



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

**CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOMEDICHE**

*Coordinatore del Corso: Prof. Andrea Fausto Piana*

**CURRICULUM IN FISIOPATOLOGIA MEDICA**

**XXIX CICLO**

**Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti  
affetti da HBV cronico durante la terapia  
con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN.  
Studio pilota per la prevenzione  
dell'epatocarcinoma.**

***Coordinatore:***

Prof. Andrea Fausto Piana

***Tutor:***

Prof. Roberto Manetti

***Tesi di dottorato di:***

Dott.ssa Alessandra Mela

La presente tesi è stata prodotta nell'ambito del Corso di Dottorato in Scienze Biomediche dell'Università degli Studi di Sassari, a.a. 2013/2014 – XXIX ciclo, con il supporto di una borsa di studio finanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività 1.3.1.1

## INDICE

### **Cap. 1: Introduzione**

#### **1.1: Epidemiologia**

#### **1.2: HBV: caratteristiche del virus**

#### **1.3: Ciclo replicativo del virus e caratteristiche genetiche**

#### **1.4: Organizzazione Genomica**

##### **- 1.4.1: regione pre-S/S**

##### **-1.4.2: regione pre-C/C**

##### **-1.4.3: l'ORF P**

##### **-1.4.4: ORF X**

#### **1.5: Genotipi di HBV**

#### **1.6: Eziopatogenesi**

#### **1.7: Storia naturale dell'infezione cronica da HBV**

#### **1.8: Approcci terapeutici**

### **2. Obiettivi dello studio**

### **3. Materiali e Metodi**

#### **3.1: Preparazione e caratterizzazione dell'antigene**

#### **3.2: Analisi citofluorimetrica**

#### **3.3: Analisi statistica**

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: "Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell'epatocarcinoma." Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

## **4. Risultati**

## **5. Conclusioni**

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: “Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell’epatocarcinoma.” Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

## **1: Introduzione**

L'HBV (Hepatitis B Virus) è tra i più comuni virus a DNA non citopatici. L'infezione da HBV negli adulti è spesso auto-limitante e si traduce in un'epatite acuta, che conferisce una successiva immunità protettiva. Per contro nel 10% degli adulti infetti si ha lo sviluppo di un'infezione cronica. L'infezione cronica da HBV è un fattore di rischio importante per lo sviluppo di cirrosi e carcinoma epatocellulare (1).

A livello mondiale l'epatite virale di tipo B ha una rilevanza primaria per la sua gravità. L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha recentemente indicato che nel mondo vi sono più di 350 milioni di soggetti portatori del virus dell'epatite B (il 5% della popolazione mondiale) e che circa il 25% sviluppa epatiti severe, le quali possono talora sfociare in epatite cronica, cirrosi e eventuale carcinoma epatocellulare. Si stima che ci siano circa un milione di decessi annui imputabili a tale infezione.

Attualmente le terapie disponibili sono molto efficaci nel controllare la replicazione del virus, ma devono essere somministrate per tutta la vita. E' molto raro che con esse si raggiunga la sierconversione con presenza di anticorpi anti-HBsAg; sarebbe perciò utile trovare

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: "Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell'epatocarcinoma." Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

dei piani terapeutici di minor durata che possano accelerare la perdita di HBsAg con la generazione di anticorpi anti-HBsAg.

L'infezione da HBV contratta durante l'età adulta è generalmente autorisolvibile, diversamente l'infezione acquisita durante il periodo perinatale può evolvere in virosi cronica. L'eliminazione del virus è strettamente legata alla risposta immunitaria dell'ospite, causando però come conseguenza un danno epatico. La prognosi di questa infezione è perciò strettamente legata all'efficienza del sistema immunitario che porta alla risoluzione dell'epatite acuta B.

Durante la prima fase dell'infezione si ha una blanda risposta data dall'immunità innata e una risposta massiccia da parte dei linfociti T. Nonostante la risoluzione dell'epatite acuta il virus persiste in forma episomale all'interno degli epatociti. È stato quindi constatato che questo provochi una stimolazione a lungo termine del sistema immunitario. Il successivo controllo dell'infezione è dato dalle cellule T deputate alla memoria.

La cronicizzazione della virosi da HBV si contraddistingue invece per una mancata maturazione delle cellule T della memoria e da un contemporanea e importante perdita delle cellule T specifiche con conseguente riduzione della risposta antivirale. L'alta e persistente carica virale iniziale è un fattore che determina l'esaurimento delle cellule T effettrici, ma anche altri meccanismi possono contribuire

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: "Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell'epatocarcinoma." Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

alla inibizione delle cellule T. Il grado di compromissione delle cellule T è direttamente proporzionale alla carica antigenica e alle condizioni fisiopatologica del paziente al momento dell'infezione. Le cellule T hanno una efficienza maggiore nei soggetti con bassa viremia, nei pazienti che arrivano alla guarigione spontanea o in seguito a terapia antivirale. (2)

## **1.1 Epidemiologia**

Attualmente si riconoscono diverse aree geografiche con diffusione endemica dell'HBV (Fig.1). Queste zone hanno una prevalenza pari all'8% e comprendono il Sud Est Asiatico, l'Africa Sub-Sahariana, l'America del sud nella zona amazzonica e le regioni del Pacifico; il rischio di infezione in queste aree è pari al 45% specialmente in età giovanile attraverso il contagio interumano, o attraverso la via perinatale. Nelle aree di media prevalenza (HBsAg 2-7%) come Europa Orientale e il Brasile, l'infezione si trasmette sia per via perinatale che per via sessuale, e talvolta per via parenterale. Nelle zone a bassa endemia (HBsAg <2%), come Europa Occidentale, Nuova Zelanda, USA e Australia, la popolazione entra in contatto con il virus o comunque ha sintomatologia evidente in età adulta (3-5) .

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: "Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell'epatocarcinoma." Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

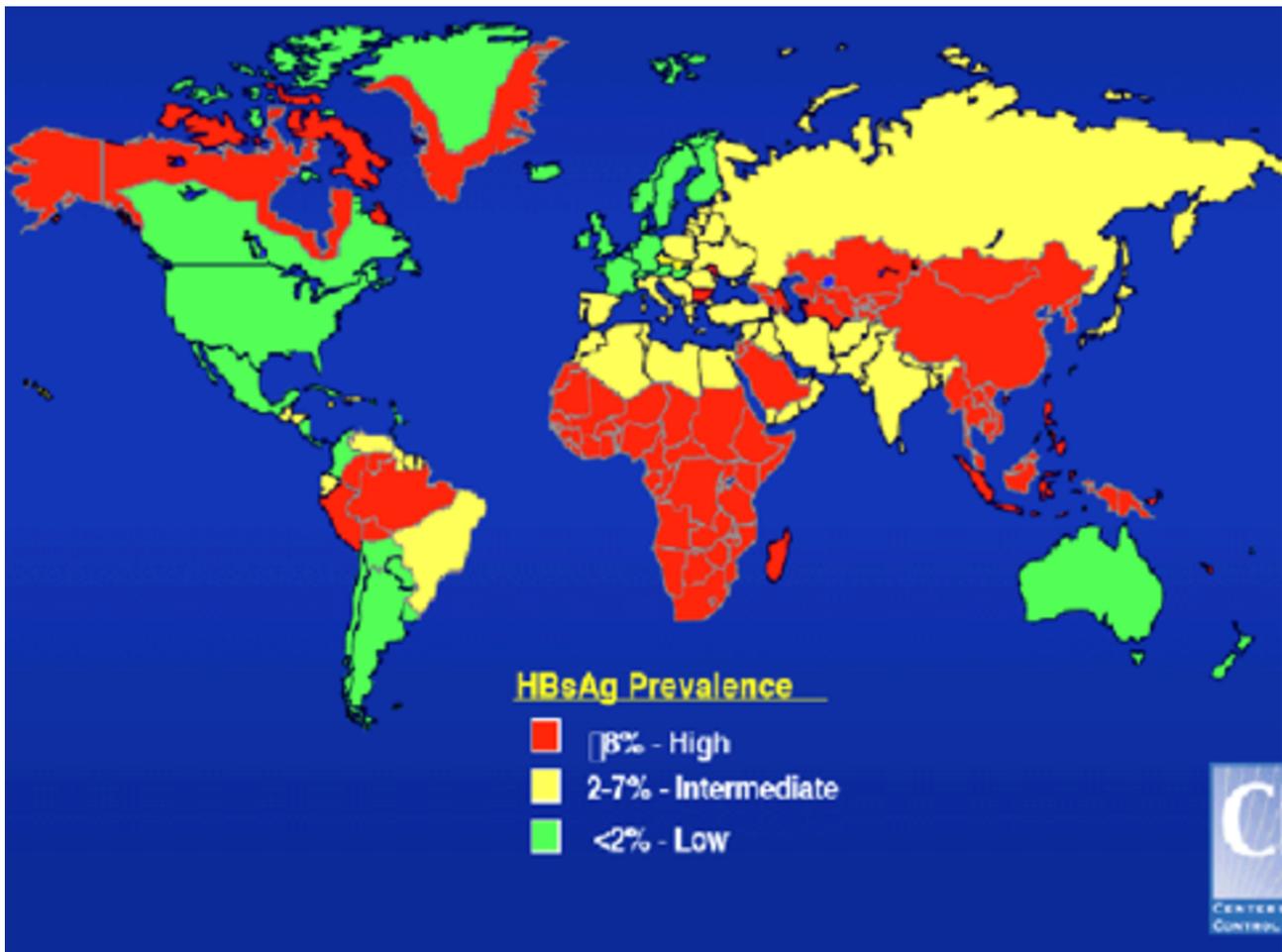


Figura 1: Prevalenza HBV nel mondo. Fonte: CDC Atlanta.

Per quanto riguarda l'attuale situazione italiana grazie al Sistema epidemiologico integrato dell'epatite virale acuta (SEIEVA) si potuto constatare che fino al 2009, le infezioni da HBV hanno presentato un'importante e costante riduzione dell'incidenza. Attualmente il SEIEVA ha stabilito che il tassi d'infezione si sono regolarizzati intorno a 1 caso per 100.000 abitanti e, nel 2014, l'incidenza sia stata di 0,8 per 100.000 (0,0 per la fascia d'età 0-14 anni; 0,3 15-24 anni; 1,0 per la fascia d'età  $\geq$  25 anni). In seguito all'introduzione della vaccinazione universale che ha

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: "Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell'epatocarcinoma." Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

preso inizio nel 1988 è stata registrata la più notevole riduzione soprattutto in persone facenti parte delle categorie dichiarate ad alto rischio di infezione da HBV, la vaccinazione è poi divenuta obbligatoria nel 1991 per tutti i nuovi nati e per i dodicenni.

Un notevole decremento del tasso d'incidenza è stato registrato nella fascia d'età 15-24 anni, presumibilmente grazie all'inserimento della vaccinazione nei dodicenni. Tuttora la maggiore incidenza si riscontra in soggetti di sesso maschile (75,4%) in fascia di età tra i 35 e i 50 anni (59,1%). L'infezione viene più frequentemente trasmessa in seguito a rapporti sessuali non protetti, terapie odontoiatriche e trattamenti di tipo chirurgico estetico. Ciò che attualmente preoccupa soprattutto in Italia è il flusso migratorio che in questi ultimi anni ha fatto incrementare le infezioni acute del 20% in particolare per i flussi migratori provenienti dall'Europa orientale e dall'Africa. (6)

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: "Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell'epatocarcinoma." Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

## **1.2 HBV: caratteristiche del virus**

Il Virus dell'epatite B umana appartiene alla famiglia delle Hepadnaviridae, alla quale appartengono diversi virus specie-specifici quali il virus della marmotta nord-americana (Marmotta monax, WHV), dell'epatite dell'anatra (DHBV), dello scoiattolo di terra (Spermophilus beccheyi, GSHV), questi come quello umano possiedono un elevato tropismo per il tessuto epatico, una spiccata abilità nell'instaurare infezioni di tipo cronico, e possiedono una struttura a DNA con una modalità replicativa davvero singolare.

Il virus viene individuato come un corpuscolo di forma globulare che prende il nome di particella di Dane con un diametro di 42 nm, Questa è la forma intera dell'HBV, ma durante l'infezione è possibile che si sviluppino due forme differenti di virus: si possono individuare piccole particelle di 22 nm di diametro e forme più allungate non tutte della medesima lunghezza le quali si pensa possano essere delle particelle prive di acido nucleico dovute a diversi errori di replicazione che non hanno capacità infettive. (Figura 2) (7-9).

Il virus è composto da un involucro esterno lipoproteico detto envelope e da un globulo interno del diametro di 30-35 nm chiamato core o nucleocapside virale, questo è composto da un involucro pro-

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: "Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell'epatocarcinoma." Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

teico detto capside di forma icosaedrica che racchiude il doppio filamento di DNA ed una DNA-polimerasi (Figura 3).

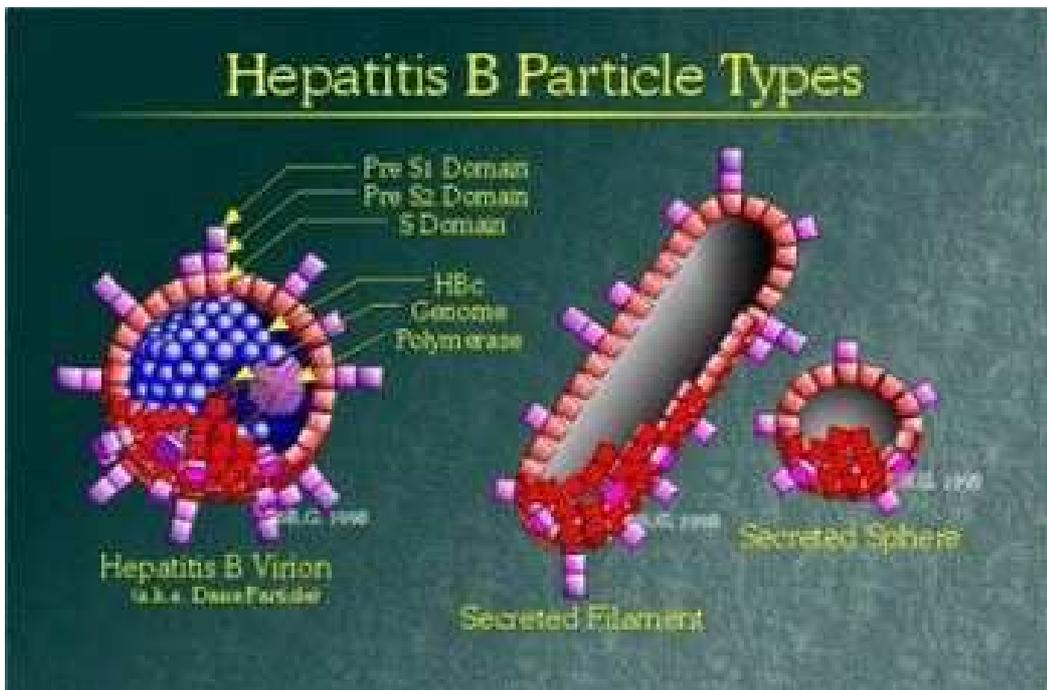
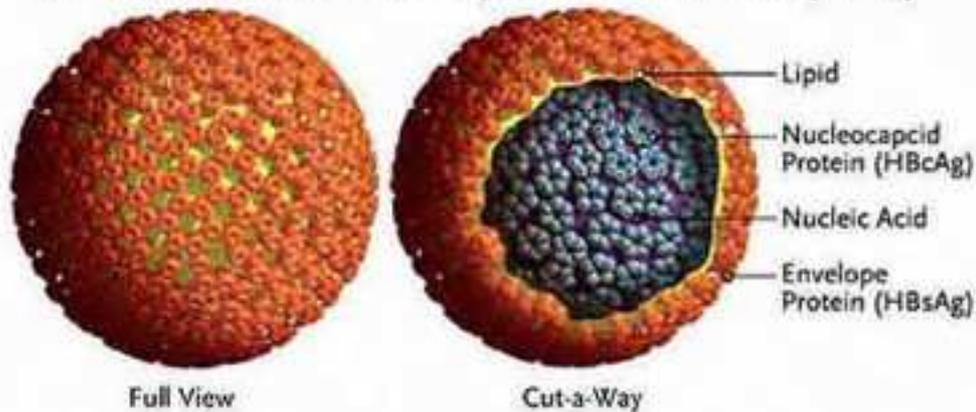


Figura 2: differenti tipi di particelle di HBV

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: “Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell’epatocarcinoma.” Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

## Model of Human Hepatitis B Virus (HBV)



© Physicians' Research Network, Inc. All rights reserved.

Published in *The PRN Notebook*, Volume 9, Issue 3, September 2004 and *The PRN Notebook Online* at [www.prn.org](http://www.prn.org)  
Three-dimensional model of HBV created by Louis E. Henderson, PhD, Frederick Cancer Research Center.

Figura 3: struttura tridimensionale del virus dell'epatite B umana

### 1.3: ciclo replicativo del virus e caratteristiche genetiche

L'HBV è l'unico virus a DNA tra tutti quelli che provocano epatiti nell'essere umano: possiede una molecola di DNA circolare ed incompleto a doppio filamento lungo 3,2 kb.

Il doppio filamento è formato da due elementi: uno denominato L(-) lungo, di circa 3020-3320 nucleotidi, ed uno S(+) più ridotto di 1700-2800 nucleotidi, questi due filamenti possiedono una zona di

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: "Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell'epatocarcinoma." Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

circa 240 nucleotidi sul 5' che consente loro di mantenere una forma simil-circolare (Figura 4).

L'HBV inizia il suo ciclo di replicazione all'interno della cellula infettata localizzandosi nel nucleo, mediante la formazione di un DNA a doppia elica circolare ad opera di una DNA-polimerasi propria che consente al filamento a polarità positiva di chiudersi e avvolgersi formando il cccDNA. Il cccDNA servirà come template per la trascrizione di un intermedio ad RNA che viene effettuata dalla RNA-polimerasi DNA-dipendente, senza integrarsi nel DNA umano. Questo meccanismo è piuttosto singolare poiché trova similarità con alcuni meccanismi retrovirali.

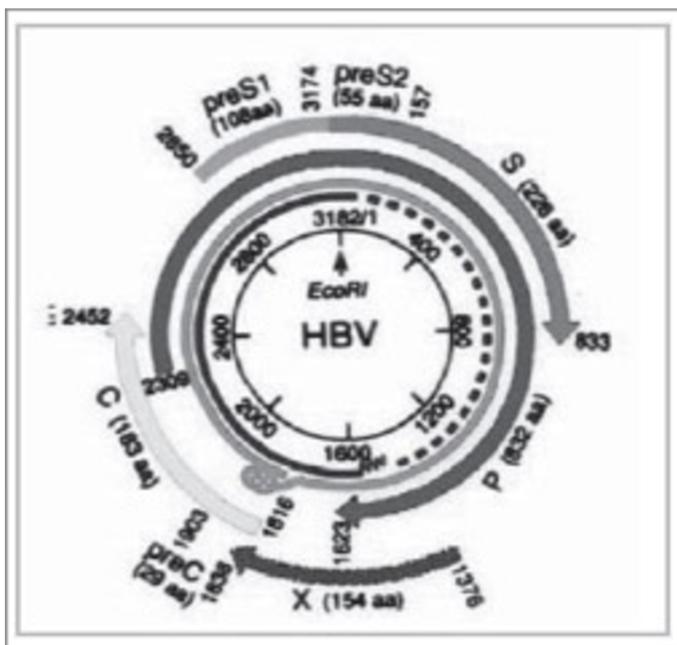


Figura 4: Rappresentazione del genoma Virale di HBV

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: "Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell'epatocarcinoma." Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

Verranno sintetizzate due forme di RNA: uno pregenomico e uno genomico:

- l'RNA genomico viene tradotto in tutte le proteine che servono per la formazione strutturale del virus, da parte dei ribosomi dell'epatocita.

- l'RNA pregenomico viene successivamente chiuso nel capsid e ad opera di una polimerasi virale, viene trascritto con un processo di trascrizione inversa dando vita ad un ibrido DNA-RNA.

La successiva degradazione dell'RNA pregenomico ad opera di una Ribonucleasi-H che cliva l'eteroduplex in un ssDNA che costituirà il filamento negativo, successivamente verrà sintetizzato il filamento positivo che rimarrà incompleto.

Si avrà la costituzione delle particelle virali mature che verranno successivamente rilasciate in circolo (fig. 5) (8, 10, 11).

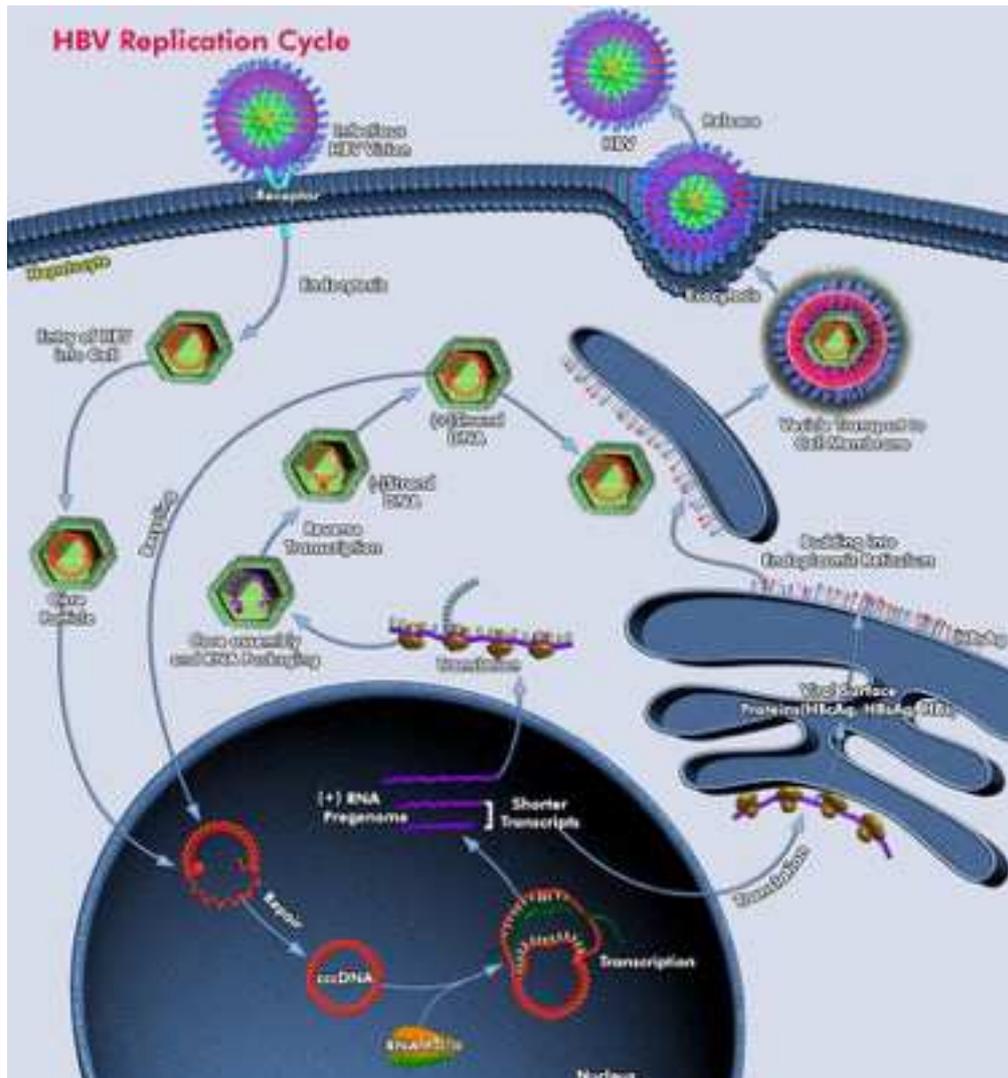


Figura 5: il ciclo replicativo dell'HBV

Il virus possiede una polimerasi in grado di svolgere diverse funzioni poiché possiede domini differenti (7).

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: "Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell'epatocarcinoma." Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

I domini sono 4:

1) Spacer

2) Priming

3) Trascrittasi inversa

4) Ribonucleasi

## **1.4 Organizzazione Genomica**

Il genoma di HBV è strutturato in 4 Open Reading Frame (ORF), che risultano avere diverse parti in comune, in questa maniera tutte le parti comuni vengono comunque tradotte dando prodotti differenti partendo da un diverso sito d'inizio della traduzione, possono essere sintetizzate 7 differenti proteine, con differenti funzioni e strutture.

Delle 4 ORF, 2 codificano rispettivamente per proteine del core (pre-C/C) e dell'envelope (pre-S/S) e le altre due (p e X) codificano per proteine con funzioni non del tutto chiare, e per la polimerasi virale.(11)

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: "Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell'epatocarcinoma." Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

### 1.4.1 Regione pre-S/S:

All'interno della regione pre-S/S possono essere distinte due porzioni geniche, pre-S1 e pre-S2, che precedono il gene S, questa regione contiene 3 differenti siti per l'inizio della traduzione (start codon) ed un unico stop codon, in questo modo vengono sintetizzate 3 proteine con struttura differente ma con una medesima porzione carbossiterminale

L'envelope è costituito da una serie di proteine transmembrana glicosilate, HBsAg che viene definita *small* perché è la più piccola tra le proteine transmembrana costituita da 226 aa, e *major* poiché risulta essere la più presente e viene codificata a partire dal gene S; fanno parte dell'envelope anche le proteine "*middle*" e "*Large*" rispettivamente pre-S1 e pre-S2.(12)

I vaccini sono stati sviluppati contro gli epitopi dell'HBsAg poiché gli anticorpi anti-HBs riescono a proteggere dall'infezione da HBV in maniera sufficiente, sia che si tratti di infezione naturale o di risposta al vaccino.

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: "Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell'epatocarcinoma." Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

L'immunogenicità dell'HBsAg è stata riscontrata in una porzione prevalentemente costituita da cisteine che si trova tra gli aminoacidi 124 e 149.

La proteina “middle”, viene trascritta a partire del gene S da una porzione che codifica per 55 aa e dalla porzione pre-S2, la “large” viene trascritta a partire del gene S da una regione che codifica per circa 120 aa e dalle porzioni pre-S1 e pre-S2. A queste proteine vengono attribuite le proprietà di attacco alla membrana dell'epatocita e possiedono diversi epitopi di riconoscimento per le cellule B e T.

Il livello di espressione delle proteine sopracitate viene regolato mediante un sito di controllo della traduzione sulla zona terminale 3' del gene S che funge da promotore e viene finemente regolato da fattori nucleari degli epatociti, inoltre nella regione pre-S1 vi è un secondo recettore non organo specifico. (13)

#### **1.4.2 Regione pre-C/C**

L'ORF pre-C/C possiede una regione che codifica per circa 160 aa dalla quale vengono trascritte sia proteina del core (HBcAg) che la proteina di secrezione (HBeAg). In questa regione sono stati riscon-

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: “Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell'epatocarcinoma.” Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

trati due codoni d'inizio rispettivamente per il gene C che codifica per l'HBcAg ed il secondo che possiede una regione mista costituita dal gene C e dalla pre-C che serve per l'espressione della proteina di secrezione dell'HBeAg. La proteina di secrezione diviene matura solo in seguito a modifiche post traduzionali che riguardano un residuo dell'HBcAg.

L'HBeAg viene utilizzato oggi in diagnosi perché indice dell'attività di replicazione del virus; l'HBsAg e l'HBeAg si ritrovano sulla membrana degli epatociti infetti e questo determina il riconoscimento da parte del sistema immunitario. L'HBeAg possiede una piccola sequenza amminoacidica che consente alla stessa di arrivare al reticolo endoplasmatico per poi traslocare, ma prima della secrezione subisce un taglio proteolitico .

Se in seguito ad analisi di campioni di sangue di pazienti affetti non si riscontra la presenza di HBeAg, con tutta probabilità si ha avuto la siero conversione. (14-16).

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: "Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell'epatocarcinoma." Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

### **1.4.3 L' ORF P**

Nell'ORF P è presente il gene p, che ricopre diverse porzioni degli altri geni, possiede quattro domini che codificano rispettivamente per enzimi implicati nella replicazione. La porzione amino-terminale codifica per la DNA polimerasi-RNA dipendente (trascrittasi inversa). L'RNasi-H viene sintetizzata a partire invece dalla porzione carbossi-terminale (14-16).

### **1.4.4 ORF X**

L'ORF X possiede un gene X che codifica per un proteina, che non fa parte della struttura del virus ed è composta da 154 aa e che apparentemente ha una funzione sconosciuta.

Inoltre il gene X codifica per altre due proteine implicate nella replicazione virale poiché in grado di attivare le regioni di Enhancer .  
(17,18)

Recenti studi hanno suggerito che questa proteina possa essere messa in correlazione con lo sviluppo di carcinoma epatico, in quanto pare possieda attività trasformante.(19)

## **1.5: Genotipi di HBV**

Per quanto concerne i genotipi di HBV esistenti, ne sono stati individuati 8 ed in seguito sono stati classificati e nominati dalla A alla H. Okamoto ha descritto i primi quattro genotipi (A-D) nel 1988 (20) in seguito sono poi stati caratterizzati i genotipi dalla E alla H. Recentemente in paesi come Cina Nord-Occidentale, Laos, Vietnam e India é stato caratterizzato il possibile genotipo I che però non sembra essere del tutto accettato poiché sembra essere una forma ricombinante dell'HBV/ACG (21).

La lunghezza del genoma completa di HBV può variare da 3182-3248 nucleotidi, secondo il genotipo, a causa di delezioni e inserzioni.

La maggior parte dei genotipi mostrano una distribuzione geografica più o meno distinta: il genotipo A è diffuso negli Stati Uniti, in Europa settentrionale e centrale, e in Sud Africa; i genotipi B e C

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: “Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell'epatocarcinoma.” Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

predominano in Estremo Oriente; il genotipo D si trova nel bacino del Mediterraneo ed in Medio Oriente; il genotipo F è stato segnalato per essere presente principalmente in Sud e Centro America; genotipo G è stato recentemente scoperto solo in Francia e negli Stati Uniti nei pazienti co-infetti con genotipo A; il genotipo E è stato principalmente segnalato in Africa occidentale. La distribuzione della prevalenza dei diversi genotipi di HBV nell'Africa Subsahariana è molto limitata. (22)

## **1.6 Eziopatogenesi**

Gli epatociti sono le uniche cellule ad essere attaccate dalla famiglia degli Hepadnaviridae e diversi studi hanno dimostrato che l'epatotropismo si manifesta anche a livello dell'espressione genica virale. Infatti, è stata evidenziata una selettività solo su cellule molto specifiche. In vivo, la replicazione del DNA virale al di fuori del fegato è stata documentata solo in anatre infettate dal DHBV, questo è stato ritrovato in un sottogruppo di cellule esocrine e nelle isole endocrine del pancreas e del tubulo prossimale del rene. (23)

Altri studi hanno dimostrato che i linfociti potrebbero essere dei bersagli di infezione da parte dell'Epadnavirus e questi potrebbero

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: "Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell'epatocarcinoma." Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

quindi divenire un secondo serbatoio per il virus che in questo modo protrarrebbe l'infezione a prescindere da quella causata al fegato(23). Queste informazioni sono ancora oggi oggetto di dibattito poiché non è stato definitivamente chiarito se la rilevazione degli acidi nucleici virali nei linfociti riflette replicazione virale attiva o è il risultato di attività fagocitaria da parte delle cellule del sistema immunitario. Di recente però alcuni studi hanno suggerito che che acidi nucleici virali di HBV presenti nei linfociti in studio fossero dovuti a virus adsorbito. Altri hanno altresì dimostrato che gli acidi nucleici di HBV identificati in queste preparazioni cellulari includevano RNA virale trascritto nelle cellule da un modello di DNA circolare chiuso covalentemente (cccDNA)(23).

La maggior parte delle infezioni da HBV (dal 90 al 95 %) negli adulti sono transitorie, mentre il 90% delle infezioni perinatali tendono a cronicizzare. Alla base della risposta verso questo virus ci sono le cellule T citotossiche che riconoscono rapidamente gli epitopi virali(23).

Ad oggi ciò che non è ancora chiaro è il meccanismo patogenetico che distingue le epatiti virali acute da quelle che cronicizzano, perché non è stato del tutto dimostrato l'effetto citopatico diretto e quindi si ritiene che la risposta immunitaria abbia assolutamente un ruolo di primaria importanza nei confronti dello svolgersi delle infe-

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: "Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell'epatocarcinoma." Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

zioni causate da HBV. Le numerose ricerche condotte negli ultimi anni hanno permesso di far luce sulla patogenesi dell'epatite B e soprattutto sui meccanismi responsabili della cronicizzazione dell'infezione.

Il decorso tipico dell'infezione da HBV perinatale prevede tre fasi che talvolta conducono alla cronicizzazione: l'immunotolleranza, la clearance, e la formazione di residui inattivi. L'esacerbazione severa in HBV cronico, di solito si verifica nella fase di clearance, ma questa può accadere anche in alcuni pazienti in fase inattiva, provocando diversi danni epatici tipici della risposta cellulo-mediata che avviene durante la fase di clearance. La cronicizzazione dell'HBV con esacerbazione spontanea acuta può variare tra sintomatica ed asintomatica oppure sintomatica con un decorso simile all'epatite acuta, in questi casi ci possono essere delle complicanze che portano alla morte del paziente. Se il fegato si presenta cirrotico in caso di riattivazione della malattia la prognosi potrebbe essere infausta in misura ancora maggiore rispetto a pazienti non affetti da cirrosi. Esistono fattori predisponenti l'esacerbazione: elevati livelli di ALT iniziali, il sesso maschile, la presenza di HBeAg, albumina bassa, alti livelli di bilirubina, tempo di protrombina (PT) prolungato e bassa conta piastrinica.(24)

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: "Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell'epatocarcinoma." Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

Durante la fase iniziale di infezione virale, sono frequenti la produzione di citochine pro-infiammatorie, interferone (IFN) e l'attivazione delle cellule natural killer (NK). Sino a poco tempo fa HBV veniva considerato come un virus “invisibile” che poteva stabilire un'infezione persistente nel fegato eludendo il sistema immunitario innato dell'ospite, ora è stato invece dimostrato che durante le prime fasi d'infezione, il virus B raggiunge gli epatociti e replica; le particelle complete assieme all'eccesso di HBsAg vengono liberate dall'epatocita in assenza di ogni effetto citopatico e passano nella circolazione sanguigna. Dopo l'inizio della espansione virale e prima del picco di viremia, in sieri di pazienti affetti sono stati rivelati discrete quantità di IFN, fattore di necrosi tumorale (TNF)- $\alpha$ , IL-15, IL-10, IL-6 e IL-1b.

I principali PRR (recettori di rilevamento patogeni) implicati nell'infezione virale sono costituiti da recettori Toll-like (TLR), da recettori NOD-like, dal gene inducibile I da acido retinoico (RIG-I) e dal gene 5 associato alla differenziazione del melanoma (MDA5). Le proteine dell'involucro virale, nucleocapsidi e acidi nucleici, sono in grado di attivare differenti pathway di segnalazione intracellulare e indurre la produzione di IFN, citochine pro-infiammatorie e chemochine. (25)

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: “Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell'epatocarcinoma.” Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

Il danno epatico vero e proprio è provocato dalla risposta immunitaria cellulo-mediata diretta verso gli antigeni del nucleocapside virale (HBcAg, HBeAg) che sono espressi sulla superficie degli epatociti infettati insieme agli antigeni maggiori di istocompatibilità di classe I (HLA-I)

La risposta immunitaria agli antigeni HBV è responsabile sia della clearance virale che della patogenesi della malattia durante questa infezione. Mentre la risposta anticorpale umorale agli antigeni virali dell'envelope, contribuisce alla clearance di particelle di virus in circolazione, la risposta immunitaria cellulare agli antigeni dell'envelope, del nucleocapside e della polimerasi contribuisce all'eliminazione delle cellule infette.

La causa dominante della persistenza virale durante l'infezione da HBV è lo sviluppo di una risposta immunitaria antivirale debole.

## **1.7 Storia naturale dell'infezione cronica da HBV**

Le fasi dell'infezione da HBV sono prevalentemente due e ben distinte: la prima replicativa e la seconda di integrazione, queste vengono a loro volta divise in due stadi. (26). La storia naturale dell'in-

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: "Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell'epatocarcinoma." Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

fezione è determinata dall'interazione tra l'attiva replicazione virale e la risposta immunitaria dell'ospite. Come detto in precedenza, la percentuale di cronicizzazione è particolarmente elevata se l'infezione è contratta alla nascita e diminuisce fino a raggiungere percentuali molto basse se contratta in età adulta. Questa differenza è dovuta alle caratteristiche del sistema immunitario dell'ospite, che matura dalla nascita all'età adulta.

Sia il controllo dell'infezione che il danno epatico sono quindi strettamente dipendenti dalla risposta immunitaria, ed il danno che avviene a carico del parenchima epatico rappresenta il prezzo che l'ospite deve pagare per poter eliminare il virus dalle cellule.

La risoluzione dell'infezione acuta da HBV è caratterizzata da una risposta immunitaria di tipo T efficiente, che è preceduta da una scarsa risposta innata negli stadi precoci dell'infezione. Il controllo persistente dell'infezione è inoltre garantito da una memoria protettiva a lungo termine che è probabilmente sostenuta da una stimolazione continua da parte di particelle virali che non sono totalmente eliminate dalle cellule epatiche (persistendo in forma di episoma nel nucleo di queste ultime) anche dopo la risoluzione dell'infezione acuta stessa. La persistenza cronica del virus è invece caratterizzata da una mancata maturazione delle cellule T della memoria e da un esaurimento della risposta T specifica all'HBV. La persistente espo-

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: "Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell'epatocarcinoma." Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

sizione delle cellule T ad una alta carica antigenica è la chiave determinante per l'esaurimento funzionale delle cellule T, ma anche altri meccanismi possono contribuire alla loro inibizione, incluso l'effetto tollerogenico dell'ambiente epatico. Il grado di disfunzione delle cellule implicate nella risposta immunitaria è variabile e la sua severità è legata al livello di replicazione virale ed alla carica antigenica. La funzione antivirale delle cellule T infatti è più efficiente in pazienti che possono controllare l'infezione sia parzialmente, come nei portatori inattivi di HBsAg che presentano una bassa replicazione virale, oppure completamente come nel caso dei pazienti che raggiungono la clearance dell'HBsAg spontaneamente o dopo terapia antivirale.(27)

Tenendo conto di quanto detto, schematicamente possono essere individuate cinque fasi nella storia naturale dell'infezione e queste fasi non sono necessariamente consecutive tra loro:

### *Fase di Immunotolleranza*

La fase iniziale di immunotolleranza è caratterizzata da una forte replicazione virale, con presenza dell'HBeAg (indice appunto di attiva replicazione virale), alti valori di HBV-DNA e valori di ALT normali (specialmente nei bambini asiatici) o solo lievemente aumentati associati ad un fegato normale o ad una minima infiammazione epatica. Questa fase è più frequente e più lunga nei soggetti

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: "Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell'epatocarcinoma." Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

che acquisiscono l'infezione in età perinatale (può durare tra i 10 ed i 30 anni), mentre è generalmente breve o assente se acquisita durante l'adolescenza o in età adulta.

### *Immunoclearance*

Dopo un periodo variabile di positività dell'HBeAg viene persa l'immunosoppressione ed il sistema immunitario inizia ad attivare una risposta contro il virus. In questa fase si hanno delle fluttuazioni dell'HBV-DNA progressivamente decrescenti ed un concomitante incremento degli indici di necrosi epatica che sono indice di una necroinfiammazione attiva, con grado di fibrosi variabile riscontrabile alla biopsia epatica. In seguito a questa attivazione immunitaria si ha la clearance dell'HBeAg e la sierconversione ad anti-HBeAg segna la transizione alla fase successiva che può essere uno stato di portatore cronico inattivo, o una epatite cronica anti-HBeAg positiva in cui è presente un mutante del virus che silenzia la produzione dell'HBeAg.

### *Stato di portatore inattivo di HBsAg*

Questa fase è caratterizzata dalla negatività dell'HBeAg e dalla positività degli anti-HBeAg, con HBV-DNA non rilevabile o a bassa carica (solitamente HBV -DNA <2000UI/ml), livelli di ALT persistenti.

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: "Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell'epatocarcinoma." Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

temente normali ed assenza di attività all'istologia epatica con una minima fibrosi.

### *Immunoriattivazione*

La persistenza di particelle di HBV-DNA nel fegato fa sì che in un certo numero di portatori cronici di HBsAg possa esserci una riattivazione con recrudescenza della malattia epatica; ciò può avvenire sia spontaneamente sia a causa di una immunosoppressione concomitante. La riattivazione può essere dovuta al virus wild type, per cui il virus riprende a replicare attivamente e si ha nuovamente una positività dell'HBeAg, oppure più frequentemente a varianti virali (mutanti) per cui non si ha l'espressione dell'HBeAg che viene silenziata, pur essendo però presente una importante attività replicativa del virus che non viene contrastato efficientemente dal sistema immunitario. In questa fase si ha quindi generalmente negatività dell'HBeAg, positività dell'anti-HBeAg, HBV-DNA rilevabile (solitamente tra 2.000 e 20.000.000 UI/ml), incremento delle ALT e moderata o severa necroinfiammazione epatica con livelli di fibrosi variabili alla biopsia epatica. Tale quadro viene definito come epatite cronica attiva HBeAg negativa.

### *Clearance dell'HBsAg*

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: "Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell'epatocarcinoma." Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

Dopo molti anni di HBV-DNA negativo, circa l'1-3% all'anno dei portatori cronici inattivi di HBsAg possono andare incontro alla perdita spontanea dell'HBsAg ed allo sviluppo degli anti-HBsAg, ma possono persistere comunque livelli di replicazione virale bassi sia nel siero sia a livello epatico. Pertanto in questi pazienti una immunosoppressione importante può portare ad una riattivazione dell'infezione.(28-29)

In considerazione di quanto appena detto, appare evidente come l'evoluzione del danno epatico sia associata con le fasi di immunoclearance e di riattivazione. Per tale ragione la fase immunotollerante e la fase di portatore cronico inattivo non richiedono alcuna terapia mentre il trattamento antivirale dovrebbe essere riservato ai portatori cronici HBsAg positivi con attiva replicazione virale ed evidenza biochimica o istologica di danno epatico.(30)

## **1.8 Approcci terapeutici**

Attualmente gli analoghi nucleosidici/tidici (NUCs) e l'interferone costituiscono il gold standard delle terapie antivirali disponibili per i pazienti con infezione da HBV cronico. Gli analoghi nucleosidici/tidici sono in grado di inibire il processo replicativo del virus me-

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: "Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell'epatocarcinoma." Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

dianete il blocco della trascrizione dell'RNA virale in DNA provirale; agiscono durante il processo di trascrizione, sostituendosi in maniera preferenziale alle basi azotate di modo che il DNA di neoformazione non sia completo e che non vi sia ulteriore capacità di essere tradotto per la successiva formazione di nuove particelle virali. I principi attivi più comuni sono l'entecavir, la lamivudina, l'adefovir dipivoxil, la telbivudina ed il tenofovir. Questi farmaci si sono dimostrati molto efficaci nell'inibizione della replicazione virale e ne consentono il mantenimento. Possiedono quindi anche un'attività antinfiammatoria virus indotta. Accade però che non siano in grado di eliminare le sequenze di cccDNA che rimane in forma episomale all'interno dell'epatocita infetto, quindi non contrastano il fenomeno della latenza virale. Inoltre queste terapie a lungo termine mostrano effetti collaterali riconducibili a sofferenza epatica, acidosi lattica, miopatia, nefropatia e osteoporosi e portano spesso all'insorgenza di mutazioni nel DNA virale, con fenomeni di farmaco resistenza.

Per quanto riguarda la terapia portata avanti con interferone, è stato rilevato che la sua efficacia, in somministrazioni che arrivano sino a 48 settimane, è nettamente inferiore a quella dei NUCs ma al contrario di essi, può indurre una completa inattivazione dell'HBsAg in circa, il 3-7% dei casi. Questo sarebbe il quadro clinico desiderabile data la totale scomparsa del virus e la sieroconversione.

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: "Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell'epatocarcinoma." Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

Tuttavia anche la terapia con interferone porta ad effetti collaterali severi come mialgie, astenia, febbre, piastrinopenia, leucopenia, e depressione.

Per cominciare una terapia antivirale esistono delle aggiornate linee guida (AASLD, AISF, EASL, APASL), ad esempio nei pazienti anti HBeAg positivi, la indicazione alla terapia antivirale si pone quando la carica virale è  $\geq 2000$  IU/mL, i valori di ALT sono superiori alla norma e/o il grado di fibrosi è  $\geq 3$  di Ishak o METAVIR  $\geq F2$ .

Recentemente diversi studi clinici hanno evidenziato una ripresa della risposta immunitaria nei pazienti con HBV cronico in seguito ad uno *switch* terapeutico effettuato in maniera sequenziale tra NUCs ed interferone, è stata riscontrata una buona casistica di negativizzazione, con frequenza della sieroconversione HbeAg anti-Hbe anche del 14% dei casi rispetto alla sola somministrazione di NUCs. (31)

Un altro recente studio, sin ora il più grande effettuato sulle terapie di combinazione ha dimostrato con ottime percentuali che la somministrazione di PEG-IFN in associazione con gli analoghi nucleosidici/tidici o in sequenza dopo la sospensione degli stessi, può migliorare la possibilità di una negativizzazione dell'HBV-DNA. Il meccanismo d'azione del PEG-IFN è noto solo in parte, ed inoltre è stato riscontrato come dato di particolare importanza che nessuno

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: "Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell'epatocarcinoma." Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

dei pazienti anti HBeAg positivi, con genotipo D (n=144) ha negativizzato per HBsAg in corso di terapia.(32)

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: “Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell’epatocarcinoma.” Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

## **2. Obiettivi dello studio**

Di recente presso il reparto di Malattie infettive dell'Università di Sassari (UOC) in 6 pazienti affetti da HBV cronico in terapia con NUCs è stata riscontrata neuropatia periferica NUCs correlata. In seguito per questi pazienti è stata bloccata la somministrazione di NUCs effettuando lo *switch* terapeutico con PEG-INTERFERON, nei quali è stato rilevato, dopo la sospensione della terapia con PEG-IFN, un «completo» controllo dell'infezione senza necessaria reintroduzione della terapia con NUCs.

Sulla base di tali premesse presso il reparto di Malattie infettive (Uoc) in collaborazione con il reparto di Medicina Clinica nel laboratorio di immunologia e citometria sperimentale, del quale faccio parte, è stato avviato un articolato progetto di ricerca strutturato in due distinte fasi;

Uno studio clinico osservazionale retrospettivo nel quale sono state individuate le caratteristiche dei pazienti per selezionare quelli per la fase prospettica di ricerca.

Sono stati selezionati per la fase prospettica pazienti in trattamento con NUCs da almeno 5 anni da poter seguire nelle varie fasi dello

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: "Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell'epatocarcinoma." Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

switch terapeutico con PEG-IFN e nel successivo *follow-up* al fine di poter studiare l'andamento della risposta immunitaria.

L'indagine è stata condotta mediante analisi cliniche ed ematologiche monitorando nei vari prelievi, la viremia attraverso la ricerca di HBV DNA, i parametri epatici quali AST/ALT/GGT e HbsAg. Contemporaneamente presso il nostro laboratorio, i campioni di sangue sono stati analizzati al citofluorimetro in seguito a stimolazione antigene-specifica utilizzando peptidi ricombinanti disegnati sulle porzioni proteiche del Core, del Surface e della Polimerasi del virus HBV genotipo D (Tab.1), come pubblicato dalla banca dati BLAST. I peptidi sono stati acquistati presso la ditta MIMOTOPS.

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: "Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell'epatocarcinoma." Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

**TAB.1: peptidi ricombinanti HBV genotipo D.**

Peptide1 "core"	15 mer (1-15)	MDIDPYKEFGATVEL
Peptide2 "core"	15 mer (15-30)	LSFLPSDFFPSVRDL
Peptide3 "core"	16 mer (40-55)	DALESPEHCSPHTAL
Peptide4 "core"	15 mer (61-80)	CWGDILTSTWVGNT
Peptide5 "core"	15 mer (61-80)	ITLSTWVGNTLEDPA
Peptide6 "core"	16 mer (80-95)	ASRDLVVSYVNSNMGL
Peptide7 "core"	16 mer (95-110)	LKFRQLLWFHISCLTF
Peptide8 "core"	16 mer (110-125)	FGRETVLELYVSGVW
Peptide9 "core"	16 mer (128-141)	IRTPPAYRPPNAPILS
Peptide10 "core"	15 mer (135-148)	NAPILSTLPETTIVR
Peptide1 "surface"	15 mer (1-15)	MGGWSSKPRQGMGTN
Peptide2 "surface"	15 mer (16-30)	LSVNPPLGFFPDHQL
Peptide3 "surface"	15 mer (31-45)	DPAFGANSNPDWDF
Peptide4 "surface"	15 mer (31-45)	NPNKDHWEANQVGA
Peptide5 "surface"	15 mer (61-90)	GAFPGFTPPHGILL
Peptide6 "surface"	15 mer (61-90)	GWSPQAQGILTTVPV
Peptide7 "surface"	15 mer (91-120)	APPPASTNRQSGRQP
Peptide8 "surface"	15 mer (91-120)	TPISPPLRDSHPQAM
Peptide9 "surface"	15 mer (141-180)	FPAGSSSGTVNVPV
Peptide10 "surface"	15 mer (141-180)	TTASPISSIFSRTGD
Peptide11 "surface"	15 mer (141-180)	SRTGDPAPNMESTTS
Peptide12 "surface"	15 mer (280-324)	CPLLPGTSTTSTGPC
Peptide13 "surface"	15 mer (280-324)	TSTGPKCTCTSPAQG
Peptide14 "surface"	15 mer (280-324)	PAQGTSMFSPCCCTK
Peptide15 "surface"	15 mer (280-324)	SMFPSCCCTKPSDGN
Peptide1 "polymerase"	10 mer (120-180)	ELQHGRLVFQ
Peptide2 "polymerase"	10 mer (120-180)	CGSPYSWEQE
Peptide3 "polymerase"	12 mer (60-120)	ARFYPNLTKYLP
Peptide4 "polymerase"	12 mer (60-120)	LKLIMPARFYPN
Peptide5 "polymerase"	15 mer (60-130)	YAVNHYFKTRHYLHT
Peptide6 "polymerase"	15 mer (60-130)	TRHYLHTLWKAGILY
Peptide7 "polymerase"	15 mer (1-60)	LLDDEAGPLEEELPR
Peptide8 "polymerase"	15 mer (180-240)	GDESFCQSSGILSR
Peptide9 "polymerase"	15 mer (180-240)	SSGILSRSPVGPVCR

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: "Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell'epatocarcinoma." Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

Peptide10 "polymerase"	15 mer (240-300)	VELHNIPPSSARSQS
Peptide11 "polymerase"	15 mer (240-300)	SOSEGPIFSCWWLQF
Peptide12 "polymerase"	16 mer (130-200)	PTTRRPFVGEPSGSGH

### 3. MATERIALI E METODI

Inizialmente ai 3 pazienti é stato sottoposto il consenso informato ed è stata stabilita la *Timeline* sperimentale:

1)Controllo basale

2)Sostituzione della terapia NUCs con PEG-IFN in maniera scalare per 16 settimane (weeks), con analisi cliniche ed ematochimiche condotte:

-1°mese -3 prelievi (in giorni differenti).

-2°mese -2 prelievi

-3/4°mese 1-prelievo

Le analisi citofluorimetriche sono state condotte con prelievi a partire dallo *switch* terapeutico:

-T O

-T 1 (15 giorni)

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: "Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell'epatocarcinoma." Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

-T 3, 4, 5 (ogni 4 *weeks*).

3) *Follow up* : analisi cliniche per sei mesi con prelievi a cadenza mensile.

-I prelievi dei campioni di sangue utilizzati per lo studio, sono stati effettuati in provette con sodio-eparina.

Per ognuna delle tre porzioni proteiche del virus sono stati allestiti dei *pool* peptidici, che successivamente sono stati utilizzati durante la fase di stimolazione antigene-specifica del sangue dei pazienti (*PZ*).

Sono stati predisposti campioni di controllo positivo (K+), per stimolo massimale della produzione di citochine al fine di valutare la capacità delle cellule del paziente di produrre risposta infiammatoria aspecifica ed inoltre campioni di controllo negativo (K-).

Il medesimo trattamento è stato eseguito su campioni di sangue *ex vivo* di donatori sani volontari (*HC health control*).

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: “Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell’epatocarcinoma.” Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

### 3.1 Preparazione e caratterizzazione dell'antigene

#### **FASE 1: Stimolazione antigene-specifica**

Per la fase di stimolazione sono stati allestiti per ogni *PZ/HC* 5 provette da citofluorimetria nominate rispettivamente:

-**K-** (controllo negativo)

-**K+**(controllo positivo)

-**Mix Core** (miscela peptidi core)

-**Mix Surface** (miscela peptidi surface)

-**Mix Polimerasi** (miscela peptidi polimerasi)

Ogni campione è stato allestito nel seguente modo:

-1ml di terreno di coltura RPMI 1640 Medium (Gibco™) +1ml di sangue

-Al controllo negativo non è stato addizionato alcun composto; il controllo positivo è stato addizionato con forbolo miristato acetato

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: “Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell’epatocarcinoma.” Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

(PMA Sigma 25ng /ml sospensione cellulare) per l'attivazione massimale della risposta cellulare poiché mantiene aperti i canali del calcio, inoltre è stato addizionato Ionomicina (Ca ionoforo) per l'attivazione del PMA (1µl/ml sospensione cellulare).

-Ai campioni per la stimolazione antigene-specifica sono state addizionate delle mix contenenti ognuna un certo numero di peptidi selezionati del core, del surface e della polimerasi (conc. 25µM, 2,5µl di peptide per ogni mix). La mix del core è costituita da dieci peptidi, la mix surface da 15 peptidi e la mix polimerasi da 12. Ad ogni campione con le differenti mix sono stati addizionati 10µl di anticorpi anti-CD28/49d (Immunofast BD). L'aggiunta del costimolatore Ab anti-CD28 e anti-CD49d si traduce in un aumento di almeno 3 volte della capacità di stimolazione delle citochine prodotte dai linfociti T, in particolare delle cellule CD4+, a seguito della stimolazione antigenica.

-I campioni sono stati posti a 37°C/ 5%CO<sub>2</sub> per 4h, ed in seguito si è proceduto addizionando 2µl di Brefeldina (BFA sigma[10mg/ml DMAS] 1µg/ml sospensione cellulare) al fine di bloccare l'escrezione delle proteine prodotte dal Golgi, per trattenere all'interno di ogni cellula stimolata i prodotti antigene-specifici.

-Successivamente i campioni sono stati rimessi in incubazione a 37°C/ 5%CO<sub>2</sub> per 6h. (Tab.2)

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: "Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell'epatocarcinoma." Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

## TAB.2 : materiali stimolazione antigene specifica

Item	Stimolo specifico	K+	K-
RPMI	1ml	1ml	1ml
PEPTIDI	CORE/SUR/POLY	-----	-----
PMA/Ionomicina	-----	25ng/ml ./1 µg/ml	-----
Ab Anti CD28/CD49d	5µl		
Brefeldina	2 µl= 1µl/ml		

-Al termine dell'incubazione con la BFA, i campioni sono stati centrifugati a 1200 RPM per 10' RT, il surnatante è stato eliminato e i campioni sono stati vorticizzati;

ad ogni campione sono stati addizionati 2ml di soluzione di lisi e fissaggio (BD FACS™ Lysing solution dil:1/10) contenente paraformaldeide 4% e lasciati per 10' RT.

-Successivamente i campioni sono stati portati ad un volume finale di 5ml con la soluzione di lisi e fissaggio conservati a 4°C sino alla preparazione per l'analisi citometrica.

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: "Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell'epatocarcinoma." Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

## **FASE DI STAINING:**

-I campioni sono stati centrifugati a 1200 RPM per 10' ed il surnatante è stato eliminato per inversione, si è poi proceduto con la preparazione del campione per la marcatura specifica.

-Ad ogni campione son stati addizionati 100µl di saponina 0,5% in PBS, per 10', al fine di creare dei pori nella parete cellulare per consentire l'ingresso degli anticorpi specifici per le molecole intracitoplasmatiche d'interesse.

-Avvenuta la permeabilizzazione, si è proceduto con diverse marcature per i differenti parametri da considerare:

-I marcatori utilizzati per l'indagine dei linfociti T sono: le citochine IFN- $\gamma$ , il TNF- $\alpha$ , IL 17, IL 10 e i marcatori di fenotipo CD3 e CD8. Gli anticorpi monoclonali (BD PHARMINGEN) utilizzati per l'analisi citofluorimetrica dei marcatori erano coniugati ai seguenti fluorocromi:

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: "Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell'epatocarcinoma." Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

1. CD3 FITC;
2. TNF- $\alpha$  PE;
3. CD8+ PerCP Cy-5.5;
4. IFN $\gamma$  PE-Cy 7;
5. IL17 APC;
6. IL10 PE;

Seguendo il medesimo protocollo è stato eseguito il controllo delle cellule Natural Killer (NK), per il quale sono stati scelti altri marcatori con i rispettivi anticorpi:

1. CD3 FITC;
2. TNF- $\alpha$  PE Cy-7;
3. IFN $\gamma$  APC;
4. CD16 PerCP Cy-5.5;
5. CD56 PE;

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: "Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell'epatocarcinoma." Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

-Per tutti i campioni sono state preparate le mix di anticorpi e si è poi proceduto a dispensare la giusta aliquota in ogni tubo. I campioni sono stati lasciati in incubazione per 20' RT al buio. Successivamente in ogni tubo è stato addizionato 1ml di saponina e si è proceduto con la centrifugazione a 1200 RPM per 10' RT, in seguito eliminato il supernatante e ad ognuno sono stati aggiunti 500 µl di FACSFlow(BD FACSFlow™ Sheat Fluid); infine si è proceduto con l'acquisizione dei campioni mediante il citofluorimetro FACS CANTO.

-Per quanto riguarda l'analisi dei linfociti T regolatori, è stato utilizzato un altro tipo di protocollo:

-500µl di sangue, sono stati aliquotati in una provetta per citofluorimetria e si è proceduto con la marcatura.

-Per ogni campione è stata preparata una mix di anticorpi per i seguenti marcatori: CD25 il recettore per l'IL2 nelle Treg, il CD3, il CD4, il CD45RA che identifica i linfociti Treg *naive*, e il CD39 per i Treg *Memory*.

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: "Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell'epatocarcinoma." Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

Mix:

1. CD3 FITC;
2. CD25 PE Cy 7;
3. CD45-RA PerCP Cy-5.5;
4. CD39 APC;
5. CD4 APC -H7;

-In ogni tubo è stata addizionata un'aliquota di mix di *staining* e i campioni sono stati incubati 30' RT al buio. Trascorso il tempo di incubazione sono stati addizionati in ogni tubo 2 ml di soluzione di lisi e fissaggio (BD Facs <sup>TM</sup>Lysing solution dil:1/10) contenente paraformaldeide 4% e lasciati per 10' RT.

In seguito in ogni tubo è stato addizionato 1 ml di fisiologica e i campioni sono stati centrifugati a 1200 RPM per 10'RT.

Il sopranatante è stato eliminato per inversione e ogni pellet è stato risospeso in 500 µl di FACSFlow.

Si è proceduto con l'acquisizione dei campioni mediante citofluorimetro FACSCanto (B&D Italia).

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: "Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell'epatocarcinoma." Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

### **3.2 Analisi citofluorimetrica**

-Per lo studio è stato utilizzato il citofluorimetro FACSCanto a due laser e sei colori. I dati sono stati raccolti per la successiva analisi mediante il software DIVA 3.2, dedicato alla citofluorimetria. Per tutti i campioni sono stati determinati 100.000 eventi (numero di acquisizione delle cellule che presentano le caratteristiche prescelte per ogni campione).

-Per ogni marcatura è stato definito un grafico morfologico o “dot plot” dove è stato disegnato un “gate” (P1) per identificare la popolazione dei linfociti, diversa da monociti e granulociti. Tutti i marcatori prescelti nei diversi tipi di indagine immunitaria sono stati definiti come percentuale di frequenza di espressione: per i linfociti T sia in CD8<sup>+</sup> che in CD8<sup>-</sup> (CD4<sup>+</sup>) sui CD3, e per le Treg CD4<sup>low</sup> CD25<sup>high</sup> sui CD3, NK CD3<sup>-</sup> CD16<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup>, in differenti Dot Plot.

### **3.3 Analisi Statistica**

I dati sono stati analizzati mediante il software GraphPad Prism versione 5.0 per Windows. L'analisi statistica è stata eseguita me-

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: “Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell'epatocarcinoma.” Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

dianche test One-way ANOVA non parametrico. Sono stati effettuati test di stringenza, come il test multiplo di comparazione di Bonferoni, che hanno confermato i valori di significatività. I dati che verranno riportati sono espressi in termini di media  $\pm$  l'errore standard medio (SEM).

## **4. Risultati**

Durante la terapia con Peg-IFN $\alpha$ -2a, l'analisi dei parametri biochimici e virologici presi in esame in tutti i pazienti ha mostrato una ricomparsa della viremia, tuttavia con valori non elevati, ed i livelli di ALT mostravano un lieve incremento alla 4<sup>o</sup> settimana (Week 4-W4) per poi rientrare entro i valori della norma ai controlli successivi (W16-24). Contestualmente è stato dosato l'HBsAg quantitativo per valutarne un eventuale declino ed in corso di terapia con Peg-interferon non sono state evidenziate variazioni significative.

Come detto in precedenza, tutti i pazienti hanno effettuato un follow up post terapia per valutare il raggiungimento di un controllo virologico ed una eventuale clearance dell'HBsAg associata o meno ad una sierconversione ad anti-HBsAg.

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: "Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell'epatocarcinoma." Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

Dai dati raccolti dei pazienti che hanno raggiunto un follow up completo almeno a sei mesi, è emerso in tutti i pazienti un incremento della carica virale graduale dall'inizio del follow up fino al primo/terzo mese. Successivamente l'andamento viremico ha configurato due gruppi: uno in cui la carica virale è scesa sino ad azzerarsi ed un altro in cui dopo un primo decremento la carica virale incrementava.

Tuttavia, in tutti i pazienti, è stata osservata l'assenza di danno epatico, monitorato attraverso le ALT, confermando il raggiungimento di uno stato di portatore cronico inattivo. In particolare, in due pazienti appartenenti al primo gruppo è da sottolineare la clearance dell'HBsAg e l'avvenuta sieroconversione ad anti-HBsAg. In base all'outcome virologico è stato inoltre possibile effettuare una correlazione tra due gruppi e la durata totale della terapia con i NUCs. In particolare dal confronto dei due gruppi, è stato possibile osservare che i soggetti appartenenti al primo gruppo erano quelli che avevano effettuato una terapia con NUCs per un periodo più lungo (Mean  $\pm$ SEM 115 $\pm$ 11 N5). Viceversa, i soggetti appartenenti al secondo gruppo, avevano effettuato la terapia per un periodo inferiore (Mean $\pm$ SEM 80 $\pm$ 11 N2), sebbene la differenza tra i due gruppi non sia al momento statisticamente significativa per l'esiguità del numero dei campioni presi in esame (Fig.6).

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: "Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell'epatocarcinoma." Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

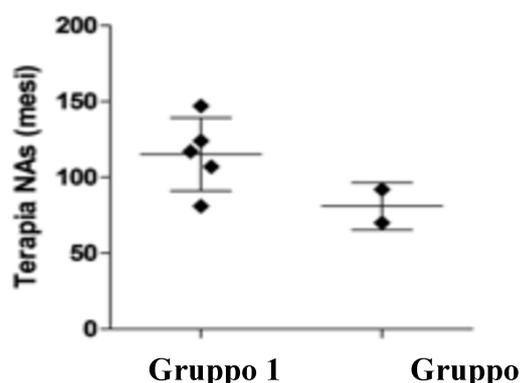


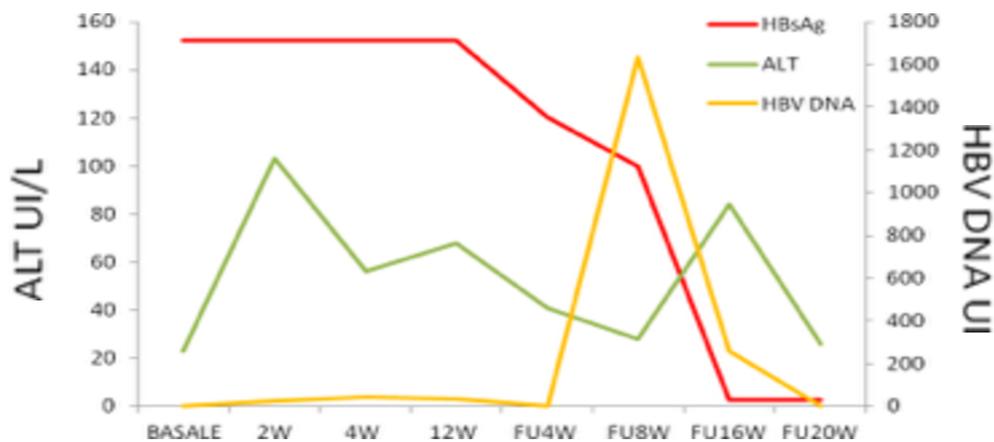
Fig.6 Grafico di confronto tra outcome virologico e durata totale di terapia con NAs nei due gruppi di pazienti.

Per quanto riguarda i tre pazienti seguiti prospetticamente anche dal punto di vista immunologico, soltanto uno (Pz 7) ha completato il follow up a sei mesi e si colloca nel gruppo dei pazienti che hanno raggiunto al follow up una carica virale negativa.

In questo paziente, in corso di terapia con Peg-IFN $\alpha$ 2a, è stato osservato un lieve movimento viremico al terzo mese con un concomitante lieve incremento delle ALT in assenza di qualsiasi fattore esotossico che potesse giustificarlo. Alla sospensione di Peg-IFN $\alpha$ 2a è inoltre emerso un declino del titolo di HBsAg che, peraltro, ha mostrato una drastica riduzione tra il terzo e il quarto mese, ovvero dopo un importante picco viremico ed un contestuale incremento

delle ALT.(Fig. 7)

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: “Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell’epatocarcinoma.” Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.



P 7	BASALE	2W	4W	12W	FU4W	FU8W	FU16W	FU20W
HBsAg	152	152	152	152	120	100	2,7	2,5
HBVDNA	0	25	43	36,00	1	1633,00	258,00	1
ALT	23	103	56	68	41	28	84	26

Figura 7: Andamento dei parametri virologici e biochimici del Pz 7

Valutando la risposta immunitaria relativa a questo paziente, dall’analisi dei dati citofluorimetrici sono emersi dei risultati interessanti soprattutto alla luce dei risultati clinici appena riportati, che sono stati monitorati secondo una timeline ben precisa maggiormente ravvicinata rispetto al gruppo di pazienti osservati retrospettivamente.

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: “Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell’epatocarcinoma.” Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

Durante la somministrazione di Peg-IFN $\alpha$ 2a è stato osservato un incremento dei CD4+ totali alla W4 con una leggera inflessione non significativa verso la W12 di terapia, e il loro numero si manteneva costante fino alle prime settimane di follow up. Viceversa si ha una deflessione dei CD8+ totali alla W4 ed un successivo incremento alla W12, per poi avere una nuova riduzione pari al 20% del picco massimo osservato ed i valori si mantengono tali per tutto il follow up. (Fig.8)

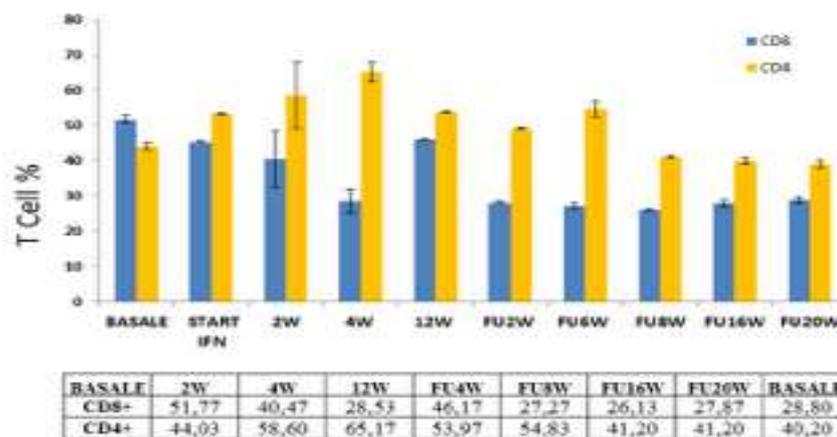


Figura 8: Nell’istogramma e nella tabella sono riportate le percentuali delle cellule T CD8+e CD4+ totali nelle varie fasi dello studio.

Inoltre, da quanto emerge dalla figura 9, si osserva che tra la quarta settimana di terapia e le prime due settimane di follow up si ha la produzione di IL17 espressa in seguito alla stimolazione specifica con peptidi del Core, con un picco notevole del 3,5% sulla popolazione dei CD4+. Questo tempo sperimentale coincide nel grafico

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: “Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell’epatocarcinoma.” Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

precedente con l'incremento dei CD4+ totali, rendendo ipotizzabile che i picchi massimi di CD4+ totali corrispondano nello studio citochinico ad una risposta specifica allo stimolo. Nella stessa finestra temporale si ha una lieve espressione di IL17 anche con i peptidi del Surface e con quelli della Polimerasi. In particolare, per quanto riguarda lo stimolo con la polimerasi, si osserva una analoga produzione di IL17 anche a carico dei CD8+, ma con un picco alla quarta settimana.(Fig.9)

Non si riscontra un'uguale specificità di risposta per quanto riguarda le altre citochine indagate (TNF $\alpha$  ed IFN $\gamma$ ).

Per quanto riguarda altri due pazienti presi in esame per lo studio immunologico, essi risultano attualmente in follow up e bisognerà pertanto aspettare i successivi dati per poter trarre delle conclusioni significative riguardo l'outcome clinico e gli eventi immunologici.

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: "Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell'epatocarcinoma." Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

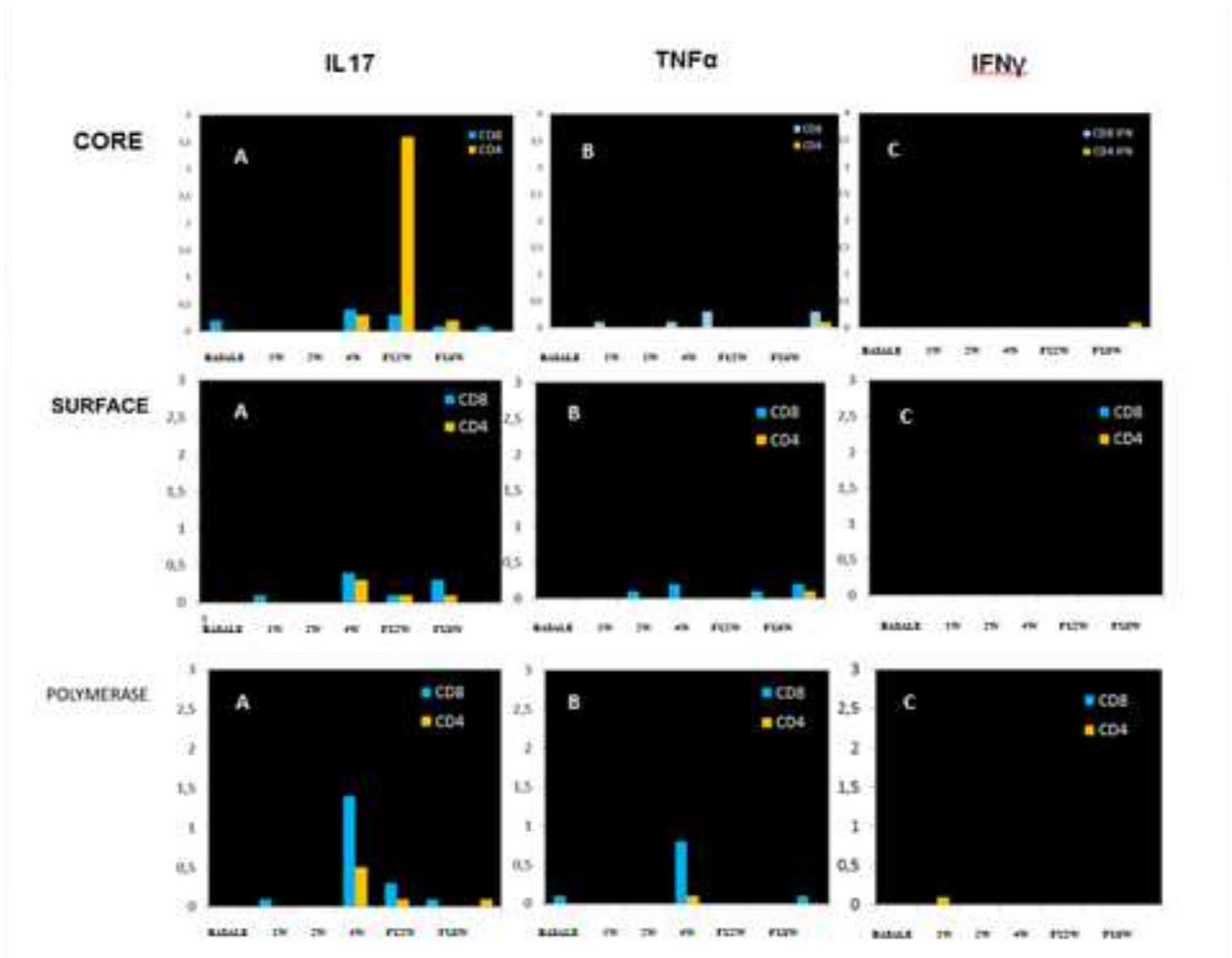


Figura 9: Nel pannello sono riportati gli istogrammi che descrivono l'andamento delle citochine in risposta allo stimolo specifico nelle popolazioni di CD4+ e di CD8+. Dall'alto verso il basso sono indicati gli stimolo somministrati (Core, Surface e Poli), da sinistra verso destra sono indicate le citochine indagate.

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: "Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell'epatocarcinoma." Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

## 5. Conclusioni

La ricerca di nuove strategie terapeutiche per il trattamento dell'infezione cronica da HBV rappresenta ad oggi una delle sfide più impegnative in questo settore. Il gold standard rappresentato dall'eradicazione virale è ancora oggi estremamente difficile da raggiungere e molti studi sono indirizzati verso nuove strategie terapeutiche che prevedano differenti bersagli rispetto a quelli utilizzati attualmente. Tuttavia, tale estrema difficoltà nel raggiungere l'eradicazione virale, ci ha spinto a valutare come end-point clinico il raggiungimento dello stato di portatore cronico inattivo, condizione che permette un controllo dell'evoluzione dell'infezione e delle maggiori complicanze. I pazienti più difficili in cui ottenere questo controllo con la terapia attualmente disponibile sono quelli affetti da epatite cronica attiva anti-HBeAg positiva ed è verso questi che è necessario concentrare maggiormente gli studi.

A tale proposito dal nostro studio emergono dei dati interessanti riguardo la strategia che prevede l'utilizzo di una terapia sequenziale da NUCs a Peg-IFN nei pazienti con epatite cronica anti-HBeAg negativa.

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: "Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell'epatocarcinoma." Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

In tutti i nostri pazienti è stato osservato un picco viremico dopo sospensione del Peg-IFN $\alpha$ 2a in un arco temporale compreso tra le quattro e le dodici settimane di follow up, per poi ridursi nuovamente nelle settimane successive. Per quanto riguarda l'HBsAg, nella maggior parte dei pazienti presi in esame si osserva un decremento nelle settimane prossime alla fine della finestra terapeutica utilizzata. Il profilo epatico mantenutosi sempre entro valori della norma indica come sia stato raggiunto un controllo clinico sostenuto dell'infezione. In due pazienti la viremia ha mostrato tuttavia segni di risalita, pur non modificandosi i parametri epatici, e questo evento potrebbe essere dovuto ad una minore durata totale della terapia con analoghi, come mostrato nei risultati; tale ipotesi concorda inoltre con la sieroconversione ad anti-HBsAg osservata in due pazienti, che facevano parte del gruppo in cui gli analoghi erano stati effettuati per un tempo più lungo. Tali osservazioni suggeriscono pertanto che, sebbene sia stato raggiunto uno stato di portatore cronico inattivo in tutti i pazienti che non hanno sierconvertito, in quelli che mostravano un trend di HBV-DNA in risalita sarebbe utile un monitoraggio più frequente rispetto agli altri degli indici di funzionalità epatica, per escludere una eventuale ripresa dell'attività della patologia.

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: "Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell'epatocarcinoma." Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

Dalla risposta clinica osservata nei pazienti che avevano praticato terapia per problemi di effetti collaterali e di aderenza, è scaturita la curiosità di comprendere quali fossero i meccanismi immunologici alla base di tali risposte.

Dai lavori presenti in letteratura e che sono ampiamente stati descritti in precedenza, appare chiaro il razionale di una terapia sequenziale NUCs/Peg-IFN alfa-2a che preveda come background una terapia con NUCs possibilmente di ultima generazione e quindi ad alta potenza di soppressione virologica, che sia protratta per un periodo di tempo prolungato. La terapia cronica con i NUCs permetterebbe infatti il ripristino della parte adattativa della risposta immunitaria, in termini di aumentata capacità proliferativa della popolazione dei linfociti T CD8+ specifici. Se venisse sospesa si avrebbe il rischio di una epatite acuta, verosimilmente mediata dalla risposta immunitaria adattativa ormai ripresa, ma che non riuscirebbe comunque ad essere efficace per l'eliminazione del virus in quanto la risposta innata risulterebbe ancora deficitaria. A questo punto, l'introduzione di una terapia con Peg-IFN alfa-2a, grazie alla sua attività immunomodulante, permetterebbe un controllo sui CD8+ specifici, impedendo così un danno epatico massivo, agendo contemporaneamente anche sul ripristino dell'immunità innata attraverso le NK che con i meccanismi apoptotici e diluizione descritti in prece-

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: "Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell'epatocarcinoma." Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

denza agirebbero anche sul cccDNA e sulla carica antigenica (che sono state implicate nel mantenimento di uno stato di deficit della risposta adattativa), permettendo un controllo dell'infezione da parte del sistema immunitario. Ciò che resta da chiarire è quali siano i meccanismi che portino poi ad una sierconversione in alcuni pazienti. A tale proposito, è stato ipotizzato un ruolo dei CD4+ ed in particolare dei Th17 nello switch verso una risposta di tipo umorale e nella costituzione della memoria a lungo termine nei confronti dell'infezione.

La combinazione dei dati clinici e dei dati immunologici su uno dei nostri pazienti ha confermato le ipotesi individuate in letteratura di cui si è parlato in precedenza. In questo paziente è stato possibile effettuare una analisi dei parametri più accurata perchè è stato monitorato con tempi più stringenti rispetto ai pazienti osservati retrospettivamente, come si evince dal grafico descritto nei risultati.

In questo paziente durante la terapia con Peg-IFN è stata osservata una lieve positivizzazione dell'HBV DNA, con un titolo di HBsAg che rimaneva elevato e un livello di ALT sempre entro i valori della norma. In corso di follow up si è verificato un graduale aumento dell'HBV DNA con un picco viremico alla W12, associato ad un piccolo delle ALT e ad un crollo dell'HBsAg quantitativo al controllo successivo alla W16. Questa stessa osservazione è stata riportata nei la-

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: "Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell'epatocarcinoma." Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

vori citati in precedenza che hanno usato però approcci terapeutici con sequenze e timeline diversi dalla nostra che prevedeva uno schema sequenziale ed a scalare invece che uno add-on. La motivazione del decremento dell'HBsAg sembra adducibile all'effetto immunomodulatorio transitorio associato alla terapia con Peg-IFN $\alpha$  2a. L'effetto del Peg-IFN  $\alpha$ -2a è imputabile allo stimolo nei confronti del sistema immunitario ed in particolare alla stimolazione di uno specifico subset di NK conosciuto come CD8+CD56bright. Il meccanismo appena riportato mitiga l'effetto citolitico delle cellule T CD8+ citotossiche, riducendo perciò il rischio di una epatite acuta, come già spiegato in precedenza. L'azione dell'immunità innata stimolerebbe pertanto meccanismi apoptotici con conseguente nuova proliferazione delle cellule epatiche sane e quindi una riduzione di cccDNA mediante meccanismo di diluizione, con conseguente riduzione dell'HBsAg. L'altro interessante dato che emerge è uno spike di IL17 tra la quarta settimana di terapia con Peg-IFN  $\alpha$  2-a e le prime settimane di follow up. Questo dato corrisponde all'andamento dei CD4+, ed è in linea con quanto detto a proposito di un eventuale ruolo della risposta T helper nei confronti di una eventuale sierconversione ad anti-HBsAg. Sulla base dell'andamento immunologico di questo paziente, i dati emersi potrebbero essere indicativi di una attiva risposta T helper in associazione ad un ripri-

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: "Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell'epatocarcinoma." Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

stino dell'immunità specifica ed innata, e potrebbero essere quindi predittivi di una clearance dell' HBsAg.

Il nostro studio comprende anche l'analisi delle cellule T regolatorie, conosciute per avere attività soppressiva nei confronti dei CD4+ ed il loro incremento è inversamente proporzionale alle Th17. Si può ipotizzare che l'osservazione da noi effettuata sulle Th17 mediante l'incremento dell' IL17 possa essere l'espressione di un feedback negativo nei confronti dei T regolatori, e quindi potrebbe essere favorita l'azione de CD4+ nell'induzione della risposta umorale a carico dei linfociti B.

Per quanto riguarda gli altri due pazienti osservati prospetticamente, per poter trarre delle conclusioni definitive dall'analisi dei risultati clinici ed immunologici finora disponibili, è necessario che venga completato il follow up.

I risultati clinici ed immunologici preliminari del nostro studio offrono uno spunto per ulteriori ricerche volte a verificare quali siano le caratteristiche dei pazienti con infezione cronica da HBV anti-HBeAg positiva, che maggiormente correlano con un controllo clinico e virologico sostenuto in corso di terapia sequenziale con NUCs e Peg-IFN $\alpha$ 2a. Inoltre dai nostri risultati appare importante l'individuazione di un timing terapeutico volto al raggiungimento di una risposta terapeutica efficace.

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: "Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell'epatocarcinoma." Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

Contestualmente saranno inoltre necessari ulteriori analisi immunologiche volte ad individuare eventuali marcatori che possano essere utilizzati come valori predittivi positivi per poter applicare delle stopping rules terapeutiche efficaci.

## **Bibliografia:**

- 1) Jeroen N. Stoop et al** “Regulatory T Cells Contribute to the Impaired Immune Response in Patients With Chronic Hepatitis B Virus Infection” HEPATOLOGY, April 2005 .
- 2) Carlo Ferrari** “HBV and the immune response” Liver International ISSN 1478-3223,DOI:10.1111/liv.12749.
- 3) Zuckerman A.J.** “More than third of world’s population has been infected with hepatitis B virus” BMJ 1999; 318: 1213.
- 4) Alter M.J.** “Epidemiology and Prevention of Hepatitis B.” Seminars in Liver Disease 2003; Vol. 23, Num. 1: 39-46.
- 5) Kao J-H., Chen D.S.** “Global control of hepatitis B virus infection.” Lanc. Inf. Dis. 2002; 2: 395-403.

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: “Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell’epatocarcinoma.” Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

- 6) Dati forniti dal centro **SEIEVA**, epicentro iss, 2009.
- 7) **Dane D.S. et al** "Virus-like particle in serum of patients with Australia antigen associated hepatitis B." *Lancet* 1970; 2: 695.
- 8) **Kann M., Gerlich W.H.** "Hepatitis B. In: "Microbiology and microbial infections. Virology". B.W.J Mahy, L. Collier. Eds. Arnold, London 1998, 745-775.
- 9) **Lee W.M.** "Hepatitis B virus infection." *N. Engl. J. Med.* 1997; Vol. 337, N. 24 :1733- 1745.
- 10) **Summers J., Mason W.S.** "Replication of the genome of a hepatitis-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate." *Cell* 1990; 29: 403-15.
- 11) **Tiollais P. et al** "Molecular genetics of hepatitis B virus. In: F.V. Chiari ed. *Advance in Hepatitis research.* New York." *Mason Publ* 1984; 9.
- 12) **Heermann K.H. et al.** "Immunogenicity of the S and pre-S domains in hepatitis B virions and HBsAg filaments." *Intervirology* 1987; 28: 14.
- 13) **Wallace L.A., et al** "Surface Gene Variation of HBV: Scientific and Medical Relevance." *Vir. Hepat. Rev.* 1997; Vol.3, Num.1: 5-16.

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: "Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell'epatocarcinoma." Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

- 14) Bruss V., Gerlich W.H.** “Formation of transmembranous Hepatitis B e antigen by cotranslation in vitro processing of the viral precore protein.” *Virology* 1988; 163: 268-275.
- 15) Bruss V., et al** “Role of the pre-core protein and HBe antigen in maturation and secretion of human hepatitis B virus.” *Liss: Hepatitis Viruses*, Mason W. and Will H. New York 1987.
- 16) Uy A., et al.** “Precore sequence of hepatitis B virus inducing e antigen and membrane association of the Viral Core protein.” *Virology* 1986; 155: 89-96.
- 17) Colgrove R., et al** “Transcriptional activation of homologous and heterologous genes by the hepatitis B virus X gene product in cells permissive for viral replication.” *J. Virol.* 1988; 63: 4019-4026.
- 18) Yen T.S.B.** “Hepadnaviral X protein: review of recent progress.” *J. Biomed. Sci.* 1996; 3: 20-30.
- 19) C. Segeer, W. Mason** “HBV Replication, pathobiology and therapy: Unanswered question”. *Journal of Hepatology* 2016 vol 64/ S1-S3.

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: “Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell’epatocarcinoma.” Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

- 20) Okamoto H, et al** “Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes.” *J Gen Virol* 1988; 69(Pt 10): 2575-2583.
- 21) Tran T.T, et al** “New complex recombinant genotype of hepatitis B virus identified in Vietnam. *J Virol* 2008; 82: 5657-5663.
- 22) Mick N. Mulders, Veronique Venard et al** “Low Genetic Diversity despite Hyperendemicity of Hepatitis B Virus Genotype Ethroughout West Africa” *The Journal of Infectious Diseases* 2004;190:400–8 .
- 23) C.Segeer, W.Mason** “Hepatitis B Virus Biology *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS*, Mar. 2000, Vol 64 p. 51–68 .
- 24) Wei-Lun Tsai, Wei-Chi Sun, Jin-Shiung Cheng** “Chronic Hepatitis B with Spontaneous Severe Acute Exacerbation” *Int. J. Mol. Sci.* 2015, 16, 28126–28145; doi:10.3390/ijms161226087
- 25) Hong-Yan Liu et al** “Innate immune recognition of hepatitis B virus” *World J Hepatol.* 2015 Sep 28; 7(21): 2319–2322.
- 26) Lee W.M.** “Medical progress: hepatitis B virus infection.” *N Engl J Med* 1997; 337 (24): 1733-1745.

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: “Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell’epatocarcinoma.” Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.

- 27) Ferrari C.** “HBV and the immune response” *Liver Int.* 2015 Jan;35 Suppl 1:121-8.
- 28) European Association for the Study Of The Liver.** EASL Clinical Practice Guidelines: management of chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol.* 2012.
- 29) Fattovich G, Bortolotti F, Donato F.** “Natural history of chronic hepatitis B: special emphasis on disease progression and prognostic factors.” *J Hepatol.* 2008;48(2):335-352.
- 30) Terrault NA<sup>1</sup>, Bzowej NH<sup>2</sup>, Chang KM<sup>3</sup>, Hwang JP<sup>4</sup>, Jonas MM<sup>5</sup>, Murad MH<sup>6</sup>.** “American Association for the Study of Liver Diseases AASLD guidelines for treatment of chronic hepatitis B.” *Hepatology.* 2016 Jan;63(1):261-83.
- 31) Ning et al** “An integration of deep viral suppression with sequential immune modulation (cocktail therapy) to restore antiviral capacity: The future of chronic hepatitis B?” *Journal of Hepatology* 2014 61; 777-784.
- 32) Jorg Petersen and Maura Dandri** “Optimal therapy for chronic hepatitis B: hepatitis B virus combination therapy?” *Version of Record online: 22 DEC 2014, DOI: 10.1111/liv.12720.*

Dott.ssa Alessandra Mela, Titolo: “Valutazioni cliniche e immunologiche in pazienti affetti da HBV cronico durante la terapia con analoghi nucleosidici/nucleotidici e Peg-IFN. Studio pilota per la prevenzione dell’epatocarcinoma.” Tesi di Dottorato in scienze biomediche, curriculum Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.