

## PREMIO NOBEL PER LA FISIOLOGIA O LA MEDICINA 2020

*assegnato a*

**Harvey J. Alter, Michael Houghton and Charles M. Rice**

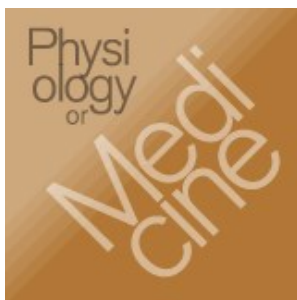
*"for the discovery of Hepatitis C virus "*

*di Enzo Tramontano\**

*Il frutto di un lavoro lento, fatto di piccoli tasselli aggiunti anno dopo anno, con pazienza, senza lasciarsi scoraggiare dai numerosi fallimenti, sfruttando le nuove tecnologie di volta in volta disponibili. Un esempio di un percorso di successo sviluppato secondo le modalità più classiche della ricerca in ambito biologico. Una serie di scoperte che hanno permesso di mettere a punto metodologie di monitoraggio sanguigno che ha portato a eliminare il rischio di epatite a seguito di trasfusione del sangue.*



\* Professore di Microbiologia e Virologia all'Università di Cagliari

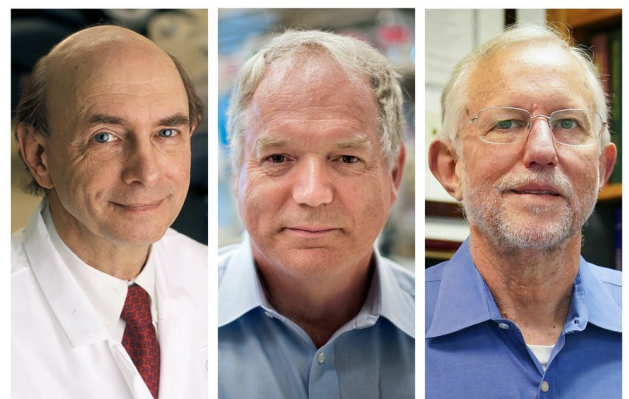


Il premio Nobel per la Fisiologia o Medicina del 2020 è stato assegnato a tre scienziati che hanno contribuito a scoprire il virus dell'epatite C (HCV, *Hepatitis C Virus*): gli statunitensi Harvey Alter e Charles Rice e il britannico Michael Houghton.

L'HCV determina lo sviluppo di epatiti acute e croniche che comprendono effetti lievi e transitori (circa il 30% dei casi), oppure casi più gravi in cui si sviluppa un'infezione cronica (70% dei casi) che può portare a cirrosi (circa il 20% dei casi a 20 anni dall'infezione) e a un significativo aumento del rischio di sviluppare un epatocarcinoma (rischio 17 volte maggiore di una persona HCV-negativa) [1].

A oggi si ritiene che ci siano circa 71 milioni di persone al mondo con una infezione cronica da HCV (in Italia si stima un tasso di infezione dell'11% della popolazione), e si è stimato che nel solo 2016 circa 400.000 persone siano morte a seguito di infezione con HCV, principalmente per lo sviluppo di cirrosi epatica ed epatocarcinoma.

L'epatite, un'infezione del fegato, è nota da secoli. Ippocrate la cita nel *De Morbus Internis* parlando di «epidemia di ittero» e la sua natura infettiva era già stata ipotizzata nell'ottavo secolo quando Papa Zaccaria a Roma mise in quarantena tutte le persone con ittero per evitare che la malattia si propagasse fuori città [2]. In tempi più recenti, l'epatite è stata riconosciuta come malattia infettiva a seguito di eventi epidemici che si sono verificati specialmente in occasione della Prima guerra mondiale (per esempio a Gallipoli nel 1915) [3], o durante la Seconda guerra mondiale quando ci furono più di 200.000 casi tra le truppe americane e fino a 5 milioni di casi tra civili e militari tedeschi [4]. Negli anni Trenta e Quaranta del secolo scorso furono anche riportati eventi epidemici dovuti all'uso improprio di siringhe [5] e un'osservazione simile fu fatta fin dal 1885 da A. Lurman che, correlando i fenomeni, si limitò però a notare che molte persone vaccinate per il vaiolo sviluppavano una



*Harvey J. Alter, Michael Houghton and Charles M. Rice*

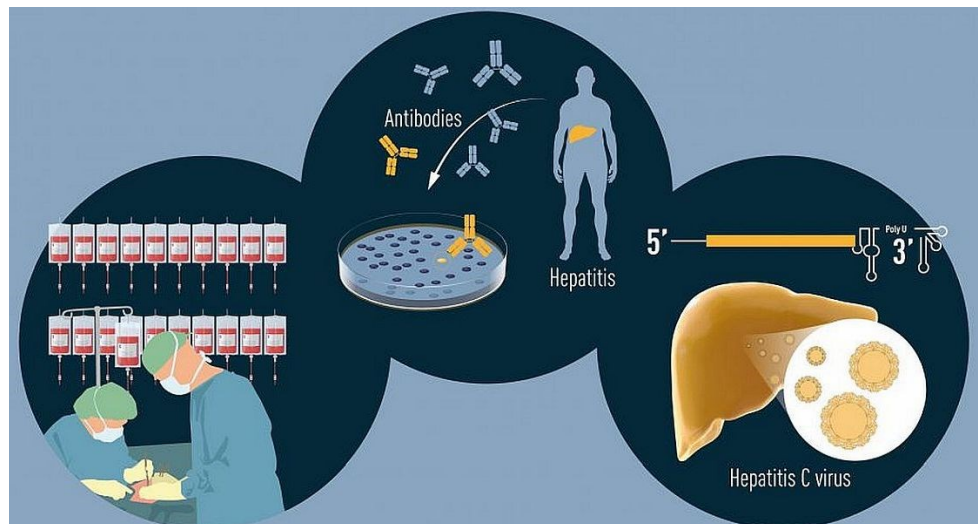
forma di ittero [6]. Simile correlazione fu poi osservata anche per molti altri vaccini: è noto il caso di 50.000 soldati americani che nel 1942 furono vaccinati per la febbre gialla e svilupparono l'ittero [7]. La trasmissione da persona a persona era quindi correlata alle trasfusioni di sangue e all'uso di siringhe: negli anni Sessanta la probabilità di sviluppare un'epatite a seguito di una trasfusione di sangue arrivava a circa il 45% [8, 9]. Sebbene non fosse chiaro quale fosse l'agente infettivo, nel 1947 il medico inglese F.O. MacCallum classificò le epatiti infettive in epatite A ed epatite B, osservando due diverse vie di infezione [10]. Una prima via era di tipo oro-fecale o dovuta all'acquisizione di cibo o acqua contaminata, una seconda era mediata dal siero. Studi svolti su alcuni carcerati e malati mentali americani negli anni Quaranta confermarono queste ipotesi [11].

Negli anni Sessanta il gruppo di ricerca di Baruch Blumberg dimostrò l'associazione dell'epatite di tipo B con un virus (il virus dell'epatite B, un virus a DNA appartenente agli *Hepadnaviridae*) [11]. Questa scoperta valse a Blumberg il premio Nobel per la Medicina nel 1976. Ai primi degli anni Settanta si scoprì poi che l'altro tipo di infezione era dovuto invece a un secondo virus, il virus dell'epatite di tipo A (HAV, un virus con genoma a RNA, appartenente ai *Picornaviridae*) [12]. Negli anni Settanta tuttavia, nonostante questi indubbi successi, un significativo numero di persone trasfuse continuava a sviluppare un'epatite cronica.

È in questo periodo che Harvey Alter si associa al gruppo di ricerca di Blumberg che dirigeva allora la banca del sangue dell'NIH. Qui Alter dimostra che l'80% dei casi di epatiti post-trasfusionali non era correlato all'infezione con HBV. Questa infezione «non B» aveva un periodo di incubazione più breve e sintomi acuti più lievi della infezione dovuta a HBV [13]. Inizialmente si ritenne che l'agente infettivo responsabile dell'epatite A potesse, in certe condizioni, causare questa infezione, ma la scoperta dell'HAV confutò questa ipotesi. Alter, avendo quindi a disposizione l'ampia banca del sangue dell'NIH, poté verificare che i sieri di pazienti «non B» che sviluppavano epatite risultavano anche «non-A», cioè non contenevano né l'HBV né l'HAV [14, 15]. Si ipotizzò quindi la presenza di un agente/i infettivo diverso, responsabile per quella forma di epatite che richiama quella indotta da HBV, ma che portava più frequentemente a forme croniche. Questo tipo di epatite fu designato quindi «epatite non-A, non-B».

Molti casi erano di epatite post-trasfusionali erano quindi dovuti a un diverso agente infettivo e il fatto che molti portatori fossero asintomatici acuiva il problema in quanto essi non erano facilmente identificabili. Il problema sanitario era pertanto particolarmente urgente, perché in assenza di un sistema diagnostico efficace le persone che dovevano subire una trasfusione erano a elevato rischio di sviluppare un'epatite cronica. In effetti, studi epidemiologici recenti, hanno dimostrato che la diffusione epidemica di HCV è stata molto limitata fino alla seconda metà del 1800, si è quindi diffusa in particolare a partire dai primi del 1900 espandendosi con continuità dopo la Seconda guerra mondiale e raggiungendo il suo culmine negli anni Ottanta del secolo scorso [16]. La trasmissione per via sessuale dell'HCV non è infatti molto efficiente, mentre le trasfusioni di sangue, l'uso di prodotti del sangue e l'abuso di droghe assunte per via endovenosa ne ha permesso una espansione incontrollata per diversi decenni.

Alla fine degli anni Settanta Alter fece un passo in avanti: dimostrò che il siero di pazienti con «epatite non-A, non-B», sia acuta sia cronica, potevano trasmettere una forma di epatite agli scimpanzé [17]. La disponibilità di un modello animale aprì nuovi scenari. Si iniziarono a studiare i cambiamenti morfologici delle cellule epatiche a seguito del contagio e Alter propose che la patologia fosse dovuta a un virus che era avvolto da uno strato lipidico (un virus con *envelope*) [18]. In definitiva, le scoperte pionieristiche di Alter hanno portato alla definizione di un'epatite post-trasfusionale con proprie caratteristiche, probabilmente dovuta a un'infezione con un virus non corrispondente a quelli noti al tempo.



(© The Nobel Committee for Physiology or Medicine. III. Mattias Karlén)

Il problema sanitario persisteva e la soluzione era ancora molto lontana così che il rilevamento di questo nuovo agente virale nel sangue da trasfondere rimaneva un'emergenza a livello planetario. È a questo problema che si rivolge Michael Houghton presso i laboratori di una azienda privata, la *Chiron Corporation* in California, che collabora con il *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) americano. Nel 1982 Houghton inizia ad applicare le nuove metodologie molecolari a questo fine. In quegli anni si era infatti sviluppata una tecnica che permetteva di fare una copia del DNA (detto cDNA) e il gruppo di ricerca di Houghton cercava di identificare il cDNA di questo nuovo agente infettivo negli scimpanzé infettati. I tentativi tuttavia sembravano tutti fallimentari: il cDNA identificato apparteneva in realtà agli scimpanzé e non all'agente infettivo. Diversi tentativi di arricchire il campione virale eliminando le sequenze dell'ospite fallirono ugualmente. Numerose tecniche furono messe in campo e gli studi proseguirono infruttuosi per più di sei anni, tanto che Houghton in una intervista ha dichiarato di sentirsi fortunato perché la Chiron in quegli anni non fermò la sua ricerca, perché «oggi se non hai risultati immediati è molto difficile ottenere dei fondi per la ricerca».

L'applicazione di una nuova tecnologia che permetteva di isolare l'RNA dal plasma e generare del cDNA che poi veniva a sua volta trasferito in batteri mediante una metodologia che usava il batteriofago lambda portò un risultato inaspettato. Fu generata una biblioteca di cDNA derivante da RNA di un paziente con una «epatite non-A, non-B» fulminante, da cui furono ottenute un milione di colonie di batteri, ciascuna contenente un diverso cDNA. Lo studio delle sequenze clonate di tutto il milione di colonie batteriche portò alla scoperta di un singolo clone che conteneva una sequenza che non era né umana né di scimpanzé [19]; siamo nel 1987. Era il segnale che Houghton stava cercando invano da sei anni (Houghton ha descritto in dettaglio questo lento processo in un suo interessante articolo) [20]. Quel singolo clone, il clone 5-1-1, conteneva una sequenza di circa 10.000 basi nucleotidiche che poteva codificare per delle proteine e che aveva una lontana somiglianza con alcune sequenze virali appartenenti alla famiglia dei *Flaviviridae* (cfr p.5). Si trattava quindi di un nuovo virus con genoma a RNA con polarità positiva, che poteva cioè essere riconosciuto immediatamente come RNA messaggero dalla cellula ospite e tradotto in proteine. Fu quindi successivamente confermato che le sequenze di questo virus codificavano una proteina che reagiva con il siero di scimpanzé infettati con il virus «dell'epatite non-A, non-B», ma non con il siero di animali infetti con HAV o HBV, e con sieri di pazienti italiani, giapponesi e americani [21]. Il virus venne quindi denominato HCV.

Mancava tuttavia la prova definitiva dell'associazione dell'HCV all'epatite secondo i postulati di Koch: verificare cioè se l'infezione di HCV potesse portare all'epatite con la storia naturale descritta, o se fosse necessaria la presenza di altri fattori. Per questa dimostrazione era necessario isolare un virus capace di indurre una epatite acuta e una epatite cronica. Il gruppo di ricerca di Charles Rice presso la *Washington University* a St. Louis entra in gioco a questo punto della storia, perché aveva identificato una porzione non-codificante per alcuna proteina, presente all'estremità 3' del genoma virale e che Rice pensava fosse rilevante proprio per la replicazione del virus [22]. Replicazione che nessuno aveva ancora mai osservato. Rice aveva quindi usato tale sequenza nel cercare di ricostruire un virus replicante, ma i tentativi erano falliti. Tuttavia, era già noto a Rice che i virus, in particolare i virus con genoma a RNA, sono particolarmente pronti a mutare, per cui Rice pensò che fosse possibile che la sequenza da lui finora utilizzata potesse aver subito una mutazione che la inattivasse. Pertanto, la sostituì con una sequenza «consenso», cioè una sequenza che indicasse una più alta probabilità di essere ritrovata nel maggior numero dei virus, e iniettò l'RNA di questo virus ricombinante nel fegato di scimpanzé. Con sorpresa osservò che si instaurò un'infezione che produceva virus a sua volta infettante, che gli animali infetti sviluppavano una patologia che seguiva il corso naturale descritto per «l'epatite non-A, non-B», e infine che il virus si ritrovava nel sangue degli scimpanzé per diversi mesi [23]. Il lavoro di Rice dimostrò in modo definitivo che l'HCV da solo era l'agente eziologico dell'epatite che si osservava nei pazienti di diverse parti del mondo.

Nel complesso si è trattato di un lavoro lento, fatto di piccoli tasselli aggiunti pezzo dopo pezzo, anno dopo anno, decennio dopo decennio, con pazienza, non facendosi scoraggiare dai numerosi fallimenti, sfruttando sempre le nuove tecnologie di volta in volta sviluppate per poter rispondere alle nuove domande, fino a raggiungere la risposta cercata. Un esempio di un lavoro messo a disposizione della comunità scientifica nel tempo, che ha portato a un successo secondo le modalità più classiche della ricerca in ambito biologico.

Un esempio, ancora una volta, di come lo studio di un virus

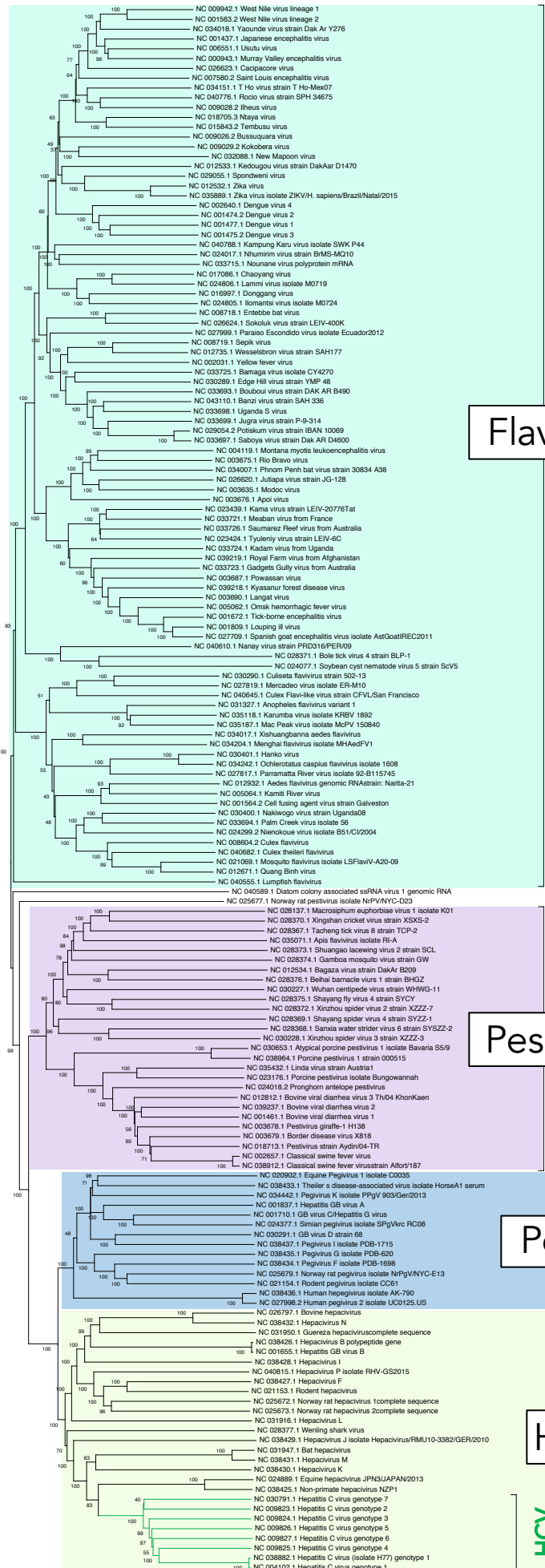
abbia portato a scoperte tanto rilevanti da meritare un premio Nobel (le scoperte fatte da virologi sono tra le più premiate in assoluto in ambito biologico).

Queste scoperte hanno permesso di mettere a punto metodologie di monitoraggio sanguigno che hanno portato a eliminare il rischio di epatite a seguito di trasfusione del sangue. La storia però non è finita qui. I premiati per il Nobel non possono essere più di tre. Forse per questo il tedesco Ralph Bartenschlager dell'Università di Heidelberg, che ha costruito il primo sistema per studiare la replicazione di HCV in cellule epatiche (un replicone) [24], non è stato premiato. Dalla sua scoperta e da quella successiva che ha permesso di migliorare la tecnologia usata e isolare dei virus che si adattassero a delle linee cellulari [25], producendo così virus infettanti, si sono poi ottenuti altri modelli animali più semplici degli scimpanzé. Questi modelli sono poi stati usati per identificare una serie di nuove molecole che hanno rivoluzionato la terapia anti-HCV trasformando una patologia con elevata mortalità in una infezione completamente curabile (solo in Italia sono state già curate circa 200.000 persone). Forse un altro premio Nobel è ancora da assegnare.

*Enzo Tramontano*

*(Professore di Microbiologia e Virologia all'Università di Cagliari)*

# L'albero filogenetico dell'HCV



Flavivirus

Pestivirus

Pegivirus

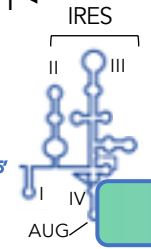
Hepacivirus

HCV



# RNA genomico HCV (NC\_004102)

1



5'UTR

3'UTR

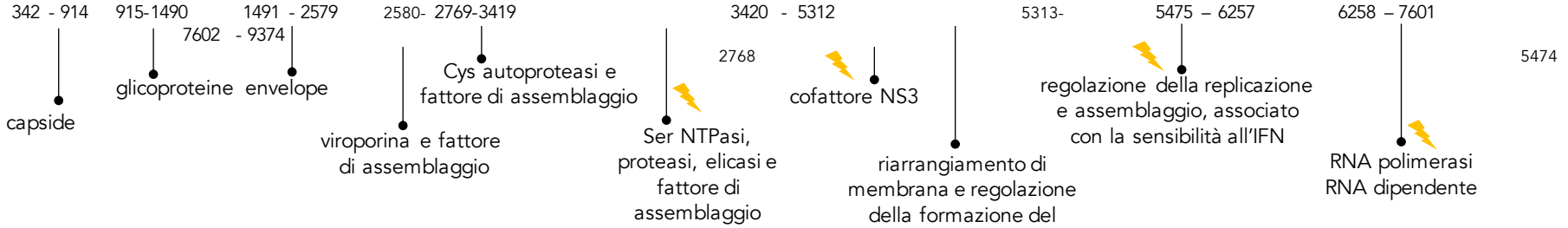


proteine strutturali

proteine non strutturali



nt



- 🔴 taglio proteolitico con peptidasi del segnale cellulare
- 👇 taglio autoproteolitico NS2
- 👇 taglio proteolitico NS3
- ⚡ Target antivirali diretti

**Indicazioni bibliografiche**

1. De Oliveria Andrade et al. Association Between Hepatitis C and Hepatocellular Carcinoma. *J Glob Infect Dis.* 2009, 1: 33–37.
2. Martin NA et al. The discovery of viral hepatitis: A military perspective. *J R Army Med. Corps* 2003, 149: 121–124.
3. Macpherson WG et al. Epidemic catarrhal jaundice, in *History of the Great War Based on Official Documents: Medical Services, in Diseases of the War.* London, His Majesty's Stationery Office, 1921, 1: 395-400.
4. Sherlock S Landmarks in Viral Hepatitis *JAMA* 1984, 252: 402-406.
5. MacCallum FO. Jaundice in syphilitics. *Br J Vener Dis* 1943, 19: 63.
6. Lurman A. Eine icterus epidemic. *Berl Klin Wo- schenschr* 1885, 22: 20–23.
7. Seeff LB. A serologic follow-up of the 1942 epidemic of post-vaccination hepatitis in the United States Army. *New Engl J Med* 1987, 316: 965–970.
8. Feinstone SM et al. Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. *Science* 1973, 182: 1026-1028.
9. Engle RE et al. Transfusion-associated hepatitis before the screening of blood for hepatitis risk factors. *Transfusion.* 2014, 54: 2833–2841.
10. MacCallum FO. Homologous serum jaundice [An icterus epidemic]. *Lancet* 1947, 2: 691-692.
11. Thomas E et al. Viral Hepatitis: Past and Future of HBV and HDV *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015, 5: a021345.
12. Provost PJ & Hilleman MR. Propagation of human hepatitis A virus in cell culture in vitro. *Proc Soc Exper Biol Med* 1979, 160: 213-221.
13. Alter HJ et al. Posttransfusion hepatitis after exclusion of commercial and hepatitis-B antigen-positive donors. *Ann Intern Med* 1972, 77: 691-699.
14. Alter HJ et al. Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis. *Lancet* 1975, 2: 838-841.
15. Feinstone SM et al. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med* 1975, 292: 767-770.
16. Magiorkinis G et al. The Global Spread of Hepatitis C Virus 1a and 1b: A Phylogenetic and Phylogeographic Analysis *PloS Medicine.* 2009, 6: e1000198.
17. Alter HJ et al. Transmissible agent in non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 1978, 1: 459-463
18. Feinstone SM et al. Inactivation of hepatitis B virus and non-A, non-B hepatitis by chloroform. *Infect Immun* 1983, 41: 816-821.
19. Choo QL et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989, 244: 359-362.
20. Houghton M The long and winding road leading to of the hepatitis C virus *Journal of Hepatology* 2009, 51: 939–948.
21. Kuo G et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989, 244: 362-364.
22. Kolykhalov AA et al. Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol* 1996, 70: 3363-3371.
23. Kolykhalov AA, et al. Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science* 1997, 277: 570-574.
24. Lohmann V et al. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 1999, 285: 110-113.
25. Wakita T, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 2005, 11: 791-796.

