

Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Biologia
Corso di Laurea Magistrale in Biotecnologie Industriali



**Screening di una libreria di farmaci approvati dalla FDA
per l'identificazione di inibitori dell'ingresso di virus
altamente patogeni.**

Relatore: Prof. Cristiano Salata
Dipartimento di Medicina Molecolare

Controrelatore: Prof. Stefano Cagnin
Dipartimento di Biologia

Laureando: Luca Violino

Anno Accademico 2023/2024

Indice

1. ABSTRACT	1
2. INTRODUZIONE	2
2.1 Malattie infettive emergenti	2
2.2 Rabbia	2
2.2.1 Epidemiologia.....	3
2.2.2 Patogenesi	4
2.2.3 Struttura del virus.....	5
2.2.4 Ciclo replicativo.....	6
2.2.5 Diagnosi	12
2.2.6 Terapia e profilassi.....	15
2.3 Febbre emorragica della Crimea e del Congo.....	16
2.3.1 Epidemiologia.....	16
2.3.2 Patogenesi e diagnostica	18
2.3.3 Struttura del virus.....	20
2.3.4 Ciclo replicativo.....	23
2.3.5 Terapia e profilassi.....	24
2.4 Virus della stomatite vescicolare	27
2.5 Virus pseudotipizzati.....	28
2.6 Drug repurposing	29
3. SCOPO DELLA TESI	30
4. MATERIALI E METODI	30
4.1 Linee cellulari	30
4.2 Ceppo batterico	31
4.3 Plasmidi	31
4.4 Virus	31
4.5 Anticorpi.....	32
4.6 Produzione plasmidica	32
4.6.1 Preparazione batteri competenti.....	32
4.6.2 Trasformazione di batteri competenti	32
4.6.3 Produzione del DNA plasmidico	33
4.6.4 Purificazione del DNA plasmidico	33

4.6.5 Quantificazione del DNA plasmidico	34
4.7 Tecniche di biologia cellulare.....	35
4.7.1 Trasfezione del DNA plasmidico.....	35
4.7.2 Pseudotipizzazione virale.....	35
4.7.3 Concentrazione dei virus pseudotipizzati tramite ultracentrifugazione	36
4.7.4 Determinazione titolo virale.....	36
4.8 Libreria di farmaci	37
4.9 Saggio di luciferasi.....	37
5. RISULTATI.....	38
5.1 Produzione DNA plasmidico.....	38
5.2 Produzione e titolazione dei virus pseudotipizzati	39
5.3 Screening libreria di farmaci	41
6. DISCUSSIONE	44
7. BIBLIOGRAFIA.....	48

1. ABSTRACT

Al giorno d'oggi esistono ancora numerose malattie causate da virus altamente patogeni per le quali non esistono vaccini o farmaci approvati. In particolare, i virus della rabbia e il virus della febbre emorragica della Crimea e del Congo (CCHFV) sono i due casi specifici che verranno trattati in questa tesi. Questi due virus causano numerose vittime, in particolare in paesi in via di sviluppo in cui la presenza di animali non vaccinati o la presenza di zecche infette è ancora elevata e dove la mancanza di fondi e la difficoltà nell'applicare un controllo adeguato rendono complessa la gestione della diffusione della malattia. Il CCHFV può essere manipolato esclusivamente in laboratori con un livello di biosicurezza di livello 4 (BSL4), mentre quello della rabbia in condizioni di BSL3. Per facilitare la ricerca su questi virus sono stati sviluppati dei modelli al fine di poterli studiare in laboratori con un livello di sicurezza BSL2. Tra i vari modelli vi è quello basato sul virus della stomatite vescicolare (VSV) pseudotipizzato. Questo sistema prevede l'utilizzo di un VSV ricombinante (rVSV) che non produce la propria glicoproteina ma che è in grado di acquisire nel suo involucro le glicoproteine di virus eterologhi, acquisendo così il tropismo cellulare del virus che fornisce le glicoproteine

Gli pseudovirus sono stati prodotti con l'obiettivo di testare una libreria di 1300 farmaci approvati dall'FDA per individuare, grazie a un'operazione di screening, quali di questi possono essere degli inibitori dell'ingresso in vitro seguendo così il principio del drug repurposing. La procedura di screening, al momento ancora parziale, ha consentito di individuare dei candidati che passeranno alla fase successiva di validazione della loro attività antivirale.

2. INTRODUZIONE

2.1 Malattie infettive emergenti

Le malattie infettive rappresentano un onere significativo per la salute pubblica e la stabilità economica delle società di tutto il mondo. La minaccia rappresentata dalle malattie infettive è ulteriormente aggravata dal continuo emergere di nuovi focolai epidemici o di nuovi agenti patogeni con un impatto globale molto considerevole. Negli ultimi 35 anni sono emersi almeno 30 nuovi agenti infettivi che colpiscono l'uomo, la maggior parte dei quali sono zoonotici e sia la loro origine che la loro diffusione hanno dimostrato di essere correlate in modo significativo con fattori ambientali, socioeconomici ed ecologici (Nii-Trebi, 2017). Questi fattori col passare degli anni rendono sempre più facili movimenti di persone, animali e altri possibili vettori, aumentando il rischio di contatto con gli agenti patogeni che causano la malattia, facendo in modo che le malattie infettive possano continuare a rappresentare una sfida difficilmente affrontabile. La costante consapevolezza e il perseguimento di strategie efficaci per il controllo delle malattie infettive rimangono quindi cruciali. Al momento esistono numerose malattie infettive per cui non esiste un vaccino o una terapia approvati e che dunque non sono trattabili, se non con cure palliative. Numerosi studi negli ultimi anni hanno messo in evidenza la portata, le dinamiche e i progressi nella gestione delle malattie infettive, con particolare attenzione alle malattie infettive emergenti (EID) e alle malattie infettive tropicali trascurate che rappresentano un grosso problema di sanità pubblica.

2.2 Rabbia

La rabbia ha una lunga storia che ha plasmato la salute sia umana che animale sin dall'inizio dei casi riportati molti secoli fa. La sua notorietà come malattia invariabilmente fatale in seguito all'insorgenza delle manifestazioni cliniche mantiene la sua reputazione di patogeno da temere in tutte le popolazioni nelle aree in cui il virus circola, oltre che attraverso il timore di reintroduzione in aree indenni dalla rabbia. Infatti, sebbene la rabbia canina sia controllata grazie alla vaccinazione, l'esistenza di serbatoi di rabbia nella fauna selvatica simpatica (che si verificano nella stessa area) diventa spesso più evidente. Inoltre, la rabbia silvestre (che colpisce la fauna selvatica) è stata identificata in paesi che sono stati storicamente considerati esenti da rabbia indicando un'espansione di questa malattia laddove non siano applicate appropriate misure di controllo.

2.2.1 Epidemiologia

La rabbia causa circa 59.000 decessi all'anno a livello globale e la perdita di 3,7 milioni di anni di vita (DALY)(Liu et al., 2020). La rabbia umana è una zoonosi inclusa tra le cosiddette malattie trascurate ed è rilevante soprattutto nei paesi con risorse limitate in Africa e in Asia (Figura 1), dove l'impatto della malattia aumenta in modo sproporzionato tra la popolazione e la mortalità è elevata. È stato stimato che una persona muore di rabbia, in un paese in cui la rabbia è endemica, ogni 10-20 minuti e che il 40-50% dei decessi riguarda i bambini minori di 15 anni (Fooks et al., 2017). I bambini sono più suscettibili a causa della loro natura curiosa e della loro bassa statura, il che li rende più propensi a subire una ferita in una posizione anatomica ad alto rischio come la testa, pertanto, nei paesi endemici, la rabbia dovrebbe essere considerata una malattia pediatrica trascurata. La trasmissione da parte di cani domestici non vaccinati è responsabile della maggior parte dei casi di rabbia umana in tutto il mondo. La vaccinazione di massa dei cani domestici è stata una strategia efficace per ridurre la prevalenza della rabbia in molti paesi dell'Africa, dell'Asia, dell'Europa e delle Americhe. In Europa, le campagne di vaccinazione orale hanno dimostrato la fattibilità dell'eliminazione della rabbia dai serbatoi della fauna selvatica.

La stragrande maggioranza dei decessi umani è causata dal morso di un cane infetto con il virus della rabbia classica, indicato come virus della rabbia (RABV) (Banyard & Tordo, 2018). Il virus della rabbia è il prototipo del genere *Lyssavirus*, della famiglia *Rhabdoviridae* (Davis et al., 2015). Ci sono 16 specie ufficialmente classificate di lyssavirus con altre due specie in attesa di classificazione. Sedici delle 18 specie di lyssavirus proposte sono state rilevate nei pipistrelli e quindi si ipotizza che tali animali rappresentino il serbatoio originale dei lyssavirus. Si pensa che tutti i membri del genere siano in grado di causare malattia nell'uomo ricapitolando la sintomatologia della rabbia classica. Ad oggi i lyssavirus non-RABV sono stati segnalati solo occasionalmente come causa di mortalità umana o animale. Tuttavia, queste infezioni da lyssavirus possono essere erroneamente diagnosticate come RABV attraverso test diagnostici di routine non discriminatori (Davis et al., 2015). La continua circolazione di lyssavirus nei pipistrelli potrebbe mettere a dura prova gli sforzi globali di eradicazione della rabbia classica, a causa delle difficoltà nello sviluppo e nella somministrazione di vaccini a queste specie altamente mobili e scarsamente accessibili che potranno reintrodurre negli animali selvatici lyssavirus in grado di causare malattia nell'uomo.

La mancanza di programmi di sorveglianza, dovuta alle disponibilità economiche limitate dei servizi sanitari nei paesi a basso reddito, si traduce in una sottostima dei casi umani, che è ulteriormente aggravata da tabù culturali, religiosi e sociali. Inoltre, nell'uomo, la rabbia può presentarsi con sintomi comuni ad altre condizioni clinicamente indistinguibili (ad esempio, la sindrome di Guillain-Barré e la malaria

cerebrale). Di conseguenza, senza la conferma della diagnosi utilizzando appropriati protocolli di laboratorio, la rabbia potrebbe essere diagnosticata erroneamente. Queste imprecisioni nella raccolta di dati empirici sull'incidenza della malattia possono contribuire nello scoraggiare i responsabili politici dal considerare la rabbia come una malattia ad alta priorità.

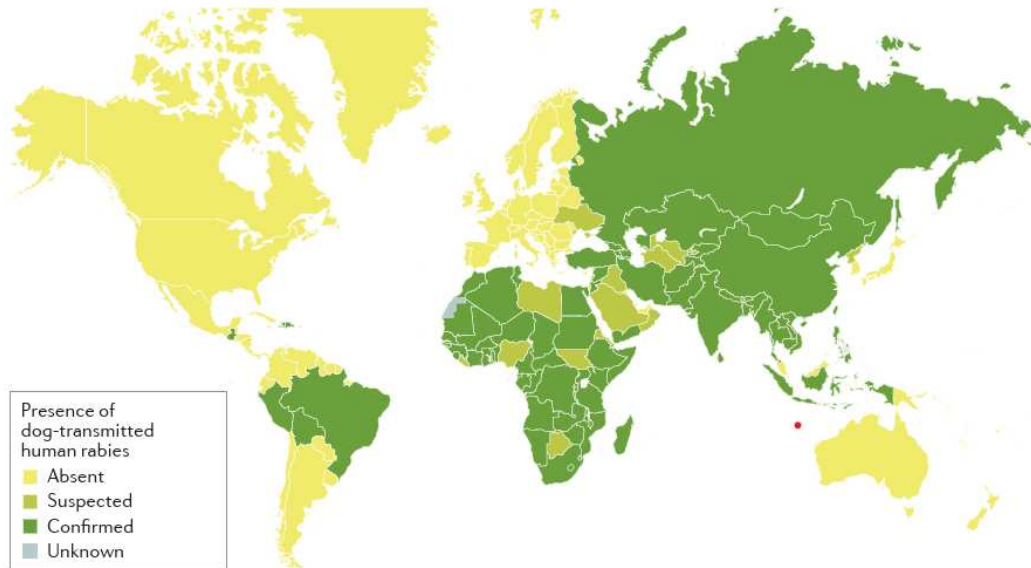


Figura 1 Distribuzione globale dei casi di rabbia trasmessa da cane a uomo. (WHO. Rabies epidemiology and burden disease. 2017)

2.2.2 Patogenesi

Una maggiore conoscenza dei meccanismi di base relativi alle interazioni del virus con la cellula o a livello dell'organismo può fornire delle informazioni essenziali per comprendere meglio la patogenesi, e quindi sviluppare degli approcci per arrestare l'evoluzione delle fasi cliniche della malattia. Le descrizioni cliniche hanno riportato diverse manifestazioni della rabbia, non correlabili direttamente con il sito di replicazione virale nel cervello. Sono generalmente riconosciute due forme classiche di rabbia: la rabbia furiosa (detta anche encefalitica) e la rabbia paralitica. I fattori che determinano lo sviluppo di entrambe le forme rimangono indefiniti, ma ogni forma può essere caratterizzata da sintomi specifici, anche se la definizione del caso può essere stabilita con certezza solo quando la malattia raggiunge la fase neurologica acuta. I periodi di incubazione possono variare considerevolmente, anche se la maggior parte dei pazienti sviluppa sintomi entro 20-90 giorni dopo l'esposizione (Figura 2). La causa di questa variabilità è probabilmente multifattoriale e può includere il sito di ingresso del virus (ossia la distanza tra il sito di inoculo del virus ed il cervello), la carica virale, la specie, il ceppo del virus infettante e la competenza immunologica dell'ospite. I sintomi iniziali sono scatenati dalla replicazione virale nei gangli della radice dorsale e comprendono dolore e/o prurito. Dopo una breve fase prodromica, il paziente entra

nella fase neurologica acuta della malattia, che è caratterizzata da particolari manifestazioni cliniche. La rabbia furiosa si presenta tipicamente durante questa fase con agitazione intermittente, ipersalivazione e idrofobia (una risposta di fuga ai liquidi). Al contrario, la forma paralitica si presenta con debolezza muscolare e, eventualmente, paralisi e generalmente una fase neurologica acuta più lunga della rabbia furiosa. Entrambe le forme di rabbia portano al coma e alla morte.

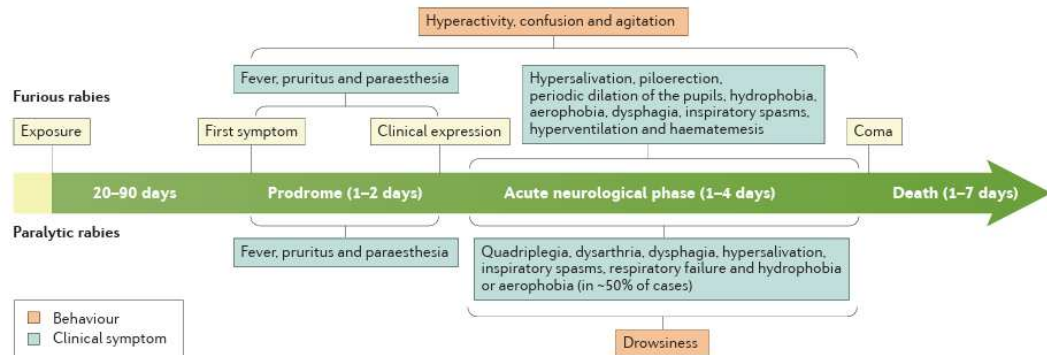


Figura 2 Lo spettro della rabbia clinica. La presentazione clinica della rabbia può variare notevolmente da un paziente all'altro, il che rende problematica la diagnosi sulla base dei sintomi osservati. (Bente et al., 2013)

2.2.3 Struttura del virus

Il virus, dotato di envelope, presenta una tipica forma a proiettile e all'interno troviamo il genoma ed una serie di proteine strutturali. Il genoma del lyssavirus è costituito da un singolo filamento di RNA a senso negativo, di circa 12 kilobasi. Questo RNA virale codifica cinque proteine virali: nucleocapside (N), fosfoproteina (P), matrice (M), glicoproteina (G) e la RNA polimerasi RNA dipendente (L) (Figura 3). Il genoma virale funge da stampo per due azioni primarie essenziali: la trascrizione dei cinque RNA messaggeri virali (mRNA) e la replicazione che avviene grazie ad un filamento di RNA antigenomico a senso positivo che funge da intermedio di replicazione per la generazione di genomi di RNA nascenti a filamento negativo (Davis et al., 2015). L'RNA virale è incapsulato dalla proteina N, mentre le proteine P e L costituiscono il complesso catalitico che esegue sia la trascrizione che la replicazione. Questa unità di base dell'RNA genomico virale con le tre proteine di supporto è comunemente chiamata complesso ribonucleoproteico (RNP). All'interno del virione, l'RNP elicoidale è circondato

dalla proteina M, che media le interazioni tra il genoma incapsulato e le code citoplasmatiche della proteina G incorporate nell'envelope.

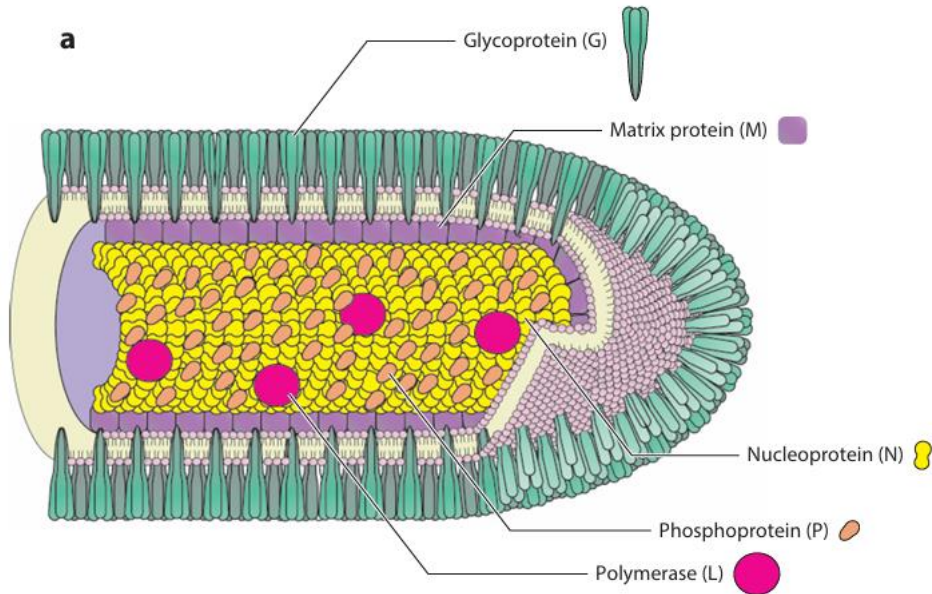


Figura 3 Una particella del virus della rabbia (RABV), composta dalla membrana derivata dalla cellula ospite e dalle cinque proteine virali (Davis et al., 2015)

2.2.4 Ciclo replicativo

La prima fase del ciclo di replicazione del virus è mediata dalla proteina G del virus che interagisce con i recettori cellulari dell'ospite innescando l'endocitosi del virione. Il pH degli endosomi tardivi promuove la fusione G-mediata tra l'involucro virale e la membrana dell'endosoma, rilasciando il complesso RNP nel citoplasma (Guo et al., 2019). Il complesso della polimerasi virale, formato dalle proteine L e P, utilizza l'RNA genomico del virus come stampo per cicli ripetitivi di trascrizione (Figura 4). I livelli di espressione degli mRNA dei rhabdovirus, e quindi delle proteine che codificano, sono massimi all'estremità 3' del genoma e diventano sequenzialmente meno abbondanti verso il 5' del genoma, secondo nell'ordine $N > P > M > G > L$. Questa diminuzione è dovuta alla dissociazione della polimerasi dall'RNP durante la trascrizione quando viene raggiunto un segnale di terminazione, richiedendo alla polimerasi di riattivarsi per avviare la trascrizione del gene a valle. La replicazione virale inizia una volta che è stata prodotta una certa soglia di N virale, e per RABV, si pensa che questa sia regolata dai livelli di M. Per la replicazione, la polimerasi virale passa ad una modalità più processiva, producendo un antigenoma a RNA a polarità positiva. Questo intermedio funge quindi da modello per la produzione di genomi a senso negativo di lunghezza intera

(Figura 5). Infine, il meccanismo di gemmazione del rhabdovirus inizia con l'inserzione della glicoproteina G nella membrana della cellula ospite. La proteina M associata all'RNP interagisce con la coda citoplasmatica dei trimeri di G che si formano a livello della membrana cellulare, innescando la gemmazione del virus dalla membrana della cellula ospite. Nonostante le strette somiglianze nella morfologia e nel ciclo vitale, i vari membri della famiglia dei rhabdovirus hanno un'ampia gamma di specie ospiti e di fenotipi in vivo. Ad esempio, il rhabdovirus meglio studiato, oltre al RABV, è il virus della stomatite vescicolare (VSV), un agente patogeno dei bovini che non causa gravi malattie nell'uomo. Lo stretto tropismo cellulare di RABV, l'assenza di effetto citopatico e il lungo tempo di incubazione possono essere contrapposti all'ampio tropismo cellulare, al ciclo di vita citotossico e alla rapida replicazione di VSV indicando un diverso livello di adattamento all'ospite: mentre RABV ha un tropismo specifico per i mammiferi, il VSV sembrerebbe essere trasmesso da vettori invertebrati. Altri rhabdovirus invece infettano pesci, insetti e piante, dimostrando così un'ampia variabilità di comportamento (Davis et al., 2015).

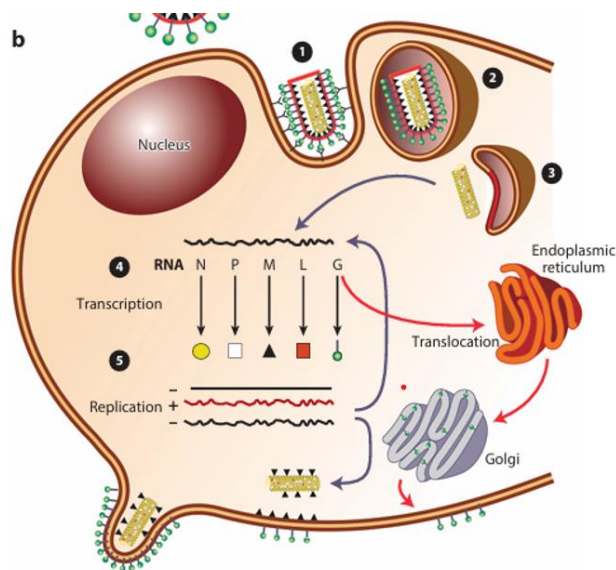


Figura 4 Ciclo di vita di RABV. Una particella RABV si attacca a un recettore della cellula ospite ed è internalizzato dalla membrana della cellula ospite. Dopo la fusione della membrana virionica con la membrana endosomiale, mediata dal pH, il capsidone viene rilasciato, i singoli geni trascritti e il genoma replicato (Davis et al., 2015).

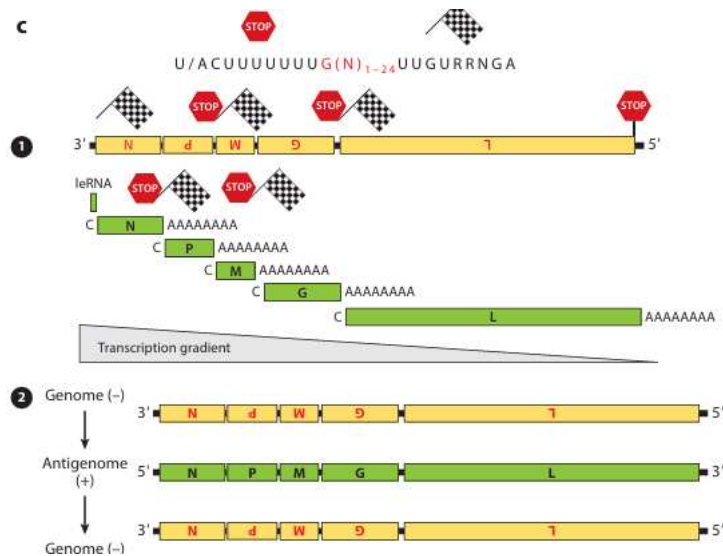


Figura 5 La strategia di trascrizione e replicazione di RABV. L'RNA genomico a senso negativo (giallo) è il modello per il complesso L-P polimerasi. Durante la trascrizione sono prodotti cinque mRNA 5'-end-caped (C) e poliadenilati (AAAAAAA) (verde) che codificano le proteine virali. Il complesso polimerasi si dissocia dal modello ad ogni segnale di terminazione (STOP). La polimerasi non sempre si riattiva con successo, portando a un gradiente di trascrizione negativo. Durante la replicazione, il genoma a senso negativo viene copiato dalla polimerasi virale in una forma di RNA antigenomica a senso positivo (verde). Questo antigenoma viene quindi trascritto in un RNA a senso negativo per generare molte copie di genoma virale e completare la fase di replicazione. (Davis et al., 2015).

Un punto critico è l'interazione tra il virus e la cellula ospite, evento che è mediato dalle interazioni della glicoproteina G con i recettori cellulari e che determina anche il tropismo cellulare/tissutale. Sono stati condotti diversi studi per identificare le molecole di superficie sulla cellula ospite in grado di interagire con le strutture trimeriche della proteina G per mediare l'ingresso virale nella cellula. Ad oggi sono state individuate diverse molecole che possono fungere da recettori virali o comunque molecole che garantiscono l'adesione del virus, quali: il recettore nicotinico dell'acetilcolina (nAChR), la molecola di adesione delle cellule neuronali (NCAM), il recettore della neurotrofina p75 (p75NTR), il recettore metabotropico del glutammato sottotipo 2 (mGluR2), oltre a vari carboidrati e glicosidi.

RABV si lega alle regioni con un'alta densità di nAChR a livello della membrana post-sinaptica delle giunzioni neuromuscolari (NMJ). Un peptide di 32 residui situato nelle posizioni 173-204 sulla subunità nAChR $\alpha 1$ è il principale sito di legame di RABV. nAChR non solo agisce come recettore RABV per l'infezione a livello muscolare, ma influenza anche l'infettività di RABV nelle cellule neuronali. È stato osservato che il nAChR si trova sulla membrana muscolare postsinaptica dei NMJ, non sulla membrana nervosa presinaptica, suggerendo che il nAChR determini l'infezione da RABV nelle cellule muscolari. Il ruolo dettagliato del nAChR nell'infezione e la possibilità che altre isoforme siano coinvolte nel legame di RABV necessitano di ulteriori indagini.

Il secondo recettore che è stato identificato è l'NCAM, o CD56, che è una glicoproteina di superficie cellulare che appartiene alla superfamiglia delle immunoglobuline (Ig). L'NCAM si divide in tre isoforme principali in base alla lunghezza della coda citoplasmatica: l'NCAM 120, NCAM140 e NCAM180. I domini extracellulari di queste tre forme contengono cinque domini simili alle Ig e due domini della fibronectina di tipo III (FNIII). L'NCAM si accumula sulla superficie cellulare dei neuroni e svolge un ruolo cruciale nel mantenimento della struttura sinaptica e nella regolazione della plasticità sinaptica, nonché nel collegamento dei neuroni in via di sviluppo con l'ambiente extracellulare. Le linee cellulari sensibili al RABV esprimono NCAM sulla superficie cellulare, mentre le linee cellulari resistenti non lo fanno. L'incubazione con RABV diminuisce l'espressione di NCAM, mentre il trattamento con ligandi o anticorpi contro NCAM riduce l'infezione da RABV. Inoltre, nei topi con ridotta presenza di NCAM la mortalità per rabbia è ritardata e l'invasione cerebrale di RABV è drasticamente limitata, suggerendo che NCAM sia un recettore del virus in vivo (Thoulouze et al., 1998).

p75NTR, chiamato anche recettore del fattore di crescita nervoso a bassa affinità (LNGFR), appartiene alla super famiglia dei recettori del fattore di crescita nervoso (NGFR) e ha una conformazione transmembrana. p75NTR è costituito da quattro domini extracellulari ricchi di cisteina (CRD) e da un dominio di morte intracellulare di tipo II (Guo et al., 2019). Questo recettore svolge un ruolo cruciale nello sviluppo del sistema nervoso ed è coinvolto in una vasta gamma di risposte cellulari, tra cui l'apoptosi, la sopravvivenza, la crescita dei neuriti, la migrazione e l'arresto del ciclo cellulare. Le CRD N-terminali di p75NTR e le strutture trimeriche della proteina virale G sono responsabili di questa specifica interazione con elevata affinità. p75NTR è considerato non essenziale per l'infezione da RABV sia in vivo che in vitro. Sebbene sia stato riportato che p75NTR facilita e accelera il trasporto assonale retrogrado intracellulare di RABV (descritto più avanti), il ruolo completo di p75NTR nei meccanismi di legame e trasporto di RABV rimane poco chiaro.

Recenti studi hanno identificato un nuovo recettore per RABV, mGluR2. mGluR2, uno degli otto diversi tipi di mGluR, appartiene al gruppo C dei recettori accoppiati a proteine G (GPCR). Questa proteina strutturalmente conservata ha sette domini transmembrana ed è espressa abbondantemente nel SNC mentre lo è raramente in altri tessuti. mGluR2 svolge funzioni vitali nel sistema nervoso centrale e periferico perché è un recettore per un importante neurotrasmettitore eccitatorio (L-glutammato). Grazie a saggi di coimmunoprecipitazione e di immunoistofluorescenza è stato possibile dimostrare l'interazione diretta di mGluR2 con RABV G per mediare l'ingresso, l'internalizzazione e il trasporto del virus agli early endosomes (EE) e agli endosomi tardivi (LE). L'abbattimento di mGluR2 riduce drasticamente l'infezione da RABV ed analogamente gli anticorpi contro mGluR2 bloccano l'infezione da RABV in vitro. Tutti questi risultati

suggeriscono che mGluR2 sia un recettore funzionale aggiuntivo che media l'ingresso di RABV.

L'interazione con recettori specifici sulle cellule ospiti innesca il processo seguente di internalizzazione virale. Il raggruppamento dei recettori sulla superficie cellulare è associato all'attivazione delle vie a valle. I virus utilizzano vari meccanismi pinocitici di endocitosi, tra cui l'endocitosi mediata dalla clatrina (CME), la macropinocitosi e l'endocitosi caveolare (CavME) sono i più studiati. Dopo il legame ai recettori specifici, il virus promuove il raggruppamento della clatrina sulla membrana cellulare reclutando adattatori, come AP2, eps15 ed epsin1. Grazie alla polimerizzazione della clatrina e all'invaginazione della membrana cellulare avviene la formazione di vescicole rivestite di clatrina (CCV) (Guo et al., 2019). Durante la macropinocitosi, la membrana plasmatica si increspa e si ripiega per formare una cavità piena di liquido che viene chiusa dalla fusione della membrana. Nella CavME, come nella CME, il carico subisce un traffico intracellulare attraverso la rete endosomiale dopo la scissione da parte della dinamina (Figura 6A).

Si ritiene che i rhabdovirus, come il lyssavirus del pipistrello australiano (ABLV), il VSV e il virus della necrosi ematopoietica infettiva (IHNV), utilizzino vie dipendenti dalla clatrina per l'ingresso nella cellula ospite (Guo et al., 2019).

Il processo di internalizzazione di RABV via endocitosi è actina-dipendente e segue un pathway paragonabile a quello del VSV. Sebbene la CME sia stata evidenziata in diverse linee cellulari per l'assorbimento di RABV, sono necessarie prove più conclusive in vivo. Inoltre, non è chiaro se altre vie o molecole siano coinvolte nel meccanismo dell'endocitosi.

RABV infetta gli ospiti nei siti periferici tramite il morso di un animale infetto e poi viaggia su lunghe distanze per raggiungere il sistema nervoso centrale, dove replica, con conseguenti sintomi neurologici.

Una volta endocitato, il virus viene successivamente localizzato negli EE, processo che avviene in modo molto rapido ed efficiente. Infatti, è stato dimostrato che RABV colocalizza con i marcatori degli EE nelle cellule nervose. La fusione delle vescicole endocitiche con gli EE avviene entro 10 minuti dall'endocitosi e il trasferimento che porta il virus verso il comparto lisosomiale avviene nell'arco di 2 ore (Guo et al., 2019). L'ambiente leggermente acido caratteristico del compartimento endosomiale innesca la fusione dell'envelope virale con la membrana endosomiale, mediata dalla glicoproteina G, che si traduce nel rilascio del genoma virale nel citoplasma. Sebbene sia stato dimostrato che RABV G colocalizza con Rab7 e Rab5, si ritiene che la fusione si verifichi quando il virus passa agli EE, grazie al pH ottimale per la fusione mediata da RABV G. La spike virale della proteina G può subire cambiamenti conformazionali a basso pH e assume almeno tre stati diversi, tra cui lo stato nativo (N), lo stato idrofobico

attivato (A) e la conformazione fusione-inattiva (I). Lo stato N di prefusione si osserva sulla superficie virale a pH 7. Dopo l'acidificazione (pH 5,8-6), le glicoproteine si convertono allo stato A e interagiscono con la membrana bersaglio quando i domini idrofobici nella loro parte superiore sono esposti, avviando il processo di fusione.

Gli eventi di fusione e uncoating consentono la separazione dell'RNP virale dalla proteina M ed il suo rilascio nel citoplasma a cui segue l'associazione con i motori della dineina. Il processo di traffico intracellulare del virus dipende inevitabilmente dalla rete di microtubuli cellulari (MT) e dai motori MT. Infatti, il trasporto assonale di RABV, dalla terminazione nervosa al corpo del neurone, può essere inibito con il trattamento delle cellule con farmaci che hanno come bersaglio la MT, ad esempio la vincristina e la colchicina (Guo et al., 2019). Sono stati proposti due modelli di trasporto retrogrado per RABV lungo l'assone della cellula neuronale al corpo cellulare. Entrambi i modelli prevedono un'ulteriore trascrizione e replicazione dell'RNA virale che seguono quelle avvenute nel sito di ingresso nella cellula nervosa.

Nel primo modello si suppone che l'intera particella virale, intatta, venga trasportata all'interno di vescicole lungo le MT in modo dipendente dalla proteina G superficiale (Guo et al., 2019).

Il secondo modello si basa sull'interazione diretta del motore della dineina con gli RNP, dove RABV P e L sono in grado di interagire con i componenti della catena leggera della dineina, rispettivamente DLC8 e DLC1.

Oltre alla diffusione di RABV tramite la via retrograda è stato proposto anche un meccanismo di diffusione intracellulare bidirezionale. Il trasporto retrogrado assicura la trasmissione di RABV dalla periferia al soma cellulare per la replicazione e la sintesi, mentre il trasporto anterogrado, che dirige RABV verso le estremità MT positive, consente la localizzazione post-replicativa delle particelle di virione di nuova formazione alle membrane presinaptiche per il rilascio e la trasmissione. Nel ganglio dorsale il trasporto assonale anterogrado di RABV è stato osservato in modo simile a quello retrogrado, ma ad una velocità relativamente maggiore. Sebbene le informazioni su questo processo rimangano scarse, il trasporto dipendente dalla glicoproteina delle particelle RABV è stato rivelato quando i virioni eliminati dal gene G non riescono a subire il trasporto anterogrado. Data la dipendenza confermata dalla proteina G e il cotrasporto visualizzato dell'RNP con G, viene formulato un modello plausibile di traffico anterogrado (Figura 6B), in cui le particelle virali completamente avvolte vengono trasportate all'interno di vescicole cellulari o le vescicole contenenti glicoproteine dirottano gli RNP citoplasmatici per muoversi lungo le MT. Rispetto agli studi sul trasporto retrogrado, gli studi sui meccanismi del trasporto anterogrado di RABV sono lunghi dall'essere sufficienti. Le differenze nelle velocità e nella cinetica di trasmissione

in queste direzioni opposte possono essere dovute al coinvolgimento di diversi complessi motori cellulari.

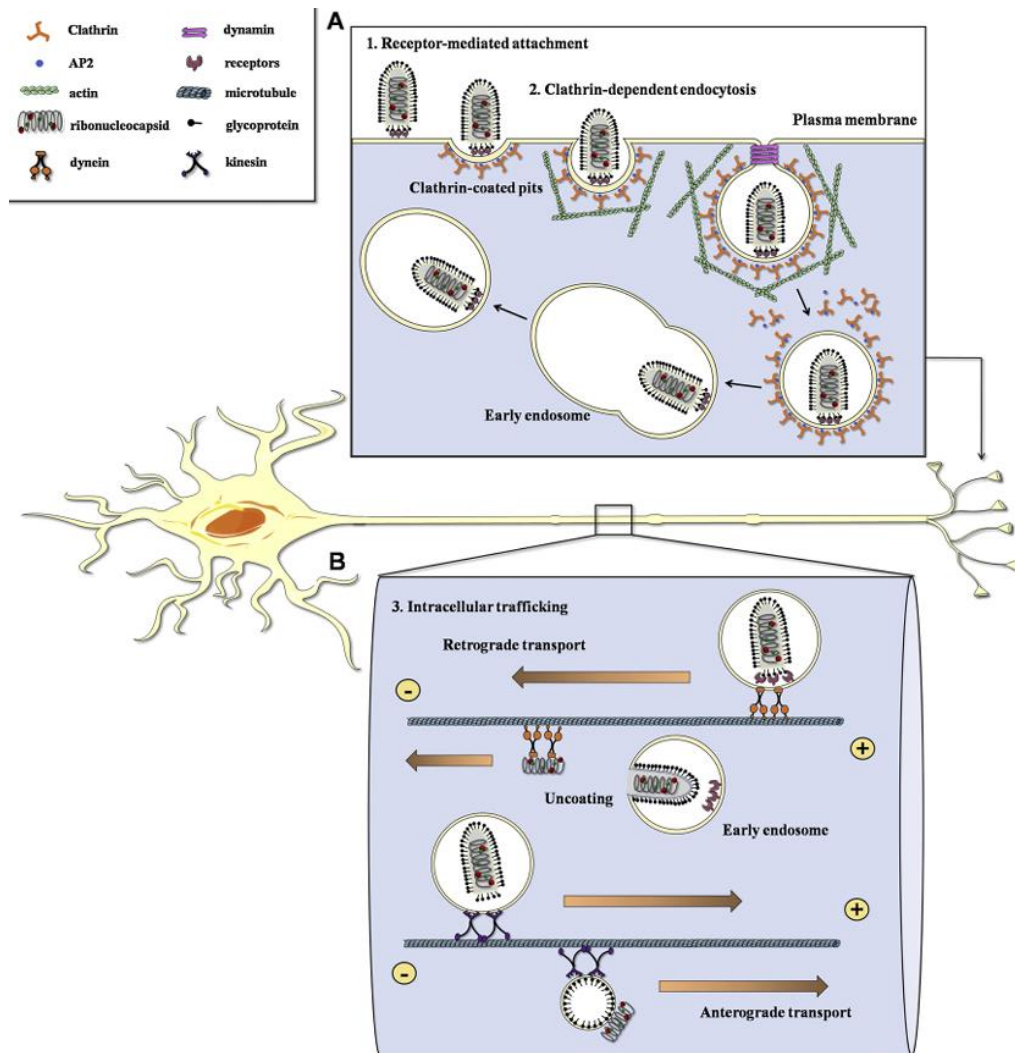


Figura 6 Modello dell' ingresso di RABV e trasporto intracellulare nei neuroni. (Guo et al., 2019)

2.2.5 Diagnosi

I sintomi clinici specifici dell'idrofobia o dell'aerofobia (paura delle correnti d'aria o dell'aria fresca) forniscono una forte indicazione dell'infezione da RABV. Tuttavia, solo i risultati dei test di laboratorio possono fornire una diagnosi definitiva di rabbia, poiché sono possibili altre diagnosi sulla base dei soli sintomi. In contesti endemici, i test diagnostici ante-mortem non vengono condotti di routine, poiché le strutture spesso non dispongono delle risorse necessarie. Questa situazione non consente un'adeguata assistenza al paziente e viene a mancare l'allerta degli operatori sanitari rispetto ai potenziali rischi di trasmissione del RABV. I campioni utilizzati per la diagnosi ante-mortem sono ottenuti dalla biopsia

cutanea nucale (nuca) e dalla saliva (Tabella 1) (Fooks et al., 2017). I campioni di pelle possono essere testati per la presenza di antigeni virali (di norma la nucleoproteina) nei neuroni in prossimità dei follicoli piliferi mentre sia i campioni di pelle che di saliva possono essere testati per la presenza di RNA virale mediante trascrizione inversa seguita da PCR (RTPCR) (Fooks et al., 2017). Le risposte immunitarie umorali al RABV di solito insorgono nel siero o nel liquido cerebrospinale (CSF) nelle fasi avanzate dell'infezione. Tuttavia, sebbene non sia direttamente considerato un test diagnostico perché troppo tardivo, il rilevamento di anticorpi specifici del virus contro gli antigeni virali nel siero di individui non vaccinati, o nel liquido cerebrospinale di individui vaccinati o non vaccinati, può avere un valore diagnostico o prognostico.

Il tessuto cerebrale è il campione di scelta per la diagnosi post-mortem. Storicamente la presenza di corpi del Negri (accumuli intracellulari di particelle RABV) era considerata indicativa della rabbia, ma questo test è stato ora sostituito da metodi più sensibili e specifici. Il test degli anticorpi fluorescenti (FAT) per rilevare l'antigene virale nei campioni cerebrali è il test diagnostico raccomandato sia dall'OMS che dal WOA (World Organisation for Animal Health) fornisce risultati affidabili in campioni freschi in meno di 4 ore. Inoltre, è stato sviluppato un test immunoistochimico diretto (dRIT) in microscopia ottica che utilizza una miscela di anticorpi biotinilati. Il dRIT è conveniente e può rilevare rapidamente l'antigene virale nel materiale cerebrale fresco. Sono disponibili dei test diagnostici molecolari in grado di rilevare l'RNA di molti lyssavirus, e presumibilmente sostituiranno i test utilizzati nelle procedure per la diagnosi della rabbia negli animali (Fooks et al., 2017). Rispetto al FAT, i metodi molecolari sono meno inclini all'interpretazione soggettiva e hanno l'ulteriore vantaggio di poter identificare le specie virali, uno strumento utile nei casi con una potenziale esposizione al RABV non evidente. I test molecolari devono essere eseguiti in ambienti ben controllati per evitare risultati falsi positivi e, di conseguenza, la standardizzazione dei test e l'uso di controlli appropriati sono necessari prima che questi strumenti possano essere utilizzati per la diagnosi post-mortem di routine della rabbia negli animali in contesti con risorse limitate (Tabella 1).

TEST	TARGET	TEMPO	VANTAGGI	SVANTAGGI
Ante-mortem				
Real-time RT-PCR	Acido nucleico virale	2-3 ore	<ul style="list-style-type: none"> • Rapido • Elevata sensibilità e specificità • I sistemi a tubo singolo riducono i rischi di contaminazione 	<ul style="list-style-type: none"> • Richiede attrezzature specializzate • Potenziale di contaminazione • Amplicone non utile per la caratterizzazione genetica

Neutralizzazione del virus degli anticorpi fluorescenti (FAVN) e fluorescent focus inhibition test (RFFIT)	Anticorpi neutralizzanti il virus	5-8 giorni	<ul style="list-style-type: none"> • Utile per la valutazione dopo la vaccinazione 	<ul style="list-style-type: none"> • Tempi di risposta lunghi • Incompatibile con la conferma ante mortem della diagnosi, in quanto gli anticorpi sono di solito rilevata dopo l'insorgenza dei segni clinici • Richiede il contenimento specialistico e l'esperienza dell'operatore
Post-mortem				
Fluorescent antibody test (FAT)*	Antigene virale	2-3 ore	<ul style="list-style-type: none"> • Rapido • Elevata sensibilità e specificità 	<ul style="list-style-type: none"> • Coniugato costoso • Richiede un microscopio a luce ultravioletta • Può essere difficile interpretare i risultati
test immunocitochimico (dRIT)	Antigene virale	2-3 ore	<ul style="list-style-type: none"> • Rapido • Richiede solo un microscopio ottico 	<ul style="list-style-type: none"> • Può essere difficile interpretare i risultati
Lateral flow devices (LFDs)	Antigene o anticorpo del virus	30-60 minuti	<ul style="list-style-type: none"> • Semplice test point-of-care • Rischio per la sicurezza associato alla preparazione dei campioni sul campo 	<ul style="list-style-type: none"> • Richiede la convalida • Segnalazione di variazioni da lotto a lotto
Test di isolamento per coltura tissutale antirabbica (RTCIT)	Virus vivo	4-6 giorni	<ul style="list-style-type: none"> • Consente la propagazione del virus per la caratterizzazione 	<ul style="list-style-type: none"> • Richiede strutture specializzate e l'esperienza dell'operatore • Lunghi tempi di consegna
Test di inoculazione del topo (MIT)	Virus vivo	Più di 28 giorni	<ul style="list-style-type: none"> • Consente la propagazione del virus per la caratterizzazione 	<ul style="list-style-type: none"> • Richiede strutture specializzate e competenze dell'operatore • Tempi di consegna molto lunghi • Problemi etici dovuti all'uso di modelli in vivo

Tabella 1 Test diagnostici e relative caratteristiche. (Fooks et al., 2017)

2.2.6 Terapia e profilassi

Al momento non esistono dei farmaci specifici per la cura della rabbia, ma esistono solamente delle terapie di supporto. Invece, diversi preparati inattivati di RABV sono disponibili come vaccini per immunizzare gli esseri umani e gli animali domestici. Per la vaccinazione della fauna selvatica sono disponibili sia vaccini vivi attenuati che vaccini a subunità. I vaccini antirabbici umani vengono somministrati per via intramuscolare o intradermica e gli stessi vaccini utilizzati per la procedura pre-esposizione (prEP) possono essere somministrati anche nel protocollo di trattamento post-esposizione (pEP). L'obiettivo della vaccinazione è quello di indurre VNA (Virus neutralizing antibodies) anti-G che forniscono protezione contro l'infezione da RABV. La disponibilità di vaccini inattivati, liofilizzati, basati su colture cellulari con maggiore antigenicità ha portato a una riduzione del numero di dosi necessarie per ottenere una risposta protettiva e, quindi, a una riduzione del numero di visite cliniche necessarie per completare il ciclo di vaccinazione, che a sua volta ha migliorato la partecipazione dei pazienti, sia alla prEP che alla pEP (Fooks et al., 2017). Molto importante per la pEP è che la somministrazione sia la più tempestiva possibile dopo l'infezione da rabbia. Tutti i vaccini autorizzati presentano dei buoni profili di sicurezza e gli eventi avversi gravi dopo la vaccinazione sono molto rari. Gli effetti avversi minori che possono verificarsi sono febbre e reazioni localizzate al sito di inoculazione. Sebbene l'uso di vaccini ricostituiti refrigerati non sia stato approvato da nessuna organizzazione sanitaria o produttore di vaccini, gli studi ne hanno dimostrato la sicurezza e l'efficacia purché sia sempre garantita la corretta conservazione. Le varianti di RABV vive attenuate, in cui l'espressione della glicoproteina è da due a tre volte superiore ai livelli fisiologici, si sono dimostrate efficaci come PrEP in modelli murini e canini ma non sono ancora approvate dagli enti regolatori (Fooks et al., 2017).

Il ricovero in ospedale di pazienti con manifestazioni cliniche simili alla rabbia è necessario per la conferma della diagnosi e per prevenire l'esposizione ad altri potenziali pazienti attraverso lo scambio di fluidi biologici. Indipendentemente dal fatto che la diagnosi di rabbia sia stata confermata, questi pazienti dovrebbero ricevere cure intensive, se disponibili, poiché la guarigione è possibile (anche se molto raramente). La durata del trattamento deve essere determinata caso per caso. Tuttavia, nella maggior parte dei casi le cure palliative rimangono l'unica opzione, poiché non esiste ancora una terapia antivirale di comprovata efficacia per la rabbia umana. Dati di efficacia in vitro di potenziali farmaci antivirali raramente si sono tradotti in successi in vivo nei modelli sperimentali e, pertanto, i risultati di queste ricerche non si sono tradotti in approcci clinici.

Nei pazienti con rabbia furiosa possono essere utili sedativi per via endovenosa (ad esempio, diazepam, midazolam o barbiturici) e analgesici (ad esempio, morfina o ketamina) per alleviare l'agitazione, gli spasmi fobici, l'ansia e altri sintomi neurologici. Gli antipsicotici (ad esempio, l'aloiperidolo) possono essere benefici (Fooks et al., 2017). Tuttavia, i pazienti con rabbia tendono a richiedere dosi più elevate e più numerose di quelle generalmente prescritte, il che potrebbe aumentare il rischio di sviluppare la sindrome neurolettica maligna. Nella rabbia furiosa, tutti questi trattamenti sintomatici o palliativi mirano ad alleviare le manifestazioni della malattia causate dalla compromissione selettiva funzionale attraverso la disregolazione dei neurotrasmettitori. Ad oggi le ricerche volte allo sviluppo di antivirali specifici sono limitate. Studi recenti riportano che molecole quali l'artemisina, la clofazimina e il deossinivalenolo sono in grado di inibire la replicazione virale in vitro ma ulteriori studi sono necessari per dimostrarne il potenziale uso in terapia (Fooks et al., 2017).

2.3 Febbre emorragica della Crimea e del Congo

Il virus della febbre emorragica della Crimea-Congo (CCHFV) causa una malattia emorragica (CCHF) caratterizzata da un'ampia variabilità sintomatologica, da lieve a grave ed esclusivamente nell'uomo, con tassi di mortalità fino al 30%. Attualmente, l'efficacia delle opzioni terapeutiche proposte non è ancora stata dimostrata negli studi clinici controllati e la terapia di supporto rimane il cardine del trattamento. Il CCHFV è considerato un virus "emergente", considerando la sua rapida espansione in nuove aree geografiche. Il CCHFV persiste in un ciclo enzootico tra zecche e mammiferi e la distribuzione geografica del virus rispecchia la distribuzione delle principali specie di zecche vettori che includono membri del genere *Hyalomma*. La trasmissione del virus all'uomo può avvenire attraverso il morso di zecca o attraverso l'esposizione ai fluidi corporei di animali o di pazienti viremici (Zivec et al., 2016).

2.3.1 Epidemiologia

Sebbene alcuni trattati descrivano la CCHF come una malattia che è "emersa" solo di recente, l'ampia distribuzione del virus nelle zecche e nei vertebrati in tutta l'Asia meridionale, l'Europa sud-orientale e l'Africa suggerisce che il virus e di conseguenza le infezioni umane esistano da moltissimo tempo (Bente et al., 2013). Una grave malattia emorragica attribuita al morso di una zecca o di un pidocchio è stata descritta in Tagikistan nel XII secolo, e malattie simili erano note in altre parti dell'Asia centrale (Hoogstraal, 1979). Il riconoscimento della CCHF come malattia umana da parte dei medici moderni potrebbe essere stato ritardato perché i casi tendono a verificarsi singolarmente e sporadicamente nelle aree rurali e molti pazienti sviluppano una malattia lieve e non specifica, senza una sindrome da febbre

emorragica riconoscibile. Il primo focolaio riconosciuto di CCHF ebbe luogo nell'estate del 1944 in Crimea, dove circa 200 militari furono ricoverati in ospedale e circa il 10% morì. Chumakov e i suoi colleghi riuscirono presto a dimostrare che la "febbre emorragica di Crimea" (CHF) era un'infezione virale trasmessa dalle zecche, inoculando a pazienti psichiatrici e a militari volontari degli ultrafiltrati di siero di paziente o estratti di zecche. Una svolta critica nella ricerca sulla CCHF arrivò nel 1967, quando il gruppo di Chumakov scoprì che i topi neonati sviluppavano una malattia letale quando venivano iniettati intracerebralmente con campioni di pazienti affetti da CCHF o zecche infette. Verso la fine degli anni '60, i ricercatori sovietici dimostrarono che una varietà di malattie febbrili trovate in vari focolai in diverse regioni dell'Unione Sovietica e in Bulgaria erano causate da ceppi di CCHFV. L'areale geografico noto della malattia fu ulteriormente ampliato nel 1969, quando Casals scoprì che il virus era identico a un agente che era stato isolato nel Congo Belga (l'attuale Repubblica Democratica del Congo, RDC) nel 1956 e designato "Congovirus". Da quando è stato identificato nella Repubblica Democratica del Congo, il Congovirus è stato riscontrato in animali e zecche in Nigeria e Uganda, ed è ormai diffuso in gran parte del continente africano come riportato dall'OMS ed illustrato in Figura 7. Casals (1970) propose che a tutti questi agenti fosse dato il nome unico di "CHF-Congovirus", che fu poi semplificato in CCHFV.

L'introduzione della tecnica della coltura virale nei topi neonati alla fine degli anni '60 ha portato a un'accelerazione della ricerca sulla CCHF, tanto che alla fine del decennio successivo Hoogstrall ha citato più di 500 articoli nella sua revisione della letteratura. Ad oggi l'areale è in continua espansione e il report dello European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) segnala che ad oggi il vettore è presente in molti stati europei e prevede che la malattia possa presto manifestarsi in tutto il mediterraneo, con casi già registrati in Spagna (Messina et al., 2023) e con la recente individuazione del virus nel sud della Francia.

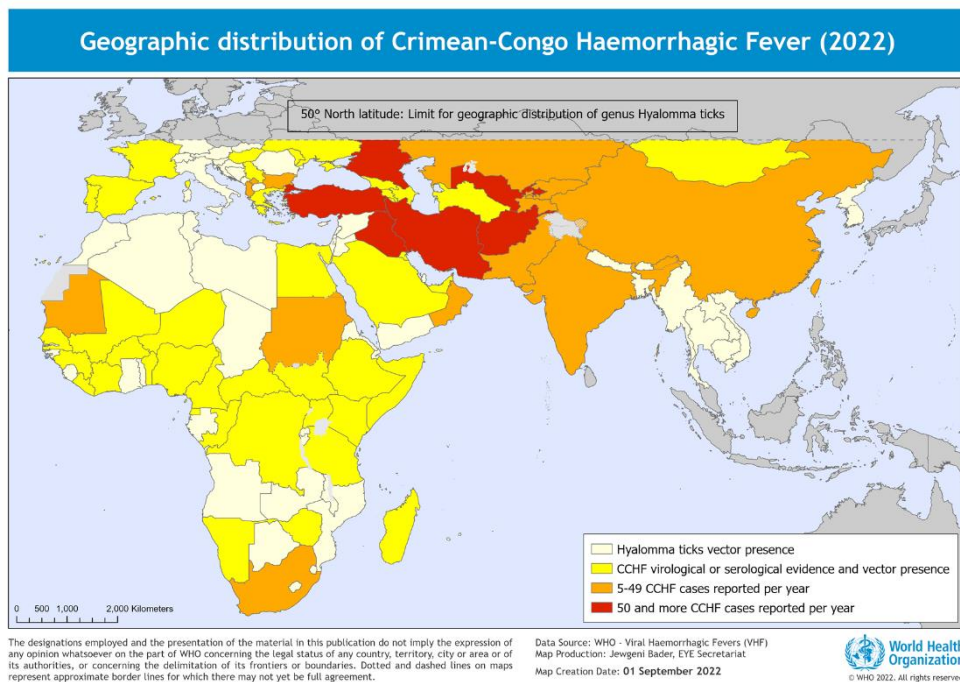


Figura7 Areale di diffusione della CCHF. (WHO, 2022)

2.3.2 Patogenesi e diagnostica

Sebbene la CCHF sia nota da molti anni, ad oggi le informazioni reative alla patogenesi sono estremamente limitate. Tra le cause si possono annoverare le difficoltà tecniche legate allo studio di un virus che è catalogato nella classe di rischio 4, che pone molte limitazioni in termini di manipolazione e sperimentazione. La maggior parte delle conoscenze derivano da osservazioni fatte su pazienti in paesi in cui il virus è endemico da tempo. In generale nei casi di CCHF si sono riscontrati nei pazienti dei parametri alterati nella coagulazione del sangue con eventi di coagulazione intravascolare disseminata, soprattutto nelle fasi tardive della malattia. Ad oggi non è ancora chiaro se questo effetto sia causato dal danno diretto del virus sull'endotelio o da un danno indiretto causato dalla presenza di mediatori dell'infiammazione. Uno studio del 1997 ha mostrato la presenza di RNA e di antigeni virali nelle cellule endoteliali di pazienti morti per CCHF, ma questo non è un elemento sufficiente per dimostrare che ci sia un danno diretto del virus sulle cellule dell'endotelio. Molto probabilmente, come è stato visto in studi su animali di laboratorio affetti dalla febbre emorragica causata dal virus Ebola, l'alterata funzione vascolare è causata da meccanismi indotti dall'ospite come la produzione di citochine pro-infiammatorie, la degranolazione piastrinica, l'adesione dei leucociti e l'attivazione della cascata intrinseca della coagulazione (Bente et al., 2013). Due studi condotti in Turchia nel 2010 hanno mostrato, in pazienti affetti da

CCHFV, livelli elevati di due marcatori di alterazione vascolare sICAM-1 e sVCAM-1, soprattutto nei casi più gravi e fatali di infezione. In accordo con questo, esperimenti di infezione di cellule endoteliali in vitro da parte del CCHFV avevano mostrato un aumento di ICAM e VCAM oltre che alla secrezione di IL-6 e IL-8 (Bente et al., 2013). Studi condotti su pazienti con patologia moderata o severa hanno mostrato elevati livelli sierici di IL-6, IL-10 e IFN- γ mentre livelli elevati di TNF- α sono stati rilevati su pazienti infetti da CCHFV con esito fatale (Bente et al., 2013). Questi dati clinici sono supportati da prove in vitro che dimostrano la capacità del CCHFV di replicarsi nelle cellule dendritiche e di indurre il rilascio di citochine pro-infiammatorie da parte di queste cellule. Un'ulteriore prova indiretta del coinvolgimento delle citochine pro-infiammatorie nella patogenesi del CCHFV è l'osservazione frequente di citopenia, causata dall'attivazione dei monociti da parte di citochine come IFN- γ , TNF- α , IL-1 e IL-6, che sono rilasciate dai linfociti Th1 (Bente et al., 2013). In ogni caso, è ampiamente documentata l'importanza dei mediatori della risposta infiammatoria nella progressione della CCHF. In uno studio recente sui topi, si è potuto evidenziare come il ruolo dell'interferone di tipo 1 sia fondamentale per attivare la risposta immunitaria adattativa e di conseguenza, limitare la capacità d'infezione di CCHFV (Bente et al., 2013). Il ruolo delle cellule T nel controllo dell'infezione primaria da CCHFV, invece, non è ancora completamente chiaro, tuttavia, tra tutti i linfociti circolanti, si osservano percentuali più elevate di linfociti T citotossici nei casi fatali rispetto a quelli non fatali, e questa percentuale è correlata al titolo virale. Per quanto concerne la risposta anticorpale, è evidente una limitata o addirittura assente produzione di IgG e IgM specifiche dirette contro il CCHFV nei pazienti affetti da forme gravi e fatali della malattia. Questo suggerisce un possibile effetto protettivo della risposta anticorpale umorale nei confronti di questo virus (Bente et al., 2013).

La CCHF deve essere sospettata quando una persona con un'anamnesi di esposizione appropriata si ammala gravemente con febbre, malessere e altri segni e sintomi aspecifici, insieme a reperti fisici indicativi di perdite vascolari e difetti della coagulazione (Figura 8). Il sospetto si rafforza se la valutazione di laboratorio iniziale mostra leucopenia, trombocitopenia e livelli sierici elevati di AST e ALT. Una diagnosi specifica può essere fatta analizzando un campione di siero per la ricerca dell'RNA virale mediante RT-PCR o per la ricerca di IgM e/o IgG virus-specifiche mediante ELISA o altri metodi. In considerazione della sua velocità, sensibilità e sicurezza, la RT-PCR è considerata il metodo diagnostico standard. I pazienti affetti da CCHF sono di solito viremici durante i primi 7-10 giorni di malattia. La RT-PCR, misurando la carica virale, fornisce anche un indice di gravità della malattia e la probabilità di morte. Le IgM virus-specifiche diventano rilevabili entro la fine della prima settimana, mentre le IgG compaiono poco dopo. Le IgM virus-specifiche scompaiono dopo diversi mesi, mentre le IgG persistono molto più a lungo. La presenza di IgG anti-CCHFV in una persona con un'anamnesi di malattia appropriata può quindi essere utilizzata per fare una diagnosi retrospettiva.

Mertens et al. (2013). Dowall et al. (2012) hanno descritto un nuovo metodo ELISA, basato su NP virali ricombinanti che è stato in grado di rilevare in modo sensibile IgM e IgG virus-specifiche in campioni di pazienti provenienti da Turchia, Tagikistan e Kosovo. Le preoccupazioni che i test diagnostici basati su sequenze possano non rilevare tutti i ceppi di CCHFV si basano sulla sua ampia diversità genetica. Sebbene i primi saggi di RT-PCR siano stati in grado di identificare virus provenienti dalla maggior parte dei cladi o delle regioni geografiche, non sono stati in grado di riconoscere il ceppo AP92 che è molto divergente dagli altri ceppi. Tuttavia, un test recentemente riportato che prende di mira una porzione altamente conservata della regione 5' non codificante del segmento S virale, che è apparentemente necessario per la formazione di "panhandle" e la replicazione del genoma, è in grado di rilevare virus in tutti e 7 i cladi. Man mano che si ottengono più campioni da esseri umani, animali e zecche in tutte le regioni endemiche, e poiché il virus continua ad evolversi nel tempo, potrebbero essere necessari ulteriori perfezionamenti nei metodi diagnostici basati sulla sequenza.

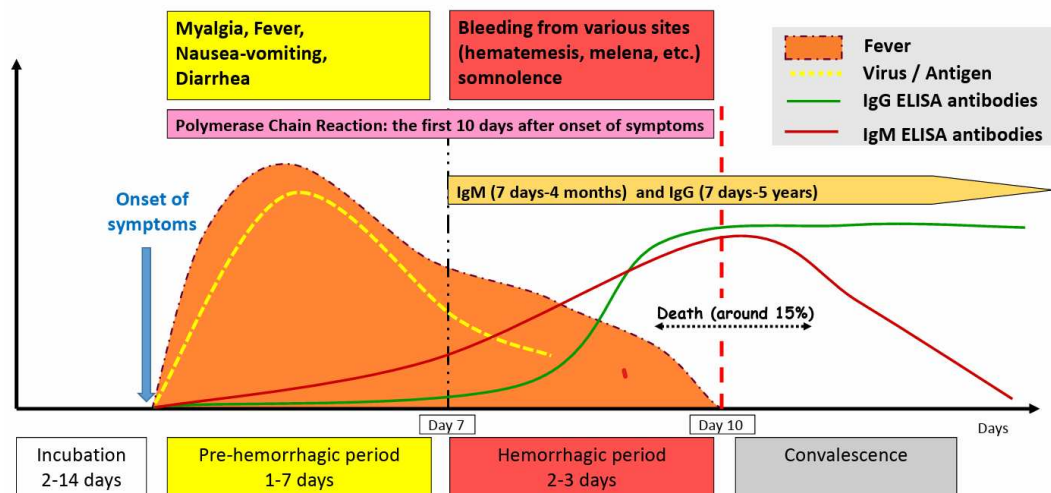


Figura 6 Evoluzione dei sintomi della CCHF. (WHO)

2.3.3 Struttura del virus

Il virione del CCHFV è sferico e ha un diametro di circa 80-100 nm. Il suo involucro lipidico è costellato di punte costituite dalle glicoproteine Gn e Gc, che sono responsabili del legame del virione ai recettori cellulari. Gli anticorpi neutralizzanti contro Gn e Gc vengono prodotti durante il corso dell'infezione. I virioni contengono il genoma, rappresentato da tre segmenti di RNA a singolo filamento. I segmenti genomici, piccolo (S), medio (M) e grande (L) sono incapsulati dalla nucleoproteina (NP) e ciascuno è associato alla RNA polimerasi RNA-dipendente (RdRp), per avviare la trascrizione e la replicazione del genoma nella cellula ospite (Figura 9). Le sequenze terminali complementari 5'-UCUCAAGA e 3'-

AGAGUUUCU sono conservate in tutti gli ortonairovirus. L'appaiamento intra-filamento tra i nucleotidi terminali porta alla formazione di strutture stabili e molecole di RNA circolari chiuse in modo non covalente. Per deduzione da altri bunyavirus, l'appaiamento terminale delle basi fornisce le regioni promotrici funzionali per l'interazione con la RdRp virale.

Segmento S

Il segmento S codifica la NP, che è costituita da un ampio dominio globulare, a cui contribuiscono porzioni N- e C-terminali del polipeptide, più un "braccio" sporgente contenente un sito di scissione riconosciuto dalla caspasi-3 che è molto conservato. La regione globulare è responsabile del legame dell'RNA. L'incapsulamento dell'RNA del virione comporta l'oligomerizzazione della NP, determinata dalle interazioni testa-coda della proteina per formare una struttura elicoidale. Il ruolo del sito di scissione riconosciuto dalla caspasi-3 nella replicazione del virus non è completamente noto. La NP viene scissa nelle cellule apoptotiche in fase avanzata di infezione. La scissione può svolgere un ruolo regolatorio, poiché la sua inibizione aumenta l'attività della RNA polimerasi.

Segmento M

Il segmento M codifica una singola poliproteina, da cui vengono prodotte due glicoproteine transmembrana di tipo I, Gn e Gc, attraverso il clivaggio co-traduzionale e un'estesa elaborazione post-traduzionale, che inizia nel reticolo endoplasmatico (ER) e termina nel Golgi. La poliproteina viene prima scissa da una peptidasi segnale dell'ospite nei segmenti PreGn da 140 kDa e PreGc da 85 kDa. Il PreGn viene poi ulteriormente scisso in un certo numero di siti di riconoscimento conservati dalle proteasi dell'ospite SKI-1 e furine, generando il Gn da 58 kDa e liberando diversi piccoli frammenti proteici, tra cui una proteina NSm non strutturale, simile a quella che è stata identificata in altri bunyavirus. Nelle cellule prive di SKI-1, PreGn e PreGc si accumulano nell'apparato di Golgi e le cellule infette secernono particelle virali prive di glicoproteine superficiali.

La glicosilazione legata all'N di Gn è anche essenziale per il processamento finale di entrambe le glicoproteine. Gn svolge una funzione simile a quella di chaperone per Gc e deve essere presente affinché si verifichi un corretto ripiegamento. Le glicoproteine del CCHFV contengono un numero eccezionalmente elevato di residui di cisteina, suggerendo la presenza di molti legami disolfuro e di una complessa struttura secondaria. L'N-terminale di Gn ha caratteristiche simili alla mucina, con il potenziale per un'estesa O-glicosilazione. È interessante notare che la coda citoplasmatica C-terminale di Gn contiene due dita di zinco, che possono legare l'RNA virale.

Segmento L

Il segmento L del CCHFV e di altri *ortonairovirus* è quasi il doppio di quelli degli altri *bunyavirus*. Il suo singolo frame di lettura aperto, lungo più di 12.000 nucleotidi, codifica una poliproteina di quasi 4000 amminoacidi, che contiene un dominio della proteasi del tumore ovarico (OTU) vicino al suo N-terminale, seguito da segmenti omologhi alla topoisomerasi virale, motivi a dito di zinco e cerniera di leucina e un dominio catalitico RdRp vicino al C-terminale. Questi ultimi mostrano un'ampia identità di sequenza con il virus Dugbe, un altro membro del genere *ortonairovirus*. La presenza della proteasi cisteina OTU vicino all'estremità N suggerisce che la poliproteina L sia scissa in maniera autocatalitica durante la traduzione; tuttavia, la delezione dell'OTU non sembra avere un effetto sulla replicazione virale in un sistema minigenomico. Ad oggi, l'unico ruolo dimostrato dell'OTU è la rimozione dell'ubiquitina dalle proteine cellulari, che può servire a contrastare i meccanismi antivirali della cellula ospite.

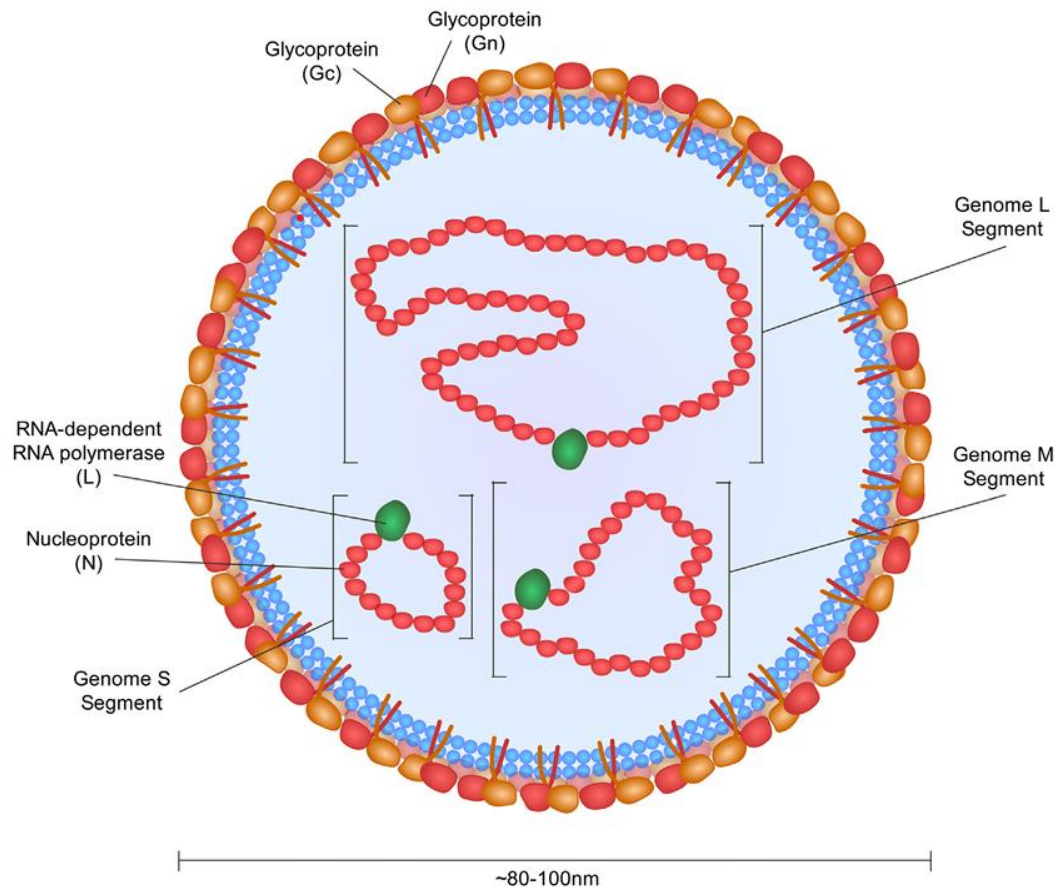


Figura 7 Rappresentazione schematica del virione CCHF. Il virione è sferico e ha un diametro di circa 80-100 nm. Il suo involucro lipidico è costellato di spighe costituite dalle glicoproteine Gn e Gc. Il virione contiene tre segmenti del genoma dell'RNA a singolo filamento (piccolo, medio e grande), incapsidati dalla nucleoproteina (NP) e dall'RNA polimerasi RNA dipendente (RdRp). (Bente et al., 2013)

2.3.4 Ciclo replicativo

Il ciclo replicativo del CCHFV risulta molto complesso e ad oggi non è ancora del tutto caratterizzato. Il legame iniziale tra il CCHFV e la superficie cellulare è mediato dalle glicoproteine poste sul pericapside virale, la proteina Gc e la proteina Gn. E' stato riportato che la proteina Gc è in grado di interagire con la nucleolina (NCL), una proteina ubiquitaria della cellula che risulta anche essere esposta sulla superficie della cellula, suggerendo un potenziale ruolo di NCL nell'ingresso del CCHFV (Zivec et al., 2016). Uno studio recentissimo ha invece individuato come un possibile recettore del CCHFV il recettore delle lipoproteine a bassa densità (LDLR) (Xu et al., 2024). A seguito del legame con la cellula, il CCHFV viene endocitato mediante un processo mediato dalla clatrina che richiede l'intervento del complesso delle proteine adattatrici-2. Le particelle virali sono trasportate agli endosomi precoci e poi ai corpi multivescicolari (MVBs, MultiVesicular Bodies) tramite un meccanismo dipendente dalla proteina Rab5 (Bente et al. 2013, Zivec et al. 2016). I MVBs probabilmente risultano i principali organelli dove l'envelope del CCHFV si fonde con le membrane dell'ospite, in particolare perché è stato dimostrato che diminuendo, attraverso specifici siRNA, le componenti del pathway del complesso di smistamento degli endosomi necessario al trasporto (ESCRT, Endosomal Sorting Complex Required for Transport), e quindi interferendo con la formazione di MVBs funzionali, i livelli di infezione da CCHFV diminuiscono. Successivamente, gli RNPs genomici vengono rilasciati nel citosol dove il vRNA serve alla proteina L come stampo per la formazione dell'mRNA virale. Per iniziare questa sintesi la proteina L utilizza inneschi con un cap m7G (7-methylGuanylate) ottenuti dagli mRNA cellulari grazie all'azione endonucleasica della stessa proteina L. La replicazione degli RNPs, invece, è un processo che richiede la replicazione e l'incapsidazione di vRNA a polarità negativa e privi di cap e cRNA a polarità positiva definiti rispettivamente RNPs genomici e antigenomici. Durante la replicazione, infatti, il cRNA sintetizzato dalla proteina L viene allo stesso tempo legato alle subunità di NP per formare gli RNPs antigenomici e in modo analogo avviene la formazione degli RNPs genomici a partire dagli antigenomici. La fase di replicazione è seguita dalla trascrizione e dalla maturazione delle proteine virali. La maturazione della GPC del CCHFV è particolarmente complessa e porta alla formazione delle proteine strutturali Gn e Gc, oltre che delle proteine non strutturali secrete GP160, GP85 e GP38 e della proteina non strutturale NSM (Bente et al. 2013, Zivec et al. 2016). Per dare origine al completo set di glicoproteine, la GPC deve essere altamente glicosilata e successivamente deve venir processata dalle proteasi dell'ospite tra cui la proproteina convertasi, una serin-proteasi presente nei mammiferi. La GPC possiede un peptide di segnale nella porzione N-terminale tale per cui la proteina viene indirizzata nel reticolo endoplasmatico per il processo di sintesi e secrezione. A seguito dell'elongazione e della traslocazione nel RE, il peptide segnale viene rimosso, la GPC viene N-glicosilata e ripiegata mediante la

formazione di vari legami a ponte disolfuro; a seguito di ciò i domini transmembrana della GPC attraversano la membrana del RE cinque volte. Prima che la GPC venga completamente tradotta, essa viene processata formando la PreGn (140 kDa), la PreGc (85 kDa) e la NSM; questo passaggio si avvale della peptidasi del segnale e delle I-CLiPs (Intramembrane CLeaving Proteases) che eseguono tagli proteolitici dopo il peptide segnale e vicino o all'interno dei domini transmembrana 2 e 4. In seguito a ciò PreGn e PreGc vengono trasportate nel complesso di Golgi dove la PreGn viene O-glicosilata in maniera massiccia sul suo MLD (Mucin Like Domain). Mentre PreGc necessita di PreGn per essere trasportata al complesso di Golgi, quest'ultima può liberamente raggiungerlo, ma la mutazione di sito di glicosilazione N577 di questa pre-proteina blocca la fuoriuscita della stessa dal RE e previene la secrezione di GP160, GP85 e GP38 suggerendo un ruolo fondamentale della glicosilazione in N577 per quanto riguarda il ripiegamento e il pathway verso il complesso di Golgi (Bente et al. 2013; Zivec et al. 2016). La proteasi dell'ospite richiesta per la conversione di PreGc in Gc rimane ad oggi sconosciuta, ma dato che il sito di taglio (RKPL) presente in PreGc risulta essere identico a quello della GPC del virus Guaranito (GTOV), un arenavirus, è probabile che la SKI-1/S1P (Subtilin Kexin Isozyme-1/Site-1 Protease) responsabile del taglio proteolitico nel virus Guaranito, oppure una proteina con simile specificità, sia lo stesso enzima responsabile del processamento della PreGc di CCHFV. Anche PreGn è processata dalla SKI-1/S1P e il taglio può avvenire sia nel RE sia dopo l'uscita dal cis-Golgi. A seguito di questo clivaggio nel motivo RLL, vengono liberate sia la Gn matura (85 kDa), che le varie proteine non strutturali tra cui i prodotti che si trovano nella porzione N-terminale contenenti il MLD (GP160 e GP85) e GP38. La mancanza della proteasi SKI-1/S1P porta all'accumulo nel complesso del Golgi della proteina PreGn con la conseguente produzione di particelle virali prive di glicoproteine di superficie. GP160/85 può essere ulteriormente clivata nel TGN (Trans Golgi Network) dalla proteina furina in un sito di taglio (RSKR) altamente conservato che si trova in prossimità della giunzione tra il dominio MLD e il dominio GP38; questo sembra essere il modo in cui GP38 venga liberata dal MLD. Per quanto riguarda l'assemblaggio del virus e la sua fuoriuscita dalla cellula ospite le informazioni sono ancora limitate, ma l'accumulo delle glicoproteine Gn e Gc nel Golgi e nel TGN, unitamente alla presenza della NP nella regione perinucleare, fa supporre una formazione e una gemmazione delle particelle virali nel complesso di Golgi e/o nel TGN. In seguito, i virioni neoformati vengono rilasciati tramite esocitosi spesso in assenza di significativi effetti citopatici; l'esocitosi, nelle cellule polarizzate, avviene dal versante basolaterale (Bente et al. 2013, Zivec et al. 2016).

2.3.5 Terapia e profilassi

Ad oggi non esiste nessun vaccino approvato contro questa malattia e non vi è neppure un farmaco specifico contro il CCHFV, ma sono disponibili solo trattamenti di supporto. La maggior parte delle infezioni da CCHFV sono asintomatiche o provocano una malattia febbrile aspecifica che non richiede ospedalizzazione o supporto terapeutico. Nei pazienti che sviluppano ipotensione ed emorragia, l'attuale trattamento medico è una terapia di supporto data dalla somministrazione di trombociti, piastrine, preparati eritrocitari e plasma fresco congelato che permette di contrastare sia una ridotta perfusione degli organi dovuta ad un aumento della permeabilità vascolare che le alterazioni della coagulazione. Nel caso in cui si verificano importanti emorragie sono necessarie delle trasfusioni di sangue.

La ribavirina, un analogo nucleosidico della purina, ha mostrato efficacia nel trattamento di infezioni da virus respiratorio sinciziale e virus dell'epatite C ed è, ad oggi, l'unico farmaco antivirale raccomandato dall'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità) per il trattamento della CCHF (Bente et al., 2013; Dai et al., 2021). L'uso della ribavirina non ha mostrato particolari eventi avversi ma, nonostante ciò, è comunque sconsigliato in gravidanza. Tuttavia, le evidenze cliniche a sostegno del trattamento benefico della ribavirina sono scarse ed inconcludenti, ad eccezione del suo utilizzo nelle prime 48 ore dall'inizio dei sintomi dove ha dimostrato di ridurre la probabilità di morte. Questo, però, ha suscitato un dibattito tra la comunità scientifica perché nelle prime fasi di infezione le persone presentano sintomi aspecifici o non certamente riconducibili ad un'infezione di CCHFV da cui ne consegue che le persone si recano in ospedale solo in seguito allo sviluppo di sintomi più gravi rendendo inefficace la terapia con Ribavirina.

A livello sperimentale sono state testate diverse molecole per trovare dei potenziali antivirali per il trattamento della CCHF. Le diverse molecole sono riportate di seguito in base al loro target. Per quanto riguarda la polimerasi virale sono stati identificati il favipiravir e il 2-deossi-2-fluorocitidina (2'-dFC). Il favipiravir (noto anche come T-705) è un antivirale che è stato autorizzato in Giappone per il trattamento delle infezioni causate da virus influenzali, ma che si è dimostrato promettente anche contro altri virus a RNA altamente patogeni tra cui Zaire Ebolavirus (EBOV), virus di Lassa, SARS-CoV2 (Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus 2). Due studi hanno valutato questo farmaco contro il CCHFV in topi Knock out dell'Interferone I evidenziando che la molecola è in grado di sopprimere la replicazione virale e prevenire la mortalità, anche quando il trattamento è iniziato 48 ore dopo l'infezione e comunque un beneficio clinico si rileva anche se il trattamento viene iniziato fino a 6 giorni dopo l'infezione. Questi dati hanno portato a supporre che il favipiravir possa essere un antivirale efficace per il trattamento della CCHF in fase avanzata. In un recente studio effettuato su un modello di primate non umano (*Macaca fascicularis*) l'azione antivirale del

Favipiravir è stata confermata in vivo con una riduzione della carica virale nel sangue e nei fluidi orali e nasali oltre che ad evitare la necrosi dei tessuti epatici. È interessante notare che l'attività sinergica dimostrata nell'utilizzo combinato di Favipiravir e ribavirina contro CCHFV in vitro suggerisce la possibilità di utilizzo di dosi inferiori di entrambi i farmaci in un'ipotetica terapia combinata sul paziente (Dai et al., 2021; Bente et al 2013). Un altro possibile antivirale è stato identificato nella 2-deossi-2 fluorocitidina (2'-dFC) tramite uno studio di screening su piccole molecole. La 2' dFC ha dimostrato avere un'attività inibente superiore a quella di Ribavirina e Favipiravir in vitro. È stato dimostrato che 2'-dFC agisce sinergicamente con Favipiravir nell'inibizione di CCHFV in vitro senza determinare citotossicità, suggerendo quindi la possibilità di una potenziale terapia combinata. Al momento rimane da verificare l'efficacia di tale composto in modelli animali di infezione da CCHFV. Ulteriori studi hanno dimostrato l'attività antivirale di alcuni composti, come il fenantrenchinone e UbV-CC4 (ubiquitina) che agiscono sul dominio OTU della proteina L di CCHFV. Le molecole in questione hanno la capacità di agire sia sull'attività deubiquitinasi e de-ISR della regione OTU bloccando la replicazione virale, l'attività antagonista verso l'IFN e la formazione degli RNP. Nonostante i dati in vitro siano promettenti, si rendono necessari ulteriori studi in vivo (Dai et al., 2021). Anche l'interferone di tipo I ha mostrato in vivo la capacità di inibire la replicazione di CCHFV e ciò sembrerebbe avvenire attraverso l'induzione dell'espressione di MxA, un membro delle GTPasi indotte da interferoni che appartiene alla superfamiglia delle dinamine, che è in grado di inibire la replicazione dell'RNA virale e la produzione di particelle virali interagendo con la nucleoproteina (Dai et al., 2021). Purtroppo, però, il trattamento con IFN- α risulta inefficace in caso di infezioni da CCHFV consolidate, inoltre non sono disponibili dati clinici positivi sull'uso di IFN nei casi di CCHF. L'unico caso di applicazione clinica è su pazienti e rispettivi contatti in cui è stato somministrato IFN- α umano, ma il trattamento è stato interrotto a causa dei gravi effetti collaterali. Tra i composti studiati per il trattamento di CCHFV si trovano la cloroquina, approvata ed utilizzata per il trattamento della malaria, e la clorpromazina utilizzata come antipsicotico. Queste due molecole interferiscono con il pathway endocitico del CCHFV dipendente da clatrina e dal pH. In particolare, questi composti si sono mostrati efficaci nel bloccare gli step successivi all'ingresso del virus nella cellula in diverse linee cellulari, oltre ad aver mostrato effetti sinergici con il farmaco ribavirina. L'efficacia di questi due farmaci contro l'infezione da CCHFV dovrebbe essere ulteriormente confermata in studi su modelli animali (Dai et al., 2021). Altre molecole che recentemente hanno mostrato avere attività antivirale sono TH328 e TH6744 che sembrerebbero essere in grado di agire da inibitori di piccole molecole coinvolte nello stress ossidativo e nel metabolismo dei nucleotidi. Per concludere sono stati riportati anche dei siRNA (short RNA interfering) in grado di agire su tutti e tre i segmenti genomici di CCHFV. Questi hanno fatto emergere la possibilità di utilizzare tecniche di

interferenza dell'RNA nella progettazione di farmaci anti-CCHFV (Dai et al., 2021).

Con l'evoluzione delle tecniche di ingegnerizzazione degli anticorpi, il loro utilizzo come terapia è aumentato molto negli ultimi anni. Gli anticorpi monoclonali (mAb), in particolare, si sono dimostrati efficaci nel trattamento di diverse malattie come nel caso della malattia da virus Ebola. In particolare, gli mAb anti-Gc hanno mostrato un'efficacia contro il CCHFV in vivo neutralizzando ceppi divergenti del virus e dimostrando così che questo approccio terapeutico può risultare promettente nel trattamento della CCHF (Bente et al., 2013). L'utilizzo degli mAb può essere un'ottima potenziale terapia in quanto presentano un'elevata specificità, bassa immunogenicità e limitati effetti collaterali. Nonostante ciò, il loro impiego presenta delle criticità date dal fatto che un singolo tipo di anticorpo monoclonale possiede un'efficacia limitata e può indurre tolleranza nel ceppo virale. Di conseguenza, la miglior strategia risulta nell'utilizzo di cocktail di anticorpi o nella combinazione di terapia anticorpale e farmacologia che possono migliorare l'attività degli anticorpi stessi e quindi l'efficacia della cura (Zivec et al., 2016). Nei casi di emergenza, invece, è stata proposta un'immunizzazione passiva con il siero di pazienti convalescenti, somministrato per via intravenosa in maniera precoce e prolungata nel tempo. Tuttavia, l'efficacia clinica di questo approccio terapeutico deve ancora essere dimostrata.

Ad oggi la prevenzione, quindi, è ancora indiretta e si suggerisce di evitare il più possibile zone infettate da zecche e lo scambio di liquidi corporei con umani o animali sospettati di aver contratto la malattia.

2.4 Virus della stomatite vescicolare

Grazie all'avvento della terapia genica e ai progressi nel campo della biologia molecolare, il virus della stomatite vescicolare del ceppo Indiana (di seguito semplicemente VSV come comunemente chiamato) è stato sempre più utilizzato come modello per lo studio di vari meccanismi legati a agenti altamente patogeni, come la patogenesi e il tropismo virale, ma anche come strumento per lo studio della terapia genica, sviluppo di vaccini e anche altre applicazioni nel mondo dell'oncologia. VSV appartiene al genere *Vesiculovirus* della famiglia *Rhabdoviridae*. Infetta naturalmente gli animali da allevamento causando una malattia clinica caratterizzata da gravi vesciche e/o ulcerazioni della lingua, dei tessuti orali, dei piedi e dei capezzoli con una sostanziale perdita di produttività negli allevamenti. I meccanismi di mantenimento e trasmissione del VSV in natura non sono ancora del tutto compresi, ma vi sono indicazioni sul coinvolgimento di vettori, come zanzare, mosche nere e flebotomi. In effetti, i flebotomi sono noti per contenere il virus nelle aree enzootiche. È possibile che i vesiculovirus siano dei virus degli insetti ben adattati che accidentalmente infettano i mammiferi. Si

presume che gli esseri umani contraggano il VSV direttamente dagli animali infetti piuttosto che da un artropode (Balachandran et al., 2000). Di solito, la malattia nell'uomo è lieve, anche se sono state segnalate manifestazioni più gravi, tra cui malattie simil-influenzali e la comparsa di lesioni vescicolari orali. Inoltre, il VSV ha un ampio tropismo virale, poiché, sebbene la stomatite vescicolare sia considerata principalmente una malattia del bestiame, sono stati identificati anticorpi neutralizzanti in numerosi animali selvatici, tra cui cervi, alci, coyote, orsi, puzzole, scoiattoli e ratti, suggerendo un'ampia permissività all'infezione da VSV. La stomatite vescicolare si verifica stagionalmente ogni anno nel sud-est degli Stati Uniti, nel Messico meridionale, in tutta l'America centrale e nel sud America settentrionale ed emerge dalle aree tropicali per causare sporadici focolai nei climi più freddi durante i mesi estivi. Altri vesiculovirus sono endemici dell'India e dell'Africa. VSV è considerato il virus prototipico del genere, mentre altri sierotipi principali includono Cocal, il ceppo virale della stomatite vescicolare del New Jersey, i virus *Chandipura*, *Maraba* e *Piry* (Balachandran et al., 2000). VSV ha un genoma di RNA lineare, a singolo filamento, a senso negativo racchiuso in un virione a forma di proiettile e codifica cinque proteine strutturali con funzioni paragonabili a quelle precedentemente descritte nel caso della rabbia. VSV rappresenta un valido strumento di ricerca nel campo della biologia. Grazie alla sua versatilità, il VSV è stato utilizzato in molti campi di ricerca come potente virus oncolitico, vettore vaccinale e strumento di trasferimento genico e per studiare le proteine eterologhe espresse sull'involucro virale. Tra le sue caratteristiche, il VSV è uno dei pochi virus che possono essere pseudotipizzati rappresentando un modello di studio per virus altamente patogeni, come descritto nel paragrafo seguente.

2.5 Virus pseudotipizzati

Il pathway di ingresso del virus della Rabbia e quello del CCHFV possono essere investigati anche utilizzando la pseudotipizzazione virale. Questo metodo si basa sull'impiego di virus (non patogeni) ingegnerizzati in modo tale da produrre virioni contenenti sulla loro superficie le glicoproteine di un virus eterologo di interesse. Il virus pseudotipizzato è in grado di imitare il tropismo e la modalità di ingresso del virus dal quale sono derivate le glicoproteine. Ad oggi, i due sistemi principali di pseudotipizzazione coinvolgono virus che sono in grado di acquisire facilmente sul loro involucro glicoproteine eterologhe, questi sono i Rhabdovirus e i Retrovirus. Gli studi condotti su virus altamente patogeni come l'Ebola si sono basati principalmente sull'utilizzo di virus pseudotipizzati basati sul virus della Stomatite Vescicolare (VSV). Per produrre un virus pseudotipizzato con le glicoproteine di rabbia e CCHFV, il gene che codifica la glicoproteina di membrana G del VSV viene sostituito con un gene reporter che codifica la proteina fluorescente verde (GFP) o la luciferasi (luc). Il genoma del VSV così ingegnerizzato, clonato in un plasmide, viene co-trasfettato nelle cellule insieme ad un vettore di espressione

contenente il gene codificante la glicoproteina di membrana del virus di interesse, consentendo così la formazione di uno stock virale di VSV pseudotipizzato con la glicoproteina eterologa. Questa tipologia di virus pseudotipizzato è in grado di infettare le cellule bersaglio ma non produce progenie virale infettiva poiché viene a mancare la presenza di una glicoproteina sull'envelope virale (virus a singolo ciclo replicativo). Gli stock virali di VSV pseudotipizzato con le glicoproteine del virus di nostro interesse possono essere, successivamente, usati come strumento utile per indagare il meccanismo di ingresso del virus e per testare potenziali inibitori dell'ingresso virale (Zivec et al., 2016).

2.6 Drug repurposing

Il riposizionamento dei farmaci (chiamato anche riprofilazione o riassegnazione dei farmaci) è una strategia per identificare nuovi usi per farmaci approvati o sperimentali che non rientrano nell'ambito dell'indicazione medica originale. Questa strategia offre vari vantaggi rispetto allo sviluppo di un farmaco completamente nuovo per una determinata indicazione. Innanzitutto, e forse la cosa più importante, il rischio di fallimento è inferiore. Poiché il farmaco riproposto si è già dimostrato sufficientemente sicuro nei modelli preclinici e nell'uomo, se sono stati completati i trials in fase iniziale, è meno probabile che fallisca, almeno dal punto di vista della sicurezza, nei successivi studi di efficacia. In secondo luogo, i tempi per lo sviluppo dei farmaci possono essere ridotti, perché la maggior parte dei test preclinici, della valutazione della sicurezza e, in alcuni casi, dello sviluppo della formulazione saranno già stati completati. In terzo luogo, sono necessari meno investimenti, anche se questi varieranno notevolmente a seconda della fase e del processo di sviluppo del candidato al riconvertimento. I costi regolatori e di fase III potrebbero rimanere più o meno gli stessi per un farmaco riproposto e per un nuovo farmaco nella stessa indicazione, ma potrebbero comunque esserci risparmi sostanziali nei costi preclinici e di fase I e II. Tutti questi vantaggi hanno il potenziale di tradursi in un ritorno sull'investimento meno rischioso e più rapido nello sviluppo di farmaci riproposti, con costi medi associati inferiori. Infatti, i costi per portare sul mercato un farmaco riproposto sono stati stimati in media a 300 milioni di dollari mentre si fa una stima di ~ \$ 2-3 miliardi per un nuovo farmaco (Pushpakom et al., 2019). Infine, i farmaci riproposti possono rivelare nuovi bersagli e percorsi che possono essere ulteriormente sfruttati. Storicamente, il riposizionamento dei farmaci è stato in gran parte opportunistico e fortuito. Una volta che si è scoperto che un farmaco aveva un effetto fuori bersaglio o un effetto on target appena riconosciuto, veniva portato avanti per lo sfruttamento commerciale.

Per quanto concerne molte malattie virali, la possibilità di sviluppo di farmaci specifici è bassa, sia per i rischi di fallimento sia per il numero sempre crescente di nuovi virus in grado di comportare rischi per la salute umana.

Da quanto sopra riportato, si deduce che il riposizionamento di farmaci potrebbe essere una strategia vincente per lo sviluppo di terapie nei confronti di molte malattie virali.

3. SCOPO DELLA TESI

Il CCHFV e il virus della rabbia sono virus altamente patogeni che ogni anno causano numerosi decessi in tutto il mondo. Sebbene entrambi siano conosciuti da molto tempo, ad oggi non vi sono dei farmaci specifici approvati che possano considerarsi efficaci contro questi patogeni. Di conseguenza, lo scopo di questo lavoro di tesi è focalizzato sulla produzione di pseudovirus contenenti le glicoproteine del CCHFV o del RABV per testare una libreria di farmaci approvati dalla FDA americana per il riposizionamento di farmaci noti quali antivirali per il trattamento della rabbia e/o della CCHF. Infatti, tali pseudovirus, mimando il tropismo dei virus che li pseudotipizzano e la loro modalità d'ingresso nelle cellule, risultano un ottimo modello per identificare possibili inibitori dell'ingresso. Inoltre, la disponibilità di librerie commerciali di farmaci approvati facilita molto le operazioni di screening combinate con il modello pseudovirale.

4. MATERIALI E METODI

4.1 Linee cellulari

a. HEK293T (ATCC Number CRL-11268) Linea cellulare derivata da tessuto renale embrionale umano che esprime l'antigene T del virus vacuolante della scimmia (SV40). Questa linea cellulare a morfologia stellata è frequentemente usata per l'espressione di proteine in quanto proprio l'antigene T permette una replicazione efficiente di particolari vettori plasmidici.

b. VERO (ATCC Number CCL-81) Linea cellulare isolata da cellule di tessuto epiteliale renale derivante dalla scimmia verde africana (*Cercopithecus Aethiops*). Le cellule VERO vengono spesso utilizzate per l'isolamento e la produzione di molti virus

c. Huh7 Linea cellulare umana isolata da carcinoma epatocellulare umano, spesso utilizzata nell'ambito della ricerca sui virus quali Dengue e HCV (questa linea cellulare è stata gentilmente fornita dal professor Gualtiero Alvisi).

Tutte le colture cellulari sono state coltivate in terreno di crescita DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco) a cui è stato addizionato il 10% v/v di FBS (Fetal Bovin Serum, Gibco) inattivato a 56°C per 30 minuti. Le cellule sono state mantenute in condizioni costanti di temperatura, pari a 37°C, con il 95% di umidità relativa ed in atmosfera addizionata del 5 % di CO₂

4.2 Ceppo batterico

a. DH5 α Questi batteri Gram-negativi sono un ceppo di E. coli ingegnerizzato per ottimizzare l'efficienza della produzione plasmidica. La coltivazione è stata effettuata in terreno liquido LB (Luria-Bertani, 10g/L NaCl, 5g/L Estratto di lievito, 10g/L Bacto Tryptone) posto in agitazione a 37°C.

4.3 Plasmidi

a) p-CG Vettore pCAGGS in cui è stato clonato il gene G di CCHFV (ceppo IbAr10200), posto sotto il controllo trascrizionale del promotore precocissimo del citomegalovirus (CMV-IE) e codificante la proteina GPC di CCHFV.

b) RABVg: Plasmide contenente il cDNA del gene G del virus della rabbia (ceppo CVS 11) che codifica per la glicoproteina virale G.

c) pVSVg Vettore pCAGGS contenente il gene del virus della stomatite vescicolare VSV-g, posto sotto il controllo trascrizionale del promotore CMV-IE, codificante la glicoproteina G del pericapside del VSV, in grado di conferire un ampio spettro di infezione. Il plasmide è stato gentilmente fornito dal Professor Robert A. Davey, Texas Biomedical Research Institute, San Antonio, Texas, Usa.

Tutti i vettori plasmidici contengono anche il gene amp^R che conferisce resistenza all'antibiotico Ampicillina e sono stati gentilmente forniti dal Professor Robert A. Davey, (Texas Biomedical Research Institute, San Antonio, Texas, USA)

4.4 Virus

a) rVSV- Δ G-LUC Questo virus è stato prodotto inserendo il gene codificante la proteina luciferasi, al posto del gene codificante la glicoproteina di membrana G wild type del Virus della Stomatite Vescicolare (VSV). Questo ceppo virale è stato fornito dal Professor Michael Whitt, University of Tennessee, Memphis, TN, USA.

b) VSV-GP-CCHFV Virus ricombinante rVSV- Δ G-LUC pseudotipizzato con le glicoproteine G_c e G_n dell'envelope del virus della febbre emorragica della Crimea e del Congo.

c) VSV-GP-RABV Virus ricombinante rVSV- Δ G-LUC pseudotipizzato con la proteina G del virus della rabbia.

4.5 Anticorpi

Anticorpo primario 23H12 (Kerafast): anticorpo monoclonale di topo legante la proteina M della matrice virale di VSV. L'anticorpo è concentrato 1 mg/mL.

Anticorpo secondario: Alexa Fluor 488 (Invitrogen): anticorpo monoclonale anti-mouse di capra, ingegnerizzato con un fluoroforo fluorescente nel verde.

L'anticorpo è concentrato 2 mg/mL

4.6 Produzione plasmidica

4.6.1 Preparazione batteri competenti

I batteri DH5 α sono stati resi artificialmente competenti per la trasformazione mediante la tecnica del calcio cloruro. I batteri sono stati fatti crescere in 3 mL di terreno Luria Bertani (LB) addizionato di MgCl₂ 15mM, a 37 °C, fino al raggiungimento di una densità ottica (OD) di 0.4-0.6 misurata alla lunghezza d'onda di 600 nm. L'inoculo è stato trasferito in un volume di 400 mL del medesimo terreno e alle medesime condizioni di crescita fino al raggiungimento della stessa (OD). La coltura è stata raffreddata rapidamente in ghiaccio per interrompere la crescita batterica. I batteri sono stati centrifugati a 3500 rpm per 15 minuti e risospesi in soluzione fredda contenente MnCl₂•4H₂O 10 mM, CaCl₂ 50 mM e 2-(N-morpholino) - ethanesulfonic acid (MES) 10 mM a pH 6,3. I batteri sono stati nuovamente centrifugati come descritto sopra, e risospesi delicatamente in 12,5 mL della stessa soluzione fredda addizionata con glicerolo al 15% v/v. Sono state fatte aliquote di 50 μ L conservate a -80° C.

4.6.2 Trasformazione di batteri competenti

La trasformazione batterica, necessaria per proseguire con l'amplificazione dei plasmidi necessari successivamente alla produzione dei virus pseudotipizzati è stata eseguita mediante la tecnica dello shock termico di cellule competenti di DH5 α . Le aliquote contenenti 50 μ L di batteri sono state scongelate e ad esse sono stati addizionati 200 ng di DNA plasmidico. La soluzione è stata incubata in ghiaccio per 30 minuti e successivamente è stata messa a 37°C per 2-3 minuti per poi essere nuovamente riposta in ghiaccio. Alla soluzione batterica sono stati aggiunti 200 μ L di terreno LB a temperatura ambiente e incubata per 1 ora e 30 minuti a 37°C. Durante questa fase le cellule iniziano ad esprimere la resistenza all'ampicillina conferitagli dal gene ampR del plasmide. I batteri trasformati sono stati piastrati in piastre Petri allestite con terreno LB-Agar addizionato con l'agente di selezione

Ampicillina in concentrazione 100 µg /mL. Le piastre sono state incubate a 37°C O/N.

4.6.3 Produzione del DNA plasmidico

Dopo l'incubazione delle piastre Petri, sono state selezionate delle colonie batteriche e inoculate singolarmente in tubi ventilati con 3 mL di terreno liquido LB contenente l'agente di selezione Ampicillina. A seconda della necessità a partire dai mini inoculi sono stati fatti dei maxi inoculi trasferendo i 3 mL di coltura batterica in 200 mL di terreno LB addizionato con Ampicillina. Entrambe le tipologie di inoculo sono state incubate a 37°C per un periodo di 16 ore a 120 rpm. A seguire è stata eseguita l'estrazione e la quantificazione del DNA plasmidico.

4.6.4 Purificazione del DNA plasmidico

L'estrazione e la purificazione del DNA plasmidico è stata ottenuta sfruttando, a seconda della tipologia di inoculo, il Kit per la purificazione del DNA plasmidico "Purelink™ Quick Plasmid Miniprep Kits" o il Kit "PureLink™ HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit (Invitrogen)". Questi kit vengono impiegati quando è necessario ottenere una preparazione di DNA plasmidico ad alto grado di purezza.

a) Pure link Quick Plasmid Miniprep Kits

Questo kit si basa sulla tecnica di cromatografia a scambio ionico, grazie alla quale il DNA, carico negativamente si lega alle particelle di silice contenute nella colonna, cariche positivamente. La separazione delle molecole avviene in base alla forza con cui queste si legano a particelle elettricamente cariche. In condizioni di elevata forza ionica, la presenza di sali permette di sottrarre le particelle di acqua 30 alle molecole di DNA che, a loro volta, vengono catturate dalla membrana di silice mentre i contaminanti eluiscono senza legarsi. Il DNA plasmidico quindi, viene eluito dalla colonna grazie all'utilizzo di tamponi (soluzioni alcaline) a bassa concentrazione salina. In questo caso 1 mL di batteri proveniente da ciascun tubetto ventilato sono stati prima trasferiti in eppendorf e centrifugati a 1 minuto a 12.000 x g. Successivamente il pellet batterico è stato risospeso in 250 µL di Resuspension Buffer/RNAsi ed è stato lisato mediante l'aggiunta di 250 µL di Lysis Buffer e lasciato a temperatura ambiente per 5 minuti. Alla soluzione sono stati aggiunti successivamente 350 µL di Precipitation Buffer e il tutto è stato centrifugato a 12000 x g per 10 minuti per eliminare la gran parte dei residui batterici. Il surnatante è stato poi trasferito nelle apposite colonnine presenti nel kit. Infine, in seguito a degli step di centrifugazione e addizione di alcuni buffer con etanolo (500 µl di Wash Buffer W10 e 700 µl Wash Buffer W9), il DNA plasmidico è stato eluito con 75 µl di TE Buffer.

b) PureLink™ HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit (Invitrogen)

Anche in questo caso il kit si basa sulla tecnica cromatografica a scambio ionico. La colonia batterica contenente il plasmide d'interesse è stata messa a crescere nelle condizioni descritte nel paragrafo 4.6.3. Al termine della crescita la coltura batterica è stata messa in ghiaccio per bloccarne immediatamente la crescita. Successivamente i batteri sono stati trasferiti in appositi tubi (SORVALL RC5C PLUS| Marshall Scientific) e sottoposti a centrifugazione a 4000 x g per 10 minuti a 4°C. Il pellet risultante è stato risospeso con 10 mL della soluzione R3 (Resuspension buffer) del kit precedentemente addizionata di una RNAasi, anch'essa fornita dal kit. Alla soluzione risospesa sono stati aggiunti 10 mL di L7 (Lysis Buffer) e il tutto è stato mescolato tramite inversione e lasciato a incubare per 5 minuti a temperatura ambiente. In seguito, sono stati aggiunti 10 mL di N3 (Precipitation Buffer) e la soluzione è stata mescolata per inversione. Il contenuto dei tubi è stato, poi, trasferito in colonnine fornite dal kit, precedentemente equilibrate con 30 mL di EQ1 (Equilibration Buffer). Successivamente alle colonnine sono stati aggiunti 15 mL di Elution buffer (E4) necessari per l'eluizione del DNA dal filtro al tubo sottostante, ottenendo il DNA plasmidico purificato da RNA ed altre sostanze. Il DNA è stato fatto precipitare tramite l'aggiunta di 10,5 mL di isopropanolo a temperatura ambiente e conseguente centrifugazione per 30 minuti a 12000 x g, dopo aver precedentemente mescolato per inversione almeno 2 o 3 volte. Dopo la centrifugazione, l'isopropanolo è stato rimosso e sostituito da 5 mL di etanolo al 70% v/v e la nuova soluzione è stata nuovamente centrifugata a 12000 x g per 5 minuti. Al termine della centrifuga l'etanolo è stato rimosso e il DNA plasmidico, una volta asciutto è stato risospeso in 500 µL di buffer TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8) per poi essere conservato a 4°C fino al suo successivo utilizzo

4.6.5 Quantificazione del DNA plasmidico

Il DNA plasmidico ottenuto dalle fasi precedenti è stato quantificato attraverso l'utilizzo dello spettrofotometro NanoDrop™ One (Thermo Scientific). Questo strumento permette la lettura della densità ottica (DO) alla lunghezza d'onda desiderata, in questo caso a 260 nm che è la lunghezza d'onda in cui le basi azotate hanno il massimo assorbimento. Lo spettrofotometro è dotato di software che permette di stabilire la concentrazione dell'acido nucleico analizzato grazie alla legge di Lambert-Beer: $C = A / (\epsilon * d)$. A è l'assorbanza del campione (quantità di luce assorbita), ϵ è il coefficiente di estinzione molare (per il dsDNA equivale a $6600 \text{ M}^{-1} * \text{cm}^{-1}$), d è il cammino ottico percorso dalla luce nel mezzo/soluzione (corrispondente a 1 mm) e C è la concentrazione dell'acido nucleico in soluzione (fornita nell'unità di misura ng/µl). Per determinare la purezza dell'acido nucleico vengono utilizzati due rapporti:

-A260/A280 che è indice di contaminazione da proteine (per il DNA tale valore deve essere compreso tra 1.6-1.8 mentre per l'RNA tra 1.8-2.0)

-A260/A230 che è indice di contaminazione da carboidrati/fenoli (per il DNA il valore ottimale è intorno al 2.2). Conseguentemente all'analisi, in base alle diverse lunghezze d'onda dei diversi composti, è possibile avere delle indicazioni sulle qualità dei campioni purificati.

4.7 Tecniche di biologia cellulare

4.7.1 Trasfezione del DNA plasmidico

La trasfezione con il DNA plasmidico è stata effettuata su cellule HEK293T seguendo un protocollo di trasfezione chimica con calcio fosfato ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). Questo tipo di trasfezione si basa sul fatto che il DNA costituisce dei cristalli assieme al calcio fosfato i quali poi, precipitando sulla membrana cellulare, vengono endocitati permettendo l'ingresso del plasmide nella cellula. Per ottimizzare il protocollo di produzione dei virus pseudotipizzati e ottenere un titolo virale migliore sono stati utilizzati tempi di incubazioni e volumi di lavoro diversi. La trasfezione viene effettuata in una fiasca T175 contenente cellule HEK293T, seminate precedentemente in una quantità di $17,5 \times 10^6$, e prevede la preparazione preventiva di due mix composte come presentato in tabella 2

MIX A	Volume	Mix B	Volume
TE buffer 1:10	1050 μL	HPB 2X	1175 μL
80 ng DNA			
CaCl_2	117 μL		

Tabella 2 Composizione delle soluzioni per la trasfezione.

Dopo averle preparate, le due mix vengono miscelate e incubate per 30 minuti per permettere la formazione dei cristalli tra DNA e calcio fosfato, essenziali per l'intero processo di trasfezione. Successivamente, la soluzione è stata aggiunta alle cellule in 18 oppure 10 mL di DMEM con 10% di FBS. Le cellule sono state quindi incubate per tempi variabili di 4 o 5 oppure 7 ore a 37°C , al termine delle quali è stato rimosso il terreno di coltura e le cellule sono state lavate per due volte con 12 mL di PBS 1X (Phosphate-Buffered Saline, Gibco) A seguito dei lavaggi alle cellule sono stati addizionati 20 mL di terreno DMEM 10% FBS e incubate 24 ore.

4.7.2 Pseudotipizzazione virale

Al termine dell'incubazione le cellule sono state lavate con PBS 1x e sono stati aggiunti 10 mL di DMEM senza siero. L'infezione è stata effettuata con VSV- ΔG -

Luc a molteplicità di infezione (MOI) di 0,1 per la propagazione del pVSV (le cellule sono state trasfettate con VSVg), MOI 1 per le cellule trasfettate con RABVg e MOI 0.1 per le cellule trasfettate con CCHFV. La quantità appropriata di pVSV è stata risospesa in 1 mL di DMEM e aggiunta alle cellule per 2 ore a 37°C. Quindi, le cellule sono state lavate due volte con PBS 1x e sono stati aggiunti 12 mL di DMEM con il 10% di FBS durante l'incubazione delle cellule

4.7.3 Concentrazione dei virus pseudotipizzati tramite ultracentrifugazione

A 20/24 ore dall'infezione, il terreno è stato raccolto e centrifugato a 3800 giri/min per 7 minuti per rimuovere i detriti. Il surnatante recuperato è stato accuratamente trasferito in provette autoclavate contenenti una soluzione di saccarosio al 20%; Alla fine di questo passaggio è disponibile una soluzione in due fasi. Questi tubi sono stati poi sottoposti a ultracentrifugazione per 5-6 ore a 20000 giri/min, ottenendo la formazione di pellet virali. I pellet sono stati risospesi in PBS 1x, aliquotati e conservati a -80°C per un uso futuro. Per quanto riguarda rVSV-ΔG-LUC, dopo la centrifuga per rimuovere le cellule staccate e i detriti, il surnatante viene direttamente raccolto e aliquotato per essere conservato a -80°C, evitando il passaggio di ultracentrifugazione. Tale differenza è dovuta alla necessità di concentrare ulteriormente VSV-GP-CCHFV e VSV-GP-RABV che rispetto a rVSV-ΔG-LUC vengono prodotti con maggior difficoltà e con un titolo più basso. Durante tutto il processo, sono state prese precauzioni appropriate per garantire il successo della propagazione e del recupero del VSV-ΔG-Luc ricombinante con la glicoproteina eterologa. Il protocollo era sufficientemente flessibile da adattarsi alle variazioni delle dimensioni delle fiasche e della MOI secondo necessità.

4.7.4 Determinazione titolo virale

Il titolo virale è stato determinato infettando cellule Vero CCL81 con diluizioni seriali 1:2 dello stock virale. L'infezione, con ogni diluizione, viene eseguita in triplicato. Le cellule sono state seminate 24 ore prima dell'infezione in una piastra da 96 pozzetti con una densità di 2×10^4 cellule/100 μ L in terreno DMEM al 10% di FBS/ pozzetto. L'infezione, in tutte le sue diluizioni, è stata eseguita inoculando 50 μ L di diluizione virale, preparata con terreno DMEM senza siero, per pozzetto e incubando la piastra per 1 ora a 37°C. Terminato il periodo di incubazione, le cellule sono state lavate per 2 volte con PBS 1X, addizionate di 100 μ L di terreno DMEM al 10% di FBS e incubate per 24 ore alle stesse condizioni di temperatura. Passate le 24 ore, alle cellule è stato rimosso il mezzo di coltura per poi essere lavate 1 volta con PBS 1X. La fissazione delle cellule necessaria per le fasi successive è stata effettuata aggiungendo 60 μ L di una soluzione preraffreddata di Acetone-Metanolo in proporzione 1:1 per 45 minuti a -20°C. Dopo l'incubazione, il fissativo viene

rimosso e le cellule vengono nuovamente lavate con PBS 1X. Per bloccare i siti aspecifici, a cui potrebbe legarsi l'anticorpo primario alle cellule, vengono aggiunti 60 μ L di una soluzione di PBS-BSA (PBS 1X, Albumina di Siero Bovino 2,5%) a ciascun pozzetto, lasciando in incubazione per 1 ora a RT (Room Temperature). La soluzione viene poi rimossa e alle cellule è stato aggiunto l'anticorpo primario monoclonale di topo diluito 1:4000 in PBS-BSA-TWEEN (PBS 1X, BSA 2,5%, TWEEN 20 0,1%) in un volume finale di 60 μ L e incubate a 37°C per 1 ora e 30 minuti, l'anticorpo in questione si lega alla proteina M del VSV. Il TWEEN 20 è un detergente che in questo caso ha una doppia funzione in quanto permeabilizza la cellula e inoltre rompe o previene legami deboli e aspecifici tra l'anticorpo e altre proteine. Terminato il periodo di incubazione le cellule sono state nuovamente lavate 1 volta con PBS 1X per poi aggiungere l'anticorpo secondario Alexa Fluor 488 anti-mouse diluito 1:800 in 60 μ L della stessa soluzione di PBS-BSA-TWEEN. Le cellule sono state lasciate ad incubare al buio per 1 ora a 37°C. Dopo l'incubazione le cellule sono state lavate per 2 volte con PBS 1X, per poi procedere con la conta delle cellule positive al microscopio a fluorescenza. Il titolo virale è stato calcolato secondo la formula: $FFU\ ml = N\ D \times V$ in cui FFU/mL è il titolo espresso come unità formanti foci (Focus Forming Unit) per millilitro, N è la media delle cellule fluorescenti ad una data diluizione, D è il coefficiente di diluizione dell'inoculo virale e V è il volume dell'inoculo in mL.

4.8 Libreria di farmaci

La libreria di farmaci è stata acquistata presso TargetMol® ed è composta da una collezione unica di 1300 farmaci approvati dalla FDA per lo screening ad alto rendimento (HTS) e lo screening ad alto contenuto (HCS). Ciascun farmaco ha bioattività e sicurezza confermate da evidenze di ricerca preclinica e da studi clinici. La libreria copre varie aree di ricerca: oncologia, cardiologia, antinfiammatori, immunologia, neuropsichiatria, analgesia ecc. è quindi strutturalmente diversificata, medicinalmente attiva e permeabile alle cellule. Per ciascun farmaco viene fornita una ricca documentazione con descrizione della struttura, del target, del valore IC50 e dell'attività biologica. Ogni molecola è stata convalidata mediante NMR e HPLC/LCMS per garantirne un'elevata purezza.

4.9 Saggio di luciferasi

Per misurare la quantità di virus che è riuscita a entrare all'interno delle cellule infettate si esegue un saggio di luciferasi dopo aver eseguito alcuni passaggi fondamentali. Inizialmente si semina una piastra a 96 pozzetti con 20000 cellule CCL81 per pozzetto. Il giorno dopo si rimuove il terreno e si aggiunge 100 μ L di un mix di DMEM e di composto diluito a concentrazione 25 μ M per 1 ora per

effettuare un pre-trattamento. Successivamente si procede effettuando un co-trattamento con un mix composto da:

- Virus pseudotipizzato a MOI 0.01 per il CCHFV e MOI 0.1 per il virus pseudotipizzato della rabbia;
- composto della libreria a concentrazione 25 μ M;
- DMEM serum free

per un'ora. Passato il tempo si rimuove la mix, si lava con PBS e si incubano le cellule per 6 ore a 37°C in DMEM 10% FBS.

Dopo aver eseguito questi passaggi si recuperano le piastre dall'incubatore e si esegue un saggio di luciferasi utilizzando Steady Glo diluita in PBS. Si aggiungono 100 μ L di Steady Glo diluita 1:10 per ogni pozzetto, si incuba la piastra per 5 minuti a 37°C, si recupera la piastra e si trasferiscono 150 μ L della soluzione presente in ogni pozzetto in una piastra bianca opaca al fine di eseguire la lettura della luminescenza al Luminometro Varioscan.

Precedentemente è stata svolta un'ottimizzazione del protocollo di luciferasi per accertarsi che la luminescenza prodotta nei pozzetti delle piastre bianche opache non influenzasse i valori dei pozzetti circostanti, rendendo la lettura di difficile comprensione. È stato verificato con un test che i pozzetti in cui veniva effettuato il saggio di luciferasi modificavano di molto poco la luminescenza nei pozzetti circostanti, innalzando di un valore non significativo la RLU (Unità di Luce Relativa). Inoltre, si è verificato che non fosse necessaria un'incubazione over night dopo il trattamento con pseudovirus e farmaco, ma che fossero sufficienti 6 ore di incubazione per poter osservare dei risultati significativi.

Ciascun farmaco è stato testato in doppio e successivamente è stata fatta la media aritmetica tra i due valori di luminescenza. I risultati ottenuti dalla media delle due letture della luminescenza sono stati poi rapportati a un controllo positivo, in cui le cellule non sono state trattate col farmaco, utilizzando la seguente formula: $(RLU \text{ campione}/RLU \text{ controllo positivo}) \cdot 100$. In questo modo si può osservare la percentuale di inibizione della luminescenza.

5. RISULTATI

5.1 Produzione DNA plasmidico

Dopo aver prodotto il DNA plasmidico codificante le glicoproteine di interesse, necessario per la trasfezione delle cellule per la preparazione del virus pseudotipizzato, si eseguono delle analisi allo spettrofotometro (Nanodrop) al fine di determinarne la concentrazione e valutare il grado di purezza. Nel corso del

tirocinio sono state eseguite diverse produzioni, in periodi diversi, di RABVg, con VSVg e pCG a seconda delle necessità. Nelle tabelle 3, 4 e 5 sono riportati i valori misurati per ciascuna preparazione.

Si evince che ci sono delle variazioni di concentrazione tra le diverse produzioni ma questo risultato potrebbe dipendere dalla variabilità della crescita batterica. Sebbene i valori di purezza non siano ottimali, per esperienza precedente sono comunque accettabili per poter proseguire allo step successivo di trasfezione.

QUANTITA' DNA VSV	A=260/280	A=260/230
887,8 ng/μL	1,90	2,22

Tabella 3 Produzione del plasmide codificante la proteina G VSV

QUANTITA' DNA CCHFV	A=260/280	A=260/230
640 ng/μL	1,93	2,22
1432,9 ng/μL	1,93	2,28

Tabella 4 Produzione del plasmide codificante la proteina G CCHFV

QUANTITA' DNA RABBIA	A=260/280	A=260/230
2734,5 ng/μL	1,97	2,30

Tabella 5 Produzione del plasmide codificante la proteina G RABV

5.2 Produzione e titolazione dei virus pseudotipizzati

Dopo aver trasfettato le cellule con il plasmide p-CG o p-VSVg o RABVg e successivamente infettato con rVSV-ΔG-LUC, gli stock virali risultanti sono stati concentrati tramite ultracentrifugazione, tranne nel caso della produzione di rVSV-ΔG-LUC, e sono stati aliquotati in provette con tappo a vite e riposti a -80°C. Per determinare il titolo degli stock di virus, è stato utilizzato un protocollo di immunofluorescenza indiretta. In questo protocollo è possibile distinguere le cellule infettate perché emettono fluorescenza verde grazie alla marcatura indiretta della proteina M del VSV da parte dell'anticorpo coniugato ad un fluoroforo che lega l'anticorpo monoclonale anti VSV-M. La formula utilizzata per determinare il titolo virale è riportata al paragrafo 4.7.4. Per il conteggio delle cellule positive è stata scelta una diluizione alla quale le cellule fluorescenti risultassero facilmente contabili, ma non troppo poche da produrre un risultato poco significativo a causa della variabilità. Attraverso la conta al microscopio a fluorescenza ed applicando l'appropriata formula (vedi paragrafo 4.7.4) sono stati calcolati i titoli virali

presentati in tabella 6. Per ogni produzione virale si sono ottenuti dai 500 µl a 1 mL di virus, a seconda del volume di medium nel quale è stato risospeso il pellet del virus ultracentrifugato, partendo da 40-50 mL di surnatante della coltura cellulare precedentemente trasfettata ed infettata.

Produzione pseudotipo virale	Titolo in FFU/mL
rVSV-ΔG-LUC I	1,5 x 10 ⁶
rVSV-ΔG-LUC II	2,2 x 10 ⁶
rVSV-ΔG-LUC III	1,4 x 10 ⁸

Tabella 6 Titolo degli stock di rVSV-ΔG-LUC

Produzione pseudotipo virale	Titolo in FFU/mL
VSV-GP-RABV I	1,1 x 10 ⁵
VSV-GP-RABV II	6,5 x 10 ⁶
VSV-GP-RABV III	2,5 x 10 ⁷

Tabella 7 Titolo degli stock di VSV-GP-RABV

Produzione pseudotipo virale	Titolo in FFU/mL
VSV-GP-CCHFV I	1,1 x 10 ⁴
VSV-GP-CCHFV II	8,4 x 10 ⁴
VSV-GP-CCHFV III	9,8 x 10 ⁴
VSV-GP-CCHFV IV	2,4 x 10 ⁶

Tabella 8 Titolo degli stock di VSV-GP-CCHFV

Come si evince dalle tabelle, è stata osservata una certa variabilità nei diversi titoli virali delle diverse produzioni. La produzione di rVSV-ΔG-LUC (Tabella 6) e VSV-GP-RABV (Tabella 7) presenta dei titoli elevati alle condizioni di produzione indicate al paragrafo 4.7.2 e questo può essere dovuto al fatto che i due virus appartengono alla stessa famiglia e quindi vi è una efficienza simile di incorporazione della glicoproteina nel virione. Nel caso del VSV-GP-CCHFV, avendo ottenuto dei titoli bassi con il protocollo standard di produzione, è stato deciso di provare a variare specificatamente i tempi di incubazione della trasfezione e infezione e i volumi ad essi associati. I titoli maggiori sono stati ottenuti utilizzando tempi di incubazione di 7 ore per la trasfezione, 2 ore per l'infezione e volumi di trasfezione e infezione di 10 mL. Questo ha portato a un titolo in linea con le produzioni degli altri due pseudovirus (Tabella 8).

5.3 Screening libreria di farmaci

Lo screening dei farmaci, come riportato al paragrafo 4.9, è stato svolto su un formato di piastre da 96 pozzetti. La libreria di farmaci è stata fornita in piastre con 80 farmaci per piastra e nello screening si è mantenuto lo stesso schema.

È stato riportato in letteratura che molecole in grado di inibire l'ingresso virale dovrebbero essere in grado di inibire l'infezione almeno del 90% per poter avere un effetto antivirale ragionevole ai fini terapeutici (Anantpadma et al., 2016). In questo studio si è deciso di applicare una soglia dell'80% dell'inibizione virale per selezionare le molecole da considerare per le fasi di studio successive allo screening. Questa scelta è stata operata al fine di poter individuare un numero maggiore di possibili farmaci candidati alle successive fasi di sperimentazione così che alla fine del processo vi sia una maggiore probabilità di trovare qualche candidato potenzialmente interessante.

Dato che le titolazioni riguardanti le prime produzioni di VSV-GP-CCHFV davano dei risultati non adeguatamente elevati si è deciso di iniziare lo screening utilizzando una MOI di 0.01 per VSV-GP-CCHFV e una MOI di 0.1 per VSV-GP-RABV che garantiva titoli più elevati nelle preparazioni.

In tutte le piastre analizzate in questo lavoro di tesi, tranne una, sono stati individuati dei farmaci in grado di inibire l'ingresso del virus pseudotipizzato di almeno l'80%. Come si può osservare dalle tabelle di seguito riportate, l'inibizione ha raggiunto in alcuni casi valori vicini al 100%. Allo stesso modo si osserva che alcuni farmaci hanno invece determinato l'ottenimento di percentuali maggiori rispetto al controllo, addirittura superiori al 2900%, suggerendo un qualche effetto positivo sull'efficienza di infezione e/o sulla espressione della luciferasi.

Dall'analisi delle tabelle si può evincere un altro risultato interessante; infatti, confrontando le percentuali delle piastre con VSV-GP-RABV e VSV-GP-CCHFV si osserva che molti farmaci hanno un ottimo effetto inibente per entrambi gli pseudovirus (ad esempio il pozzetto 5E della tabella 9) ma si nota anche che molti farmaci con una buona inibizione per uno, hanno una pessima inibizione per l'altro. Questo ci potrebbe suggerire che alcuni farmaci agiscono su determinati recettori o altri fattori cellulari che favoriscono l'infezione di uno solo dei due virus.

Il pozzetto 9G della tabella 9 mostra come lo stesso farmaco abbia avuto un effetto inibitorio quasi del 100% per la rabbia mentre vi sia un effetto amplificatore nel caso dello pseudovirus con le glicoproteine del CCHFV.

I pozzetti 4C e 4E nelle tabelle 10, al contrario, danno il risultato opposto, ovvero vi è una forte inibizione per VSV-GP-CCHFV e un effetto inibitorio piuttosto blando nel caso del VSV-GP-RABV.

La tabella 11 mostra un altro dato interessante. Si può vedere che il farmaco presente nel pozzetto 4F ha un valore percentuale di attività luciferasica del 2984,99% rispetto al controllo nel caso dello pseudovirus della rabbia, mentre nel test con lo pseudovirus del CCHFV l'ingresso è stato inibito di più del 70%.

RLU	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		36,60	54,18	49,19	50,66	42,41	56,48	50,95	59,11	46,91	53,67	
B		58,86	65,63	42,04	58,91	27,45	53,29	38,61	70,45	32,32	52,39	
C		80,51	53,80	43,46	33,04	34,75	52,69	50,87	62,71	48,17	33,59	
D		58,50	45,51	32,27	180,80	16,80	37,17	41,94	16,11	42,09	54,78	
E		4,71	44,14	28,48	0,37	34,74	394,37	42,30	132,30	32,21	60,97	
F		53,77	53,71	40,59	43,78	44,46	51,18	14,90	55,43	42,76	30,81	
G		69,40	55,01	38,69	80,05	1,36	43,99	53,99	17,09	35,28	23,59	
H		70,88	50,27	34,59	55,87	29,94	39,26	52,07	39,31	41,42	76,06	

RLU%	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		41,68	36,73	83,20	72,02	74,90	77,28	65,62	61,82	82,16	70,61	
B		98,14	84,21	82,20	70,56	63,96	57,29	56,31	79,24	100,16	91,82	
C		67,39	66,81	100,94	69,92	52,95	78,70	67,52	51,93	74,89	78,47	
D		69,34	99,62	83,89	26,38	58,00	71,28	85,67	4,98	59,70	0,27	
E		3,72	85,56	88,86	0,70	72,61	51,67	70,20	52,94	28,13	77,37	
F		56,08	63,66	54,02	56,42	88,76	84,82	21,11	80,63	78,75	33,35	
G		63,09	103,68	77,26	83,16	0,39	56,12	87,27	126,77	55,78	96,73	
H		92,59	68,45	110,39	51,13	33,41	71,73	100,07	73,89	78,72	16,99	

Tabella 9 Risultati dello screening dei farmaci della piastra 1 per VSV-GP-RABV (in alto) e per VSV-GP-CCHFV (in basso)

RLU	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		106,73	70,54	75,18	53,33	41,95	39,08	36,31	38,29	19,71	52,97	
B		110,78	55,43	38,17	37,80	27,56	30,16	29,14	48,15	32,66	81,49	
C		63,56	101,17	71,40	13,98	34,18	30,25	11,90	42,87	61,83	72,36	
D		71,26	44,38	37,69	81,16	17,89	23,94	27,56	32,23	50,94	32,83	
E		68,85	33,01	76,18	10,33	20,76	15,88	32,14	29,32	8,58	35,03	
F		42,86	36,58	9,09	33,43	1,22	16,76	10,21	27,12	48,54	43,41	
G		25,73	58,79	90,94	50,48	1,56	17,12	36,29	42,19	48,65	54,46	
H		118,76	72,87	67,69	66,85	46,49	41,00	3,29	72,26	79,30	65,92	

RLU	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,00	71,03	73,15	46,95	55,20	29,34	45,07	38,26	56,15	10,84	41,39	0,00
B	0,00	37,27	50,04	21,24	35,48	27,44	22,02	30,22	30,87	38,18	39,75	0,00
C	0,00	43,99	26,16	11,80	11,06	12,19	17,34	16,69	27,59	25,39	25,35	0,00
D	0,00	45,56	38,71	18,79	26,88	23,20	18,69	21,91	32,39	30,44	29,39	0,00
E	0,00	45,25	36,21	13,85	28,66	24,48	23,61	26,22	14,35	44,45	15,15	0,00
F	0,00	17,78	28,61	16,24	26,73	21,48	20,56	21,11	59,28	24,85	35,44	0,00
G	0,00	28,66	41,94	53,85	25,13	17,24	31,34	30,61	27,77	14,50	44,34	0,00
H	0,00	64,91	49,44	56,03	45,65	39,11	45,21	16,53	54,18	43,09	35,77	0,00

Tabella 10 Risultati dello screening dei farmaci della piastra 2 per VSV-GP-RABV (in alto) e per VSV-GP-CCHFV (in basso)

RLU	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,00	413,70	657,63	404,72	554,90	392,39	476,12	363,05	400,41	391,34	224,84	0,00
B	0,00	452,33	394,12	337,30	315,73	247,43	300,00	303,56	246,58	458,44	289,62	0,00
C	0,00	441,86	212,48	288,71	399,92	130,24	284,14	364,22	172,24	189,27	40,07	0,00
D	0,00	412,29	353,52	335,44	249,32	276,14	283,72	245,01	5,01	356,39	199,52	0,00
E	0,00	483,20	5,18	4,13	5,86	145,06	271,25	252,29	342,06	344,45	233,56	0,00
F	0,00	282,83	248,57	2984,99	224,84	335,08	479,42	346,08	289,49	239,04	304,63	0,00
G	0,00	285,48	298,73	342,49	391,41	293,38	326,82	1,87	396,43	7,48	335,77	0,00
H	0,00	286,72	225,24	210,19	375,51	314,98	314,23	292,07	337,07	397,61	221,16	0,00

RLU	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,00	48,02	61,08	79,05	29,72	80,96	70,59	59,08	81,37	91,72	89,05	0,00
B	0,00	89,63	41,15	46,81	36,51	51,75	27,20	46,63	38,73	52,42	70,81	0,00
C	0,00	64,72	37,02	39,89	29,60	27,34	31,96	53,14	36,60	48,44	40,61	0,00
D	0,00	40,95	42,98	36,70	34,86	28,99	26,21	30,45	13,32	30,77	59,37	0,00
E	0,00	38,84	23,94	24,91	25,30	28,52	27,67	31,84	35,62	30,78	42,27	0,00
F	0,00	40,08	51,06	28,59	22,82	37,54	24,49	26,64	49,50	53,77	53,19	0,00
G	0,00	61,17	39,00	39,47	52,12	41,03	32,24	15,66	43,49	12,93	33,38	0,00
H	0,00	61,66	53,59	40,76	40,38	41,04	44,27	40,30	46,17	59,12	45,69	0,00

Tabella 11 Risultati dello screening dei farmaci della piastra 3 per VSV-GP-RABV (in alto) e per VSV-GP-CCHFV (in basso)

RLU	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,00	61,25	56,44	0,83	45,77	50,52	52,77	43,34	47,69	29,93	73,03	0,00
B	0,00	58,25	54,58	47,89	44,38	2,43	87,06	46,75	37,51	3,19	52,16	0,00
C	0,00	46,35	680,97	52,02	53,91	47,62	31,33	19,32	50,48	53,98	39,34	0,00
D	0,00	53,83	58,91	20,69	42,65	33,42	27,54	27,98	31,69	40,59	48,64	0,00
E	0,00	62,37	14,42	36,67	7,39	27,10	26,96	30,64	38,63	45,99	52,78	0,00
F	0,00	66,57	30,91	43,94	42,42	47,69	44,56	28,22	87,16	23,63	55,88	0,00
G	0,00	71,03	61,23	57,02	47,01	52,44	39,09	47,10	41,52	45,98	7,48	0,00
H	0,00	81,19	62,51	57,08	55,50	24,97	26,07	31,37	66,70	79,31	51,75	0,00

RLU	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,00	52,66	38,49	24,19	55,53	59,33	43,39	49,74	33,88	46,30	47,85	0,00
B	0,00	42,43	41,86	46,69	31,07	36,31	43,89	43,68	40,27	23,49	48,40	0,00
C	0,00	45,78	62,51	37,77	44,99	32,55	28,00	31,79	39,89	22,09	46,03	0,00
D	0,00	36,73	30,79	25,31	34,30	32,17	28,16	28,96	27,79	44,78	39,94	0,00
E	0,00	38,62	47,60	37,48	27,05	28,73	34,46	36,00	27,44	45,49	60,78	0,00
F	0,00	38,89	30,40	39,30	39,67	41,87	30,06	35,15	40,96	25,73	37,94	0,00
G	0,00	51,99	53,57	56,55	35,75	29,38	38,93	33,24	32,89	38,65	55,58	0,00
H	0,00	65,34	71,58	59,45	47,16	42,88	60,46	35,14	65,08	54,60	78,80	0,00

Tabella 12 Risultati dello screening dei farmaci della piastra 4 per VSV-GP-RABV (in alto) e per VSV-GP-CCHFV (in basso)

RLU	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,00	185,57	215,06	267,66	269,81	613,79	267,76	173,24	261,98	1,01	249,57	0,00
B	0,00	247,46	241,17	242,93	259,88	229,72	330,65	65,92	102,70	285,76	1,22	0,00
C	0,00	267,87	204,38	23,47	201,95	211,36	148,41	172,44	201,69	117,62	251,65	0,00
D	0,00	297,23	378,42	182,66	137,88	149,24	152,41	108,33	114,21	233,20	282,58	0,00
E	0,00	302,93	229,72	163,87	121,08	13,56	141,93	217,80	253,36	141,80	354,50	0,00
F	0,00	307,84	99,83	48,73	170,20	15,74	135,26	188,06	1,18	172,31	1,05	0,00
G	0,00	3,19	279,15	88,01	202,24	231,35	243,13	0,98	0,99	310,08	295,56	0,00
H	0,00	213,55	184,80	31,90	111,08	170,95	216,75	173,56	385,98	1,23	251,71	0,00

RLU	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,00	195,45	167,50	133,65	148,52	248,66	139,22	173,81	98,05	0,72	176,41	0,00
B	0,00	178,62	202,75	137,17	181,39	144,89	349,92	29,58	197,68	181,30	4,63	0,00
C	0,00	152,51	195,54	18,89	210,81	143,45	123,03	204,59	84,93	209,52	159,49	0,00
D	0,00	192,11	244,68	154,61	118,49	278,53	142,11	252,55	95,58	149,57	222,04	0,00
E	0,00	191,17	134,72	151,96	121,12	39,99	161,73	354,72	203,98	109,10	291,02	0,00
F	0,00	225,26	82,63	20,76	138,82	59,64	146,46	124,69	1,09	116,12	0,85	0,00
G	0,00	1,61	187,82	190,36	155,42	177,76	175,52	0,96	171,08	206,83	223,46	0,00
H	0,00	159,34	126,86	71,48	102,83	157,87	256,87	132,86	132,31	0,79	189,92	0,00

Tabella 13 Risultati dello screening dei farmaci della piastra 5 per VSV-GP-RABV (in alto) e per VSV-GP-CCHFV (in basso)

RLU	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,00	26,05	105,54	143,47	179,16	155,12	23,78	101,08	123,64	129,01	154,09	0,00
B	0,00	116,25	27,44	151,45	172,34	303,32	177,95	205,29	138,62	146,11	0,72	0,00
C	0,00	24,42	117,66	148,02	122,67	96,84	126,23	261,24	115,43	94,70	145,35	0,00
D	0,00	160,51	134,51	151,91	107,30	4,51	125,31	101,24	117,81	120,14	145,49	0,00
E	0,00	130,46	141,30	291,73	105,00	139,72	122,31	140,82	104,91	116,30	141,53	0,00
F	0,00	130,14	148,04	185,22	131,31	135,88	89,36	96,94	103,81	117,55	100,43	0,00
G	0,00	139,49	147,71	203,97	185,52	147,67	153,70	161,65	106,20	120,81	80,21	0,00
H	0,00	136,02	138,85	169,02	154,53	155,42	136,91	159,21	115,67	99,63	98,97	0,00

RLU	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,12	19,82	100,82	102,34	83,35	142,70	88,71	51,37	91,29	86,09	101,49	0,00
B	0,00	116,82	145,67	102,34	115,08	116,12	146,41	92,53	113,08	126,46	0,60	0,00
C	0,00	18,65	121,53	82,00	91,64	89,89	99,70	53,36	100,92	100,20	117,04	0,00
D	0,00	70,23	103,20	84,83	62,17	0,42	108,85	79,67	97,71	90,90	94,23	0,00
E	0,00	113,04	120,99	74,30	89,31	91,59	111,39	88,56	117,04	119,34	134,25	0,00
F	0,00	101,58	105,43	103,97	101,16	113,37	74,59	63,57	85,30	88,53	91,65	0,00
G	0,00	97,25	112,08	129,95	129,28	137,58	120,82	140,50	106,36	121,18	87,79	0,00
H	0,00	112,50	100,79	114,78	134,78	138,76	146,82	111,66	136,23	106,96	78,13	0,00

Tabella 14 Risultati dello screening dei farmaci della piastra 6 per VSV-GP-RABV (in alto) e per VSV-GP-CCHFV (in basso)

Al momento sono stati analizzati 480 dei 1300 farmaci. I risultati hanno mostrato una grande variabilità, andando da un'inibizione della luminescenza di quasi il 100% a valori superiori rispetto a quelli del controllo.

6. DISCUSSIONE

Il virus della rabbia è il prototipo del genere *Lyssavirus* della famiglia *Rhabdoviridae* (Davis et al., 2015). La rabbia umana è considerata una zoonosi trascurata ed è stato stimato che una persona muore di rabbia in un paese in cui la rabbia è endemica ogni 10-20 minuti e che il 40-50% dei decessi riguarda i bambini minori di 15 anni (Fooks et al., 2017). Al momento sono disponibili dei vaccini anti-rabbici, ma non esiste nessun farmaco approvato contro questo virus, se non con scopi palliativi.

Il CCHFV, noto come Virus della Febbre Emorragica della Crimea-Congo, è un membro dell'ordine *Bunyavirales*, appartenente alla famiglia *Nairoviridae*. Questo virus è classificato come patogeno di classe di rischio 4 in quanto è in grado di provocare una patologia ad alta mortalità nell'uomo, per la quale attualmente non esistono terapie profilattiche e di trattamento specifiche (Bente et al., 2013). La diffusione del virus è permessa dalle zecche del genere *Hyalomma*, reservoir naturale e vettore principale della malattia. A causa della vasta distribuzione geografica di questo vettore e delle variazioni climatiche degli ultimi decenni, questa patologia emorragica si sta espandendo ulteriormente, coinvolgendo regioni al di là dei Paesi già colpiti in Europa, Africa e Asia (Bente et al., 2013).

La conoscenza dei cicli replicativi, ed in particolare quello del CCHFV, presentano ancora molte lacune e questo limita le possibilità di sviluppo di farmaci appositamente disegnati su target specifici. Risulta quindi importante studiare il ciclo replicativo e i meccanismi patogenetici di questi virus, in un'ottica di sviluppo di farmaci per ridurre o prevenire l'infezione virale e i suoi effetti.

Di fronte a queste problematiche e data la difficoltà di utilizzare questi virus, i quali richiedono di essere manipolati in laboratori BSL3 (RABV) o BSL 4 (CCHFV), si è adottato un modello di tipo pseudovirale facilmente manipolabile in laboratori BSL 2 per la ricerca di potenziali inibitori dell'ingresso virale. L'uso del virus della stomatite vescicolare pseudotipizzato con le glicoproteine di superficie di CCHFV e RABV offre vantaggi in termini di sicurezza e praticità, ma è importante considerare le sfide associate a questo approccio. Uno dei principali vantaggi dell'utilizzo di questo pseudovirus è il fatto che presenta lo stesso tropismo dei due virus di interesse, rappresentando, dunque, un modello valido per lo studio dell'ingresso virale o per l'individuazione di inibitori dell'ingresso virale. Inoltre, lo pseudovirus prodotto non è in grado di produrre progenie virale infettiva in quanto nel VSV utilizzato è stato sostituito il gene codificante la glicoproteina G di superficie nativa con un gene reporter codificante l'enzima luciferasi aumentando così i parametri di biosicurezza. Nonostante il vantaggio che segue dall'utilizzo di questo pseudovirus per quanto concerne la manipolazione e la valutazione dell'infezione tramite luminescenza, ci sono comunque delle problematiche date dalla difficoltà di preparazione di stock virali ad alto titolo, in particolare per quanto riguarda il CCHFV. Probabilmente questa difficoltà è data dal fatto che il CCHFV gemma a livello dell'apparato del Golgi, dove si accumulano le sue glicoproteine, mentre il VSV è un virus che gemma dalla superficie cellulare. Tuttavia, con alcune modificazioni del protocollo è stato successivamente possibile migliorare la resa di produzione del virus, riducendo il numero di preparazione degli stock virali richiesti per la fase di screening.

Per quanto riguarda la ricerca di inibitori dell'ingresso di RABV e CCHFV, il progetto si basa sul drug repurposing, che è una strategia per identificare nuovi usi per farmaci approvati o sperimentali che non rientrano nell'ambito dell'indicazione

medica originale. Questa strategia offre vari vantaggi rispetto allo sviluppo di un farmaco completamente nuovo grazie al fatto che il rischio di fallimento è inferiore, poiché il farmaco riproposto si è già dimostrato sufficientemente sicuro nei modelli preclinici e nell'uomo, e i tempi per l'approvazione all'uso possono essere ridotti. Infine, sono necessari meno investimenti rispetto alla validazione di una molecola completamente nuova, anche se questi varieranno notevolmente a seconda della fase e del processo di sviluppo del candidato al riposizionamento. Il drug repurposing può permettere di individuare farmaci che manifestano un'azione antivirale ma che agiscono sull'ospite e non direttamente sul virus. Questo aspetto è interessante perché si possono trovare molecole che agiscono su un ampio spettro di virus, ad esempio agendo su una delle vie cellulari che viene utilizzata da più virus, e che presentano un basso o nullo rischio di sviluppo di resistenze poiché si agisce sull'ospite e non sul virus.

Considerando che lo scopo della tesi è l'individuazione di farmaci in grado di inibire l'ingresso partendo da una libreria di molecole approvate dall'FDA si è adottato un protocollo in cui le cellule sono pre-trattate con il farmaco di interesse per un'ora, per consentire l'accumulo all'interno della cellula (per agire sugli eventuali target intracellulari), e poi con un co-trattamento con farmaco e pseudovirus per garantire la presenza del farmaco nelle fasi iniziali dell'infezione. Le cellule sono tutte state trattate con diluizioni uguali di farmaco e virus pseudotipizzato, con la sola differenza che nel caso di VSV-GP-CCHFV si è utilizzata una MOI di 0,01 (a causa della difficoltà iniziale nel produrre quantità adeguate di virus per lo screening) e nel caso dei VSV-GP-RABV una MOI di 0,1. Questi valori di MOI sono stati utilizzati in altri studi per la scoperta di inibitori dell'ingresso e la differenza della quantità di virus non sembrerebbe avere avuto un grosso impatto sui risultati dato che sono stati individuati farmaci apparentemente efficaci su entrambi gli pseudovirus, oltre ad alcuni ad azione specifica su uno pseudovirus e non sull'altro. Per valutare la capacità di inibizione del farmaco l'efficienza di infezione è stata valutata tramite un saggio di luciferasi, che misura la produzione della luciferasi codificata dallo pseudovirus, eseguito sulle cellule infettate e trattate coi vari farmaci rispetto al controllo non trattato.

Dati di letteratura suggeriscono che un potenziale candidato quale inibitore dell'ingresso virale dovrebbe essere in grado di inibire l'infezione virale di almeno il 90% (Anantpadma et al., 2016). Come indicato nei risultati, in questa prima fase di screening verranno presi in considerazione tutti i farmaci che inibiscono l'attività luciferasica di almeno l'80%. In tal modo si aumenterà la probabilità di riuscire a trovare alcuni candidati per una fase più avanzata della sperimentazione dopo aver concluso lo screening e le validazioni seguenti. I risultati sembrano incoraggianti e sono stati ad ora identificati circa 50 farmaci efficaci contro VSV-GP-RABV e circa 40 farmaci nel caso del VSV-GP-CCHFV. Numerosi composti hanno mostrato dei risultati vicini al 100% di inibizione virale, mentre alcuni hanno

addirittura comportato un aumento dell'attività della luciferasi, il che potrebbe riflettere o un'aumentata infezione o un'aumentata espressione della luciferasi. Di particolare interesse possono essere i casi in cui composti uguali hanno dato risultati molto differenti nell'inibizione dell'ingresso tra i due diversi pseudovirus, suggerendo che ci possa essere un'azione mirata sui recettori dell'ingresso di quel particolare virus o altri fattori cellulari coinvolti nell'infezione che sono determinanti per uno dei due pathway di ingresso dei due pseudovirus. Tutti questi aspetti potranno essere approfonditi in successivi studi, nei quali si individueranno i diversi farmaci forniti dall'azienda e si osserverà che tipo di molecole sono e che tipo di azione manifestano sulla cellula. Tuttavia, un test essenziale che andrà effettuato è quello di citotossicità per escludere quei farmaci che hanno dato un apparente effetto positivo ma dovuto ad un'azione citotossica anziché una reale azione antivirale. È presumibile che tale problema possa verificarsi solo per alcuni dei farmaci che sono efficaci su entrambi i virus.

Nelle fasi successive allo screening verranno effettuati dei test per valutare l'effetto dell'MOI sull'efficienza dell'azione antivirale e dei test di valutazione della concentrazione-risposta per misurare la dose efficace al 50% (EC_{50}) che insieme alla dose citotossica al 50% (CC_{50}) consentirà di calcolare l'indice di selettività per confrontare le varie molecole dimostrate promettenti come antivirali. Successivamente, i 3-5 candidati più promettenti saranno testati con RABV e CCHFV per dimostrare che i dati ottenuti con il modello pseudovirale sono traslabili ai due virus veri.

In conclusione, in questo lavoro di tesi sono stati individuati dei farmaci quali potenziali candidati come inibitori dell'ingresso di VSV-GP-CCHFV e di VSV-GP-RABV. Tuttavia, tali farmaci dovranno essere validati in successive fasi dello studio in vitro attraverso una serie di appositi test di laboratorio.

7. BIBLIOGRAFIA

- Anantpadma M, Kouznetsova J, Wang H, Huang R, Kolokoltsov A, Guha R, Lindstrom AR, Shtanko O, Simeonov A, Maloney DJ, Maury W, LaCount DJ, Jadhav A, Davey RA. (2016). Large-Scale Screening and Identification of Novel Ebola Virus and Marburg Virus Entry Inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother*. doi: 10.1128/AAC.00543-16.
- Balachandran, S., & Barber, G. N. (2000). Vesicular stomatitis virus (VSV) therapy of tumors. *IUBMB life*, 50(2), 135-138.
- Banyard AC, Tordo N. (2018) Rabies pathogenesis and immunology. *Rev Sci Tech*. doi: 10.20506/rst.37.2.2805
- Benjamin M. Davis,¹ Glenn F. Rall,² and Matthias J. Schnell(2015). Everything You Always Wanted to Know About Rabies Virus (But Were Afraid to Ask). *Annu Rev Virol*. doi: 10.1146/annurev-virology-100114-055157.
- Bente, D. A., Forrester, N. L., Watts, D. M., McAuley, A. J., Whitehouse, C. A., & Bray, M. (2013). Crimean-Congo hemorrhagic fever: history, epidemiology, pathogenesis, clinical syndrome and genetic diversity. *Antiviral research*, 100(1), 159–189. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.07.006>
- Dai, S., Deng, F., Wang, H., & Ning, Y. (2021). Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus: Current Advances and Future Prospects of Antiviral Strategies. *Viruses*, 13(7), 1195.
- Ergönül O. (2006). Crimean-Congo haemorrhagic fever. *The Lancet. Infectious diseases*, 6(4), 203–214. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70435-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70435-2)
- Fooks AR, Cliquet F, Finke S, Freuling C, Hemachudha T, Mani RS, Müller T, Nadin-Davis S, Picard-Meyer E, Wilde H, Banyard AC.(2017) Rabies. *Nat Rev Dis Primers*. doi: 10.1038/nrdp.2017.91.
- Guo Y, Duan M, Wang X, Gao J, Guan Z, Zhang M.(2019) Early events in rabies virus infection-Attachment, entry, and intracellular trafficking. *Virus Res*.. doi: 10.1016/j.virusres.2019.02.006.
- Hoogstraal(1979), *Review Article: The Epidemiology of Tick-Borne Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in Asia, Europe, and Africa*, *Journal of Medical Entomology*, Volume 15(1979), Pages 307–417, <https://doi.org/10.1093/jmedent/15.4.307>
- Lentz TL, Burrage TG, Smith AL, Crick J, Tignor GH. (1982) Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor? *Science*. doi: 10.1126/science.7053569.
- Liu C, Cahill JD. (2020) Epidemiology of Rabies and Current US Vaccine Guidelines. *R I Med J* . PMID: 32752569.

- Messina J, School of Geography and the Environment, and William Wint, Environmental Research Group, University of Oxford. (2023). European Centre for Disease Prevention and Control. The spatial distribution of Crimean-Congo haemorrhagic fever in Europe and its neighbours. doi: 10.2900/222576
- Nii-Trebi NI. (2017). Emerging and Neglected Infectious Diseases: Insights, Advances, and Challenges. Biomed Res. doi: 10.1155/2017/5245021.
- Pushpakom, S., Iorio, F., Eyers, P. et al. (2019). Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. Nat Rev Drug Discov. Doi: <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.168>
- Thoulouze M, Lafage M, Schachner M, Hartmann U, Cremer H, Lafon M. (1998). The Neural Cell Adhesion Molecule Is a Receptor for Rabies Virus. <https://doi.org/10.1128/jvi.72.9.7181-7190.1998>
- Xu ZS, Du WT, Wang SY, Wang MY, Yang YN, Li YH, Li ZQ, Zhao LX, Yang Y, Luo WW, Wang YY.(2024) LDLR is an entry receptor for Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. Cell Res. doi: 10.1038/s41422-023-00917-w.
- Zivec, M., Scholte, F. E., Spiropoulou, C. F., Spengler, J. R., & Bergeron, É. (2016). Molecular Insights into Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. *Viruses*, 8(4), 106. <https://doi.org/10.3390/v8040106>