67 em células T tetrâmero⁺CD8⁺, analisadas por citometria de fluxo. Os histogramas derivados de um experimento representativo apresentam a expressão dos diferentes marcadores em células tetrâmero⁺CD8⁺ de animais imunizados (linhas pretas) e tetrâmero⁻CD8⁺ de animais *naïve* (áreas hachuradas). O símbolo (*) denota significância estatística de $p < 0,05$ através de Teste *t* de Student de diferenças de MIF entre o grupo vacinado e o controle.

Em resumo, diferenças notáveis na expressão de marcadores presentes em células T CD8⁺ Gag-específicas em comparação àquelas isoladas de TG e seus linfonodos drenantes foram observadas um ano após vacinação. Células T tetrâmero⁺CD8⁺ provenientes do TG apresentaram elevada expressão de CD103, CD127, CD62L, granzima B, perforina, CTLA-4 e Ki-67, indicando que estas células encontram-se num estágio de diferenciação não observado em baço ou sangue.

4.6 Origem das células T CD8⁺ presentes na mucosa genital

Com o intuito de identificar a origem das células T CD8⁺ que migram para o TG feminino, foram conduzidos experimentos de transferência adotiva de linfócitos. Camundongos BALB/c doadores foram imunizados i.m. com AdC6gag, recebendo dose de reforço após seis semanas com AdC68gag pela via i.m. Quatorze dias após o reforço, esplenócitos foram isolados de animais imunizados e a frequência de células tetrâmero⁺CD8⁺ foi determinada. As células restantes foram transferidas por via e.v. para camundongos da linhagem congênica Thy1.1 (5x10⁷ células/animal). Os animais recipientes foram sacrificados sete dias após a transferência para detecção da presença de células T CD8⁺ Gag-específicas em diferentes tecidos. A utilização da linhagem Thy1.1 permite a distinção de células provenientes de animal doador ou receptor por meio da marcação de CD90, pois esta proteína possui alteração em um aminoácido em camundongos Thy1.1, denominada CD90.1. Como demonstrado na Figura 19, células tetrâmero⁺CD8⁺CD90.1⁻ de origem dos animais doadores foram detectadas em todos os tecidos analisados, incluindo TG. Como observado após administração de vetores por via i.m. (Figura 11), detectou-se maior frequência de células T CD8⁺ Gag-específicas no TG do que em tecidos sistêmicos analisados ($p < 0,01$). Estes resultados

demonstram que células T CD8⁺ Gag-específicas isoladas de baço possuem a habilidade de migrar para o TG feminino de camundongos.

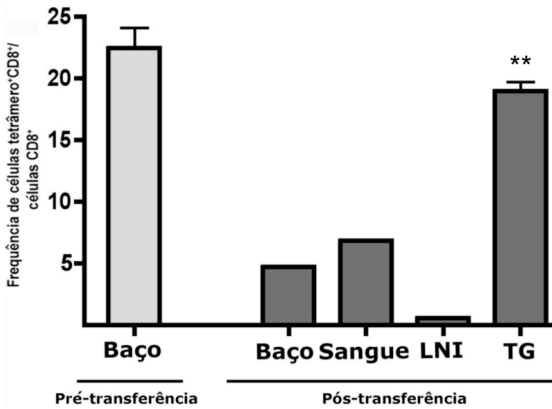


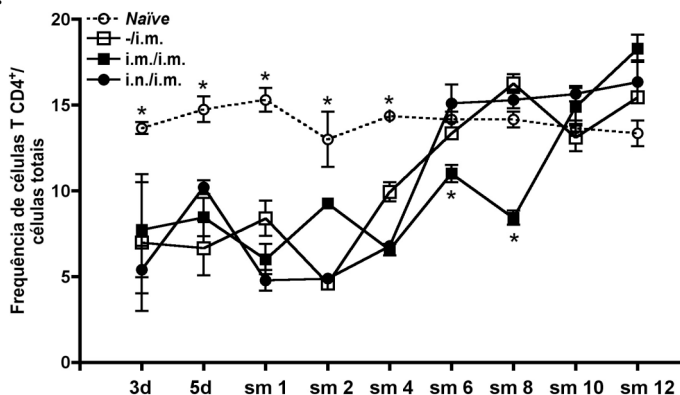
Figura 19. Migração de células T CD8⁺ Gag-específicas após transferência adotiva de linfócitos. Grupos de 10 camundongos BALB/c foram imunizados com AdC6gag por via i.m. Quatorze dias após reforço i.m. com AdC68gag, células provenientes do baço de animais imunizados foram transferidas via e.v. para camundongos Thy1.1 *naïve*. Sete dias após a transferência, os animais recipientes foram sacrificados e células provenientes de diferentes tecidos foram incubadas com tetrâmero específico, anticorpo anti-CD8 α e anti-CD90.1. Para análise do padrão de migração, células dos animais doadores foram identificadas através do fenótipo tetrâmero⁺CD8⁺CD90.1⁻; o gráfico demonstra frequência destas células em relação à contagem total de células CD8⁺. O símbolo (**) denota significância estatística de $p < 0,01$.

4.7 Efeito da imunização intramuscular com AdHu5gag sobre linfócitos residentes na mucosa genital

Vacinação com vetores adenovirais induz potente resposta inflamatória, que pode mudar a biodistribuição de células T ativadas por meio da secreção de quimiocinas. A presença de imunidade contra o vetor resulta em resposta inflamatória exacerbada, podendo resultar em alterações na distribuição e magnitude da resposta imune contra o transgene. Para avaliar se a vacinação com o vetor AdHu5gag altera a composição de células T residentes no TG e a determinar se essas mudanças são influenciadas pela presença de imunidade pré-existente ao vetor, camundongos BALB/c *naïve* ou imunes contra AdHu5 foram imunizados com 10^{10} p.v. de AdHu5gag por via i.n. ou i.m. Linfócitos

foram isolados do TG em diferentes períodos pós-imunização e frequências de células T totais foram avaliadas por citometria de fluxo (Figura 20).

20A.



20B.

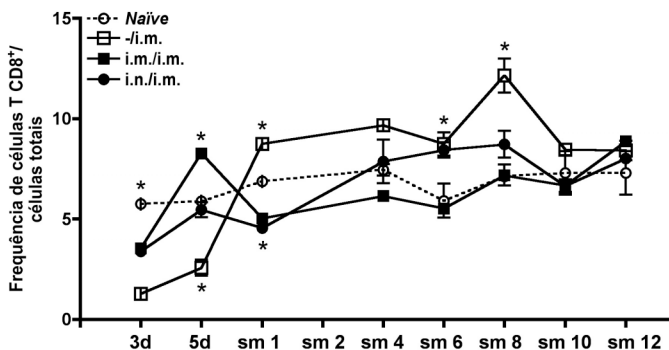


Figura 20. Frequência de células T no TG feminino após imunização i.m. com o vetor AdHu5gag. Imunidade pré-existente contra o vetor AdHu5 foi induzida em grupos de cinco camundongos BALB/c através de duas administrações de 10^{11} p.v. de AdHu5rab.gp por via i.m. ou i.n. Animais pré-expostos ao vetor AdHu5 foram imunizados com 10^{10} p.v. de AdHu5gag por via i.m. três semanas depois (i.m./i.m., quadrados preenchidos e i.n./i.m., círculos preenchidos). O grupo controle foi imunizado com o vetor AdHu5gag por via i.m. na ausência de pré-exposição (-i.m., quadrados abertos), enquanto animais *naïve* receberam PBS em lugar de vetores virais (círculos abertos). Animais dos diferentes grupos experimentais foram sacrificados duas semanas após a imunização com AdHu5gag e células provenientes do TG foram avaliadas

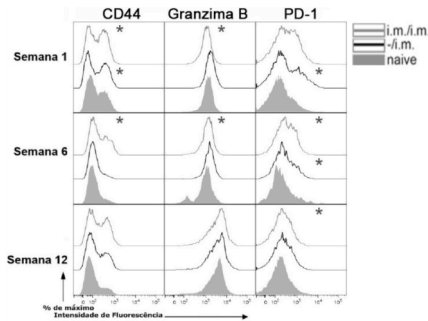
quanto às frequências de células CD4⁺ (20A) ou CD8⁺ (20B). O símbolo (*) denota significância estatística de $p < 0,05$ de diferenças nas frequências entre o grupo *naïve* e os grupos imunizados.

Animais *naïve* apresentaram frequências estáveis de células CD4⁺ e CD8⁺ em populações celulares isoladas do TG durante as doze semanas pós-imunização avaliadas ($p > 0,05$) (Figura 20). Após a administração de AdHu5gag, foi observada diminuição na frequência de células T CD4⁺ nos grupos imunizados ($p < 0,05$) (Figura 20A). Entretanto, a frequência de células CD4⁺ retornou aos valores normais na sexta semana após a imunização em animais soronegativos para AdHu5 no momento da imunização (grupo -/i.m.) ou pré-expostos ao vetor por via i.n. (i.n./i.m.), enquanto esta mesma população celular permaneceu contraída em relação ao controle em animais pré-expostos ao vetor por via i.m. (grupo i.m./i.m.) até a décima semana pós-imunização ($p < 0,05$). Observou-se o mesmo declínio nas frequências totais de células CD8⁺ após imunização com AdHu5gag ($p < 0,05$) (Figura 20B). No grupo i.n./i.m. ou i.m./i.m., a frequência de células CD8⁺ permaneceu abaixo dos valores normais até a quarta ou sexta semana pós-imunização, respectivamente ($p < 0,05$). Em contrapartida, o grupo -/i.m. apresentou frequência aumentada de células T CD8⁺ em relação ao grupo *naïve* entre a primeira e oitava semana pós-imunização com AdHu5gag ($p < 0,05$), o que sugere a infiltração de células T CD8⁺ no TG recentemente ativadas pela administração do vetor.

O início da resposta imune foi caracterizada por redução na frequência de células T CD4⁺ e CD8⁺ no TG (Figura 20). Para avaliar se os linfócitos T que continuaram a residir no TG neste período são fenotipicamente distintos de células provenientes de animais *naïve*, células isoladas após imunização com AdHu5gag por via i.m., na presença ou ausência de imunidade pré-existente contra o vetor, foram avaliadas quanto à expressão de diferentes marcadores celulares por citometria de fluxo. O perfil fenotípico de células isoladas de animais pré-expostos ao vetor por via i.n. ou i.m. foram semelhantes e por este motivo somente dados referentes à pré-exposição i.m. são mostrados. Somente os marcadores CD44, granzima B e PD-1 apresentaram variação de expressão em células T CD4⁺ totais (Figura 21A). Foi possível detectar aumento da expressão do marcador CD44 em células isoladas dos dois grupos imunizados quando comparadas às células provenientes do controle na primeira semana após imunização. A molécula granzima B apresentou aumento de expressão em células CD4⁺ provenientes do grupo i.m./i.m. nos dois primeiros pontos de

análise. Na décima segunda semana pós-imunização, os níveis de expressão das moléculas granzima B e CD44 foram comparáveis em células T provenientes dos 3 grupos analisados. A população CD4⁺PD-1^{hi} foi detectada nos dois grupos vacinados com AdHu5gag mas não no controle *naïve*; o tamanho desta população contraiu na sexta semana pós-vacinação com AdHu5gag, não podendo mais ser detectada na décima segunda semana.

21A.



21B.

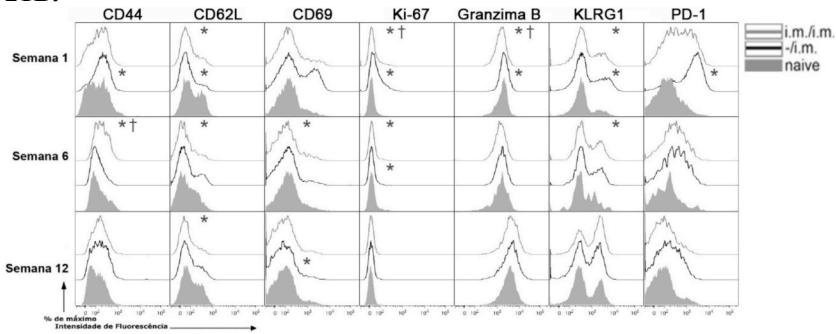


Figura 21. Fenótipo de células T provenientes do TG feminino após imunização i.m. com o vetor AdHu5gag. Imunidade pré-existente ao vetor AdHu5 foi induzida em grupos de cinco camundongos BALB/c através da administração de 10^{11} p.v. de AdHu5rab.gp por via i.m. Animais pré-expostos ao vetor AdHu5 foram imunizados com 10^{10} p.v. de AdHu5gag por via i.m. três semanas depois (i.m./i.m., linha cinza). Grupo controle foi imunizado com o vetor AdHu5gag por via i.m. na ausência de pré-exposição (-i.m., linha preta), enquanto animais *naive* receberam PBS em lugar de vetores virais (área hachurada). Animais dos diferentes grupos experimentais foram sacrificados em diferentes períodos após imunização com AdHu5gag e células CD4⁺ (21A) ou CD8⁺ (21B) provenientes do TG foram avaliadas quanto à expressão dos marcadores listados na figura. Os histogramas apresentados são derivados de um experimento representativo. O símbolo (*) denota significância estatística de $p < 0,05$ entre o grupo vacinado e controle, enquanto (†) denota $p < 0,05$ entre os dois grupos vacinados através de Teste *t* de Student de diferenças de MIF.

Diferenças fenotípicas foram mais pronunciadas para células T CD8⁺ isoladas do TG de animais vacinados com AdHu5gag quando

comparadas às células isoladas de animais *naïve* (Figura 21B). Foi observado aumento diferencial da expressão do marcador CD44, estando esta molécula aumentada no grupo *-i.m.* na primeira semana, e no grupo *i.m./i.m.* na sexta semana após imunização. A expressão da molécula CD62L apresentou-se diminuída nos dois grupos imunizados uma semana após administração, retornando aos valores basais no grupo *-i.m.* após este período. Células T CD8⁺CD69^{hi} foram detectadas na primeira semana pós-imunização no grupo *-i.m.*, não sendo observadas em outros pontos de análise ou grupos experimentais. A população celular CD8⁺Ki-67^{hi} foi observada de forma transiente na primeira semana após imunização com AdHu5gag no grupo *-i.m.*, enquanto observou-se aumento da expressão de granzima B nos dois grupos imunizados. Animais vacinados com AdHu5gag demonstraram aumento na frequência de células CD8⁺KLRG1^{hi} em populações isoladas do TG, suportando a noção de que a imunidade pré-existente ao vetor aumenta a estimulação antigênica constante de células T. Células T CD8⁺ isoladas de animais do grupo *-i.m.* apresentaram aumento da expressão do marcador PD-1 na primeira semana após imunização. Tomados em conjunto, estes resultados demonstram que a imunização com o vetor AdHu5gag resulta em alteração na frequência e fenótipo de células T presentes na mucosa genital, sugerindo um padrão dinâmico de migração celular após imunização com o vetor viral. Estas células T aparentemente evadem a mucosa após imunização com AdHu5, talvez migrando para sítios de inflamação induzidos pela aplicação do vetor adenoviral, enquanto células T induzidas pela vacina infiltram a mucosa após ativação específica.

4.8 Cinética da resposta de células T CD8⁺ induzida por administração intramuscular de AdHu5gag na presença de imunidade contra o vetor viral

A imunidade pré-existente ao vetor vacinal pode resultar em interferência não somente no padrão de migração de células T, mas também em sua magnitude. Para avaliar o efeito da imunidade pré-existente contra o vetor na indução de resposta imune celular transgene-específica no TG feminino, camundongos BALB/c *naïve* ou pré-expostos à AdHu5 por via *i.n.* ou *i.m.* foram imunizados com 10¹⁰ p.v. de AdHu5gag por via *i.m.* Como controle, células provenientes de animais *naïve* foram analisadas em paralelo. O grupo pré-exposto ao vetor AdHu5 por via *i.m.* apresentou menor frequência de células T CD8⁺ Gag-específicas em relação ao grupo imunizado com AdHu5gag

na ausência de imunidade pré-existente ao vetor adenoviral em todos os tecidos analisados ($p < 0,05$ em sangue, $p < 0,01$ em baço, LNI e TG) (Figura 22). No sangue, a pré-exposição ao vetor AdHu5 resultou em redução da frequência de células T CD8⁺ Gag-específicas em cerca de 50% na primeira semana após imunização para este grupo, sendo esta redução mais pronunciada na décima segunda semana (~80%). Considerando o grupo pré-exposto ao vetor por via i.n., a queda na frequência de células T CD8⁺ Gag-específicas foi observada somente no TG e nos ILN ($p < 0,01$), em comparação ao observado no grupo imunizado na ausência de imunidade pré-existente ao vetor vacinal. No grupo -/i.m., a vacinação com AdHu5gag induziu aumento da frequência de células T CD8⁺ Gag-específicas no TG na primeira semana pós-imunização, declinando na quarta semana ($p < 0,01$) e permanecendo estável até o final do experimento. Houve diminuição na frequência de células T CD8⁺ Gag-específicas isoladas do TG do grupo pré-exposto i.n. ao vetor AdHu5 em todos os pontos de análise ($p < 0,05$). De forma geral, a pré-exposição i.m. ao vetor AdHu5 influencia a indução de células T CD8⁺ transgene-específicas em tecidos sistêmicos e de mucosas, enquanto a pré-exposição ao vetor por via i.n. atua principalmente em populações do TG e seus linfonodos drenantes.

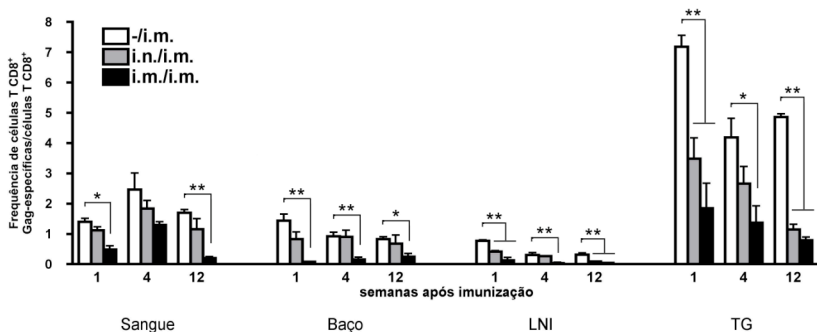


Figura 22. Efeito da imunidade pré-existente contra o vetor AdHu5 sobre a frequência de células T CD8⁺ Gag-específicas após imunização i.m. com AdHu5gag. Camundongos BALB/c foram pré-expostos ao vetor AdHu5 por via i.m. ou i.n. e imunizados com o vetor AdHu5gag por via i.m. após três semanas (i.m./i.m., colunas pretas e i.n./i.m., colunas cinzas). Grupos-controle consistiram em animais imunizados com AdHugag na ausência de imunidade pré-existente ao vetor adenoviral (-/i.m., colunas abertas). Células foram incubadas com tetrâmero específico, anticorpo anti-CD8 α e corante aqua e analisadas por citometria de fluxo. O gráfico demonstra cinética da frequência de células T CD8⁺ Gag-específica provenientes de diferentes tecidos. Valores obtidos mediante análise de células provenientes de animais *naïve*, receptores de PBS em lugar de vetores virais, foram subtraídos dos valores demonstrados para os dois grupos experimentais. Significância estatística de $p < 0,05$ (*) ou $p < 0,01$ (**) é mostrada na figura.

Para avaliar a qualidade da resposta mediada por células T CD8⁺ transgene-específicas induzidas pela administração do vetor AdHu5gag na presença de imunidade contra o vetor vacinal, o fenótipo de células T CD8⁺ Gag-específicas foram avaliados 1, 6 e 12 semanas após a imunização com o vetor adenoviral (Figura 23). Por similaridades no fenótipo observado em células isoladas de animais pré-expostos ao vetor AdHu5, somente o grupo i.m./i.m. é mostrado em comparação com o grupo imunizado na ausência de imunidade pré-existente ao vetor ou com o grupo *naïve*. Em células isoladas de baço, os marcadores CCR5 e CD69 apresentaram-se expressos de maneira aumentada em células T CD8⁺ Gag-específicas de animais pré-expostos ao vetor AdHu5. Em contraste, observou-se a população CD8⁺CD69^{hi} em células provenientes do TG do grupo -/i.m. na primeira semana pós-imunização. Diferenças na expressão de marcadores celulares neste período entre os dois grupos receptores de vacina sugerem retardamento na ativação de células T CD8⁺ na presença de imunidade contra o vetor. Após seis

semanas de imunização com AdHu5gag foi observada maior expressão da molécula PD-1 em células isoladas de sangue e LNI do grupo -i.m., em comparação ao grupo pré-exposto ao vetor.

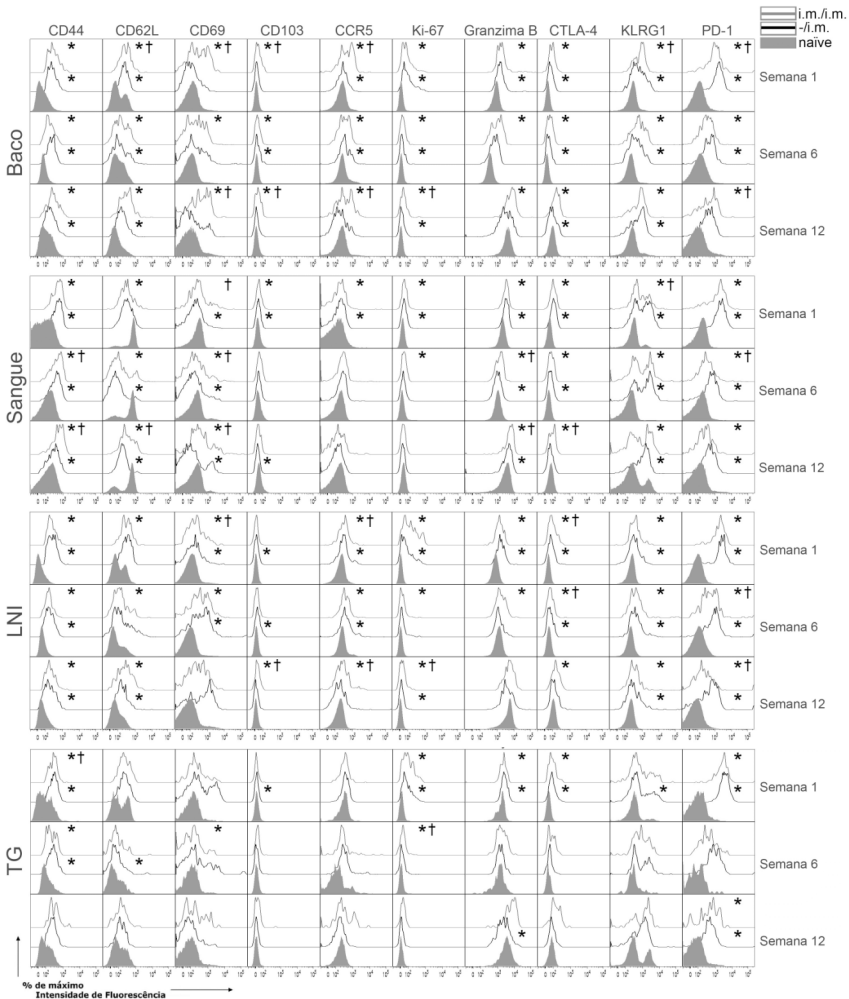


Figura 23. Fenótipo de células T CD8⁺ Gag-específicas induzidas mediante administração de AdHu5gag por via i.m. Grupos de cinco camundongos BALB/c foram imunizados com AdHu5gag na presença (linha cinza) ou ausência (linha preta) de imunidade pré-existente contra o vetor AdHu5. Células foram isoladas 1, 6 ou 12 semanas após a administração de AdHu5gag. Os

histogramas derivados de um experimento representativo apresentam expressão dos marcadores listados na figura em células tetrâmero⁺CD8⁺, em relação à células tetrâmero⁻CD8⁺ provenientes de animais *naïve*. O símbolo (*) denota significância estatística de $p < 0,05$ entre o grupo vacinado e controle, enquanto (†) denota $p < 0,05$ entre os dois grupos vacinados através de Teste *t* de Student de diferenças de MIF.

As diferenças mais pronunciadas no fenótipo celular entre grupos imunizados com AdHu5gag foram observadas doze semanas após a imunização (Figura 23). Observou-se aumento da expressão da molécula CD69 em células T CD8⁺ Gag-específicas isoladas de sangue e baço do grupo i.m./i.m. Houve aumento da expressão dos marcadores CD103, CCR5 e Ki-67 em células T CD8⁺ Gag-específicas isoladas de baço e LNI de animais imunes ao vetor, enquanto PD-1 apresentou expressão elevada em células provenientes de LNI do grupo -/i.m. Células T CD8⁺ Gag-específicas isoladas do TG dos dois grupos imunizados apresentaram aumento da expressão do marcador PD-1, enquanto o grupo -/i.m. apresentou também diminuição de granzima B. De maneira geral, os dados originados neste estudo sugerem que a imunidade pré-existente ao vetor vacinal não somente retarda a ativação de células T CD8⁺ transgene-específicas, mas pode também influenciar seu processo de diferenciação.

Além da resposta imune inata que pode perdurar por várias semanas após a infecção, pré-exposição ao vetor AdHu5 induz não somente anticorpos, mas também resposta de células T contra antígenos do vetor viral. Para avaliar se a redução na frequência de células T CD8⁺ transgene-específicas é resultante da ação de AcN contra o vetor ou se componentes celulares do sistema imune contribuem para este fenômeno, foram conduzidos experimentos de transferência de soro imune. Camundongos BALB/c foram pré-expostos à AdHu5 ou injetados com soro proveniente de animais imunes ao vírus e então vacinados com 10^{10} p.v. de AdHu5gag. Animais *naïve* vacinados com AdHu5gag foram utilizados como controle para frequência de células transgene-específicas. Como observado na figura 24, a diminuição da frequência de células T CD8⁺ Gag-específicas em sangue, baço e LNI foi semelhante entre animais pré-expostos ao vetor ou receptores de soro imune ($p > 0,05$). Mediante transferência de soro imune, frequências de células T CD8⁺ Gag-específicas no TG foram restauradas ($p < 0,01$), aumentando em média 21 vezes (frequências de 0-0,24% para grupo pré-exposto, 2,19-2,98% no grupo de animais que recebeu soro imune). Estes resultados sugerem que enquanto AcN são o principal mecanismo

atuando na imunidade pré-existente ao vetor AdHu5 em tecidos sistêmicos, o tráfego de células T CD8⁺ para o TG é influenciado não somente por AcN, mas também por mecanismos celulares envolvidos na resposta imune adaptativa contra o vetor AdHu5.

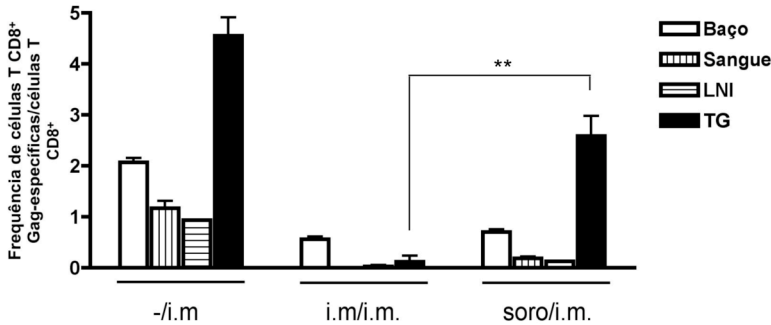


Figura 24. Efeito da presença de anticorpos pré-existentes contra AdHu5 na indução de células T CD8⁺ Gag-específicas após imunização i.m. com AdHugag. Camundongos BALB/c foram pré-expostos à AdHu5 ou injetados i.p. com soro proveniente de animais imunes ao vírus. Animais foram imunizados após uma semana com 10^{10} p.v. de AdHu5gag. Células foram analisadas por citometria de fluxo duas semanas após a imunização, comparadas com células provenientes de animais imunizados com o vetor AdHu5gag na ausência de imunidade pré-existente contra o vetor adenoviral. Valores denotam frequências de células tetrâmero⁺CD8⁺ em relação ao número total de CD8⁺; valores obtidos mediante análise da resposta Gag-específica em camundongos *naïve* foram subtraídos dos grupos experimentais mostrados na figura. O símbolo (**) denota significância estatística de $p < 0,01$.

5 DISCUSSÃO

Atualmente mulheres são mais comumente infectadas por HIV através de contato sexual (ABDOOL KARIM; SIBEKO; BAXTER, 2010) e por este motivo acredita-se que a localização de resposta imune específica no TG possa ser um importante mecanismo para possivelmente conter a infecção. Além de eliminar a infecção inicial por HIV, esta contenção local poderia impedir a propagação sistêmica do vírus, a qual resulta em variantes virais que escapam detecção pelo sistema imune e acaba por prejudicar a resposta adaptativa contra o HIV. Estratégias vacinais que induzam a produção de anticorpos contra HIV-1 foram extensivamente avaliadas, entretanto não foi possível a obtenção de nenhuma vacina que fosse capaz de induzir AcN (MASCOLA; MONTEFIORI, 2010). Os esforços vacinais estão atualmente concentrados na indução de resposta imune celular, mediada principalmente por células T CD8⁺, por possuir papel central no controle de infecções virais incluindo infecção persistente com HIV-1 (PANTALEO; FAUCI, 1995). Esta resposta de células T CD8⁺ não previne infecção, mas se presente na porta de entrada do vírus em indivíduos infectados poderia rapidamente eliminar células infectadas por HIV e potencialmente prevenir ou interromper a disseminação viral (UBERLA, 2008). Por este motivo, teve-se por objetivo neste trabalho a indução de células T CD8⁺ HIV-específicas no TG feminino mediante a administração por diferentes vias de vetores adenovirais que expressam proteína derivada de HIV-1.

É sabido que imunização i.n. induz resposta imune adaptativa não somente no trato respiratório mas também no trato reprodutivo (HOLMGREN; CZERKINSKY, 2005). No presente trabalho, imunização i.n. com AdC6gag induziu células T CD8⁺ Gag-específicas em diversos tecidos e mucosas (Figura 3), incluindo o TG, bem como resposta imune humoral contra o vetor vacinal e contra a proteína Gag de HIV-1 (Figuras 2 e 4). O isotipo IgA é comum em superfícies mucosas e foi portanto esperado que estivesse envolvido na resposta contra o vetor em superfícies mucosas, quando da administração i.n. de AdC6gag (Figura 5A). A presença de IgG2 sérica, que possui funções de fixação de complemento, opsonização e neutralização viral (SCHROEDER; CAVACINI, 2010), demonstra a habilidade de vetores adenovirais símios em induzir anticorpos que posteriormente podem atuar na interferência de infecção pela partícula viral (Figura 5B).

Os resultados do presente estudo confirmam que células T CD8⁺ migram para o TG feminino após imunização por via i.n. com

AdC6gag, porém o número desta população celular diminuiu rapidamente após o fim da fase efetora da resposta imune celular (Figura 3). A imunização i.vag., por sua vez, foi ineficiente na indução de imunidade em tecidos outros que não o TG (Figura 11) e quando utilizada como via de reforço após imunização i.n., induziu um pequeno aumento nas frequências de células T CD8⁺ Gag-específicas no TG e linfonodos drenantes (Figura 8). Apesar da baixa frequência da resposta imune celular induzida pela imunização i.vag. observada neste estudo, a utilização de formulações que protejam o vetor viral do baixo pH vaginal e conseqüentemente aumentem a eficiência desta via de imunização é de grande valia e deve ser posteriormente explorada. Entretanto, como relatado previamente por Gupta e colaboradores (GUPTA et al., 2005), a via de imunização i.vag. foi relativamente ineficaz na indução de resposta imune sistêmica, o que combinado à problemas de logística dificulta o uso desta via de imunização em grande escala em seres humanos.

Na avaliação da administração de vetores adenovirais por vias de mucosa, observou-se a superior indução de resposta imune celular HIV-específica no grupo que recebeu a primeira dose do vetor por via i.n. seguida de reforço pela via i.vag (Figura 9). Entretanto, este protocolo de imunização por vias de mucosa resultou na indução de menor frequência de células T CD8⁺ Gag-específicas quando comparada ao protocolo dose-reforço por via i.m (Figura 14). A imunização i.m. com vetores adenovirais recombinantes induziu não somente células T CD8⁺ Gag-específicas em tecidos sistêmicos, mas também altas frequências destas células específicas no TG (Figura 11). Uma segunda dose de vetor recombinante por via i.m resulta em potente reforço no TG de animais recebedores de primeira dose pela via i.m. (Figura 14). Foi observado que a frequência de células HIV-específicas induzidas por esta via de imunização permaneceram detectáveis pelo menos 1 ano após a administração dos vetores recombinantes. Imunização i.m. é portanto superior na indução de células T CD8⁺ genitais induzidas por vetores AdC quando comparada à via i.n., e oferece também o benefício de induzir potente resposta de células T CD8⁺ sistêmicas, que poderiam servir como uma segunda linha de defesa no caso do vírus ultrapassar a barreira mucosa. Estes resultados são corroborados por Suvas e colaboradores que demonstraram que infecção i.p. com vírus da coriomeningite linfocítica é superior à infecção i.n. na indução de células específicas na mucosa do TG de camundongos (SUVAS et al., 2007). Outros grupos demonstram achados semelhantes mediante imunização com proteínas (BARNETT et al., 2008), vacinas de DNA

(WU et al., 2009) e vacinas de DNA em combinação com vetores MVA e Semliki Forest (MARTINON et al., 2008). Tomados em conjunto, estes estudos indicam que a indução de células T CD8⁺ Gag-específicas em sítios mucosos após imunização i.m. é independente de vetor ou transgene de interesse, mas sim reflete um processo estabelecido do sistema imune adaptativo, relacionado à ativação e migração celular para tecidos de mucosa.

Ao se comparar a frequência e a funcionalidade de células induzidas por imunização de mucosa ou parenteral (Figura 12), pode-se concluir que a administração i.m. de vetores adenovirais é mais propícia para a indução de resposta imune adaptativa no TG feminino. Isto despertou interesse quanto às diferenças de fenótipo celular induzido por distintas vias de administração do antígeno (Figuras 15 e 16). Também foi realizado um estudo fenotípico detalhado de células T CD8⁺ na tentativa de esclarecer quais eram os marcadores celulares relacionados à migração celular para o TG feminino (Figuras 16, 17 e 18). É possível que células T CD8⁺ ativadas após encontro com antígeno se dirijam para o TG com o auxílio de sensores não-identificados, ou que este processo seja aleatório. Nestes ensaios foram comparadas células isoladas de baço, sangue, LNI e TG em diferentes dias pós-imunização. Em alguns experimentos NALT também foi avaliado, sendo utilizado para fins de comparação de população celular migrando para tecido mucoso distinto. Além de induzir frequências superiores aos protocolos de imunização por vias de mucosa, a administração i.m. dos vetores induziu células específicas com fenótipos similares aos observados após imunização i.n ou i.vag (Figuras 15 e 16). Foi observado que células T CD8⁺ isoladas da mucosa genital, quando na fase efetora, compartilham características fenotípicas com aquelas circulando em tecidos sistêmicos ou que migram para o NALT. Entretanto, células Gag-específicas isoladas de tecidos sistêmicos ou TG são fenotipicamente distintas após estabelecimento de memória, sendo esta situação especialmente pronunciada um ano após a imunização i.m. Os marcadores celulares avaliados sugerem que células tetrâmero⁺CD8⁺ residentes no TG permanecem ativadas por longos períodos e poderiam, portanto, proliferar e atuar em processos citotóxicos após encontro com células infectadas expressando HIV-1 Gag.

Na tentativa de desvendar o fenótipo de células T provenientes do TG feminino, foram avaliados marcadores celulares que são expressos em células provenientes da mucosa intestinal. Apesar da expressão aumentada do marcador CD69 em células T CD8⁺ provenientes da mucosa intestinal ter sido demonstrada (KUO et al.,

2001; KLEIN, 2004), não foi observado aumento da expressão de CD69 em células isoladas da mucosa do TG após administração de vetores adenovirais símios (Figura 17). Apesar da molécula $\alpha_4\beta_7$ estar relacionada à migração de células T CD4⁺ para o TG e ser considerada um marcador de migração celular para a mucosa intestinal (HAWKINS; RANK; KELLY, 2000), não foi observado aumento da sua expressão em células T CD8⁺ que migram para o TG feminino de camundongos (Figuras 15 e 16). Entretanto, não é possível excluir a atuação de $\alpha_4\beta_7$ no endereçamento de células T para a mucosa vaginal, visto que a expressão deste marcador ocorre de forma transiente e por curtos períodos de tempo, podendo assim ter escapado de detecção nos ensaios realizados. O marcador CD103 esteve discretamente aumentado em células tetrâmero⁺CD8⁺ do TG logo após imunização, sendo fortemente expresso um ano após a vacinação (Figura 17).

Na tentativa de desvendar se a migração celular para o TG é dependente da origem celular, foram realizados experimentos de transferência adotiva de linfócitos provenientes de animais imunizados com vetores adenovirais recombinantes por via i.m. (Figura 19). Demonstrou-se assim que células T CD8⁺ Gag-específicas de origem esplênica podem rapidamente migrar para o TG feminino de maneira similar à observada em animais imunizados com vetores adenovirais. Este dado contrapõe a hipótese de que células T CD8⁺ que migram e residem em tecidos mucosos requerem uma via distinta de maturação ou ativação da observada para células T pertencentes à circulação sistêmica (HOLMGREN; CZERKINSKY, 2005). Além disso, a elevada frequência de células T CD8⁺ Gag-específicas induzida no TG por imunização i.m., quando comparada à observada após administração i.n. do vetor, contraria a teoria de que imunização por diferentes vias resulta na migração diferencial de células T ativadas (LEFRANCOIS et al., 2002), sendo este processo ditado pelas condições nas quais as células T CD8⁺ são inicialmente estimuladas. Os resultados aqui apresentados sugerem que a migração de células T CD8⁺ ativadas para o TG é em parte aleatório e afetado pela frequência destas células no sangue, e em parte direcionado pela expressão de marcadores de endereçamento celular ainda não identificados. Em ambos os casos, acredita-se que células T CD8⁺ ativadas recebem sinal de um microambiente que favorece sua retenção uma vez que alcançam o TG, resultando em enriquecimento desta população na superfície mucosa.

A funcionalidade de células T CD8⁺ isoladas do TG deve ser melhor investigada. Estes dados iniciais demonstram que células do TG

produzem IFN- γ , como também observado para células T CD8⁺ genitais isoladas de NHP infectados com SIV (STEVCEVA et al., 2002). Foi observado também que células T CD8⁺ Gag-específicas provenientes do TG apresentam elevada expressão de granzima B, perforina e Ki-67, sugerindo que estas células permanecem ativadas, mesmo um ano após a administração do vetor vacinal (Figura 18). Apesar de células de memória tradicionalmente não possuírem marcadores de fase efetora, Klein demonstrou a presença de células T atípicas em superfícies mucosas (KLEIN, 2004) e acredita-se que a elevada expressão de enzimas líticas observada em células de memória provenientes do TG seja resultado de microambiente específico deste tecido.

Em seres humanos, vacinas de Ad induziram resposta imune robusta em ensaios de fase I e II (CATANZARO et al., 2006; PRIDDY et al., 2008), tendo sido recentemente avaliadas em ensaios de fase IIb, denominados STEP e Phambili (BUCHBINDER et al., 2008). Estes estudos foram projetados para avaliar a redução de aquisição e/ou diminuição da carga viral pós-infecção com HIV em indivíduos que não possuíam títulos de AcN contra o vetor vacinal utilizado, bem como em indivíduos com altos títulos de AcN. A vacina baseada em AdHu5, expressando *gag*, *pol* e *nef* derivados de HIV-1 subtipo B foi administrada pela via i.m. em protocolo de dose-reforço de três doses. Apesar de ter sido planejado o recrutamento de três mil indivíduos para o ensaio STEP, o estudo foi interrompido antes do recrutamento ter sido finalizado devido à falta de eficácia da vacina após a confirmação de 82 infecções por HIV (MCEL RATH et al., 2008). O ensaio Phambili foi interrompido logo em seguida, após o recrutamento de somente 801 participantes e confirmação de 11 novas infecções (NIAID, 2007). O resultado mais surpreendente deste estudo está realacionado à resposta imune pré-existente contra o vetor AdHu5, visto que houve tendência de maior aquisição de HIV por indivíduos com altos títulos de AcN contra o vetor. A incidência de infecção por HIV em indivíduos soropositivos para AdHu5 foi 2,3% maior que no respectivo grupo placebo (BUCHBINDER et al., 2008). Tem sido sugerido que a ativação global de células T CD4⁺ observada no estudo possa enriquecer a população de células-alvo para o vírus e dessa maneira facilitar a infecção por HIV-1. De fato, estudos demonstram que a administração de AdHu5 induz ativação de células T CD4⁺ com maior expressão de CCR5 e receptores de migração para sítios mucosos (BENLAHRECH et al., 2009). Esta situação é particularmente importante no caso de vetores adenovirais, considerando que o vetor persiste de forma transcricionalmente ativa por

longos períodos após imunização, mantendo populações de células específicas pela constante estimulação antigênica (TATSIS et al., 2007b). Foi também sugerido que a presença de AcN contra o vetor possa interferir com a apresentação de antígeno e ocasionar redirecionamento de resposta celular de Th1 para Th2, reduzindo assim a estimulação de células T CD8⁺ (HAUT; ERTL, 2009). É possível ainda que AcN possam não ser a causa direta da maior aquisição de infecção, mas atuam promovendo aumentado estado de ativação celular, resultando em maiores taxas de infecção de células-alvo. Na tentativa de investigar possíveis fatores que possam interferir na resposta imune contra o transgene em presença de imunidade contra o vetor vacinal, os experimentos subsequentes utilizaram AdHu5 como vetor vacinal contra HIV-1.

Após imunização de dose única com AdHu5gag pela via i.m., foi observada diminuição da frequência de células T CD4⁺ e T CD8⁺ no TG feminino (Figura 20). Acredita-se que esta queda reflita o recrutamento destas populações celulares para sítios de inflamação induzidos no local de aplicação do vetor. Observou-se também que as frequências destas populações celulares retornaram aos valores normais mais rapidamente nos grupos imunizados com AdHu5gag na ausência de imunidade pré-existente contra o vetor. Pelo fato da resposta imune inata induzida pela administração de AdHu5gag na presença de AcN contra o vetor ser exacerbada em comparação à administração do vetor viral na ausência de resposta imune pré-existente (TATSIS et al., 2007b; MCEL RATH et al., 2008), é possível que sinais para migração de células T para sítios de inflamação sejam sustentados por períodos mais longos na presença de AcN contra o vetor. A queda nas frequências de células T CD4⁺ e CD8⁺ foi acompanhada por queda no número absoluto destas populações no TG, refletindo evasão de células para outros tecidos ao contrário de influxo de outros tipos celulares neste tecido. A expressão de marcadores em células residentes no TG também demonstrou ser influenciada por imunidade pré-existente. De forma geral, a análise fenotípica de células CD4⁺ e CD8⁺ de origem genital sugere que a imunização com AdHu5gag na presença de imunidade pré-existente contra o vetor retarda o início de ativação celular, mas uma vez que este processo é estabelecido, ocorre de maneira exacerbada, talvez devido à ação de processos inflamatórios ou de resposta imune adaptativa contra o vetor (VARNAVSKI et al., 2005).

Como também observado por Yang e colaboradores (YANG et al., 2003), houve declínio na frequência de células T CD8⁺ Gag-específicas na presença de imunidade pré-existente ao vetor AdHu5

(Figura 22). Entretanto, esta redução ocorre de forma distinta em diferentes tecidos ou após pré-exposição ao vetor viral por diferentes vias. É possível observar que na décima segunda semana após a imunização, o impacto da imunidade pré-existente é visto com mais clareza no sangue e TG para o grupo i.m./i.m., tecidos nos quais houve maior redução na frequência de células T CD8⁺ Gag-específicas. O grupo i.n./i.m., por sua vez, apresentou maior interferência da imunidade pré-existente no TG, sem alterações nas frequências de células T CD8⁺ Gag-específicas isoladas de sangue ou baço. Entretanto, ainda é necessário determinar se este fato é resultante de um processo distinto para indução de resposta imune celular nos tecidos analisados ou consequência dos diferentes títulos de anticorpos neutralizantes induzidos pelas distintas vias de pré-exposição ao vetor viral. Sítios mucosos e sangue contém células T CD8⁺ ativadas que expressam receptores de endereçamento para tecidos linfóides de forma diminuída, enquanto baço contém células T ativadas e quiescentes. O declínio pronunciado na frequência de células T CD8⁺ Gag-específicas observado em sangue e TG sugere que a imunidade pré-existente contra o vetor vacinal atua sobre células T efetoras, reduzindo sua taxa de diferenciação ou meia-vida, ou sobre células T destinadas à população de memória central, favorecendo sua indução em detrimento de células efetoras.

Também foi conduzida uma análise fenotípica das células T CD8⁺ Gag-específicas induzidas na presença de imunidade pré-existente contra o vetor vacinal. A distribuição dos marcadores celulares indica que a ativação celular neste grupo é retardada, mas não prejudicada (Figura 23). De fato, a maior expressão de marcadores de proliferação e enzima lítica, em relação ao grupo soronegativo no momento da imunização, demonstra que a ativação de células T CD8⁺ ocorre de forma mais pronunciada no grupo possuidor de imunidade adaptativa contra o vetor vacinal no momento da imunização. Esta ativação exacerbada pode ser indício de maior ativação geral do sistema imune, favorecendo a possível explicação de que, no caso de infecção por HIV, a administração do vetor vacinal em presença de pré-exposição induz inflamação e acaba por gerar ambiente propício para a disseminação viral.

De forma geral, a estimulação antigênica leva à diferenciação de células T *naïve* em células efetoras durante a fase aguda de infecções. Células destinadas à população de memória não são submetidas à ativação total; esta ocorre em células que atingem o local de inflamação no início da infecção e estão sujeitas à estimulação antigênica por

longos períodos (SARKAR et al., 2008). Estas células exibem perfil de total ativação e passam por vários ciclos de divisão, constituindo diferenciação terminal em fase efetora. Um estudo demonstrou que a alta expressão do marcador KLRG1 no início da fase efetora de células T CD8⁺ favorece o desenvolvimento de estágio efetor terminal, enquanto células com expressão intermediária ou ausência de KLRG1 são destinadas à população de memória (SARKAR et al., 2008). Apesar de não possuírem perfil total de ativação, esta população é efetora e apresenta aumento da expressão dos marcadores CD62L, granzima B e IFN- γ (SARKAR et al., 2008). Desta maneira, o período de recrutamento celular para o sítio de inflamação pode influenciar o destino celular. No presente estudo, foi observado que células do TG deixam este tecido após imunização i.m. (Figura 20). Coincidentemente, este tecido possui duas subpopulações que expressam a molécula KLRG1 de forma diferencial (Figura 21 e 23). No início da resposta imune, a maioria das células presentes no TG são KLRG1^{low}, progredindo para maior expressão deste marcador possivelmente conforme células retornam ao TG após recirculação. Apesar da maioria das células estar submetida à constante estimulação antigênica e potencial diferenciação em células efectoras terminais na décima segunda semana após vacinação, parte da população permanece KLRG1^{low} ou KLRG1^{int} no TG. Este fato pode explicar a grande contração da resposta imune observada no experimento de memória após administração de vetores adenovirais símios por via i.m., onde grande parte das células Gag-específicas morre e há estabelecimento de pequena população de memória. Nos LNI, foi observado somente o fenótipo KLRG1^{low} (Figura 23), favorecendo assim o desenvolvimento de memória nos linfonodos drenantes do TG e proporcionando reservatório celular que pode ser rapidamente recrutado mediante infecção. Assim, células induzidas na presença de imunidade pré-existente estão presentes em menor frequência e possuem ativação retardada, mas são submetidas aos processos normais de diferenciação em células efectoras e formação de populações de memória.

O ensaio de transferência adotiva de soro imune foi realizado para determinar o papel de AcN como o fator central da interferência na resposta imune induzida pelo vetor vacinal (Figura 24). Estes anticorpos parecem possuir o papel principal na interferência com o vetor vacinal observada em tecidos sistêmicos, mas exercem menor influência no TG. Desta maneira, conclui-se que a imunidade pré-existente ao vetor presente neste tecido mucoso é composta não somente por AcN, mas é

em grande parte mediada por mecanismos celulares direcionados contra antígenos da partícula viral. Inúmeras hipóteses foram levantadas na tentativa de explicar a ineficácia da vacina utilizada no ensaio STEP, como a indução de células T HIV-específicas com limitado repertório de especificidade ou células específicas com menor capacidade efetora ou proliferativa (NIAID, 2007). Entretanto, os resultados aqui descritos sugerem que a administração de AdHu5 em animais possuidores de imunidade pré-existente contra o vetor gera alteração nas populações de células T genitais sem resultar no aumento do número de células-alvo ou expressão aumentada de receptores e co-receptores para HIV.

Em resumo, os dados apresentados sugerem que imunização i.m. com vetor adenoviral símio replicante-defectivo induz resposta robusta de células T CD8⁺ transgene-específicas no TG de camundongos, e que esta resposta pode ser aumentada por administração de dose de reforço heterólogo por via i.m. A resposta é sustentada e pode ser detectada um ano após imunização. Células T CD8⁺ genitais induzidas por vacinação i.m. são funcionais, carregam enzimas líticas e secretam citocinas mediante estimulação com antígeno específico. Em conjunto, estes resultados sugerem que vacinas administradas por via i.m. podem induzir uma barreira contra infecção pelo HIV-1 no TG de indivíduos do sexo feminino. De fato, regimes sistêmicos são preferíveis à mucosos em seres humanos devido a fatores logísticos e ausência de interferência por flora ou ciclo menstrual, o que pode afetar profundamente a eficácia de vacinas.

6 CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou que a administração intramuscular de vetores adenovirais símios que expressam a proteína Gag de HIV-1, em protocolo de dose-reforço heterólogo, estimula resposta imune celular e humoral específicas no trato genital feminino de camundongos, sendo superior aos protocolos de imunização utilizando vias de mucosa. A via de imunização intramuscular induziu células T CD8⁺ Gag-específicas que permanecem no trato genital como células de memória efetora, representando um estágio de diferenciação distinto do observado em células provenientes de outros tecidos. Células de origem sistêmica possuem a capacidade de migrar e serem retidas no tecido mucoso, contrariando a visão tradicional da existência de um processo distinto de estimulação antigênica para a indução de resposta imune adaptativa em superfícies mucosas. A administração de vetores adenovirais por via intramuscular ou intranasal alterou a frequência e o fenótipo de células T CD4⁺ e CD8⁺ presentes no trato genital, enquanto a presença de imunidade contra o vetor vacinal influenciou a frequência e o processo de ativação de células T CD8⁺ transgene-específicas. Esta interferência é causada principalmente por anticorpos neutralizantes nos tecidos sistêmicos analisados, enquanto no trato genital este fenômeno é influenciado também por mecanismos celulares. Os resultados demonstrados sugerem que a administração de vetores adenovirais por via intramuscular é um procedimento adequado para a indução de resposta imune contra HIV no trato genital feminino, induzindo resposta imune de longa duração sem prover um microambiente favorável à infecção de células-alvo pelo vírus no tecido mucoso.

REFERÊNCIAS

- ABDOOL KARIM, Q.; SIBEKO, S.; BAXTER, C. Preventing HIV infection in women: a global health imperative. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50 Suppl 3, p. S122-129, 2010.
- ARSTILA, T. et al. Identical T cell clones are located within the mouse gut epithelium and lamina propia and circulate in the thoracic duct lymph. **Journal of Experimental Medicine**, v. 191, n. 5, p. 823-834, 2000.
- ARTHOS, J. et al. HIV-1 envelope protein binds to and signals through integrin alpha4beta7, the gut mucosal homing receptor for peripheral T cells. **Nature Immunology**, v. 9, n. 3, p. 301-309, 2008.
- ASANUMA, H. et al. Isolation and characterization of mouse nasal-associated lymphoid tissue. **Journal of Immunological Methods**, v. 202, n. 2, p. 123-131, 1997.
- BANGARI, D. S.; MITTAL, S. K. Development of nonhuman adenoviruses as vaccine vectors. **Vaccine**, v. 24, n. 7, p. 849-862, 2006.
- BARNETT, S. W. et al. Protection of macaques against vaginal SHIV challenge by systemic or mucosal and systemic vaccinations with HIV-envelope. **Aids**, v. 22, n. 3, p. 339-348, 2008.
- BAROUCH, D. H. et al. Reduction of simian-human immunodeficiency virus 89.6P viremia in rhesus monkeys by recombinant modified vaccinia virus Ankara vaccination. **Journal of Virology**, v. 75, n. 11, p. 5151-5158, 2001.
- BARRETINA, J. et al. Evaluation of the putative role of C-C chemokines as protective factors of HIV-1 infection in seronegative hemophiliacs exposed to contaminated hemoderivatives. **Transfusion**, v. 40, n. 4, p. 461-467, 2000.
- BARRETT, T. A. et al. Differential function of intestinal intraepithelial lymphocyte subsets. **Journal of Immunology**, v. 149, n. 4, p. 1124-1130, 1992.
- BELYAKOV, I. M.; BERZOFSKY, J. A. Immunobiology of mucosal HIV infection and the basis for development of a new generation of mucosal AIDS vaccines. **Immunity**, v. 20, n. 3, p. 247-253, 2004.

BELYAKOV, I. M. et al. Mucosal immunization with HIV-1 peptide vaccine induces mucosal and systemic cytotoxic T lymphocytes and protective immunity in mice against intrarectal recombinant HIV-vaccinia challenge. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**, v. 95, n. 4, p. 1709-1714, 1998.

BENAROCH, P. et al. HIV-1 assembly in macrophages. **Retrovirology**, v. 7, p. 29, 2010.

BENLAHRECH, A. et al. Adenovirus vector vaccination induces expansion of memory CD4 T cells with a mucosal homing phenotype that are readily susceptible to HIV-1. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**, v. 106, n. 47, p. 19940-19945, 2009.

BERMAN, P. W. et al. Human immunodeficiency virus type 1 challenge of chimpanzees immunized with recombinant envelope glycoprotein gp120. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**, v. 85, n. 14, p. 5200-5204, 1988.

BERZOFSKY, J. A.; AHLERS, J. D.; BELYAKOV, I. M. Strategies for designing and optimizing new generation vaccines. **Nature Reviews Immunology**, v. 1, n. 3, p. 209-219, 2001.

BHARDWAJ, N.; WALKER, B. D. Immunotherapy for AIDS virus infections: cautious optimism for cell-based vaccine. **Nature Medicine**, v. 9, n. 1, p. 13-14, 2003.

BRENCHLEY, J. M.; DOUEK, D. C. HIV infection and the gastrointestinal immune system. **Mucosal Immunology**, v. 1, n. 1, p. 23-30, 2008a.

BRENCHLEY, J. M.; DOUEK, D. C. The mucosal barrier and immune activation in HIV pathogenesis. **Current Opinions in HIV and AIDS**, v. 3, n. 3, p. 356-361, 2008b.

BUCHBINDER, S. P. et al. Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial. **Lancet**, v. 372, n. 9653, p. 1881-1893, 2008.

BURKE, S. A.; WEN, L.; KING, N. J. Routes of inoculation and the immune response to a resolving genital flavivirus infection in a novel murine model. **Immunology and Cell Biology**, v. 82, n. 2, p. 174-183, 2004.

CATANZARO, A. T. et al. Phase 1 safety and immunogenicity evaluation of a multiclade HIV-1 candidate vaccine delivered by a replication-defective recombinant adenovirus vector. **Journal of Infectious Diseases**, v. 194, n. 12, p. 1638-1649, 2006.

CHIRMULE, N. et al. Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans. **Gene Therapy**, v. 6, n. 9, p. 1574-1583, 1999.

CICALA, C. et al. The integrin alpha4beta7 forms a complex with cell-surface CD4 and defines a T-cell subset that is highly susceptible to infection by HIV-1. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**, v. 106, n. 49, p. 20877-20882, 2009.

COHEN, J. Public health. AIDS vaccine trial produces disappointment and confusion. **Science**, v. 299, n. 5611, p. 1290-1291, 2003.

COIRAS, M. et al. Understanding HIV-1 latency provides clues for the eradication of long-term reservoirs. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 11, p. 798-812, 2009.

CRAWFORD-MIKSZA, L.; SCHNURR, D. P. Analysis of 15 adenovirus hexon proteins reveals the location and structure of seven hypervariable regions containing serotype-specific residues. **Journal of Virology**, v. 70, n. 3, p. 1836-1844, 1996.

DAVISON, A. J.; BENKO, M.; HARRACH, B. Genetic content and evolution of adenoviruses. **Journal of General Virology**, v. 84, n. Pt 11, p. 2895-2908, 2003.

DE SOUZA, A. P. et al. Genital CD8+ T cell response to HIV-1 gag in mice immunized by mucosal routes with a recombinant simian adenovirus. **Vaccine**, v. 25, n. 1, p. 109-116, 2007.

DE WITTE, L. et al. Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells. **Nature Medicine**, v. 13, n. 3, p. 367-371, 2007.

DEMBERG, T. et al. Sequential priming with simian immunodeficiency virus (SIV) DNA vaccines, with or without encoded cytokines, and a replicating adenovirus-SIV recombinant followed by protein boosting does not control a pathogenic SIVmac251 mucosal challenge. **Journal of Virology**, v. 82, n. 21, p. 10911-10921, 2008.

DOE, B.; WALKER, C. M. HIV-1 p24 Gag-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in mice. **Aids**, v. 10, n. 7, p. 793-794, 1996.

DOUEK, D. C.; PICKER, L. J.; KOUP, R. A. T cell dynamics in HIV-1 infection. **Annual Review of Immunology**, v. 21, p. 265-304, 2003.

DUNACHIE, S. J.; HILL, A. V. Prime-boost strategies for malaria vaccine development. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. Pt 21, p. 3771-3779, 2003.

ERSCHING, J. et al. Neutralizing antibodies to human and simian adenoviruses in humans and New-World monkeys. **Virology**, 2010.

FALKENSAMMER, B. et al. Role of complement and antibodies in controlling infection with pathogenic simian immunodeficiency virus (SIV) in macaques vaccinated with replication-deficient viral vectors. **Retrovirology**, v. 6, p. 60, 2009.

FARINA, S. F. et al. Replication-defective vector based on a chimpanzee adenovirus. **Journal of Virology**, v. 75, n. 23, p. 11603-11613, 2001.

FEINBERG, M. B.; MOORE, J. P. AIDS vaccine models: challenging challenge viruses. **Nature Medicine**, v. 8, n. 3, p. 207-210, 2002.

FITZGERALD, J. C. et al. A simian replication-defective adenoviral recombinant vaccine to HIV-1 gag. **Journal of Immunology**, v. 170, n. 3, p. 1416-1422, 2003.

FOWKE, K. R. et al. Resistance to HIV-1 infection among persistently seronegative prostitutes in Nairobi, Kenya. **Lancet**, v. 348, n. 9038, p. 1347-1351, 1996.

FREED, E. O. HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. **Virology**, v. 251, n. 1, p. 1-15, 1998.

GEIJTENBEEK, T. B. et al. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. **Cell**, v. 100, n. 5, p. 587-597, 2000.

GIRARD, M.; HABEL, A.; CHANEL, C. New prospects for the development of a vaccine against human immunodeficiency virus type 1. An overview. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie**, v. 322, n. 11, p. 959-966, 1999.

GOH, W. C. et al. Protection against human immunodeficiency virus type 1 infection in persons with repeated exposure: evidence for T cell immunity in the absence of inherited CCR5 coreceptor defects. **Journal of Infectious Diseases**, v. 179, n. 3, p. 548-557, 1999.

- GUNTAKA, R. V. Transcription termination and polyadenylation in retroviruses. **Microbiological Reviews**, v. 57, n. 3, p. 511-521, 1993.
- GUPTA, S. et al. Characterization of human immunodeficiency virus Gag-specific gamma interferon-expressing cells following protective mucosal immunization with alphavirus replicon particles. **Journal of Virology**, v. 79, n. 11, p. 7135-7145, 2005.
- HAGLUND, K. et al. High-level primary CD8(+) T-cell response to human immunodeficiency virus type 1 gag and env generated by vaccination with recombinant vesicular stomatitis viruses. **Journal of Virology**, v. 76, n. 6, p. 2730-2738, 2002.
- HARTLEY, O. et al. V3: HIV's switch-hitter. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 21, n. 2, p. 171-189, 2005.
- HAUT, L. H.; ERTL, H. C. Obstacles to the successful development of an efficacious T cell-inducing HIV-1 vaccine. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 86, n. 4, p. 779-793, 2009.
- HAWKINS, R. A.; RANK, R. G.; KELLY, K. A. Expression of mucosal homing receptor alpha4beta7 is associated with enhanced migration to the Chlamydia-infected murine genital mucosa in vivo. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 10, p. 5587-5594, 2000.
- HAYDAY, A. et al. Intraepithelial lymphocytes: exploring the Third Way in immunology. **Nature Immunology**, v. 2, n. 11, p. 997-1003, 2001.
- HENSLEY, S. E. et al. Dendritic cell maturation, but not CD8+ T cell induction, is dependent on type I IFN signaling during vaccination with adenovirus vectors. **Journal of Immunology**, v. 175, n. 9, p. 6032-6041, 2005.
- HERITAGE, P. L. et al. Comparison of murine nasal-associated lymphoid tissue and Peyer's patches. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 156, n. 4 Pt 1, p. 1256-1262, 1997.
- HIDAJAT, R. et al. Correlation of vaccine-elicited systemic and mucosal nonneutralizing antibody activities with reduced acute viremia following intrarectal simian immunodeficiency virus SIVmac251 challenge of rhesus macaques. **Journal of Virology**, v. 83, n. 2, p. 791-801, 2009.
- HLADIK, F.; MCEL RATH, M. J. Setting the stage: host invasion by HIV. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 6, p. 447-457, 2008.

HOLMGREN, J.; CZERKINSKY, C. Mucosal immunity and vaccines. **Nature Medicine**, v. 11, n. 4 Suppl, p. S45-53, 2005.

HOXIE, J. A. Toward an antibody-based HIV-1 vaccine. **Annual Reviews of Medicine**, v. 61, p. 135-152, 2010.

HU, J.; GARDNER, M. B.; MILLER, C. J. Simian immunodeficiency virus rapidly penetrates the cervicovaginal mucosa after intravaginal inoculation and infects intraepithelial dendritic cells. **Journal of Virology**, v. 74, n. 13, p. 6087-6095, 2000.

JACQUE, J. M.; STEVENSON, M. The inner-nuclear-envelope protein emerin regulates HIV-1 infectivity. **Nature**, v. 441, n. 7093, p. 641-645, 2006.

JIANG, J. Q. et al. CD8+ T-cell-mediated cross-clade protection in the genital tract following intranasal immunization with inactivated human immunodeficiency virus antigen plus CpG oligodeoxynucleotides. **Journal of Virology**, v. 79, n. 1, p. 393-400, 2005.

JOHANSSON, M.; LYCKE, N. A unique population of extrathymically derived alpha beta TCR+CD4-CD8- T cells with regulatory functions dominates the mouse female genital tract. **Journal of Immunology**, v. 170, n. 4, p. 1659-1666, 2003.

KLEIN, J. R. T-cell activation in the curious world of the intestinal intraepithelial lymphocyte. **Immunologic Research**, v. 30, n. 3, p. 327-337, 2004.

KOBAYASHI, A. et al. Lymphoid follicles are generated in high-grade cervical dysplasia and have differing characteristics depending on HIV status. **American Journal of Pathology**, v. 160, n. 1, p. 151-164, 2002.

KOMNINAKIS, S. et al. Techniques used to identify the Brazilian variant of HIV-1 subtype B. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, n. 3, p. 301-304, 2007.

KOZLOWSKI, P. A.; NEUTRA, M. R. The role of mucosal immunity in prevention of HIV transmission. **Current Molecular Medicine**, v. 3, n. 3, p. 217-228, 2003.

KUHN, L. et al. T-helper cell responses to HIV envelope peptides in cord blood: protection against intrapartum and breast-feeding transmission. **Aids**, v. 15, n. 1, p. 1-9, 2001.

- KUO, S. et al. Differential appearance of T cell subsets in the large and small intestine of neonatal mice. **Pediatric Research**, v. 49, n. 4, p. 543-551, 2001.
- KWANT, A.; ROSENTHAL, K. L. Intravaginal immunization with viral subunit protein plus CpG oligodeoxynucleotides induces protective immunity against HSV-2. **Vaccine**, v. 22, n. 23-24, p. 3098-3104, 2004.
- LANZA, S. R. et al. Simian recombinant adenovirus delivered by the mucosal route modulates gammadelta T cells from murine genital tract. **Vaccine**, v. 28, n. 29, p. 4600-4608, 2010.
- LASARO, M. O.; ERTL, H. C. New insights on adenovirus as vaccine vectors. **Molecular Therapy**, v. 17, n. 8, p. 1333-1339, 2009.
- LEFRANCOIS, L. et al. Migration of primary and memory CD8 T cells. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 512, p. 141-146, 2002.
- LEOPOLD, P. L.; CRYSTAL, R. G. Intracellular trafficking of adenovirus: many means to many ends. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 8, p. 810-821, 2007.
- LETVIN, N. L. Progress toward an HIV vaccine. **Annual Reviews of Medicine**, v. 56, p. 213-223, 2005.
- LI, S. et al. Priming with recombinant influenza virus followed by administration of recombinant vaccinia virus induces CD8+ T-cell-mediated protective immunity against malaria. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**, v. 90, n. 11, p. 5214-5218, 1993.
- LIU, J. et al. Magnitude and phenotype of cellular immune responses elicited by recombinant adenovirus vectors and heterologous prime-boost regimens in rhesus monkeys. **Journal of Virology**, v. 82, n. 10, p. 4844-4852, 2008.
- LIU, L. et al. Advances in viral-vector systemic cytokine gene therapy against cancer. **Vaccine**, v. 28, n. 23, p. 3883-3887, 2010.
- LLANO, M. et al. An essential role for LEDGF/p75 in HIV integration. **Science**, v. 314, n. 5798, p. 461-464, 2006.
- MAKEDONAS, G. et al. HIV-specific CD8 T-cell activity in uninfected injection drug users is associated with maintenance of seronegativity. **Aids**, v. 16, n. 12, p. 1595-1602, 2002.

MANRIQUE, M. et al. Nasal DNA-MVA SIV vaccination provides more significant protection from progression to AIDS than a similar intramuscular vaccination. **Mucosal Immunology**, v. 2, n. 6, p. 536-550, 2009.

MANRIQUE, M. et al. DNA-MVA vaccine protection after X4 SHIV challenge in macaques correlates with day-of-challenge antiviral CD4+ cell-mediated immunity levels and postchallenge preservation of CD4+ T cell memory. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 24, n. 3, p. 505-519, 2008.

MARMOR, M. et al. Resistance to HIV infection. **Journal of Urban Health**, v. 83, n. 1, p. 5-17, 2006.

MARTINEZ-PICADO, J. et al. Antiretroviral resistance during successful therapy of HIV type 1 infection. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**, v. 97, n. 20, p. 10948-10953, 2000.

MARTINON, F. et al. Improved protection against simian immunodeficiency virus mucosal challenge in macaques primed with a DNA vaccine and boosted with the recombinant modified vaccinia virus Ankara and recombinant Semliki Forest virus. **Vaccine**, v. 26, n. 4, p. 532-545, 2008.

MASCOLA, J. R.; MONTEFIORI, D. C. The role of antibodies in HIV vaccines. **Annual Reviews of Immunology**, v. 28, p. 413-444, 2010.

MASOPUST, D. et al. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. **Science**, v. 291, n. 5512, p. 2413-2417, 2001.

MCCOY, K. et al. Effect of preexisting immunity to adenovirus human serotype 5 antigens on the immune responses of nonhuman primates to vaccine regimens based on human- or chimpanzee-derived adenovirus vectors. **Journal of Virology**, v. 81, n. 12, p. 6594-6604, 2007.

MCELRATH, M. J. et al. HIV-1 vaccine-induced immunity in the test-of-concept Step Study: a case-cohort analysis. **Lancet**, v. 372, n. 9653, p. 1894-1905, 2008.

MERCIER, S. et al. Specific antibodies modulate the interactions of adenovirus type 5 with dendritic cells. **Virology**, v. 322, n. 2, p. 308-317, 2004.

MESTECKY, J.; RUSSELL, M. W. Induction of mucosal immune responses in the human genital tract. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 27, n. 4, p. 351-355, 2000.

MILLIGAN, G. N. et al. Efficacy of genital T cell responses to herpes simplex virus type 2 resulting from immunization of the nasal mucosa. **Virology**, v. 318, n. 2, p. 507-515, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico AIDS 2009 Disponível em <http://www.aids.gov.br>. Acesso em 17 de agosto de 2010 2009.

MITCHELL, R. S. et al. Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences. **PLoS Biology**, v. 2, n. 8, p. E234, 2004.

MOFENSON, L. M. Prevention in neglected subpopulations: prevention of mother-to-child transmission of HIV infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50 Suppl 3, p. S130-148, 2010.

MOSIER, D. E. How HIV changes its tropism: evolution and adaptation? **Current Opinions in HIV and AIDS**, v. 4, n. 2, p. 125-130, 2009.

MUDHAKIR, D.; HARASHIMA, H. Learning from the viral journey: how to enter cells and how to overcome intracellular barriers to reach the nucleus. **American Association of Pharmaceutical Scientists Journal**, v. 11, n. 1, p. 65-77, 2009.

NASU, K.; NARAHARA, H. Pattern recognition via the toll-like receptor system in the human female genital tract. **Mediators of Inflammation**, v. 2010, p. 976024, 2010.

NAYAK, S.; HERZOG, R. W. Progress and prospects: immune responses to viral vectors. **Gene Therapy**, v. 17, n. 3, p. 295-304, 2010.

NIAID. An update concerning the HVTN 503/Phambili HIV vaccine study. v. Disponível em <http://www.niaid.nih.gov>, 2007.

NORRIS, P. J.; ROSENBERG, E. S. Cellular immune response to human immunodeficiency virus. **Aids**, v. 15 Suppl 2, p. S16-21, 2001.

PANTALEO, G.; FAUCI, A. S. New concepts in the immunopathogenesis of HIV infection. **Annual Reviews of Immunology**, v. 13, p. 487-512, 1995.

PARKS, R. J. Adenovirus protein IX: a new look at an old protein. **Molecular Therapy**, v. 11, n. 1, p. 19-25, 2005.

PHILLIPS, D. M. et al. Mechanism of monocyte-macrophage-mediated transmission of HIV. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 14 Suppl 1, p. S67-70, 1998.

PICHLA-GOLLON, S. L. et al. Structure-based identification of a major neutralizing site in an adenovirus hexon. **Journal of Virology**, v. 81, n. 4, p. 1680-1689, 2007.

PINTO, A. R.; ERTL, H. C. Genetically modified adenoviruses as recombinant vaccines. **Current Topics in Virology**, p. 269-284, 2002.

PINTO, A. R. et al. Induction of CD8+ T cells to an HIV-1 antigen upon oral immunization of mice with a simian E1-deleted adenoviral vector. **Vaccine**, v. 22, n. 5-6, p. 697-703, 2004.

PINTO, A. R. et al. Induction of CD8+ T cells to an HIV-1 antigen through a prime boost regimen with heterologous E1-deleted adenoviral vaccine carriers. **Journal of Immunology**, v. 171, n. 12, p. 6774-6779, 2003.

PINTO, L. A. et al. ENV-specific cytotoxic T lymphocyte responses in HIV seronegative health care workers occupationally exposed to HIV-contaminated body fluids. **Journal of Clinical Investigation**, v. 96, n. 2, p. 867-876, 1995.

POPE, M.; HAASE, A. T. Transmission, acute HIV-1 infection and the quest for strategies to prevent infection. **Nature Medicine**, v. 9, n. 7, p. 847-852, 2003.

PORGADOR, A. et al. Intranasal immunization with CTL epitope peptides from HIV-1 or ovalbumin and the mucosal adjuvant cholera toxin induces peptide-specific CTLs and protection against tumor development in vivo. **Journal of Immunology**, v. 158, n. 2, p. 834-841, 1997.

PRIDDY, F. H. et al. Safety and immunogenicity of a replication-incompetent adenovirus type 5 HIV-1 clade B gag/pol/nef vaccine in healthy adults. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 11, p. 1769-1781, 2008.

RAMBAUT, A. et al. The causes and consequences of HIV evolution. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, n. 1, p. 52-61, 2004.

- RAMIREZ DE ARELLANO, E.; SORIANO, V.; HOLGUIN, A. Regulation of transcription in different HIV-1 subtypes. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 23, n. 3, p. 156-162, 2005.
- RERKS-NGARM, S. et al. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 23, p. 2209-2220, 2009.
- REYES-SANDOVAL, A. et al. Human immunodeficiency virus type 1-specific immune responses in primates upon sequential immunization with adenoviral vaccine carriers of human and simian serotypes. **Journal of Virology**, v. 78, n. 14, p. 7392-7399, 2004.
- ROBERTS, D. M. et al. Hexon-chimaeric adenovirus serotype 5 vectors circumvent pre-existing anti-vector immunity. **Nature**, v. 441, n. 7090, p. 239-243, 2006.
- ROSENBERG, E. S. et al. Immune control of HIV-1 after early treatment of acute infection. **Nature**, v. 407, n. 6803, p. 523-526, 2000.
- ROY, S. et al. Characterization of a family of chimpanzee adenoviruses and development of molecular clones for gene transfer vectors. **Human Gene Therapy**, v. 15, n. 5, p. 519-530, 2004.
- RUPRECHT, R. M. et al. Protection of neonatal macaques against experimental SHIV infection by human neutralizing monoclonal antibodies. **Transfusion Clinique et Biologique**, v. 8, n. 4, p. 350-358, 2001.
- RUSSELL, M. W. Immunization for protection of the reproductive tract: a review. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 47, n. 5, p. 265-268, 2002.
- RUX, J. J.; KUSER, P. R.; BURNETT, R. M. Structural and phylogenetic analysis of adenovirus hexons by use of high-resolution x-ray crystallographic, molecular modeling, and sequence-based methods. **Journal of Virology**, v. 77, n. 17, p. 9553-9566, 2003.
- SAIDI, H. et al. R5- and X4-HIV-1 use differentially the endometrial epithelial cells HEC-1A to ensure their own spread: implication for mechanisms of sexual transmission. **Virology**, v. 358, n. 1, p. 55-68, 2007.
- SANKARAN, S. et al. Gut mucosal T cell responses and gene expression correlate with protection against disease in long-term HIV-1-

infected nonprogressors. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**, v. 102, n. 28, p. 9860-9865, 2005.

SARKAR, S. et al. Functional and genomic profiling of effector CD8 T cell subsets with distinct memory fates. **Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 3, p. 625-640, 2008.

SCHROEDER, H. W., JR.; CAVACINI, L. Structure and function of immunoglobulins. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2 Suppl 2, p. S41-52, 2010.

SHACKLETT, B. L. Cell-mediated immunity to HIV in the female reproductive tract. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 83, n. 1-2, p. 190-195, 2009.

SHIVER, J. W.; EMINI, E. A. Recent advances in the development of HIV-1 vaccines using replication-incompetent adenovirus vectors. **Annual Reviews of Medicine**, v. 55, p. 355-372, 2004.

SHIVER, J. W. et al. Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity. **Nature**, v. 415, n. 6869, p. 331-335, 2002.

SILVESTRI, G. AIDS pathogenesis: a tale of two monkeys. **Journal of Medical Primatology**, v. 37 Suppl 2, p. 6-12, 2008.

SLEASMAN, J. W.; GOODENOW, M. M. 13. HIV-1 infection. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, n. 2 Suppl, p. S582-592, 2003.

SOUZA, A. P. et al. Recombinant viruses as vaccines against viral diseases. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 4, p. 509-522, 2005.

STAHL-HENNIG, C. et al. Rapid infection of oral mucosal-associated lymphoid tissue with simian immunodeficiency virus. **Science**, v. 285, n. 5431, p. 1261-1265, 1999.

STEVCEVA, L. et al. Cervicovaginal lamina propria lymphocytes: phenotypic characterization and their importance in cytotoxic T-lymphocyte responses to simian immunodeficiency virus SIVmac251. **Journal of Virology**, v. 76, n. 1, p. 9-18, 2002.

STOLTE-LEEB, N. et al. Better protective effects in rhesus macaques by combining systemic and mucosal application of a dual component

- vector vaccine after rectal SHIV89.6P challenge compared to systemic vaccination alone. **Viral Immunology**, v. 21, n. 2, p. 235-246, 2008.
- SUMIDA, S. M. et al. Neutralizing antibodies to adenovirus serotype 5 vaccine vectors are directed primarily against the adenovirus hexon protein. **Journal of Immunology**, v. 174, n. 11, p. 7179-7185, 2005.
- SUVAS, P. K. et al. Systemic and mucosal infection program protective memory CD8 T cells in the vaginal mucosa. **Journal of Immunology**, v. 179, n. 12, p. 8122-8127, 2007.
- TATSIS, N. et al. A CD46-binding chimpanzee adenovirus vector as a vaccine carrier. **Molecular Therapy**, v. 15, n. 3, p. 608-617, 2007a.
- TATSIS, N.; ERTL, H. C. Adenoviruses as vaccine vectors. **Molecular Therapy**, v. 10, n. 4, p. 616-629, 2004.
- TATSIS, N. et al. Adenoviral vectors persist in vivo and maintain activated CD8+ T cells: implications for their use as vaccines. **Blood**, v. 110, n. 6, p. 1916-1923, 2007b.
- TATSIS, N. et al. Adenovirus vector-induced immune responses in nonhuman primates: responses to prime boost regimens. **Journal of Immunology**, v. 182, n. 10, p. 6587-6599, 2009.
- THORNER, A. R. et al. Immunogenicity of heterologous recombinant adenovirus prime-boost vaccine regimens is enhanced by circumventing vector cross-reactivity. **Journal of Virology**, v. 80, n. 24, p. 12009-12016, 2006.
- TOP, F. H., JR. et al. Immunization with live types 7 and 4 adenovirus vaccines. II. Antibody response and protective effect against acute respiratory disease due to adenovirus type 7. **Journal of Infectious Diseases**, v. 124, n. 2, p. 155-160, 1971.
- UBERLA, K. HIV vaccine development in the aftermath of the STEP study: re-focus on occult HIV infection? **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 8, p. e1000114, 2008.
- UNAIDS. AIDS epidemic update 2009. v. Disponível em <http://www.unaids.org>. Acesso em 27 de setembro de 2010, 2009.
- VAGENAS, P. et al. Tonsillar application of AT-2 SIV affords partial protection against rectal challenge with SIVmac239. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 52, n. 4, p. 433-442, 2009.

VARNAVSKI, A. N. et al. Evaluation of toxicity from high-dose systemic administration of recombinant adenovirus vector in vector-naïve and pre-immunized mice. **Gene Therapy**, v. 12, n. 5, p. 427-436, 2005.

VEAZEY, R. S. et al. Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection. **Science**, v. 280, n. 5362, p. 427-431, 1998.

VIIALA, N. O.; LARSEN, S. R.; RASKO, J. E. Gene therapy for hemophilia: clinical trials and technical tribulations. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 35, n. 1, p. 81-92, 2009.

VOGELS, R. et al. Replication-deficient human adenovirus type 35 vectors for gene transfer and vaccination: efficient human cell infection and bypass of preexisting adenovirus immunity. **Journal of Virology**, v. 77, n. 15, p. 8263-8271, 2003.

WAGNER, R. et al. Molecular and functional analysis of a conserved CTL epitope in HIV-1 p24 recognized from a long-term nonprogressor: constraints on immune escape associated with targeting a sequence essential for viral replication. **Journal of Immunology**, v. 162, n. 6, p. 3727-3734, 1999.

WALKER, B. D.; BURTON, D. R. Toward an AIDS vaccine. **Science**, v. 320, n. 5877, p. 760-764, 2008.

WANG, Y. et al. Mucosal immunization in macaques upregulates the innate APOBEC 3G anti-viral factor in CD4(+) memory T cells. **Vaccine**, v. 27, n. 6, p. 870-881, 2009.

WARRILOW, D.; TACHEDJIAN, G.; HARRICH, D. Maturation of the HIV reverse transcription complex: putting the jigsaw together. **Reviews in Medical Virology**, v. 19, n. 6, p. 324-337, 2009.

WHITE, H. D. et al. CD3+ CD8+ CTL activity within the human female reproductive tract: influence of stage of the menstrual cycle and menopause. **Journal of Immunology**, v. 158, n. 6, p. 3017-3027, 1997.

WIRA, C. R.; FAHEY, J. V. A new strategy to understand how HIV infects women: identification of a window of vulnerability during the menstrual cycle. **Aids**, v. 22, n. 15, p. 1909-1917, 2008.

WIRA, C. R. et al. Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions. **Immunology Reviews**, v. 206, p. 306-335, 2005.

- WU, H. et al. RSV fusion (F) protein DNA vaccine provides partial protection against viral infection. **Virus Research**, v. 145, n. 1, p. 39-47, 2009.
- WYATT, R.; SODROSKI, J. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. **Science**, v. 280, n. 5371, p. 1884-1888, 1998.
- XIANG, Z. et al. Novel, chimpanzee serotype 68-based adenoviral vaccine carrier for induction of antibodies to a transgene product. **Journal of Virology**, v. 76, n. 6, p. 2667-2675, 2002.
- XIANG, Z. et al. Mucosally delivered E1-deleted adenoviral vaccine carriers induce transgene product-specific antibody responses in neonatal mice. **Journal of Immunology**, v. 171, n. 8, p. 4287-4293, 2003.
- YANG, Z. Y. et al. Overcoming immunity to a viral vaccine by DNA priming before vector boosting. **J Virol**, v. 77, n. 1, p. 799-803, 2003.
- YEAMAN, G. R. et al. Human immunodeficiency virus receptor and coreceptor expression on human uterine epithelial cells: regulation of expression during the menstrual cycle and implications for human immunodeficiency virus infection. **Immunology**, v. 109, n. 1, p. 137-146, 2003.
- YOSHIZAWA, I. et al. Studies on the generation and maintenance of mucosal cytotoxic T lymphocytes against human immunodeficiency virus type 1 Gag in mice. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 19, n. 6, p. 469-479, 2003.
- YU, S. et al. Potent specific immune responses induced by prime-boost-boost strategies based on DNA, adenovirus, and Sendai virus vectors expressing gag gene of Chinese HIV-1 subtype B. **Vaccine**, v. 26, n. 48, p. 6124-6131, 2008.
- ZAISS, A. K. et al. Antiviral antibodies target adenovirus to phagolysosomes and amplify the innate immune response. **Journal of Immunology**, v. 182, n. 11, p. 7058-7068, 2009.
- ZHANG, Y. et al. Acute cytokine response to systemic adenoviral vectors in mice is mediated by dendritic cells and macrophages. **Molecular Therapy**, v. 3, n. 5 Pt 1, p. 697-707, 2001.

ZHOU, D. et al. A chimpanzee-origin adenovirus vector expressing the rabies virus glycoprotein as an oral vaccine against inhalation infection with rabies virus. **Molecular Therapy**, v. 14, n. 5, p. 662-672, 2006.

ZHOU, Q. et al. Comparative evaluation of oral and intranasal priming with replication-competent adenovirus 5 host range mutant (Ad5hr)-simian immunodeficiency virus (SIV) recombinant vaccines on immunogenicity and protective efficacy against SIV(mac251). **Vaccine**, v. 25, n. 47, p. 8021-8035, 2007.

ZIELLO, J. E.; HUANG, Y.; JOVIN, I. S. Cellular endocytosis and gene delivery. **Molecular Medicine**, v. 16, n. 5-6, p. 222-229, 2010.

APÊNDICE A – Painéis de anticorpos utilizados na avaliação do fenótipo de células provenientes de animais imunizados com vetores adenovirais por vias de mucosa

Painel	Marcador	Fluorocromo	Tipo de marcação	Fabricante
1	Tetrâmero CD8 CD127 CD44	APC PerCP PE FITC	superfície superfície superfície superfície	NIH BD Pharmingen eBioscience BD Pharmingen
2	Tetrâmero CD8 CD27 CD62L	APC PerCP PE FITC	superfície superfície superfície superfície	NIH BD Pharmingen BD Pharmingen BD Pharmingen
3	Tetrâmero CD8 $\alpha_4\beta_7$ CD69	APC PerCP PE FITC	superfície superfície superfície superfície	NIH BD Pharmingen BD Pharmingen BD Pharmingen

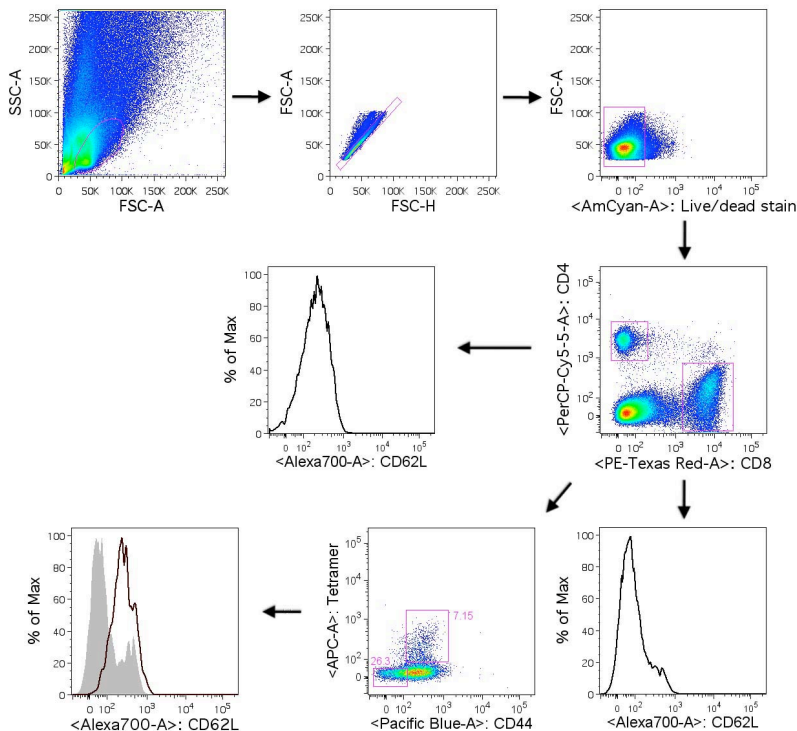
APÊNDICE B – Painéis de anticorpos utilizados na avaliação do fenótipo de células provenientes de animais imunizados com vetores adenovirais símios por via i.m.

Painel	Marcador	Fluorocromo	Tipo de marcação	Fabricante
1	Corante Aqua Tetrâmero CD8 CD44 NKG2D CD62L CD27 CD103	AmCyan APC PerCP Cy-5.5 Azul pacífico PE-Cy7 Alexa 700 PE FITC	intracelular superfície superfície superfície superfície superfície superfície	Invitrogen NIH BD Pharmingen BioLegend eBioscience Biolegend BD Pharmingen BD Pharmingen
2	Corante Aqua Tetrâmero CD8 CD44 PD-1 Granzima B Ki-67	AmCyan APC PerCP Cy-5.5 Azul pacífico PE-Cy7 PE FITC	intracelular superfície superfície superfície superfície intracelular intracelular	Invitrogen NIH BD Pharmingen BioLegend BioLegend eBioscience BD Pharmingen
3	Corante Aqua Tetrâmero CD8 CD44 CD127 Perforin CTLA-4	AmCyan APC PerCP Cy-5.5 Azul pacífico Alexa 700 PE FITC	Intracelular superfície superfície superfície superfície intracelular intracelular	Invitrogen NIH BD Pharmingen BioLegend eBioscience eBioscience AbCam

APÊNDICE C – Painéis de anticorpos utilizados na avaliação do fenótipo de células provenientes de animais imunizados com AdHu5gag por via i.m.

Painel	Marcador	Fluorocromo	Tipo de marcação	Fabricante
1	Corante Aqua	AmCyan	intracelular	Invitrogen
	Tetrâmero	APC	superfície	NIH
	CD8	Vermelho Texas	superfície	Invitrogen
	CD4	PerCP Cy-5.5	superfície	BD Pharmingen
	CD44	Azul pacífico	superfície	BioLegend
	CD62L	Alexa 700	superfície	BioLegend
	CD69	PE-Cy7	superfície	eBioscience
	CCR5	PE	superfície	BD Pharmingen
CD103	FITC	superfície	BD Pharmingen	
2	Corante Aqua	AmCyan	intracelular	Invitrogen
	Tetrâmero	APC	superfície	NIH
	CD8	Vermelho Texas	superfície	Invitrogen
	CD4	PerCP Cy-5.5	superfície	BD Pharmingen
	CD44	Azul pacífico	superfície	BioLegend
	CD127	Alexa 700	superfície	eBioscience
	NKG2D	PE-Cy7	superfície	eBioscience
	Granzima B	PE	intracelular	eBioscience
Ki-67	FITC	intracelular	BD Pharmingen	
3	Corante Aqua	AmCyan	intracelular	Invitrogen
	Tetrâmero	APC	superfície	NIH
	CD8	Vermelho Texas	superfície	Invitrogen
	CD4	PerCP Cy-5.5	superfície	BD Pharmingen
	CD44	Azul pacífico	superfície	BioLegend
	CD86	Alexa 700	superfície	BioLegend
	PD-1	PE-Cy7	superfície	BioLegend
	KLRG1	PE	superfície	Southern Biotech
CTLA-4	FITC	intracelular	AbCam	

APÊNDICE D – Esquema da estratégia de análise utilizada na avaliação da expressão de marcadores em células T CD8⁺ Gag-específicas



Esta figura representa a seleção de populações celulares em amostras provenientes do TG feminino de camundongos BALB/c imunizados com AdHu5gag por via i.m. na ausência de imunidade pré-existente contra o vetor vacinal. Células foram selecionadas de acordo com a dispersão frontal (FSC) e lateral (SSC) de luz (tamanho e complexidade celular, respectivamente) e selecionadas para a população de células únicas em suspensão, excluída de agregados celulares (FSC-A x FSC-H). Em seguida, células positivas para corante Aqua (fluorocromo AmCyan) foram excluídas, resultando em população de células vivas, sendo então selecionadas para populações CD4⁺ (PerCP-Cy-5.5) e CD8⁺ (PE-Vermelho Texas [*Texas Red*]). A frequência de células CD8⁺ Gag-específicas foi avaliada através de seleção da população tetramero⁺CD8⁺ (APC⁺ PE- Vermelho Texas [*Texas Red*]), CD44^{hi} (Azul Pacífico (Pacific Blue)). Células tetramero⁻CD8⁺CD44^{low} provenientes de animais *naïve* foram utilizadas como base de comparação dos níveis de expressão dos diferentes marcadores. Em todos os experimentos, células tetramero⁻CD8⁺CD44^{low} derivadas de animais imunizados foram analisadas e

seus fenótipos espelharam os observados em animais *naïve*. Populações totais de células CD4⁺ ou CD8⁺, bem como células tetrâmero⁺CD8⁺, foram avaliadas para diferentes marcadores celulares mediante a construção de histogramas, representando porcentagem da contagem máxima de células para cada amostra (como exemplo, é demonstrada a expressão do marcador CD62L no canal Alexa700).

PUBLICAÇÃO A – HAUT, L. H.; ERTL, H. C. Obstacles to the successful development of an efficacious T cell-inducing HIV-1 vaccine. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 86, n. 4, p. 779-793, 2009.

Tipo de artigo: Revisão. Artigo publicado em 13 de julho de 2009.

Obstacles to the successful development of an efficacious T cell-inducing HIV-1 vaccine

Larissa Herkenhoff Haut*[†] and Hildegund C. J. Ertl*[†]

*Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil; and [†]Wistar Institute, Philadelphia, Pennsylvania, USA

RECEIVED FEBRUARY 20, 2009; REVISED MAY 19, 2009; ACCEPTED MAY 21, 2009. doi: 10.1189/jlb.0209094

ABSTRACT

An efficacious vaccine to HIV-1 is direly needed to stem the global pandemic. Immunogens that elicit broadly cross-neutralizing antibodies to HIV-1 remain elusive, and thus, most HIV-1 vaccine efforts are focusing on induction of T cells. The notion that T cells can mediate protection against HIV-1 has been called into question by the failure of the STEP trial, which was designed to test this concept by the use of an E1-deleted Ad vaccine carrier. Lack of efficacy of the STEP trial vaccine underscores our limited knowledge about correlates of immune protection against HIV-1 and stresses the need for an enhanced commitment to basic research, including preclinical and clinical vaccine studies. In this review, we discuss known correlates of protection against HIV-1 and different vaccine strategies that have been or are being explored to induce such correlates, focusing on T cell-inducing vaccines and particularly on Ad vectors. *J. Leukoc. Biol.* **86**: 779–793; 2009.

Introduction

The failure of Merck's HIV-1 vaccine trial (called STEP trial), based on replication-defective AdHu5, designed to induce T cell responses to conserved internal proteins of HIV-1 [1], raises questions about the concept of T cell vaccines to HIV-1 [2] and necessitates more basic research about correlates of protection and how such correlates can be achieved by vaccines. The STEP trial not only showed lack of vaccine efficacy but in contrast, showed a trend toward increased acquisition of HIV-1 in vaccinees with moderate-to-high, pre-existing neutralizing antibodies to the vaccine carrier prior to immunization [1].

Abbreviations: AAV=adeno-associated viral vector(s), Ad=adenovirus, AdC=Ad vectors derived from chimpanzees, AdHu5=Ad vectors of the human serotype 5, AdHu35/26=Ad vector derived from other human serotypes, CAR=coxsackie and Ad receptor, EC=elite controller(s), env=envelope protein, HAART=highly active antiretroviral therapy, HEK=human embryo kidney, HVTN=HIV Vaccine Trial Network, LTNP=long-term nonprogressor(s), MVA=modified vaccinia Ankara, NHP=nonhuman primate, RCA=replication-competent Ad virus, SHIV=HIV/SIV, VLP=virus-like particle, VRC=Vaccine Research Center, VSV=vesicular stomatitis virus

Most licensed vaccines induce protection through antibodies. The env of HIV-1, the virus' sole target for neutralizing antibodies, is extraordinarily variable, heavily glycosylated, and undergoes structural changes upon receptor binding [3, 4]. It has thus been impossible so far to design env-based immunogens, which can induce antibodies that reliably neutralize a broad spectrum of different HIV-1 isolates. Recent HIV-1 vaccine efforts have focused largely on induction of T cell responses, most notably CD8⁺ T cells [5–7], which have been implicated to protect against progression of HIV-1 infection in humans and which have shown some efficacy in preclinical animal models based on infection of rhesus macaques with SHIV or SHIV chimeras [8, 9].

In this review, we will provide a general overview about immune responses to HIV-1 and on different vaccine prototypes that have been developed and tested against this virus or its surrogate in animals and humans, with a focus on vaccines based on Ad vectors.

HIV-1 AND AIDS

AIDS, caused by HIV-1, is the leading cause of death in humans aged 15–59 worldwide. Between 1981 and 2003, an estimated 20 million individuals died of AIDS, and 40.3 million people were infected with HIV-1 in 2005. It is estimated by UNAIDS that in 2007, 33.2 million humans were living with HIV-1, an additional 2.1 million humans died of AIDS, and 2.5 million people became newly infected with HIV-1. Sub-Saharan Africa has by far the highest incidence rates of HIV-1 infections, and in some Sub-Saharan nations, such as in Botswana, a staggering ~36% of the adult population is infected. HIV-1 has started to spread in other regions, including highly populated countries of Asia, such as India and China. In the Americas, 65% of infected individuals are treated with antiviral drugs; in contrast, less than 10% of HIV-1-infected humans in Africa or Southeast Asia have access to antiretroviral treatment.

In most cases, HIV-1 is sexually transmitted through the male or female genital tract or the rectal mucosa. Women are

1. Correspondence: The Wistar Institute, 3601 Spruce St., Philadelphia, PA 19104, USA. E-mail: ertl@wistar.upenn.edu

at a higher risk than men to become infected by heterosexual contact, and currently 60% of all HIV-1-infected individuals are women. Infected women in turn can transmit virus to their offspring, and it is estimated that more than 2.2 million infants have become infected from their mothers.

It was shown in NHPs, upon their low-dose vaginal SIV infection, that the initial viral replication is limited to small foci within the cervical submucosa for the first few days [10]. After the initial local burst of viral replication, the virus disseminates to lymph nodes and then to various organs and lymphoid tissues [11]. In the symptomatic phase, viral replication and CD4⁺ T cell loss occur predominantly in the GALT. Once the viral load has expanded, adaptive immune responses become activated, patients seroconvert, and numbers of HIV-1 antigen-specific T cells increase. At this stage, virus titers decrease to a plateau referred to as "viral load set point." During the usually asymptomatic, latent phase following the acute infection, the patients show a slow but progressive loss of CD4⁺ T cells, which eventually reaches very low counts in the blood. At this time, the symptomatic phase of AIDS begins.

HAART to treat HIV-1 infection was introduced in 1986. Although increasing quality of life and life expectancy, HAART is not an optimal solution to the HIV-1 pandemic. HAART's costs, side-effects, and complex regimens make it difficult for the patient to access or adhere to the treatment [12]. The drugs are not available in the poorest countries, which have the highest prevalence rates of HIV-1 infections. Last but not least, the drugs do not eliminate HIV-1 but only reduce viral loads, which resurge rapidly once treatment is stopped [13]. An efficacious and safe vaccine to HIV-1 would certainly be best to control the pandemic. Vaccine-induced immune mechanisms, which can clear the virus or virus-infected cells during the early stages of infection at the site of viral entry, when viral load is still limited and before the virus mutates extensively, would be best suited to prevent a systemic infection and its pathological consequences. Vaccines that only reduce viral loads may offer some temporary advantages, but one would expect that the highly mutating HIV-1 virus, even if combated efficiently by a vaccine-induced immune response, would eventually escape immunosurveillance through mutations.

CORRELATES OF PROTECTION

Although most current vaccines were developed without any knowledge of potential immune correlates of protection against the pathogen and in fact, helped to partially establish correlates of protection, such knowledge would clearly aid in the development of vaccines against complex pathogens such as HIV-1.

Neutralizing antibodies are known to protect against many viruses, and the initial efforts to develop an HIV vaccine were concentrated on exploring humoral immune responses against HIV. In experimental models, neutralizing antibodies given by passive transfer protect against infections with pathogenic strains of SHIV chimeras [14, 15], which carry the envelope of HIV-1, and HIV-1-specific antibodies of the IgA isotype have been isolated from mucosal surfaces and blood of exposed,

seronegative women, suggesting that they might prevent infection [16, 17]. Although neutralizing antibodies would be expected to protect against HIV-1 infection, with few exceptions, most neutralizing antibodies recognize only closely related isolates of HIV-1 [18], and immunogens that elicit broadly cross-neutralizing antibodies reliably remain elusive.

Although T cells are in general unable to prevent infection, they are crucial for its control, including an infection with HIV-1, as suggested by several lines of evidence. Some humans are remarkably resistant to developing AIDS upon HIV-1 infection, instead, controlling viral loads to low or even undetectable levels [19, 20]. These individuals are classified as LTNP or EC. LTNP show low but variable plasma viremia and occasionally develop AIDS after long asymptomatic phases [21]; EC are able to control HIV-1 to undetectable levels. It was shown that certain HLA class I alleles are more common in ECs [9] and furthermore, that such individuals develop exceptionally strong CD8⁺ T cell responses to HIV gag upon infection, which can lead to mutations that impair the fitness of HIV-1 [22]. Although these studies are far from conclusive, they suggest that HIV-1-specific CD8⁺ T cells can protect against the spread of an HIV-1 infection. This notion is supported by other studies, which showed that after the acute phase of infection, the appearance of HIV-1-specific CD8⁺ T lymphocytes is associated temporally with a decrease in viral load [23] or that resistance against progression is linked to the presence of polyfunctional CD8⁺ T cells in blood [8]. CD8⁺ T cell depletion studies in NHPs indicate that CD8⁺ T cells play a major role in controlling SIV/SHIV infection [24, 25], but these results have to be interpreted with caution, as available antibodies to primary CD8⁺ T cells also deplete NK cells. In spite of the data, correlates of cell-mediated protection against HIV-1 remain ill-defined and are likely to depend in part on route of transmission, host factors, and viral fitness.

Considering that most HIV infections start at the mucosal level, the anatomic distribution of vaccine-induced immune responses is presumably critical. Vaccine-induced immune responses present at the port of entry might be decisive to fight a primary infection before a viral reservoir is established within lymphoid tissues and the gut. CD4⁺ T cells in GALT are primary targets of HIV-1 [26]. This may relate to interactions between gp120 of the env and $\alpha\beta7$ integrins, the latter involved in leukocyte migration to and retention in the intestine. This interaction promotes formation of synapses that support cell-to-cell spreading of the virus [27]. Studies in primates infected with SIV have shown that CD4⁺ T cell loss within the GALT and its associated lymphoid tissues disrupts the protective barrier of the intestine, allowing for bacterial antigens such as LPS to enter the bloodstream [28]. This in turn results in a global activation of CD4⁺ T cells, which promotes progression of the virus by providing target cells to HIV-1/SIV [29]. Preventing the early CD4⁺ T cell loss within the gut and thus, preserving the mucosal barrier of the intestine may be key to protecting against high viral set-point loads and progression to AIDS [30].

ANIMAL MODELS FOR HIV-1 VACCINES

A major obstacle in developing an efficacious HIV-1 vaccine is the lack of a validated animal model. Chimpanzees are susceptible to HIV-1 but cannot be used for ethical reasons. SIV, a lentivirus closely related to HIV-1, causes chronic but benign infections in its natural hosts such as sooty mangabeys [31]. Macaques develop AIDS upon infection with SIV or SHIV, but the infections are more virulent than HIV-1 infections in humans. It remains unknown to date if results obtained with SIV/SHIV infections in rhesus macaques or cynomolgus monkeys are relevant for human HIV-1 infection. Nevertheless, most HIV-1 vaccines undergo extensive preclinical testing in these primates to assess if they induce protection against challenge with SIV or SHIV. Table 1 shows some of the results obtained with different vaccines in SIV or SHIV challenge models.

Many vaccines, including T cell-inducing vaccines, were found to provide at least partial protection against SHIV89.6P, which carries a HIV-1 clade B envelope [7, 46–52]. SHIV89.6P differs in some crucial aspects from HIV-1; e.g., it uses CXCR4 for cell entry during the initial infection, it causes AIDS much more rapidly, and its env is more neutralization-sensitive [53]. Therefore, SHIV89.6P may not be a valid challenge virus. This is further substantiated by findings such as the one in the STEP trial, where the vaccine used showed no efficacy in humans though had protected NHPs against challenge with SHIV89.6P. Subsequent studies showed that this or similar vac-

cines failed to protect against challenge with SIVmac239 [40] or SIVmac251 [42]. Additional SHIVs, based on env from HIV-1 virus clade B or C, have been developed that like HIV-1, use CCR5 as a coreceptor [54, 55]. Other studies assessed vaccine efficacy by challenging NHPs with SIV, such as SIVmac239 or SIVmac251, given systemically or mucosally [41, 43, 56–60]. Protection against SIV challenge can be achieved by prior infection of NHPs with an attenuated SIV. Most studies used nef-deleted SIV [61], and others used SIVs attenuated through deletion of V1-V2 sequences in env [62] or through modification of the transmembrane domain of env [63]. In these challenge studies, attempts were made to correlate immune responses with level of protection. In most reports, immune responses measured by traditional assays failed to predict if the animals were to be protected against challenge. One study reported a correlation between frequencies of β -chemokine-producing CD8⁺ T cells and levels of protection [64], and another study suggested a dominant role for neutralizing antibodies [65].

It appears that protection might be achieved more readily against homologous challenge, i.e., challenge with a virulent SIV that carries the same or a closely related env as the immunogen than against heterologous challenge [59], pointing toward an important role for antibodies that may act, not necessarily solely by neutralization but also by other mechanisms such as antibody-dependent, cell-mediated cytotoxicity. In humans, vaccines need to achieve protection against a heterolo-

TABLE 1. NHP Challenge Experiments

Vaccine	Antigen	Challenge virus/ challenge route	Result	References
DNA vaccine (IL-15)	gag	SHIV89.6P, i.v.	Reduced viral loads	[32]
DNA vaccine (IL-12) prime/VSV boost	gag, env	SHIV89.6P, i.v.	Reduced viral loads	[33]
DNA (IL-12) prime/AdHu5 boost	multiple	SIVmac251, rectal	Reduced viral loads	[34]
DNA prime/ <i>Listeria monocytogenes</i> boost	gag, env	SIVmac239, rectal	Reduced viral loads	[35]
DNA (IL-2) prime/MVA boost	gag, pol, env	SHIV89.6P, rectal	Some protection against CD4 ⁺ T cell loss	[36]
DNA prime/MVA boost	multiple	SIVmac239, rectal	Reduced peak viral loads, no protection against disease	[37]
DNA prime/NYVAC boost	gag, pol, env	SIVmac251, rectal	Reduced viral loads	[38]
DNA (IL-12/IL-15) AdHu5/protein (gp120, nef)	multiple	SIVmac251, rectal	No protection	[39]
DNA prime/AdHu5 boost	gag	SIVmac239, rectal	Transient reduction in viral load	[40]
AdHu5 prime/AdHu5 boost	gag	SIVmac239, rectal	No protection	[40]
AdHu5 prime/AdHu5 boost	gag	SHIV89.6P, i.v.	Reduced viral loads, no CD4 ⁺ T cell loss	[7]
DNA prime/AdHu5 boost	gag/pol/env	SIVmac251, i.v.	Reduction in peak viral loads, no reduction in viral set point loads, prolonged survival	[41]
AdHu26 prime/AdHu5 boost	gag	SIVmac251, i.v.	Reduced viral loads	[42]
Replication competent AdHu5/protein (gp120)	gag, env, rev	SIVmac251, rectal	Reduced viral loads	[43]
Rabies virus vector	gag, env	SHIV89.6P i.v.	Reduced viral loads	[44]
RhCMV vector	gag, rev, tat, nef, env	SIVmac239, repeated low-dose rectal	Increased resistance against infection and complete control of local infections in some NHPs	[45]

NYVAC, attenuated vaccinia virus; RhCMV, rhesus CMV.

gous challenge, and correlates of protection in preclinical models should thus be defined under conditions that afford this type of protection to NHPs. Other SIV challenge viruses such as SIVE660 have been developed and can be used to assess correlates of protection against a heterologous challenge in NHPs.

In early challenge experiments, the challenge viruses were given i.v. Although HIV-1 can be transmitted through this route, as attested by its spread in i.v. drug users, the most common route of transmission is through the mucosal sites of the genital tract or the rectum. For this reason, challenge models, based on mucosal challenge of NHPs, have been developed. Infection through mucosal routes can be achieved by a single administration of a high dose of virus or by repeated challenge with low doses of virus [66]. Although the latter model is appealing, as only few virus particles penetrate the mucosal barrier, mimicking transmission in otherwise healthy humans, it may not be a stringent-enough challenge model for humans with underlying sexually transmitted diseases, which are known to increase the risk for HIV-1 acquisition.

Vaccine-induced protection can be achieved more easily in so-called EC NHPs, which have certain MHC class I haplotypes such as Mamu-A*01 or Mamu-B*17 [67]. NHPs with these haplotypes develop exceptionally high CD8⁺ T cell responses to antigens of SIV that are commonly present in vaccines, again suggesting that a potent CD8⁺ T cell response can afford protection.

The field of HIV-1 vaccinology would profit substantially if animal models were to be standardized with regard to the challenge virus as well as the route and dose of challenge. If challenge studies were performed using a consensus regimen, different vaccine strategies could be compared more readily. Unfortunately, as none of the different NHP challenge models have been validated by successful clinical trials so far, it is currently impossible to assess which model would be best suited to predict the outcome of vaccination in humans.

EXPERIMENTAL VACCINES TO HIV-1

Most current HIV-1 vaccine efforts are focused on inducing protection through T cells, mainly directed against conserved epitopes of the virus. A large number of different vaccine platforms are being investigated, such as adjuvanted protein vaccines [68], VLPs [69], plasmid vectors [70–75], or viral [48, 76–80] and bacterial recombinant vectors [81, 82]. Viral recombinants based on poxviruses such as MVA [76] or vaccinia virus [78], AAV [80], VSV [48] or measles virus-based vaccines [77], or different serotypes of Ad vectors [79] have undergone extensive preclinical and in some cases, clinical testing. Some of the different vaccine platforms are listed in Table 2. Most platforms use prime-boost regimens to further increase the magnitude of the HIV-1 antigen-specific immune responses. Prime boost regimens are especially useful to reduce the dose of each individual vaccine, thus reducing dose-related toxicity, which can be substantial for some of the viral vectors, such as those based on Ad viruses. Prime-boost regimens commonly combine DNA vaccines or protein vaccines with other modalities [81, 82] or heterologous types of a specific viral vector vac-

cine [88, 103]. For examples, the VRC (Bethesda, MD, USA) has focused on developing a vaccine regimen based on DNA priming, followed by a booster immunization with a replication-defective Ad of the AdHu5 serotype [104, 105]; Robinson et al. [106] have focused on DNA vaccine priming followed by a MVA boost; Barouch and co-workers [107, 108] are developing replication-defective Ad vectors based on rare human serotypes; our group [89, 109] has focused on replication-defective AdC; Robert-Guroff and co-workers [110, 111] are exploring the use of RCA vectors of the human serotypes 4, 5, and 7; Rose and colleagues [48] and Schnell and co-workers [44] are exploring rhabdovirus vectors such as VSV or attenuated rabies virus, respectively; Knipe and colleagues [58] are testing herpes virus vectors; and Weiner and co-workers [75, 112] and others [70–74] are focusing on DNA vaccines.

DNA vaccines, which are being used by many investigators, are immunogenic in small animal models, inducing potent cellular and humoral immune responses to a variety of pathogens. However, a major obstacle has been transferring their immunogenicity/efficacy to larger animal models and humans. This may be achieved with novel delivery methods such as electroporation, which increases uptake of DNA by cells close to the injection site [113]. DNA vaccines given alone have so far failed to induce potent immune responses in clinical trials [83] and thus regimens using DNA vaccines in combination with viral vectors have been studied in several early stage trials. DNA priming followed by MVA boost resulted in detectable cellular immune responses in one trial [114] but performed poorly in another [115]. DNA vaccine priming followed by a boost with env [116] induced antibody and CD4⁺ T cell responses but failed to elicit high titers of neutralizing antibodies or CD8⁺ T cells. DNA priming followed by a boost with an AdHu5 vector was evaluated by Merck and VRC in phase I trials. This combination was immunogenic but did not result in responses that were superior to those induced with the Merck AdHu5 vector alone.

AD VECTOR VACCINES

From all of the vaccines tested preclinically, those based on Ad vectors have shown superior immunogenicity with regard to induction of CD8⁺ T cells. Ads can be derived from bacterial molecular clones, which allows for easy modifications. The most widely used manipulation of Ad vectors consists of a deletion of the E1 domain, which encodes polypeptides that initiate transcription of other viral genes. E1-deleted Ad vectors are thus replication-defective and presumably safer than replication-competent vectors [117]. The gene products of the E1 domain are essential for viral replication; E1-deleted Ad vectors need to be grown on packaging cell lines that provide E1 in trans. Several different packaging cell lines are available. HEK 293 cells contain not only the E1 genes of the AdHu5 virus but also additional sequences flanking the E1 domain [118]. E1-deleted AdHu5 vectors grown on HEK 293 cells can undergo homologous recombination with the E1 genes present in HEK 293 cells and thus, revert to RCA. PerC6 cells, developed more recently, only contain the E1 genes of the AdHu5 virus, thus minimizing the risk for homologous recom-

TABLE 2. HIV Vaccine Strategies

Vaccine platform	Immune response/development	References
Plasmid vectors	<i>CD4⁺ and CD8⁺ T cells</i>	
Naked DNA	Humans—phase I	[83]
Adjuvanted DNA	Humans—phase I	[84]
Subunit	<i>Humoral responses</i>	
Protein	Humans—phase III	[85]
Adjuvanted protein	Humans—phase I	[68]
VLP	Humans—phase II	[86]
Viral vectors	<i>Cellular and humoral immune responses</i>	
AAV vector	NHP	[87]
AdC	NHP	[88,89]
AdHu5	Humans—phase IIb	[1, 40]
AdHu35, AdHu26	Humans—phase I	[42, 90]
Canarypox virus (ALVAC)	Humans—phase II	[91]
Fowlpox virus (FPV)	Humans—phase I	[92]
MVA	Humans—phase I	[81]
Vaccinia virus	Humans—phase I	[93]
Sendai virus	NHP	[94]
Measles virus	Mice	[95]
Poliovirus	NHP	[56]
Rabies virus	NHP	[44]
VSV	NHP	[48]
Semliki forest virus (SFV)	NHP	[96]
Venezuelan equine encephalomyelitis virus (VEE)	Humans—phase I	[97]
HSV-1	NHP	[58]
CMV	NHP	[45]
Bacterial vectors	<i>Varied immune responses</i>	
<i>Clostridium perfringens</i>	Mice	[98]
<i>Mycobacterium bovis</i>	Guinea pigs	[99]
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Mice	[100]
<i>L. monocytogenes</i>	NHP	[101]
<i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i>	Humans—phase I	[102]

bination and outgrowth of RCAs [119]. Additional serotypes of primate Ad viruses have been vectored as gene carriers. These viruses were shown to grow in the presence of the AdHu5 E1 gene products [79], or they were modified by replacing early genes [120], or more precisely, the open reading frame 6 of E4 [121] with that of the AdHu5 virus or another permissive virus to allow for their propagation in HEK 293 or PerC6 cells.

Another commonly used deletion is that of the E3 domain, which encodes polypeptides that subvert immune response [122]. Gene products of E3 are not essential for viral replication, and E3-deleted Ad vectors are replication-competent. Ad vectors deleted in E1 and E3 have also been used. In our hands, E1-only deleted Ad vectors, and E1- and E3-deleted vectors performed similarly [123]. This presumably reflects that the E3 genes are poorly transcribed in E1-deleted vectors and that levels of E3 polypeptides are below the threshold, where they affect a detectable impairment of antigen presentation or cytokine pathways. Deletion of the E3 genes has the advantage to generate more space for transgenes. It also offers the possibility to generate dual expression vectors, in which one transgene and its regulatory elements are placed in the E1 domain, and the other is placed into the E3 domain. VRC has used Ad vectors deleted in E1 and E4, in part to prevent outgrowth of RCAs in HEK 293 cells [124]. In our hands, Ad vectors de-

leted in E1, E3, and E4 showed lower expression of the transgene product compared with vectors deleted in E1 or E1 and E3, and consequently, they induced overall lower immune responses [123].

Immunogenicity testing in mice, NHPs, and humans showed that Ad vectors not only induce potent transgene product-specific CD8⁺ T cells but also that responses are exceptionally sustained [53, 125], which most likely relates to Ad vectors' ability to persist, albeit at low levels [126]. During persistence, which occurs mainly in activated T cells, the Ad vectors remain transcriptionally active. This in turn, results in continuous activation of T cells preventing the pronounced contraction of vector-induced T cells typically seen at the end of the effector phase. Lack of contraction of the Ad vector-induced immune responses may be advantageous by maintaining high frequencies of effector/effector memory cells. On the other hand, the prolonged presence of fully activated CD4⁺ T cells may pose risks by providing targets for HIV-1. It may also prevent the timely development of central memory cells that proliferate more effectively upon re-encounter of antigen, compared with more activated effector or effector memory CD8⁺ T cells.

Humans are infected frequently with Ad viruses throughout their life, and infections with the AdHu5 virus are common. In the United States, depending on the age of the study popula-

tion and the sensitivity of the assay, 40–60% of humans carry readily detectable neutralizing antibodies to AdHu5 virus [127]. Seroprevalence rates to AdHu5 virus are markedly higher in human populations from undeveloped countries. Pre-existing neutralizing antibodies to the vaccine carrier can prevent its uptake by cells and thus, transcription and translation of the vaccine antigen, thus reducing the levels of antigen presented to the immune system; consequently, adaptive immune responses to the vaccine antigen are reduced in the presence of vector-specific neutralizing antibodies [89]. To circumvent impairment of vaccine efficacy by pre-existing neutralizing antibodies to the vaccine carrier, our group developed vaccine vectors based on AdC [128]. Vectors were derived from five different viruses: AdC1, AdC5, AdC6, AdC7, and AdC68. These represent three different serotypes [79, 88, 89, 120]. AdC7 and AdC5 belong to the same serotype and are cross-neutralized completely by antibodies. AdC68 and AdC7 are closely related and are cross-neutralized partially by high-titer neutralizing antibodies. AdC6 belongs to a distinct serotype. All of these Ad viruses (except for C1) have close sequence homology to the Ad virus of the human serotype 4 and thus, belong to subgroup E of Ad viruses. AdC1 belongs to subfamily B. Ad viruses have been isolated from a multitude of different species; we developed vectors from Ad viruses that naturally infect chimpanzees under the assumption that these viruses would closely resemble human Ad viruses. Indeed, AdC vectors are grouped phylogenetically within human serotype Ad5 [129]. In addition, sequencing of the AdC vectors showed that their genetic organization is identical to that of human Ad5. Further studies showed that their basic characteristics with regard to molecular organization, structure, growth, receptor use, and interactions with cells of the immune system are similar to those of human Ad viruses [79, 130].

E1-deleted AdC5, AdC6, AdC7, and AdC68 vectors can be grown on HEK 293 packaging cells that carry the E1 of AdHu5 virus. The use of packaging cell lines that carry a heterologous E1 for growth of E1-deleted AdC vectors has advantages: U.S. Food and Drug Administration-approved cell lines, such as HEK 293 cells or PerC6 cells, have been generated. PerC6 cells carry only the E1 of AdHu5; HEK 293 cells carry additional Ad sequences. The E1-flanking sequences of the AdC viruses show limited sequence homology with the AdHu5 virus, which virtually abolishes the chance of recombination and reversion to replication competence in HEK 293 cells. Prevalence rates of neutralizing antibodies to AdC viruses are low in the United States or Asia; they are higher in sub-Saharan Africa, presumably as a result of closer contacts with chimpanzees [127]. In mice and NHPs, the AdC vectors induce high CD8⁺ T cell responses that can be increased by the sequential use of two serologically distinct AdC vectors or by combining AdC vectors with DNA vaccines and poxvirus vectors [88, 89, 109, 131]. AdC vectors induce significantly stronger immune responses compared with AdHu5 vectors in animals with pre-existing, neutralizing antibodies to AdHu5.

To avoid the negative effects of pre-existing neutralizing antibodies to Ad viruses, investigators from Harvard Medical School together with Crucell developed and tested AdC vectors derived from so-called rare serotypes, such as AdHu26,

AdHu48, AdHu35, and AdHu11 [108, 132]. Prevalence rates of neutralizing antibodies to these rare serotypes are low in humans residing in the United States and Europe, being higher in African countries [133]. Immune responses to these AdC vectors were compared with those induced by AdHu5 vectors, which induced higher transgene product-specific CD8⁺ T cell responses than AdC vectors based on the other human serotypes; however, in AdHu5-preimmune animals, the AdHu35/AdHu11 combination used in either order outperformed combinations that included the AdHu5 vector [132]. AdHu35 and AdHu11 use CD46 rather than the CAR (used by AdHu5, AdHu4, or most of the AdC vectors) as their cell-attachment receptor. CD46, unlike CAR, is ubiquitously expressed on cells of NHPs and humans, and in our experience, CD46-binding vectors, such as the AdC1 vector, are poorly immunogenic compared with AdC vectors that bind to CAR [120]. The Harvard/Crucell group developed a chimeric AdHu35 vector, in which the fiber knob of AdHu35 was replaced with that of AdHu5. This vector induced better transgene product-specific CD8⁺ T cell responses than the original AdHu35 vector [90]. Nevertheless, the caveat that fiber is a target for Ad virus-specific neutralizing antibodies should be noted. The Harvard/Crucell group also explored the use of an AdHu5 hexon chimera, in which the variable loops of hexon of AdHu5, which bind most of the virus-neutralizing antibodies, were replaced with those of AdHu48. The chimeric AdHu5/AdHu48 vector was highly immunogenic, even in animals with pre-existing immunity to the AdHu5 virus [134]. Nevertheless, despite the low prevalence in the United States, ~20% of human sera from sub-Saharan Africa carry neutralizing antibodies against the AdHu48 serotype, precluding the use of AdHu48 vectors in these regions that are most direly in need of a HIV-1 vaccine. This group also tested AdHu26 vectors and showed impressive results from NHP vaccinated with an AdHu26/AdHu5 prime-boost regimen [42].

CLINICAL EXPERIENCE WITH VACCINES TO HIV-1

A number of HIV-1 vaccines have undergone clinical testing. Early vaccines focused on those expressing the env of HIV-1 for the induction of neutralizing antibodies. One of those, a monomeric HIV-1 gp120 vaccine, underwent large-scale efficacy trials. The vaccine did not prevent infection nor reduce the viral load in infected subjects [135]. Humoral responses were detected, but they failed to neutralize field isolates. Overall, vaccines designed to induce neutralizing antibodies universally failed to induce the desired responses.

T cell-inducing vaccines such as DNA vaccines, MVA or AAVs, which induced promising results in NHPs, were found to lack immunogenicity in early clinical trials [115, 136, 137]. Novel delivery methods for DNA vaccines through electroporation of the vector or by combining antigen-expressing plasmids with plasmids expressing cytokines have been shown to increase the immunogenicity of this vaccine platform in animal models [138], and clinical trials are planned to test if this also translates into better immune responses in human subjects. The initial AAV vectors that were tested clinically were based

on serotype 2, which is comparatively poorly immunogenic than other serotypes that have a higher tropism for muscle cells. Discussions are under way to test alternative serotypes such as AAV-1 in human volunteers. The caveat should be pointed out that in preclinical studies in mice, single-stranded AAV vectors of different serotypes were found to induce functionally impaired CD8⁺ T cells that were defective in their proliferative capacity and showed a pronounced up-regulation of immunoinhibitory molecules [139]. Induction of such responses in humans could potentially be harmful. MVA vectors were found to be safe in humans but only elicited barely detectable cellular immune responses to the vaccine antigens in a fraction of the volunteers. Current efforts thus focus on combining MVA with other vaccine modalities such as DNA vaccines. Several of the current and past vaccine trials, focusing on large-scale trials, are listed in Table 3.

In humans, Ad vector vaccines induced robust immune responses in phase I/II trials [124, 146] and were thus tested in two-phase IIb clinical efficacy trials, called STEP [1] and Phambili trials, in men and women at high risk for HIV-1 acquisition. Both trials enrolled individuals with low or absent baseline titers of neutralizing antibodies to AdHu5 virus and individuals with moderate to high titers of such antibodies. In early trials, the AdHu5 vector induced detectable T cell responses, even in individuals with pre-existing, neutralizing antibodies to the vaccine carrier; the STEP and Phambili trials

thus did not exclude such individuals. The trials were powered to allow for testing of vaccine efficacy in reducing HIV-1 acquisition and viral set-point loads. The STEP trial, which had planned to enroll 3000 subjects, was stopped and unblinded before enrollment was completed, as an interim analysis showed that the vaccine lacked efficacy [147]. The Phambili trial was stopped and unblinded shortly thereafter [148]. In the STEP trials infections were mostly in men who have sex with men; only one woman in the placebo group had become infected with HIV-1 at the time of unblinding. As of spring of 2008, in the placebo group, 33/922 men became infected, and in the vaccine group, 49/914 men became infected, suggesting a trend for higher HIV-1 acquisition in vaccinated individuals. Viral set points initially showed no significant difference between the placebo and the vaccine groups. Further analyses showed that the trend for increased acquisition was seen mainly in men with pre-existing, neutralizing antibodies to AdHu5 virus, i.e., in men with titers <18; 20/382 in the vaccine group and 20/394 in the placebo group became infected, and in the male group with titers ≥18, 21/392 in the vaccine group and 9/386 in the placebo group became infected. Further differences were seen when data were analyzed according to the circumcision status of men, and those who were vaccinated and not circumcised were at higher risk for acquisition than those who were vaccinated and circumcised. Prevacina-

TABLE 3. Clinical Trials

Development	Platform	Vaccine/antigen	Immunogenicity/efficacy	References
Phase III, closed	Protein	Protein; gp120	Seroconversion in all participants, no efficacy against HIV-1 acquisition or viral loads	[135]
Phase III, enrollment closed	ALVAC/protein	gp120, gag and protease	Study results are not yet available	[140]
Phase IIB, stopped and unblinded	AdHu5	gag, pol, nef	T cell responses in most participants, no efficacy against HIV-1 acquisition or viral loads, a trend for increased acquisition in a subgroup	[141]
Phase II closed	Lipopeptide	Epitopes of gag, pol, nef	T and B cell responses	[142, 143]
Phase II closed	Canarypox/protein	env, gag, parts of pol and nef	Neutralizing antibodies to laboratory strains, no T cell responses	[144]
Phase II, ongoing but recruitment stopped	DNA/AdHu5	env, gag, pol	Cellular immune responses	[124]
Phase II closed	AAV	gag/pol	Cellular immune responses in a low percentage of participants	No publication available
Phase I closed	DNA/MVA	gag epitopes	T cell responses were infrequent and transient	[137]
Phase I closed	DNA/MVA	gp160, gag, RT	T cell responses in 95% of trial participants	[114]
Phase I closed	DNA/protein	gp120 multiple clades, gag	T cell responses and neutralizing antibodies	[116]
Phase I closed	DNA/NYVAC	env, gag, nef, pol	Priming effect for T and B cell responses by the DNA vaccine	[145]
Phase I closed	<i>S. enterica</i>	gag	Low level of specific cellular immune responses	[112]

tion-neutralizing antibodies to AdHu5 were more common in uncircumcised men [1].

The Phambili trial was stopped after enrollment of 801 participants; at the time of unblinding, 11 cases of HIV-1 infection had been confirmed, with four in the placebo group and seven in the vaccine group. In individuals with neutralizing antibody titers to AdHu5 virus >18, six infections were observed in vaccinated and three infections in unvaccinated individuals. Ten of 11 infections were seen in women.

A lack of efficacy of AdHu5 vector vaccines in humans with pre-existing, neutralizing antibodies to AdHu5 virus was potentially foreseeable. Lack of efficacy in humans without pre-existing neutralizing antibodies to AdHu5 virus, in spite of the demonstrated ability of the vaccine to induce a robust transgene product-specific T cell response [149], was unexpected and raised the question of whether T cells can indeed protect against HIV-1 infections or control viral load in individuals that become infected.

We would argue that the failure of the trials reflects a product rather than a concept failure, i.e., that T cells can protect but that the vaccine failed to induce a T cell response that was of sufficient potency or quality to afford resistance. The vaccine regimen used in the two trials was based on repeated vaccination with an AdHu5 vector. Vaccination with a viral vector not only induces immune responses to the transgene product but also to the vector, and vector-specific neutralizing antibodies inhibit vector uptake and transgene product expression required for induction of immune responses to the vaccine antigen. Individuals who were seronegative at the time of enrollment produced vector-specific neutralizing antibodies after the first immunization and thus, developed immunity to subsequent doses of the same vaccine. Homologous prime-boost regimens with viral vectors using the same vector repeatedly are thus suboptimal compared with heterologous prime-boost regimens based on the sequential use of different viral vectors. Additional results from the HVTN showed that Ad seronegative-vaccinated individuals of the STEP trial with MHC genotypes commonly found in elite controllers were able to reduce viral loads significantly better than unvaccinated individuals with similar genotypes. HVTN also showed that in vaccinated AdHu5-seronegative individuals with these genotypes, known to develop exceptionally potent T cell responses to gag of HIV-1, viral loads were inversely correlated with the magnitude of the T cell responses to HIV-1, as tested for by IFN- γ ELISpot assays [147]. These results are based on small numbers of infected individuals, and the trial had not been designed to assess responses in such subgroups. Even with these caveats, the results are suggestive that vaccine-induced T cells might be able to control an infection with HIV-1 in individuals that can mount potent CD8⁺ T cell responses to the vaccine antigen.

Additional data are being gathered from the STEP trial. Upon unblinding, data about trends of HIV-1 acquisition will no longer be interpretable.

The AdHu5 vaccine used by Merck and in combination with DNA vaccine priming by VRC were the first HIV-1 vaccine regimens used in humans that elicited T cells of sufficient magnitude to allow for an in-depth analysis of some of the T cells' pertinent characteristics. In the STEP trial, the vaccine in-

duced T cell responses detectable by ELISpot in ~80% of vaccinees [146]. More than 40% of the subjects with measurable ELISpot responses developed CD4⁺ T cell responses to HIV antigens, and ~60% developed CD8⁺ T cell responses [149]. HIV-specific CD8⁺ T cells induced by the vaccine produce IFN- γ or IFN- γ in combination with TNF- α . The magnitude and overall composition of T cell responses were similar between vaccinated subjects who acquired HIV infection and those who did not. In additional trials conducted by Merck and VRC, conversion rates and magnitude of CD8⁺ and CD4⁺ T responses were slightly lower in individuals with pre-existing, neutralizing antibodies to AdHu5. Curiously, this was more pronounced with the VRC than the Merck vaccine [150]. The VRC AdHu5 vaccine has a deletion in the E4 domain of Ad, and it has been suggested (but not formally proven) that this deletion would reduce the residual transcription of Ad genes in E1-deleted vectors and thus, the impact of pre-existing cellular immunity to AdHu5.

One worrisome aspect of AdHu5 vaccines used by Merck or in combination with DNA vaccine priming by VRC is that both failed to induce a broad T cell response to different epitopes of HIV-1 in humans. Both vaccines expressed several antigens of HIV-1, but they only induced, on average, T cells to two or three epitopes [148, 150]. Such a narrow response would obviously not provide sufficient coverage to the multitude of HIV-1 variants and would allow for escape through viral mutations. The underlying cause for this narrow response is not yet fully understood. Recent results in NHPs, comparing the breadth of T cell responses with different Ad vector-based vaccine regimens, showed that the AdHu5 vector, given repeatedly, induced a narrow T cell response, as observed in the STEP trial, and a heterologous prime-boost regimen, in which an Ad vector derived from a different serotype was used for priming, followed by a booster immunization with an AdHu5 vector, induced a much broader response [108]. These results are promising, as they indicate that some prime-boost regimens may elicit a broad T cell response. Clearly, these results thus far obtained in NHPs need to be confirmed in clinical trials.

The underlying cause for the observed trend toward increased acquisition in individuals with moderate-to-high neutralizing antibodies to AdHu5 vectors also remains poorly understood. It has been suggested that the vaccine recalled Ad-specific CD4⁺ T cells, which provided targets for HIV-1. Indeed, a similar pathway had been shown to result in enhanced SIV replication in NHPs [151]. Studies in HIV-1-infected patients showed that vaccination with a pneumococcal vaccine or an influenza virus vaccine could cause a transient increase in viral load, suggesting that activation of CD4⁺ T cells might have sponsored replication of HIV-1 [152, 153]. It should be noted though that other studies failed to confirm long-term effects of influenza virus vaccination on HIV-1-infected individuals [154]. Increased acquisition as a result of vaccine-induced activation of Ad-specific CD4⁺ T cells, which cross-react between different serotypes of Ad [155] and are thus not linked to neutralizing antibody titers to a specific serotype, should have been observed in all vaccinees and not just in those with pre-existing antibodies to AdHu5.

One could postulate that pre-existing, neutralizing antibodies to the vaccine carrier affected antigen presentation cause a shift of the ratio of vaccine-induced Th1 versus Th2 cells and in turn, reduced induction of "protective" CD8⁺ T cells. Neutralizing antibodies to Ad are serotype-specific, and non-neutralizing-binding antibodies cross-react between different serotypes. When we tested human sera for neutralizing and binding antibodies to AdHu5, we were unable to find any correlation in titers of these two types of antibodies. In fact, all adults had binding antibodies to AdHu5 (unpublished), which had presumably been induced in part by other serotypes. Changes in antigen uptake as a result of pre-existing antibodies to AdHu5 are thus unlikely to explain the trend toward increased HIV acquisition in the STEP trial, as such changes should have been caused by all binding antibodies and not just those that are virus-neutralizing.

The argument has been made that neutralizing antibodies to AdHu5 were not causative for the trend of increased HIV-1 acquisition but rather, reflected a yet-to-be-identified condition that caused a heightened status of immune activation, which in turn promoted HIV-1 acquisition. Again, it is unclear why this should have affected vaccinated individuals primarily. In fact, placebo recipients with pre-existing, neutralizing antibodies to AdHu5 showed a slight trend toward decreased acquisition of HIV-1.

HIV-1 differs from other pathogens in preferentially infecting activated CD4⁺ T cells. Ad vectors, unlike other vaccine carriers that have been tested in advanced trials for HIV-1, were shown to persist at low levels in a transcriptionally active form in T cells of experimental animals [126], and one would assume that they may also persist in humans. Continued low-level production of antigen in lymphatic tissues in turn maintains high frequencies of activated T cells and is at least part of the reason why responses to Ad vectors are typically sustained. Continued presence of CD4⁺ T cells activated by the vaccine within the genital or rectal mucosa could provide a risk factor by increasing the number of cells that supports acquisition and replication of HIV-1. Clinical trials have thus far not assessed the effect of vaccination on mucosal T cell responses, and even in experimental animals, such knowledge remains uncertain.

AdHu5 virus and other human serotypes of Ad virus only replicate in humans (and potentially chimpanzees), which become infected during their lives with a variety of different serotypes. It may thus not be possible to closely mimic the conditions that lead to the trend toward increased HIV-1 acquisition in the STEP trial in a rhesus macaque model. An AdHu5 virus that can replicate in rhesus macaques has been developed [156], but as this virus shows a high degree of attenuation in rhesus compared with wild-type AdHu5 virus in humans, results obtained by pre-exposure of macaques with this virus to assess the effects of pre-existing immunity to AdHu5 in a pre-clinical model would need to be interpreted with caution.

The overall lesson from the STEP trial is that AdHu5 vector vaccines should not be used in humans with pre-existing, neutralizing antibodies to the vaccine vector, and as in some regions of Africa, up to 90% of adults have such antibodies,

AdHu5 vectors will not be suitable for mass vaccination against HIV-1.

Several questions remain.

Will it be safe to use other AdHu5 vectors as vaccines for HIV-1? The argument has been made that the problems encountered in the STEP trial could reflect peculiarities of the Merck vaccine and that other AdHu5 vaccines, such as the VRC vaccine, which has an additional deletion in E4, might not cause an increased risk in HIV-1 acquisition. It would be unethical to substantiate or refute this argument by clinical trials in individuals at high risk for HIV-1 acquisition.

Will it be safe to use AdHu5 vectors as vaccine carriers for other pathogens? One would expect that the trend toward increased HIV-1 acquisition in vaccinated seropositive individuals was caused by the vaccine carrier rather than by the vaccine antigens. AdHu5-based vaccines expressing antigens of other pathogens and used in a population at risk for HIV-1 acquisition would thus be expected to cause the same problem as the vaccine used in the STEP trial.

Will it be safe to use other Ad vectors based on common human serotypes? One could make the argument that AdHu5 vectors, which have consistently been the most immunogenic of all human serotype Ad vectors, are fundamentally different. As mentioned previously, without animal data, for which suitable models are not available, it is currently impossible to address this argument, and one should thus view all Ad vectors based on common human serotypes as potentially too risky.

Will it be safe to use a RCA Ad vector based on a common human serotype? Data obtained in preclinical models with replication-competent human serotype Ad vectors such as AdHu4 have been encouraging. Neutralizing antibodies to AdHu4 can be found in a significant percentage of the U.S. population (>30%), and again, it is currently not possible to assess the potential risks of a RCA vectors based on a common human serotype.

Will it be safe to use Ad vectors based on rare human serotypes or on serotypes from other species? The AdHu5 vectors of the STEP trial did not increase HIV-1 acquisition rates in AdHu5-seronegative individuals, and one would thus assume that Ad vectors to which humans have no or only low titers of pre-existing neutralizing antibodies would be safe.

Will it be safe to use Ad vectors that contain parts of the AdHu5 virus? Ad vectors have been developed in which the hexon loops of the AdHu5 virus, the main targets for neutralizing antibodies, were replaced with those of a rare serotype, i.e., AdHu48. Preclinical data showed that the immunogenicity of this vector was not affected by pre-existing, neutralizing antibodies to AdHu5 virus. Until it is known to what degree Ad-specific, neutralizing antibodies induced by experimental exposure in NHPs resemble those induced by natural infections of humans, the safety of such chimeric vectors remains uncertain.

FUTURE OF HIV-1 VACCINES

In 1983, when HIV-1 was first shown to be causative for AIDS, the United States Health and Human Services Secretary Mar-

garet Heckler announced that "We hope to have a vaccine [against AIDS] ready for testing in about two years." In March of 2008, at a summit in Washington, D.C., organized by the National Institutes of Health to assess future HIV-1 vaccine funding in the wake of the STEP trial results, some activists as well as HIV-1 scientists asked for an overall stop on all HIV-1 vaccine research, as in their minds, an HIV-1 vaccine could never be made, and further attempts were nothing but a waste of taxpayers' money. So far, many HIV-1 vaccines have been tested in phase I trials for safety in a limited number of volunteers; few of those were then tested in larger trials for immunogenicity/efficacy. Protein-based env vaccines failed to induce protection [135]; this was not surprising, as such vaccines failed to induce neutralizing antibodies to field isolates. Results from another phase III trial, which combines a poxvirus vector with a protein boost, are not yet available. AdHu5 vectors, which by many were viewed as the most promising vaccine platform for HIV-1 prevention, failed. A large trial, called PAVE-100, initially designed to test a prime-boost regimen using a DNA vaccine prime, followed by an AdHu5 boost in individuals at high risk for HIV-1 acquisition in several countries, was reduced to a smaller trial to be conducted in AdHu5-seronegative individuals in the United States only [157]. Although the initial trial was powered to assess effects of vaccination on viral loads and HIV-1 acquisition rates, the scaled-down trial would only enroll a sufficiently high number of individuals to allow an assessment of vaccination on viral loads. In early stage clinical trials, the PAVE-100 vaccine composition induced T cell responses that were comparable with those induced by the STEP trial vaccine. Nevertheless, as correlates of protection remain undefined, it is felt that testing of the vaccine in AdHu5-seronegative individuals is justified, as it might yield information that could aid future vaccine development. It is not expected that the trial will lead to a clinical product, as the use of AdHu5 vectors for HIV-1 prevention is not justifiable in light of the high prevalence rates of AdHu5-neutralizing antibodies in humans. Other vaccines are in earliest stage clinical testing or still in preclinical development, so currently, the prospects for an efficacious HIV-1 vaccine in the near future are rather dim.

Before dismissing future research about HIV-1 vaccines, one should examine other infectious diseases that take a large global toll on human lives. It took longer, by far, than 30 years to develop efficacious vaccines for measles or pertussis, and after 40 years of research, there is still no vaccine for malaria, a vector-borne disease caused by protozoan parasites. Each year, there are ~515 million cases of malaria causing 1–3 million deaths. It was shown as early as 1967 that immunization with live, radiation-attenuated sporozoites provides protection to rodents, suggesting that this disease could be prevented by vaccination [158]. Nevertheless, in spite of numerous clinical trials, a commercial vaccine to malaria is not currently available. Yet no one is suggesting that attempts to generate such a vaccine should be abandoned.

Although many have called the STEP trial a failure, as it did not show vaccine efficacy, it was in all fairness a success in its execution and the scientific knowledge that could be gained from it. Reduction in viral load in the small group of elite con-

trollers that became infected in the STEP trial suggests, with the caveat that the number of such individuals was small, that CD8⁺ T cell vaccines, provided that they induce responses of sufficient potency, might be able to induce protection against high viral loads. Although factors other than magnitude of the vaccine-induced CD8⁺ T cell response, such as CD8⁺ T cell functionality, differentiation status, migration patterns, proliferative potential, etc., may affect the efficacy of a T cell-inducing HIV-1 vaccine, optimizing vaccine-induced CD8⁺ T cell frequencies is likely to be crucial. In HIV-1 vaccine development, most investigators have restricted their efforts to a single vaccine carrier or to related vaccine carriers, such as different poxvirus vectors or Ad vectors derived from different serotypes, which in some instances, are being combined with DNA vaccines. More potent responses can be achieved, at least in animals, through a combination of different platforms, such as poxvirus vectors with Ad vectors or even DNA vaccines with poxvirus vectors and Ad vectors. Combining different platforms, although technically straightforward, poses logistic challenges, as it not only requires intense collaborations of scientists but also acceptance by the commercial entities that own the different vaccine platforms.

SUMMARY

Not too long ago, someone jokingly told us that American settlers, when under attack, formed a wagon circle and shot out of this circle—that's how the West was won; scientists, when under attack, also form a circle but then shoot each other. Clearly, this is not a time to divide and conquer but rather, to join forces and continue our efforts to develop a safe and effective vaccine against HIV-1.

REFERENCES

- Buchbinder, S. P., Mehrotra, D. V., Duerr, A., Fitzgerald, D. W., Mogg, R., Li, D., Gilbert, P. B., Lama, J. R., Marmor, M., Del Rio, C., McElrath, M. J., Casimiro, D. R., Gottesdiener, K. M., Chodakewitz, J. A., Corey, L., Robertson, M. N. (2008) Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the STEP Study): a double-blind, randomized, placebo-controlled, test-of-concept trial. *Lancet* **372**, 1881–1893.
- Pantaleo, G. (2008) HIV-1 T-cell vaccines: evaluating the next step. *Lancet Infect. Dis.* **8**, 82–83.
- Hu, S. L., Stamatakos, L. (2007) Prospects of HIV env modification as an approach to HIV vaccine design. *Curr. HIV Res.* **5**, 507–513.
- Kouy, K. H., Taylor, K. A. (2007) AIDS virus envelope spike structure. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **17**, 244–252.
- Emmi, E. A., Weiner, D. B. (2004) AIDS vaccines. *Expert Rev. Vaccines* **3**, S1–S2.
- McMichael, A. J. (2006) HIV vaccines. *Annu. Rev. Immunol.* **24**, 227–255.
- Shiver, J. W., Fu, T. M., Chen, L., Casimiro, D. R., Davies, M. E., Evans, R. K., Zhang, Z. Q., Simon, A. J., Trigo, W. L., Dubey, S. A., et al. (2002) Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity. *Nature* **415**, 331–335.
- Betts, M. R., Nason, M. C., West, S. M., De Rosa, S. C., Migueles, S. A., Abraham, J., Lederman, M. M., Benito, J. M., Goepfert, P. A., Connors, M., Roederer, M., Koup, R. A. (2006) HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8⁺ T cells. *Blood* **107**, 4781–4789.
- Emu, B., Sinclair, E., Hatano, H., Ferre, A., Shacklett, B., Martin, J. N., McCune, J. M., Deeks, S. G. (2008) HLA class I-restricted T-cell responses may contribute to the control of human immunodeficiency virus infection, but such responses are not always necessary for long-term virus control. *J. Virol.* **82**, 5398–5407.
- Miller, C. J., Li, Q., Abel, K., Kim, E. Y., Ma, Z. M., Wietegre, S., La Franco-Schuch, L., Compton, L., Duan, L., Shore, M. D., Zupanic, M., Busch, M., Carlis, J., Wolinsky, S., Haase, A. T. (2005) Propagation and

- dissemination of infection after vaginal transmission of simian immunodeficiency virus. *J. Virol.* 79, 9217-9227.
11. Sleasman, J. W., Goodenow, M. M. (2003) 13. HIV-1 infection. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111, S582-S592.
 12. Nguyen, V. K., Akko, C. Y., Niamba, P., Sylla, A., Tiendrebeogo, I. (2007) Adherence as therapeutic citizenship: impact of the history of access to antiretroviral drugs on adherence to treatment. *AIDS* 21 (Suppl. 5), S31-S35.
 13. Chen, L. F., Hoy, J., Lewin, S. R. (2007) Ten years of highly active anti-retroviral therapy for HIV infection. *Med. J. Aust.* 186, 146-151.
 14. Mc Cann, C. M., Song, R. J., Ruprecht, R. M. (2005) Antibodies: can they protect against HIV infection? *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* 5, 95-111.
 15. Rasmussen, R. A., Hofmann-Lehmann, R., Li, P. L., Vlasak, J., Schmitz, J. E., Reimann, K. A., Kuroda, M. J., Letvin, N. L., Montefiori, D. C., McClure, H. M., Ruprecht, R. M. (2002) Neutralizing antibodies as a potential secondary protective mechanism during chronic SHIV infection in CD8+ T-cell-depleted macaques. *AIDS* 16, 829-838.
 16. Hirbo, T., Kaul, R., Reichard, C., Kimani, J., Ngunjiri, E., Bravo, J. J., Nagelkerke, N., Hasselrot, K. Li, B., Moses, S., MacDonald, K. S., Brolden, K. (2008) HIV-neutralizing immunoglobulin A and HIV-specific proliferation are independently associated with reduced HIV acquisition in Kenyan sex workers. *AIDS* 22, 727-735.
 17. Mazzoli, S., Trabattini, D., Lo Caputo, S., Piconi, S., Ble, C., Meacci, F., Ruzante, S., Savi, A., Semplici, F., Longhi, R., Pusi, M. L., Totani, N., Basini, M., Villa, M. L., Mazzotta, F., Clerici, M. (1997) HIV-specific mucosal and cellular immunity in HIV-seronegative partners of HIV-seropositive individuals. *Nat. Med.* 3, 1250-1257.
 18. Pinter, A. (2007) Roles of HIV-1 env variable regions in viral neutralization and vaccine development. *Curr. HIV Res.* 5, 542-553.
 19. Baker, B. M., Block, B. L., Rothchild, A. C., Walker, B. D. (2009) Elite control of HIV infection: implications for vaccine design. *Expert Opin. Biol. Ther.* 9, 55-69.
 20. Pereyra, F., Addo, M. M., Kaufman, D. E., Liu, Y., Miura, T., Rathod, A., Baker, B., Trocha, A., Rosenberg, R., Mackey, E., Ueda, P., Lu, Z., Cohen, D., Wrin, T., Petropoulos, C. J., Rosenberg, E. S., Walker, B. D. (2008) Genetic and immunologic heterogeneity among persons who control HIV infection in the absence of therapy. *J. Infect. Dis.* 197, 563-571.
 21. Goudsmit, J., Bogaards, J. A., Jurriaans, S., Schuitemaker, H., Lange, J. M., Coutinho, R. A., Weverling, G. J. (2002) Naturally HIV-1 seroconverters with lowest viral load have best prognosis, but in time lose control of viremia. *AIDS* 16, 791-793.
 22. Miura, T., Brockman, M. A., Schneidewind, A., Lobritz, M., Pereyra, F., Rathod, A., Block, B. L., Brumme, Z. L., Brumme, C. J., Baker, B., Rothchild, A. C., Li, B., Trocha, A., Cutrell, E., Frahm, N., Brander, C., Toth, I., Arts, E. J., Allen, T. M., Walker, B. D. (2009) Hla-B57/*B*801 HIV-1 elite controllers select for rare gag variants associated with reduced viral replication capacity and strong CTL recognition. *J. Virol.* 83, 2743-2755.
 23. Koup, R. A., Ho, D. D. (1994) Shutting down HIV. *Nature* 370, 416.
 24. Jin, X., Bauer, D. E., Tuttleton, S. E., Weinberg, S., Gettie, A., Blanchard, J., Irwin, C. E., Saftir, J. T., Mittleer, J. E., Weinberger, L., Kostrikis, L. G., Zhang, L., Perelson, A. S., Ho, D. D. (1999) Dramatic rise in plasma viremia after CD8+ T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *J. Exp. Med.* 189, 991-998.
 25. Schmitz, J. E., Johnson, R. P., McClure, H. M., Manson, K. H., Wyand, M. J., Kuroda, M. J., Lifton, M. A., Khunkhun, R. S., McEvers, K. J., Gillis, J., Piatak, M., Lifson, J. D., Grosschupf, C., Racz, P., Tenner-Racz, K., Rieber, E. P., Kuus-Reichel, K., Gelman, R. S., Letvin, N. L., Montefiori, D. C., Ruprecht, R. M., Desrosiers, R. C., Reimann, K. A. (2005) Effect of CD8+ lymphocyte depletion on virus containment after simian immunodeficiency virus SIVmac239 challenge of live attenuated SIVmac239/3-vaccinated rhesus macaques. *J. Virol.* 79, 8131-8141.
 26. Sankaran, S., Guadalupe, M., Reay, E., George, M. D., Flamm, J., Prindiville, T., Dandekar, S. (2005) Cut mucosal T cell responses and gene expression correlate with protection against disease in long-term HIV-1-infected nonprogressors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 9850-9855.
 27. Arthos, J., Cicala, C., Martinelli, E., Macleod, K., Van Ryk, D., Wei, D., Xiao, Z., Veenstra, T. D., Conrad, T. P., Lempicki, R. A., McLaughlin, S., Pascuccio, M., Gopaul, R., McNally, J., Cruz, C. C., Censolano, N., Chung, E., Reitano, K. N., Kottlitz, S., Goode, D. J., Fauci, A. S. (2008) HIV-1 envelope protein binds to and signals through integrin $\alpha 4 \beta 7$, the gut mucosal homing receptor for peripheral T cells. *Nat. Immunol.* 9, 301-309.
 28. Douek, D. C., Roederer, M., Koup, R. A. (2008) Emerging concepts in the immunopathogenesis of AIDS. *Annu. Rev. Med.* 60, 471-484.
 29. Brencley, J. M., Douek, D. C. (2008) HIV infection and the gastrointestinal immune system. *Mucosal Immunol.* 1, 23-30.
 30. Silvestri, G. (2008) AIDS pathogenesis: a tale of two monkeys. *J. Med. Primatol.* 37 (Suppl. 2), 6-12.
 31. Silvestri, G. (2009) Immunity in natural SIV infections. *J. Intern. Med.* 265, 97-109.
 32. Boyer, J. D., Robinson, T. M., Kutzler, M. A., Vansant, G., Hokey, D. A., Kumar, S., Parkinson, R., Wu, L., Sidhu, M. K., Pavlakis, G. N., Felber, B. K., Brown, C., Silveira, P., Lewis, M. C., Monforte, J., Waldmann, T. A., Eldridge, J., Weiner, D. B. (2007) Protection against simian/human immunodeficiency virus (SHIV) 89.6P in macaques after coimmunization with SHIV antigen and IL-15 plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 18648-18653.
 33. Egan, M. A., Chong, S. Y., Megati, S., Montefiori, D. C., Rose, N. F., Boyer, J. D., Sidhu, M. K., Quiroz, J., Rosati, M., Schadeck, E. B., Pavlakis, G. N., Weiner, D. B., Rose, J. K., Israel, Z. R., Udem, S. A., Eldridge, J. H. (2005) Priming with plasmid DNAs expressing interleukin-12 and simian immunodeficiency virus gag enhances the immunogenicity and efficacy of an experimental AIDS vaccine based on recombinant vesicular stomatitis virus. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 21, 629-643.
 34. Suh, Y. S., Park, K. S., Sauermaun, U., Franz, M., Norley, S., Witting, S., Stoiber, H., Fagrouch, Z., Heeney, J., Hunsmann, G., Stahl-Hennig, C., Sung, Y. C. (2006) Reduction of viral loads by multigenic DNA priming and adenovirus boosting in the SIVmac-macaque model. *Vaccine* 24, 1811-1820.
 35. Boyer, J. D., Robinson, T. M., Maciag, P. C., Peng, X., Johnson, R. S., Pavlakis, G., Lewis, M. C., Shen, A., Siliciano, R., Brown, C. R., Weiner, D. B., Paterson, Y. (2005) DNA prime *Listeria* boost induces a cellular immune response to SIV antigens in the rhesus macaque model that is capable of limited suppression of SIV239 viral replication. *Virology* 335, 88-101.
 36. Bertley, F. M., Kozlowski, P. A., Wang, S. W., Chappelle, J., Patel, J., Sonuyi, O., Mazzara, G., Montefiori, D., Carville, A., Mansfield, K. G., Aldovini, A. (2004) Control of simian/human immunodeficiency virus viremia and disease progression after IL-2-augmented DNA-modified vaccinia virus Ankara nasal vaccination in nonhuman primates. *J. Immunol.* 172, 3745-3757.
 37. Horton, H., Vogel, T. U., Carter, D. K., Vielhuber, K., Fuller, D. H., Shipley, T., Fuller, J. T., Kunstman, K. J., Sutter, G., Montefiori, D. C., Erfle, V., Desrosiers, R. C., Wilson, N., Picker, L. J., Wolinsky, S. M., Wang, C., Allison, D. B., Watkins, D. I. (2002) Immunization of rhesus macaques with a DNA prime/modified vaccinia virus Ankara boost regimen induces broad simian immunodeficiency virus (SIV)-specific T-cell responses and reduces initial viral replication but does not prevent disease progression following challenge with pathogenic SIVmac239. *J. Virol.* 76, 7187-7202.
 38. Hel, Z., Nacsa, J., Trzniszewska, E., Tsai, W. P., Parks, R. W., Montefiori, D. C., Felber, B. K., Tartaglia, J., Pavlakis, G. N., Franchini, G. (2002) Containment of simian immunodeficiency virus infection in vaccinated macaques: correlation with the magnitude of virus-specific pre- and post-challenge CD4+ and CD8+ T cell responses. *J. Immunol.* 169, 4778-4787.
 39. Demberg, T., Boyer, J. D., Malkevich, N., Patterson, L. J., Venzon, D., Summers, E. L., Kalisz, I., Kalyanaram, V. S., Lee, E. M., Weiner, D. B., Robert-Guroff, M. (2008) Sequential priming with simian immunodeficiency virus (SIV) DNA vaccines, with or without encoded cytokines, and a replicating adenovirus-SIV recombinant followed by protein boosting does not control a pathogenic SIVmac251 mucosal challenge. *J. Virol.* 82, 10911-10921.
 40. Casimiro, D. R., Wang, F., Schleif, W. A., Liang, X., Zhang, Z. Q., Tobery, T. W., Davies, M. E., McDermott, A. B., O'Connor, D. H., Fridman, A., et al. (2005) Attenuation of simian immunodeficiency virus SIVmac239 infection by prophylactic immunization with DNA and recombinant adenoviral vaccine vectors expressing gag. *J. Virol.* 79, 15547-15555.
 41. Letvin, N. L., Mascola, J. R., Sun, Y., Gorgone, D. A., Buzby, A. P., Xu, L., Yang, Z. Y., Chakrabarti, B., Rao, S. S., Schmitz, J. E., Montefiori, D. C., Barker, B. R., Bookstein, F. L., Nabel, G. J. (2006) Preserved CD4+ central memory T cells and survival in vaccinated HIV-challenged monkeys. *Science* 312, 1530-1533.
 42. Liu, J., O'Brien, K. L., Lynch, D. M., Simmons, N. L., La Porte, A., Riggs, A. M., Abbink, P., Coffey, R. T., Grandpre, L. E., Seaman, M. S., Landucci, G., Forthal, D. N., Montefiori, D. C., Carville, A., Mansfield, K. G., Havganga, M. J., Pau, M. C., Goudsmit, J., Barouch, D. H. (2009) Immune control of an SIV challenge by a T-cell-based vaccine in rhesus monkeys. *Nature* 457, 87-91.
 43. Zhao, J., Pinczewski, J., Gomez-Roman, V. R., Venzon, D., Kalyanaram, V. S., Markham, P. D., Aldrich, K., Moake, M., Montefiori, D. C., Lou, Y., Pavlakis, G. N., Robert-Guroff, M. (2003) Improved protection of rhesus macaques against intrarectal simian immunodeficiency virus SIVmac251 challenge by a replication-competent AdShr-SIVenv/rev and AdShr-SIVgag recombinant priming/gp120 boosting regimen. *J. Virol.* 77, 8354-8365.
 44. McKenna, P. M., Koser, M. L., Carlson, K. R., Montefiori, D. C., Letvin, N. L., Papaneri, A. B., Pomerantz, R. J., Dietzschold, B., Silveira, P., McGettigan, J. P., Schnell, M. J. (2007) Highly attenuated rabies virus-based vaccine vectors expressing simian-human immunodeficiency virus89.6P env and simian immunodeficiency virusmac239 gag are safe in rhesus macaques and protect from an AIDS-like disease. *J. Infect. Dis.* 195, 980-988.

45. Hansen, S. G., Vieville, C., Whizin, N., Coyne-Johnson, L., Siess, D. C., Drummond, D. D., Legasse, A. W., Axthelm, M. K., Oswald, K., Trubey, C. M., Piatka Jr., M., Lifson, J. D., Nelson, J. A., Jarvis, M. A., Picker, L. J. (2009) Effector memory T cell responses are associated with protection of rhesus monkeys from mucosal simian immunodeficiency virus challenge. *Nat. Med.* 15, 293–299.
46. Barouch, D. H., Fu, T. M., Montefiori, D. C., Lewis, M. G., Shiver, J. W., Letvin, N. L. (2001) Vaccine-elicited immune responses prevent clinical AIDS in SHIV(89.6P)-infected rhesus monkeys. *Immunol. Lett.* 79, 57–61.
47. Doria-Rose, N. A., Ohlen, C., Polacino, P., Pierce, C. C., Hensel, M. T., Kuller, L., Mulvania, T., Anderson, D., Greenberg, P. D., Hu, S. L., Hatwood, N. L. (2003) Multigenic DNA priming/boosting vaccines protect macaques from acute CD4⁺-T-cell depletion after simian-human immunodeficiency virus SHIV89.6P mucosal challenge. *J. Virol.* 77, 11563–11577.
48. Egan, M. A., Chong, S. Y., Rose, N. F., Megati, S., Lopez, R. J., Schadeck, E. B., Johnson, J. E., Masood, A., Piacente, P., Drullhoff, R. E., Barras, P. W., Hasselchwerdt, D. L., Reilly, P., Mishkin, E. M., Montefiori, D. C., Lewis, M. G., Clarke, D. K., Hendry, R. M., Marx, P. A., Eldridge, J. H., Udem, S. A., Israel, Z. R., Rose, J. K. (2004) Immunogenicity of attenuated vesicular stomatitis virus vectors expressing HIV type 1 env and SIV gag proteins: comparison of intranasal and intramuscular vaccination routes. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 20, 989–1004.
49. Pultz, P. N., Sallwoth, J., Porter, D., Novak, M., Anderson, M. J., Morrow, C. D. (2003) Immunogenicity in pig-tailed macaques of poliovirus replicons expressing HIV-1 and SIV antigens and protection against SHIV-89.6P disease. *Virology* 315, 425–437.
50. Kim, J. J., Yang, J. S., Nottingham, L. K., Lee, D. J., Lee, M., Manson, K. H., Wyand, M. S., Boyer, J. D., Ugen, K. E., Weiner, D. B. (2001) Protection from immunodeficiency virus challenges in rhesus macaques by multicomponent DNA immunization. *Virology* 285, 204–217.
51. Lifson, J. D., Rossio, J. L., Piatka Jr., M., Bess Jr., J., Chertova, E., Schneider, D. K., Coalter, V. J., Poore, B., Kiser, R. F., Imming, R. J., Scarzello, A. J., Henderson, L. E., Alford, W. G., Hirsch, V. M., Benveniste, R. E., Arthur, L. O. (2004) Evaluation of the safety, immunogenicity, and protective efficacy of whole inactivated simian immunodeficiency virus (SIV) vaccines with conformationally and functionally intact envelope glycoproteins. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 20, 772–787.
52. Tang, Y., Villinger, F., Staprans, S. L., Amara, R. R., Smith, J. M., Herrndon, J. G., Robinson, H. L. (2002) Slowly declining levels of viral RNA and DNA in DNA/recombinant modified vaccinia virus Ankara-vaccinated macaques with controlled simian-human immunodeficiency virus SHIV-89.6P challenges. *J. Virol.* 76, 10147–10154.
53. Feinberg, M. B., Moore, J. P. (2002) AIDS vaccine models: challenging challenge viruses. *Nat. Med.* 8, 207–210.
54. Song, R. J., Chenine, A. L., Rasmussen, R. A., Ruprecht, C. R., Mirshahidi, S., Grison, R. D., Xu, W., Whitney, J. B., Goins, L. M., Ong, H. L., Li, P. L., Shai-Kobiler, E., Wang, T., McCann, C. M., Zhang, H., Wood, C., Kankasa, C., Secor, W. E., Masure, H. M., Strobert, E., Else, J. C., Ruprecht, R. M. (2006) Molecularely cloned SHIV-1157pΔ3N4: a highly replication-competent, mucosally transmissible R5 simian-human immunodeficiency virus encoding HIV-1 clade C env. *J. Virol.* 80, 8729–8738.
55. Viellard, V., Habib, R. E., Brochard, P., Delache, B., Bovento, H. F., Calvo, J., Mozin, J., Ficy, I., Martinon, F., Vasilin, B., Le Grand, R., Derbré, P. (2008) CCR5 or CXCR4 use influences the relationship between CD4 cell depletion, NkP44L expression and NK cytotoxicity in SHIV-infected macaques. *AIDS* 22, 185–192.
56. Crotty, S., Miller, C. J., Lohman, B. L., Neagu, M. R., Compton, L., Lu, D., Lu, F. X., Fritts, L., Lifson, J. D., Andino, R. (2001) Protection against simian immunodeficiency virus vaginal challenge by using Sabin poliovirus vectors. *J. Virol.* 75, 7438–7452.
57. Martinon, F., Brochard, P., Ripaux, M., Delache, B., Auregan, G., Vasilin, B., Le Grand, R. (2008) Improved protection against simian immunodeficiency virus mucosal challenge in macaques primed with a DNA vaccine and boosted with the recombinant modified vaccinia virus Ankara and recombinant Semliki Forest virus. *Vaccine* 26, 532–545.
58. Murphy, C. C., Lutes, W. T., Means, R. E., Czajak, S., Hale, C. L., Lifson, J. D., Kaur, A., Johnson, R. P., Knipe, D. M., Desrosiers, R. C. (2000) Vaccine protection against simian immunodeficiency virus by recombinant strains of herpes simplex virus. *J. Virol.* 74, 7745–7754.
59. Polacino, P., Stallard, V., Montefiori, D. C., Brown, C. R., Richardson, B. A., Morton, W. R., Benveniste, R. E., Hu, S. L. (1999) Protection of macaques against intrarectal infection by a simian immunization regimen with recombinant simian immunodeficiency virus SIVmac gp160 vaccines. *J. Virol.* 73, 3134–3146.
60. Zhou, Q., Hidayat, R., Peng, B., Venzon, D., Aldrich, M. K., Richardson, E., Lee, E. M., Kalyanaram, V. S., Grimes, G., Gomez-Roman, V. R., Summers, L. E., Malkevich, N., Robert-Guroff, M. (2007) Comparative evaluation of oral and intranasal priming with replication-competent adenovirus 5 host range mutant (dR) simian immunodeficiency virus (SIV) recombinant vaccines on immunogenicity and protective efficacy against SIV(mac251). *Vaccine* 25, 8021–8035.
61. Johnson, R. P., Desrosiers, R. C. (1998) Protective immunity induced by live attenuated simian immunodeficiency virus. *Curr. Opin. Immunol.* 10, 436–443.
62. Mansfield, K., Lang, S. M., Gauduin, M. C., Sanford, H. B., Lifson, J. D., Johnson, R. P., Desrosiers, R. C. (2008) Vaccine protection by live, attenuated simian immunodeficiency virus in the absence of high-titer antibody responses and high-frequency cellular immune responses measurable in the periphery. *J. Virol.* 82, 4135–4148.
63. Shacklett, B. L., Shaw, K. E., Adamson, L. A., Wilkens, D. T., Cox, C. A., Montefiori, D. C., Gardner, M. B., Sonigo, P., Luciw, P. A. (2002) Live, attenuated simian immunodeficiency virus SIVmac14, with point mutations in the env transmembrane protein intracytoplasmic domain, provides partial protection from mucosal challenge with pathogenic SIVmac251. *J. Virol.* 76, 11365–11378.
64. Ahmed, R. K., Nilsson, C., Wang, Y., Lehner, T., Biberfeld, G., Thorstenson, R. (1999) β-Chemokine production in macaques vaccinated with live attenuated virus correlates with protection against simian immunodeficiency virus (SIVm) challenge. *J. Gen. Virol.* 80, 1569–1574.
65. Clements, J. E., Montefiori, R. C., Zink, M. C., Amedee, A. M., Miller, S., Trichel, A. M., Jagerski, B., Hauer, D., Martin, L. N., Bohm, R. P., et al. (1995) Cross-protective immune responses induced in rhesus macaques by immunization with attenuated macrophage-tropic simian immunodeficiency virus. *J. Virol.* 69, 2737–2744.
66. McDermott, A. B., Mitchem, J., Piskowski, S., De Souza, I., Yant, L. J., Stephany, J., Furlatt, J., Watkins, D. I. (2004) Repeated low-dose mucosal simian immunodeficiency virus SIVmac239 challenge results in the same viral and immunological kinetics as high-dose challenge: a model for the evaluation of vaccine efficacy in nonhuman primates. *J. Virol.* 78, 3140–3144.
67. Lofredo, J. T., Friedrich, T. C., Leon, E. J., Stephany, J. J., Rodrigues, D. S., Spencer, S. P., Bean, A. T., Beal, D. R., Burwitz, B. J., Rudersdorf, R. A., Wallace, L. T., Piskowski, S. M., May, C. E., Sidney, J., Costick, E., Wilson, N. A., Price, D. A., Kallas, E. C., Piontowski, H., Hughes, A. L., Sette, A., Watkins, D. I. (2007) CD8⁺ T cells from SIV elite controller macaques recognize Mamu-B*08-bound epitopes and select for widespread viral variation. *PLoS ONE* 2, e1152.
68. Geopfert, P. A., Tomaras, G. D., Horton, H., Montefiori, D., Ferrari, G., Deers, M., Voss, G., Koutsoukos, M., Peduzzi, L., Vandepapele, P., McElrath, M. J., Spearman, P., Fuchs, J. D., Kohli, B. A., Blattner, W. A., Frey, S., Baden, L. R., Harro, C., Evans, T. (2007) Durable HIV-1 antibody and T-cell responses elicited by an adjuvanted multi-protein recombinant vaccine in uninfected human volunteers. *Vaccine* 25, 510–518.
69. Cries, E. T., Moore, P. L., Franti, M., Coanran, C. S., Zhu, P., Jiang, P., de Vries, R. P., Wiley, C., Zharikh, I., Schulke, N., Roux, K. H., Montefiori, D. C., Burton, D. R., Binley, J. M. (2007) A comparative immunogenicity study of HIV-1 virus-like particles bearing various forms of envelope proteins, particles bearing no envelope and soluble monomeric gp120. *Virology* 366, 245–262.
70. Brwe, A., Hallengard, D., Malm, M., Blazevic, V., Rollman, E., Stancu, L., Krohn, K. (2006) Combining DNA technologies and different modes of immunization for induction of humoral and cellular anti-HIV-1 immune responses. *Vaccine* 27, 184–186.
71. Huang, Y., Krasnitz, M., Rabadan, E., Witten, D. M., Song, Y., Levine, A. J., Ho, D. D., Robins, H. (2008) A recoding method to improve the humoral immune response to an HIV DNA vaccine. *PLoS ONE* 3, e3214.
72. Kennedy, J. S., Go, M., Green, S., Longtine, K., Longtine, J., O'Neill, M. A., Adams, J. P., Rothman, A. L., Yu, Q., Johnson-Leva, R., Pat, R., Wang, S., Lu, S., Markham, P. (2008) The safety and tolerability of an HIV-1 DNA prime-protein boost vaccine (DP6-001) in healthy adult volunteers. *Vaccine* 26, 4420–4424.
73. Megati, S., Garcia-Hand, D., Cappello, S., Roopchand, V., Masood, A., Xu, R., Luckay, A., Chong, S. Y., Rosati, M., Sackley, S., Weiner, D. B., Felber, B. K., Pavlakis, G. N., Israel, Z. R., Smith, L. R., Eldridge, J. H., Sidhu, M. K., Egan, M. A. (2008) Modifying the HIV-1 env gp160 gene to improve pDNA vaccine-elicited cell-mediated immune responses. *Vaccine* 26, 5083–5094.
74. Xu, R., Megati, S., Roopchand, V., Luckay, A., Masood, A., Garcia-Hand, D., Rosati, M., Weiner, D. B., Felber, B. K., Pavlakis, G. N., Sidhu, M. K., Eldridge, J. H., Egan, M. A. (2008) Comparative ability of various plasmid-based cytokines and chemokines to adjuvant the activity of HIV plasmid DNA vaccines. *Vaccine* 26, 4819–4829.
75. Yan, J., Hokey, D. A., Morrow, M. P., Corbett, N., Harris, K., Harris, D., Weiner, D. B. (2009) Novel SIVmac DNA vaccines encoding Env, Pol and Gag consensus proteins elicit strong cellular immune responses in cynomolgus macaques. *Vaccine* 27, 3260–3265.
76. Chen, Z., Huang, Y., Zhao, X., Ba, L., Zhang, W., Ho, D. D. (2008) Design, construction, and characterization of a multigenic modified vaccinia Ankara candidate vaccine against human immunodeficiency virus type 1 subtype C/B'. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 47, 412–421.
77. Lingner, M., Zuniga, A., Morin, T. N., Combariende, B., Marty, K., Wiegand, M., Iiter, O., Knuchel, M., Naim, H. Y. (2009) Recombinant measles virus expressing single or multiple antigens of human immunodeficiency virus (HIV-1) induce cellular and humoral immune responses. *Vaccine* 27, 3299–3305.

78. Slobod, K. S., Lockey, T. D., Howlett, N., Srinivas, R. V., Rencher, S. D., Freiden, P. J., Doherty, P. C., Hurwitz, J. L. (2004) Subcutaneous administration of a recombinant vaccinia virus vaccine expressing multiple envelope proteins of HIV-1. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 23, 106–110.
79. Tasis, N., Ertl, H. C. (2004) Adenoviruses as vaccine vectors. *Mol. Ther.* 10, 616–629.
80. Xin, K. Q., Urabe, M., Yang, J., Nomiyama, K., Mizutaki, M., Hamajima, K., Nomiyama, H., Saito, T., Imai, M., Monahan, J., Okuda, K., Ozawa, K., Okuda, K. (2001) A novel recombinant adeno-associated virus vaccine induces a long-term humoral immune response to human immunodeficiency virus. *Hum. Gene Ther.* 12, 1047–1061.
81. Guimaraes-Walker, A., Mackie, N., McCormack, S., Hanke, T., Schmidt, C., Gilmour, J., Barin, B., McMichael, A., Weber, J., Legg, K., Babiker, A., Hayes, P., Goeh, F., Smith, C., Dally, L., Dorrell, L., Gebere, J., Kay, R., Winston, N., Moore, S., Goentz, N., Fast, P. (2008) Vaccines from IAVI-006, a phase I clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of the pThr.HIVa DNA and MVA.HIVa vaccines in a prime-boost strategy to induce HIV-1 specific T-cell responses in healthy volunteers. *Vaccine* 26, 6671–6677.
82. Yu, S., Feng, X., Shu, T., Matano, T., Hasegawa, M., Wang, X., Ma, H., Li, H., Li, Z., Zeng, Y. (2008) Potent specific immune responses induced by prime-boost-boost strategies based on DNA, adenovirus, and Sendai virus vectors expressing gag gene of Chinese HIV-1 subtype B. *Vaccine* 26, 6124–6131.
83. Mulligan, M. J., Russell, N. D., Celum, C., Kahn, J., Noonan, E., Montefiori, D. C., Ferrari, G., Weinhold, K. J., Smith, J. M., Amara, R. K., Robinson, H. L. (2006) Excellent safety and tolerability of the human immunodeficiency virus type 1 pGAD₂/IS2 plasmid DNA priming vector vaccine in HIV type 1 uninfected adults. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 22, 678–683.
84. Barouch, D. H., Santra, S., Steenbeke, T. D., Zheng, X. X., Perry, H. C., Davies, M. A., Freed, D. C., Craiu, A., Strom, T. B., Shiver, J. W., Levin, N. L. (1998) Augmentation and suppression of immune responses to an HIV-1 DNA vaccine by plasmid cytokine/ligand administration. *J. Immunol.* 161, 1875–1882.
85. Jones, N. G., DeCamp, A., Gilbert, P., Peterson, M. L., Gurwith, M., Cao, H. (2009) AIDSvax immunization induces HIV-specific CD8⁺ T-cell responses in high-risk, HIV-negative volunteers who subsequently acquire HIV infection. *Vaccine* 27, 1136–1140.
86. Lindenburg, C. E., Stöle, L., Langendam, M. W., Miedema, F., Williams, I. G., Colebunders, R., Weber, J. N., Fisher, M., Coutinho, R. A. (2002) Long-term follow-up: no effect of therapeutic vaccination with HIV-1 p17/p24/Ty virus-like particles on HIV-1 disease progression. *Vaccine* 20, 2343–2347.
87. Johnson, P. R., Schneck, B. C., Connell, M. J., Rohne, D., Robinson, S., Krivulka, G. R., Lord, C. I., Zinn, R., Montefiori, D. C., Levin, N. L., Clark, K. B. (2005) Novel adeno-associated virus vector vaccine restricts replication of simian immunodeficiency virus in macaques. *J. Virol.* 79, 955–965.
88. Pinto, A. R., Fitzgerald, J. C., Giles-Davis, W., Gao, G. P., Wilson, J. M., Ertl, H. C. (2003) Induction of CD8⁺ T cells to an HIV-1 antigen through a prime boost regimen with heterologous E1-deleted adenoviral vaccine carriers. *J. Immunol.* 171, 6774–6779.
89. Fitzgerald, J. C., Gao, G. P., Reyes-Sandoval, A., Pavlakis, G. N., Xiang, Z. Q., Wladis, A. P., Giles-Davis, W., Wilson, J. M., Ertl, H. C. (2003) A simian replication-defective adenoviral recombinant vaccine to HIV-1 gag. *J. Immunol.* 170, 1416–1422.
90. Nanda, A., Lynch, D. M., Goudsmit, J., Lemckert, A. A., Ewald, B. A., Sumida, S. M., Truitt, D. M., Abbink, P., Kishko, M. G., Gorgone, D. A., Lifton, M. A., Shen, L., Carville, A., Mansfield, K. G., Havgens, M. J., Barouch, D. H. (2005) Immunogenicity of recombinant fiber-chimeric adenovirus serotype 35 vector-based vaccines in mice and rhesus monkeys. *J. Virol.* 79, 14161–14168.
91. Russell, N. D., Graham, B. S., Keefer, M. C., McElrath, M. J., Self, S. G., Weinhold, K. J., Montefiori, D. C., Ferrari, G., Horton, H., Tomaras, G. D., Gurnathan, S., Baghys, L., Frey, S. E., Mulligan, M. J., Harro, C. D., Buchbinder, S. P., Baden, L. R., Blattner, W. A., Koblin, B. A., Corey, L. (2007) Phase 2 study of an HIV-1 canarypox vaccine (vCP1452) alone and in combination with rgp120: negative results fail to trigger a phase 3 correlates trial. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 44, 203–212.
92. Emery, S., Workman, C., Puls, R. L., Bloch, M., Baker, D., Bodsworth, N., Anderson, J., Crowe, S. M., French, M. A., Hoy, J., Aichelburg, A., Ward, L. D., Boyle, D. B., Law, M. G., Kelleher, A. D., Cooper, D. A. (2005) Randomized, placebo-controlled, phase I/IIa evaluation of the safety and immunogenicity of fowlpox virus expressing HIV gag/pol and interferon- γ in HIV-1 infected subjects. *Hum. Gene Ther.* 1, 232–238.
93. Sealy, R., Slobod, K. S., Flynn, P., Branum, K., Surman, S., Jones, B., Freiden, P., Lockey, T., Howlett, N., Hurwitz, J. L. (2009) Preclinical and clinical development of a multi-envelope, DNA-virus-protein (D-V-P) HIV-1 vaccine. *Int. Rev. Immunol.* 28, 49–68.
94. Kawada, M., Tsukamoto, T., Yamamoto, H., hamoto, N., Kurihara, K., Takeda, A., Moriya, C., Takeuchi, H., Akari, H., Matano, T. (2008) Gag-specific cytotoxic T-lymphocyte-based control of primary simian immunodeficiency virus replication in a vaccine trial. *J. Virol.* 82, 10199–10206.
95. Guerbois, M., Moris, A., Combredet, C., Najburg, V., Ruffie, C., Fievrier, M., Cayet, N., Brandler, S., Schwartz, O., Tangy, F. (2009) Live attenuated measles vaccine expressing HIV-1 gag virus like particles covered with gp160 Δ VI2 is an strongly immunogenic. *Virology* 388, 191–203.
96. Berglund, P., Quesada-Rolander, M., Putkonen, P., Biberfeld, G., Thorenstrom, R., Liljestrom, P. (1997) Outcome of immunization of cynomolgus monkeys with recombinant Simliki Forest virus encoding human immunodeficiency virus type 1 envelope protein and challenge with a high dose of SHIV-4 virus. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 13, 1487–1495.
97. Williamson, C., Morris, L., Maughan, M. F., Ping, L. H., Dryga, S. A., Thomas, R., Reap, E. A., Gilliers, T., van Harmelen, J., Pascual, A., Ramjee, G., Gray, G., Johnston, R., Karim, S. A., Swanstrom, R. (2003) Characterization and selection of HIV-1 subtype C isolates for use in vaccine development. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 19, 133–144.
98. Chen, Y., Helmus, R., McClane, B., Hoffman, R., Watkins, S., Wehrli, T., Gupta, P. (2004) Use of a *Glaciobium perfringens* vector to express high levels of HIV p27 protein for the development of an oral HIV vaccine. *Virology* 329, 226–233.
99. Kawahara, M. (2008) Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG vector system expressing HIV gag protein stably and persistently induces antigen-specific humoral immune response concomitant with IFN- γ response, even at three years after immunization. *Clin. Immunol.* 129, 492–498.
100. Hovan, A. H., Cayabyab, M. J., Panas, M. W., Santra, S., Greenland, J., Geiben, R., Hayes, B. F., Jacobs Jr., W. R., Levin, N. L. (2007) Rapid memory CD8⁺ T-lymphocyte induction through priming with recombinant *Mycobacterium smegmatis*. *J. Virol.* 81, 74–83.
101. Jiang, S., Rasmussen, R. A., Nolan, K. M., Frankel, F. R., Lieberman, J., McClure, H. M., Williams, K. M., Babu, U. S., Raybourne, R. B., Strober, E., Ruprecht, R. M. (2007) Live attenuated *Listeria monocytogenes* expressing HIV gag: immunogenicity in rhesus monkeys. *Vaccine* 25, 7470–7479.
102. Kotton, C. N., Lankowski, A. J., Scott, N., Sisul, D., Chen, L. M., Raschke, K., Borders, G., Boaz, M., Spentzo, A., Galan, J. E., Hohmann, E. L. (2006) Safety and immunogenicity of attenuated *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* delivering an HIV-1 gag antigen via the *Salmonella* type III secretion system. *Vaccine* 24, 6216–6224.
103. Haglund, K., Leiner, L. K., Kerski, C., Buoncicco, L., Pamer, E., Rose, J. K. (2002) High-level primary CD8⁺ T-cell response to human immunodeficiency virus type 1 gag and env generated by vaccination with recombinant vesicular stomatitis viruses. *J. Virol.* 76, 2730–2738.
104. Levin, N. L., Huang, Y., Chakrabarti, B. K., Xu, L., Seaman, M. G., Beaudry, K., Korioth-Schmitz, B., Yu, F., Rohne, D., Martin, K. L., Miura, A., Kong, W. P., Yang, Z. Y., Gelman, R. S., Golubeva, O. G., Montefiori, D. C., Mascola, J. R., Nabel, G. J. (2004) Heterologous envelope immunogens contribute to AIDS vaccine protection in rhesus monkeys. *J. Virol.* 78, 7490–7497.
105. Mascola, J. R., Sambor, A., Beaudry, K., Santra, S., Welcher, B., Louder, M. K., Vancotti, T. C., Huang, Y., Chakrabarti, B. K., Kong, W. P., Yang, Z. Y., Xu, L., Montefiori, D. C., Nabel, G. J., Levin, N. L. (2005) Neutralizing antibodies elicited by immunization of monkeys with DNA plasmids and recombinant adenoviral vectors expressing human immunodeficiency virus type 1 proteins. *J. Virol.* 79, 771–779.
106. Robinson, H. L., Sharma, S., Zhao, J., Kannanganat, S., Lai, L., Chennareddi, L., Yu, T., Montefiori, D. C., Amara, R. K., Wyatt, L. S., Moss, B. (2007) Immunogenicity in macaques of the clinical product for a clade B DNA/MVA HIV vaccine: elicitation of IFN- γ , IL-2, and TNF- α producing CD4 and CD8 T cells. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 23, 1555–1562.
107. Lemckert, A. A., Grimbergen, J., Smits, S., Hartkoorn, E., Holterman, L., Berkhout, B., Barouch, D. H., Vogels, R., Quax, P., Goudsmit, J., Havgens, M. J. (2006) Generation of a novel replication-incompetent adenoviral vector derived from human adenovirus type 49: manufacture on PER.C6 cells, tropism and immunogenicity. *J. Gen. Virol.* 87, 2891–2899.
108. Liu, J., Ewald, B. A., Lynch, D. M., Denholtz, M., Abbink, P., Lemckert, A. A., Carville, A., Mansfield, K. G., Havgens, M. J., Goudsmit, J., Barouch, D. H. (2008) Magnitude and phenotype of cellular immune responses elicited by recombinant adenovirus vectors and heterologous prime-boost regimens in rhesus monkeys. *J. Virol.* 82, 4844–4852.
109. McCoy, K., Tasis, N., Korioth-Schmitz, B., Lasaro, M. O., Hensley, S. E., Lin, S. W., Li, Y., Giles-Davis, W., Cunn, A., Zhou, D., Xiang, Z., Levin, N. L., Ertl, H. C. (2007) Effect of preexisting immunity to adenovirus human serotype 5 antigens on the immune response of cellula immune primates to vaccine regimens based on human- or chimpanzee-derived adenovirus vectors. *J. Virol.* 81, 6594–6604.
110. Demberg, T., Flores, R. H., Heath, M. J., Larsen, K., Kalisz, I., Kalyanaram, V. S., Lee, E. M., Pal, R., Venzon, D., Grant, R., Patterson, L. J., Korioth-Schmitz, B., Buzby, A., Domingos, D., Montefiori, D. C., Levin, N. L., Garino, A., Enskli, B., Robert-Guroff, M. (2007) A replication-competent adenovirus/human immunodeficiency virus (Ad/HIV) tat and Ad/HIV env priming/Tat and envelope protein boosting regimen elicits enhanced protective efficacy against simian/human immunodeficiency

- ciency virus SHIV89.6P challenge in rhesus macaques. *J. Virol.* **81**, 3414–3427.
111. Patterson, L. J., Prince, G. A., Richardson, E., Alford, W. C., Kalyan, N., Roberts-Guroff, M. (2002) Insertion of HIV-1 genes into Ad4AE3 vector abrogates increased pathogenesis in cotton rats due to E3 deletion. *Virology* **292**, 107–113.
 112. Hoeks, D. A., Weiner, D. B. (2006) DNA vaccines for HIV: challenges and opportunities. *Springer Seminars Immunopathol.* **28**, 267–279.
 113. Rosati, M., Valentin, A., Jalah, R., Patel, V., von Cegerfeldt, A., Bergamaschi, C., Alicea, C., Weiss, D., Treece, J., Pal, R., Markham, P. D., Marques, E. T., August, J. T., Khan, A., Draghia-Akli, R., Felber, B. K., Pavlakis, G. N. (2008) Increased immune responses in rhesus macaques by DNA vaccination combined with electroporation. *Vaccine* **26**, 5223–5229.
 114. Sandstrom, E., Nilsson, C., Hejdeman, B., Brave, A., Bratt, G., Robb, M., Cox, J., Vancott, T., Marovich, M., Stout, R., Aboud, S., Bakari, M., Palangyo, K., Ljungberg, K., Moss, B., Earl, P., Michael, N., Bix, D., Mhalu, F., Wahren, B., Biberfeld, G. (2008) Broad immunogenicity of a multigenic, multiclade HIV-1 DNA vaccine boosted with heterologous HIV-1 recombinant modified vaccinia virus Ankara. *J. Infect. Dis.* **198**, 1482–1490.
 115. Jaoko, W., Nakwagala, F. N., Anzala, O., Manyoni, G. O., Birungi, J., Nanvubya, A., Bashir, F., Bhatt, K., Ogutu, H., Wakasiaka, S., et al. (2008) Safety and immunogenicity of recombinant low-dose HIV-1 A vaccine candidates vectored by plasmid pTH DNA of modified vaccinia virus Ankara (MVA) in humans in East Africa. *Vaccine* **26**, 2788–2795.
 116. Wang, S., Kennedy, J. S., West, K., Montefiori, D. C., Coley, S., Lawrence, J., Shen, S., Green, S., Rothman, A. L., Ennis, F. A., Arthos, J., Pal, R., Markham, P., Lu, S. (2008) Cross-subtype antibody and cellular immune responses induced by a polyvalent DNA prime-protein boost HIV-1 vaccine in healthy human volunteers. *Vaccine* **26**, 1098–1110.
 117. Graham, F. L., Prevec, L. (1992) Adenovirus-based expression vectors and recombinant vaccines. *Biotechnol.* **20**, 363–390.
 118. Shaw, G., Morse, S., Ararat, M., Graham, F. L. (2002) Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *FASEB J.* **16**, 869–871.
 119. Jones, D., Kroos, N., Anema, R., van Montfort, B., Vooyas, A., van der Kraats, S., van der Helm, E., Smits, S., Schouten, J., Brouwer, K., Lagerwerf, F., van Berkel, P., Opstelten, D. J., Loggenberg, T., Bout, A. (2003) High-level expression of recombinant IgG in the human cell line PER.C6. *Biotechnol. Prog.* **19**, 163–168.
 120. Tatis, N., Bjejer, A., Lasaro, M. O., Hensley, S. E., Cun, A., Tesema, L., Li, Y., Gao, G. P., Xiang, Z. Q., Zhou, D., Wilson, J. M., Ertl, H. C. (2007) A CD46-binding chimpanzee adenovirus vector as a vaccine carrier. *Mol. Ther.* **15**, 608–617.
 121. Orlando, J. S., Ormelles, D. A. (2002) E4orf5 variants with separate abilities to augment adenovirus replication and direct nuclear localization of the E1B 55-kilodalton protein. *J. Virol.* **76**, 1475–1487.
 122. Burgert, H. G., Ruzsics, Z., Obermeier, S., Hilgendorf, A., Windheim, M., Eising, A. (2002) Subversion of host defense mechanisms by adenoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **269**, 273–318.
 123. Tatis, N., Tesema, L., Robinson, E. R., Giles-Davis, W., McCoy, K., Gao, G. P., Wilson, J. M., Ertl, H. C. (2006) Chimpanzee-origin adenovirus vectors as vaccine carriers. *Gene Ther.* **13**, 421–429.
 124. Catanzaro, A. T., Koup, R. A., Koehler, M., Bailor, R. T., Enama, M. E., Moodie, Z., Gu, L., Martin, J. E., Novik, L., Chakrabarti, B. K., Butman, B. T., Gall, J. G., King, C. R., Andrews, C. A., Sheets, R., Gomez, P. L., Masciola, J. R., Nabel, G. J., Graham, B. S. (2006) Phase 1 safety and immunogenicity evaluation of a multiclade HIV-1 candidate vaccine delivered by a replication-defective recombinant adenovirus vector. *J. Infect. Dis.* **194**, 1638–1649.
 125. Shiver, J. W., Emini, E. A. (2004) Recent advances in the development of HIV-1 vaccines using replication-incompetent adenovirus vectors. *Annu. Rev. Med.* **55**, 355–372.
 126. Tatis, N., Fitzgerald, J. C., Reyes-Sandoval, A., Harris-McCoy, K. C., Hensley, S. E., Zhou, D., Lin, S. W., Bian, A., Xiang, Z. Q., Ipparraguirre, A., Lopez-Camacho, C., Wherry, E. J., Ertl, H. C. (2007) Adenoviral vectors persist in vivo and maintain activated CD8⁺ T cells: implications for their use as vaccines. *Blood* **110**, 1916–1923.
 127. Xiang, Z., Li, Y., Cun, A., Yang, W., Ellenberg, S., Switzer, W. M., Kalish, M. L., Ertl, H. C. (2006) Chimpanzee adenovirus antibodies in humans, sub-Saharan Africa. *Emerg. Infect. Dis.* **12**, 1596–1599.
 128. Farina, S. F., Gao, G. P., Xiang, Z. Q., Rux, J. J., Burnett, R. M., Ahira, M. R., Marsh, J., Ertl, H. C., Wilson, J. M. (2001) Replication-defective vector based on a chimpanzee adenovirus. *J. Virol.* **75**, 11603–11613.
 129. Rux, J. J., Kuser, P. R., Burnett, R. M. (2003) Structural and physico-chemical analysis of adenovirus hexons by use of high-resolution X-ray crystallographic, molecular modeling, and sequence-based methods. *J. Virol.* **77**, 9553–9566.
 130. Hensley, S. E., Giles-Davis, W., McCoy, K. C., Weninger, W., Ertl, H. C. (2005) Dendritic cell maturation, but not CD8⁺ T cell induction, is dependent on type I IFN signaling during vaccination with adenovirus vectors. *J. Immunol.* **175**, 6032–6041.
 131. Reyes-Sandoval, A., Fitzgerald, J. C., Grant, R., Roy, S., Xiang, Z. Q., Li, Y., Gao, G. P., Wilson, J. M., Ertl, H. C. (2004) Human immunodeficiency virus type 1-specific immune responses in primates upon sequential immunization with adenovirus vaccine carriers of human and simian serotypes. *J. Virol.* **78**, 7392–7399.
 132. Thorne, A. R., Lemckert, A., Goudsmit, J., Lynch, D. M., Ewald, B. A., Denholtz, M., Havenga, M. J., Barouch, D. H. (2006) Immunogenicity of heterologous recombinant adenovirus prime-boost vaccine regimens is enhanced by circumventing vector cross-reactivity. *J. Virol.* **80**, 12009–12016.
 133. Abbink, P., Lemckert, A. A., Ewald, B. A., Lynch, D. M., Denholtz, M., Smits, S., Holtermann, L., Damen, I., Vogels, R., Thorne, A. R., O'Brien, K. L., Carville, A., Mansfield, K. G., Goudsmit, J., Havenga, M. J., Barouch, D. H. (2007) Comparative seroprevalence and immunogenicity of six rare serotype recombinant adenovirus vaccine vectors from subgroups B and D. *J. Virol.* **81**, 4654–4663.
 134. Roberts, D. M., Nanda, A., Havenga, M. J., Abbink, P., Lynch, D. M., Ewald, B. A., Liu, J., Thorne, A. R., Swanson, P. E., Gorgone, D. A., Lifton, M. A., Lemckert, A. A., Holtermann, L., Chen, B., Dilraj, A., Carville, A., Mansfield, K. G., Goudsmit, J., Barouch, D. H. (2006) Hexon-chimeric adenovirus serotype 5 vectors circumvent pre-existing anti-vector immunity. *Nature* **441**, 239–243.
 135. Flynn, N. M., Forthal, D. N., Harro, C. D., Judson, F. N., Mayer, K. H., Para, M. F. (2005) Placebo-controlled phase 3 trial of a recombinant glycoprotein 120 vaccine to prevent HIV-1 infection. *J. Infect. Dis.* **191**, 654–665.
 136. Mehendale, S., van Lunzen, J., Clumeck, N., Rockstroh, J., Vees, E., Johnson, P. R., Anklesaria, F., Barin, B., Boaz, M., Kochhar, S., Lehman, J., Schmidt, C., Peeters, M., Schwarze-Zander, C., Kabamba, K., Glausinger, T., Sahay, S., Thakar, M., Paranjape, R., Gilmour, J., Excler, J. L., Fast, P., Heald, A. E. (2008) A phase 1 study to evaluate the safety and immunogenicity of a recombinant HIV type 1 subtype C adenovirus-associated virus vaccine. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **24**, 873–880.
 137. Peters, B. S., Jaoko, W., Vardas, E., Panayotakopoulos, C., Fast, P., Schmidt, C., Gilmour, J., Bogoshi, M., Omosa-Maniyoni, G., Dally, L., Klavinskis, L., Parah, B., Tarragona, T., Bart, P. A., Robinson, A., Pretorius, C., Stevens, W., Thomas, R., Barin, B., McMichael, A. J., McIntyre, J. A., Pantaleo, G., Hanke, T., Bwalya, J. (2007) Studies of a prophylactic HIV-1 vaccine candidate based on modified vaccinia virus Ankara (MVA) with and without DNA priming: effects of dosage and route on safety and immunogenicity. *Vaccine* **25**, 2120–2127.
 138. Hirao, L. A., Wu, L., Khan, A. S., Satschchidanand, A., Draghia-Akli, R., Weiner, D. B. (2008) Intradermal/subcutaneous immunization by electroporation improves plasmid vaccine delivery and potency in pigs and rhesus macaques. *Vaccine* **26**, 440–448.
 139. Lin, S. W., Hensley, S. E., Tatis, N., Lasaro, M. O., Ertl, H. C. (2007) Recombinant adenovirus-associated virus vectors induce functionally impaired transgene product-specific CD8⁺ T cells in mice. *J. Clin. Invest.* **117**, 3658–3670.
 140. Nerke-Nigam, S., Brown, A. E., Khamboonruang, C., Thongcharoen, P., Kumsal, P. (2006) HIV/AIDS preventive vaccine "prime-boost" phase III trial: foundations and initial lessons learned from Thailand. *AIDS* **20**, 1471–1479.
 141. Corey, L., McElrath, M. J., Kublin, J. G. (2009) Poststep modifications for research on HIV vaccines. *AIDS* **23**, 3–8.
 142. Cahery-Segard, H., Piatoux, C., Figueiredo, S., Igea, C., Surenaud, M., Gaston, J., Gras-Masse, H., Levy, J. P., Guillet, J. G. (2003) Long-term specific immune responses induced in humans by a human immunodeficiency virus type 1 lipopeptide vaccine: characterization of CD8⁺ T cell epitopes recognized. *J. Virol.* **77**, 11220–11231.
 143. Keeler, M. C., Wolff, M., Gorse, G. J., Graham, B. S., Corey, L., Clements-Mann, M. L., Verani-Ketter, N., Erb, S., Smith, C. M., Belshe, R. B., Wagner, L. J., McElrath, M. J., Schwartz, D. H., Fast, P. (1997) safety profile of phase I and II preventive HIV type 1 envelope vaccination: experience of the NIAID AIDS Vaccine Evaluation Group. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **13**, 1163–1177.
 144. Cleghorn, F., Pape, J. W., Schechter, M., Bartholomew, C., Sanchez, J., Jack, N., Metch, B. J., Hansen, M., Allen, M., Cao, H., Montefiori, D. C., Umara, G. D., Gurunathas, S., Eastman, D. J., do Lago, R. F., Jean, S., Lama, J. R., Lawrence, D. N., Wright, P. F. (2007) Lessons from a multisite international trial in the Caribbean and South America of an HIV-1 Canaropy vaccine (ALVAC-HIV vCP1452) with or without boosting with MN rgp120. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **46**, 222–230.
 145. McCormack, S., Stohr, W., Barber, T., Bart, P. A., Harari, A., Moog, C., Cunniffreda, D., Cellerei, C., Cowen, M., Gamboni, R., Burnett, S., Legg, K., Brodnicki, E., Wolf, H., Wagner, R., Heeney, J., Frachette, M. J., Tartaglia, J., Babiker, A., Pantaleo, G., Weber, J. (2008) EV02: a phase I trial to compare the safety and immunogenicity of HIV DNA-C prime-NYAC-C boost to NYAC-C alone. *Vaccine* **26**, 3162–3174.
 146. Priddy, F. H., Brown, D., Kublin, J., Monahan, K., Wright, D. P., Lalezari, J., Santiago, S., Marmor, M., Lally, M., Novak, R. M., Brown, S. J., Kulkarni, P., Dubey, S. A., Kierstead, L. S., Casimiro, D. R., Mogg, R.,

- DiNubile, M. J., Shiver, J. W., Leavitt, R. Y., Robertson, M. N., Mehrotra, D. V., Quirk, E. (2008) Safety and immunogenicity of a replication-incompetent adenovirus type 5 HIV-1 clade B gag/pol/nef vaccine in healthy adults. *Clin. Infect. Dis.* **46**, 1769–1781.
147. NIAID (2007) An update regarding the HVTN 502 and HVTN 503 HIV vaccine trials. http://www3.niaid.nih.gov/news/newsreleases/2007/step_update.htm.
148. NIAID (2008) An update concerning the HVTN 503/Phambili HIV vaccine study. http://www3.niaid.nih.gov/news/newsreleases/2008/hvn503_update.htm.
149. McElrath, M. J., De Rosa, S. C., Moodie, Z., Dubey, S., Kierstead, L., James, H., DeFawe, O. D., Carter, D. K., Hural, J., Akondy, R., Buchbinder, S. P., Robertson, M. N., Mehrotra, D. V., Self, S. G., Corey, L., Shiver, J. W., Casimiro, D. R. (2008) HIV-1 vaccine-induced immunity in the test-of-concept STEP Study: a case-cohort analysis. *Lancet* **372**, 1894–1905.
150. HVTN (2008) Reshaped scientific agenda involves understanding the clinical and immunological aspects of the Step trial. <http://www3.niaid.nih.gov/topics/HIV/AIDS/Research/vaccines/reports/hvtnoct2008.htm>.
151. Staprans, S. I., Barry, A. P., Silvestri, G., Safritz, J. T., Kozyr, N., Sumpter, B., Nguyen, H., McClure, H., Montefiori, D., Cohen, J. I., Feinberg, M. B. (2004) Enhanced SIV replication and accelerated progression to AIDS in macaques primed to mount a CD4 T cell response to the SIV envelope protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 13029–13031.
152. Brichacek, B., Swindells, S., Janoff, E. N., Pirruccello, S., Stevenson, M. (1996) Increased plasma human immunodeficiency virus type 1 burden following antigenic challenge with pneumococcal vaccine. *J. Infect. Dis.* **174**, 1191–1199.
153. Staprans, S. I., Hamilton, B. L., Follansbee, S. E., Elbeik, T., Barbosa, P., Grant, R. M., Feinberg, M. B. (1995) Activation of virus replication after vaccination of HIV-1-infected individuals. *J. Exp. Med.* **182**, 1727–1737.
154. Sullivan, P. S., Hanson, D. L., Dworkin, M. S., Jones, J. L., Ward, J. W. (2000) Effect of influenza vaccination on disease progression among HIV-infected persons. *AIDS* **14**, 2781–2785.
155. Veltrop-Duits, L. A., Heenskerk, B., Sombroek, C. C., van Vreeswijk, T., Gubbels, S., Toes, R. E., Melief, C. J., Franken, K. L., Havenga, M., van Tol, M. J., Schilham, M. W. (2006) Human CD4+ T cells stimulated by conserved adenovirus 5 hexon peptides recognize cells infected with different species of human adenovirus. *Eur. J. Immunol.* **36**, 2410–2423.
156. Cheng, S. M., Lee, S. G., Ronchetti-Blume, M., Virk, K. P., Mizutani, S., Eichberg, J. W., Davis, A., Hung, P. P., Hirsch, V. M., Chanock, R. M., et al. (1992) Coexpression of the simian immunodeficiency virus Env and Rev proteins by a recombinant human adenovirus host range mutant. *J. Virol.* **66**, 6721–6727.
157. NIAID (2008) NIAID Will Not Move Forward with the Pave 100 HIV Vaccine Trial. <http://www3.niaid.nih.gov/news/newsreleases/2008/pave100.htm>.
158. Zuckerman, A., Hamburger, Y., Spira, D. (1967) Active immunization of rats with a cell-free extract of the erythrocytic parasites of *Plasmodium berghei*. *Exp. Parasitol.* **21**, 84–97.

KEY WORDS:

correlates of protection • adenovirus vectors • STEP trial • animal models

PUBLICAÇÃO B – HAUT, L. H.; LIN, S. W.; TATSIS, N.; DiMENNA, L. J.; GILES-DAVIS, W.; PINTO, A. R.; ERTL, H. C. Robust genital Gag-specific CD8⁺ T cell responses in mice upon intramuscular immunization with simian adenoviral vectors expressing HIV-1-gag. **European Journal of Immunology**, v. 40, n. 12, p. 3426-3438, 2010.

Tipo de artigo: Pesquisa original. Artigo publicado em dezembro de 2010.

Robust genital gag-specific CD8⁺ T-cell responses in mice upon intramuscular immunization with simian adenoviral vectors expressing HIV-1-gag

Larissa H. Haut^{1,2}, Shih W. Lin³, Nia Tatsis⁴, Lauren J. DiMenna⁵, Wynetta Giles-Davis¹, Aguinaldo R. Pinto² and Hildegund C. J. Ertl¹

¹ Wistar Institute, Philadelphia, PA, USA

² Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

³ Harvard School of Public Health, Harvard University, Cambridge, MA, USA

⁴ Wyeth Pharmaceuticals, Collegeville, PA, USA

⁵ Weill Cornell Medical College, Cornell University, New York, NY, USA

Most studies on E1-deleted adenovirus (Ad) vectors as vaccine carriers for antigens of HIV-1 have focused on induction of central immune responses, although stimulation of mucosal immunity at the genital tract (GT), the primary port of entry of HIV-1, would also be highly desirable. In this study, different immunization protocols using chimpanzee-derived adenoviral (AdC) vectors expressing Gag of HIV-1 clade B given in heterologous prime-boost regimens were tested for induction of systemic and genital immune responses. Although i.n. immunization stimulated CD8⁺ T-cell responses that could be detected in the GT, this route induced only marginal cellular responses in systemic tissues and furthermore numbers of Gag-specific CD8⁺ T cells contracted sharply within a few weeks. On the contrary, i.m. immunization induced higher and more sustained frequencies of vaccine-induced cells which could be detected in the GT as well as systemic compartments. Antigen-specific CD8⁺ T cells could be detected 1 year after immunization in all compartments analyzed. Genital memory cells secreted IFN- γ , expressed high levels of CD103 and their phenotypes were consistent with a state of activation. Taken together, the results presented here show that i.m. vaccination with chimpanzee-derived (simian) adenovirus vectors is a suitable strategy to induce a long-lived genital CD8⁺ T-cell response.

Key words: Adenovirus · HIV · Mucosal · T cells



Supporting Information available online

Introduction

The efficacy of most vaccines is linked to their ability to induce neutralizing Ab (NAb). This approach has thus far been elusive

for vaccines to HIV-1 as the envelope proteins of this virus are heavily glycosylated [1], variable between isolates [2], and undergo structural changes during binding to their receptors and coreceptors [3]. Many HIV-1 vaccines currently in clinical or preclinical testing thus attempt to induce HIV-1-specific T cells to more conserved viral antigens [4].

HIV-1 is most commonly transmitted through sexual contact [5]. Women are infected at a higher rate than men and can pass

Correspondence: Dr. Hildegund C. J. Ertl
e-mail: ertl@wistar.upenn.edu

the virus to their offspring. One would assume that vaccine-induced CD8⁺ T cells at the port of entry, *i.e.* the genital tract (GT) would be crucial for early clearance of infected cells before HIV-1 spreads to LN and then to the intestinal tract, which provides a rich source of HIV-1 target cells [6]. Although our knowledge on T cells within the GALT is rapidly expanding, pertinent characteristics of T cells that home to the female GT remain understudied.

The HIV-1 vaccine efforts of our group have focused on chimpanzee-derived (simian) adenovirus (AdC) vectors that induce potent transgene product-specific B- and CD8⁺ T-cell responses in mice [7–9] and nonhuman primates [10]. NAb to AdC are rare in humans and do not cross-react with human serotypes of Ad. AdC-induced responses are sustained as the vector persists at low levels [11] and can be increased by heterologous prime-boost regimens [10, 12]. As we reported recently, *i.n.* administration of AdC elicits high frequencies of CD8⁺ T cells that home to the GT of female mice [13].

Here, we extended these studies and our results show that CD8⁺ T cells that home to the GT can be induced at high frequencies by both mucosal and *i.m.* immunizations. Briefly, *i.m.* immunization elicits stronger systemic and mucosal responses than *i.n.* or intravaginal (*i.vag.*) immunization. Genital CD8⁺ T cells express phenotypic markers indicative for activation, and most importantly, are fully functional; they proliferate and secrete cytokines upon reencounter of their cognate antigen.

Results

Frequencies of vaccine-induced CD8⁺ T cells

Responses were analyzed upon a single immunization of female BALB/c mice with AdC6gag given *i.m.*, *i.n.* or *i.vag.* Frequencies of gag-specific CD8⁺ T cells were determined by tetramer staining using a gag peptide- (AMQMLKETI) and H-2K^d-specific tetramer of cells isolated from spleens, blood, iliac LN (ILN), GT and nasal-associated lymphoid tissue (NALT) at different times after administration. For most experiments, samples from the GT-included cells from the vagina, cervix, uterus, uterine horns and ovaries. For some of the phenotypic analyses, cells from the vagina were isolated separately from the remaining GT, referred to as OUC (ovaries, uterus, uterine horns and cervix). Cells isolated from the same compartments of naïve mice were used as controls.

As reported previously [10] and shown in Fig. 1A, *i.m.* immunization induced a robust and sustained gag-specific CD8⁺ T-cell response in systemic compartments. Surprisingly, *i.m.* immunization induced high frequencies of gag-specific CD8⁺ T cells within the GT that by week 2 after vaccinations were close to 40% and by 10 wk were still above 10% of all CD8⁺ T cells. *i.n.* vaccination induced readily measurable responses within the GT and NALT, but only marginal responses in blood or spleens. *i.vag.* immunization was ineffective and only induced a low and

transient response in all tissues analyzed. Importantly, *i.n.* or *i.vag.* immunization induced lower frequencies of gag-specific CD8⁺ T cells within the GT than *i.m.* immunization. Differences in frequencies achieved by *i.m.* in comparison to *i.n.* or *i.vag.* immunization were statistically significant ($p < 0.05$) in spleens, blood, ILN and GT at all post-vaccination time points tested.

In the next set of experiments, prime-boost regimens were tested to establish whether systemic and mucosal CD8⁺ T-cell responses could be enhanced by a second immunization with a heterologous AdC vector expressing the same transgene product. For these experiments, mice were primed either *i.n.*, *i.m.* or *i.vag.* with AdC6gag. Six weeks later, they were boosted *i.n.*, *i.vag.* or *i.m.* (*i.m.* for the *i.m.*-primed group only) with AdC68gag. Frequencies of gag-specific CD8⁺ T cells were analyzed 2 wk before and 2 and 4 wk after the boost (Fig. 1B). GT and NALT were assessed after immunization with regimens inducing the highest responses against HIV-Gag in systemic compartments. Briefly, *i.m.*-primed/*i.m.*-boosted mice were also analyzed for frequencies of tet⁺CD8⁺ T cells at 1 year after booster immunization to determine the longevity of the response.

Vaginal booster immunization failed to increase frequencies of gag-specific CD8⁺ T cells in systemic compartments of *i.m.*-primed mice. However, *i.vag.* boost of *i.n.*-primed mice elicited an increase of frequencies in spleen and blood, although less pronounced than the *i.m./i.m.* regimen ($p < 0.05$). Frequencies were higher in spleen, blood, ILN and GT for the group receiving two doses through systemic routes in comparison to groups receiving at least one mucosal administration ($p < 0.05$). Within the GT, frequencies of gag-specific CD8⁺ T cells increased after *i.n./i.vag.* or *i.m./i.m.* regimens, being more pronounced in the group receiving the vectors systemically ($p < 0.01$). At 2 and 4 wk after the *i.m./i.m.* prime-boost immunization, frequencies at the GT exceeded those from blood ($p < 0.01$). At 1 year after the *i.m./i.m.* regimen, gag-specific CD8⁺ T cells could still be detected in the GT although frequencies were not statistically different from those in blood ($p < 0.05$) and had decreased compared with those detected at 4 wk after boost ($p < 0.05$). At that time, frequencies in spleens and ILN remained stable and those in blood decreased, presumably reflecting a loss of the more activated effector/effector memory cells ($p < 0.05$).

Cytokine secretion by gag-specific CD8⁺ T cells

To gain insight into functional properties of Gag-specific T cells, we conducted ELISpot assays for IFN- γ and IL-2. Figure 2A shows IFN- γ secretion by splenocytes isolated from mice that received AdC6gag *i.m.* Concomitantly with the ELISpot assays, cells were tested by flow cytometry to determine the frequencies of CD8⁺ T cells and results were normalized to reflect spots per 10⁶ CD8⁺ T cells. In the ELISpot assay, cells were stimulated with either the AMQMLKETI peptide, which carries an immunodominant MHC class I epitope of gag for H-2K^d mice or with a pool of peptides representing the entire Gag sequence. We observed no difference in the response and therefore conclude that, as observed previously,

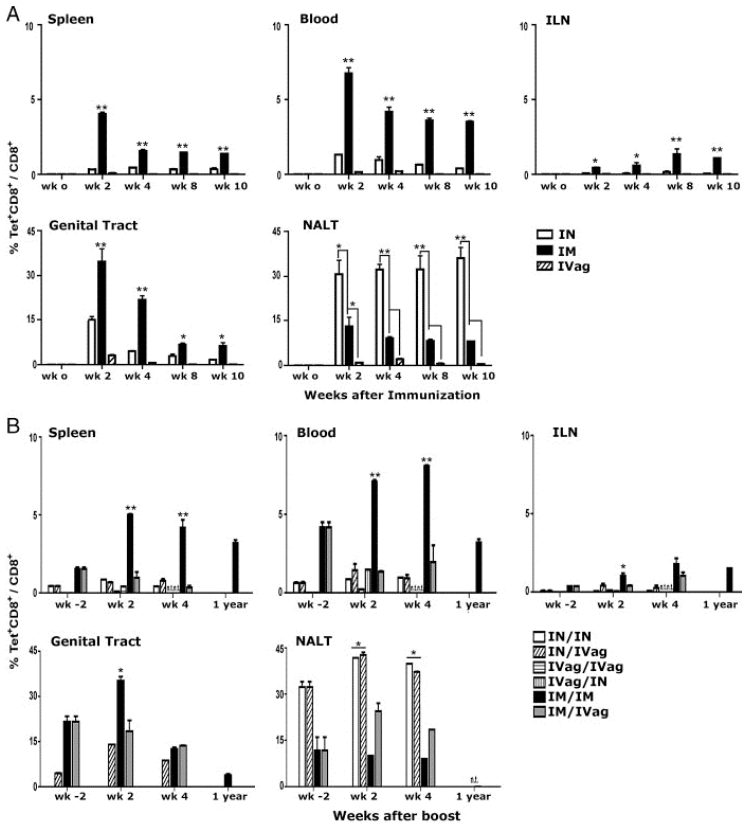


Figure 1. Frequencies of Gag-specific CD8⁺ T cells after administration of AdC vectors expressing HIV-1 gag. (A) Mice were immunized i.n. (open bars), i.m. (black bars) or i.vag. (striped bars) with AdC6gag. Cells from different tissues were analyzed at different time points thereafter, as indicated. Cells were stained with Ab to CD8 α , CD44 and specific tetramer and analyzed by flow cytometry. Graphs show frequencies of CD8⁺, tetramer⁺ T cells over total CD8⁺ cells. The wk 0 data show the average frequencies in naïve mice obtained for the different time points. (B) Mice were immunized i.vag., i.n. or i.m. with the AdC6gag vector, and boosted 6 wk later with the AdC6gag vector. Briefly, i.n.-primed mice were boosted i.n. (open bars) or i.vag. (angle-striped bars), i.vag.-primed mice were boosted i.vag. (horizontally striped bars) or i.n. (vertically striped bars), i.m.-primed mice were boosted i.vag. (gray bars) or i.m. (black bars). Cells from different tissues were analyzed in (B), 2 wk before the boost (wk -2), 2 and 4 wk post-boost, and for the i.m./i.m. regimen 1 year after the boost. Samples from ILN, GT and NALT were pooled from 5 to 20 mice, samples from spleen and blood were analyzed from five individual mice. Statistical analysis was performed using unpaired two-sample Student's *t*-test with $p < 0.01$ (**) and $p < 0.05$ (*). Columns show mean and \pm standard deviations upon comparison of three experiments conducted independently with groups of 20 mice for analysis of the GT and groups of five mice for the remaining tissues; n.t.: not tested.

our AdC-based vaccine induces mainly CD8⁺ T cells rather than CD4⁺ T cells [14] to the transgene product, and that Gag-specific CD8⁺ T cells in BALB/c mice are directed mainly to the AMQMLKETI peptide. Consequently, the use of this one peptide for stimulation of specific cells would be expected to detect the majority of Gag-specific CD8⁺ T cells in this mouse strain.

Independent of the route and number of immunizations, T cells isolated from different tissues preferentially produced IFN- γ ; significant numbers of IL-2-producing cells could not be detected (>55 spot-forming units (SFU)/ 10^6 lymphocytes). Examples for the results are shown in Fig. 2B, which presents data from mice immunized 2 wk earlier i.n. or i.m. with AdC6gag.

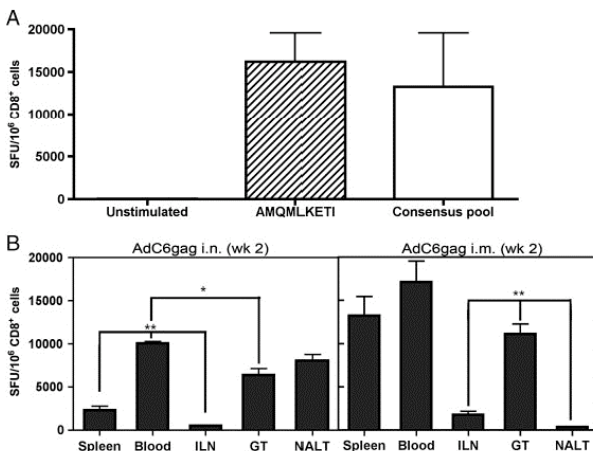


Figure 2. IFN- γ production by vaccine-induced Gag-specific CD8⁺ T cells. IFN- γ ELISpot assay was performed with splenocytes from (A) mice immunized i.m. with AdC6gag 2 wk earlier, and stimulated with the total pool of consensus Gag clade B in parallel to the AMQMLKETI peptide or (B) mice immunized i.n. or i.m. with the AdC6gag vector and tested 2 wk later. Each sample was tested in triplicate using the AMQMLKETI peptide as well as media controls for *in vitro* stimulation. Cells were also tested by flow cytometry to determine the frequencies of CD8⁺ T cells and results were normalized to reflect spots/10⁶ CD8⁺ cells. Data obtained with the control, which yielded <12 SFU for any of the samples, were subtracted from data obtained with the peptide. Statistical analysis was performed using unpaired two-sample Student's *t*-test with $p < 0.01$ (**) and $p < 0.05$ (*) and columns show mean and \pm standard deviations upon comparison of results from three experiments conducted independently with groups of ten mice for analysis of the GT and groups of five mice for the remaining tissues.

Similar results were obtained at later time points or after prime-boost regimens (data not shown). Numbers of IFN- γ -secreting cells were higher in spleen, blood, ILN and the GT upon i.m. immunization ($p < 0.05$). Although samples from the GT showed secretion of IFN- γ in response to the antigen, we had expected higher SFU numbers from this compartment based on the SFU numbers obtained by tetramer staining (higher in GT than in blood or spleen ($p < 0.05$) for both i.n. and i.m. administration). However, ELISpot assays showed significantly higher secretion of IFN- γ in blood than in GT for the i.n. group ($p < 0.05$) and comparable numbers for the i.m.-primed mice. It is feasible that cells from the GT or NALT secrete cytokines other than IFN- γ or IL-2 and therefore escaped detection by the ELISpot assays. Although this was not ruled out, we favor the explanation that vaccine-induced T cells from the GT and NALT are comparatively frail and thus more readily detected by staining procedures that do not require lengthy incubations. In order to further address this issue, mice were immunized with AdC6gag i.m. and tetramer frequencies were evaluated from cells isolated from the GT either directly without further culture, or after an overnight culture at 37°C with or without the specific peptide. Cells were stained with an Ab to CD8 α , the specific tetramer, a live cell dye and analyzed by flow cytometry. We observed pronounced cell death after overnight incubation of cells especially upon stimulation with the specific peptide; accordingly numbers of tet⁺CD8⁺ T cells

declined ~25- or 150-fold upon overnight *in vitro* culture in medium or the Gag peptide, respectively (data not shown).

Phenotypes of vaccine-induced CD8⁺ T cells

To elucidate potential differences between T cells isolated from distinct compartments, expression levels of CD44, CD27 (two lymphocyte activation markers), CD62L, an LN homing marker differentially expressed by effector and central memory cells, and $\alpha_4\beta_7$, an integrin that favors migration to the gut mucosa, were determined on tet⁺CD8⁺ T cells induced by AdC6gag. Figure 3A shows data for naive CD8⁺ lymphocytes compared with tet⁺CD8⁺ T cells 4 and 10 wk after a single i.n. immunization and 4 wk after a vaginal boost of i.n.-primed mice. Figure 3B shows data for CD8⁺ T cells tested 4 and 10 wk after i.m. priming, at 4 wk after a booster immunization of i.m.-primed mice given i.vag. or i.m., and at 1 year after an i.m./i.m. prime-boost regimen. In all experiments, tet⁺CD8⁺ T cells from immune mice were also analyzed and their phenotypes mirrored those of naive mice (data not shown).

Four weeks after i.n. immunization with AdC6gag, CD44 was upregulated on Gag-specific CD8⁺ T cells from spleens, blood, ILN and NALT (Fig. 3A). This increase was less pronounced on tet⁺CD8⁺ cells from the GT, presumably reflecting that most

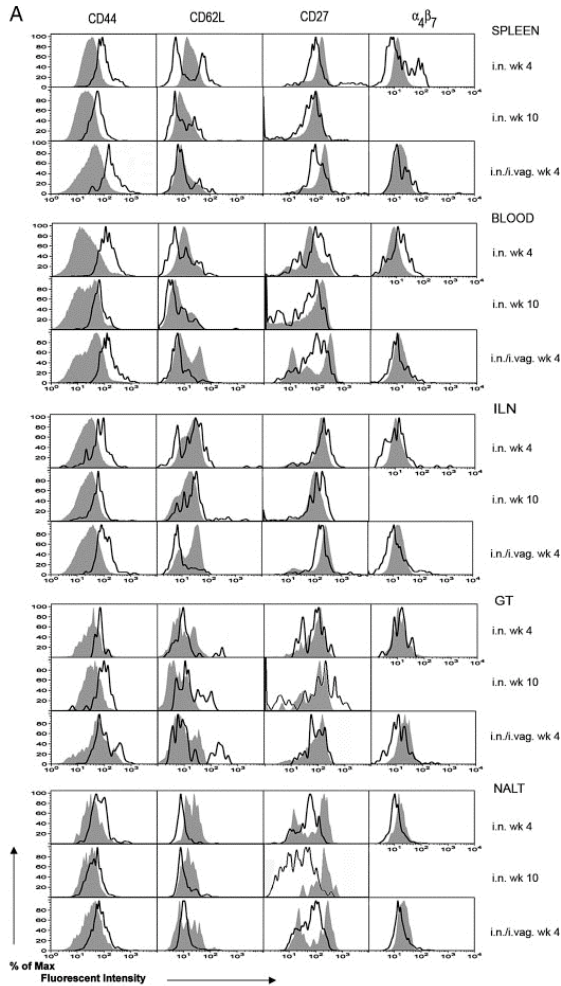


Figure 3. Phenotype analysis of Gag-specific CD8⁺ T cells upon mucosal or systemic administration of AdC vectors. Lymphocytes from different tissues were harvested, stained with Ab to CD8 α , CD44, CD62L, CD27 and α 4 β 7, and analyzed by flow cytometry. (A) Markers expression in mice that were vaccinated 4 or 10 wk earlier with AdC6gag given i.n., or that were primed i.n. with AdC6gag and boosted 4wk before the analysis with AdC6 β gag given i.vag. (B) Markers expression in mice that were vaccinated 4 or 10 wk earlier with AdC6gag given i.m., or that were primed i.m. with AdC6gag and then boosted with AdC6 β gag given i.m. or i.vag. 4 wk before the analysis. For i.m./i.m.-immunized mice, analyses were also performed 1 year after the booster immunization. Both graphs show the expression of the markers on tet⁺CD8⁺ from vaccinated mice (black lines) and tet⁺CD8⁺ cells from naive mice (gray areas). The results are representative of three experiments conducted independently with groups of 20 mice for analysis of the GT and groups of five mice for the remaining tissues.

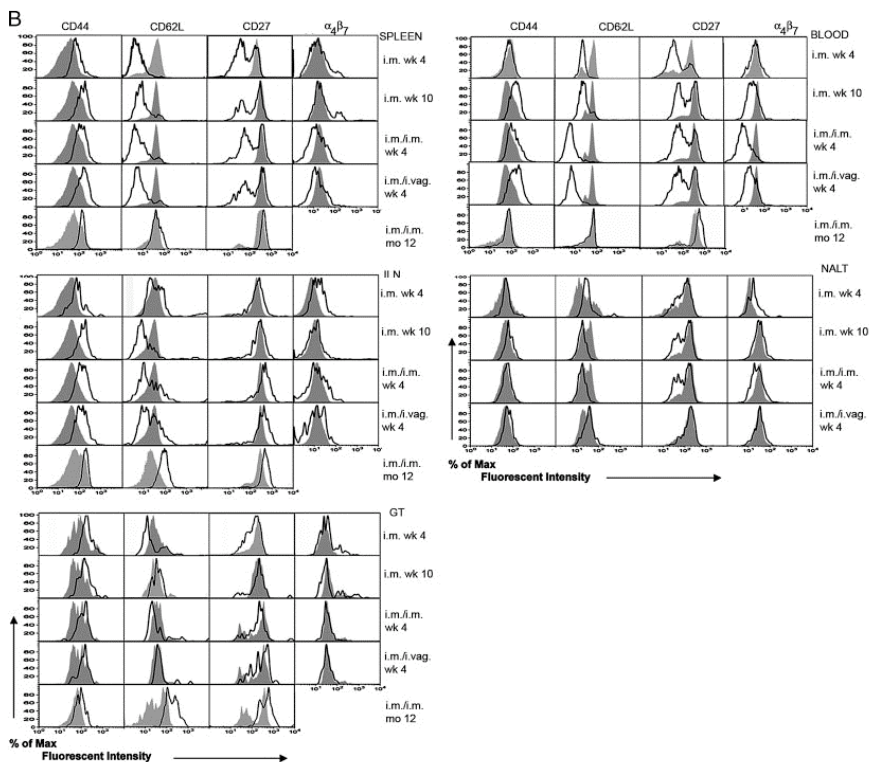


Figure 3. Continued

T cells from the GT were already antigen-experienced. Most of the tet⁺CD8⁺ T cells from the GT expressed comparable levels of CD62L although a small population was CD62L^{hi}. It should be pointed out that expression of CD62L was also low on most of the genital CD8⁺ T cells from naïve mice. Expression of $\alpha_4\beta_7$ was low on most cells except for a small population of tet⁺CD8⁺ T cells present in spleen and blood. The booster immunization did not have a pronounced effect on the expression of CD44, CD62L or CD27. $\alpha_4\beta_7$ expression was again increased on some of the tet⁺CD8⁺ T cells from spleens and ILN.

At 4 wk after i.m. immunization, CD44 expression was upregulated on tet⁺CD8⁺ T cells from spleens, ILN and GT (Fig. 3B). We detected a downregulation of CD62L expression on tet⁺CD8⁺ T cells from spleens, blood and the GT but not on those from ILN. CD27 expression was decreased on a subpopulation of tet⁺CD8⁺ T cells from blood, spleens and GT. At 4 wk after i.n. or i.vag.

boost, expression levels of CD44, CD62L, CD27 and $\alpha_4\beta_7$ mirrored those seen at 10 wk after priming, and there were no striking differences among groups that received an AdC6gag i.m. prime followed by a heterologous boost through the i.m. or i.vag. routes. At 1 year after the i.m. prime-boost vaccine regimen, expression of CD44 on tet⁺CD8⁺ T cells isolated from the different compartments (NALT was not tested in this experiment) overlapped with those seen on part of CD8⁺ T cells of age-matched naïve mice. This may reflect an increase of CD44 expression on the control CD8⁺ T cells due to immunosenescence [15]. Gag-specific CD8⁺ T cells isolated from the ILN and GT showed an increase in CD62L expression, which was unexpected for the latter compartment. In blood and spleen, expression of CD62L and CD27 was similar or only slightly increased above those seen on unprimed CD8⁺ T cells, suggesting that the Gag-specific CD8⁺ T cells had differentiated into resting memory cells.

Additional markers were analyzed on Gag-specific CD8⁺ T cells isolated from different compartments after an i.m./i.m. heterologous prime-boost regimen (Fig. 4). For the two

early time points, i.e. 4 wk after priming or boosting, cells isolated from the vaginal mucosa were treated and analyzed separately from OUC. CD44, CD62L and CD27 were

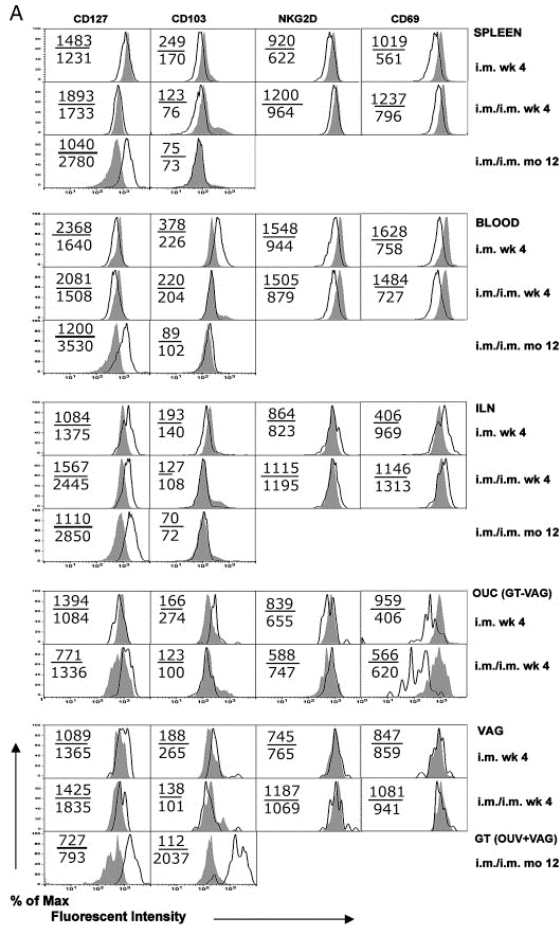


Figure 4. Phenotype of Gag-specific CD8⁺ T cells induced by i.m. administration of AdC vectors. Lymphocytes from different tissues were harvested and analyzed 4 wk after i.m. prime with AdC6gag vector, and 4 wk and 1 year after boost with the heterologous AdC6gag vector. Lymphocytes were stained with Ab to CD8 α , CD44, the tetramer and the markers indicated in the graphs, and analyzed by flow cytometry. (A) Expression of CD127, CD103, NKG2D and CD69. (B) Expression of lytic enzymes, CTLA-4, Ki-67 and PD-1. For the analysis of Gag-specific responses, cells were gated on CD8⁺, tetramer⁺ cells (black lines) and compared with tet⁻ CD8⁺ cells from naive mice (gray areas). Upper values show median fluorescence intensity for tetramer⁺ CD8⁺ cells from naive mice, lower values show median fluorescence intensity for tetramer⁺ CD8⁺ cells from vaccinated animals. The results are representative of three experiments conducted independently with groups of 20 mice for analysis of the GT and groups of five mice for the remaining tissues.

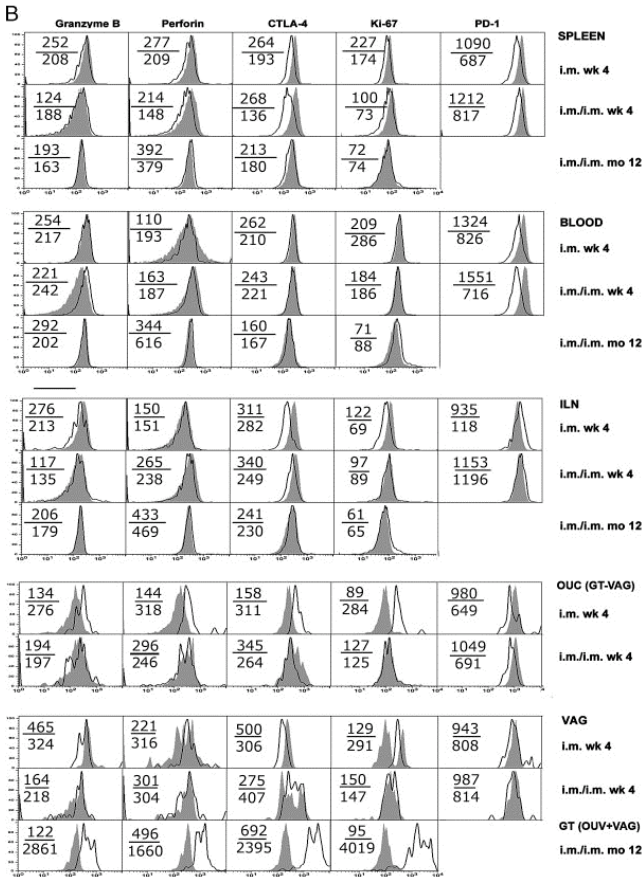


Figure 4. Continued

tested and found to mirror those shown in Fig. 3. Figure 4A shows the expression levels of CD69, an early activation marker enriched on mucosal cells derived from the intestinal tract, CD127, the IL-7 receptor that allows for homeostatic proliferation of memory CD8⁺ T cells through IL-7, CD103, also known as integrin $\alpha\beta$, which has been linked to infiltration of cells into epithelial tissues [16, 17] and NK group 2D (NKG2D), a transmembrane protein that acts as a primary activation receptor on NK cells and serves as a costimulator for CD8⁺ T cells [18].

By 4wk after i.m. prime or boost, CD69 was decreased on tet⁺ CD8⁺ T cells from spleens, blood and OUC, whereas its expression on the vagina was similar to that on unprimed CD8⁺ T cells. By 1 year after the boost, CD69 expression on tet⁺ CD8⁺ T cells from all compartments was similar to that of naive cells, suggesting that this molecule is unlikely to contribute for the sustained presence of vaccine-induced CD8⁺ T cells within the GT (data not shown). Expression of CD127 was increased on tet⁺ CD8⁺ T cells from ILN and the vagina at 4wk after priming. A similar pattern was observed at 4wk after the boost but for a

modest increase in OUC. By 1 year after the boost, CD127 expression was increased in $\text{tet}^+\text{CD8}^+$ T cells from all compartments, being especially pronounced in cells from GT.

The most striking difference in the expression of CD103 was seen at 1 year after the boost, when this marker was markedly upregulated on $\text{tet}^+\text{CD8}^+$ T cells from the GT, but otherwise comparable to naïve cells in the other compartments. No remarkable changes were seen in the profile of NKG2D on T cells from the compartments analyzed.

Figure 4B shows the expression levels of granzyme B, a proteolytic enzyme that induces caspase-dependent apoptosis, and perforin, a pore-forming protein that facilitates granzyme access through the membrane into the cytosol of the target cell [19]. In addition, Fig. 4B shows the expression levels for CTLA-4, a key molecule for downregulation of T-cell responses, programmed death-1 (PD-1), which negatively regulates T-cell signaling and effector functions and is expressed at increased levels on so-called exhausted T cells [20] and Ki-67, a protein associated with proliferation.

Expression of granzyme B mostly mirrored that of perforin, with a very pronounced increase in both enzymes in most $\text{tet}^+\text{CD8}^+$ T cells isolated from the whole GT at 1 year after the boost. Notably, the expression levels of other markers such as CD62L at the same time point suggest that T cells isolated from the GT had differentiated into resting memory cells. Memory CD8^+ T cells typically do not carry granzyme or perforin, which are markers for fully activated effector CD8^+ T cells.

CTLA-4 expression was decreased in $\text{tet}^+\text{CD8}^+$ T cells from spleens, ILN and vagina at 4 wk after the prime, whereas there was an increase in its expression on those from OUC. By 1 year after the boost, most $\text{tet}^+\text{CD8}^+$ T cells from the whole GT showed high levels of CTLA-4 expression, which was otherwise expressed at levels similar to those of unprimed CD8^+ T cells in other compartments. Further analysis showed that in the GT, cells that were high in CTLA-4 concomitantly expressed high levels of lytic enzymes (data not shown). By 1 year after the boost, Ki-67 levels were upregulated on the GT. Expression of PD-1 was largely unremarkable.

In summary, the most striking differences in phenotypes between $\text{tet}^+\text{CD8}^+$ T cells from blood and spleen in comparison to those from the GT and its draining LN were seen at 1 year after the i.m./i.m. prime-boost regimen. Subpopulations of $\text{tet}^+\text{CD8}^+$ T cells from the GT showed marked increases in the expression of CD103, CD127, CD62L, granzyme B, perforin, CTLA-4 and Ki-67 and thus clearly represented a stage of differentiation not seen in spleens or blood.

Origin of genital Gag-specific CD8^+ T cells

To gain insight into the origin of CD8^+ T cells that homed to the GT, we conducted adoptive transfer experiments. BALB/c donor mice were primed with AdC6gag and boosted with AdC68gag given i.m. Fourteen days post-boost, splenocytes were isolated from the vaccinated mice and frequencies of $\text{tet}^+\text{CD8}^+$ cells were

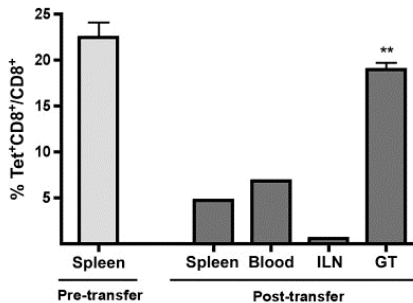


Figure 5. Migratory properties of adoptively transferred CD8^+ T cells. BALB/c mice were vaccinated with AdC6gag and boosted with AdC68gag. Fourteen days after the boost, splenocytes were isolated and transferred into naïve Thy1.1 recipient mice. Mice were euthanized 7 days later and samples were analyzed. Frequencies of Gag-specific CD8^+ T cells in the transferred splenocyte population and at day 7 after transfer in the different compartments of the recipient mice are shown. Cells were stained with Ab to CD8 α , CD44, CD90.1 and tetramer. For the analysis of Gag-specific responses, cells were gated on CD8^+ , CD90.1 and tetramer $^+$ cells. The results are representative of two experiments conducted independently with groups of ten mice. Statistical analysis was performed using unpaired two-sample Student's t-test with $p < 0.01$ (**).

determined (Fig. 5). The remaining cells were injected i.v. at 5×10^7 cells/mouse into naïve Thy1.1 congenic recipient mice. The recipient mice were euthanized 7 days later. As AdC vectors persist at very low levels in activated CD8^+ T cells [11], we cannot rule out transfer of the vectors in splenocytes of donor origin. However, it is unlikely that the minute amount of vector present in T cells of the donors would induce a detectable immune response in the host within the time frame of the experiment. Nevertheless, to ensure that the results were not biased by activation of host-derived T cells, we used a congenic mouse strain for the experiment, which allowed us to track cells of donor origin. As shown in Fig. 5, Gag-specific Thy1.1 $^+$ CD8^+ cells of donor origin could readily be detected in all compartments tested, including the GT. As seen after i.m. prime with AdC6gag (Fig. 1), frequencies of $\text{tet}^+\text{CD8}^+$ T cells were higher in the GT than in other compartments analyzed ($p < 0.01$). The results clearly show that Gag-specific CD8^+ T cells from spleens can migrate to and are enriched for in the GT. We tested $\text{tet}^+\text{CD8}^+$ cells from donor mice prior to transfer for expression of cell markers shown in Figs. 3 and 4. CD69 and CD103, two molecules that have been implicated on the phenotype of mucosa-derived cells [21, 22], were expressed at the same levels on $\text{tet}^+\text{CD8}^+$ cells from donor mice prior to transfer and in control cells, and were thus unlikely to have contributed to the enrichment of Gag-specific CD8^+ T cells within the GT. We also tested for the expression levels of these markers in $\text{tet}^+\text{CD8}^+$ cells of donor origin that had homed to the GT of recipient mice. Levels of CD69 again were similar to those on $\text{tet}^+\text{CD8}^+$ T cells, whereas CD103 was increased. This increase was only seen on $\text{tet}^+\text{CD8}^+$ cells

from the GT but not on those from other compartments, suggesting that this molecule becomes upregulated once CD8⁺ T cells home to the GT (data not shown).

Discussion

Women are most commonly infected by HIV-1 through heterosexual contact and immune mechanisms at or within the female GT would be expected to provide a crucial first barrier to transmission. As Ab that neutralize the countless HIV-1 variants remain elusive, many of the vaccines currently in clinical trials focus on the induction of HIV-1-specific CD8⁺ T cells. Such response cannot prevent the initial infection, but if present at the port of entry, might rapidly eliminate infected cells and thus thwart or potentially prevent spread of the virus.

We showed in mice that a homologous prime-boost regimen using AdC vectors expressing Gag induces transgene product-specific CD8⁺ T cells that could be isolated from the GT [13]. This previous article used intracellular cytokine staining assays, which may not be optimal for the study of the GT-derived lymphocytes. Here, we extended these studies testing different routes of immunization, more efficacious heterologous prime-boost regimens, and assessed migratory patterns of such cells.

It is known that nasal immunization is able to induce immune responses not only in the respiratory tract but also at the GT [23]. Results reported here show that CD8⁺ T cells, which home to the female GT, can be induced by i.n. immunization but this response is not sustained. In addition, vaginal booster immunization, as would be experienced in human vaccine recipients against HIV-1, causes only a slight local increase in i.n.-induced antigen-specific CD8⁺ T cells and fails to increase responses systemically. Last but not least, i.n. immunization may be problematic for some vectors as this route allows access of the vaccine into the central nervous system. In brief, i.vag. immunization, as reported by others [24], induces only very low levels of antigen-specific CD8⁺ T cells, which combined with logistic problems in humans should discourage further pursuit of this route of immunization for Ad vectors.

Results are more promising after i.m. immunization, which not only elicits antigen-specific CD8⁺ T cells in systemic tissues but also high and sustained responses within the GT, as also reported recently by another group [25]. A second immunization given i.m. causes a robust booster effect within the GT of i.m.-primed mice, and Gag-specific CD8⁺ T cells remain detectable for at least 1 year. i.m. immunization is thus overall superior at inducing genital CD8⁺ T cell responses by AdC vectors compared with i.n. immunization, and offers the added benefit of also eliciting potent systemic CD8⁺ T-cell responses, which may serve as a second layer of defense in case the virus breaks through the mucosal barrier. These findings are in agreement with a study in mice showing that i.p. infection with lymphocytic choriomeningitis virus is superior to i.n. infection for the induction of CD8⁺ T-cell responses in the vaginal mucosa [26]. Other reports reached similar conclusions upon vaccination with protein

vaccines [27], DNA vaccines [28] or DNA vaccines combined with Modified Vaccinia Ankara and Semliki Forest vectors [29]. Taken together, these results indicate that induction of CD8⁺ T-cell responses at mucosal sites upon i.m. immunization is independent of a given vaccine platform.

Antigen-experienced CD8⁺ T cells may traffic to the GT with the help of specific sensors that remain to be identified, or alternatively this process may be random. To gain further insight into the vaccine-induced CD8⁺ T cells that homed to the GT, we conducted a detailed phenotypical analysis of Gag-specific CD8⁺ T cells induced by the different immunization protocols, comparing cells isolated from spleen, blood, ILN and the GT at different times after immunization. In some assays, we also tested cells isolated from NALT; the latter were tested for comparison as a population of cells homing to a distinct mucosal site. Phenotypes of Gag-specific CD8⁺ T cells isolated from systemic sites and the GT were phenotypically distinct, and this was especially pronounced at 1 year after the i.m./i.m. prime-boost vaccine regimen. The phenotypes suggest that most tet⁺CD8⁺ T cells present in the GT remain fully activated and would be expected to start target cell lysis immediately upon encounter of infected cells.

We evaluated markers that are known to be upregulated on cells derived from the intestinal mucosa. Studies have demonstrated high levels of CD69 expression on intestinal CD8⁺ cells [22, 30], but expression of CD69 was not increased in the GT at any of the time points analyzed. Although $\alpha_4\beta_7$ has been linked to the genital migration of subsets of CD4⁺ cells [31], and is a well-known marker for homing of T cells to the intestinal mucosa, our results do not suggest that $\alpha_4\beta_7$ affects homing of CD8⁺ T cells to the GT. CD103 was slightly increased in tet⁺CD8⁺ T cells from the GT at early time points, and by 1 year after immunization became strongly upregulated. In the adoptive transfer experiment, CD103 was low on the Gag-specific CD8⁺ T cells isolated from the vaccinated donors and upon transfer remained low on cells isolated from all compartments but the GT, where an increase was observed. Again, these data argue against the notion that CD103 supports mucosal homing but rather suggest that CD103 may contribute to the retention of CD8⁺ T cells within the GT. The adoptive transfer experiment also showed that Gag-specific CD8⁺ T cells from the spleen could readily migrate to the GT to a similar extent as observed in vaccinated mice. This argues against the need for a distinct differentiation pathway during activation to allow for migration of CD8⁺ T cells to the mucosa, as had been described for T-cell homing to GALT [32] or for CD4⁺ T cells of the female GT [33]. On the other hand, the observation that at 2 wk upon i.m. immunization frequencies of Gag-specific CD8⁺ T cells were ~10-fold higher in blood but only ~2-fold higher in the GT than upon i.n. immunization argues for a deliberate homing process that is dictated by the conditions under which the CD8⁺ T cells are initially stimulated. We would therefore assume that migration of activated CD8⁺ T cells to the GT is in part random and affected by their overall frequencies in blood, and in part driven by the expression of yet to be identified homing markers. In either case, we would assume that activated

CD8⁺ T cells receive signals from the microenvironment that favor their retention once they reach the GT, leading to an enrichment of these cells at the mucosal surface, which is the port of entry for many pathogens.

The functionality of genital CD8⁺ T cells remains to be investigated in more depth. Our data thus far show that T cells from the GT produce IFN- γ but not IL-2 as has also been reported for genital T cells in SIV-infected non-human primates [34]. In our study, Gag-specific CD8⁺ T cells from the GT expressed high levels of granzyme B, perforin and Ki-67, which suggests that they are highly activated cells able to immediately commence target cell lysis and proliferation. Other authors have demonstrated atypical T cells within mucosal surfaces [22] and we speculate that the high levels of lytic enzymes seen in memory-type CD8⁺ T cells from the GT could be a result of a specific microenvironment.

In summary, data presented here show that i.m. immunization with a replication defective AdC vector in mice induces a robust transgene product-specific CD8⁺ T-cell response within the GT that can be enhanced by a booster immunization given i.m. The response is sustained and can still be detected 1 year after immunization. Vaccine-induced genital CD8⁺ T cells are functional; they carry lytic enzymes and release cytokines upon antigenic stimulation. Taken together, the results shown should allow for guarded optimism that potent vaccines administered i.m. may induce a genital barrier to HIV-1 infection in women. In fact, systemic regimens would be preferable over mucosal ones in humans due to the logistical factors and the lack of interference by flora or menstrual cycle, which may profoundly affect mucosal vaccine efficacy.

Materials and methods

Mice

Female 6- to 8-wk-old BALB/c mice were obtained from Ace Animals (Boyertown, PA). Female 6- to 8-wk-old Thy1.1 mice were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Animals were housed at the Animal Facility of The Wistar Institute (Philadelphia, PA) and all experiments were performed according to the institutionally approved protocols.

Viral vectors

Purified E1-deleted Ad vectors expressing Gag of HIV-1 clade B, derived from simian serotypes C6 (AdC6) or C68 (AdC68), were produced and quality controlled as described previously [8, 35].

Immunization of mice

Groups of 5–20 BALB/c mice were immunized by i.m. or mucosal routes with AdC vectors diluted to 10^{10} viral particles in sterile saline to a total volume of 10 μ L (i.n. and i.vag.) or 100 μ L (i.m.).

Mice were immunized i.m. by injection into the lower leg muscle, whereas mucosal immunization was given with an automatic pipette. For mucosal immunizations, *i.e.* i.n. or i.vag., mice were first anesthetized with ketamine and xylazine chloride given i.p. Five days before i.vag. immunization, mice were i.p. injected with 3 mg of medroxyprogesterone-acetate (Sigma-Aldrich). For prime-boost experiments, mice were boosted i.n., i.vag. or i.m. 6 wk after the first immunization.

Isolation of lymphocytes

Lymphocytes were isolated as described previously [36]. Briefly, blood was collected in heparin and red blood cells were lysed using ACK Lysing Buffer (Invitrogen). Spleens, ILN and NALT were dissociated against metal screens and washed with Leibovitch's L-15-modified medium (Mediatech). For isolation of lymphocytes from the GT, the vagina, cervix, uterus, uterine horns and ovaries were removed and cut into fragments. Tissue segments were submitted to constant shaking at 130 rpm for 1 h in RPMI 1640 (Mediatech) containing 5% FBS and 1% penicillin-streptomycin (Sigma-Aldrich). Fragments were enzymatically digested with 1.4 mg/mL of collagenase type I (Gibco) for 15 min. Cells from the two cycles were pooled and lymphocytes purified by a discontinuous Percoll gradient (Sigma-Aldrich) consisting of 40% fraction containing cells overlaid over a 70% fraction.

Adoptive transfer of lymphocytes

BALB/c mice were primed i.m. with AdC6gag and boosted 6 wk later with AdC68gag given i.m. Splenocytes were isolated 14 days later, and 5×10^7 splenocytes were injected *i.v.* into naïve Thy1.1 recipient mice. Tissues were analyzed for the presence of tet⁺ CD8⁺ donor cells 7 days after the transfer.

Tetramer staining, phenotypic analyses and flow cytometry

Staining was performed using a Gag peptide- (AMQMLKETT) and H-2K^d-specific tetramer (NIAID Tetramer Facility). For phenotyping, cells were incubated with the tetramer, and Ab to CD8 α , $\alpha_4\beta_7$, CD27, CD133 (BD Pharmingen), CD44, CD62L, PD-1 (Biolegend), CD69, CD127 and NKG2D (eBioscience). Cells were permeabilized with BD Cytofix/CytopermTM Fixation and Permeabilization Solution (BD Bioscience) and stained for granzyme B, Ki-67 (BD Pharmingen), CTLA-4 (RD Systems) and perforin (eBioscience). For transfer experiments, cells were also stained for CD90.1 (Thy 1.1) (BD Pharmingen). Prior to analysis, cells were fixed with BD Stabilizing Fixative (BD Bioscience). Flow cytometric analyses of cells were performed with a BD LSR II (Becton-Dickinson) flow cytometer. Data were analyzed using FlowJo V8.8 software (Tree Star). BD CompBeads Compensation Particles (Becton-Dickinson) were used to set distinct negative- and positive-stained populations

for the fluorochrome-labeled Ab used in the experiments. For the assessment of background and nonspecific activation, we immunized animals with AdC vectors expressing an unrelated transgene; phenotypes for those cells mirrored those from naïve groups, as did frequencies of tetramer⁺CD8⁺ T cells (data not shown). Samples were gated on live lymphoid cells, and then on CD8⁺ cells *versus* side scatter, followed by gating on CD8⁺ cells *versus* forward scatter. The remaining cells were then plotted as CD44 cells *versus* tetramer for further analysis.

ELISpot assay

IFN- γ and IL-2 ELISpot assays were performed with lymphocytes as described previously [10]. Briefly, 96-well Millipore polyvinylidene difluoride plates were coated with anti-mouse IFN- γ or IL-2 Ab (BD Pharmingen) diluted in PBS and incubated overnight at 4°C. Plates were then washed and blocked with 10% MLC media (DMEM supplemented with 10⁻⁶ M of 2-mercaptoethanol and 10% FBS) for 2 h at 37°C. Lymphocytes were added to plates at 2 \times 10⁵ cells per well in triplicates, and stimulated with the 9-mer peptide AMQMLKETI or the total pool of 123 15-mer peptides derived from consensus Gag clade B, in the presence of anti-mouse CD28 and CD49d (BD Pharmingen) for 18–20 h at 37°C in 10% CO₂. Cells were removed and plates incubated with biotin-labeled Ab (BD Pharmingen) for 2 h at room temperature. Streptavidin alkaline phosphatase (Mabtech AB) was added for 1 h, and the spots developed by adding BCIP/NBT (Pierce) for 5 min. Plates were washed in water and dried before counting using the C.T.L. Series 3A Analyzer and ImmunoSpot 3.2 (Cellular Technology). Data from unstimulated cells were used as background control, and values were subtracted from sample values before plotting. In parallel, cells were stained with an Ab to CD8 α and analyzed by flow cytometry to determine the frequencies of this cell subset. These results were used to normalize the data obtained by ELISpot assays and data show numbers of SFU/10⁶ CD8⁺ cells. Samples that resulted in less than 55 SFU/10⁶ cells were considered negative.

Statistical analysis

Each experiment was conducted repeatedly with 5–20 mice and figures show means and standard deviations based on the independent experiments. Statistical significance of differences between groups was calculated by unpaired two-sample Student's *t*-test using GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). The *p*-values of <0.05 or <0.01 were considered statistically significant.

Acknowledgements: The authors thank Christina Cole for assistance with preparation of the manuscript. This work was

supported by grant A1074078-01 from the National Institutes of Health, by Wistar Cancer Center Support Grant P30 CA 010815 from the National Cancer Institute, and by the Gates Foundation (GCGH). Partial support was also provided by CAPES and PNDST/Aids, Brazil.

Conflict of interest: The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

References

- Pikora, C. A., Glycosylation of the ENV spike of primate immunodeficiency viruses and antibody neutralization. *Curr. HIV Res.* 2004. 2: 243–254.
- Simmonds, P., Balfe, P., Ludlam, C. A., Bishop, J. O. and Brown, A. J., Analysis of sequence diversity in hypervariable regions of the external glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 1990. 64: 5840–5850.
- Jones, P. L., Korte, T. and Blumenthal, R., Conformational changes in cell surface HIV-1 envelope glycoproteins are triggered by cooperation between cell surface CD4 and co-receptors. *J. Biol. Chem.* 1998. 273: 404–409.
- McMichael, A. J., HIV vaccines. *Annu. Rev. Immunol.* 2006. 24: 227–255.
- Chan, D. J., Fatal attraction: sex, sexually transmitted infections and HIV-1. *Int. J. STD AIDS* 2006. 17: 643–651.
- Centlivre, M., Sala, M., Wain-Hobson, S. and Berkhout, B., In HIV-1 pathogenesis the die is cast during primary infection. *AIDS* 2007. 21: 1–11.
- Fitzgerald, J. C., Gao, G. P., Reyes-Sandoval, A., Pavlakis, G. N., Xiang, Z. Q., Wlazlo, A. P., Giles-Davis, W. et al., A simian replication-defective adenoviral recombinant vaccine to HIV-1. *gag*. *J. Immunol.* 2003. 170: 1416–1422.
- Pinto, A. R., Fitzgerald, J. C., Giles-Davis, W., Gao, G. P., Wilson, J. M. and Ertl, H. C., Induction of CD8⁺T cells to an HIV-1 antigen through a prime boost regimen with heterologous E1-deleted adenoviral vaccine carriers. *J. Immunol.* 2003. 171: 6774–6779.
- Xiang, Z., Gao, G., Reyes-Sandoval, A., Cohen, C. J., Li, Y., Bergelson, J. M., Wilson, J. M. and Ertl, H. C., Novel, chimpanzee serotype 68-based adenoviral vaccine carrier for induction of antibodies to a transgene product. *J. Virol.* 2002. 76: 2667–2675.
- Reyes-Sandoval, A., Fitzgerald, J. C., Grant, R., Roy, S., Xiang, Z. Q., Li, Y., Gao, G. P. et al., Human immunodeficiency virus type 1-specific immune responses in primates upon sequential immunization with adenoviral vaccine carriers of human and simian serotypes. *J. Virol.* 2004. 78: 7392–7399.
- Tatsis, N., Fitzgerald, J. C., Reyes-Sandoval, A., Harris-McCoy, K. C., Hensley, S. E., Zhou, D., Lin, S. W. et al., Adenoviral vectors persist *in vivo* and maintain activated CD8⁺T cells: implications for their use as vaccines. *Blood* 2007. 110: 1916–1923.
- Tatsis, N., Lin, S. W., Harris-McCoy, K., Garber, D. A., Feinberg, M. B. and Ertl, H. C., Multiple immunizations with adenovirus and MVA vectors improve CD8⁺T cell functionality and mucosal homing. *Virology* 2007. 367: 156–167.
- de Souza, A. P., Haut, L. H., Silva, R., Ferreira, S. I., Zanetti, C. R., Ertl, H. C. and Pinto, A. R., Genital CD8⁺T cell response to HIV-1 gag in mice immunized by mucosal routes with a recombinant simian adenovirus. *Vaccine* 2007. 25: 109–116.

- 14 Tatsis, N. and Ertl, H. C., Adenoviruses as vaccine vectors. *Mol. Ther.* 2004. 10: 616–629.
- 15 Ernst, D. N., Weigle, W. O., Noonan, D. J., McQuitty, D. N. and Hobbs, M. V., The age-associated increase in IFN- γ synthesis by mouse CD8⁺T cells correlates with shifts in the frequencies of cell subsets defined by membrane CD44, CD45RB, 3G11, and MEL-14 expression. *J. Immunol.* 1993. 151: 575–587.
- 16 Karcela, P. I., Bowden, S. J., Green, S. J. and Kilshaw, P. J., Recognition of E-cadherin on epithelial cells by the mucosal T cell integrin α M290 beta 7 (α E beta 7). *Eur. J. Immunol.* 1995. 25: 852–856.
- 17 Cepek, K. L., Shaw, S. K., Parker, C. M., Russell, G. J., Morrow, J. S., Rimm, D. L. and Brenner, M. B., Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the α E beta 7 integrin. *Nature* 1994. 372: 190–193.
- 18 Raulet, D. H., Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat. Rev. Immunol.* 2003. 3: 781–790.
- 19 Cullen, S. P. and Martin, S. J., Mechanisms of granule-dependent killing. *Cell Death Differ.* 2008. 15: 251–262.
- 20 Keir, M. E., Butte, M. J., Freeman, G. J. and Sharpe, A. H., PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 2008. 26: 677–704.
- 21 Johansson-Lindbom, B. and Agace, W. W., Generation of gut-homing T cells and their localization to the small intestinal mucosa. *Immunol. Rev.* 2007. 215: 226–242.
- 22 Klein, J. R., T-cell activation in the curious world of the intestinal intraepithelial lymphocyte. *Immunol. Res.* 2004. 30: 327–337.
- 23 Holmgren, J. and Czerkinsky, C., Mucosal immunity and vaccines. *Nat. Med.* 2005. 11: S45–S53.
- 24 Gupta, S., Janani, R., Bin, Q., Luciw, P., Greer, C., Perri, S., Legg, H. et al., Characterization of human immunodeficiency virus Gag-specific gamma interferon-expressing cells following protective mucosal immunization with alphavirus replicon particles. *J. Virol.* 2005. 79: 7135–7145.
- 25 Kaufman, D. R., Liu, J., Carville, A., Mansfield, K. G., Havenga, M. J., Goudsmit, J. and Barouch, D. H., Trafficking of antigen-specific CD8⁺T lymphocytes to mucosal surfaces following intramuscular vaccination. *J. Immunol.* 2008. 181: 4188–4198.
- 26 Suvas, P. K., Dech, H. M., Sambira, F., Zeng, J. and Onami, T. M., Systemic and mucosal infection program protective memory CD8⁺T cells in the vaginal mucosa. *J. Immunol.* 2007. 179: 8122–8127.
- 27 Barnett, S. W., Srivastava, I. K., Kan, E., Zhou, F., Goodsell, A., Cristillo, A. D., Ferrai, M. G. et al., Protection of macaques against vaginal SHV challenge by systemic or mucosal and systemic vaccinations with HIV-envelope. *AIDS* 2008. 22: 339–348.
- 28 Wu, H., Dennis, V. A., Pillai, S. R. and Singh, S. R., RSV fusion (F) protein DNA vaccine provides partial protection against viral infection. *Virus Res.* 2009. 145: 39–47.
- 29 Martinon, F., Brochard, P., Ripaux, M., Delache, B., Auregan, G., Vasin, B. and Le Grand, R., Improved protection against simian immunodeficiency virus mucosal challenge in macaques primed with a DNA vaccine and boosted with the recombinant modified vaccinia virus Ankara and recombinant Semliki Forest virus. *Vaccine* 2008. 26: 532–545.
- 30 Kuo, S., El Guindy, A., Panwala, C. M., Hagan, P. M. and Camerini, V., Differential appearance of T cell subsets in the large and small intestine of neonatal mice. *Pediatr. Res.* 2001. 49: 543–551.
- 31 Hawkins, R. A., Rank, R. G. and Kelly, K. A., Expression of mucosal homing receptor α 4beta7 is associated with enhanced migration to the Chlamydia-infected murine genital mucosa in vivo. *Infect. Immun.* 2000. 68: 5587–5594.
- 32 Svensson, M., Johansson-Lindbom, B., Zapata, F., Jaensson, E., Austenaa, L. M., Blomhoff, R. and Agace, W. W., Retinoic acid receptor signaling levels and antigen dose regulate gut homing receptor expression on CD8⁺T cells. *Mucosal. Immunol.* 2008. 1: 38–48.
- 33 Ibragimov, A. R., Sacco, R. E., Sandor, M., Iakoubov, I. Z. and Lynch, R. G., Resident CD4⁺ α 4beta7 T cells of the murine female genital tract: a phenotypically distinct T cell lineage that rapidly proliferates in response to systemic T cell activation stimuli. *Int. Immunol.* 1995. 7: 1763–1769.
- 34 Stevecva, L., Kelsall, B., Nacs, J., Moniuszko, M., Hel, Z., Tryniszewska, E. and Franchini, G., Cervicovaginal lamina propria lymphocytes: phenotypic characterization and their importance in cytotoxic T-lymphocyte responses to simian immunodeficiency virus SIVmac251. *J. Virol.* 2002. 76: 9–18.
- 35 Roy, S., Gao, G., Lu, Y., Zhou, X., Lock, M., Calcedo, R. and Wilson, J. M., Characterization of a family of chimpanzee adenoviruses and development of molecular clones for gene transfer vectors. *Hum. Gene Ther.* 2004. 15: 519–530.
- 36 Xiang, Z. Q., Gao, G. P., Reyes-Sandoval, A., Li, Y., Wilson, J. M. and Ertl, H. C., Oral vaccination of mice with adenoviral vectors is not impaired by preexisting immunity to the vaccine carrier. *J. Virol.* 2003. 77: 10780–10789.

Abbreviations: Ad: adenovirus · AdC: chimpanzee-derived (simian) adenovirus · GT: genital tract · ILN: iliac LN · Lvag: intravaginal · NAb: neutralising antibody · NALT: nasal-associated lymphoid tissue · NKG2D: NK group 2D · OUC: ovaries, uterus, uterine horns and cervix · PD-1: programmed death-1 · SFU: spot-forming units

Full correspondence: Dr. Hildegund C. J. Ertl, The Wistar Institute, 3601 Spruce St, Philadelphia, PA 19104, USA
Fax: +1-215-898-3868
e-mail: ertl@wistar.upenn.edu

Received: 24/2/2010
Revised: 9/7/2010
Accepted: 3/9/2010
Accepted article online: 21/9/2010

PUBLICAÇÃO C – **HAUT, L. H.**; RATCLIFFE, S.; PINTO, A. R.; ERTL, H. C. Effect of pre-existing immunity to adenovirus on transgene product-specific genital T cell responses upon vaccination of mice with a homologous vector. **Journal of Infectious Diseases**, v. 203, n. 8, p. 1073-1081, 2011.

Tipo de artigo: Pesquisa original. Artigo publicado em abril de 2011.

Effect of Preexisting Immunity to Adenovirus on Transgene Product–Specific Genital T Cell Responses on Vaccination of Mice With a Homologous Vector

Larissa Herkenhoff Haut,^{1,3} Sarah Ratcliffe,² Aguinaldo Roberto Pinto,³ and Hildegund Ertl¹

¹Immunology Program, Wistar Institute, and ²Department of Biostatistics and Epidemiology, University of Pennsylvania, Philadelphia; and ³Laboratório de Imunologia Aplicada, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

We evaluated changes in global and human immunodeficiency virus (HIV)–specific genital T cells after vaccination of female mice with a replication-defective adenovirus vector of human serotype 5 (AdHu5) expressing Gag protein of HIV-1, in the presence or absence of preexisting immunity to the vaccine carrier. Our data show that preexisting immunity causes a rapid and transient decrease of genital CD4⁺ T cells without increasing the expression of chemokine (C-C motif) receptor 5. Furthermore, preexposure to AdHu5 affects long-term alterations in the magnitude and quality of vaccine-induced Gag-specific CD8⁺ T cell responses. AdHu5-specific antibodies interfere with the induction of transgene product–specific CD8⁺ T cell responses in systemic compartments, whereas some mechanism other than antibodies also seems to affect those that home to the genital tract.

In 2 phase IIb clinical trials (Step and Phambili trials), vaccination with an adenovirus (Ad) vector of human serotype 5 (AdHu5) expressing antigens of human immunodeficiency virus (HIV) induced potent T cell responses but failed to reduce transmission rates or significantly lower viral loads in individuals who became infected [1]. A number of hypotheses were formulated to explain the failure of the potent AdHu5 vaccine and the paradoxical increase in HIV-1 acquisition in male vaccine recipients with preexisting neutralizing antibodies to the vaccine carrier. Lack of protection by the AdHu5 vaccine designed to elicit T cell responses to

conserved antigens of HIV-1 was largely attributed to lack of induction of HIV-1 specific antibodies and to the stimulation of a very narrow T cell response [2].

The increase in HIV-1 acquisition in males with circulating neutralizing antibodies to AdHu5 virus was especially worrisome, because it would preclude future use of AdHu5 vectors as vaccine carriers for any pathogen intended for vaccination of adults at risk for HIV-1 acquisition. AdHu5 infects most humans during childhood and up to 90% of humans residing in Sub-Saharan Africa carry neutralizing antibodies to this virus [3, 4]. Specific neutralizing antibodies prevent transduction of cells by AdHu5 vectors and thus expression of the transgene product, which in turn reduces the adaptive immune response to the vaccine antigen [5, 6].

In the Step trial, the increase in HIV-1 acquisition in men who were AdHu5 seropositive before vaccination may have been a reflection of confounding variables, such as circumcision status [7] or coinfections with other genital pathogens [8]. Others have argued that neutralizing antibodies were a surrogate marker for elevated numbers of memory CD4⁺ T cells to AdHu5

Received 2 September 2010; accepted 17 November 2010.

Potential conflicts of interest: none reported.

Reprints or correspondence: Hildegund Ertl, MD, Department of Immunology Program, Wistar Institute, 3801 Spruce St, Philadelphia, PA 19104-4298 (ertl@wistar.upenn.edu).

The Journal of Infectious Diseases 2011;203:1073–81

© The Author 2011. Published by Oxford University Press on behalf of the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com
1537-6613/2011/2038-1073\$15.00
DOI: 10.1093/infdis/jiq161

virus, which expanded after vaccination and on migration to the mucosa of the genital tract or the rectum provided additional targets for HIV-1 infection. This was ruled out, however, because titers of neutralizing antibody to a specific serotype of Ad virus were not predictive of the frequencies of circulating Ad-specific T cells [9].

In a nonhuman primate study we reported elsewhere, pre-existing immunity to AdHu5 virus affected the biodistribution of T cells induced by Ad vaccines [6]. To test this effect in more detail, we compared global and Gag-specific genital T cell responses between groups of female mice that had or had not been preexposed to AdHu5 virus before intramuscular vaccination with an AdHu5 vector expressing HIV-1 Gag. We were particularly interested in changes in genital CD4⁺ T cells, which might provide targets for HIV infection, and in Gag-specific CD8⁺ T cells, which might reduce infection rates by eliminating virus-infected cells before HIV-1 replicates, spreads to other tissues, and escapes immune mechanisms through mutations.

MATERIALS AND METHODS

Mice

Female 6–8-week-old BALB/c mice (Ace Animals) were housed at the Animal Facility of the Wistar Institute. Experiments were performed according to institutionally approved protocols.

Viral Vectors

Purified E1-deleted AdHu5 expressing Gag of HIV-1 clade B, glycoprotein of rabies virus (rab.gp), or green fluorescence protein (GFP) was produced according to methods, including quality control, described elsewhere [10, 11].

Vaccination of Mice

For preexposure, groups of BALB/c mice were injected intramuscularly with 10¹¹ virus particles of AdHu5rab.gp. Two weeks later, serum samples were analyzed for AdHu5 neutralizing antibody titers. Mice with neutralizing antibody titers of $\geq 1:40$ were vaccinated with 10¹⁰ virus particles of AdHu5gag at 3 weeks after intramuscular preexposure.

Isolation of Lymphocytes

Lymphocytes were isolated as described elsewhere [12]. Blood was collected in 4% sodium citrate, and lymphocytes were purified through a Histopaque (Sigma) gradient solution. Spleens and iliac lymph nodes were dissociated against metal screens and washed with L-15 modified medium (Mediatech). For isolation of lymphocytes from the genital tract, the vagina, cervix, uterine horns, and ovaries were removed, cut into fragments, placed into Roswell Park Memorial Institute 1640 medium with 5% fetal bovine serum (Mediatech), and shaken at 130 rpm for 1 h. Cells were recovered, and the remaining fragments were digested with 1.4 mg/mL of collagenase type I

(Gibco) for 15 min. Debris was removed by filtration and single cells were pooled. Lymphocytes were purified by a discontinuous Percoll (Sigma) gradient and counted using trypan blue dye (Sigma). Lymphocytes from blood and spleens were tested from individual mice, and cells from iliac lymph nodes and the genital tract were pooled from mice within the same group.

Neutralization Assay

Serum samples from individual mice were tested for AdHu5 neutralizing antibody titers, as described elsewhere [3]. Briefly, samples were inactivated at 56°C for 30 min and then serially diluted in 50 μ L of Dulbecco's modified Eagle medium with 10% fetal bovine serum (Mediatech), added to 50 μ L of AdHu5GFP vector diluted to 10⁸ virus particles/mL, and incubated at room temperature for 1 h. The mixture was then transferred onto 3 \times 10⁴ HEK 293 cells in 96-well flat-bottomed plates. Plates were incubated at 37°C for 24 h and examined under a fluorescence microscope. Sample dilutions that showed $>50\%$ reduction of green fluorescent foci compared with infected controls incubated with naive serum were scored positive for neutralizing antibodies.

Adoptive Transfer of Immune Serum

Mice were injected intraperitoneally with .5 mL of serum derived from naive control mice or from mice preexposed twice with 10¹¹ virus particles of AdHu5rab.gp given intramuscularly at a 6-week interval.

Tetramer Staining, Phenotypic Analyses and Flow Cytometry

Cells were stained with a Gag peptide (AMQMLKETI)/major histocompatibility class I tetramer (National Institutes of Health), LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain (Invitrogen) and antibodies to CD8a (Invitrogen); CD4, CD103, chemokine (C-C motif) receptor 5 (CCRS) (BD Pharmingen); CD44, CD62L, PD-1, CD86 (BioLegend); CD69, CD127, NKG2D (eBioscience); and KLRG1 (Southern Biotech). Cells were permeabilized with BD Cytofix/Cytoperm Fixation and Permeabilization Solution (BD Bioscience) and stained to granzyme B (eBioscience), Ki-67 (BD Pharmingen), and CTLA-4 (RD Systems). Cells were analyzed on a BD LSR II flow cytometer (Becton Dickinson) using FlowJo software (version 8.8; Tree Star) for data analyses [13].

Statistical Analysis

Each experiment was conducted twice with 5–10 mice, and figures show means and standard deviations for samples from independent experiments. Blood and spleens were assessed individually. Cells from iliac lymph nodes and genital tract were pooled from 2–3 or 5 mice, respectively. The statistical significance of differences between groups was calculated by 2-way analysis of variance followed by Bonferroni posttest or Student's *t* test using GraphPad Prism software (GraphPad Software).

RESULTS

Genital T Cell Composition after AdHu5 Vaccination

To test whether vaccination with an AdHu5gag vector affects frequencies of T cells within the genital tract and whether such changes are influenced by preexisting immunity to AdHu5, female mice were preexposed intramuscularly with 10^{11} virus particles of AdHu5rab.gp. At this high dose of vector, all animals developed neutralizing antibody titers of ≥ 40 within 14 days. Naive or AdHu5-immune mice were vaccinated intramuscularly with 10^{10} virus particles of AdHu5gag. Lymphocytes were isolated from the genital tract, and frequencies of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells were measured over time. Naive mice had stable frequencies of $CD4^+$ T cells within their genital tract throughout the 12-week observation period (Figure 1A). Early after

vaccination, AdHu5 preexposed and nonpreexposed mice had reduced frequencies of $CD4^+$ T cells. In AdHu5-seronegative mice, frequencies of $CD4^+$ T cells returned to baseline by week 6, but in the preexposed group they stayed below those of naive mice until week 10 after vaccination. Reduction of frequencies was largely mirrored by a decline in absolute numbers of $CD4^+$ T cells (Figure 1C). Although these data showed significant differences only on days 3 and 7 after vaccination, overall they suggest that this decline in $CD4^+$ T cells reflects their egress from the genital tract rather than an influx of other cell types.

Percentages and numbers of $CD8^+$ T cells were reduced in vaccinated mice on day 3 after vaccination (Figure 1B and D). In preexposed mice, frequencies of $CD8^+$ T cells remained slightly below those of naive mice for most time points until week 6,

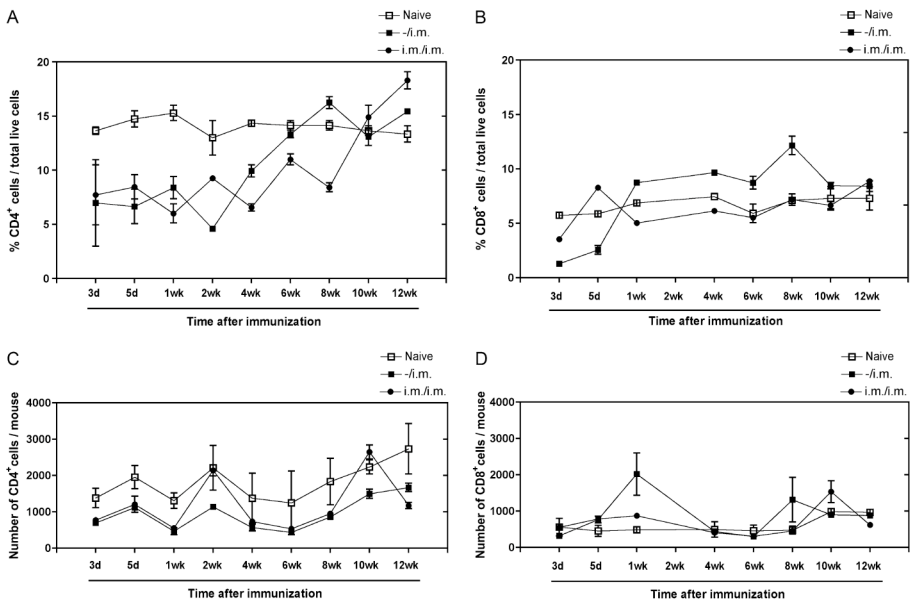


Figure 1. Frequencies and numbers of genital $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells. Graphs show percentages of $CD4^+$ (A) and $CD8^+$ (B) T cells, as well as absolute numbers of $CD4^+$ (C) and $CD8^+$ (D) T cells within the genital tract at different intervals after vaccination with AdHu5gag. Graphs show average frequencies or cell counts \pm standard deviations (SD) for animals preexposed to adenovirus vector of human serotype 5 (AdHu5) and vaccinated with AdHu5gag 3 weeks later (i.m./i.m.; circles), mice vaccinated with the AdHu5gag vector without preexposure (-i.m.; closed squares), and naive mice (open squares). Cells were isolated from the female genital tract and stained with a live cell stain and antibodies to CD4 and CD8. Statistical analyses compared 2 individual experiments, using 2-way analysis of variance followed by Bonferroni test. A, Both vaccinated groups had significantly lower frequencies of $CD4^+$ cells over time than did the naive control group ($P < .01$). Frequencies of $CD4^+$ cells for the 2 vaccinated groups differed only at week 8 after vaccination ($P < .05$). B, Frequencies of $CD8^+$ cells were reduced in the 2 vaccinated groups early after vaccination ($P < .01$). Frequencies of $CD8^+$ T cells in the nonpreexposed group were increased between weeks 1 and 8, compared with the naive group ($P < .01$). C, $CD4^+$ cell counts were significantly different on days 3 and 7 between either of the vaccinated groups and the control group ($P < .05$ by *t* test). D, Cell counts were significantly different for $CD8^+$ T cells only at week 1 when the 2 vaccinated groups were compared with the naive group ($P < .05$).

whereas in nonpreexposed mice they were increased from week 1 to week 8, compared with naive mice.

To test for vaccine-induced differences in phenotypes of genital T cells, lymphocytes isolated at 1, 6, and 12 weeks after vaccination were stained with a panel of antibodies to assess their differentiation status and functions. Lymphocytes were tested for surface expression of CD103, CCR5, CD44, CD62L, PD-1, CD86, CD69, CD127, NKG2D, and KLRG1 and for intracellular granzyme B, Ki-67, and CTLA-4. Most of these markers were expressed at comparable levels on or in genital CD4⁺ T cells from naive or vaccinated mice. Only CD44, granzyme B, and PD-1 showed significant differences in expression (Figure 2A). A PD-1^{hi}CD4⁺ population was seen in all vaccinated but not in naive mice by week 1 after vaccination; this population decreased by week 6 and was no longer detectable by week 12. Expression of CCR5 was not increased in either group at any time point ($P > .05$).

Phenotypic differences were more pronounced for CD8⁺ T cells from the genital tract of vaccinated mice, compared with unvaccinated mice (Figure 2B). Expression levels of CD44 tended to be higher, whereas those of CD62L were lower on CD8⁺ T cells from the preexposed group at 1 week after vaccination and from the nonpreexposed group at all time points tested. A subpopulation of CD69^{hi}CD8⁺ T cells was detected at 1 week after vaccination in nonpreexposed, vaccinated mice; this population disappeared by week 6 and was not seen in any of the other groups at either time point. Levels of Ki-67 were increased on cells from both vaccinated groups at 1 and 6 weeks, and granzyme B levels were also slightly elevated in both groups at 1 week after vaccination. In naive mice, KLRG1 was initially low on most genital CD8⁺ T cells; however, we observed a population of KLRG1^{hi} cells, which gradually increased over time.

This population may have been a reflection of the young animals' continued exposure to environmental antigens during the 12-week period of the experiment. PD-1, an early activation marker [14] that may also indicate exhaustion [15], was up-regulated on CD8⁺ T cells isolated from nonpreexposed mice, compared with naive mice, at 1 week after vaccination. Overall, these results show that after AdHu5 vaccination, T cells appear to initially leave the mucosa and presumably migrate to sites of vaccine-induced inflammation [16, 17], whereas vaccine-induced T cells enter the mucosa after activation.

Antigen-Specific CD8⁺ T Cell Responses

To test whether preexisting immunity to AdHu5 has a differential effect on frequencies of AdHu5gag vector-induced transgene product-specific CD8⁺ T cells in different tissues, a group of mice was first preexposed intramuscularly with an AdHu5 vector expressing an irrelevant antigen. AdHu5-specific neutralizing antibody titers, measured from serum samples of individual mice 2 weeks later, were $\geq 1:40$ and thus at levels that had previously been shown to reduce transgene product-specific CD8⁺ T cell responses to AdHu5 vector vaccination [18]. These mice, together with the nonpreexposed group, were vaccinated intramuscularly with AdHu5gag. Lymphocytes were isolated from blood, spleen, iliac lymph nodes, and the genital tract at 1, 4, and 12 weeks after vaccination (Figure 3). Nonvaccinated naive mice were tested in parallel. Gag-specific CD8⁺ T cells were not detected in naive mice or in mice that had been preexposed but not vaccinated (data shown for naive mice). In vaccinated mice, frequencies of Gag-specific CD8⁺ T cells from all sites and at all time points tested were significantly lower in preexposed compared with nonpreexposed mice (Figure 3). In blood, preexposure caused a modest reduction ($\sim 50\%$) in

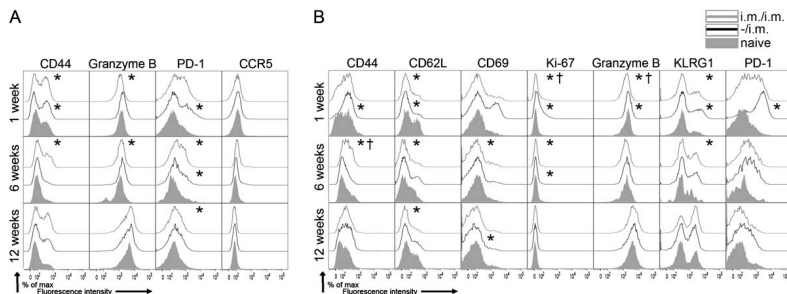


Figure 2. Phenotypes of genital CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *A*, Phenotypes of CD4⁺ cells. *B*, Phenotypes of CD8⁺ cells. Cells from 5 mice were isolated at different time points, pooled, and stained with a live cell stain and antibodies to CD4, CD8a, and the markers indicated in the graphs. Gray lines represent data from preexposed and vaccinated mice (i.m./i.m.); black lines, data from vaccinated mice that were not preexposed (-i.m.); and gray areas at bottom of graphs, data for cells isolated from naive animals. Student's *t* test was performed to compare percentages of difference in median fluorescence intensity for samples derived from 2 individual experiments, of which 1 is displayed here. * $P < .05$ for comparison between immunized and naive groups; † $P < .05$ for comparison between immunized groups. CCR5, chemokine (C-C motif) receptor 5.

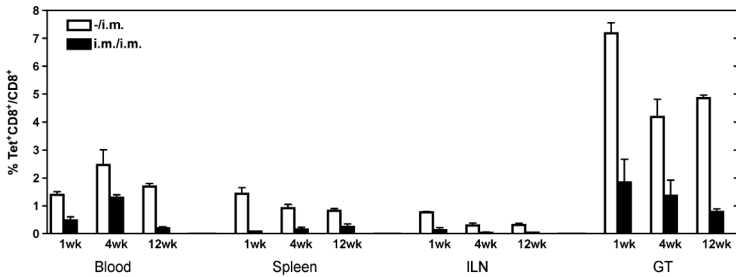


Figure 3. Effect of preexposure on frequencies of Gag-specific CD8⁺ T cells. Graph shows the kinetics of Gag-specific CD8⁺ T cell responses in different compartments after vaccination. Mice were preexposed to adenovirus vector of human serotype 5 (AdHu5) and vaccinated with AdHu5gag 3 weeks later (i.m./i.m.) (closed bars); a control group received the vector intramuscularly without preexposure (-i.m.) (open bars). Frequencies represent ratios of tetramer (Tet)⁺ CD8⁺ cells to total CD8⁺ cells (means \pm standard deviations from 2 individual experiments). Values obtained from naive animals were subtracted before plotting frequencies for the 2 test groups. Statistical analysis (2-way analysis of variance followed by Bonferroni correction) shows reduction in Gag-specific CD8⁺ T cell frequencies in mice on preexposure to the vaccine vector in iliac lymph nodes (ILN) ($P < .05$), spleen, and the genital tract (GT) ($P < .01$).

CD8⁺ T cell frequencies early after vaccination (ie, by weeks 1 and 4). This reduction became more pronounced by week 12 after vaccination (~80%). Gag-specific CD8⁺ T cells from the genital tract, although present at higher frequencies, mirrored the pattern seen in cells isolated from blood. In seronegative mice, frequencies of genital Gag-specific CD8⁺ T cells were highest at 1 week after vaccination, declined slightly by 4 weeks, and remained stable until week 12. In preexposed mice, the decline in frequencies of genital Gag-specific CD8⁺ T cells was more pronounced between weeks 1 and 12 than observed in cells isolated from blood. In iliac lymph nodes, frequencies were low in nonpreexposed mice and reduced further in preexposed mice; frequencies declined between weeks 1 and 4 and remained stable thereafter for the first group. In spleens, frequencies of Gag-specific CD8⁺ T cells increased over time in preexposed mice and decreased slightly in nonpreexposed mice, so that the ratio of frequencies between nonpreexposed and preexposed mice was initially high but declined gradually over time.

Preexposure to AdHu5 not only induces antibodies to AdHu5 but also elicits T cell responses to antigens of the Ad vector. We conducted serum transfer studies to test whether the reduction in Gag-specific CD8⁺ T cell frequencies in different tissues is caused mainly by preexisting antibodies, or whether cellular components of the immune system contribute. Mice were preexposed to AdHu5 or injected with serum from AdHu5-immune or naive mice. On preexposure or immune serum transfer, mice had titers ranging from 1:40 to 1:80. Mice were then vaccinated intramuscularly with AdHu5gag, and lymphocytes were isolated from blood, spleens, iliac lymph nodes, and genital tracts 2 weeks later and analyzed for frequencies of Gag-specific CD8⁺ T cells (Figure 4). Decreases in frequencies of Gag-specific

CD8⁺ T cells in blood, spleens, and iliac lymph nodes were comparable between preexposed and AdHu5-immune serum-

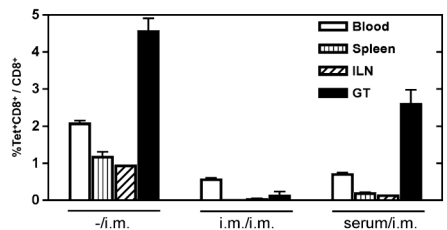


Figure 4. Effect of immune serum transfer on Gag-specific CD8⁺ T cell frequencies. Mice were injected intramuscularly twice with AdHu5rab.gp, and serum samples were collected 2 weeks after the boost dose. Pooled immune serum was transferred intraperitoneally into naive mice, followed 1 week later by intramuscular vaccination with AdHu5gag (serum/i.m.). Control groups consisted of animals that received serum from sham-vaccinated mice (-i.m.) or were preexposed to adenovirus vector of human serotype 5 (AdHu5) before vaccination with AdHu5gag (i.m./i.m.). Frequencies represent ratios of tetramer (Tet)⁺ CD8⁺ cells to total CD8⁺ cells (means frequencies \pm standard deviations from 2 individual experiments). Values obtained from naive mice tested in parallel were subtracted from frequencies of vaccinated mice before graphs were plotted. Statistical analysis (2-way analysis of variance followed by Bonferroni posttest) shows that frequencies of tetramer⁺ CD8⁺ cells were significantly lower in the preexposed group than in the serum-transfer group for all compartments analyzed ($P < .05$). The serum-transfer group had significantly lower frequencies of Gag-specific CD8⁺ T cells in blood, spleen, and iliac lymph nodes (ILN) ($P < .01$), but differences in frequencies did not reach statistical significance for cells isolated from the genital tract (GT).

Table 1. Reduction in Gag-Specific CD8⁺ T Cell Frequency After Immunization With AdHu5gag in Preexposed or Serum-Transferred Mice

Treatment before vaccination	Reduction in Gag-specific CD8 ⁺ T cell frequency, mean ± SD, %			
	Blood	Spleen	Iliac lymph nodes	Genital tract
Preexposure to AdHu5	72.75 ± 1.58	98.09 ± 2.69	96.80 ± 3.00	97.14 ± 4.04
Immune serum transfer	65.81 ± 4.94	83.91 ± .99 ^a	86.64 ± 2.17 ^a	43.58 ± 6.04 ^b

NOTE. Before vaccination with AdHu5gag, one group of mice was preexposed to adenovirus vector of human serotype 5 (AdHu5), and the other group received intraperitoneal transfer of immune serum. Student's *t* test was performed to measure differential reductions in frequencies between immunized groups after intramuscular preexposure or serum transfer.

^a *P* < .05.

^b *P* < .001.

treated mice, but the latter group showed a significantly less pronounced reduction in frequencies of genital Gag-specific CD8⁺ T cells (Table 1). These results may suggest that trafficking of CD8⁺ T cells to this compartment was affected by a preexposure-induced immune mechanism other than antibodies.

To further assess whether preexposure to AdHu5 influences the quality of transgene product-specific CD8⁺ T cell responses, phenotypes of Gag-specific CD8⁺ T cells were evaluated from lymphocytes isolated from blood, spleen, iliac lymph nodes, or the genital tract at 1, 6, and 12 weeks after vaccination of naive or AdHu5 preexposed mice, using the panel of antibodies described elsewhere. Naive T cells from unvaccinated mice were used for comparison. Figure 5 shows markers that were differentially expressed in the 2 vaccine groups. One week after vaccination, differences between preexposed and nonpreexposed vaccinated mice were suggestive of a delay in CD8⁺ T cells activation, as would be expected with a lowering of the antigenic load. In spleens, PD-1 expression was slightly higher on Gag-specific CD8⁺ T cells from nonpreexposed mice early after vaccination. In this tissue, the early activation markers CCR5 and CD69 were higher on Gag-specific CD8⁺ T cells from preexposed mice.

By week 6 after vaccination, phenotypes of Gag-specific CD8⁺ T cells from blood, spleen and iliac lymph nodes showed subtle differences for most markers except for PD-1, which was higher on cells from blood and iliac lymph nodes of nonpreexposed compared with preexposed mice. The most pronounced differences between groups vaccinated with AdHu5gag in the presence or absence of immunity against AdHu5 were observed by week 12 after vaccination. In spleens and iliac lymph nodes, CD69, CD103, CCR5, Ki-67, and PD-1 were markedly higher on Gag-specific CD8⁺ T cells from preexposed as compared with nonpreexposed mice. Expression levels of granzyme B and CTLA-4 were increased on Gag-specific CD8⁺ T cells from blood of preexposed mice. Overall, these data suggest that pre-existing immunity not only delays full activation of transgene product-specific CD8⁺ T cells but may also change their differentiation pathway.

DISCUSSION

We conducted this preclinical mouse study to test whether and how preexisting immunity to AdHu5 before vaccination with an AdHu5 vector expressing Gag of HIV-1 affects T cells that home to the female genital tract. Our results show that naive mice have higher frequencies of CD4⁺ than CD8⁺ T cells in their genital tract. Unexpectedly, frequencies and absolute numbers of CD4⁺ and CD8⁺ T cells initially declined in this tissue after vaccination, later returning to baseline. This effect was dose dependent and was not seen when the vaccine dose was lowered to 10⁹ virus particles (data not shown). Higher doses of 10¹¹ virus particles did not further increase egress of T cells (data not shown), suggesting the presence of different T cell subpopulations that could or could not leave the genital tract once a threshold was reached. Although the decline of either T cell subset was transient, a general exodus of activated T cells from the genital mucosa (and as remains to be investigated, possibly from other peripheral sites) toward an inflammation triggered in response to a vaccine or an infection could potentially affect the host's resistance to other infections. Phenotypes of CD4⁺ T cells that remained within the genital tract were similar overall to those observed in unvaccinated mice, except for slight increases in CD44^{hi} and PD-1^{hi} cells, perhaps suggesting the egress of less activated cells or retention of those expressing coinhibitory markers.

Mucosally transmitted HIV-1 isolates are almost uniformly CCR5 tropic. CCR5 is expressed on CD4⁺ T cells after their activation and expansion [19] and is especially high on CD4⁺ T cells within the intestinal mucosa [20]. Importantly, expression of CCR5 was not increased on CD4⁺ T cells within the genital tract at any of the time points analyzed. Overall, provided that T cells act similarly in AdHu5-vaccinated humans, these data suggest that AdHu5 vaccination initially reduces available HIV-1 targets within the female genital tract.

Genital CD8⁺ T cells showed more marked differences between AdHu5-seropositive and seronegative mice after vaccination. Phenotypic analyses suggested that CD8⁺ T cells infiltrating the genital tract had been recently activated. Further

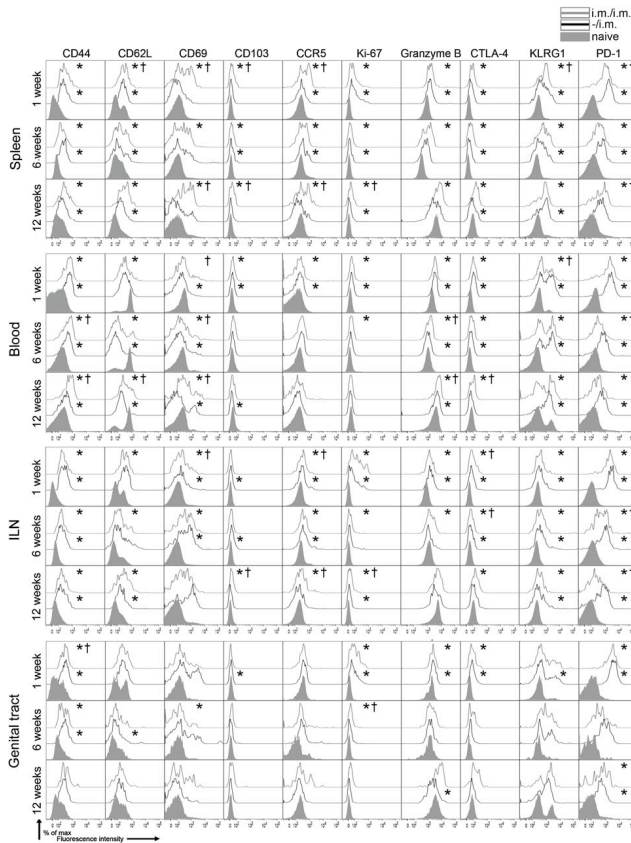


Figure 5. Phenotypes of Gag-specific CD8⁺ T cells. Mice preexposed to adenovirus vector of human serotype 5 (AdHu5) (i.m./i.m.) (gray lines) and nonpreexposed mice (-i.m.) (black lines) were vaccinated with AdHu5gag. Cells from different compartments were analyzed 1, 6, and 12 weeks after vaccination. Cells were stained with a live cell stain, the Gag-specific tetramer, antibodies to CD8a, and the markers indicated. Graphs show expression of markers on tetramer (Tet)⁺CD8⁺ T cells isolated from vaccinated mice. Gray shaded areas show expression of the markers on tetramer⁻CD8⁺ T cells from naive mice. Graphs presenting samples from blood and spleens show cells isolated from 5 individual mice, and those from iliac lymph nodes (ILN) show samples pooled from 2 or 3 mice; data from these samples were concatenated using FlowJo software. Graphs of samples derived from the genital tract show results obtained with pooled lymphocytes from 5 mice. Student's *t* test was used to compare percentage differences in median fluorescence intensity between samples derived from 2 individual experiments, of which 1 is displayed here. **P* < .05 for difference between immunized and naive mice; †*P* < .05 for difference between the 2 immunized groups. CCR5, chemokine (C-C motif) receptor 5.

analyses of Gag-specific CD8⁺ T cells showed that preexisting immunity to AdHu5 reduced their frequencies in all compartments and at all time points tested, although there were some unexpected quantitative and temporal differences between groups. First, the reduction of specific CD8⁺ T cells seen at week 1 was more pronounced in spleen and iliac lymph nodes than in

blood or the genital tract. Previous studies had indicated that the strength of T cell receptor signaling, which can be related to antigenic load, determines the kinetics of T cell activation [21] and affects CD8⁺ T cell outcome [22]. The findings at week 12 support this latter notion, because Gag-specific CD8⁺ T cells from seronegative and seropositive mice continued to show

marked phenotypic differences. Preexposed mice showed a more pronounced contraction of Gag-specific CD8⁺ T cells in blood and within the genital tract than did nonpreexposed mice.

Ad vectors persist in a transcriptionally active form [11] and thus maintain primarily more activated CD8⁺ T cells, which fail to home to lymph nodes. Accordingly, frequencies of Gag-specific CD8⁺ T cells were consistently low in iliac lymph nodes. In spleens, which contain both highly activated and quiescent antigen-experienced cells, frequencies of Gag-specific CD8⁺ T cells decreased between weeks 1 and 12 in seronegative mice, but increased during the same period in AdHu5 preexposed mice. Phenotypic analyses showed that a higher proportion of Gag-specific CD8⁺ T cells from spleen, blood and iliac lymph nodes of Ad-seropositive mice had up-regulated CD62L, compared with those from seronegative mice. This suggests a more pronounced transition into a quiescent stage, although these cells lacked expression of CD127 (not shown), as would be typical for central memory CD8⁺ T cells.

In addition, cells from spleens and blood expressed elevated levels of CD69, viewed as an early and transient activation marker. CD69^{hi}CD127^{low} memory T cells have been observed in other studies and represent a population that is maintained independent of cytokines, presumably through T cell receptor stimulation [23], as would be feasible under conditions of continued antigen production by a persisting vector. Notwithstanding, it remains to be investigated if and to what degree CD8⁺ T cells detected in preexposed mice resemble such cells or represent one of the many transitional stages of T cell differentiation that are being detected in human viral infections [24].

In summary, our results obtained in mice indicate that pre-existing immunity to AdHu5 virus does not result in an increase of HIV-1 susceptible targets within the female genital tract, the most common port of HIV-1 entry. Preexposure to the vector changes the magnitude and quality of transgene product-specific CD8⁺ T cells induced by a homologous vaccine carrier. This reduction, which can be observed in several tissues, including the genital tract, can largely but not exclusively be attributed to a lowering of antigenic load caused by the presence of vaccine vector-specific antibodies. Animal studies can at best approximate what may happen in humans vaccinated with an Ad vector. Clinical trials using Ad vector vaccines, such as those for HIV-1, should be designed to assess not only systemic responses but also immunity at the most common port of entry for the pathogen.

Funding

This work was funded by grants from NIH/Division of Acquired Immunodeficiency Syndrome (DAIDS) and institutional grants to the Wistar Institute, including a US National Cancer Institute Cancer Core Grant (CA10815), and the Commonwealth Universal Research Enhancement Program from the Pennsylvania Department of Health. Partial support was

also provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico and Ministério da Saúde, Brazil.

Acknowledgments

We would like to thank Christina Cole for help in preparation of the manuscript.

References

- Buchbinder SP, Mehrotra DV, Duerr A, et al. Step Study Protocol Team. Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial. *Lancet* **2008**; 372:1881–93.
- McElrath MJ, De Rosa SC, Moodie Z, et al. Step Study Protocol Team. HIV-1 vaccine-induced immunity in the test-of-concept Step Study: a case-cohort analysis. *Lancet* **2008**; 372:1894–905.
- Xiang Z, Li Y, Cui A, et al. Chimpanzee adenovirus antibodies in humans, sub-Saharan Africa. *Emerg Infect Dis* **2006**; 12:1596–9.
- Chen H, Xiang ZQ, Li Y, et al. Adenovirus-based vaccines: comparison of vectors from three species of adenoviridae. *J Virol* **2010**; 84:10522–32.
- Fitzgerald JC, Gao GP, Reyes-Sandoval A, et al. A simian replication-defective adenoviral recombinant vaccine to HIV-1 gag. *J Immunol* **2003**; 170:1416–22.
- McCoy K, Tatsis N, Koriath-Schmitz B, et al. Effect of preexisting immunity to adenovirus human serotype 5 antigens on the immune responses of nonhuman primates to vaccine regimens based on human- or chimpanzee-derived adenovirus vectors. *J Virol* **2007**; 81:6594–604.
- Inungu J, Malone-Beach E, Betts J. Male circumcision and the risk of HIV infection. *AIDS Read* **2005**; 15:130–1.
- de Jong MA, de Witte L, Taylor ME, Geijtenbeek TB. Herpes simplex virus type 2 enhances HIV-1 susceptibility by affecting Langerhans cell function. *J Immunol* **2010**; 185:1633–41.
- Hutnick NA, Carnathan DG, Dubey SA, et al. Baseline Ad5 serostatus does not predict Ad5 HIV vaccine-induced expansion of adenovirus-specific CD4⁺ T cells. *Nat Med* **2009**; 15:876–8.
- Tatsis N, Ertl HC. Adenoviruses as vaccine vectors. *Mol Ther* **2004**; 10:616–29.
- Tatsis N, Fitzgerald JC, Reyes-Sandoval A, et al. Adenoviral vectors persist in vivo and maintain activated CD8⁺ T cells: implications for their use as vaccines. *Blood* **2007**; 110:1916–23.
- de Souza AP, Haut LH, Silva R, et al. Genital CD8⁺ T cell response to HIV-1 gag in mice immunized by mucosal routes with a recombinant simian adenovirus. *Vaccine* **2007**; 25:109–16.
- DiMenna L, Latimer B, Parzych E, et al. Augmentation of primary influenza A virus-specific CD8⁺ T cell responses in aged mice through blockade of an immunoinhibitory pathway. *J Immunol* **2010**; 184:5475–84.
- Sauce D, Almeida JR, Larsen M, et al. PD-1 expression on human CD8 T cells depends on both state of differentiation and activation status. *AIDS* **2007**; 21:2005–13.
- Muruve DA. The innate immune response to adenovirus vectors. *Hum Gene Ther* **2004**; 15:1157–66.
- Bengsch B, Seigel B, Ruhl M, et al. Coexpression of PD-1, 2B4, CD160 and KLRG1 on exhausted HCV-specific CD8⁺ T cells is linked to antigen recognition and T cell differentiation. *PLoS Pathog* **2010**; 6:e1000947.
- Perreau M, Pantaleo G, Kremer EJ. Activation of a dendritic cell-T cell axis by Ad5 immune complexes creates an improved environment for replication of HIV in T cells. *J Exp Med* **2008**; 205:2717–25.
- Varnavski AN, Calcedo R, Bove M, Gao G, Wilson JM. Evaluation of toxicity from high-dose systemic administration of recombinant adenovirus vector in vector-naïve and pre-immunized mice. *Gene Ther* **2005**; 12:427–36.

19. Veazey RS, Mansfield KG, Tham IC, et al. Dynamics of CCR5 expression by CD4⁺ T cells in lymphoid tissues during simian immunodeficiency virus infection. *J Virol* **2000**; 74:11001–7.
20. Ebert LM, McColl SR. Up-regulation of CCR5 and CCR6 on distinct subpopulations of antigen-activated CD4⁺ T lymphocytes. *J Immunol* **2002**; 168:65–72.
21. Rosette C, Werlen G, Daniels MA, et al. The impact of duration versus extent of TCR occupancy on T cell activation: a revision of the kinetic proofreading model. *Immunity* **2001**; 15:59–70.
22. Valitutti S, Müller S, Dessing M, Lanzavecchia A. Different responses are elicited in cytotoxic T lymphocytes by different levels of T cell receptor occupancy. *J Exp Med* **1996**; 183:1917–21.
23. Boyman O, Létourneau S, Krieg C, Sprent J. Homeostatic proliferation and survival of naïve and memory T cells. *Eur J Immunol* **2009**; 39:2088–94.
24. Romero P, Zippelius A, Kurth J, et al. Four functionally distinct populations of human effector-memory CD8⁺ T lymphocytes. *J Immunol* **2007**; 178:4112–9.