

Vaccino: stato dell'arte

G. Mojana, C.A. Liverani, G. Scarfone, F. Boselli*

Servizio di Ginecologia Preventiva

Dipartimento di Ostetricia, Ginecologia e Neonatologia - Fondazione IRCCS

Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena di Milano

* Unità di Ginecologia Oncologica preventiva - Sezione di Ginecologia e Ostetricia

Dipartimento integrato materno infantile - Università degli studi di MO e RE

La Colposcopia in Italia Anno XX - N. 3 pagg. 5-8

Introduzione

Il carcinoma della cervice uterina rappresenta la seconda neoplasia maligna che interessa la donna ed è causato da un agente trasmesso per via sessuale. Esso è a tutt'oggi ancora responsabile di circa 500.000 morti all'anno nel mondo. Numerosissimi studi hanno confermato l'esistenza di una relazione estremamente forte tra HPV e neoplasia cervicale intraepiteliale. Prove della presenza di infezione da HPV si hanno in oltre il 95% dei carcinomi cervicali. Il virus viene oggi considerato la "forza" responsabile dell'alterata regolazione del ciclo cellulare che è alla base della trasformazione maligna.

Sono stati identificati oltre 200 tipi di papillomavirus, dei quali circa 40 possono causare infezioni del tratto genitale. Anche se quasi tutti i carcinomi cervicali contengono genoma di HPV, la grande maggioranza dei papillomavirus non è oncogena ma induce semplicemente verruche cutanee o tumori benigni. L'acquisizione di un tipo virale oncogeno aumenta la probabilità di infezione persistente, che conduce ad integrazione virale e rappresenta un fattore predittivo di progressione neoplastica più significativo rispetto alla carica virale. Le donne esposte al rischio più alto sono quelle con carica virale elevata in aggiunta alla presenza dei tipi virali oncogeni. Circa la metà dei carcinomi cervicali presenti nel mondo contiene l'oncogeno HPV16. L'integrazione del DNA virale nel genoma dell'ospite avviene in una fase tardiva della storia naturale dell'infezione da HPV. Spesso tale integrazione avviene solo quando il carcinoma sta diventando invasivo.

Il genoma virale dell'HPV consiste di 9 "fasi di lettura aperta" (open reading frames) che codificano sette geni precoci (E1-E7) e due geni tardivi (L1 ed L2). E1-E7 sono responsabili della propagazione del virus, mentre L1 ed L2 codificano le proteine del capsido virale. L1 è più abbondante di L2, rappresentando approssimativamente l'80% del capsido. Le proteine capsidiche L1 ed L2 sono

necessarie per l'instaurarsi dell'infezione a livello degli stati basali dell'epitelio, ma dopo che il virione si è integrato, queste proteine non sono più accessibili al sistema immunitario dell'ospite. Una volta dentro la cellula, le proteine E1 ed E2 iniziano e mantengono la replicazione virale. Sono però le proteine E6 ed E7 a fornire al virus il suo potenziale oncogeno, determinando la formazione di complessi con proteine di inibizione tumorale espresse dall'ospite. La E6 lega la proteina di inibizione tumorale p53 e stimola la sua degradazione, portando a una diminuzione dell'apoptosi; la E7 lega la proteina di inibizione tumorale pRb, portando alla sua inattivazione e quindi a proliferazione cellulare incontrollata. L'instabilità genetica che ne deriva può consentire un aumentato danneggiamento cellulare e cromosomiale da parte di HPV e di cofattori addizionali, oppure mutazioni casuali. La persistenza virale fino all'integrazione rappresenta tuttavia l'eccezione e non la regola: la maggior parte delle infezioni da papillomavirus è estremamente transitoria e lesioni squamose intraepiteliali di basso grado spesso scompaiono spontaneamente nell'arco di 12-24 mesi. Inoltre l'evoluzione dall'esposizione al virus allo sviluppo della lesione cancerosa è un processo a step successivi, che per compiersi richiede almeno un decennio. Ciò spiega perché il carcinoma della cervice uterina è una malattia dell'età di mezzo e delle donne anziane, e non delle donne di 20 anni, tra le quali invece l'infezione da HPV presenta la prevalenza più elevata. Nelle lesioni da HPV benigne, il genoma virale rimane separato da quello dell'ospite (forma episomale). Ciò permette la normale trascrizione del gene E2, i cui prodotti sopprimono la E6 e la E7. Nelle lesioni con potenziale maligno il DNA virale si integra nel genoma dell'ospite: questa integrazione si verifica all'interno dell'open reading frame di E2, determinando la perdita della proteina E2. Tale perdita impedisce la soppressione di E6 ed E7, consentendo loro di agire sui geni oncosoppressori bersaglio, p53 e pRb rispettivamente.

In uno studio recente, si è osservato che durante un follow-up di 5 anni, il 67% delle donne inizialmente positive per DNA HPV16 guariva spontaneamente dall'infezio-

ne e lo stesso si verificava nel 92% delle donne positive per qualunque tipo di DNA HPV. Nel medesimo periodo di osservazione però, il 14% delle donne acquisiva una nuova infezione da HPV. Ciò spiega l'estrema difficoltà nella gestione delle patologie indotte da questo gruppo di virus.

In base al grado di oncogenicità, si distinguono tre classi principali di HPV:

- (a) Sottotipi a rischio oncogenico basso: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81
- (b) Sottotipi a probabile rischio oncogenico elevato: 26, 53, 66
- (c) Sottotipi a rischio oncogenico elevato: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82.

Vaccini profilattici anti-HPV basati su analoghi non infettivi del virus (particelle simil-virali note come VLP) composti da L1, hanno dato risultati promettenti nella protezione contro l'infezione e lo sviluppo delle lesioni. Inoltre sono stati studiati anche vaccini terapeutici diretti contro l'E6 e l'E7, che potrebbero in futuro rappresentare la strategia più efficace per il controllo dei cancri HPV-associati.

Vaccini profilattici

Poiché i tipi di HPV 16 e 18 causano circa il 70% dei cancri cervicali e delle lesioni intraepiteliali di alto grado, mentre i tipi 6 ed 11 causano il 90% dei condilomi floridi anogenitali, la ricerca si è concentrata su questi tipi virali. Una prima sperimentazione è stata condotta con un vaccino anti-HPV16, i cui risultati sono stati pubblicati nel 2002 sul *New England Journal of Medicine* da Koutsky e coll. Sono state randomizzate 2.392 donne di età compresa fra i 16 e i 23 anni, che hanno ricevuto tre dosi di un vaccino contenente 40 µg di L1 VLP HPV16 versus placebo. Campioni cervicali per il rilevamento del DNA da HPV-16 sono stati ottenuti all'arruolamento, un mese dopo la terza vaccinazione (mese 7) e successivamente ogni 6 mesi. Le donne sono state seguite per un periodo mediano di 17,4 mesi dopo avere completato il ciclo di vaccinazioni. L'incidenza di infezione da HPV 16 persistente è stata del 3,8 per 100 anni/donna a rischio nel gruppo placebo e dello 0 per 100 anni/donna a rischio nel gruppo vaccino (efficacia 100%, $p < 0,001$). Tutti e nove i casi di CIN HPV-16 correlati si erano verificati nel gruppo placebo.

Una sperimentazione con un vaccino quadrivalente anti-HPV 6, 11, 16, 18 (Merck Research Laboratories) è stata recentemente pubblicata sulla rivista *Lancet Oncology* da Villa e coll. Sono state studiate 277 donne con età media di 20 anni, cui è stato somministrato un vaccino quadrivalente L1 VLP (20µg HPV 6, 40 µg HPV 11, 40 µg HPV 16, 20 µg HPV 18), contro 275 donne di analoga età che hanno ricevuto il placebo. Ad un follow-up di 36 mesi, si

è evidenziato che l'incidenza combinata di infezione persistente o di malattia da HPV 6, 11, 16, 18 diminuiva drasticamente del 90% ($p < 0,0001$) nelle donne sottoposte a vaccinazione rispetto a quelle del gruppo placebo. In partenza, questo studio non aveva lo scopo di valutare l'efficacia del vaccino nei confronti della malattia indotta dal virus o per ciascuno dei tipi virali separatamente. Tuttavia, il fatto che tutte e tre le donne con lesioni genitali esterne e tutte e tre quelle con CIN appartenessero al gruppo placebo, è indubbiamente incoraggiante. Il vaccino si è dimostrato anche altamente immunogenico, oltre che ben tollerato. Gli Autori concludevano che un vaccino che ha come bersaglio i tipi virali 6, 11, 16, 18 potrebbe ridurre significativamente l'acquisizione dell'infezione e delle lesioni causate dai tipi più comuni di HPV.

Un'altra sperimentazione con un vaccino bivalente anti-HPV 16 e 18 (GlaxoSmithKline Biologicals) è stata pubblicata su *Lancet* nel 2004 da Harper e coll. Sono state studiate 1.113 donne di età compresa fra i 15 e i 25 anni, che hanno ricevuto tre dosi di un vaccino bivalente L1 VLP (20µg HPV 16 e 20 µg HPV 18) versus tre dosi di placebo. Ad un follow-up di 27 mesi, dall'analisi dei risultati attesi sulla base del gruppo di trattamento cui la randomizzazione ha assegnato la paziente ("intention-to-treat"), l'efficacia del vaccino è stata del 95,1% contro l'infezione cervicale persistente da HPV 16/18 e del 92,9% contro le anomalie citologiche associate all'infezione da HPV 16/18. Dall'analisi dei dati relativi al trattamento effettivamente ricevuto ("according-to-protocol"), l'efficacia del vaccino si è rivelata del 91,6% contro l'infezione incidente e del 100% contro l'infezione persistente da HPV 16/18. Per quanto riguarda le anomalie citologiche, nel gruppo placebo sono stati diagnosticati 15 ASCUS, 14 LSIL e 1 HSIL, mentre nel gruppo vaccino 1 ASCUS, 2 LSIL e nessun HSIL. Per quanto riguarda le lesioni istologicamente confermate invece, sette donne hanno sviluppato lesioni intraepiteliali (6 nel gruppo placebo e 1 nel gruppo vaccino). La paziente vaccinata era dapprima risultata positiva per l'HPV 51 e per l'HPV 56 al mese 9, mentre al mese 12 la positività era verso i tipi 18, 51 e 56. La biopsia colposcopicamente mirata aveva però evidenziato una CIN 1 contenente solo il tipo 51 e non il 18. Il successivo HPV test mostrava un HPV 51 persistente al mese 21 e pertanto questa lesione veniva definitivamente giudicata associata all'HPV 51. La diagnosi istologica delle 6 donne nel gruppo placebo è stata di CIN 1 in 3 casi (Pap test ASCUS o LSIL ed associato HPV-16) e di CIN 2 in altri 3 casi (Pap test ASCUS, LSIL e HSIL ed associato HPV-16). Il vaccino si è dimostrato sicuro, ben tollerato e altamente immunogenico. I dati di un ulteriore follow-up dello stesso studio del 2004 sono stati riportati su *Lancet* nel 2006. Qui si conclude confermando che il vaccino è altamente immunogeno e sicuro anche dopo 4-5 anni, evidenziando inoltre una cross-protezione.

Vaccini terapeutici

Dopo che il virus è divenuto intracellulare, le proteine capsidiche non sono più espresse. Le proteine E1 ed E2 che vengono espresse nelle cellule con replicazione virale attiva, sarebbero appropriate per i vaccini diretti contro le lesioni di basso grado, mentre le proteine E6 ed E7 sarebbero invece adatte per i vaccini diretti contro le lesioni di alto grado o il cancro invasivo, laddove il genoma virale si è integrato nel DNA dell'ospite e la E2 non viene più espressa. A questo proposito sono stati condotti alcuni studi che hanno fornito risultati parzialmente positivi, ma anche che sono stati oggetto di notevoli perplessità.

Conclusioni

Gli studi in corso sui vaccini profilattici stanno indubbiamente aprendo nuove prospettive nel campo della prevenzione del cancro cervicale. Rimangono aperte numerose questioni, che dovranno essere affrontate nel corso dei prossimi anni. Fra i problemi sollevati, elenchiamo i seguenti:

- 1) Le IgG di L1 non danno cross-reattività e quindi un determinato vaccino anti-HPV può fornire protezione solo verso i tipi virali inclusi. Dato che i tipi virali oncogenici sono parecchi, per ridurre l'incidenza del cancro cervicale in modo significativo, un vaccino dovrebbe comprendere almeno i tipi più comuni. Non essendo nota l'entità delle differenze regionali nella distribuzione dei diversi tipi, i vaccini andrebbero confezionati in modo differente a seconda dell'area geografica in cui gli stessi dovranno essere impiegati;
- 2) Non si conosce la lunghezza dell'immunità indotta da un vaccino profilattico (dosi di richiamo? Quando? Quante volte? Fino a che età?);
- 3) Popolazione bersaglio: per garantire un'immunità prima dell'esposizione all'HPV, sarebbe necessario un programma di vaccinazione durante l'adolescenza (accettazione da parte dei genitori?) o l'infanzia (immunità per tutta la vita?);
- 4) Occorre calcolare quale percentuale della popolazione bersaglio si sottoporrà realmente alla vaccinazione;
- 5) I maschi devono essere vaccinati? I partner potrebbero riceverne sia benefici indiretti (nel senso di una riduzione dell'esposizione al virus nelle donne), sia benefici diretti (l'associazione anche dei sottotipi virali a basso rischio in un vaccino profilattico consentirebbe una protezione anche dai condilomi acuminati, patologia psicologicamente invalidante, che dà frequenti recidive e richiede trattamenti spesso dolorosi);
- 6) I vaccini costituiti da VLPs funzionano solo come vaccini profilattici, poiché le proteine capsidiche non

vengono più espresse dopo che il virus è entrato nella cellula epiteliale;

- 7) Non si conosce il livello degli anticorpi serici richiesto per un'adeguata protezione dall'infezione;
- 8) La produzione di VLPs è costosa;
- 9) È necessaria la catena del freddo (e ciò cui costituisce una limitazione notevole nei paesi in via di sviluppo);
- 10) Si è calcolato che il numero di vaccinazioni richieste per prevenire un singolo caso di cancro cervicale – posta un'efficacia del 90% di un vaccino che contenga i 4 tipi più comuni di HPV oncogenici – varia da 200 a 350 vaccinazioni;
- 11) Inoltre l'eventuale riduzione dei sierotipi indotta da un dato vaccino, può far aumentare la prevalenza di altri sierotipi;
- 12) L'efficacia di un vaccino non è facilmente misurabile: occorre stabilire degli adeguati endpoint da valutare negli studi clinici. Con un vaccino efficace al 70% contro l'HPV 16 sono necessari 1.000 casi per valutare un'infezione da HPV 16 e 15.000 casi per una CIN 3. L'acquisizione o la persistenza di DNA virale nei campioni cervicali costituisce un potenziale endpoint che consentirebbe di effettuare studi più brevi, anche se la piccola percentuale di infezioni che procede verso il cancro e la mancanza di definitivi cofattori predittivi, rende difficoltoso estrapolare da un simile studio l'endpoint ultimo del cancro invasivo;
- 13) Occorre valutare l'effetto della vaccinazione sugli attuali programmi di screening. Poiché è inverosimile che un qualunque tipo di vaccino sia in grado di prevenire tutte le infezioni da HPV ad alto rischio, un qualche programma di screening dovrà rimanere in atto. Se un vaccino è efficace nel prevenire le lesioni di alto grado e il cancro, ma non diminuisce anche la prevalenza delle lesioni di basso grado, le attuali linee-guida dovranno essere riviste, in modo da evitare alle pazienti portatrici di lesioni di basso grado test e interventi non necessari;
- 14) Se la vaccinazione verrà introdotta in modo tale da non permettere almeno una riduzione degli screening, i costi potrebbero risultare proibitivi in alcune aree geografiche;
- 15) Se le donne vaccinate saranno erroneamente indotte a credere di non essere più a rischio per il cancro cervicale e disserteranno i programmi di screening, l'impatto ultimo sull'incidenza del cancro sarà diminuita.

La risoluzione di tutti questi problemi rappresenta la grande sfida che ci attende per il prossimo futuro. È comunque un fatto estremamente positivo poter riporre speranze nell'utilizzo di un vaccino – fino a pochi anni fa considerato di difficile realizzazione – per la prevenzione di una malattia tumorale come il cervicocarcinoma. Per quanto riguarda i vaccini terapeutici invece, ogni previsione appare oggi prematura.

Riferimenti bibliografici

- Berek JS. Cervical cancer: an opportunity to prevent and cure. *Cancer J* 2003; 9(5):325-6.
- Boisgerault F, Moron G, Leclerc C. Virus-like particles: a new family of delivery systems. *Expert Rev Vaccines* 2002; 1(1):101-9.
- Corona Gutierrez CM, Tinoco A, Navarro T et al. Therapeutic vaccination with MVA E2 can eliminate precancerous lesions (CIN 1, CIN 2, and CIN 3) associated with infection by oncogenic human papillomavirus. *Hum Gene Ther* 2004; 15(5):421-31.
- Crum CP, Abbott DW, Quade BJ. Cervical cancer screening: from the papanicolaou smear to the vaccine era. *J Clin Oncol* 2003; 21(10 Suppl):224-30.
- DaSilva DM, Schiller JT, Kast WM. Heterologous boosting increases immunogenicity of chimeric papillomavirus virus-like particle vaccines. *Vaccine* 2003; 21:3219-27.
- Franco EL, Harper DM. Vaccination against human papillomavirus infection: a new paradigm in cervical cancer control. *Vaccine* 2005; 23(17-18):2388-94.
- Garcia F, Petry KU, Muderspach L et al. ZYC101a for treatment of high-grade cervical intraepithelial neoplasia: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol* 2004; 103(2):317-26.
- Goldie SJ, Grima D, Kohli M et al. A comprehensive natural history model of HPV infection and cervical cancer to estimate the clinical impact of a prophylactic HPV-16/18 vaccine. *Int J Cancer* 2003; 106(6):896-904.
- Goldie SJ, Kohli M, Grima D et al. Projected clinical benefits and cost-effectiveness of a human papillomavirus 16/18 vaccine. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96(8):604-15.
- Gravitt PE, Shah KV. A Virus-based Vaccine May Prevent Cervical Cancer. *Curr Infect Dis Rep* 2005; 7(2):125-131.
- Gravitt PE, Jamshidi R. Diagnosis and management of oncogenic cervical human papillomavirus infection. *Infect Dis Clin North Am* 2005; 19(2):439-58.
- Hantz S, Alain S, Denis F. Anti-papillomavirus vaccines and prevention of cervical cancer: progress and prospects. *Presse Med* 2005 Jun 4; 34(10):745-53.
- Harper DM, Franco EL, Wheeler C et al. Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. *Lancet* 2004; 364(9447):1757-65.
- Harper DM, Franco EL, Wheeler C et al. Substained efficacy up to 4-5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from controlled trial. *Lancet* 2006; 367:1247-55.
- Ho GY, Studentsov YY, Bierman R, Burk RD. Natural history of human papillomavirus type 16 virus-like particle antibodies in young women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13(1):110-6.
- Hughes JP, Garnett GP, Koutsky L. The theoretical population-level impact of a prophylactic human papilloma virus vaccine. *Epidemiology* 2002; 13(6):631-9.
- Kahn JA, Rosenthal SL, Hamann T, Bernstein DI. Attitudes about human papillomavirus vaccine in young women. *Int J STD and AIDS* 2003; 14:300-6.
- Kotecha MT, Afghan RK, Vasilikopoulou E et al. Enhanced tumour growth after DNA vaccination against human papilloma virus E7 oncoprotein: evidence for tumour-induced immune deviation. *Vaccine* 2003; 21:2506-15.
- Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM et al. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N Engl J Med* 2002; 347(21):1645-51.
- Kulasingam AL, Myers ER. Potential health and economic impact of adding a human papillomavirus vaccine to screening programs. *JAMA* 2003; 290(6):781-9.
- Lehtinen M, Paavonen J. Effectiveness of preventive human papillomavirus vaccination. *Int J STD and AIDS* 2003; 14:787-92.
- Liu DW, Chang JL, Tsao YP et al. Co-vaccination with adeno-associated virus vectors encoding human papillomavirus 16 L1 proteins and adenovirus encoding murine GM-CSF can elicit strong and prolonged neutralizing antibody. *Int J Cancer* 2005; 113(1):93-100.
- Mahdavi A, Monk BJ. Vaccines against human papillomavirus and cervical cancer: promises and challenges. *Oncologist* 2005; 10(7):528-38.
- Munoz N, Bosch FX, Castellsague X et al. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int J Cancer* 2004; 111(2):278-85.
- Nardelli-Haeffliger D, Wirthner D, Schiller JT 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(15):1128-37.
- Pinto LA, Edwards J, Castle PE et al. Cellular immune responses to human papillomavirus (HPV)-16L1 in healthy volunteers immunized with recombinant HPV-16L1 virus-like particles. *J Inf Dis* 2003; 188:327-38.
- Roden RBS, Yutzy WH, Fallon R et al. Minor Capsid Protein of Human Genital Papillomaviruses contains Subdominant, Cross-Neutralizing Epitopes. *Virology* 2000; 270:254-7.
- Roden R, Wu TC. Preventative and therapeutic vaccines for cervical cancer. *Expert Rev Vaccines* 2003; 2(4):495-516.
- Rudolf MP, Fausch SC, DaSilva SM, Kast WM. Human Dendritic Cells are Activated by Chimeric Human Papillomavirus Type-16 Virus-Like Particles and Induce Epitope Specific Human T Cell Responses In Vitro. *J Immunol* 2001; 166:5917-24.
- Schiller JT, Hildesheim A. Developing HPV virus-like particle vaccines to prevent cervical cancer: a progress report. *J Clin Virol* 2000; 19:67-74.
- Sherman ME, Schiffman MH, Strickler H, Hildesheim A. Prospects for a prophylactic HPV vaccine: rationale and future implications for cervical cancer screening. *Diagn Cytopathol* 1998; 18(1):5-9.
- Simon P. Progress towards a vaccine for cervical cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2005; 17(1):65-70.
- Stanley MA. Progress in prophylactic and therapeutic vaccines for human papillomavirus infection. *Expert Rev Vaccines* 2003; 2(3):381-9.
- Tjalma WA, Arbyn M, Paavonen J et al. Prophylactic human papillomavirus vaccines: the beginning of the end of cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2004; 14(5):751-61.
- Villa LL, Costa RL, 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(5):271-8.
- Warzecha H, Mason HS, Lane C et al. Oral immunogenicity of human papillomavirus-like particles expressed in potato. *J Virol* 2003; 77(16):8702-11.
- Washam C. Two HPV vaccines yielding similar success. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97(14):1030.
- Washam C. Targeting teens and adolescents for HPV vaccine could draw fire. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97(14):1030-1.
- Williamson AL, Passmore JA, Rybicki EP. Strategies for the prevention of cervical cancer by human papillomavirus vaccination. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2005; 19(4):531-44.