

Papillomavirus umano (HPV) e cancro: nuove strategie terapeutiche e diagnostiche

Il *Papillomavirus* umano (HPV) di tipo 16 è causa del carcinoma del collo dell'utero. Da diversi anni sono disponibili vaccini profilattici e saggi molecolari per diagnosticare l'infezione. Le nuove sfide sono rappresentate da nuovi vaccini preventivi/terapeutici e metodi diagnostici mirati per il controllo dei vari tumori associati a HPV 16

DOI 10.12910/EAI2017-048

di **Rosella Franconi** e **Silvia Massa**, ENEA; **Aldo Venuti** e **Luciano Mariani**, Istituti Fisioterapici Ospitalieri-Istituto Nazionale Tumori Regina Elena (IFO-IRE); **Luisa Accardi** e **Paola di Bonito**, Istituto Superiore di Sanità

I genotipi definiti ad alto rischio oncogeno (*high risk HR*) del *Papillomavirus* umano (HPV), in particolare il tipo 16 (HPV 16), sono responsabili non solo del 99% dei tumori della cervice e di altri tumori ano-genitali ma anche di un sottogruppo di tumori dell'orofaringe della donna e dell'uomo per i quali non esiste una terapia specifica e risolutiva. Il virus (Figura 1, immagine a sinistra) causa lesioni tipiche intraepiteliali che in un piccolo numero di casi diventano persistenti, possono trasformarsi in carcinoma *in situ* e, successiva-

mente, in carcinoma invasivo [1]. A causa dell'impossibilità di isolare e coltivare *in vitro* i *Papillomavirus*, gli studi sulla patogenesi virale sono cominciati solo negli anni 80 con l'avvento delle tecniche di ingegneria genetica e hanno avuto un enorme incremento negli anni 90, periodo in cui si è riusciti a diagnosticare l'infezione virale e a poter progettare vaccini profilattici e terapeutici. Dopo un trentennio di studi, la prevenzione delle infezioni da HPV è stata possibile grazie a vaccini ricombinanti composti da particelle virali prive di genoma (*Virus-Like*

Particles, VLP) prodotte in cellule di lievito e di insetto (Figura 1, immagine a destra). Tali vaccini sono offerti gratuitamente nel nostro Paese dal 2007 alle ragazze di 12 anni d'età, secondo quanto stabilito dalle auto-

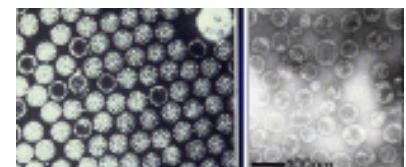
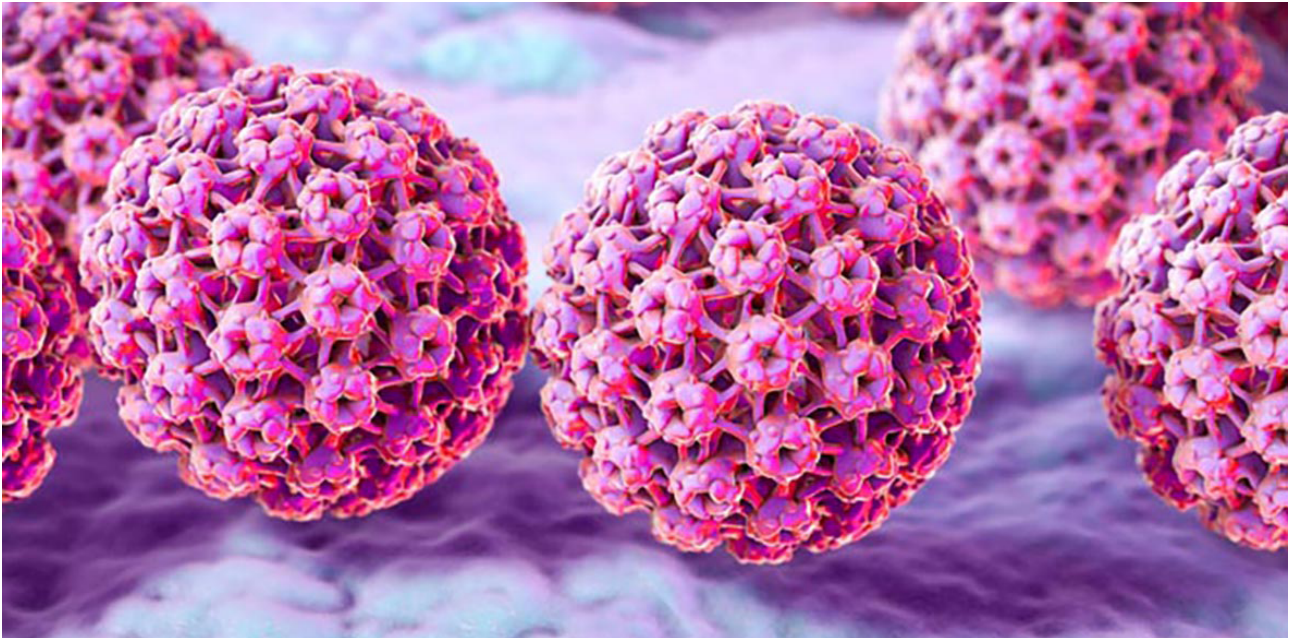


Fig. 1 Immagini di microscopia elettronica dal repertorio IFO-IRE. A sinistra: particelle di Papillomavirus (HPV) purificate; a destra: *Virus like particles* (VLPs) prodotte in lievito



rità sanitarie regionali e, a partire da quest'anno, anche alla popolazione maschile della medesima età. Se nei Paesi occidentali la vaccinazione organizzata negli adolescenti è diventata una realtà, invece nei Paesi in via di sviluppo c'è ancora molto da fare, specie in considerazione degli alti costi di produzione, della schedula di vaccinazione (2 o 3 dosi in relazione all'età) e della catena del freddo per la conservazione. Laddove la vaccinazione HPV ha raggiunto alti livelli di adesione nella popolazione *target* (>50%) sono già evidenti i benefici in termini di riduzione della prevalenza di infezione, crollo della diagnosi di condilomi genitali e sensibile riduzione delle lesioni pretumorali (CIN 2-3) della cervice uterina. In più, l'alta adesione comporta anche la comparsa del fenomeno dell' *herd-immunity*, per cui parte della popolazione non-vaccinata (di entrambi i sessi, per lo più coetanei delle vaccinate) beneficia in termini di protezione dalle patologie da HPV. La prevenzione del carcinoma del

collo dell'utero si realizza nel nostro Paese mediante lo screening con il 'Papanicolaou test' (Pap test, in Italia con carattere di programma organizzato dalla metà degli anni 90) o con HPV-DNA test (divenuto recentemente il test di prima scelta e che dal 2018 sostituirà il Pap test in tutte le regioni italiane), che permettono di individuare le donne con lesioni HPV-correlate della cervice uterina a rischio di progressione. L'identificazione e la cura di queste lesioni (CIN 2-3) consentono di interrompere la storia naturale che, se lasciata a sé, può sfociare nel carcinoma invasivo. Nonostante l'esistenza di misure preventive efficaci, i tumori anogenitali causati dai *papillomavirus* ad alto rischio (HR-HPV) sono ancora un grave problema sanitario. Il cancro del collo dell'utero rappresenta il 3° cancro più comune nelle donne nella fascia 15-44 anni. In Italia, vengono diagnosticati ogni anno poco meno di 3.000 nuovi casi di carcinoma cervicale e oltre 1000 donne muoiono per questo tumore. A livello globale,

le stime più recenti registrano ogni anno circa 528.000 nuovi casi di cancro cervicale con 266.000 decessi di cui l'87% si verifica nei Paesi meno sviluppati (Figura 2)¹. È stato inoltre stimato che HPV è l'agente causale del 5% di tutti i tumori a livello globale.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) stima che la prevalenza delle infezioni da HPV sia compresa nell'intervallo 9-30%, in relazione all'area geografica, alla tipologia di popolazione esaminata ed al metodo di rilevamento (tipo di test utilizzato), con circa 630 milioni di persone infettate dai vari genotipi di HPV. Le infezioni da HPV 16 sono comuni nella popolazione sessualmente attiva, ma i tumori correlati al virus sono comunque un evento raro che si verifica dopo che il genoma virale si è integrato accidentalmente nel genoma umano a livello dei cheratinociti basali. Si ritiene che l'integrazione di HPV, un processo complesso con meccanismi non del tutto chiariti, interrompa il controllo

del ciclo cellulare e generi infezioni persistenti. In questo contesto, l'espressione anomala di due proteine virali, E6 ed E7, causa un'alterazione delle attività di due proteine che svolgono il ruolo di soppressori dei tumori, p53 e pRb, spingendo i cheratinociti infettati da HR-HPV verso la trasformazione neoplastica. Le

utilizzato sul mercato mondiale un nuovo vaccino nonavalente, diretto cioè specificatamente verso nove genotipi virali che si affianca a quelli storici: bivalente (contro HPV 16 e 18) e quadrivalente (contro HPV 6, 11, 16 e 18). Le sfide per il futuro però sono rappresentate da una nuova tipologia di vaccini di 'seconda' e

possibilità di usare le piante per la produzione di vaccini terapeutici contro le patologie associate ad HPV risale al 2002, quando l'oncoproteina E7 di HPV 16 è stata prodotta in piante di tabacco tramite il virus X della patata (PVX) (Figura 3). I topi vaccinati con l'estratto vegetale hanno svi-

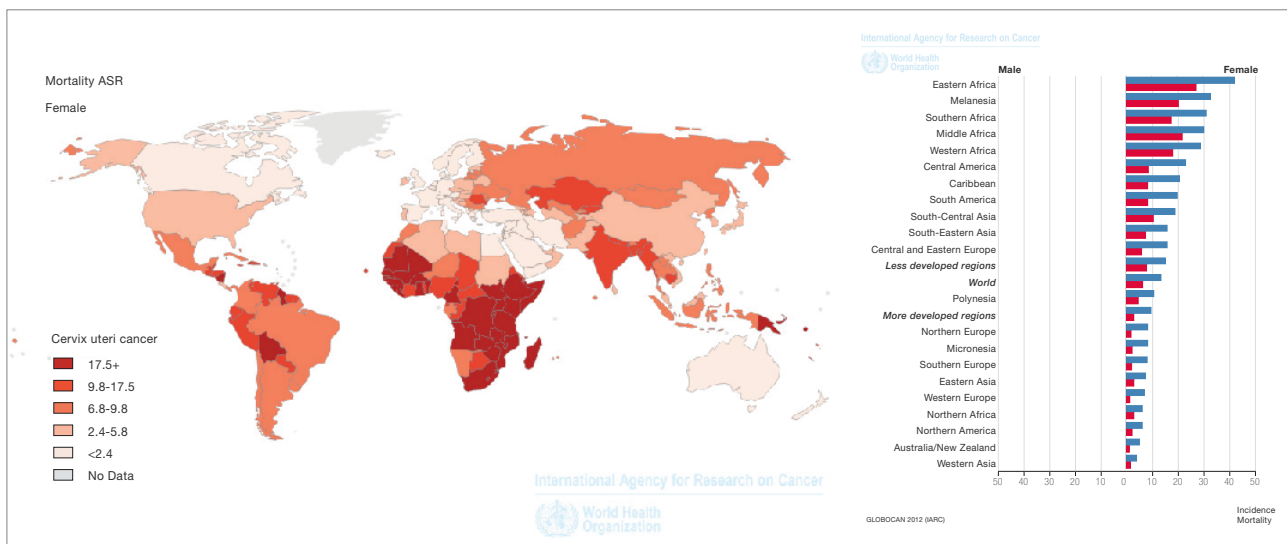


Fig. 2 Cancro del collo dell'utero a livello globale. Tassi stimati di mortalità (normalizzati per età, su 100.000)
Fonte: modificata da Globocan 2012 (IARC)

proteine E6 ed E7 di HPV 16, oggetto di numerosissimi studi, agiscono come proteine oncogene *in vivo* e *in vitro* a causa della loro interazione con numerose proteine intracellulari. E6 ed E7 sono anche antigeni tumore-specifici (TSA) e quindi rappresentano bersagli ideali per interventi di immunoterapia. Molti vaccini terapeutici sono stati sviluppati e sperimentati in modelli animali per la cura delle lesioni precancerose e dei tumori correlati a HPV 16. Alcuni di questi sono stati anche sperimentati sull'uomo e potrebbero entrare a breve sul mercato [2]. Come evoluzione dei vaccini di prima generazione, è già disponibile ed

'terza' generazione, a basso costo, a più ampia copertura verso i diversi tipi di HPV, termostabili, somministrabili possibilmente in singola dose e, magari, senza siringhe. I ricercatori di ENEA, ISS e IFO-IRE fin dal 1999 hanno iniziato a collaborare per lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici e diagnostici per i tumori associati a HPV.

Vaccini terapeutici di nuova generazione

- *Piante come biofabbriche (Molecular Farming) per lo sviluppo di vaccini per HPV 16*
La prima dimostrazione della

luppato una risposta immunitaria E7-specifica (mediata sia da anticorpi sia da cellule) in grado di inibire lo sviluppo del tumore [3]. Questi studi hanno inoltre suggerito che il 'vaccino verde' è dotato di intrinseche proprietà adiuvanti (immunostimolanti) conferite dagli estratti di foglia. E7 forma dei complessi con componenti della pianta e, studi su cellule dendritiche umane, hanno confermato che gli estratti di foglia di *N. bentamiana* influenzano l'uptake di E7 da parte delle cellule, avviando la stimolazione del sistema immunitario. Successivamente, la proteina E7 è stata espressa in altri sistemi

vegetali (microalghe, colture di radici *in vitro*), anche come proteina di fusione con proteine ad attività immunostimolante, e purificata. La vaccinazione di topi con la proteina purificata da pianta ha determinato la regressione di tumori già stabilizzati nel 100% degli animali anche in un nuovo modello animale sviluppato da IFO-IRE per i tumori orofaringei associati a HPV 16 [4].

- *Vaccini per HPV 16 in forma particolata e nuovi sistemi di 'delivery'*

Per la realizzazione di vaccini terapeutici abbiamo utilizzato anche sistemi di espressione in forma particolata e altri sistemi di *delivery*. La proteina E7 di HPV 16, espressa in batterio e rinaturata *in vitro*, si auto-assembla in particelle nano- e micro-metriche che, somministrate come vaccino nel topo, inducono una potente risposta antitumorale che impedisce l'attecchimento di un tumore HPV 16-dipendente. Allo scopo di sviluppare un vaccino monodose a lento rilascio di antigene, E7 di HPV 16 è stata adsorbita su particelle lamellari aminolizzate di poli-lattide (APLLA), un polimero dell'estere dell'acido lattico biocompatibile e biodegradabile il cui impiego nell'uomo è già stato autorizzato. Le particelle E7-APLLA sono altamente immunogeniche e generano nel topo un'immunità antitumorale più potente di quella generata dalla proteina da sola.

Un'altra strategia è stata quella di veicolare le oncoproteine E7 ed E6 negli esosomi, grazie alle proprietà molecolari e all'azione cargo di Nef7, un mutante della proteina Nef di HIV-1 (caratterizzato dal Dott. M Federico, ISS). Grazie a Nef7, i prodotti di fusione veicola-

ti negli esosomi, sono in grado di cross-presentare tali antigeni alle cellule del sistema immunitario e stimolare una risposta citotossica specifica. La somministrazione degli esosomi contenenti le proteine di fusione Nef-E7 o Nef-E6, oppure i rispettivi plasmidi codificanti, sono in grado di bloccare la crescita di un tumore associato a HPV 16 [5].

- *Vaccini genetici potenziati dall'impiego di sequenze da proteine vegetali*

I vaccini genetici sono in uso clinico da qualche anno e si basano sulla somministrazione della sequenza di DNA che codifica l'antigene di interesse con un procedimento simile alle comuni tecniche di vaccinazione (ad es. per via intramuscolare): il plasmide utilizzerà i meccanismi cellulari dell'ospite per la produzione dell'antigene che a sua volta stimolerà nell'organismo una risposta immunitaria. Allo stato attuale della ricerca, uno dei problemi principali da risolvere con i vaccini genetici (sia preventivi che terapeutici) è la loro scarsa capacità di indurre una risposta immunitaria adeguata (produzione di anticorpi e/o risposte mediate da cellule). In un

approccio di immunoterapia per i tumori associati ad infezione da HPV, una versione 'disarmata' del gene codificante l'oncoproteina E7 di HPV 16 è stata fusa all'estremità N-terminale della sequenza codificante per una proteina di difesa vegetale mutata (saporina) di *Saponaria officinalis* (Figura 4A), un *carrier* capace di indurre risposte immunitarie citotossiche efficaci nell'inibire la crescita di un tumore sperimentale (Figura 4B2).

Inoltre, di recente abbiamo dimostrato che un vaccino genetico, basato sulla fusione di una sequenza segnale di una proteina vegetale con una sequenza di DNA di un antigene di HPV è in grado di generare una risposta anticorpale rapida, robusta e duratura in animali da laboratorio³. Tale strategia vaccinale, potenziata dall'associazione con l'elettroporazione, potrebbe essere utile per prevenire anche le infezioni da virus emergenti o riemergenti (es. SARS-CoV, Zika, influenza) [6].

La scoperta delle proprietà di tali sequenze di origine vegetale in grado di incrementare, in un caso le risposte immunologiche mediate da cellule (utili nel caso di tumori) e, nell'altro, risposte mediate da anticorpi (utili nel caso di infezioni), insieme

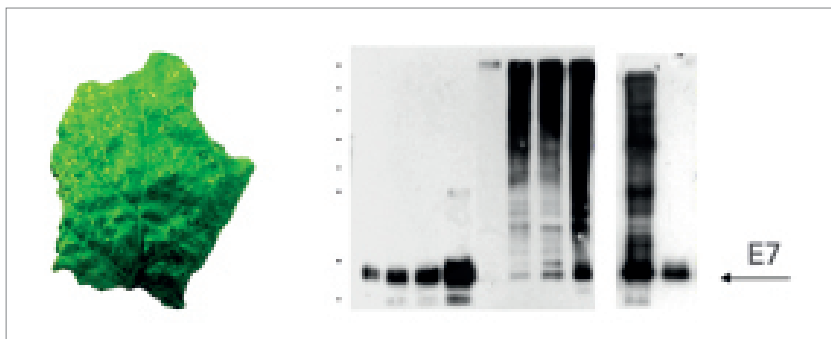


Fig. 3 Oncoproteina E7 di HPV 16 prodotta in piante di tabacco tramite il virus X della patata (PVX)

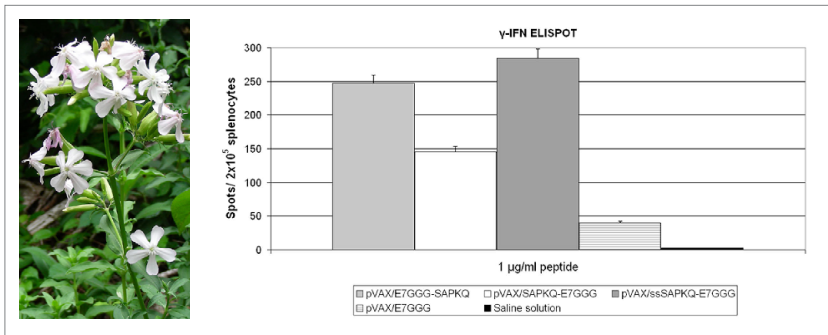


Fig. 4 a) *Saponaria officinalis*, specie spontanea fotografata presso il Centro Ricerche ENEA Casaccia e da cui deriva il gene codificante la saporina attenuata (SAPKQ) per il vaccino terapeutico anti-HPV

b) Miglioramento della risposta immunitaria mediata da cellule suscitate nel modello animale a seguito di vaccinazione con il vaccino genetico contenente la sequenza vegetale SAPKQ

all'impiego di tecnologie a basso costo (vaccini a DNA) permette lo sviluppo di una piattaforma 'verde' che potrebbe essere generalmente valida per la generazione di nuovi vaccini profilattici e/o terapeutici efficaci. Le sequenze ad attività immuno-stimolante di origine vegetale sono inoltre più sicure di quelle di derivazione umana o batterica che potrebbero indurre reazioni secondarie, reazioni crociate o autoimmuni (rischio intrinseco di altre strategie utilizzate per la stessa classe di farmaci dove l'antigene tumore-specifico è fuso con sequenze di proteine umane quali HSPs, calreticolina o citochine).

Anticorpi intracellulari per la terapia delle lesioni associate a HPV 16

Un altro approccio innovativo in studio per la terapia delle lesioni associate a HPV si basa sull'utilizzo di anticorpi intracellulari (*intrabodies*) contro le proteine oncogene di HPV. Si tratta di anticorpi ricombinanti in formato a singola catena (scFv) espressi all'interno delle cellule contenenti il genoma di HPV per bloc-

care o de-localizzare il loro *target* intracellulare, sovvertendo i *pathways* coinvolti nel controllo della proliferazione e della sopravvivenza cellulare, e ostacolare la trasformazione tumorale delle cellule infette (Figura 5). Attraverso metodologie quali la *Phage display technology* e la *Intracellular Antibody Capture Technology* (IACT), che consentono di identificare ligandi specifici per antigeni di

interesse da repertori sintetici ad alta diversità, abbiamo isolato scFvs specifici per le oncoproteine E6 ed E7 di HPV 16. Il formato scFv è estremamente versatile grazie alla elevata specificità verso l'antigene, le dimensioni ridotte a fronte di una capacità di legame conservata, e la possibilità di essere ingegnerizzato per acquisire proprietà rilevanti o costituire la matrice di anticorpi di diverso formato da utilizzare in ambito sia diagnostico che terapeutico.

Gli scFvs da noi selezionati e caratterizzati, una volta modificati ed espressi come *intrabodies* in compartimenti specifici delle cellule tumorali HPV 16-positive, sono stati in grado di contrastare l'attività dei loro bersagli molecolari, con l'esito finale di inibire la proliferazione cellulare e ripristinare l'apoptosi. Inoltre, abbiamo dimostrato che l'espressione di questi scFvs è in grado di prevenire lo sviluppo di tumori associati a HPV 16 in modelli pre-clinici [7].

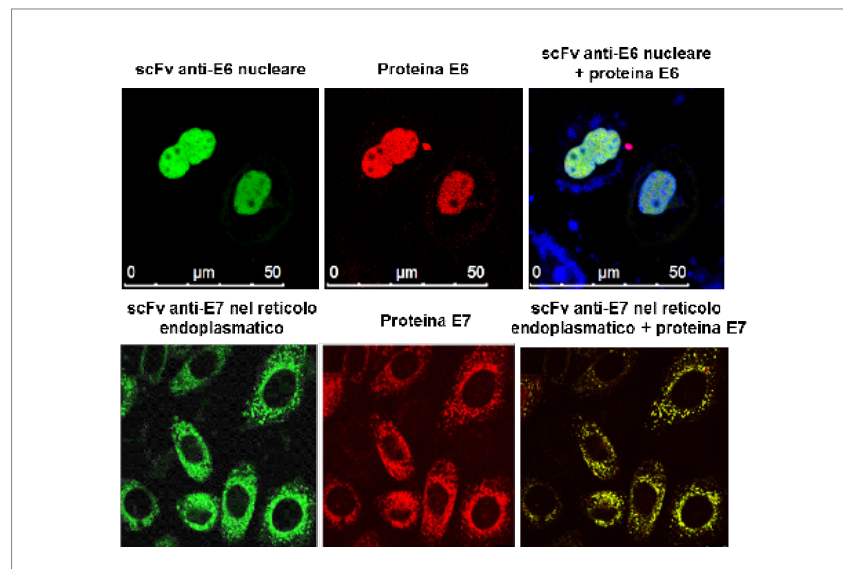


Fig. 5 Immunofluorescenza degli 'intrabodies' scFv (in verde) e delle oncoproteine E6 ed E7 (in rosso) al microscopio confocale: E6 ed il rispettivo anticorpo co-localizzano nel nucleo cellulare (in blu); E7 ed il rispettivo anticorpo co-localizzano nel reticolo endoplasmatico

Nuovi sistemi diagnostici

Poiché non tutte le infezioni da HR-HPV progrediscono in tumore, il rilevamento del virus tramite HPV-DNA test non è indicativo di una eventuale progressione tumorale. Al contrario, le oncoproteine E6 ed E7, essendo necessarie per l'induzione ed il mantenimento della cancerogenesi indotta da HPV, rappresentano dei marcatori ideali per lo sviluppo di sistemi diagnostici potenzialmente in grado di distinguere tra le infezioni transitorie e quelle orientate verso il processo di carcinogenesi. In particolare, l'oncoproteina E6 di

HPV 16 è stata identificata come un bio-marcatore precoce per i tumori orofaringei associati a HPV (in forte aumento) dove la presenza di anticorpi contro tale proteina è rilevabile con 10 anni di anticipo rispetto alla diagnosi.

Abbiamo sviluppato una metodica innovativa per la produzione della proteina E6 di HR-HPV (tipi 16 e 18) in forma solubile, stabile e biologicamente attiva⁴ e stiamo lavorando per lo sviluppo di un sistema diagnostico di facile utilizzo e che potrebbe fornire indicazioni importanti per la diagnosi o la scelta del piano di intervento terapeutico in tutta un'altra

serie di tumori associati ad HPV, quali i tumori della regione anale e dell'orofaringe.

Conclusioni

Le ricerche condotte in collaborazione tra i nostri Istituti, sebbene abbiano ricevuto scarsissimi finanziamenti, hanno prodotto risultati riconosciuti a livello internazionale e aprono la strada alla sperimentazione clinica delle varie formulazioni da noi realizzate (vaccini genetici e proteici, anticorpi intracellulari, antigeni) come possibili strumenti contro i tumori associati ad infezione da HPV.

¹ Globocan 2012, IARC, <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/cervix-new.asp#TOP>

² Franconi R, Massa S Spanò L, Venuti A., Vaccines based on genetic chimera of viral and/or tumoral antigens and plant proteins Brevetto italiano 1394887. Brevetto Europeo EP2456785. Notificato in Italia, Francia e Germania

³ Franconi R, Massa S, Venuti A. *Plant protein signal sequence as adjuvant in DNA vaccines. Patent pending*

⁴ Franconi R, Illiano E. Proteina E6 di HPV ricombinante, solubile e in forma biologicamente attiva, procedimento per la sua preparazione, usi e vaccini terapeutici che la comprendono. Brevetto italiano 1379103 licenza esclusiva a Nanofaber Srl (Spin-off ENEA)

BIBLIOGRAFIA

1. H. zur Hausen (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* **2**(5):342-50
2. A. Yang, Farmer E, Wu TC, Hung CF (2016). Perspectives for therapeutic HPV vaccine development. *J Biomed Sci* **23**(1):75
3. R. Franconi, P. Di Bonito, F. Dibello, L. Accardi, A. Muller, A. Cirilli, P. Simeone, G. Donà, A. Venuti, C. Giorgi (2002). *Plant-derived Human Papillomavirus 16 E7 oncoprotein induces immune response and specific tumor protection. Cancer Research* **62**: 3654-58
4. A. Venuti, G. Curzio, L. Mariani, F. Paolini (2015). Immunotherapy of HPV-associated cancer: DNA/plant-derived vaccines and new orthotopic mouse models. *Cancer Immunol Immunother.* **64**(10):1329-38
5. P. Di Bonito, C. Chiozzini, C. Arenaccio, S. Anticoli, F. Manfredi, E. Olivetta, F. Ferrantelli, E. Falcone, A. Ruggieri, M. Federico (2017). Antitumor HPV E7-specific CTL activity elicited by in vivo engineered exosomes produced through DNA inoculation. *International Journal of Nanomedicine* **12**:4579-4591
6. S. Massa, F. Paolini, G. Curzio, M.N. Cordeiro, E. Illiano, O.C. Demurtas, R. Franconi, A. Venuti (2017). A plant protein signal sequence improved humoral immune response to HPV prophylactic and therapeutic DNA vaccines. *Hum Vaccin Immunother* **13**(2):271-282
7. C. Amici, M. Visintin, F. Verachi, F. Paolini, Z. Percario, P. Di Bonito, A. Mandarino, E. Affabris, A. Venuti, L. Accardi (2016). A novel intracellular antibody against the E6 oncoprotein impairs growth of human papillomavirus 16-positive tumor cells in mouse models. *Oncotarget* **7**(13):15539-53