



# UNIVERSITÀ DI PARMA

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA**

**DOTTORATO DI RICERCA IN  
"SCIENZE MEDICHE E CHIRURGICHE TRASLAZIONALI"  
CICLO XXXIII**

**RIPRISTINO DELLE RISPOSTE T LINFOCITARIE IN PAZIENTI  
CON EPATITE CRONICA B IN TERAPIA CON NUC:  
IMPLICAZIONI PER POSSIBILI TERAPIE IMMUNOMODULANTI  
DI ASSOCIAZIONE**

**Coordinatore:**

Chiar.mo Prof. **CARLO FERRARI**

**Tutore:**

Chiar.mo Prof. **CARLO FERRARI**

Dottorando: Dr. **MARCO PESCI**

Anni 2017/2020



# SOMMARIO

<b>RIASSUNTO</b> .....	5
<b>INTRODUZIONE</b> .....	6
1. Biologia del virus dell'epatite B dell'uomo (HBV) .....	6
1.1 Morfologia del virione .....	6
1.2 Organizzazione genomica .....	8
2. Ciclo replicativo .....	10
3. Storia Naturale dell'Infezione .....	12
4. Epidemiologia e modalità di trasmissione .....	14
6. Terapia .....	21
6.1 Interferone .....	21
6.2 Analoghi Nucleos(t)idici .....	23
6.3 Nuove strategie terapeutiche .....	26
6.3.1 Farmaci ad azione antivirale .....	26
6.3.2 Strategie immunomodulatorie innovative .....	28
<b>MATERIALI E METODI</b> .....	33
1. Pazienti .....	33
2. Valutazioni virologiche e sierologiche .....	33
3. Isolamento dei linfociti del sangue periferico .....	34
4. Espansione in vitro e valutazione delle citochine intracellulari (ICS) dei linfociti T HBV-specifici .....	34
5. ELISpot (Enzyme-Linked Immunosorbent Spot Assay) .....	35
6. Analisi statistica .....	36
<b>RISULTATI</b> .....	37
1. Il trattamento con analoghi nucleosidici induce recupero funzionale delle risposte T linfocitarie HBV-specifiche .....	37

2. Polimerasi e core sono gli antigeni più potenti nella stimolazione dei linfociti T dei pazienti trattati con analoghi. ....	39
3. Cinetica di recupero delle risposte T linfocitarie in corso di terapia con NUC .....	40
4. Comportamento delle singole funzioni anti-virali T linfocitarie in corso di terapia con NUC. ....	43
5. Comportamento delle risposte anti-virali T linfocitarie contro i singoli antigeni virali in corso di terapia con NUC. ....	45
<b>DISCUSSIONE</b> .....	46
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	51
<b>RINGRAZIAMENTI</b> .....	60

## RIASSUNTO

La terapia dell'epatite cronica B si basa principalmente sull'utilizzo di analoghi nucleos(t)idici, che sono estremamente efficaci nell'inibire la replicazione di HBV e privi di effetti collaterali rilevanti, ma devono essere somministrati cronicamente e in taluni casi per tutta la vita del paziente. Un'impellente necessità clinica è pertanto quella di disegnare nuove terapie che permettano di abbreviare il tempo di utilizzo degli analoghi nucleosidici o che possano sostituirli totalmente.

Pur avendo una specifica azione antivirale diretta, gli analoghi nucleos(t)idici hanno anche dimostrato un effetto positivo sulla funzione dei linfociti T *exhausted* dei pazienti con infezione cronica, attraverso meccanismi presumibilmente indiretti. Quest'attività immunomodulante degli analoghi potrebbe essere sfruttata per disegnare terapie di associazione con farmaci stimolanti diretti del sistema immunitario, come vaccinoterapie, volte ad abbreviare il tempo di utilizzo degli analoghi, potenziandone l'efficacia. Per ottenere questo obiettivo è indispensabile caratterizzare in maniera più approfondita i meccanismi che vengono attivati dagli analoghi per modulare il sistema immunitario e identificare la modalità ottimale di associazione con farmaci immunomodulanti diretti. A tale scopo, abbiamo reclutato coorti di pazienti sottoposti a terapia con analoghi per periodi di tempo differenti ed abbiamo studiato le loro risposte T linfocitarie CD4 e CD8-mediate, stimolando i linfociti T con pannelli di peptidi corrispondenti alle sequenze di tutte le proteine di HBV. Attraverso questo approccio sperimentale abbiamo potuto dimostrare che il ripristino funzionale linfocitario indotto dalla terapia con analoghi riguarda alcune delle principali funzioni anti-virali dei linfociti T (produzione di citochine e capacità proliferativa), tutte le specificità antigeniche contro le varie proteine di HBV ed entrambe le sottopopolazioni T linfocitarie CD8 e CD4. Inoltre, valutando l'effetto immunomodulante degli analoghi in funzione del tempo d'inizio della terapia si può ipotizzare la possibilità futura di terapie sequenziali basate sull'utilizzo degli analoghi, a cui associare successivamente, dopo 1-2 anni di terapia, farmaci immunostimolanti, come vaccino-terapie specifiche, che dovrebbero riuscire ad esprimere tutta la loro potenzialità terapeutica grazie al recupero funzionale linfocitario indotto dagli analoghi.

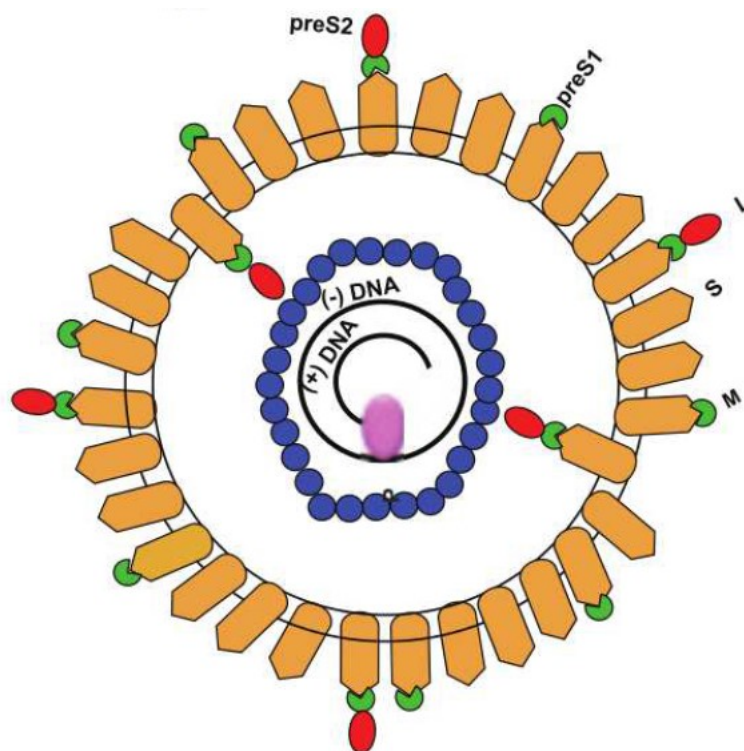
# INTRODUZIONE

## 1. Biologia del virus dell'epatite B dell'uomo (HBV)

### 1.1 Morfologia del virione

Il virus dell'Epatite B (HBV) è il prototipo di una famiglia di virus, in costante aumento, chiamata Hepadnaviridae [1]. Sono una famiglia di virus a DNA con spiccato epatotropismo e uno spettro d'ospite molto ampio, comprendente mammiferi (incluso l'uomo) e volatili [2].

La forma infettiva di HBV è un virione sferico con diametro variabile compreso tra 42 e 47 nm, conosciuto come particella di Dane. È costituito da un doppio involucro racchiudente il genoma (Figura 1A).



**Figura 1A.** Rappresentazione schematica della struttura del virione di HBV. (Ezzikouri S et al., 2014).

L'**envelope** deriva dalla cellula ospite ed è formato da un doppio strato di fosfolipidi; contiene 3 differenti proteine di superficie, denominate *small* (SHBsAg), *medium* (MHBsAg) e *large* (LHBsAg), composte da tre determinanti antigenici distinti, denominati S, pre-S2 e pre-S1.

Le proteine di superficie sono proteine transmembrana di tipo II glicosilate, organizzate in multimeri stabilizzati da ponti disolfuro tra i residui di cisteina presenti nel dominio S [3,4].

Le proteine di superficie di HBV non sono solo incorporate negli involucri dei virioni. Infatti, gemmano anche in modo molto efficiente da membrane pre-Golgi intracellulari, senza l'avvolgimento del capsido [5,6], e come particelle sferiche o filamentose vengono rilasciate dalla cellula per secrezione. Le particelle subvirali sono altamente sovraesposte rispetto ai virioni e raggiungono una concentrazione nel siero 10.000 volte maggiore. Si presume che l'enorme sovrapproduzione di HBsAg influenzi il sistema immunitario dell'ospite in modo vantaggioso per il virus.

L'espressione ricombinante della proteina S (ad es. nel lievito) produce particelle di HBsAg intracellulari di 20-nm altamente immunogeniche che possono essere utilizzate come vaccino attivo contro l'epatite B [7]

L'involucro interno è rappresentato dal **nucleocapside**, che presenta una struttura icosaedrica elettrondensa del diametro di 28 nm, costituito da circa 180 molecole di proteina core (HBcAg; Hepatitis B Core Antigen). All'interno del nucleocapside è contenuta una singola copia di DNA genomico, circolare a doppio filamento incompleto, ad un'estremità del quale si trova legata la polimerasi virale che ha anche attività di trascrittasi inversa. Il guscio del capsido contiene pori con un diametro compreso tra 12 Å e 15 Å, che consentono la diffusione di nucleotidi all'interno e all'esterno del lume durante la sintesi del genoma del DNA virale. L'assemblaggio di capsidi HBV può essere bloccato da composti a basso peso molecolare, che potrebbero offrire nuove opzioni per i trattamenti antivirali in futuro [8-11].

## 1.2 Organizzazione genomica

Il genoma è rappresentato da una molecola di DNA circolare parzialmente bicatenario con una catena più lunga L (-) della lunghezza di 3200 nt e una catena più corta S (+) di lunghezza variabile da 1700 a 2800 nt (Figura 1B).

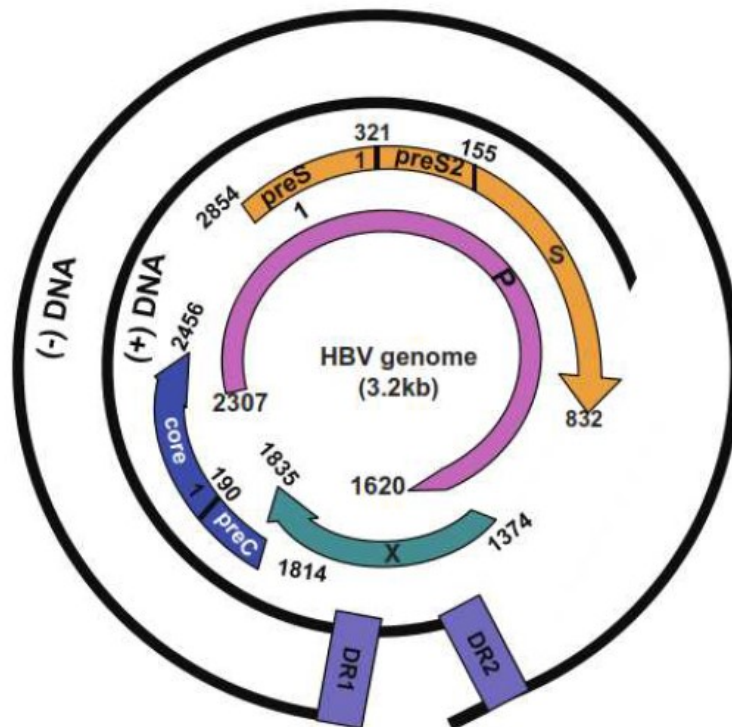


Figura 1B. Organizzazione del genoma di HBV. (Ezzikouri S et al., 2014).

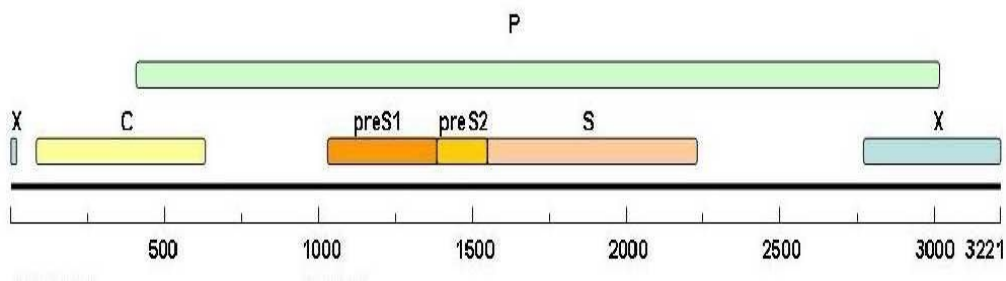
Nella catena L- sono stati identificati quattro geni codificanti, organizzati in quattro ORFs (open reading frame) parzialmente sovrapposti:

**-ORF E (regioni pre-S1, pre-S2 ed S):** possiede tre start per la traduzione e codifica le tre proteine dell'envelope; è sovrapposto all'ORF della polimerasi;

-**ORF C (gene pre-Core/Core)** codifica le proteine del nucleocapside (HBcAg) e l'antigene secretorio HBeAg; è parzialmente sovrapposto all'ORF della polimerasi e all'ORF della X;

-**ORF P (gene P)** codifica la DNA polimerasi/trascrittasi inversa ed essendo il più lungo dei quattro ORF risulta sovrapposto parzialmente agli altri tre;

-**ORF X (gene X)** codifica la proteina X, con funzione verosimilmente regolatrice della replicazione virale, sovrapposto all'ORF C e ORF P.

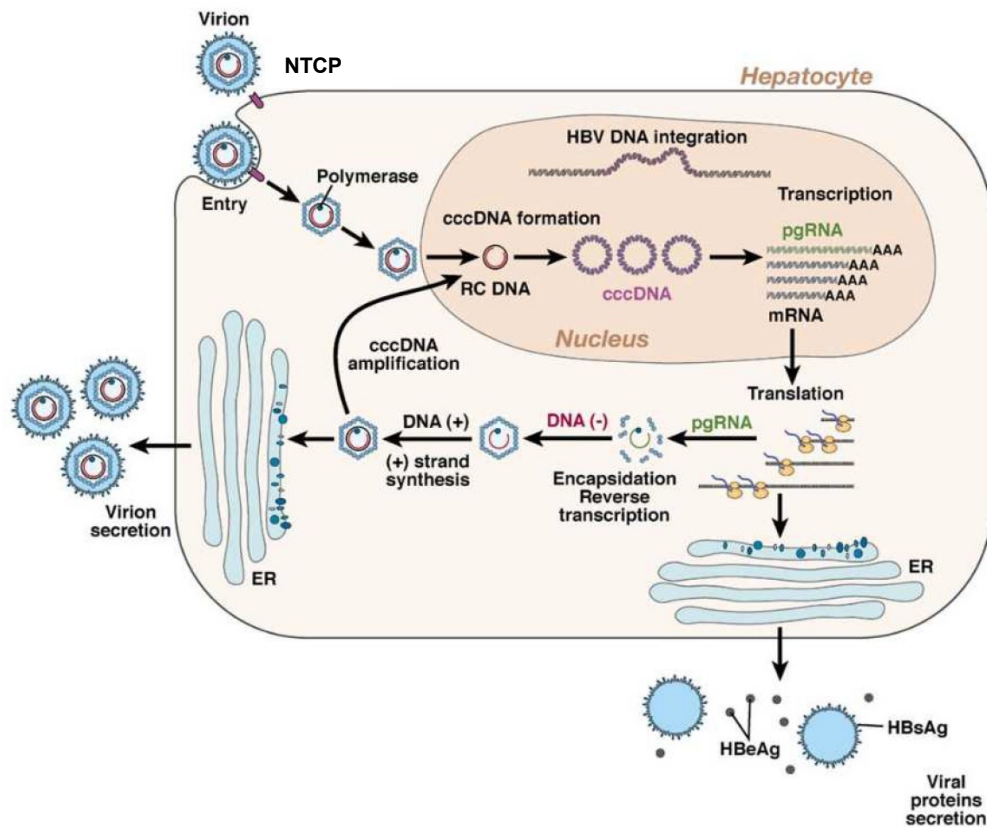


**Figura 2.** Rappresentazione genomica linearizzata dell'HBV DNA

Il genoma dell'HBV presenta un tasso di mutazioni tra  $1^{10}$  e  $3^{10}$  per sito/anno a causa della mancata attività di *proof-reading* della polimerasi virale. In modo casuale, si possono quindi selezionare mutazioni che conferiscono un vantaggio replicativo al virus o un vantaggio mimetico rispetto all'ospite [12].

## 2. Ciclo replicativo

La replicazione virale necessita dell'interazione virus-ospite ed è caratterizzata da una cascata di processi specifici e consequenziali, i primi dei quali riguardano l'adesione del virione sull'epatocita e il conseguente ingresso all'interno della cellula. Solo negli ultimi tempi sono stati meglio compresi i meccanismi che regolano l'adesione, il riconoscimento e l'internalizzazione virale (Figura 3).



**Figura 3.** Rappresentazione del ciclo biologico del virus HBV nell'ospite (Zoulim F e Locarnini S, 2009)

L'HBV, pur essendo un virus a DNA, replica come un retrovirus attraverso la trascrizione inversa di un intermedio a RNA, detto RNA pre-genomico. Subito dopo l'infezione e l'esposizione del genoma, il DNA virale viene trasferito nel nucleo, dove enzimi cellulari operano la conversione del rcDNA (relax circular) virale in DNA completamente bicatenario e superspiralizzato (cccDNA, covalently closed circular DNA) tramite la sintesi della parte mancante dell'elica S (+). Poiché il

cccDNA rappresenta lo stampo per la trascrizione dell'RNA pregenomico, la sua formazione indica l'inizio di infezione.

A questo punto l'RNA-polimerasi II cellulare inizia la trascrizione del cccDNA con la formazione di due classi di RNA rappresentate rispettivamente da una serie di RNA messaggeri sub-genomici e da una serie di molecole di RNA (+) pre-genomici in cui è trascritta l'intera sequenza della catena polinucleotidica completa (-) del genoma del virus infettante.

Gli RNA messaggeri e gli RNA pre-genomici sono quindi trasferiti nel citoplasma. La traduzione degli RNA messaggeri sub-genomici porta alla produzione delle proteine virali che verranno inserite nell'involucro pericapsidico e della proteina X.

Gli RNA pre-genomici, invece, sono bifunzionali poiché rappresentano sia i messaggeri per la produzione delle proteine del capsido (core) e della polimerasi, sia gli stampi per la sintesi del DNA della progenie virale.

Dopo la sintesi delle proteine tradotte dagli RNA pre-genomici, questi ultimi vengono encapsidati dalle proteine del core in una struttura che prende il nome di provirione, al cui interno vengono retrotrascritti in DNA, ad opera della DNA-polimerasi RNA-dipendente (trascrittasi inversa) virus specifica.

La polimerasi virale opera, a questo punto, la rimozione dello stampo di RNA pregenomico e la successiva sintesi (parziale) della catena complementare di DNA (attività di polimerasi DNA-dipendente). La sintesi del filamento S (+) non sarà completata a causa di proteine del nucleocapside che si legano all'elica L (-); quindi il genoma virale della progenie sarà circolare, rilassato e parzialmente bicatenario [13].

Il provirione, a questo punto, è un virione definitivamente formato nelle sue strutture essenziali, che acquisisce l'involucro pericapsidico dalle membrane del reticolo endoplasmatico in cui sono inserite le glicoproteine virali di superficie e, seguendo il pathway secretorio, è liberato all'esterno della cellula [14].

Un aspetto caratteristico della replicazione degli *hepadnavirus* è rappresentato dal fatto che alcuni virioni, una volta completata la sintesi del genoma, anziché essere avviati all'acquisizione dell'involucro pericapsidico e all'esportazione all'esterno della cellula, vengono riciclati nel nucleo cellulare dove il genoma virale viene

ulteriormente trascritto, con l'innesco di un ulteriore ciclo replicativo. Questo meccanismo consente una notevole amplificazione della quantità di progenie virale prodotta da una singola cellula, e spiega la presenza di antigeni virali nel nucleo delle cellule infette. Dopo la penetrazione nella cellula ospite, quindi, l'HBV DNA esiste in due stati: libero, che rappresenta la forma intermedia di replicazione, o integrato nel genoma cellulare sotto forma di cccDNA.

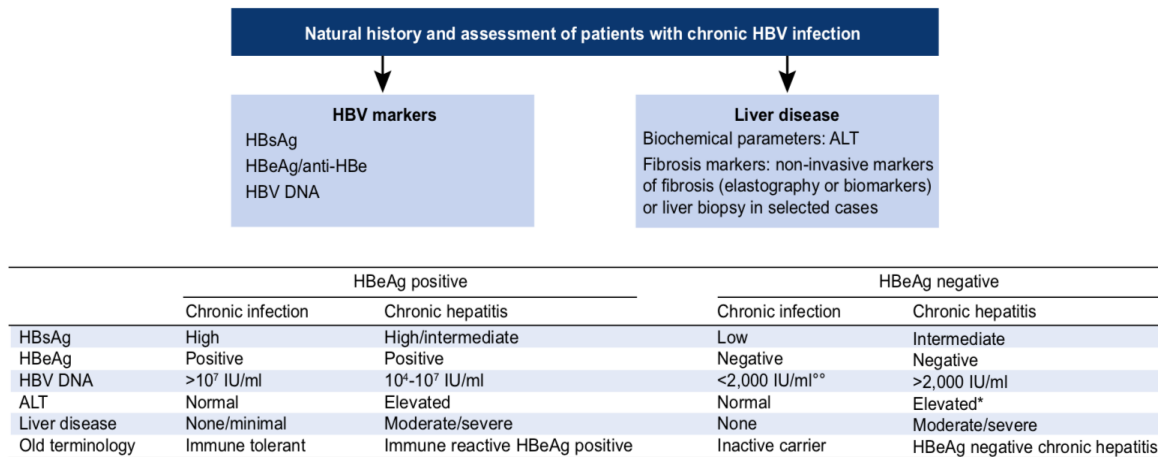
Nelle infezioni naturali da HBV un singolo epatocita nel fegato rilascia da 1 a 10 virus al giorno [15].

### 3. Storia Naturale dell'Infezione

La storia naturale dell'infezione da HBV prevede un ampio spettro di forme cliniche, la cui evoluzione è influenzata da diversi fattori, quali l'età di acquisizione dell'infezione, il livello di replicazione virale e lo stato immunitario del soggetto. L'età al momento del contatto con il virus sembra essere il più importante determinante per la cronicizzazione dell'infezione [16]. Infatti, mentre l'infezione acquisita in età adulta decorre in modo prevalentemente asintomatico ed esita, nel 95% dei casi, nella completa guarigione con *clearance* del virus, l'esposizione al virus in età infantile è associata a tassi molto più elevati di cronicizzazione. La percentuale di cronicizzazione è tanto maggiore quanto più precoce è l'infezione: si attesta intorno al 90-95% in soggetti che hanno contratto il virus in epoca perinatale, decresce fino al 25-30% in pazienti infettati entro il 5° anno di vita, per arrivare al 5-10% di probabilità di cronicizzazione nell'adulto, in cui prevale nettamente l'infezione autolimitante [16].

L'infezione cronica da HBV è un processo dinamico che riflette l'interazione tra virus e risposta immunitaria dell'ospite. La storia naturale dell'infezione cronica da HBV è stata schematicamente suddivisa in cinque fasi, tenendo conto della presenza di HBeAg, dei livelli di HBV-DNA, dei livelli di transaminasi (ALT) e della presenza/assenza di infiammazione epatica (**Figura 4**). La nuova nomenclatura si basa sulla descrizione delle due principali caratteristiche della cronicità, ovvero la presenza di infezione o di epatite (**Figura 5**) [17]. Tuttavia, nonostante questa

nomenclatura, non è sempre possibile una classificazione immediata di una delle fasi.



**Figura 4.** Storia naturale e valutazione dei pazienti con infezione cronica da HBV sulla base dei marcatori biochimici e siero-virologici di HBV. [17]

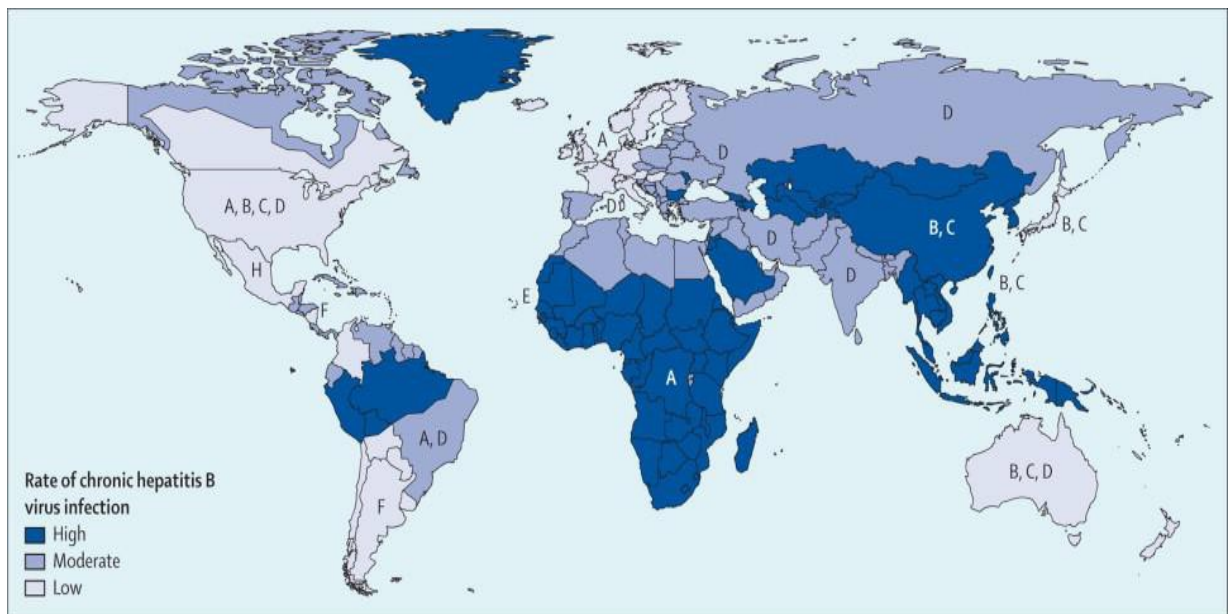
PHASE	1	2	3	4	5
<b>New Terminology</b>	HBeAg positive Chronic infection	HBeAg positive Chronic hepatitis	HBeAg negative Chronic infection	HBeAg negative Chronic hepatitis	Resolved HBV infection
<b>Old Terminology</b>	Immune tolerant	HBeAg positive CHB	Inactive carrier	HBeAg negative CHB	HBsAg negative / anti- Hbcore positive
<b>HBsAg</b>	High	High / Intermediate	Low	Intermediate	Negative
<b>HBeAg</b>	Positive	Positive	Negative	Negative	Negative
<b>HBV DNA</b>	> 10 <sup>7</sup> IU/ml	10 <sup>4</sup> - 10 <sup>7</sup> IU/ml	< 2000 IU/ml	> 2000 IU/ml	< 10 IU/ml
<b>ALT</b>	Normal	Elevated	Normal	Elevated	Normal
<b>Liver disease</b>	None/ minimal	Moderate/ severe	None	Moderate/ severe	None
<b>Disease progression</b>	Low	Moderate to high	No, very low	Moderate to high	None
<b>Treatment</b>	Not indicated	Indicated	Not indicated	Indicated	Not indicated but prophylaxis for selected cases

**Figura 5.** Nuova classificazione delle fasi dell'infezione da HBV (a paragone della precedente) e indicazioni terapeutiche, secondo le recenti "EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection".

#### **4. Epidemiologia e modalità di trasmissione**

Si stima che, a livello mondiale, i soggetti con infezione pregressa o in atto da HBV ammontino circa a due miliardi e che il numero di portatori cronici sia compreso tra 250 e 300 milioni: di questi, circa 500 mila vanno incontro a morte ogni anno per le conseguenze dell'infezione. La presenza di soggetti portatori di HBsAg, il marcatore di infezione in atto da HBV, varia a seconda delle aree geografiche. Le regioni a elevata endemia (maggiore dell'8%, e fino al 20%, di portatori nella popolazione) includono l'Africa subsahariana, l'Alaska, parte dell'Europa Orientale e dell'estremo Oriente. Le aree identificate a media endemia (2-7% di portatori) includono l'Asia centrale, l'Europa orientale, l'America latina; sono considerati a bassa endemia (meno del 2% di portatori) gli Stati Uniti, l'Europa Settentrionale e Occidentale (l'Italia compresa), l'Australia e la Nuova Zelanda.

I soggetti con infezione cronica rappresentano il principale serbatoio per il virus. HBV è presente nel sangue e in diversi liquidi biologici (in ordine di importanza liquido seminale, secrezioni vaginali, latte materno, saliva) dei soggetti infetti. Va tenuto presente che HBV può persistere a lungo nell'ambiente esterno, e che pertanto oggetti contaminati possono mantenersi a lungo infettanti. Attualmente l'infezione da HBV può essere considerata, soprattutto nelle aree a bassa endemia, una malattia a trasmissione prevalentemente sessuale. I rapporti sessuali non protetti rappresentano nei paesi occidentali la più comune via di trasmissione. La trasmissione verticale costituisce tuttora una frequente modalità di infezione nelle zone endemiche, laddove una quota significativa di donne gravide è portatrice di HBV con livelli di viremia elevata. Benché il virus sia presente nel latte delle donne infette, l'allattamento al seno non costituisce un rischio di trasmissione nei neonati correttamente immunizzati. Nelle aree iperendemiche, soprattutto tra i bambini, il virus dell'epatite B può essere occasionalmente trasmesso attraverso contatti stretti, che ne permettono il passaggio da lesioni cutanee di un soggetto infetto alle mucose di un altro individuo. [18]



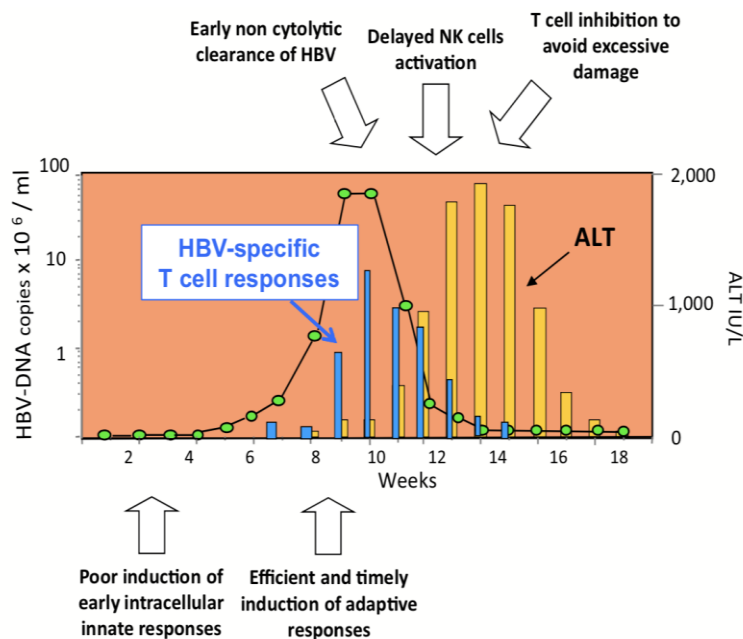
**Figura 6.** Mappa della prevalenza dell'infezione da HBV nel mondo. I differenti colori evidenziano le aree geografiche ad alta, intermedia e bassa (Christian Trépo, Henry L Y Chan, Anna Lok - Hepatitis B virus infection - Lancet 2014).

## 5. Immunopatogenesi dell'Infezione da Virus dell'Epatite B

In corso di infezione da HBV il danno epatocellulare è prevalentemente determinato dalla risposta immunitaria dell'organismo ospite, la quale spesso provoca la distruzione delle cellule infettate. Affinché l'organismo riesca a controllare l'infezione da HBV, è necessaria un'azione combinata tra la risposta immunitaria innata e acquisita, anche se i meccanismi che portano alla totale *clearance* virale o alla cronicizzazione della patologia sono per lo più ancora poco compresi [19]. Il ruolo della risposta immunitaria innata durante l'infezione da virus dell'epatite B è tuttora oggetto di dibattito. La conoscenza dei meccanismi immunitari innati anti-HBV è ostacolata da limitazioni di tipo tecnico, come la difficoltà di reclutare pazienti nella fase pre-sintomatica dell'infezione acuta e la scarsità di modelli animali e linee cellulari adatti all'infezione e alla replicazione di HBV [20].

Studi eseguiti *in vivo* nei modelli animali di scimpanzé e *woodchuck* hanno indicato una debole attivazione della risposta immunitaria intracellulare durante la fase precoce dell'infezione da virus dell'epatite B, il quale sembra essere debolmente percepito dall'immunità innata. Altri studi hanno dimostrato, al contrario, l'attivazione dell'espressione intraepatica di geni coinvolti nella risposta immunitaria innata subito dopo l'infezione nel modello del *woodchuck*; tale risposta risulta essere tuttavia transitoria e stimolata da inoculi ad elevata concentrazione virale [21]. Uno dei primi eventi attraverso cui la risposta immunitaria innata dell'ospite contrasta il virus consiste nel rilascio di interferoni di tipo I (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ) da parte degli epatociti. IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  promuovono il reclutamento e l'attivazione di cellule presentanti l'antigene come le cellule di Kupffer (macrofagi residenti nel fegato) e le cellule dendritiche, le quali, dopo essere state attivate, reclutano cellule NK e macrofagi, che giocano un ruolo importante nella risposta immunitaria iniziale contro il virus [19].

HBV ha sviluppato molteplici strategie per evadere queste prime linee difensive messe in campo dall'organismo ospite: l'utilizzo di templati di DNA virale localizzati nel nucleo delle cellule infette (cccDNA); la protezione dei genomi di nuova sintesi in capsidi virali allocati nel citoplasma degli epatociti; il blocco dell'attività dell'interferone di tipo I mediante inibizione dell'espressione dei TLRs e delle risposte effettrici mediati da questi ultimi [20,21].



**Figura 7.** sequenza di eventi immunologici che si verificano dal momento dell'infezione nell'infezione acuta auto-limitata acquisita nella vita adulta. Nonostante una scarsa induzione delle risposte intracellulari innate da parte di HBV, le cellule T HBV-specifiche vengono efficacemente e tempestivamente attivate immediatamente dopo la replicazione attiva del virus, che generalmente segue di alcune settimane il tempo dell'infezione. Queste risposte sono essenziali per l'iniziale clearance non citolitica di HBV. In contrasto con l'induzione tempestiva delle risposte delle cellule T, l'attivazione delle cellule NK sembra essere ritardata perché è stato riportato che il picco della frequenza e della funzione delle cellule NK segue il picco della viremia. Le cellule T HBV-specifiche sembrano essere altamente attivate ma quasi totalmente incapaci di secernere citochine antivirali e di svolgere attività citolitica al momento del picco di ALT. Questa inibizione delle cellule T è ritenuta un meccanismo protettivo per evitare un'eccessiva patologia immuno-mediata ed è principalmente sostenuta da fattori solubili come l'arginasi rilasciata dalle cellule del fegato necrotiche.

Anche la risposta immunitaria umorale interviene nel controllo dell'infezione, attraverso la sintesi di anticorpi specifici contro gli antigeni virali per la neutralizzazione di particelle virali solubili.

Si ritiene che l'efficienza della risposta immunitaria acquisita cellulo-mediata giochi un ruolo fondamentale nell'indirizzare l'evoluzione dell'infezione acuta verso la risoluzione oppure verso la cronicizzazione [21]. Questo tipo di risposta si basa sull'attività delle due popolazioni di linfociti T, CD4 e CD8, e inizia dopo circa 1-2 settimane dall'esordio della replicazione virale di HBV. Studi eseguiti sul modello

murino e in scimpanzé hanno dimostrato come la popolazione linfocitaria CD4 svolga un ruolo centrale per l'attivazione e, soprattutto, per il mantenimento dei linfociti T CD8 e dei linfociti B virus-specifici [22]. I linfociti T CD4 rappresentano anche i maggiori produttori di IL-2 e IL-21, citochine che influenzano il differenziamento dei linfociti T CD8 [23].

I linfociti T CD8 giocano un ruolo chiave durante la risoluzione dell'infezione da HBV; infatti, la deplezione di queste cellule nel modello animale, dimostra l'impossibilità di andare incontro alla *clearance* virale. I linfociti T CD8 possono intervenire sia attraverso un meccanismo citotossico, che promuove la lisi diretta degli epatociti infettati, sia attraverso un meccanismo non citotossico, basato sul rilascio di citochine, soprattutto IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  [24,25]. Queste citochine rappresentano i mediatori per il reclutamento di altre cellule effettrici, come macrofagi e neutrofili; inoltre possono inibire l'espressione dei geni virali negli epatociti infettati senza determinare lisi cellulare, contrastando così il virus localizzato all'interno delle cellule limitando il danno epatico [26].

I pazienti che tendono a guarire spontaneamente in seguito ad infezione acuta da HBV presentano tipicamente una risposta T CD4 e CD8 tempestiva, vigorosa e multispecifica, ossia capace di riconoscere molteplici epitopi antigenici del virus; ciò garantisce un efficiente riconoscimento degli epatociti infettati e diminuisce la probabilità che HBV possa evadere il controllo linfocitario [26,27].

Tuttavia, la risoluzione dell'infezione non implica la completa eradicazione del virus, ma piuttosto riflette la capacità del sistema immunitario, in particolare dei linfociti CD4 e CD8, di sostenere un controllo persistente e stringente sulla replicazione di HBV. Nei pazienti che vanno incontro a cronicizzazione dell'infezione si osservano risposte T linfocitarie tardive, meno intense e transitorie.

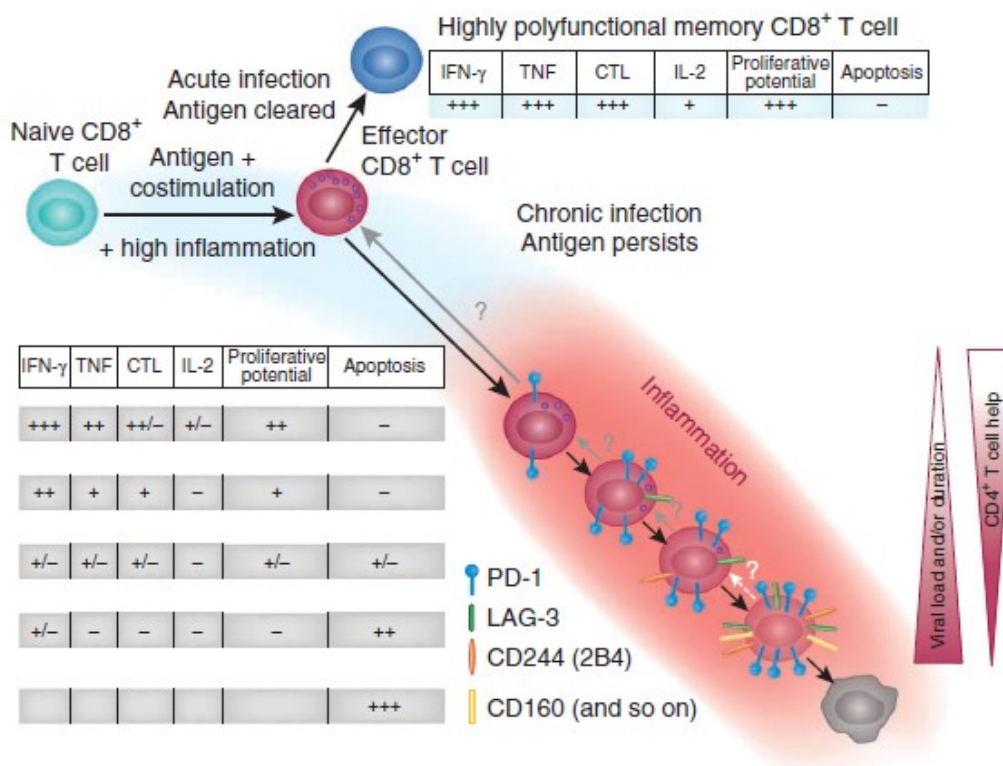
I pazienti con epatite cronica sono caratterizzati da elevati livelli di replicazione virale e da un progressivo declino dell'immunità acquisita associata a basse frequenze di linfociti T HBV-specifici nel sangue periferico e nell'ambiente intraepatico e ad una ridotta produzione di anticorpi virus-specifici neutralizzanti. La persistenza di HBV è generalmente accompagnata da un'alterata maturazione e differenziazione dei linfociti T e a deboli risposte T linfocitarie CD4 e CD8 virus-specifiche. L'esposizione prolungata di queste cellule ad alte dosi di antigeni virali (HBeAg e HBsAg) sembra

essere una delle cause principali della perdita progressiva di funzionalità dei linfociti T virus-specifici durante l'infezione cronica da HBV, processo noto come *exhaustion*. Queste cellule esprimono alti livelli di recettori capaci di attivare vie di segnalazione inibitorie, come PD1, TIM3, CTLA4 e 2B4 [27,28,29]. Nel caso specifico del recettore co-inibitorio PD1, questo sembra svolgere un ruolo cruciale nel fenomeno dell'*exhaustion*, risultando costantemente espresso non solo nei linfociti virus-specifici circolanti di pazienti con epatite cronica, ma anche nei linfociti T HBV-specifici intraepatici, nei quali presenta livelli di espressione maggiori, testimoniando l'esistenza di un profondo stato di *exhaustion* intraepatico. Oltre alle molecole inibitorie, anche alcune citochine ad azione soppressiva sembrano influenzare il fenomeno dell'*exhaustion*, come TGF- $\beta$  e IL-10, la cui espressione aumenta in caso di persistenza virale contribuendo alla disfunzione T linfocitaria [21]. I linfociti T *exhausted* mostrano un assetto trascrizionale differente rispetto a quello delle cellule T effettrici o di memoria, che mantengono la loro funzionalità antivirale, come è stato ampiamente dimostrato attraverso studi condotti su modelli animali: in particolare i fattori di trascrizione Blimp-1 e T-bet svolgono un ruolo centrale nell'*exhaustion* dei linfociti T CD8. L'espressione di Blimp-1 aumenta durante l'infezione cronica e ciò provoca *up*-regolazione di molti recettori inibitori. T-bet, al contrario, inibisce l'espressione dei recettori inibitori e promuove il differenziamento cellulare; la persistente stimolazione da parte degli antigeni virali provoca la *down*-regolazione di T-bet [29].

Il fenomeno dell'*exhaustion* si realizza in modo gerarchico (Figura 8), attraverso diversi gradi di esaurimento funzionale che accompagnano la progressiva perdita di funzionalità dei linfociti T all'aumentare della carica antigenica virale a cui queste cellule sono esposte [28]. Le fasi sono così definite:

- *Partial Exhaustion I*: tipica delle fasi precoci delle infezioni croniche o quando i valori di antigene non risultano elevati; le cellule T CD8 perdono la capacità di produrre IL-2, di effettuare killing *ex vivo* e di proliferare;
- *Partial Exhaustion II*: si manifesta quando le funzioni più resistenti, come la produzione di IFN- $\gamma$ , vanno incontro ad inibizione; vi è anche una mancata produzione di TNF- $\alpha$  e IL-2;

- *Full Exhaustion*: prevede la perdita di tutte le funzioni effettrici dei linfociti T CD8 e si verifica quando la carica antigenica virale raggiunge livelli molto elevati e/o quando l'attività dei linfociti T CD4 è compromessa;
- *Deletion*: rappresenta la fase finale del processo di *exhaustion*, e prevede l'eliminazione fisica mediante apoptosi della cellula T virus-specifica.



**Figura 8. Progressione gerarchica del fenomeno dell'”exhaustion” T linfocitario durante l’infezione cronica da HBV.** Differenza di potenziale antivirale tra una cellula effettrice “sana” e una in via di “exhaustion”, in base a parametri quali la produzione di citochine, la capacità citotossica ex vivo, il potenziale proliferativo e l’apoptosi. Le prime capacità perse dal linfocita in via di esaurimento sono la produzione di IL-2 e la capacità di proliferare; con la progressione dell’esaurimento vengono via via perse tutte le altre funzioni del linfocita T, fino ad arrivare all’apoptosi [71].

## 6. Terapia

La terapia dell'epatite da virus B è tornata di grande attualità sia perché il profilo epidemiologico dell'infezione da HBV si è fortemente modificato negli ultimi decenni nel nostro Paese, a causa dell'aumento di nuove infezioni soprattutto legate a trasmissione sessuale, sia perché i farmaci disponibili presentano un'efficacia curativa parziale, costringendo il paziente, in un'alta percentuale di casi, ad assumere terapie prolungate, che possono durare tutta la vita [17]. Attualmente si dispone di due categorie di farmaci approvati dall'*Agenzia Italiana del Farmaco* (AIFA) per il trattamento dell'epatite cronica da HBV: interferone alfa peghilato (PEG-IFN-alpha) in monoterapia con regime a durata limitata e somministrazione a lungo termine di analoghi nucleos(t)idici (NUC), quali lamivudina, telbivudina, adefovir, entecavir, e tenofovir [30].

Con i farmaci disponibili sono possibili al momento due tipi di approcci:

- **trattamento curativo** che ha come obiettivo quello di ottenere la guarigione tramite il raggiungimento di un controllo stabile dell'infezione attraverso un ciclo terapeutico a tempo determinato. Solitamente si effettua terapia con IFN, dotato sia di attività antivirale che immunomodulante [31,32], che permette di modificare l'equilibrio fra virus e ospite a favore del sistema immune;
- **trattamento soppressivo** che mira a sopprimere il processo replicativo virale e il processo necroinfiammatorio epatico bloccando la progressione della malattia; è attuabile con la somministrazione, a tempo indeterminato, degli inibitori della polimerasi virale.

### 6.1 Interferone

Gli interferoni sono una famiglia di citochine che presentano un'azione antivirale, antiproliferativa e immunomodulante e possono essere divise in tre specie: interferone-alfa, beta e gamma [33].

L'interferone alfa è costituito da una classe di proteine poco glicosilate, codificate nell'uomo da almeno 24 geni situati sul cromosoma 9. In base al grado di omologia,

questi geni possono essere distinti in due gruppi di 18 e 6 loci che codificano rispettivamente per proteine dette alfa I o alfa II. Almeno 9 di questi geni (4 per l'alfa I e 5 per l'alfa II) sono considerati non funzionali (pseudogeni); il peso molecolare varia da 10 a 24 KDa. L'interferone alfa è stabile a pH 2 e viene prevalentemente prodotto dai linfociti B, cellule dendritiche circolanti e monociti. È possibile ottenere IFN alfa non soltanto per produzione naturale (IFN-alfa linfoblastoide e IFN-alfa leucocitario), ma anche attraverso la tecnologia del DNA ricombinante: IFN-alfa-2a e IFN-alfa-2b [34].

L'interferone beta è una proteina glicosilata codificata da un solo gene situato nel cromosoma 9 in posizione adiacente a quelli per l'interferone alfa, con i quali condivide un certo grado di omologia (40-50%). Il peso molecolare è di circa 20 KDa, è stabile a pH 2 ed è prodotto da cellule fibro-epiteliali stimolate da acidi nucleici esogeni [34].

L'interferone gamma è una glicoproteina con peso molecolare di 45 KDa, costituita da due monomeri di circa 20 KDa. È instabile a pH acido, ed è stato identificato un solo gene, situato nel cromosoma 12, che non presenta omologia con quelli per l'interferone alfa e beta. È prodotto da linfociti T stimolati da antigeni, mitogeni, agenti ossidanti o ionofori per il calcio [34].

Il trattamento terapeutico con IFN-alfa, in particolare, è in uso fin dal 1986 ed il rationale per l'utilizzo di questa sostanza deriva dal fatto che possiede effetti sia antivirali che immunomodulanti, stimolando l'attività dei linfociti *T* e causando una maturazione dei linfociti B [35]. L'IFN-alfa ha costituito per molti anni il farmaco principale per il trattamento dell'epatite cronica da virus B, ma di recente è stata dimostrata una maggior efficacia dell'interferone peghilato il quale garantisce un costante ed elevato livello del farmaco nel sangue grazie al suo legame con il poli-etilenglicole. L'azione antivirale dell'interferone non si esercita direttamente sul virus bensì sulle cellule infettate ed è dovuta all'induzione di enzimi (oligoadenilato-sintetasi, proteinchinasi, fosfodiesterasi), inibenti la produzione di diverse proteine cellulari che svolgono azioni differenti [36]. La oligoadenilato-sintetasi è un enzima che in presenza di RNA bicatenario sintetizza oligomeri adenilici capaci di attivare una ribonucleasi, già presente in forma inattiva nella cellula, che provoca a sua volta depolimerizzazione dell'RNA virale; la proteinchinasi rende inattivo, fosforilandolo, il

fattore di inizio della sintesi proteica IF-2, impedendo così la formazione del complesso ternario 40S necessario per la traduzione degli RNA messaggeri. In virtù di questa azione antivirale aspecifica, gli interferoni vanno considerati agenti antivirali ad ampio spettro, tanto sugli agenti a RNA, quanto su quelli a DNA. Oltre all'effetto antivirale, gli interferoni hanno altre proprietà biologiche: inducono la sintesi di numerose proteine, alcune delle quali hanno un ruolo decisivo nei meccanismi di immunoregolazione come gli antigeni HLA, la proteina Mx (inibente i processi di trascrizione), la  $\beta$ 2-microglobulina e il recettore per il TNF (*Tumor Necrosis Factor*). Gli effetti collaterali non sono trascurabili e risultano strettamente correlati alle dosi somministrate.

L'obiettivo di questo trattamento è quello di portare l'epatite cronica attiva ad una forma inattiva (fase di portatore inattivo) attraverso la soppressione della replicazione virale. L'Interferone peghilato viene somministrato attraverso iniezione sottocutanea a cadenza settimanale per dodici mesi; tale trattamento presenta pertanto una durata limitata nel tempo, è caratterizzato da una bassa frequenza di sviluppo di resistenza farmacologica e risulta efficace anche nell'induzione della sierconversione nei pazienti con epatite cronica HBeAg positiva (30% ogni anno).

Per contro, la frequenza degli effetti collaterali sviluppati dal farmaco è alta e vi è controindicazione assoluta in caso di cirrosi scompensata, riacutizzazione dell'epatite e in gravidanza e allattamento. Il trattamento con PEG-IFN-alfa risulta efficace in una percentuale limitata di pazienti: solo il 12% dei soggetti trattati ottiene la negativizzazione dell'HBsAg e lo sviluppo di anticorpi anti-HBs entro 5 anni dalla sospensione del farmaco [37].

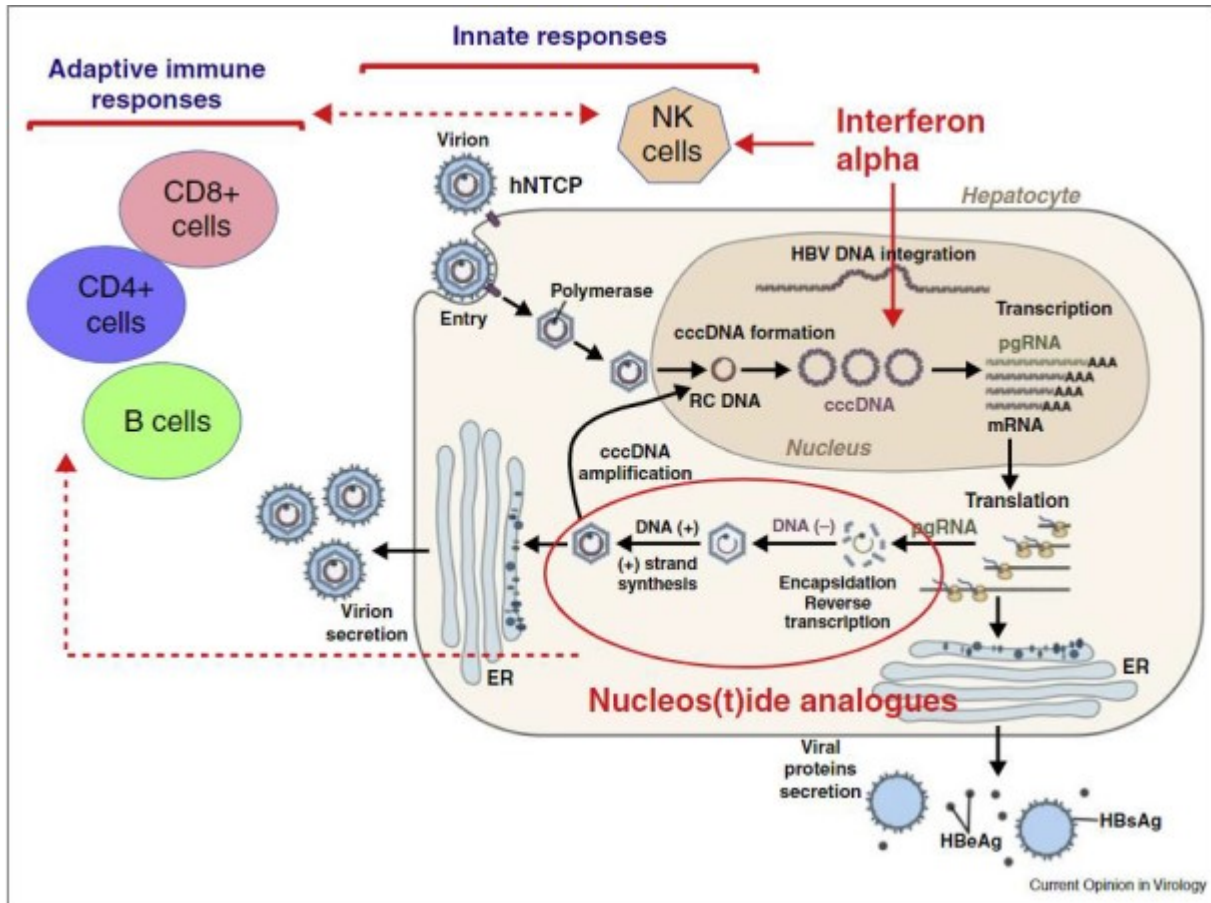
## **6.2 Analoghi Nucleos(t)idici**

Gli analoghi nucleos(t)idici (NUC) di più recente introduzione (tenofovir, entecavir) competono infatti con il substrato naturale della polimerasi virale (deossiadenosina trifosfato dATP), inibendo l'attività di trascrittasi inversa e la replicazione virale [38]. I NUC sono indicati nelle forme di infezione cronica HBeAg negativa e come trattamento di secondo livello nei pazienti che non mostrano una risposta virologica

sostenuta ad un tentativo terapeutico con interferone. Inoltre, questa strategia farmacologica è raccomandata in tutti i pazienti con cirrosi, indipendentemente dallo stato di HBeAg, in quanto l'utilizzo del PEG-IFN-alfa potrebbe aumentare il rischio di batteriemie e di scompenso epatico. Tra gli svantaggi dei NUC va considerato il rischio di sviluppare resistenze farmacologiche, che possono diminuire la sensibilità del virus al farmaco stesso. Gli analoghi nucleos(t)idici di prima generazione, come la *lamivudina*, trovano ormai scarsa indicazione in monoterapia, in quanto dotati di bassa barriera genetica (numero di mutazioni necessarie a produrre una marcata riduzione della suscettibilità al farmaco), che porta ad uno sviluppo di resistenze fino al 70% a 5 anni [39]. Gli analoghi di terza generazione (*entecavir* e *tenofovir disoproxil fumarato*) sono invece farmaci ad elevata barriera genetica e allo stesso tempo ad elevata potenza (relazione tra concentrazione plasmatica raggiunta e intensità dell'effetto farmacologico) e presentano pertanto un'efficacia significativamente maggiore rispetto alle molecole di prima generazione sui parametri virologici, biochimici ed istologici [40]. Per questa ragione sono considerati farmaci di prima scelta da utilizzare in monoterapia nei pazienti naïve. Pur essendo efficaci nell'indurre nella pratica clinica corrente un controllo completo della replicazione virale in oltre il 90% dei pazienti, gli analoghi nucleos(t)idici determinano un calo molto lento dei livelli sierici di HBsAg, cosicché la loro somministrazione non può essere sospesa se non dopo sieroconversione anti-HBs, indicativa di un completo controllo immunitario nei confronti del virus, privo di rischi di riattivazione virale. Poiché tale evento è sempre tardivo in corso di terapia e ristretto ad una percentuale limitata di pazienti, e dato che le riattivazioni dell'epatite possono essere estremamente severe, soprattutto se la funzionalità epatica è già di base compromessa, la terapia con analoghi è destinata ad essere continuata per un tempo indeterminato in un'elevata percentuale di pazienti [17]. L'impiego dei NUC presenta alcuni vantaggi rispetto al trattamento con interferone, come una migliore maneggevolezza grazie alla somministrazione orale, la scarsa induzione di effetti collaterali, quindi con maggiore *compliance* da parte dei pazienti, sebbene la sicurezza a lungo termine di queste molecole necessiti di ulteriori studi di approfondimento [40].

Data l'efficacia antivirale degli analoghi di ultima generazione, la loro eccellente tollerabilità e la loro elevata barriera genetica, le terapie del prossimo futuro dovranno

certamente comprendere tali farmaci come “*back bone*”, ai quali associare nuove molecole, che permettano di accorciarne la somministrazione, favorendo la *clearance* di HBsAg e inducendo possibilmente l’eradicazione del virus.



**Figura 9. Schema dei principali meccanismi di azione antivirali in corsi di infezione cronica da HBV:** L’interferone alfa peghilato (PEG-IFN- $\alpha$ ) promuove l’attività mediata dalle cellule NK. In modelli sperimentali il suo effetto antivirale è stato attribuito all’inibizione della trascrizione del cccDNA virale e alla parziale eliminazione del pool di cccDNA stesso. L’azione degli analoghi nucleos(t)idici (NUC) mira invece al blocco della subunità della DNA-polimerasi con azione di trascrittasi inversa, riducendo la quantità di virus circolante. La prolungata soppressione della replicazione di HBV indotta dai NUC permette un parziale ripristino delle funzioni effettrici dei linfociti T HBV-specifici, pur non avendo alcuna azione sul cccDNA degli epatociti infettati.

Source: Zoulim F, Lebossé F, Levrero M. Current treatments for chronic hepatitis B virus infections. Current Opinion in Virology. 2016

## 6.3 Nuove strategie terapeutiche

### 6.3.1 Farmaci ad azione antivirale

Uno dei principali limiti dell'impiego degli analoghi nucleos(t)idici è la persistenza di cccDNA negli epatociti anche dopo regimi di trattamento di lunga durata [41].

Il mantenimento del pool di cccDNA durante la terapia con NUC potrebbe essere il risultato di una incompleta soppressione della replicazione di HBV, in cui sia presente una produzione di particelle virali a livelli non quantificabili con le correnti metodiche di rilevazione. Questo fenomeno innescherebbe nuovi cicli di infezione, non controllati dal trattamento, con rifornimento diretto del cccDNA intraepatico [42].

Inoltre, un'incompleta soppressione virologica concorrerebbe direttamente al mantenimento del pool di cccDNA mediante il meccanismo del "recycling" [43].

Ne consegue come il "covalently closed circular DNA" rappresenti un target importante per lo sviluppo di strategie terapeutiche che mirino a ridurre la produzione, silenziarne la trascrizione ed ottenere l'eradicazione del cccDNA stesso dalle cellule infettate [44].

#### a. Inibitori dell'entry

L'uso di farmaci che antagonizzano il legame tra HBV e il recettore NTCP sugli epatociti può potenzialmente impedire l'ingresso del virus nella cellula ospite. Il Myrcludex B, un lipopeptide derivato dalla proteina PreS1 che ha dimostrato in modelli murini efficacia nell'impedire lo stabilirsi delle infezioni da HBV e HDV [45]. In un recente studio clinico di fase 2b, in associazione al TDF, il Myrcludex B a dosi di 2, 5 e 10 mg/die ha determinato un declino di HDV-RNA >2 log alla fine del trattamento nel 46%, 47% e 77% dei pazienti rispettivamente, senza tuttavia indurre una riduzione dei valori di HBsAg [46]. Attualmente sono in fase di sviluppo anche altri farmaci che hanno come target NTCP, come i composti ciclosporina A-simili [47].

#### b. Induttori della degradazione del cccDNA

Lo sviluppo di farmaci e tecniche in grado di eliminare il pool di cccDNA presente nel fegato di pazienti con epatite B cronica potrebbe rappresentare la chiave di volta per raggiungere l'ambizioso obiettivo della *cura completa* dell'infezione da HBV [48].

È stato recentemente dimostrato che sia alcune citochine (TNF- $\alpha$  ed IFN- $\gamma$ ) che IFN $\alpha$  sono in grado di attivare le deaminasi APOBEC3A/B (*lucifora*), inducendo così la degradazione del cccDNA. A tale scopo appare interessante l'utilizzo di tecniche di editing genetico, come il sistema CRISP/Cas9, potenzialmente capaci di clivare ed eliminare il cccDNA [49]; tuttavia va ancora verificata l'effettiva specificità di queste tecniche nell'interagire esclusivamente con le componenti virali.

#### **c. Inibitori dell'assemblaggio del capsido (Core protein Allosteric modulators, CpAM)**

Finora sono state sviluppate due classi di composti in grado di interferire con la formazione del capsido virale: fenilpropenamidi e sulfamoilbenzamidi che interferiscono con l'impacchettamento del pgRNA e accelerano la formazione di capsidi immaturi vuoti, e le eteroaridildiidropirimidine che inducono creazione di capsidi aberranti [48]. Oltre a questi effetti classici, i CpAMs potrebbero virtualmente bloccare la trascrizione virale attraverso un effetto repressivo a livello epigenetico sul cccDNA della proteina core. I composti testati (JNJ-379, ABI-H0731, RO7049389) hanno dimostrato in fase 1 una significativa potenza antivirale e un buon profilo di sicurezza [50].

#### **d. Small interfering RNAs (siRNAs)**

Queste corte sequenze di ribonucleotidi sono stati disegnate per legare specifici mRNA virali ed indurre la loro degradazione. Il primo siRNA contro HBV entrato in sviluppo è stato ARC-520, che ha mostrato determinare una riduzione di HBsAg e HBV DNA in scimmie e in pazienti HBeAg-positivi, ma con minore effetto in pazienti HBeAg-negativi, probabilmente perché ARC-520 ha come bersagli i trascritti derivanti dal cccDNA, ma non quelli da DNA di HBV integrato [51]. A seguito di queste osservazioni sono state sviluppate strategie attive anche sull'HBsAg derivato da DNA integrato [52]. Strategie simili in corso di sviluppo includono oligonucleotidi antisense e destabilizzatori dell'RNA.

#### **e. Inibitori della secrezione di HBsAg: Nucleid Acid Polimers (NAPs)**

Sebbene il meccanismo d'azione non sia completamente chiarito, i NAPs sembrerebbero agire inibendo la secrezione di HBsAg, che ha un effetto inibitorio sul

sistema immunitario. In studi preclinici su modelli animali e clinici di fase 2 si sono dimostrati efficaci nei pazienti mono-infetti e nei co-infetti HBV/HDV [53]. Inoltre *in vivo* ha determinato, in associazione a TDF o ETV, una netta riduzione dei valori di cccDNA e DNA virale intraepatico, in assenza di rebound virologico dopo la sospensione [54].

### **6.3.2 Strategie immunomodulatorie innovative**

Un ulteriore approccio terapeutico per la cura funzionale di HBV è rappresentato dal potenziamento dell'immunità antivirale.

Una caratteristica peculiare dell'interazione tra sistema immunitario dell'ospite e HBV è la capacità di quest'ultimo di evadere le risposte dell'immunità innata, che risulta debole sia in corso di infezione acuta che cronica.

Per quanto concerne l'immunità adattativa è noto come pazienti che controllano la replicazione di HBV possiedono un'attivazione coordinata dell'immunità cellulo-mediata ed umorale anti-HBV, con robuste risposte T-linfocitarie multispecifiche e linfociti B in grado di secernere anticorpi neutralizzanti anti-HBs [55].

L'efficacia dell'immunità virus-specifica è stata dimostrata in pazienti con infezione cronica che, sottoposti a trapianto di midollo osseo da donatore che aveva spontaneamente risolto l'infezione da HBV (con conseguente maturazione di linfociti T virus-specifici e cellule B della memoria), riuscivano a negativizzare HBsAg [56].

Infine, grazie alle conoscenze maturate in campo oncoematologico, è dimostrato come la replicazione di HBV vada incontro a riattivazione a seguito della deplezione dei linfociti B in corso di trattamento con rituximab, suggerendo un ruolo cardine degli anticorpi anti-HBs non solo nella prevenzione, ma anche nel controllo dell'infezione stessa [57]. Il recente impiego a scopo terapeutico di anticorpi anti-HBs in modelli animali rappresenterebbe una potenziale strategia di eradicazione di infezione cronica da HBV [58].

#### **a. Agonisti dei toll-like receptors (TLRs)**

L'attivazione dell'immunità innata nei pazienti con infezione cronica da HBV può essere ottenuta non soltanto mediante la somministrazione diretta di citochine ad

azione antivirale (in primis IFN-alfa nella sua formulazione peghilata) ma anche grazie all'impiego di agonisti dei Toll-like receptor (TLR) [44].

A livello intraepatico i TLRs sono largamente espressi dalle cellule mieloidi (monociti, macrofagi, cellule dendritiche) ma, con l'eccezione di TLR1/2/3 e 4, scarsamente dagli epatociti. L'azione degli agonisti dei TLRs sembrerebbe quindi essere in buona parte mediata dall'attivazione di queste cellule immunitarie.

Il composto maggiormente caratterizzato tra questi è il GS-9620, agonista di TLR7, che agisce inducendo la produzione di IFN- $\alpha$  dalle cellule dendritiche plasmocitoidi. Nonostante l'efficacia mostrata nel modello animale, questo agente non ha prodotto effetti antivirali di nota in pazienti con infezione cronica da HBV, sia naive che trattati con NUCs, sebbene si sia evidenziata una transitoria attivazione degli ISG-15 a livello delle cellule periferiche mononucleate [59]. Un altro potenziale target di attivazione della risposta innata ha come bersaglio l'attivazione del TLR8 dei monociti intraepatici, mediante l'impiego di agonisti quali il GS-9688 [60] con la conseguente produzione di IL-12 e IL-18, in risposta a cui le cellule NK e MAIT intraepatiche sintetizzano IFN- $\gamma$  [61].

## **b. Vaccini terapeutici**

I vaccini terapeutici rappresentano un promettente approccio verso la cura funzionale di HBV: il rationale del loro utilizzo consiste nella rottura dell'immunosoppressione caratteristica dell'infezione cronica da HBV, attraverso la stimolazione di risposte linfocitarie B e T effettrici multispecifiche e polifunzionali [62]. Sebbene gli studi preclinici abbiano prodotto risultati incoraggianti, l'utilizzo dei vaccini non si è finora tradotto in un'efficacia virologica nei trials clinici fino ad oggi effettuati. Una delle ragioni potrebbe risiedere nel disegno di vaccini subottimali, che potrebbe essere superata con lo sviluppo di vaccini eterologhi *prime-boost*, che vadano a determinare risposte più simili a quelle dell'immunità naturale. Comunque, l'ostacolo principale che i vaccini terapeutici devono affrontare è costituito dall'alto carico antigenico di HBV nel paziente cronico. Ad esempio, un recente studio [63] ha mostrato come il vaccino GS-4774 in combinazione con tenofovir sia in grado di indurre un miglioramento delle risposte T linfocitarie HBV-specifiche, in assenza però di una riduzione significativa della quantità di HBsAg circolante. Ci si aspetta quindi che nuovi agenti terapeutici in grado di ridurre l'espressione di antigeni virali (come i

siRNAs e i NAPs), possano essere efficacemente utilizzati come pretrattamento in pazienti da sottoporre a vaccinazione terapeutica.

### **c. Linfociti T ingegnerizzati**

La scarsa efficacia di approcci immunoterapeutici finalizzati al potenziamento dell'immunità cellulo-mediata, nei pazienti con infezione cronica da HBV, è principalmente dovuta alle basse frequenze di linfociti T virus-specifici nel sangue periferico e nell'ambiente intraepatico. Inoltre, la persistenza di HBV è generalmente accompagnata da un'alterata maturazione e differenziazione dei linfociti T e a deboli risposte T linfocitarie CD4 e CD8 virus-specifiche [64].

Per ovviare a questo problema, analogamente a quanto avviene nel campo di ricerca onco-ematologica, cellule T autologhe possono essere ingegnerizzate ad esprimere recettori antigenici chimerici (CARs) diretti contro antigeni di HBV espressi sulla superficie degli epatociti infetti, oppure per esprimere TCRs che riconoscono epitopi di HBV presentati da cellule MHC I. Cellule T esprimenti CARs o TCRs ingegnerizzati sono state in grado di indurre effetti antivirali, sia citolitici che non-citolitici in topi con fegati umanizzati, mantenendo un profilo di sicurezza [65]. Questi risultati ottenuti nei modelli animali infondono fiducia circa la possibilità di traslare questi approcci terapeutici nell'uomo.

### **d. Inibitori dei checkpoints**

La *up-regolazione* di vari recettori inibitori (definiti anche *checkpoint* immunitari) è una caratteristica comune dell'esaurimento funzionale delle risposte T linfocitarie in corso di infezioni croniche e tumori. Pertanto, il blocco di queste vie inibitorie può rappresentare una strategia razionale per ripristinare le funzioni antivirali delle cellule T *exhausted* [66]. Mentre nella terapia oncologica l'uso di anticorpi monoclonali che interferiscono con recettori e ligandi di PD-1 ha già mostrato efficacia clinica, nel campo delle infezioni virali croniche sono ancora scarse le evidenze cliniche in tal senso. Gli studi in vitro finora condotti hanno mostrato che, sebbene il blocco della via PD1/PDL1 determini miglioramenti nella funzionalità immunitaria, questo approccio da solo determina un ripristino parziale delle risposte cellulo-mediate [67]. Di conseguenza si è cercato di agire in maniera sinergica su altri recettori, come attraverso la stimolazione simultanea di OX40 (CD134) che ha determinato un'

aumentata produzione di IFN- $\gamma$  e IL-21 da cellule T CD4 HBV-specifiche [68]. Finora è stato effettuato un trial clinico utilizzando gli inibitori dei checkpoints su 24 pazienti HBeAg-negativi in soppressione virologica, a cui è stato somministrato il nivolumab con o senza il vaccino terapeutico GS-4774. I titoli di HBsAg sono calati di 0.5 log in 3 pazienti alla settimana 24 post-trattamento e un solo paziente è riuscito a sieroconvertire l'antigene S [63]. Sebbene promettente, l'utilizzo clinico di questi composti potrebbe essere limitato dai possibili effetti avversi, correlati principalmente al rischio di possibile immuno-attivazione sistemica, che potrebbe determinare l'induzione di patologie immunomediate soprattutto di tipo autoimmune [69].

## SCOPO DELLO STUDIO

Le attuali terapie per l'epatite B sono per lo più basate sull'utilizzo degli analoghi nucleosidici che hanno effetto antivirale diretto contro HBV, ma non hanno effetti modulanti attesi sul sistema immunitario attraverso un'azione diretta. E' noto tuttavia che la terapia con analoghi riesce a potenziare le risposte anti-virali HBV-specifiche, presumibilmente attraverso meccanismi indiretti. Nella prospettiva di immunoterapie da associare agli analoghi per abbreviare il loro tempo di somministrazione ripristinando risposte immunitarie antivirali efficienti, è cruciale capire con quale meccanismo la terapia con analoghi moduli in modo indiretto le risposte immunitarie, in particolare le risposte T linfocitarie, che sono essenziali per il controllo anti-virale. I principali problemi irrisolti riguardano, oltre alla caratterizzazione del meccanismo attraverso il quale gli analoghi esprimono questo effetto immunomodulante, la durata di terapia necessaria perché gli effetti immunomodulanti vengano espressi, la definizione delle popolazioni linfocitarie più sensibili all'effetto modulante degli analoghi ed una più fine definizione delle vie metaboliche e di segnale intracellulari che la terapia è in grado di attivare. Obiettivo del presente studio è stato quindi di valutare fino a che punto l'effetto degli analoghi sia secondario al calo dell'antigenemia indotto dalla terapia, quale sia la cinetica temporale di ripristino delle risposte anti-virali, quali funzioni linfocitarie siano meglio ripristinate in corso di terapia, quali specificità antigeniche siano maggiormente inibite in corso di infezione cronica e quindi più difficili da ripristinare con la terapia a base di analoghi. Queste conoscenze potrebbero fornire la base teorica per il disegno di strategie ottimali per modulare in maniera più efficiente le risposte antivirali e ottenere un controllo più rapido e completo dell'infezione virale.

# MATERIALI E METODI

## 1. Pazienti

Lo studio è stato eseguito su una casistica di pazienti con epatite cronica da HBV, genotipo D, HBeAg negativi, mai precedentemente trattati o in trattamento con analoghi nucleos(t)idici così suddivisi:

- 18 pazienti *naive* mai precedentemente trattati
- 7 pazienti trattati con analoghi nucleosidici per 1 anno
- 28 pazienti trattati per 3 anni
- 10 pazienti con completo controllo dell'infezione (HBsAg e HBV-DNA negativi, con normali livelli di transaminasi) dopo periodi variabili di trattamento con analoghi (ameno 3 anni)

Lo studio, è stato approvato dal Comitato Etico dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma e tutti i pazienti hanno sottoscritto il consenso informato. Ciascun paziente è inoltre risultato negativo per la ricerca di anticorpi anti-HCV, anti-HDV, anti-HIV-1 e anti-HIV-2 e per gli altri *markers* di epatite virale o autoimmune.

## 2. Valutazioni virologiche e sierologiche

L'antigene di superficie dell'epatite B, l'anticorpo anti-antigene di superficie, le immunoglobuline totali e le immunoglobuline di classe M anti-antigene core dell'epatite B, l'antigene HBe, gli anticorpi anti-HDV, anti-HIV-1 e 2 sono stati determinati con kit commerciali immunoenzimatici (Laboratori Abbott, Abbott Park, IL; Ortho Clinical Diagnostic, Johnson & Johnson, Raritan, NJ; DiaSorin, Vercelli, Italia). La viremia sierica è stata determinata tramite PCR (Cobas TaqMan 48; Roche Diagnostics, Basel, Svizzera). La genotipizzazione di HBV è stata ottenuta con la determinazione di sequenze tipo-specifiche nei domini B e C del gene pol di HBV (Line Probe Assay, INNO - LiPA HBV genotyping, Innogenetics, Alpharetta, GA). HBsAg è stato quantificato con saggi disponibili in commercio (Architect; Laboratori Abbott, Abbott Park, IL).

### **3. Isolamento dei linfociti del sangue periferico**

Le cellule linfomononucleate del sangue periferico (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC) sono state isolate a partire da sangue fresco eparinato attraverso centrifugazione su gradiente di densità Ficoll-Hypaque: 20ml di sangue eparinato sono stati stratificati su 12 ml di Ficoll e centrifugati a 2200 rpm per 20 minuti. L'anello di PBMC, formatosi all'interfaccia tra Ficoll e plasma, è stato quindi raccolto e sottoposto a due lavaggi con soluzione salina di HBSS (Hank's Balanced Salt Solution). La vitalità delle cellule recuperate è stata determinata mediante colorazione vitale con Türk e conta utilizzando la camera di Neubauer. In seguito le PBMC sono state congelate in medium di congelamento (Siero Fetale Bovino-FBS 90% e Dimetilsolfossido- DMSO 10%) e crioconservate in azoto liquido fino al momento del loro utilizzo per gli esperimenti.

### **4. Espansione in vitro e valutazione delle citochine intracellulari (ICS) dei linfociti T HBV-specifici.**

Le PBMC crioconservate in azoto liquido, sono state scongelate, risospese in terreno completo (RPMI 1640 supplementato con 40 µg/ml di Gentamicina, 2.5 µg/ml di Fungizone, 0.05 mM di 2-Mercaptoetanololo, 1X NEA e 8% siero umano) e stimulate con 8 miscele di peptidi sintetici, di lunghezza pari a 15 aminoacidi e corrispondenti alla sequenza dell'intero genoma di HBV genotipo D oppure con peptidi HLA di classe I e di classe II corrispondenti a sequenze di EBV, CMV ed Influenza (ognuno alla concentrazione finale di 1 µM). Le cellule sono state incubate alla temperatura di 37°C per 10 giorni. Al terzo giorno di coltura cellulare è stata aggiunta IL-2 alla concentrazione di 50 U/ml, per supportare la proliferazione dei linfociti T.

Lo studio della produzione di citochine intracellulari è stato realizzato sui linfociti T, dopo 10 giorni di espansione in vitro. Le cellule sono state incubate in presenza o assenza di peptidi virali (alla concentrazione di 1 µM) per un'ora a 37°C. L'aggiunta del peptide virale ha la funzione di ristimolare i linfociti T virus-specifici. Successivamente sono stati aggiunti 10 µg/ml di Brefeldina-A per ulteriori 3 ore di

incubazione, al fine di bloccare la secrezione delle citochine prodotte da parte delle cellule. Al termine, le cellule stimulate con i peptidi e quelle di controllo non stimulate, accuratamente lavate con PBS 1X (Phosphate Buffered Saline), sono state colorate con gli opportuni marcatori di superficie. Le cellule sono state poi fissate e permeabilizzate (Medium A e B, Nordic MUBio) per consentire la reazione delle citochine intracellulari con gli anticorpi monoclonali anti-IFN- $\gamma$ , anti-IL-2 (BD Biosciences) e anti-TNF- $\alpha$  (Miltenyi), incubati con le cellule per 15 minuti a temperatura ambiente. Dopo opportuno lavaggio con PBS 1X, si è proceduto all'analisi mediante citometria a flusso.

## 5. ELISpot (Enzyme-Linked Immunosorbent Spot Assay)

La metodica di ELISpot (Enzyme-Linked Immunosorbent Spot Assay) è una procedura altamente sensibile e rapida per l'identificazione, la quantificazione e la caratterizzazione di cellule secernenti anticorpi e citochine; è stata utilizzata per ottenere informazioni sulla produzione di IFN- $\gamma$  in quanto la capacità secretiva osservata *ex vivo* riflette l'effettivo stato di attivazione *in vivo*. La metodica ELISpot si basa sull'incubazione delle cellule per un periodo di tempo definito, in piastra a 96 pozzetti, sul cui fondo sono stati adsorbiti anticorpi monoclonali ad alta affinità per la citochina investigata che viene prodotta durante l'incubazione. La combinazione di un anticorpo biotinilato anti-citochina e di un anticorpo secondario anti-biotina enzima-coniugato, in presenza di substrati cromogeni per l'enzima, permette la rivelazione della produzione della citochina, grazie alla formazione di spot (accumuli di colore), in aree ben definite sul fondo della piastra. Se tali aree sono discrete, ossia non sovrapposte e quantificabili, si assume che ogni spot derivi dalla produzione di citochina da parte di una singola cellula secernente; per questo, quantificando il numero di spot, si quantifica il numero di cellule secernenti IFN- $\gamma$ . Il primo giorno è stato eseguito il coating delle piastre da 96 pozzetti (Multiscreen-IP-Millipore S.A.S., Malshelm, Francia) e lasciato in incubazione *overnight* a 4 °C con anticorpo monoclonale anti-IFN- $\gamma$  in rapporto 1: 300 (Becton Dickinson). Le piastre, il giorno seguente, sono state lavate con RPMI medium 1640 contenente 10% di siero bovino fetale (FBS), in modo da eliminare l'anticorpo in eccesso e successivamente lasciate in incubazione con il medesimo terreno per 2 ore a temperatura ambiente (fase di

blocking), al fine di saturare i siti di legame aspecifici. In particolare gli esperimenti di ELISpot sono stati eseguiti utilizzando peptidi di 15 aminoacidi corrispondenti all'intera sequenza di HBV (suddivisi in regioni x, core, polimerasi ed envelope) e raggruppati in 8 miscele. Per ogni singola miscela di peptidi, in ogni pozzetto sono stati seminati  $2-4 \times 10^5$  PBMC precedentemente risospese in terreno X-VIVO™ 10 (LONZA). Le piastre sono state incubate per 18 ore a 37 ° C in presenza o in assenza di peptidi (alla concentrazione di 1  $\mu$ M). Il terzo giorno, le piastre sono state lavate e messe in incubazione per due ore a temperatura ambiente con 75  $\mu$ l di anticorpo monoclonale anti-IFN- $\gamma$  secondario biotinilato (1: 300, Becton Dickinson). Al termine dell'incubazione, le piastre sono state lavate e messe in incubazione per un'ora a temperatura ambiente con 75  $\mu$ l di Enzyme Conjugate (Streptavidin-HRP, Becton Dickinson). Al termine, le piastre sono state lavate e in ciascun pozzetto sono stati distribuiti 75  $\mu$ l di Chromogen Substrate Solution (AEC Chromogen/AEC Substrate, Becton Dickinson). Dopo 4-7 minuti, la reazione colorimetrica è stata interrotta lavando con acqua distillata. Le piastre sono state asciugate all'aria e gli spot sono stati contati usando un Elispot Reader (AID Elispot Reader System; Autoimmune Diagnostika). Le cellule che producono IFN- $\gamma$  sono state espresse come Spot Forming Cells (SFC) per  $1 \times 10^6$  PBMC. I controlli positivi consistevano in PBMC stimulate con CMV, EBV e FLU. Il saggio ELISpot è stato considerato significativamente positivo se il numero di spot nei pozzetti stimolati era di almeno 3 deviazioni standard rispetto al non stimolato e la differenza tra il numero di spot nei pozzetti stimolati e non stimolati risultava superiore a 10.

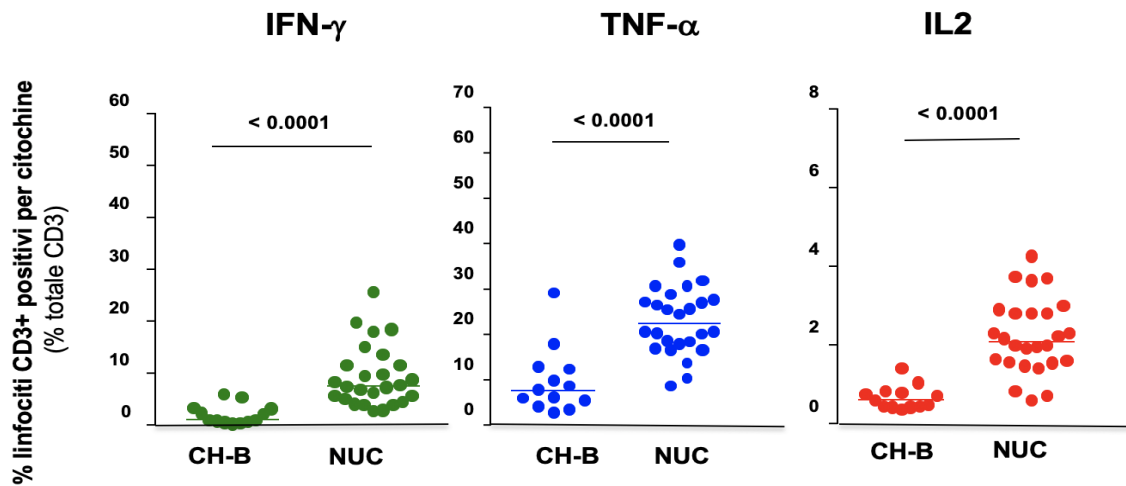
## 6. Analisi statistica

I risultati sono stati analizzati con GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA). La significatività statistica tra gruppi di campioni è stata calcolata attraverso il Mann-Whitney U test per dati non appaiati e tramite il Wilcoxon Signed Rank test per dati appaiati. Le correlazioni sono state analizzate usando il coefficiente di Spearman. Il cluster gerarchico dei parametri dei linfociti T è stato eseguito con GeneSpring-GX. L'analisi di *clustering* è stata ottenuta tramite l'algoritmo Canberra *Average similarity measure* dopo aver normalizzato i dati rispetto alla mediana.

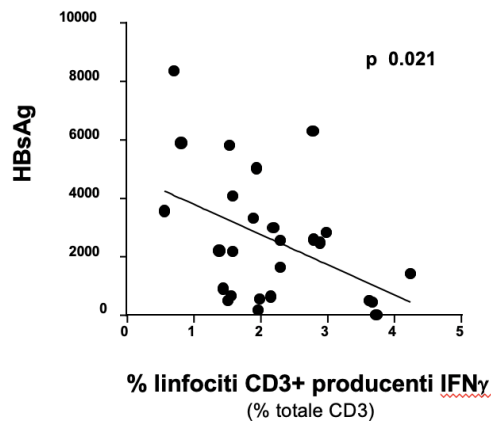
## RISULTATI

### **1. Il trattamento con analoghi nucleosidici induce recupero funzionale delle risposte T linfocitarie HBV-specifiche.**

Studi precedenti condotti nel laboratorio in cui è stata svolta la presente tesi hanno mostrato che le terapie con analoghi nucleosidici riescono a migliorare l'intensità e la qualità delle risposte T linfocitarie nei pazienti trattati, pur essendo farmaci ad azione anti-virale diretta senza alcuna azione immunomodulante descritta [70]. Per confermare questo dato abbiamo innanzi tutto confrontato i livelli di produzione citochinica da parte di linfociti T di pazienti cronici rispetto a pazienti sottoposti a terapia con analoghi, valutando la produzione di IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2 da parte dei linfociti T stimolati con peptidi specifici in colture di 10 giorni. Per avere una rappresentazione complessiva delle risposte T linfocitarie HBV-specifiche sono stati usati pannelli di peptidi sintetici della lunghezza di 15 aminoacidi corrispondenti all'intera sequenza di HBV di genotipo D. Per definire i livelli di risposta ai singoli antigeni virali il pannello complessivo di peptidi è stato suddiviso in pool più ristretti, corrispondenti alle sequenze degli antigeni dell'envelope, del core, della polimerasi e della proteina X. Come illustrato in figura 10, le risposte sono risultate significativamente più intense nei pazienti trattati con analoghi rispetto a tutti i parametri analizzati. Inoltre, l'intensità di risposta T linfocitaria complessiva è risultata inversamente correlata ai livelli di HBsAg, in quanto risposte più intense si sono riscontrate in associazione a livelli di antigeni più bassi, mentre le risposte più deboli sono state generalmente riscontrate nei pazienti con alti livelli di antigenemia (figura 11).



**Figura 10.** Frequenza di linfociti T capaci di produrre IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  o IL-2 dopo stimolo per 10 giorni con l'intero pannello di peptidi corrispondenti all'intera sequenza di HBV in pazienti con epatite cronica B naive (CH-B) o in trattamento con NUC. Ciascun punto corrisponde ad un paziente. La linea orizzontale rappresenta la media delle risposte.

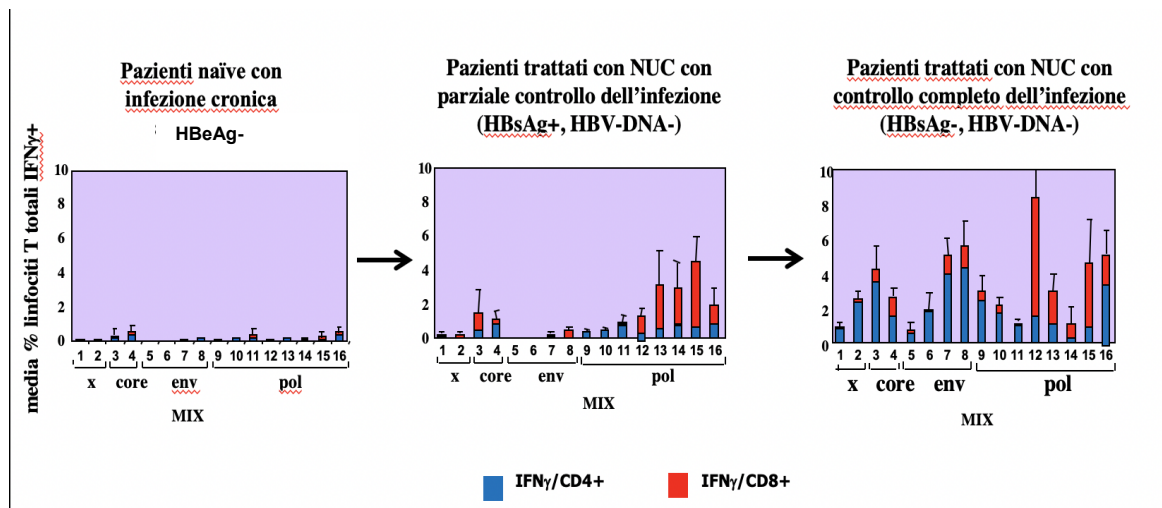


**Figura 11.** Correlazione tra livelli di HBsAg e risposte T linfocitarie totali dopo stimolo dei linfociti T in vitro per 10 giorni con i pool di peptidi corrispondenti alla sequenza di HBsAg.

## **2. Polimerasi e core sono gli antigeni più potenti nella stimolazione dei linfociti T dei pazienti trattati con analoghi.**

Suddividendo i peptidi sintetici in base alle sequenze dei singoli antigeni di HBV e utilizzando separatamente i pool di peptidi corrispondenti a ciascun antigene si è poi valutata la capacità stimolatoria delle varie proteine del virus. Gli antigeni più stimolatori nei pazienti trattati con NUC e con un controllo parziale dell'infezione, come documentato dalla persistente positività di HBsAg, sono risultati la polimerasi e il core, mentre le risposte dirette contro gli antigeni di superficie sono risultate molto più deboli o addirittura assenti. Risultati paragonabili sono stati riscontrati sia per le risposte CD4- che CD8-mediate, indicando che il recupero funzionale indotto dalla terapia viene esercitato su entrambe le popolazioni T linfocitarie. Molto deboli sono risultate le risposte contro tutti gli antigeni di HBV nei pazienti cronici *naive* non trattati, che costituiscono la popolazione di riferimento per valutare l'effetto indotto dalla terapia con NUC sui linfociti T. I risultati di questi esperimenti suggeriscono quindi che il maggiore livello di esaurimento funzionale linfocitario sia a carico delle popolazioni di linfociti envelope-specifici, la cui funzione risulta pertanto più difficilmente recuperabile (figura 12). Più facilmente recuperabili risultano invece le risposte contro polimerasi e core.

Soltanto nella limitata percentuale di pazienti trattati che riescono a controllare completamente l'infezione con perdita di HBsAg e generazione di anticorpi anti-HBs si riscontra anche un recupero delle risposte T linfocitarie contro gli antigeni dell'envelope (figura 12, pannello di destra).



**Figura 12.** Livelli di risposte T linfocitarie in pazienti con infezione cronica HBeAg- naïve, in pazienti trattati con NUC con controllo parziale dell'infezione, ancora HBsAg positivi e in pazienti trattati con NUC con controllo completo dell'infezione, HBsAg e HBV-DNA negativi. Ogni barra esprime la percentuale di linfociti T capaci di produrre IFN- $\gamma$  a seguito di stimolo in vitro per 10 giorni con i pool di peptidi indicati. La parte blu di ciascuna barra esprime le risposte CD4-mediate, la parte rossa le risposte CD8-mediate.

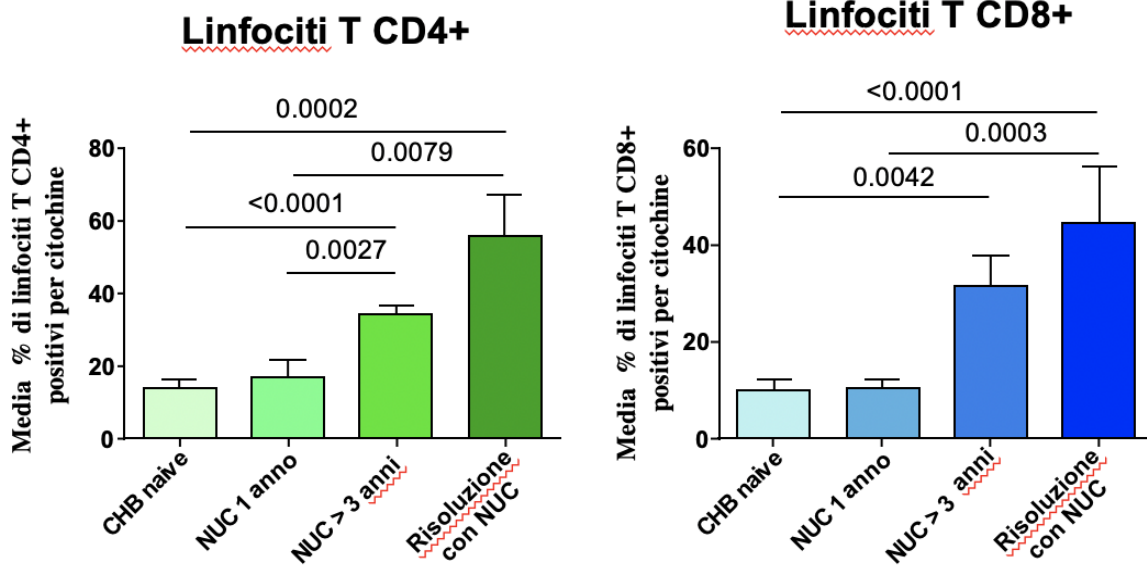
### 3. Cinetica di recupero delle risposte T linfocitarie in corso di terapia con NUC

Nella prospettiva di associare la terapia con NUC a farmaci capaci di stimolare ulteriormente le risposte immunitarie adattative cellulo-mediate (per esempio vaccino-terapie), una volta che i linfociti T abbiano riacquisito la capacità di rispondere ad uno stimolo esogeno, è cruciale capire dopo quanto tempo di terapia con NUC le risposte immunitarie siano funzionalmente ripristinate in modo sufficiente da rendere massimamente efficace uno stimolo antigenico diretto. Tale informazione è di fondamentale importanza perché una stimolazione vaccinale terapeutica potrebbe essere totalmente inefficace se venisse applicata a pazienti *naïve*, quando ancora l'inibizione funzionale linfocitaria è massima.

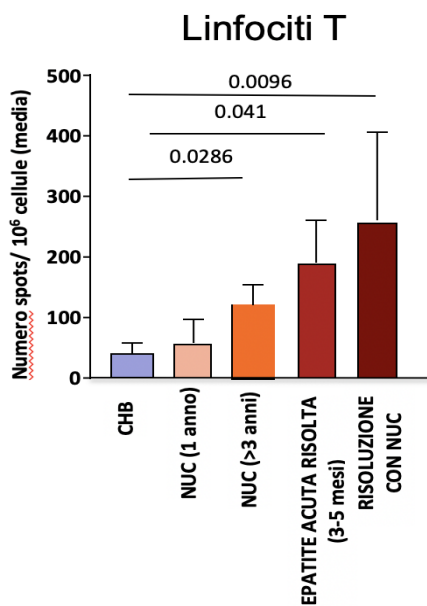
Per rispondere a questo quesito abbiamo studiato le risposte T linfocitarie CD4- e CD8-mediate in pazienti che avevano ricevuto terapia con NUC per 1 anno, per più di tre anni o che avevano completamente controllato l'infezione con generazione di anticorpi anti-HBs dopo terapie di più lunga durata. Come evidente dai dati illustrati in figura 13, almeno tre anni di terapia sembrano necessari per indurre un

significativo aumento delle risposte T linfocitarie HBV-specifiche. Lo stesso risultato è stato osservato sia dopo 10 giorni di stimolo e di coltura (figura 13), che studiando le risposte *ex vivo* dopo uno stimolo antigenico di più breve durata (*overnight*; figura 14). Questo tempo di recupero della funzione T linfocitaria non appare correlato al calo dei livelli di HBsAg, perché il calo dell'antigenemia nei pazienti trattati con NUC è generalmente molto lento.

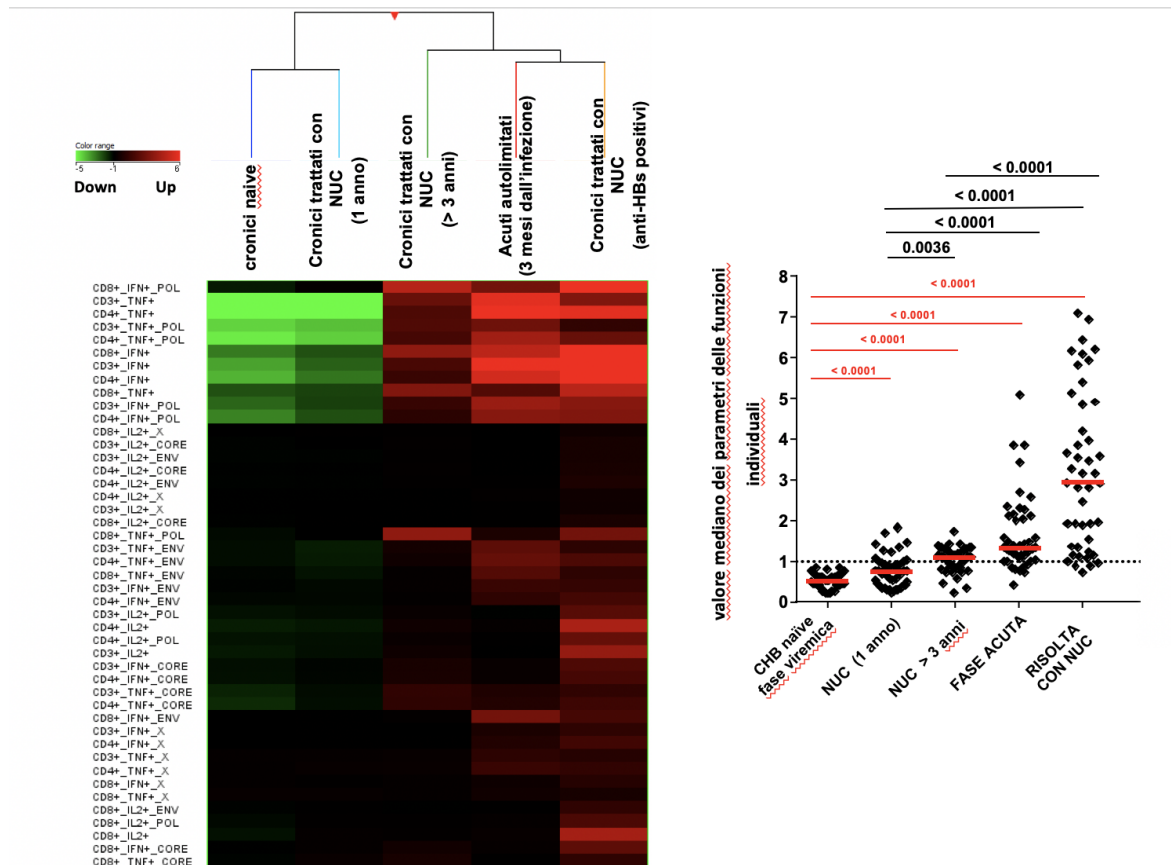
I dati sono stati quindi valutati anche attraverso un altro approccio statistico, denominato *clustering analysis* (figura 15), che permette di paragonare ogni singola funzione linfocitaria nelle varie popolazioni di pazienti in studio; le funzioni meno intensamente depresse appaiono illustrate in verde, mentre le funzioni più intensamente espresse sono illustrate in rosso. Anche attraverso quest'analisi si conferma che le risposte linfocitarie aumentano gradualmente in funzione del tempo di trattamento, con un migliore livello di recupero dopo tre anni rispetto ad un anno di terapia, ma che già a quest'ultimo punto tempo più precoce si riscontra un aumento significativo rispetto al controllo, rappresentato dai pazienti cronici naive non trattati con risposte linfocitarie massimamente inibite. Di estremo interesse è anche l'osservazione che le risposte dei pazienti trattati che controllano completamente l'infezione è addirittura più intensa di quella espressa da pazienti che riescono a controllare spontaneamente l'infezione dopo un'epatite acuta autolimitata.



**Figura 13.** Progressivo incremento della produzione di citochine da parte di linfociti T HBV-specifici di pazienti cronici naive o trattati con NUC in funzione del tempo di terapia. Ciascuna barra esprime la media delle percentuali di linfociti positivi per IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 dopo stimolo in vitro per 10 giorni con pannelli di peptidi corrispondenti all'intera sequenza virale. CHB: chronic hepatitis B.



**Figura 14.** Progressivo incremento della produzione di citochine da parte di linfociti T HBV-specifici di pazienti cronici naive o trattati con NUC in funzione del tempo di terapia. Ciascuna barra esprime la media delle percentuali di linfociti positivi per IFN- $\gamma$  valutati ex vivo con tecnica ELISpot, dopo stimolo overnight con pannelli di peptidi corrispondenti all'intera sequenza virale. CHB: chronic hepatitis B.



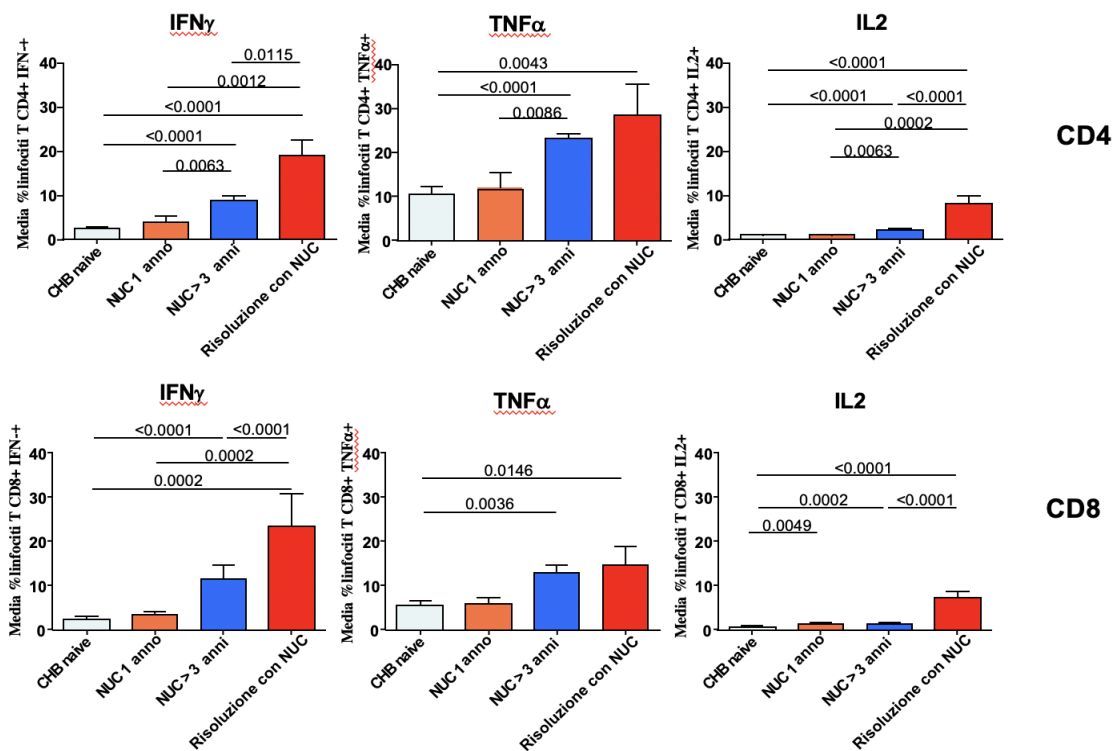
**Figura 15.** Clustering analysis di tutti i singoli parametri di immunità cellulo-mediata (indicati a sinistra della heat map), rappresentati nei singoli gruppi di pazienti (indicati nella parte superiore della heat map), rispetto alla mediana di tutti i valori riscontrati nella popolazione totale. Le tonalità di colore, dal verde al rosso, indicano i livelli di funzionalità cellulare progressivamente crescente; verde, massima depressione funzionale; rosso, massima efficienza. Nel pannello di destra sono indicate le differenze statistiche fra i vari gruppi di pazienti, calcolate utilizzando gli stessi dati illustrati nel plot di sinistra. CHB: chronic hepatitis B.

#### 4. Comportamento delle singole funzioni anti-virali T linfocitarie in corso di terapia con NUC.

Studi compiuti nel modello murino di infezione cronica con LCMV hanno mostrato che in presenza di alte concentrazioni di antigene le varie funzioni anti-virali T linfocitarie vanno incontro ad una inibizione progressiva e gerarchica [71]. Le prime funzioni che vedono perse sono la citotossicità e la capacità di produrre IL-2, mentre le funzioni più resistenti all'*exhaustion* da alte dosi di antigene e che richiedono quindi più alte concentrazioni di antigene per essere inibite, sono la capacità proliferativa e la capacità di produrre IFN- $\gamma$ . Il recupero delle varie funzioni

anti-virali procede in modo opposto con ripresa della capacità di produrre IFN- $\gamma$  più precoce e ripristino più tardivo della produzione di IL-2.

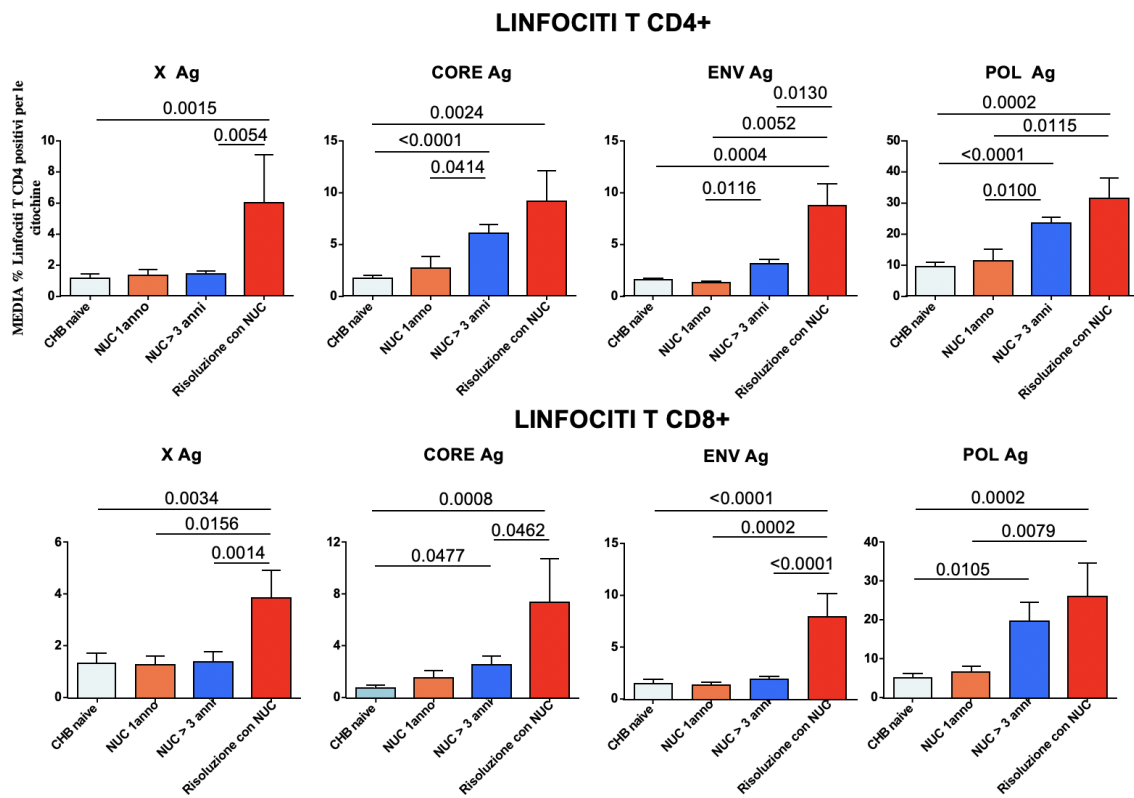
Analizzando il comportamento delle singole funzioni anti-virali in corso di terapia NUC si è potuto osservare un recupero più precoce della produzione di IFN- $\gamma$  e di TNF- $\alpha$ , che hanno mostrato una cinetica sovrapponibile sia nell'ambito della popolazione CD4 che CD8, richiedendo almeno tre anni di terapia per raggiungere livelli significativi di incremento rispetto al gruppo dei pazienti *naive*, mai sottoposti a terapia (figura 16). In linea con i dati generati nel topo in corso di infezione da LCMV, la produzione di IL-2 è migliorata più tardivamente, in quanto evidente solo nei pazienti capaci di controllare completamente l'infezione (figura 16).



**Figura 16.** Progressivo recupero delle singole funzioni dei linfociti CD4+ o CD8+ in funzione del tempo di terapia in pazienti con infezione cronica da HBV naive o trattati con NUC per periodi di tempo differenti (1 anno, più di 3 anni, infezioni risolte dopo trattamenti di lunga durata variabile da paziente a paziente). Ciascuna barra esprime la media delle percentuali di linfociti positivi per IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 dopo stimolo di 10 giorni con pannelli di peptidi corrispondenti ai singoli antigeni virali. Ciascuna barra esprime la media delle percentuali di linfociti positivi per IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 dopo stimolo in vitro. CHB: chronic hepatitis B.

## 5. Comportamento delle risposte anti-virali T linfocitarie contro i singoli antigeni virali in corso di terapia con NUC.

Scomponendo le risposte T linfocitarie ai singoli antigeni virali espresse dalle sottopopolazioni CD4 e CD8 (figura 17) si può di nuovo osservare un recupero più precoce delle risposte CD4- e CD8-mediate dirette contro polimerasi e core, mentre un recupero significativo delle risposte envelope- e x-specifiche risulta evidente solo dopo successo terapeutico completo. Quindi, un recupero efficiente delle risposte T linfocitarie envelope- e x-specifiche si realizza solo dopo eliminazione di HBsAg e controllo duraturo dell'infezione virale, suggerendo un loro possibile ruolo nella patogenesi del controllo anti-virale.



**Figura 17.** Progressivo recupero delle risposte dei linfociti CD4+ o CD8+ ai singoli antigeni di HBV in funzione del tempo di terapia in pazienti con infezione cronica da HBV naive o trattati per periodi di tempo differenti con NUC (1 anno, più di 3 anni, infezioni risolte dopo trattamenti di lunga durata, variabile da paziente a paziente). Ciascuna barra esprime la media delle percentuali di linfociti positivi per IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2 dopo stimolo di 10 giorni con pannelli di peptidi corrispondenti ai singoli antigeni virali. Ciascuna barra esprime la media delle percentuali di linfociti positivi per IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 dopo stimolo di 10 giorni con pannelli di peptidi corrispondenti all'intera sequenza virale. CHB: chronic hepatitis B

## DISCUSSIONE

Le infezioni croniche da HBV sono caratterizzate da una profonda depressione delle risposte immunitarie cellulo-mediate HBV specifiche, che è considerata un elemento chiave nella patogenesi della persistenza virale [70]. Le cause di questa disfunzione dei linfociti T virus-specifici sono sicuramente molteplici. Studi inizialmente eseguiti nel modello murino di infezione cronica da LCMV hanno dimostrato che quando i linfociti T sono esposti per lunghi periodi di tempo ad alte concentrazioni di antigeni virali, queste ultime determinano un'inibizione delle funzioni linfocitarie [71]. Tale fenomeno è generalmente progressivo, coinvolgendo in modo gerarchico e sequenziale le varie funzioni anti-virali dei linfociti T. Le prime funzioni che vengono perse sono la funzione citotossica e la capacità di produrre IL-2, mentre più tardivamente si realizza la compromissione della capacità dei linfociti di produrre TNF-alfa e IFN- $\gamma$  e della capacità di proliferare. Tali meccanismi sono sicuramente operanti anche in corso di infezione cronica B, in quanto i pazienti cronici presentano costantemente elevatissime quantità di antigeni di superficie di HBV, che vengono prodotti in largo eccesso rispetto alle particelle virali complete e possono quindi avere un ruolo fortemente inibitorio sui linfociti T. Inoltre, le alte concentrazioni di antigene si associano ad una *up-regolazione* di molecole inibitorie sui linfociti T, soprattutto HBV-specifici intra-epatici, quali PD-1, CTLA-4, TIM-3 ed altre ancora, che possono inibire la funzione linfocitaria a seguito della loro interazione con i rispettivi ligandi, che sono a loro volta sovra-espresi all'interno del fegato cronicamente infettato [70]. In corso di infezione cronica B, però, anche altri meccanismi sono contemporaneamente operanti all'interno del fegato cronicamente infiammato [72] che, in virtù di questo stato infiammatorio, facilita l'attivazione di fenomeni inibitori sostenuti da alte concentrazioni di citochine soppressive e di altri fattori inibitori, quali arginasi eIDO, che causano la deplezione nel microambiente epatico di aminoacidi fondamentali per la funzione e la proliferazione dei linfociti T, come arginina e triptofano. All'interno del fegato cronicamente infiammato si attivano inoltre altri meccanismi inibitori aspecifici, sostenuti dall'espansione di popolazioni cellulari a funzione soppressiva, quali linfociti Treg e cellule mieloidi soppressive, che esercitano una funzione inibitoria sui linfociti T, indipendentemente dalla loro specificità antigenica. Infine, la soppressione funzionale dei linfociti T è anche

sostenuta da linfociti NK, che all'interno del fegato infiammato possono distruggere o inibire i linfociti T attivati, soprattutto attraverso meccanismi TRAIL- e NKG2D-dipendenti. Infine, tutta una serie di popolazioni cellulari residenti all'interno del fegato infettato esprimono una funzione inefficace di presentazione degli antigeni virali ai linfociti T, inducendone inibizione anziché attivazione. In considerazione della complessità e della molteplicità dei meccanismi inibitori che possono agire simultaneamente sui linfociti T sopprimendo la loro funzione, è ovvio che un ripristino completo della funzione antivirale potrebbe essere estremamente difficile da ottenere in vivo.

I farmaci maggiormente utilizzati oggi per la terapia dell'epatite cronica B sono gli analoghi nucleos(t)idici che sono estremamente efficienti nell'inibire la replicazione del virus, ma non hanno alcuna documentata azione immunomodulante diretta sulle risposte linfocitarie. Studi precedentemente pubblicati hanno però dimostrato che attraverso meccanismi presumibilmente indiretti i NUC riescono a potenziare le risposte linfocitarie HBV-specifiche [73-75]. Si ipotizza che questo effetto possa essere causato non tanto dalla diminuzione degli antigeni virali, la cui concentrazione cala in modo estremamente lento in corso di terapia, quanto invece dalla risoluzione dell'infiammazione intraepatica che, come precedentemente descritto, può innescare tutta una serie di meccanismi inibitori per i linfociti T. Sulla base di quest'evidenza, quindi, i nuovi approcci terapeutici che si prospettano per potenziare l'attività dei NUC ed abbreviarne la durata di somministrazione, è l'associazione dei NUC con farmaci capaci di stimolare direttamente le risposte T linfocitarie HBV-specifiche, quali per esempio vaccini terapeutici contenenti i vari antigeni di HBV. In tale prospettiva è di fondamentale importanza capire quale sia il momento ideale in cui associare la terapia immunomodulante ai NUC, per riuscire a stimolare i linfociti stessi nel momento in cui abbiano riacquisito una sufficiente capacità di rispondere ad una stimolazione antigenica esogena, come quella fornita da un vaccino terapeutico. È ovvio che nel caso in cui l'associazione con il vaccino venisse eseguita troppo precocemente, prima di un ripristino almeno parziale della responsività T linfocitaria, la possibile efficacia del vaccino potrebbe essere fortemente ridotta. Altro cruciale elemento da definire è se il recupero funzionale indotto dalla terapia con NUC sia a carico di entrambe le sottopopolazioni T linfocitarie CD4 e CD8, in quanto l'obiettivo finale della terapia di associazione con un vaccino terapeutico è quello di

attivare non solo i linfociti CD4, come si realizza con l'utilizzo del vaccino preventivo, ma anche i linfociti CD8, vista la loro importanza cruciale nel riconoscimento e nell'eliminazione degli antigeni virali intracellulari. Altrettanto fondamentale è capire se l'effetto dei NUC si estenda a tutte o solo ad alcune delle sotto-popolazioni linfocitarie di specificità antigenica diversificata, in quanto si pensa che un controllo completo e duraturo dell'infezione comporti l'attivazione efficiente di risposte che siano simultaneamente dirette contro tutti gli antigeni virali. Infine, resta da stabilire se la terapia con NUC riesca ad agire in senso stimolatorio per tutte le funzioni antivirali dei linfociti T o solo su alcune di esse.

Per potere dare risposta a questi quesiti abbiamo studiato pazienti con infezione cronica B sottoposti a terapia con NUC per differenti periodi di tempo, allo scopo di definire quale possa essere il momento ottimale in cui associare eventuali altri farmaci immunomodulanti. Abbiamo inoltre usato un ampio pannello di peptidi sintetici capaci di coprire e rappresentare tutte le sequenze dei diversi antigeni di HBV e ottenere in tal modo sia una valutazione della risposta anti-virale complessiva, sia una valutazione della qualità e dell'intensità delle risposte ai singoli antigeni virali. Sono state inoltre studiate alcune delle principali funzioni antivirali, quali capacità di espansione e capacità di produrre le principali citochine necessarie per il controllo dell'infezione.

I nostri risultati confermano innanzitutto che i NUC riescono a potenziare le risposte linfocitarie proteggenti e che un efficiente ripristino della funzione linfocitaria richiede generalmente periodi piuttosto lunghi di trattamento. Infatti, un iniziale ripristino funzionale è già dimostrabile dopo un anno di terapia, ma la funzione diventa significativamente più efficiente dopo tre anni di trattamento, per arrivare a una ricostituzione apparentemente completa delle funzioni antivirali solo nei pazienti che riescono a controllare l'infezione dopo lunghi periodi di terapia, eliminando l'HBsAg e generando anticorpi anti-HBs. Questo recupero generalizzato della funzione T linfocitaria, anche se apprezzabile solo in una percentuale limitata di pazienti trattati con NUC, induce comunque un sostanziale ottimismo sulla reale possibilità di ricostituire in vivo nei pazienti con infezione cronica una funzione antivirale adeguata per conseguire il controllo virale che i pazienti cronici non sono riusciti ad ottenere spontaneamente. Di estrema importanza sono anche le osservazioni che entrambe le sottopopolazioni linfocitarie CD4 e CD8 migliorano le risposte durante terapia con

NUC e che tutte le principali funzioni anti-virali, compresa la capacità di proliferare e di produrre TNF-alfa e IFN-gamma, vengono ricostituite, con l'eccezione della produzione di IL-2, che, come atteso in base alle attuali conoscenze *sull'exhaustion* T linfocitario, dovrebbe essere la funzione che viene persa per prima in seguito ad esposizione ad alte concentrazioni di antigene e l'ultima ad essere recuperata in seguito al calo dell'antigenemia e alla risoluzione dello stato di infiammazione epatica cronica. Considerando che nei pazienti cronici *naive* le uniche risposte che generalmente si riscontrano sono quelle dirette contro l'antigene core, è di estrema importanza il riscontro di risposte contro la polimerasi nei pazienti trattati. Purtroppo, invece, le risposte HBsAg-specifiche si attivano solo dopo controllo completo dell'infezione con clearance dell'HBsAg e comparsa di anticorpi anti-HBs. Considerando l'importanza dei linfociti HBsAg-specifici nelle fasi acute delle infezioni dell'adulto che si risolvono spontaneamente, particolare attenzione nelle immunoterapie del futuro dovrà essere rivolta a sviluppare strategie che permettano il potenziamento di queste risposte. Da considerare, in particolare, la via di somministrazione e quindi la modalità con cui l'antigene viene presentato al sistema immunitario, la tipologia di antigene usato nel vaccino che possa avere la capacità di accedere alle vie di presentazione appropriate per la complessazione sia con molecole HLA di classe I e di classe II, il tipo di adiuvante da utilizzare che possa facilitare l'attivazione dei linfociti CD8 citotossici, inducendo possibilmente in modo più selettivo l'attività anti-virale non citolitica, rispetto a quella citolitica.

In conclusione, i dati generati dal nostro studio forniscono alcune informazioni che potrebbero essere di fondamentale importanza per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche immunomodulanti per l'epatite B. Innanzi tutto l'effetto immunomodulante dei NUC, presumibilmente indiretto, riscontrato nei pazienti sottoposti a terapia, individua i NUC come possibili molecole di supporto per future immuno-terapie volte a potenziare le risposte immunitarie proteggenti, in particolare vaccino-terapie anti-HBV. Infatti, i pazienti trattati con NUC mostrano un significativo incremento della funzionalità linfocitaria, probabilmente dovuto all'efficiente capacità dei NUC di risolvere l'infiammazione intraepatica e di abrogare conseguentemente i meccanismi inibitori sostenuti dall'infiammazione stessa. Tale ripristino funzionale potrebbe quindi creare una situazione adeguata per permettere a immunoterapie specifiche di espletare al meglio la loro funzione. Dato che l'effetto di ripristino

funzionale linfocitario indotto dai NUC non è sostenuto dal calo dell'antigenemia, una strategia efficace potrebbe essere quella di ricorrere ad una somministrazione sequenziale di NUC, che avrebbero un primo effetto di ripristino funzionale linfocitario principalmente dovuto al controllo dell'infiammazione intraepatica, seguita dall'utilizzo di farmaci capaci di agire specificamente sulla produzione di antigeni virali, inibendone la concentrazione nell'organismo, quali per esempio farmaci ad azione inibitoria sulla sintesi degli RNA messaggeri (siRNA). Questi ultimi, infatti, potrebbero facilitare ulteriormente il ripristino funzionale attraverso il calo dei livelli antigenici nell'organismo infettato. Questa somministrazione coordinata e sequenziale di NUC e siRNA, dovrebbe quindi permettere a immunoterapie mirate a stimolare le risposte T linfocitarie specifiche, come le vaccino-terapie, di ottenere risposte anti-virali massimamente efficienti nei confronti dei determinanti antigenici di HBV presenti nel vaccino stesso, conferendo alla terapia il massimo di potenzialità curativa.

## BIBLIOGRAFIA

1. Mason WS, Burrell CJ, Casey J, Gerlich WH et al "Virus Taxonomy" Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Amsterdam: Elsevier, 2005
2. Gust ID, Burrell CJ, Coulepis AG, Robinson WS, Zuckerman AJ "Taxonomic classification of human hepatitis B virus" *Intervirology* (1986); 25:14-29
3. Datta S, Chatterjee S, Veer V, Chakravarty R et al "Molecular Biology of the Hepatitis B Virus for Clinicians" *J Clin Exp Hepatol* (2012); 2(4): 353-365
4. Jung ML, Ahn H "Quantification of HBsAg: basic virology for clinical practice" *Gastroenterology*(2011); 17(3): 283-289
5. Huovila AP, Eder AM, Fuller SD. Hepatitis B surface antigen assembles in a post-ER, pre-Golgi compartment. *J Cell Biol* 1992; 118: 1305-1320
6. Patzer EJ, Nakamura GR, Simonsen CC, Levinson AD, Brands R. Intracellular assembly and packaging of hepatitis B surface antigen particles occur in the endoplasmic reticulum. *J Virol* 1986; 58: 884-892
7. McAleer WJ, Buynak EB, Maigetter RZ, Wampler DE, Miller WJ, Hilleman MR. Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature* 1984; 307: 178-180
8. Deres K, Schröder CH, Paessens A, Goldmann S, Hacker HJ, Weber O, Krämer T, Niewöhner U, Pleiss U, Stoltefuss J, Graef E, Koletzki D, Masantschek RN, Reimann A, Jaeger R, Gross R, Beckermann B, Schlemmer KH, Haebich D, Rübsamen-Waigmann H. Inhibition of hepatitis B virus replication by drug-induced depletion of nucleocapsids. *Science* 2003; 299: 893-896

9. Stray SJ, Bourne CR, Punna S, Lewis WG, Finn MG, Zlotnick A. A heteroaryldihydropyrimidine activates and can misdirect hepatitis B virus capsid assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 8138-8143
10. Stray SJ, Johnson JM, Kopek BG, Zlotnick A. An in vitro fluorescence screen to identify antivirals that disrupt hepatitis B virus capsid assembly. *Nat Biotechnol* 2006; 24: 358-362
11. Asif-Ullah M, Choi KJ, Choi KI, Jeong YJ, Yu YG. Identification of compounds that inhibit the interaction between core and surface protein of hepatitis B virus. *Antiviral Res* 2006; 70: 85-90
12. Carman WF, Thomas HC. Genetic variation in hepatitis B virus. *Gastroenterology* 1992; 102: 711-9
13. Seeger C and Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64: 51-68
14. Bruss V. Hepatitis B virus morphogenesis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 65-73
15. Nowak MA, Bonhoeffer S, Hill AM, Boehme R, Thomas HC, McDade H. Viral dynamics in hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 4398-4402
16. Liaw YF, Brunetto MR et al. *The natural history of chronic HBV infection and geographical differences*. *Antiviral Therapy*. 2010; 15: 25-33.
17. European association for the study of the liver. *EASL Clinical Practice Guidelines: management of chronic hepatitis B virus infection*. *Journal of Hepatology*. 2017; 67: 370-398.
18. M. Moroni, R. Esposito, S. Antinori. *Malattie infettive ottava edizione*. Edra S.p.a., Milano. 2017
19. Balmasova IP, Yushchuk ND et al. *Immunopathogenesis of chronic hepatitis B*. *World Journal of Gastroenterology*. 2014; 20: 14156-14171.

20. Bertoletti A, Ferrari C. *Innate and adaptive immune responses in chronic hepatitis B virus infections: towards restoration of immune control of viral infection*. Gut. 2012; 61: 1754-1764.
21. Ferrari C. *HBV and the immune response*. Liver International. 2014; 35: 121-128.
22. Chisari FV, Isogawa M et al. *Pathogenesis of hepatitis B virus infection*. Pathologie Biologie. 2010; 58: 258-266.
23. Kahan SM, Wherry EJ et al. *T cell exhaustion during persistent viral infections*. Virology. 2015; 479-480: 180-193.
24. Said ZN, Abdelwahab KS. *Induced immunity against hepatitis B virus*. World Journal of Hepatology. 2015; 7: 1660-1670.
25. Ganem D, Prince A. *Hepatitis B virus infection—natural history and clinical consequences*. New England Journal of Medicine. 2004; 350: 1118-1129.
26. Wang, L., Wang, K. & Zou, Z. Q. Crosstalk between innate and adaptive immunity in hepatitis B virus infection. World J. Hepatol. (2015). doi:10.4254/wjh.v7.i30.2980
27. Guidotti LG, Chisari FV. *Immunobiology and Pathogenesis of Viral Hepatitis*. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease. 2006; 1: 23-26.
28. Shimizu Y. *T cell immunopathogenesis and immunotherapeutic strategies for chronic hepatitis B virus infection*. World Journal of Gastroenterology. 2012; 18: 2443-2451.
29. Wherry EJ. *T cell exhaustion*. Nature Immunology. 2011; 12: 492-499.
30. Van Bömmel F, Wiegand J et al. Hepatitis B Treatment. 2015; Cap. 9, pp. 145-181.
31. European association for the study of the liver “EASL Clinical Practice Guidelines: management of chronic hepatitis B virus

infection”

J Hepatol. 2012 Jul;57(1):167-85. doi: 10.1016/j.jhep.2012.02.010. Epub 2012 Mar 20.

32. Bonino F “Introduction to "Hepatitis B virus eterogeneity - a mean to personalized care” *Antiviral Therapy* (2010); 15 Suppl 3: 1-2
33. Hadziyannis S, Papatheodoridis GV. “Hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis: natural history and treatment” *Semin Liver Dis* 2006;26:130-141
34. Rugarli C, Cappio FC et al. *Medicina Interna Sistemica*. 2015; Edizione Edra Masson. VII Edizione.
35. Lok ASF, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology*. 2007; 45: 507–539.
36. Abbas AK, Lichtman AH. *Cellular and molecular immunology*. 2014; Ed. Elsevier. Eighth Edition.
37. Reese RE, Chapman SW et al. *Manuale pratico di malattie infettive*. V edizione. 2005. Antonio Delfino editore, Roma.
38. Marcellin P, Bonino F et al. *Hepatitis B surface antigen levels: association with 5-year response to peginterferon alfa-2a in hepatitis HBe antigen-negative patients*. *Hepatology International*. 2013; 7: 88-97.
39. Lau DT, Bleibel W. *Current status of antiviral therapy for hepatitis B*. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*. 2008; 1: 61-75.
40. Craxì A, Antonucci G et al. *Treatment options in HBV*. *Journal of Hepatology*. 2006; 44: 77-83.
41. Werle- Lapostolle, B. et al. Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy. *Gastroenterology* 126, 1750–1758 (2004).

42. Le Guerhier, F. et al. Characterization of the antiviral effect of 2',3'-dideoxy-2', 3'-dideoxy- beta-L-5- fluorocytidine in the duck hepatitis B virus infection model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 111–122(2000).
43. Boyd, A. et al. Decay of ccc- DNA marks persistence of intrahepatic viral DNA synthesis under tenofovir in HIV- HBV co- infected patients. *J. Hepatol.* 65,683–691 (2016).
44. Therapeutic strategies for hepatitis B virus infection: towards a cure Gregory C. Fanning, Fabien Zoulim, Jinlin Hou & Antonio Bertolotti *Nature Reviews Drug Discovery* volume 18, pages827–844(2019).
45. Urban S, Strategies to inhibit entry of HBV and HDV into hepatocytes. *Gastroenterology* 2014.
46. Wedemeyer H, Bogomolov P, Blank A, et al. Final results of a multicenter, open-label phase 2b clinical trial to assess safety and efficacy of Myrcludex B in combination with Tenofovir in patients with chronic HBV/HDV coinfection. *J Hepatol* 2018.
47. Watashi K, Sluder A, Daito T, et al. Cyclosporin A and its analogs inhibit hepatitis B virus entry into cultured hepatocytes through targeting a membrane transporter, sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP). *Hepatology.* 2014;59(5):1726-1737. doi:10.1002/hep.26982.
48. Xia Y, Liang TJ. Development of Direct-acting Antiviral and Host-targeting Agents for Treatment of Hepatitis B Virus Infection. *Gastroenterology.* 2019;156(2):311-324. doi:10.1053/j.gastro.2018.07.057.
49. Seeger C, Sohn JA. Targeting hepatitis B virus with CRISPR/Cas9. *Mol Ther Nucleic Acids* 2014;3:e216.
50. Yuen M-F, Aggarwal R, Gane EJ, et al. Interim Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Antiviral Activity of ABI-H0731, a Novel Core Protein Allosteric Modifier (CpAM), in Healthy Volunteers and Non-Cirrhotic Viremic Subjects with Chronic Hepatitis B. *J Hepatol.* 2018;68:S111.

51. RNAi-based treatment of chronically infected patients and chimpanzees reveals that integrated hepatitis B virus DNA is a source of HBsAg. Wooddell CI, Yuen MF, Chan HL, Gish RG, Locarnini SA, Chavez D, Ferrari C, Given BD, Hamilton J, Kanner SB, Lai CL, Lau JYN, Schlupe T, Xu Z, Lanford RE, Lewis DL.
52. Yuen MF, Schiefke I, Yoon JH, Ahn SH, Heo J, Kim JH, Lik Yuen Chan H, Yoon KT, Klinker H, Manns M, Petersen J, Schlupe T, Hamilton J, Given BD, Ferrari C, Lai CL, Locarnini SA, Gish RG. RNA Interference Therapy With ARC-520 Results in Prolonged Hepatitis B Surface Antigen Response in Patients With Chronic Hepatitis B Infection. *Hepatology*. 2020 Jul;72(1):19-31. doi: 10.1002/hep.31008. Epub 2020 Apr 23.
53. Bazinet M, Pantea V, Cebotarescu V, Cojuhari L, Jimbei P, Albrecht J. Safety and efficacy of REP 2139 and pegylated interferon alfa-2a for treatment-naive patients with chronic hepatitis B virus and hepatitis D virus co-infection (REP 301 and REP 301-LTF): a non-randomised, open-label, phase 2 trial. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2017;2(12):877-889.
54. Quinet J, Jamard C, Burtin M, et al. Nucleic acid polymer REP 2139 and nucleos(T)ide analogues act synergistically against chronic hepadnaviral infection in vivo in Pekin ducks. *Hepatology*. 2018;67(6):2127-2140. doi:10.1002/hep.29737.
55. Zhou, K., Contag, C., Whitaker, E. & Terrault, N. Spontaneous loss of surface antigen among adults living with chronic hepatitis B virus infection: a systematic review and pooled meta-analyses. *Lancet Gastroenterol. Hepatol*. 4, 227–238 (2019); Bertoletti, A. & Ferrari, C. Innate and adaptive immune responses in chronic hepatitis B virus infections: towards restoration of immune control of viral infection. *Gut* 61, 1754–1764 (2012).
56. Lau, G. K. et al. Clearance of hepatitis B surface antigen after bone marrow transplantation: role of adoptive immunity transfer. *Hepatology* 25, 1497–1501 (1997); Ilan, Y. et al. Adoptive transfer of immunity to hepatitis B virus after T

cell- depleted allogeneic bone marrow transplantation. *Hepatology* 18, 246–252 (1993).

57. Yeo, W. et al. Hepatitis B virus reactivation in lymphoma patients with prior resolved hepatitis B undergoing anticancer therapy with or without rituximab. *J. Clin. Oncol.* 27, 605–611 (2009).

58. Li, D. et al. A potent human neutralizing antibody Fc- dependently reduces established HBV infections. *eLife* 6, 213 (2017); Zhang, T. Y. et al. Prolonged suppression of HBV in mice by a novel antibody that targets a unique epitope on hepatitis B surface antigen. *Gut* 65, 658–671 (2016).

59. Janssen HLA, Brunetto MR, Kim YJ, et al. Safety, efficacy and pharmacodynamics of vesatolimod (GS-9620) in virally suppressed patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol.* 2018;68(3):431-440. doi:10.1016/j.jhep.2017.10.027.

60. Toll-Like Receptor 8 Agonist GS-9688 Induces Sustained Efficacy in the Woodchuck Model of Chronic Hepatitis B. Daffis S, Balsitis S, Chamberlain J, Zheng J, Santos R, Rowe W, Ramakrishnan D, Pattabiraman D, Spurlock S, Chu R, Kang D, Mish M, Ramirez R, Li L, Li B, Ma S, Hung M, Voitenleitner C, Yon C, Suresh M, Menne S, Cote P, Delaney WE 4th, Mackman R, Fletcher SP. *Hepatology.* 2020 Apr 4. doi: 10.1002/hep.31255. Online ahead of print PMID: 32246499.

61. Schurich A, Pallett LJ, Lubowiecki M, et al. The Third Signal Cytokine IL-12 Rescues the Anti-Viral Function of Exhausted HBV-Specific CD8 T Cells. *PLoS Pathog.* 2013;9(3). doi:10.1371/journal.ppat.1003208.

62. Gehring AJ, Protzer U. Targeting Innate and Adaptive Immune Responses to Cure Chronic HBV Infection. *Gastroenterology.* 2019;156(2):325-337. doi:10.1053/j.gastro.2018.10.032.

63. Boni C, Janssen HLA, Rossi M, et al. Combined GS-4774 and Tenofovir Therapy Can Improve HBV-Specific T-Cell Responses in Patients With

Chronic Hepatitis. *Gastroenterology*. 2019;157(1):227-241.e7. doi:10.1053/j.gastro.2019.03.044.

64. Boni, C. et al. Characterization of hepatitis B virus (HBV)-specific T- cell dysfunction in chronic HBV infection. *J. Virol.* 81, 4215–4225 (2007).
65. Kah J, Koh S, Volz T, et al. Lymphocytes transiently expressing virus-specific T cell receptors reduce hepatitis B virus infection. *J Clin Invest.* 2017;127(8):3177-3188. doi:10.1172/JCI93024.
66. Boni C, Barili V, Acerbi G, et al. HBV immune-therapy: From molecular mechanisms to clinical applications. *Int J Mol Sci.* 2019;20(11):1-20. doi:10.3390/ijms20112754
67. Fisicaro, P Combined Blockade of Programmed Death-1 and Activation of CD137 Increase Responses of Human Liver T Cells Against HBV, But Not HCV. *Gastroenterology* 2012.
68. Jacobi, F.J.; Wild, K.; Smits, M.; Zoldan, K.; Csernalabics, B.; Flecken, T.; Lang, J.; Ehrenmann, P.; Emmerich, F.; Hofmann, M.; et al. OX40 stimulation and PD-L1 blockade synergistically augment HBV-specific CD4 T cells in patients with HBeAg-negative infection. *J. Hepatol.* 2019.
69. Nishida N, Kudo M. Liver damage related to immune checkpoint inhibitors. *Hepatol Int.* 2019;13(3):248-252. doi:10.1007/s12072-018-9921-7
70. Rigopoulou EI, Suri D, Chokshi S, Mullerova I, Rice S, Tedder RS, et al. Lamivudine plus interleukin-12 combination therapy in chronic hepatitis B: antiviral and immunological activity. *HEPATOLOGY* 2005; 42:1028-1036.
71. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nature Immunology.* 2011; 12: 492–499 figura 8).
72. Ferrari C, Boni C, Rossi M, Vecchi A, Barili V, Laccabue D, Fisicaro P, Missale G. T cell regulation in HBV-related chronic liver disease. *J Hepatol.* 2017 May;66(5):1096-1098. doi: 10.1016/j.jhep.2016.10.002. Epub 2017 Feb 8.

73. Peppas D, Micco L, Javaid A, Kennedy PT, Schurich A, Dunn C, et al. Blockade of immunosuppressive cytokines restores NK cell antiviral function in chronic hepatitis B virus infection. *PLoS Pathog* 2010;6: e1001227.
74. Boni C, Bertolotti A, Penna A, Cavalli A, Pilli M, Urbani S, et al. Lamivudine treatment can restore T cell responsiveness in chronic hepatitis B. *J Clin Invest* 1998;102:968-975.
75. Boni C, Penna A, Bertolotti A, Lamonaca V, Rapti I, Missale G, et al. Transient restoration of anti-viral T cell responses induced by lamivudine therapy in chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2003;39:595-605.

## RINGRAZIAMENTI

*Desidero ringraziare il Prof. Carlo Ferrari ed il Prof. Massimo Levrero per avermi seguito nel percorso di formazione, contribuendo al raggiungimento di questo prestigioso obiettivo.*

*Doverosa gratitudine va nondimeno alla D.ssa Paola Fisicaro ed a tutti i membri del Laboratorio di Immunopatologia virale dell' AOU di Parma per avermi insegnato con pazienza e umiltà, facendomi sempre sentire parte del gruppo.*

*Alla mia famiglia, solida radice nel terreno.*

*A Maria, custode dei miei occhi e del mio cuore.*

*A Lorenzo, padrone di ogni singolo respiro e pensiero della mia vita su questa terra.*