

Le basi biologiche dei vaccini per il papilloma virus umano

Biological basis for HPV vaccines

Francesca Maria Carozzi

UO Citologia analitica e molecolare, CSPO, Istituto scientifico prevenzione oncologica, Firenze

Corrispondenza: Francesca Maria Carozzi, CSPO, UO Citologia analitica e molecolare; via Cosimo il Vecchio 2, 50139 Firenze;

e-mail: f.carozzi@cspo.it

Riassunto

L'individuazione dell'HPV come causa del carcinoma cervicale e altre malattie implica che, con lo sviluppo di un vaccino efficace, possa essere possibile prevenire l'infezione, offrendo un'opportunità senza precedenti per la prevenzione del carcinoma cervicale in tutto il mondo.

Tradizionalmente, vaccini profilattici che generano anticorpi specifici neutralizzanti i virus hanno rappresentato un modo efficace di controllare le malattie virali. HPV non dovrebbe in teoria essere un'eccezione, ma il tropismo tissutale e la complessa biologia dei papillomavirus li differenzia dalla maggior parte degli altri microrganismi contro cui programmi di vaccinazione hanno avuto successo. Due vaccini (quadrivalente e bivalente), diretti entrambi contro i tipi virali responsabili di oltre il 70% dei carcinomi cervicali, sono stati recentemente sviluppati e hanno dimostrato ottima efficacia negli studi clinici. Questi prodotti, costituiscono una fondamentale possibilità preventiva da integrare con i tradizionali programmi di screening citologico.

Introduzione

L'individuazione dell'infezione da papillomavirus umano (HPV), come causa principale del carcinoma cervicale, ha aperto nuovi fronti per la prevenzione mediante vaccinazione e il miglioramento delle metodologie di screening.

Il grado di certezza del ruolo eziologico del virus HPV nella genesi del carcinoma della cervice uterina è molto elevato e l'infezione persistente con i tipi oncogeni di HPV è considerata un fattore causale necessario, ma non sufficiente, nella carcinogenesi del cancro cervicale.¹

Degli oltre 10 milioni di cancro che si sviluppano annualmente nel mondo, più del 15% sono attribuibili ad agenti infettivi. L'infezione² da HPV è responsabile (tabella 1) di circa il 30% di questi cancro (3,71% di tutti i cancro), mentre l'epatite B e C e l'*Helicobacter pylori* contribuiscono insieme a un altro 60%.

La forza dell'associazione HPV-tumore cervicale è tra le più elevate, tanto che i rischi relativi registrati in vari studi sono nell'ordine delle centinaia, arrivando talora al valore di 500, a fronte di rischi relativi per l'associazione tra virus epatotropici (HCV e HBV) ed epatocarcinoma variabili tra 20 e 100, e tra fumo di sigaretta e tumore del polmone intorno a 10.

I papillomavirus (PV) sono piccoli virus a DNA che infettano uomini e animali e sono specie-specifici. I papillomavirus umani fanno parte di questa famiglia con più di 100 tipi conosciuti. Hanno una struttura icosaedrica e un genoma circolare che codifica per otto diverse proteine. Le due proteine strutturali, L1 e L2 formano l'involucro esterno, o capsida virale (figura 1), mentre le proteine non strutturali sono importanti per il ciclo vitale del virus. In particolare le proteine E6 e E7 rappresentano le proteine ad attività trasformante e hanno un ruolo importante nell'iniziazione del processo oncogenico, interferendo con la normale funzione di alcuni geni onco-soppressori.

Gli HPV possono essere fondamentalmente suddivisi in due gruppi: quelli che infettano la cute, o superfici cutanee, e quelli che infettano le mucose squamose, in modo particolare quelle del tratto genitale. I tipi di HPV definiti a basso rischio (lrHPV) provocano lesioni benigne, mentre i tipi ad alto rischio od oncogenici (hrHPV) sono associati ai carcinomi e alle lesioni preneoplastiche.

Recentemente, lo IARC ha confermato l'evidenza oncogena per 13 tipi di HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 56, 58, 59 e 66),^{3,4} mentre studi casi-controllo indicano un possibile coinvolgimento di altri cinque tipi (HPV 26, 53, 68, 73 e 82).^{5,6} Circa il 70% dei carcinomi cervicali sono causati^{5,7} dagli HPV 16 e 18, i tipi 45/31 contribuiscono ciascuno⁸ per il 4% e gli HPV 33/52/58 per un altro 2%. Anche la maggior parte (50-60%) delle lesioni precancerose di alto grado (CIN2/3) è attribuibile⁹ a HPV 16 e 18. Al contrario, le Cin1 sono associate¹⁰ a un più largo spettro di genotipi HPV, di cui circa il 25% da HPV 16 e 18.

Ad ogni modo il carcinoma della cervice non è la sola malattia maligna associata con l'infezione da hr-HPV. HPV 16 e, in minor misura, HPV 18 sono associati a cancro più rari, principalmente il cancro della vulva e della vagina nelle donne, il cancro del pene nell'uomo, e il cancro dell'ano, orofaringe e laringe in entrambi i sessi².

Prevalenza e storia naturale delle infezioni da HPV

L'infezione da HPV è la più comune infezione virale trasmessa sessualmente. C'è comunque una significativa variabilità regionale nella prevalenza¹¹ di HPV, che può essere dovuta a differenze in termini di comportamento sessuale e cultura-

le. Nelle donne giovani (15-25 anni) si hanno stime di prevalenza che vanno dal 27% al 46%.¹²⁻¹⁵ La prevalenza scende al 15% nelle donne tra i 26-30 anni, al 10% nelle donne 31-35 e decresce ulteriormente nella quarta, quinta e sesta decade di vita. Alcuni modelli suggeriscono che fino all'80% delle donne sessualmente attive contrarranno l'infezione entro i 50 anni.¹⁶

La trasmissione da contatti genitali non penetrativa è rara,^{17,18} così come la trasmissione verticale da madre a neonato. Una trasmissione oro-genitali o mano-genitali di alcuni HPV è un fenomeno plausibile che è stato riportato in maniera aneddotica, ma non è mai stato provato.¹⁷

Gli studi, sulla storia naturale del carcinoma cervicale, hanno mostrato che l'infezione con i tipi di HPV oncogeni può portare allo sviluppo di lesioni intraepiteliali di basso e alto grado. Le lesioni di alto grado se non trattate possono progredire a carcinoma.

La maggior parte delle infezioni da HPV, incluse quelle da tipi oncogenici, sono generalmente transitorie e si risolvono spontaneamente entro un anno o poco più. Alcune infezioni persistono e solo le donne con infezione persistente da hr-HPV sono considerate a maggior rischio di sviluppare lesioni precancerose e poi il cancro.^{16,19,20}

Comunque, non tutte le infezioni persistenti progrediscono a lesioni precancerose di alto grado e non tutte le lesioni di alto grado progrediscono a cancro. Lo sviluppo di cancro invasivo (infezione HPV, persistenza e sviluppo di lesioni precancerose e carcinoma) è un processo lento che avviene in circa 10 anni e questo sviluppo relativamente lento del cancro, dal momento dell'iniziale infezione, ha contribuito al successo dei programmi di screening citologico/colposcopico.

Aspetti immunologici dell'infezione da HPV

Sia l'immunità umorale che l'immunità cellulo-mediata sono coinvolte nella risposta all'infezione da HPV.²¹ La risposta umorale mira a prevenire l'ancoraggio del virus alle cellule epiteliali ed è principalmente diretta contro gli epitopi conformazionali del capsido maggiore L1 presenti sulla superficie esterna della particella virale intatta ed è specifica per ogni tipo di HPV (tipo-specifica). L'immunità umorale è generata nella maggior parte, ma non in tutti, degli individui infettati e in ogni caso il titolo degli anticorpi neutralizzanti è molto basso.²² Non sono conosciuti né il grado né la durata della protezione fornita dagli anticorpi in un'infezione naturale e, almeno teoricamente, potrebbe essere possibile una re-infezione con lo stesso genotipo.²³ L'immunità cellulo-mediata è associata con la regressione della lesione e la protezione contro un'ulteriore infezione con lo stesso genotipo. Particolarmente rilevante è l'immunità cellulo-mediata diretta contro i prodotti degli oncogeni virali E6 e E7, la cui espressione è responsabile delle lesioni croniche a evoluzione verso il carcinoma cervicale.

Un aspetto peculiare dell'immunologia dell'infezione da HPV è il fatto che i tipi virali ad alto rischio hanno la capacità di evadere il sistema immunitario: i geni virali E6 e E7 stimolano le cellule epiteliali capaci di sopprimere la risposta immune locale e, inoltre, il virus ha imparato a esprimere i suoi geni solo nelle cellule terminali differenziate che hanno finito di dividersi. Di conseguenza, le proteine virali sono espresse in grandi quantità solo nelle cellule superficiali dell'epitelio, mentre le cellule negli strati profondi esprimono solo bassi livelli di geni virali. Questo meccanismo di replicazione permette al virus di nascondere se stesso, usando i normali meccanismi di differenziazione dell'epitelio infettato e rende difficile l'induzione di un'efficiente e durevole risposta immunitaria all'iniziale infezione virale. Per tale motivo, un'infezione pregressa con un tipo di HPV ad alto rischio potrebbe non garantire l'immunità nei confronti di un'infezione successiva.

Razionale ed evidenze per la vaccinazione HPV

L'individuazione dell'HPV come causa del carcinoma cervicale e altre malattie implica che con lo sviluppo di un vaccino efficace possa essere possibile prevenire l'infezione, offrendo un'opportunità senza precedenti per la prevenzione del carcinoma cervicale in tutto il mondo.

Tradizionalmente vaccini profilattici, che generano anticorpi specifici neutralizzanti i virus, hanno rappresentato un modo efficace di controllo delle malattie virali. L'HPV non dovrebbe in teoria essere un'eccezione, ma il tropismo tissutale e la complessa biologia lo differenzia dalla maggior parte degli altri microrganismi verso i quali la vaccinazione ha avuto successo.

Gli anticorpi neutralizzanti sono la pietra miliare della maggior parte dei vaccini profilattici e i vaccini approvati fino ad ora erano diretti contro agenti infettivi in grado di determinare una malattia sistemica tale da renderli accessibili agli anticorpi neutralizzanti presenti nel sangue.

Il ciclo vitale di HPV è esclusivamente intraepiteliale e solo l'epitelio squamoso differenziato è capace di consentire il ciclo infettivo completo e la produzione di particelle infettanti. In un'infezione naturale non c'è una viremia, le particelle del virus sono rilasciate dalla superficie delle mucose lontano dai vasi linfatici e vascolari e i livelli serici di anticorpi neutralizzanti sono bassi. Inoltre, le particelle virali complete sono assemblate nelle cellule degli strati superficiali, senza infiammazione e citolisi, lontano dalla maggior parte delle cellule che presentano gli antigeni e dai macrofagi. Come risultato, le particelle virali e le proteine del loro capsido sono poco esibite nei linfonodi drenanti e nella milza, i classici siti per l'iniziazione delle risposte anticorpali. Quindi uno dei quesiti iniziali principali era se vaccini che generano anticorpi neutralizzanti potevano fornire una protezione dall'infezione. I risultati ottenuti in infezioni sostenute da papillomavirus animali mostravano molto chiara-

Sito	Attribuibili a HPV (%)	Attribuibili HPV16 e/o HPV 18 (%)	Maschi			Femmine		
			totale cancri	attribuibili a HPV	attribuibili HPV16 e/o HPV 18	totale cancri	attribuibili a HPV	attribuibili HPV16 e/o HPV 18
cervice	100	70	0	0	0	492.800	492.800	344.900
pene	40	63	26.300	10.500	6.600	0	0	0
vulva,vagina	40	80	0	0	0	40.000	16.000	12.800
ano	90	92	14.500	13.000	12.000	15.900	14.300	13.100
bocca	3	95	175.900	5.200	5.000	98.400	2.900	2.800
oro-faringe	12	89	42.500	5.100	4.500	9.600	1.100	1.000
tutti			5.801.800	33.900	28.100	5.060.700	527.200	374.700

Tabella 1. Cancro attribuibile a infezione da HPV nel 2002, (da Parkin2 modificata).

Table 1. HPV Infection-attributable cancer in 2002.

mente che gli anticorpi neutralizzanti erano protettivi.²⁴ Se i conigli erano infettati sistemicamente con *Cottontail Rabbit PapillomaVirus* (CRPV), mediante un'iniezione diretta del virus nel muscolo, il virus non cresceva sulla pelle degli animali infettati e venivano prodotti anticorpi neutralizzanti che rendevano gli animali resistenti all'infezione virale. Questi e altri esperimenti hanno suggerito che gli anticorpi generati contro la proteina virale del capsido potevano essere una strategia vaccinale profilattica efficace. La produzione di anticorpi contro la proteina L1 del capsido richiede però la struttura terziaria o nativa della proteina. Poiché i papillomavirus non possono crescere in cultura la generazione di strutture native è stata per lungo tempo problematica. La soluzione si è avuta osservando che se il gene L1 viene espresso attraverso un Baculovirus ricombinante,^{25,26} la proteina L1 viene prodotta in grandi quantità e si auto-assembla in una particella simile al virus (VLP) o capsido vuoto che è geometricamente e antigenicamente quasi identico al virione nativo. Le VLP non contengono DNA e nemmeno virus vivo o attenuato. Nei modelli animali, queste VLP erano in grado di generare anticorpi neutralizzanti e gli animali immunizzati risultavano protetti contro inoculi di alti livelli di virus.²⁷⁻²⁹

I meccanismi di protezione dei vaccini VLP sono al momento poco conosciuti. L'ipotesi più accreditata è che alti livelli anticorpali generati dai vaccini VLP forniscano protezione.^{30,31} L'evidenza più convincente viene da esperimenti sui conigli, in cui il passivo trasferimento di IgG purificate provenienti da donatori iper-immuni, immunizzati con CRPV L1 VLP, protegge completamente i conigli *naïve* riceventi dallo sviluppo di papillomi dopo inoculo del virus.^{32,33} Solo gli animali immunizzati con VLP intatte sono in grado di produrre anticorpi neutralizzanti e solo IgG purificate provenienti da questi animali proteggono i riceventi *naïve*. Queste evidenze sono comunque indirette. Ciononostante, tutti i dati mostrano che L1 VLP inducono alti livelli di IgG seriche neutralizzanti e i risultati degli studi vaccinali sia in animali sia nei trial clinici, supportano l'idea che questa attività sia cruciale per la protezione. Le IgG sono la princi-

pale classe d'immunoglobuline presenti nel muco cervicale e allo stato attuale un'ipotesi è che la protezione sia fornita dalle IgG seriche che possono trasudare attraverso l'epitelio cervicale, particolarmente a livello della giunzione squamo-colonnare, in concentrazioni sufficientemente elevata da legare le particelle virali e prevenire l'infezione. I livelli di IgG sistemiche sono sostanzialmente più alte di quelle nelle secrezioni cervicali³⁴ ed è possibile che i siti potenziali di infezione sugli epitelii superficiali mucosali o cutanei possano avere accesso agli anticorpi circolanti. L'infezione s'instaura quando il virus viene a diretto contatto con i cheratinociti nello strato basale dell'epitelio genitale. I microtraumi che possono avvenire durante i rapporti sessuali, potrebbero incrementare la probabilità di questa esposizione e in tale scenario il sito di una potenziale infezione potrebbe avere un accesso più diretto alle IgG sistemiche. L'erosione superficiale dell'epitelio porterebbe probabilmente a un'essudazione serica e il rapido accesso delle IgG seriche alle particelle virali. Inoltre, la superficie della cervice e l'epitelio vaginale superiore sono bagnate nel muco cervicale e le immunoglobuline dominanti nel muco cervi-

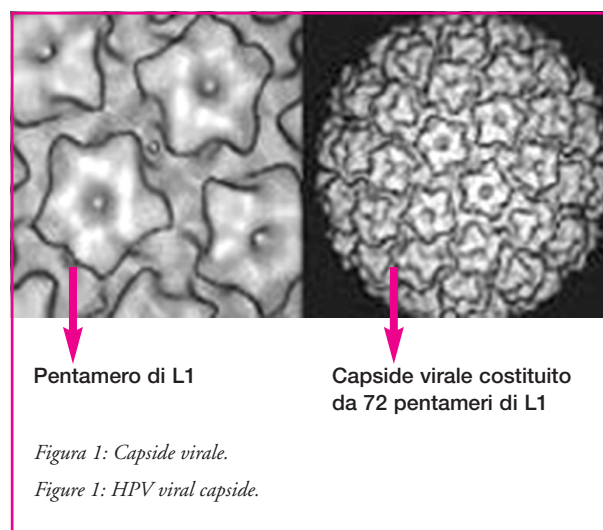


Figura 1: Capside virale.

Figure 1: HPV viral capsid.

cale sono IgG trasudate dalla superfici endo-cervicale e squamo-colonnare.³⁴ C'è quindi l'evidenza di un rapido e facile accesso degli anticorpi serici alle particelle del virus che possono spiegare la straordinaria efficacia dei vaccini VLP. Tutto questo ha portato allo sviluppo di due vaccini profilattici, mentre molte incertezze rimangono invece per i vaccini terapeutici. Un vaccino terapeutico contro le infezioni da HPV potrebbe prevenire le complicazioni associate a un'infezione da HPV in atto. Il ruolo oncogeno degli HPV è dovuto alle proprietà trasformanti di E6 e E7 e queste proteine rappresentano quindi il bersaglio antigenico ideale per lo sviluppo di vaccini terapeutici e per strategie di immunoterapia. Nonostante i molti studi condotti in questo campo, nessuno di questi ha mostrato una validità clinica certa, probabilmente perché i vaccini non hanno ancora riprodotto fedelmente gli eventi principali di una risposta immunitaria curativa

Attuali vaccini HPV-L1-VLP

Sarebbe desiderabile per un vaccino HPV avere la capacità di prevenire tutti i casi di carcinoma cervicale. Comunque, sebbene i 15 tipi di HPV oncogeni siano dal punto di vista filogenetico strettamente correlati gli uni agli altri, gli epitopi immuno-dominanti nelle L1-VLP inducono anticorpi neutralizzanti che sono prevalentemente tipo-specifico. È stato quindi necessario, almeno per la prima generazione dei vaccini, focalizzare gli sforzi sui tipi di HPV associati più frequentemente ai carcinomi cervicali. Due tipi di vaccini profilattici (bivalente e quadrivalente) sono stati sviluppati commercialmente.

Nel vaccino quadrivalente (Gardasil™), la proteina L1 di ciascun tipo di HPV è espressa in *Saccharomyces pombe* (già utilizzato nel vaccino dell'epatite B); il prodotto consiste di VLP L1 dei tipi 6/11/16/18 a 20/40/40/20 µg per dose ed è adiuvato in idrossido di alluminio. Il prodotto viene somministrato mediante iniezione intramuscolare (0,5 ml) con un pro-

collo di immunizzazione in 3 dosi con la schedula a 0,2,6 mesi. Ha l'obiettivo di prevenire circa il 70% dei carcinomi cervicali e il 90% dei condilomi genitali. Nel 2006 questo vaccino quadrivalente è stato licenziato in molti paesi e da pochi giorni l'Agenzia Italiana del farmaco (AIFA) ha deliberato l'approvazione della commercializzazione anche in Italia.

Nel vaccino bivalente (Cervarix™), le proteine L1, prodotte separatamente e poi combinate, sono espresse in cellule d'insetto usando come vettore il Baculovirus. Il prodotto consiste di VLP purificate di HPV 16/18 a 20/20 µg per dose ed è adiuvato in AS04 (contenente 500 µg idrossido di alluminio e 50 µg di monofosforil-lipideA). Anche questo prodotto viene somministrato mediante iniezione intramuscolare (0,5 ml) con un protocollo di immunizzazione in 3 dosi, ma con la schedula a 0,1,6 mesi. Ha l'obiettivo di prevenire il 70% circa dei casi di cancro della cervice uterina.

Una seconda generazione di vaccini probabilmente includerà altri tipi oncogenici e una questione fondamentale è se il cocktail di HPV potrà essere uguale nei diversi paesi o dovrà essere diverso, sulla base dei dati locali di prevalenza per tipo. HPV 16 e 18 sono i tipi predominanti in tutti i paesi del mondo, altri 6 tipi, HPV-45/31/33/35/52/56, sono coinvolti in un altro 20-30% dei casi indipendentemente dalla regione geografica; quindi un vaccino polivalente che contenga 8 tipi di HPV potrebbe proteggere contro oltre il 90% di tutti i carcinoma cervicali.³⁵

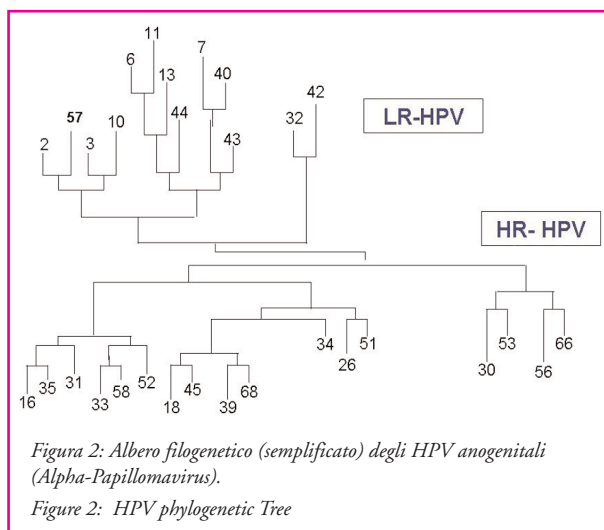
Endpoints e criteri per la valutazione dell'efficacia del vaccino

La valutazione dei vaccini può essere divisa in tre stadi: sviluppo, autorizzazione e post-autorizzazione. I trials clinici sull'uomo sono classificati in tre fasi: fase I, II e III. Negli studi clinici in fase I, il vaccino viene testato su un piccolo numero di adulti sani (circa 20) per valutarne le proprietà, la tollerabilità e i parametri farmacologici e clinici; fondamentalmente gli studi della fase I servono per valutarne la sicurezza.

Gli studi della fase II coinvolgono un numero più ampio di soggetti e hanno lo scopo di ottenere informazioni preliminari sulla capacità del vaccino di produrre l'effetto desiderato (l'immunogenicità) nella popolazione obiettivo e la sicurezza. Gli studi clinici della fase III sono quelli su cui si basa la licenza e devono produrre dati sufficienti per poter dimostrare che il nuovo prodotto è sicuro ed efficace per l'obiettivo programmato.

Gli endpoints principali di tutti i vaccini sono l'immunogenicità (risposta B e T), la tollerabilità (reazioni locali e sistemiche), la sicurezza (eventi negativi nel breve e nel lungo periodo) e la protezione fornita contro la malattia (efficacia). Nel caso specifico possono essere considerati tre tipi di endpoints: clinici, virologici e immunologici.³⁶

Ci sono tre endpoints virologici per valutare l'efficacia dei vaccini: infezioni incidenti, infezioni persistenti e presen-



za di genotipi specifici in una lesione clinica. Essendo l'infezione persistente (definita come la individuazione dello stesso tipo di HPV-DNA in campioni di cellule cervicali prelevati a distanza di 6-12 mesi) condizione indispensabile allo sviluppo di cancro, essa è stata presa quale *end-point* primario nei trial clinici. Un'alta percentuale di donne sessualmente attive, sono, almeno in via transitoria, infettate da uno o più HPV, ma poiché la malattia clinica indotta da HPV avviene in una piccola frazione degli individui infettati, la stima dell'efficacia del vaccino non può essere basata solo sulla protezione contro l'infezione.³⁶ La misurazione di specifici genotipi è importante per determinare se i vaccini proteggono contro alcuni o tutti i genotipi HPV inclusi o persino contro altri genotipi non inclusi.

La misurazione degli anticorpi non è una misura di malattia ma può essere una misura della protezione contro la malattia. Nel caso di HPV, è importante sottolineare che al momento non esiste un metodo standard universale per misurare la concentrazione degli anticorpi, il che preclude il confronto diretto dei risultati ottenuti in laboratori diversi. Qualora fosse conosciuto il titolo anticorpale protettivo, diventerebbe semplice condurre trials clinici per valutare le varie schedule di somministrazione e i relativi dosaggi nella popolazione. Questo è stato estremamente utile per esempio nel caso dei vaccini per l'epatite B. Allo stato attuale non conosciamo se sia possibile determinare una correlazione tra immunità e protezione dall'infezione, ma i titoli anticorpali potrebbero essere comunque usati come un surrogato di protezione.

Gli *end-points* clinici con cui si valuta l'efficacia di un vaccino, incidenza della malattia, non sono applicabili nel caso del carcinoma cervicale sia per ragioni pratiche (il carcinoma cervicale compare dopo molti anni dall'infezione iniziale) che etiche. In linea di principio, l'efficacia dei vaccini HPV dovrebbe essere misurata in termini di casi di cancro invasivo cervicali dovuti ai tipi vaccinali prevenuti nei riceventi il vaccino rispetto ai riceventi il placebo. E' evidente che, visti gli ovvi problemi etici di un approccio di tale tipo, si sia stabilito di trovare un risultato di efficacia che rappresenti un surrogato accettabile.

Poiché molti dati mostrano come l'individuazione e il trattamento della neoplasia cervicale intraepiteliale di alto grado (CIN2/3) riduce l'incidenza e la mortalità del carcinoma cervicale, l'individuazione di lesioni preinvasive di alto grado (CIN2/3) accompagnata dall'individuazione di HPV-DNA, è attualmente considerato un *end-point* intermedio, eticamente accettabile per valutazioni di efficacia del vaccino sullo sviluppo di carcinoma cervicale.

Il gruppo di esperti del WHO non considera CIN-1 un appropriato *end-point* per valutazioni di efficacia del vaccino, in quanto la sua diagnosi ha una riproducibilità molto scarsa ed esso non è un obbligato precursore del carcinoma (a causa dell'alta percentuale di regressione spontanea).

Tollerabilità del vaccino

Negli studi condotti, entrambi i vaccini sono stati ben tollerati e solo lo 0,2% dei soggetti ha interrotto il ciclo per esperienze negative. La maggior parte degli effetti negativi erano reazioni locali nel sito di iniezione (Gardasil: 83% dei vaccinati contro 73,4% dei soggetti con placebo, Cervarix: 94% e 88% rispettivamente). Quelli riscontrati più comunemente sono febbre e reazioni locali (dolore, gonfiore e arrossamento nel sito d'iniezione). Sono state segnalate raramente anche reazioni di possibile natura allergica (broncospasmo in meno di una persona vaccinata su 10.000 e orticaria in meno di 1/1.000).^{30,31,37,38}

Non sono stati effettuati studi specifici sul vaccino in donne in gravidanza e i dati disponibili non sono al momento sufficienti per raccomandarne l'uso in gravidanza.

Immunogenicità e durata della protezione

La vaccinazione mediante iniezione intramuscolare di L1-VLP è risultata essere fortemente immunogena e ben tollerata. La misurazione di specifiche immunoglobuline seriche (IgG) contro anticorpi L1 VLP, nei soggetti vaccinati e non vaccinati, è il principale parametro usato nei trials per monitorare la risposta immune indotta dai vaccini.

Le VLPs sono altamente immunogeniche e negli individui immunizzati il picco di risposta anticorpale anti-VLP è sostanzialmente più alto (almeno 1-3 logs) di quello indotto in un'infezione naturale.³⁷⁻³⁹ Le concentrazioni seriche di anticorpi, a seguito del picco dei livelli anticorpali ottenuto dopo la terza immunizzazione, diminuiscono a concentrazioni più basse, che però persistono allo stesso livello per almeno 60 mesi dopo la vaccinazione e sono superiori di 10-20 volte rispetto a quelli misurabili in seguito a un'infezione naturale.^{30,31,38}

Allo stato attuale ci sono solo poche informazioni disponibili sulla durata a lungo termine della risposta immunitaria indotta dal vaccino. Gli studi di follow-up delle vaccinate non possono basarsi solamente sul titolo anticorpale indotto dal vaccino. Per misurare adeguatamente l'efficacia del vaccino contro i tipi di HPV presenti nel vaccino stesso, sarà necessaria anche una sorveglianza a lungo termine che valuti l'incidenza di infezione tipo-specifiche nei soggetti vaccinati. Queste valutazioni saranno critiche per identificare una potenziale immunità che decresce e l'eventuale necessità di una dose supplementare (richiamo). La durata a lungo termine della protezione dipende dalla memoria immunitaria e c'è evidenza che entrambi i vaccini inducano una buona memoria immunitaria.

Anche se il livello degli anticorpi circolanti decade, normalmente quando si ha un ulteriore inoculo dell'antigene specifico, in questo caso HPV 16/18, le cellule B della memoria si sviluppano rapidamente e si differenziano in plasmacellule mediante un processo che è controllato dalle cellule memoria Th2 e dalle citochine che esse secernono. Sarà rile-

vante a questo proposito se, dopo la vaccinazione, l'esposizione al virus agirà come una «dose di richiamo» naturale. E' probabile che il vaccino HPV sia altamente immunogeno per entrambi i sessi, ma, contrariamente a quanto avviene nel tratto riproduttivo femminile, i genitali maschili esterni non sono bagnati da muco contenente anticorpi e questo potrebbe far risultare la vaccinazione nei maschi meno efficace nel prevenire l'infezione da HPV rispetto alla sua efficacia nel sesso femminile. Comunque, poiché per la stabilizzazione di un'infezione HPV si ritiene necessario la presenza di un'abrasione della cute e di un'esposizione dello strato basale dell'epitelio, è anche plausibile che la trasudazione corporea dovuta a un'abrasione possa essere sufficiente per conferire protezione anche nel sesso maschile. Solo uno studio condotto con il vaccino quadrivalente ha incluso tra i partecipanti soggetti di sesso maschile di età compresa tra 9-15 anni; i risultati si attendono quest'anno. L'immunità umorale indotta dai vaccini VLP è fondamentalmente tipo-specifica, ma occorre considerare che c'è una non trascurabile omologia nella sequenza aminoacidica (figura 2) della proteina L1 tra i tipi di HPV strettamente correlati:⁴⁰ HPV 16/31, HPV 31/33, HPV 18/45.

Quando le sequenze aminoacidiche di L1 sono disposte in struttura tridimensionale, le regioni ipervariabili sono sparpagliate sulla parte esterna esposta alla superficie del capsomero in 5 anse, ciascuno formato da 10-30 aminoacidi, che sporgono rispetto al pilastro delle regioni conservate disposte più in profondità nella particella VLP.

Sia gli epitopi conformazionali sia quelli lineari, individuati dagli anticorpi neutralizzanti, mappano su queste anse.⁴¹ Tutte le evidenze suggeriscono che la specificità per tipo degli anticorpi è determinata dagli epitopi delle anse.

Studi sierologici con VLP hanno però mostrato che possono formarsi anticorpi cross-reattivi verso epitopi comuni a VLP di tipi di HPV diversi, ma che generalmente non sono neutralizzanti.

Nel trial di fase II di Cervarix c'è l'evidenza che i vaccini HPV 16/18 siano parzialmente cross-protettivi³⁰ contro infezioni incidenti da HPV31 e HPV 45. Anticorpi cross-reattivi sembrano essere presenti anche per il vaccino quadrivalente.⁴² Deve comunque essere enfatizzato che al momento non c'è evidenza di cross protezione contro malattie, cioè CIN2/3, indotte da HPV 45 e 31 e se questa cross-protezione avviene, probabilmente è solo parziale e non completa. Dati più certi su questo punto si avranno da trial con largo potere statistico, poiché la prevalenza d'infezioni con questi tipi di virus nella popolazione è bassa.

Un'altra importante questione riguarda in particolare l'HPV 16, di cui, oltre al tipo principale, sono state identificate delle varianti; evidenze strutturali⁴⁰ e sperimentali⁴³ mostrano che gli anticorpi neutralizzanti, rivolti contro gli epitopi *wild-type* di HPV 16, neutralizzano in maniera efficiente anche le varianti conosciute di L1 HPV 16.

Studi di efficacia

Entrambi i vaccini sono stati valutati in trials clinici randomizzati, con un braccio di controllo con placebo. Dai dati pubblicati^{30,31,37,38} dei trial in fase II e in fase III, entrambi i vaccini dimostrano di proteggere le vaccinate da infezioni cervicali persistenti per i tipi HPV 16/18 e dalle lesioni cervicali sostenute da HPV 16/18. Inoltre, il vaccino quadrivalente protegge le donne anche dalle malattie mucosali e cutanee indotte dagli HPV 6/11.

Nelle donne tra 16 e 26 anni, che avevano ricevuto il ciclo vaccinale completo e che erano negative per gli HPV 6,11,16 e 18, la protezione del vaccino quadrivalente,³⁸ valutata per CIN di alto grado, VIN, VAIN e condilomi genitali, era del 100%.

La stima di efficacia clinica misurata sul totale delle donne partecipanti, incluse le donne con infezione da HPV 16 e 18 e quelle che non avevano completato il ciclo vaccinale (inferiore allo 0,3%), è stata invece molto inferiore (circa il 50%). Nessun effetto protettivo del vaccino per lesioni di alto grado è stato osservato nelle donne che erano positive per DNA di HPV 16/18 e sieropositive, cioè quelle che avevano sviluppato una risposta immunitaria, ma non avevano eliminato il virus, mentre una modesta e non significativa riduzione di malattia era osservata in donne che all'entrata erano HPV-DNA positive, ma sieronegative.

Nei trials del vaccino bivalente³⁰ c'era un 100% di efficacia contro lo sviluppo di CIN2/3 associate a HPV 16/18, in donne che all'arruolamento erano negative sia per la ricerca del DNA virale per i tipi 16/18 sia pap-test negative.

Raccomandazioni per ulteriori ricerche post-marketing

Il periodo *post-market* sarà cruciale per la raccolta di dati sulla sicurezza e sull'efficacia in un grande numero di riceventi. Gli studi *post-marketing* sono pre-pianificati in protocolli di studio e sono indicati come studi di fase IV. Questi studi sono generalmente condotti per valutare l'uso ottimale del vaccino (età della vaccinazione, simultanea somministrazione di altri vaccini, eccetera...), l'efficacia in gruppi a rischio (persone anziane, pazienti immunocompromessi, pazienti con particolari malattie, eccetera...), valutazioni sul mantenimento a lungo termine dell'efficacia e monitoraggio della sicurezza a lungo termine. I vaccini VLP HPV appaiono essere promettenti, ma è importante individuare le loro criticità. Gli attuali vaccini non proteggono contro tutti i tipi di HPV oncogeni, non sono terapeutici per le infezioni pre-esistenti, non è conosciuta la durata della protezione, la possibile necessità di un richiamo e il regime delle tre dosi può essere un limite per determinate popolazioni.

Sarebbe importante poter valutare il livello di protezione ottenibile con due o persino con una sola dose. Oppure, se due vaccinazioni a distanza di un anno potrebbero permettere una migliore *compliance*, con una suffi-

ciente efficacia e una conseguente riduzione dei costi. Dati molto limitati sono disponibili per valutare il beneficio della vaccinazione in donne di età 19-26; inoltre non ci sono dati disponibili per donne con più di due partner (valore medio) nella loro vita e in soggetti immunocompromessi e dovrebbe essere considerato il rischio associato al comportamento sessuale del partner. I pazienti HIV-positivi hanno una più alta prevalenza e persistenza delle infezioni da HPV, che aumenta il rischio di lesioni preneoplastiche e neoplastiche. Non è al momento conosciuto l'impatto dello stato del paziente HIV, in altre parole conta CD4 e carica, sullo sviluppo di una risposta immune protettiva alla vaccinazione con VLP di HPV.

Non ci sono dati né biologici né epidemiologici se la significativa riduzione nell'incidenza da HPV 16 e 18 indotta dalla vaccinazione profilattica possa portare a un incremento dei tipi oncogenici meno frequenti. Le evidenze disponibili attualmente sembrano indicare che le infezioni da HPV sono indipendenti le une dalle altre e quindi appare improbabile che il posto di HPV 16 e 18 sia occupato da altri tipi oncogeni, ma valutazioni su un eventuale sbilanciamento sarebbero necessari.

Inoltre, c'è la necessità di programmare ricerche sulla sicurezza del vaccino, specialmente tossicità sulla riproduzione, e co-somministrazione alle adolescenti con altri vaccini. Se da una parte il Servizio sanitario nazionale offrirà la vaccinazione a determinate classi di età, è ipotizzabile che anche le donne di altre classi di età si sottopongano a vaccinazione e allora sarà fondamentale poter avere la possibilità di registrare dati sulla copertura, dati di sorveglianza per valutare l'efficacia nella riduzione di malattia, dati di prevalenza delle infezioni per evidenziare eventuali cambiamenti nella frequenza dei virus oncogeni minori nella popolazione generale e nelle lesioni, dati qualitativi e quantitativi sull'accettabilità del vaccino e sul suo impatto sulle abitudini sessuali e, soprattutto, sulle abitudini allo screening. Un'importante necessità nei paesi dove è attivo un programma di screening per il cervico-carcinoma è l'integrazione dei servizi di vaccinazione con i servizi di screening e la valutazione di come la vaccinazione impatterà sullo screening. La sensibilità e specificità dei test di screening dovranno essere rivalutate nelle donne immunizzate. Con la diminuzione dell'incidenza e della prevalenza della malattia sarà importante valutare i dati di follow-up dei trials in corso, per valutare l'impatto sul numero totale di anomalie citologiche e individuare la migliore strategia di screening in una popolazione vaccinata (età di intervento, modalità, test HPV o citologia, e periodicità dei controlli per minimizzare procedure non necessarie e i costi). Inoltre, per assistere le donne nel prendere una decisione informata sulla vaccinazione, adeguate procedure di comunicazione dovrebbero essere sviluppate. Sarà inoltre importante valutare l'impatto dei vaccini su altri tumori genitali e non-genitali associati a HPV.

Bibliografia

1. Bosch FX, Lorincz AT, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002; 55: 244-65.
2. Parkin DM, Bray F. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine* 2006; 24(Suppl 3): S11-25.
3. Cogliano V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F. Carcinogenicity of human papillomavirus. *Lancet Oncol* 2005; 6: 204.
4. IARC Monograph Working Group et al. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol 90: human papillomaviruses*. Lyon: International Agency for Research in Cancer; 2007, in press.
5. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 518-27.
6. Munoz N, Castellsague X, de Gonzales AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* 2006; 24: 1-10.
7. Bosch FX, Manos MM, Munoz N et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87(11): 796-802.
8. Bosch FX, Harper D. Prevention strategies of cervical cancer in the HPV vaccine era. *Gynecol Oncol* 2006, 103: 21-24.
9. Clifford GM, Smith JS, Aguado T, Franceschi S. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2003; 89: 101-05.
10. Human papillomavirus testing for triage of women with cytologic evidence of low-grade squamous intraepithelial lesions: baseline data from a randomized trial. The Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions Triage Study (ALTS) Group. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 397-402.
11. Pham TH, Nguyen TH, Herrero R et al. Human papillomavirus infection among women in South and North Vietnam. *Int J Cancer* 2003; 104: 213-20.
12. Ho GY, Bierman R, Beardsley L et al. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998; 338: 423-28.
13. Bauer HM, Ting Y, Greer CE et al. Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. *JAMA* 1991; 265: 472-77.
14. Kulasingam SL, Hughes JP, Kiviat NB et al. Evaluation of human papillomavirus testing in primary screening for cervical abnormalities: comparison of sensitivity, specificity, and frequency of referral. *JAMA* 2002; 288: 1749.
15. Richardson H, Kelsall G, Tellier P et al. The natural history of type-specific human papillomavirus infections in female university students. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12: 485-90.
16. Baseman JG, Koutsky L. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol* 2005; 32(Suppl 1): S16-24.
17. Winer RL, Lee SK, Hughes JP et al. Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am J Epidemiol* 2003; 157: 218-26.
18. Rylander E, Ruusuvaara L, Almstromer MW et al. The absence of vaginal human papillomavirus 16 DNA in women who have not experienced sexual intercourse. *Obstet Gynecol* 1994; 83: 735-37.
19. Nobbenhuis MA, Walboomers JM, Helmerhorst TJ et al. Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequence for cervical-cancer screening: a prospective study. *Lancet* 1999; 354: 20-25.
20. Wright TC Jr, Schiffman M. Adding a test for human papillomavirus DNA to cervical-cancer screening. *N Engl J Med* 2003; 348: 489-90.
21. Stern PL, Brown M, Stacey SN et al. Natural HPV immunity and vaccination strategies. *J Clin Virol* 2000; 19: 57-66.
22. Carter J, Koutsky LA, Hughes JP et al. Comparison of human

- papillomavirus types 16, 18 and 6 capsid antibody responses following incident infection. *J Infect Dis* 2000; 181: 1911-19.
23. Stanley M. HPV vaccines. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2006; 20: 279-93.
 24. Shope, RE. Immunization of rabbits to infectious papillomatosis. *J Exp Med* 1937; 65: 607-24.
 25. Kirnbauer R, Booy F, Cheng N et al. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 12180-84.
 26. Rose RC, Reichman RC, Bonnez W. Human papillomavirus (HPV) type 11 recombinant virus like particles induce the formation of neutralizing antibodies and detect HPV specific antibodies in human sera. *J Gen Virol* 1994; 75: 2075-79.
 27. Jansen KU, Rosolovsky M, Schultz LD et al. Vaccination with yeast-expressed cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) virus-like particles protects rabbits from CRPV-induced papilloma formation. *Vaccine* 1995; 13: 1509-14.
 28. Kirnbauer R, Chandrachud LM, O'Neil BW et al. Virus-like particles of bovine papillomavirus type 4 in prophylactic and therapeutic immunization. *Virology* 1996; 219: 37-44.
 29. Suzich JA, Ghim SJ, Palmer Hill FJ et al. Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 11553-57.
 30. Harper DM, Franco EL, Wheeler CM et al. Sustained efficacy up to 4-5 years of bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomized control trial. *Lancet* 2006; 367: 1247-55.
 31. Mao C, Koutsky LA, Ault KA et al. Efficacy of human papillomavirus-16 vaccine to prevent cervical intraepithelial neoplasia: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol* 2006; 107: 18-27.
 32. Breitburd F, Kirnbauer R, Hubbert NL et al. Immunization with virus-like particles from cotton tail rabbit papillomavirus (CRPV) can protect against experimentally CRPV infection. *J Virol* 1995; 69: 3959-63.
 33. Ghim, S, Newsome J, Bell J et al. Spontaneously regressing oral papillomas induce systemic antibodies that neutralize canine oral papillomavirus. *Exp Mol Pathol* 2000; 68: 147-51.
 34. Nardelli E, Haefliger D, Wirthner D et al. Specific antibody levels at the cervix during the menstrual cycle of women vaccinated with human papillomavirus 16 virus-like particles. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 1128-37.
 35. Clifford G, Franceschi S, Diaz M et al. Chapter 3: HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. *Vaccine* 2006; 24(Suppl 3): S26-34.
 36. Pagliusi SR, Teresa AM. Efficacy and other milestones for human papillomavirus vaccine introduction. *Vaccine* 2004; 23: 569-78.
 37. Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM et al. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N Engl J Med* 2002; 347: 1645-51.
 38. Villa LL, Costa RLR, Petta CA et al. Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. *Lancet Oncol* 2005; 6: 271-78.
 39. Harro CD, Pang YY, Roden RB et al. Safety and immunogenicity trial in adult volunteers of a human papillomavirus 16 L1 virus-like particle vaccine. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 284-92.
 40. Chen XS, Garcea RL, Goldberg I et al. Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Mol Cell* 2000; 5: 557-67.
 41. Olcese VA, Chen Y, Schlegel R, Yuan H. Characterization of HPV16 L1 loop domains in the formation of a type-specific, conformational epitope. *BMC Microbiol* 2004; 4: 29.
 42. Stanley M, Lowy DR, Frazer I. Prophylactic HPV vaccines: Underlying mechanisms. *Vaccine* 2006; 24(Suppl 3): S106-13.
 43. Pastrana DV, Vass WC, Lowry DR, Schiller JT. NHPV16 VLP vaccine induces human antibodies that neutralize divergent variants of HPV16. *Virology* 2001 5; 279(1): 361-69.

IN BREVE

● Infortuni e tumori professionali

I dati INAIL riguardanti le morti sul lavoro del 2006 confermano l'incremento già visibile nelle stime pubblicate dall'ente assicurativo lo scorso ottobre. Nell'anno in questione risultano 1.280 infortuni mortali contro i 1.265 del 2005 e, considerando che il dato del 2006 crescerà ancora a causa dei tempi tecnici di definizione e dei criteri di rilevazione dei dati, questo andamento è destinato a interrompere un trend in diminuzione dal 2002 al 2005. Diventano quindi maggiormente significativi i ripetuti appelli del presidente della Repubblica, Giorgio Napolitano, per una cultura della sicurezza e della prevenzione e per «affrontare senza indugio e con il massimo impegno la

piaga delle morti bianche». Inoltre, secondo un documento pubblicato dall'OMS il 28 aprile 2007 in occasione della giornata mondiale per la sicurezza nei luoghi di lavoro, ogni anno nel mondo muoiono almeno 200.000 persone per tumori causati dall'ambiente di lavoro malsano; sono 125 milioni le persone esposte all'amianto che causa ogni anno almeno 90.000 decessi. La maggior parte dei tumori occupazionali dovuti a sostanze cancerogene vengono diagnosticati nei paesi industrializzati, tuttavia se non verrà interrotta la tendenza a spostare i processi che richiedono l'utilizzo di queste sostanze in paesi con standard di sicurezza meno vincolanti, nei prossimi decenni si verificherà un ulteriore incremento

dei tumori occupazionali nei paesi in via di sviluppo. L'Oms, inoltre, richiama i governi e le industrie a un maggior impegno per assicurare la salubrità dei luoghi di lavoro e indica alcuni interventi base che permetterebbero una maggior prevenzione: il divieto di utilizzare l'amianto e la proibizione di fumo nei luoghi di lavoro; introduzione di solventi senza benzene e di indumenti protettivi per chi lavora sotto il sole.

Per il prossimo ottobre è prevista una conferenza internazionale, organizzata dall'Oms e dal National Cancer Institute of France, al fine di elaborare raccomandazioni per rafforzare, a livello nazionale e internazionale, le politiche di prevenzione dei tumori occupazionali e ambientali.