

# SVILUPPO DI STRATEGIE IMMUNOTERAPEUTICHE CONTRO TUMORI CAUSATI DAL PAPILOMAVIRUS UMANO DI TIPO 16

Luisa Accardi, Paola di Bonito

Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto superiore di Sanità, Roma

## Introduzione

I papillomavirus umani (*Human papilloma virus*, HPV) sono virus epiteliotropici a DNA, alcuni dei quali a trasmissione sessuale e quindi responsabili di infezioni del tratto anogenitale e del cavo orale (1). L'infezione da HPV è correlata con lo sviluppo di tumori del collo dell'utero, e studi epidemiologici sull'incidenza del genoma di HPV nei tumori hanno consentito di classificare i Papillomavirus anogenitali in genotipi ad alto rischio (*high-risk HPV*, HR-HPV) e basso rischio (*low-risk HPV*, LR-HPV) (2). Il genoma dei genotipi HPV16, HPV18, HPV31 e HPV45 è presente nel 99,7% dei casi di carcinoma squamoso e di adenocarcinoma del collo dell'utero (CC), con una maggiore prevalenza di HPV16, il cui DNA è stato identificato nel 61% circa dei campioni biotipici dei tumori raccolti in varie parti del mondo, e che è infatti considerato il principale agente eziologico dei CC. HPV16 infetta lo strato basale dell'epitelio esposto negli epiteli di transizione e in seguito a microtraumi degli epiteli. Il ciclo replicativo del virus dipende dal programma di differenziamento dell'epitelio. Durante l'infezione naturale, il genoma di HPV16 si replica nel nucleo come episoma ma in alcuni casi può integrarsi nel cromosoma dell'ospite, evento raro correlato con l'inizio della carcinogenesi virale. Le proteine virali E6 ed E7, attraverso la rispettiva interazione con le proteine *tumour-suppressor* p53 e pRB, influenzano sia il ciclo cellulare che i meccanismi di morte cellulare. Tali azioni determinano un ritardo nel differenziamento dei cheratinociti, un ispessimento del tessuto infettato e la comparsa dei tipici sintomi di infezione riconosciuti come lesioni intraepiteliali (3).

In virtù del loro ruolo chiave nell'indurre e mantenere lo stato trasformato, E6 ed E7 rappresentano bersagli ideali per le immunoterapie basate su vaccini terapeutici o anticorpi specifici (4, 5).

Attualmente sono in commercio due vaccini (Cervarix e Gardasil) in grado di fornire protezione contro HPV16 e 18, i due genotipi ad alto rischio per il CC più diffusi al mondo. Questi vaccini hanno un elevato grado di sicurezza e di efficacia nel prevenire le infezioni, ma nessun effetto sulle donne già infettate dal virus e, poiché la vaccinazione è prevista per bambine e adolescenti, gli effetti di prevenzione tumorale saranno percepibili solo tra molti anni. Inoltre, nonostante i vaccini HPV siano in commercio da 5 anni nella maggior parte dei Paesi sviluppati, il costo elevato ne ostacola la diffusione nei Paesi in via di sviluppo, dove l'HPV è endemico e il CC molto diffuso. Poiché la maggior parte dei casi di CC si registra nei Paesi che non hanno introdotto la vaccinazione di massa, si ritiene che l'introduzione dei vaccini HPV non ne cambierà l'incidenza su scala globale (4).

Per tutte le ragioni esposte, è evidente la necessità di poter disporre di approcci terapeutici per le lesioni da HPV.

Il nostro gruppo, diretto dalla dott.ssa Colomba Giorgi fino al dicembre 2010, è impegnato da circa un decennio nello sviluppo di strategie terapeutiche per la cura delle lesioni precancerose e cancerose causate da HPV16 e metodi di studio dell'infezione da HPV sotto

diversi punti di vista. La messa a punto di un modello tumorale murino per HPV16 ha consentito e consente la sperimentazione preclinica di preparazioni vaccinali e terapie innovative. Inoltre, l'allestimento di metodi sierologici per la rilevazione della risposta anticorpale verso proteine di HPV16 in sieri umani può essere applicato allo studio della sierconversione della popolazione sottoposta alla vaccinazione profilattica e terapeutica per HPV.

## Stato di sviluppo

### Studi sul vaccino terapeutico per HPV

I vaccini HPV terapeutici hanno lo scopo di eliminare le cellule già infettate dal virus e quindi indurre una risposta CTL antigene-specifica. Nonostante i numerosi studi a favore dell'efficacia dell'immunoterapia e i moltissimi sistemi proposti, la sperimentazione sull'uomo è scarsa e nessun vaccino terapeutico per HPV è ancora entrato in commercio (6).

Le proteine E6 ed E7 di HPV16 sono antigeni tumorali e antigeni per il rigetto del tumore che, essendo espresse sia nel corso dell'infezione sia nel CC, possono essere utilizzate nella preparazione di vaccini terapeutici. Date le piccole dimensioni (151 aminoacidi per E6 e 98 per E7), sono scarsamente immunogeniche e la loro efficacia nelle formulazioni vaccinali dipende dall'adiuvante utilizzato per elicitare la risposta T. Pochi sono gli adiuvanti in grado di stimolare una risposta cellulo-mediata, e molti sono in fase di sperimentazione per l'impiego nell'uomo (4).

Una funzione importante dell'adiuvante è veicolare (*delivery*) l'antigene di interesse alle cellule dendritiche (*antigen presenting cells*, APCs) per la presentazione dei suoi epitopi in associazione con le molecole del maggior complesso di istocompatibilità di classe I (MHC I). Nei nostri studi sul modello animale murino di HPV16, abbiamo sperimentato diversi sistemi di *delivery* delle proteine E6 ed E7 di HPV16 nel tentativo di elicitare linfociti citotossici E7/E6-specifici. Nonostante siano stati usati entrambi gli antigeni, i risultati più convincenti, qui riassunti, sono stati ottenuti con la sola proteina E7 di HPV16.

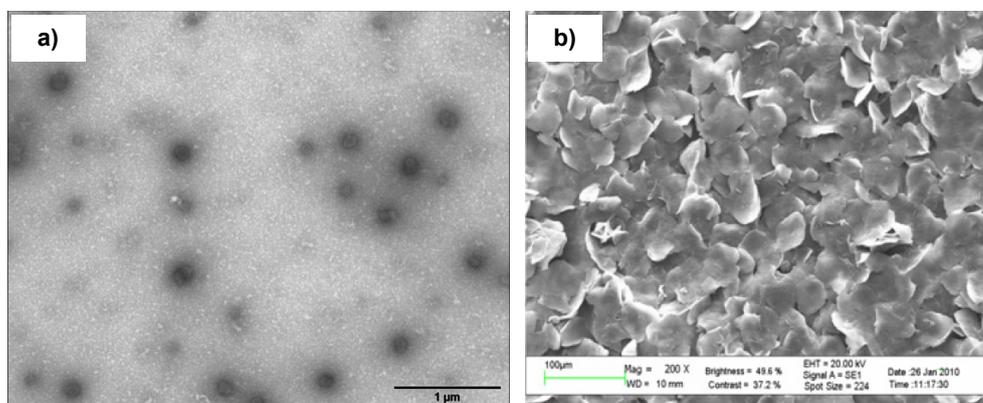
Nel tentativo di produrre un vaccino edibile, di facile conservazione e somministrazione, abbiamo sviluppato il primo vaccino HPV terapeutico che utilizza antigeni espressi in pianta. In collaborazione con la dott.ssa Rosella Franconi (ENEA-Casaccia, Anguillara) e il dott. Aldo Venuti (IFO-Regina Elena, Roma) la proteina E7 di HPV16 è stata espressa in *Nicotiana benthamiana*, una pianta di tabacco, mediante un vettore genetico derivato dal virus X della patata (PVX). La proteina E7 espressa in modo transiente da PVX è stabile e solubile. Estratti grezzi di *N. benthamiana*, contenenti E7, somministrati a topi C57Black/6 senza alcun adiuvante, sono stati in grado di innescare una risposta umorale e cellulo-mediata, e conferire protezione dal tumore HPV negli animali immunizzati (7). La produzione di E7 è stata migliorata ulteriormente veicolando la proteina, tramite un peptide segnale, nel compartimento reticolo endoplasmatico (RE) della cellula vegetale, dove E7 si è dimostrata più stabile. La preparazione dell'estratto di foglia da *N. benthamiana* contenente E7 che è in grado di indurre una immunità protettiva nei confronti del tumore da HPV (8), è stata standardizzata e sottoposta a brevetto (PCT WO 02/102410 A1. Franconi R, Giorgi C, Venuti A, Accardi L, Di Bonito P.).

Per studiare l'attività immunostimolatoria e la possibile efficacia nell'uomo di tale estratto, è stato utilizzato il sistema delle cellule dendritiche (DCs) umane differenziate *in vitro* con GM-CSF e IL4 da monociti isolati da sangue periferico di donatori sani. L'estratto di pianta è risultato non tossico per PBMC (*peripheral blood mononuclear cell*), monociti e dendritiche umane ad una concentrazione del 10% nel terreno di coltura. Tale quantità di estratto non fa differenziare i monociti in DCs *in vitro* ma induce la maturazione di queste ultime in modo

simile all'endotossina LPS. Tuttavia estratti di pianta detossificati con Polimixina non perdono la capacità di indurre maturazione delle DCs, suggerendo la presenza, negli estratti di pianta, di sostanze naturali potenzialmente adiuvanti che dovranno essere ulteriormente caratterizzate. Gli estratti di *N. bentamiana* aumentano la quantità di antigene fagocitato dalle DCs, come dimostrato con l'antigene Ovalbumina, mentre l'estratto produce un incremento non significativo nel caso di E7, che è in grado di entrare autonomamente nelle DCs. Dunque, DCs pulsate con estratti di *N. bentamiana*/E7 in co-cultura con PBLs autologhi sono in grado di far maturare linfociti E7-specifici con attività citotossica dopo 5 stimolazioni *in vitro*. In questi esperimenti di *priming*, a parità di antigene somministrato, le DCs pulsate con *N. bentamiana* E7 sono più efficienti nel far maturare i linfociti citotossici rispetto alle DCs pulsate con la E7 da *E. coli* detossificata usata come controllo (9).

Per generare un vaccino terapeutico è stato anche utilizzato un sistema di *delivery*, sviluppato e brevettato dal dott. Maurizio Federico (ISS), che prevede l'impiego di particelle lentivirali, prive di DNA, contenenti E6 o E7 fusa alla proteina cargo Nef7G3C, una variante di Nef di HIV-1. Tale variante può essere incorporata in virioni lentivirali o retrovirali in quantità 100 volte superiori alla proteina *wild-type*. Le particelle lentivirali penetrano nelle cellule dendritiche umane e cross-presentano l'antigene fuso alla proteina Nef7G3C. Particelle lentivirali portatrici di E7 di HPV16, somministrate a topi C57Black/6, sono in grado di indurre una risposta umorale e cellulo-mediata protettive nei confronti di un tumore HPV (10).

Durante gli studi di immunogenicità *in topo*, si era osservato che la preparazione di E7 prodotta in *E. coli* era particolarmente immunogenica nonostante un ridotto contenuto in LPS ottenuto grazie all'impiego di solventi organici. La caratterizzazione biochimica e al microscopio elettronico di questa preparazione ci ha consentito di osservare che E7, purificata in forma denaturata e rinaturata *in vitro*, si assemblava in micro e nanoparticelle sferoidali (Figura 1a), che abbiamo quindi utilizzato come vaccino senza aggiunta di adiuvanti, nel modello tumorale HPV in topi C57Black/6. I risultati dimostrano che E7 in particelle induce una forte immunità umorale e cellulo-mediata in grado di conferire protezione dal tumore HPV (11).



**Figura 1. a) HPV16 E7 in particelle (foto MG Amendolia);  
b) lamelle di Polilattide usate per il *delivery* di E7 (Foto A. Martinelli)**

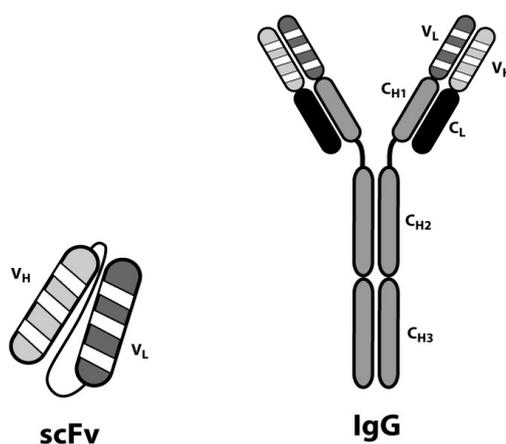
In collaborazione con il dott. Gabriele Casini, il prof. Andrea Martinelli e la prof. Antonella Piozzi (Dipartimento di Chimica, Università Sapienza, Roma), la proteina E7 in forma particellare è stata adsorbita su particelle lamellari di polilattide (PLLA), un polimero

biodegradabile dell'acido lattico conosciuto e usato per il *delivery* di farmaci. Tali particelle, che hanno due dimensioni micrometriche e la terza nanometrica (Figura 1b) sono state funzionalizzate con gruppi aminici e usate per adsorbire la proteina E7. La proteina viene assorbita stabilmente e trattenuta dalle lamelle, in una forma idonea all'impiego come vaccino (12 e manoscritto in preparazione). Il nostro obiettivo è sviluppare un vaccino terapeutico monodose.

## Anticorpi ricombinanti in formato scFv

Le caratteristiche proprie delle oncoproteine E6 ed E7 di HPV16 rappresentano il fondamento di strategie anti-tumorali che si basino sull'inibizione selettiva e specifica della loro attività (3).

Gli anticorpi ricombinanti sono potenti mezzi per il *knock-out* di proteine. In particolare, gli anticorpi in formato a singola catena (scFv = *single chain variable fragment*), i più piccoli frammenti anticorpali in grado di legare l'antigene con sufficiente affinità e stabilità (Figura 2), sono molecole estremamente versatili che possono essere facilmente modificate con l'ingegneria genetica per migliorarne le proprietà fisico-chimiche, coniugate con radioisotopi e tossine (immuntossine) a scopo diagnostico o terapeutico e impiegate *in vitro* e *in vivo* (13, 14).

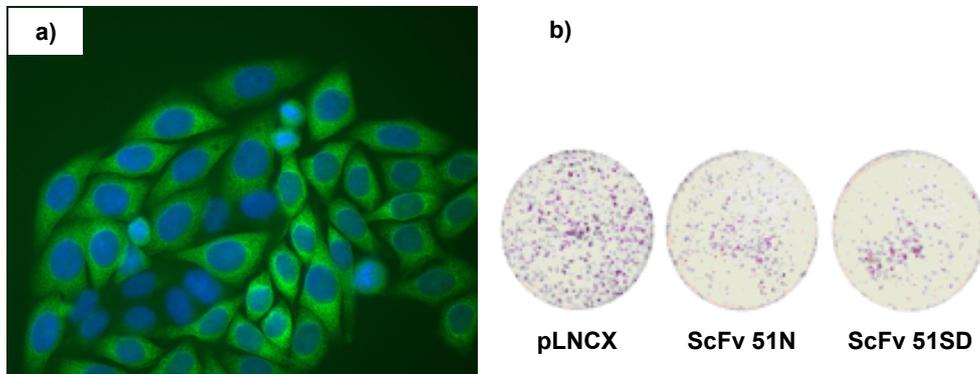


**Figura 2.** L'anticorpo in formato scFv, schematizzato a sinistra, comprende le sole regioni variabili ( $V_H$  e  $V_L$ ) delle catene pesante e leggera di una Immunoglobulina (IgG), raffigurata a destra

Inoltre è possibile ottenere l'espressione intracellulare degli scFv (anticorpi intracellulari o *intrabodies*), tramite trasfezione o trasduzione dei loro geni in cellule, e bloccare di conseguenza importanti attività cellulari. Molti scFvs sono già impiegati con successo nella terapia genica contro i tumori (5).

Nel nostro laboratorio la strategia degli *intrabodies* viene utilizzata per contrastare l'azione delle proteine tumorali E6 ed E7 attraverso un legame specifico. Sono stati selezionati con metodologie diverse, e in parte caratterizzati, alcuni anticorpi scFv contro le proteine ricombinanti E6 ed E7 di HPV16 (19-20 e dati non pubblicati). I più stabili degli anticorpi scFv contro E7, selezionati tramite *Phage display* dalla libreria fagica ETH-2 (15), sono stati espressi in diversi compartimenti di cellule positive per HPV16 grazie a segnali specifici di localizzazione (16), sia tramite trasfezione di vettori eucariotici ricombinanti sia tramite

trasduzione di retrovirus ricombinanti. L'analisi della proliferazione cellulare in seguito all'espressione di due degli scFv anti-E7 ha permesso di rilevare un significativo e specifico effetto anti-proliferativo, evidente soprattutto quando gli anticorpi vengono trattenuti nel reticolo endoplasmatico (Figura 3a, b) (17-19).



**Figura 3. (a) Immunofluorescenza con espressione di anticorpi scFv anti-E7 nel reticolo endoplasmatico di cellule SiHa HPV16-positive; (b) saggio di proliferazione tramite Colony Forming assay di cellule SiHa trasdotte con retrovirus esprimente scFv51 anti-E7 nel nucleo (N) o nel reticolo endoplasmatico (SD)**

Allo scopo di studiare il meccanismo che sottende tale effetto anti-proliferativo, è stato mappato il sito di legame dei due scFv su E7, con particolare riguardo alla possibilità che i due anticorpi potessero legare la proteina nello stesso sito in cui si lega pRb. Per mezzo di saggi immunologici con frammenti di E7, Risonanza Plasmonica di superficie e tecnologia PepSet, si è constatato che ambedue gli scFv legano l'estremità amino-terminale di E7 ma nessuno dei due si lega al sito di legame per pRb, pur mostrando una interferenza reciproca nell'inibizione competitiva del legame a E7. Si è quindi concluso che gli epitopi dei due scFv sono distinti anche se sovrapposti, e l'inibizione della proliferazione è, con grande probabilità, pRb-indipendente (19).

L'anticorpo scFv I7 contro la proteina E6 è stato selezionato tramite *Intracellular Antibody Capture Technology* (20) che, nello sfruttare l'espressione intracellulare in lievito, consente la selezione di scFv sicuramente stabili in ambiente intracellulare. ScFv I7 è stato fornito di un segnale di localizzazione nucleare tramite subclonaggio in apposito vettore e poi trasferito anch'esso in un vettore per l'espressione nel sistema retrovirale. Sono in corso studi di espressione in cellule HPV16-positive.

Nel nostro laboratorio sono anche disponibili cloni di anticorpi scFv verso la proteina del capsido L1 di HPV16 selezionati dalla libreria fagica ETH-2 contro pseudovirioni di HPV16 forniti dal dott. Schiller (NIH, Stati Uniti). La caratterizzazione di questi anticorpi è in corso.

### **Analisi della risposta umorale HPV specifica dopo infezione o vaccinazione**

I papillomavirus infettando gli epiteli non inducono viremia, quindi la risposta immunitaria adattativa è debole e non sempre misurabile. Per tale ragione, l'analisi degli anticorpi HPV specifici non ha valore diagnostico e attualmente non sono disponibili kit commerciali per il loro monitoraggio. Nel corso degli anni tuttavia, per meglio conoscere la storia naturale della

malattia da HPV, molti gruppi hanno sviluppato saggi *in-house* per l'analisi sierologica. L'introduzione della vaccinazione HPV apre nuove prospettive per l'analisi della risposta anticorpale specifica. Come dimostrato dalle sperimentazioni cliniche, tutte le persone vaccinate con Gardasil e Cervarix sviluppano anticorpi contro la proteina L1 del capside virale che costituisce il vaccino. L'Organizzazione Mondiale della Sanità invita i Paesi che hanno introdotto il vaccino HPV ad avviare campagne di sorveglianza sierologica a lungo termine per valutare l'impatto che la vaccinazione avrà sulla popolazione. Il nostro gruppo ha messo a punto un saggio ELISA *in-house*, basato su 5 antigeni, per uno studio di popolazione (21-22); con esso è possibile monitorare la risposta anticorpale sia dopo vaccinazione con Gardasil o Cervarix sia dopo immunoterapia con gli antigeni tumorali di HPV.

## Conclusioni e prospettive future

Nel corso dei nostri studi sui vaccini terapeutici abbiamo ottenuto in sistemi preclinici prove di efficacia di vaccini terapeutici potenzialmente utilizzabili nell'uomo. Alcuni sistemi sono protetti da brevetti e richiedono ulteriori studi. Per tutti i sistemi descritti è necessario sviluppare procedure per la produzione degli antigeni proposti su larga scala e con l'alto grado di purezza necessario per la sperimentazione clinica nell'uomo (*GMP grade*). Tali procedure sono costose, e per la prosecuzione degli studi sul vaccino terapeutico molto dipenderà dai finanziamenti disponibili. L'unico finanziamento in corso prevede studi per ottimizzare la produzione da cellule di mammifero di VLPs lentivirali come carrier di HPV16 E6 ed E7, in collaborazione con il dott. M. Federico.

Attualmente sono in corso studi di sierologia per la validazione del nostro saggio ELISA in una popolazione vaccinata. Uno studio prevede il controllo degli anticorpi HPV in un gruppo di bambini e adolescenti HIV-positivi vaccinati con Gardasil afferenti all'Ospedale Bambino Gesù. Tale studio viene effettuato in collaborazione con il dott. Giuseppe Pontrelli (*Clinical Trial Centre-Ospedale Bambino Gesù, Roma*) nell'ambito dello *European AIDS Treatment Network (NEAT)*. In un altro studio verranno monitorati gli anticorpi in una popolazione di donne vaccinate con Cervarix afferenti ai programmi di screening del CC in Toscana. Tale studio è in collaborazione con la dott.ssa Francesca Carozzi (Istituto per lo studio e la prevenzione oncologica-Unità Operativa Citologia Analitica e Molecolare, Firenze).

L'uso di anticorpi ricombinanti contro antigeni tumorali per applicazioni diagnostiche e terapeutiche sta conoscendo in questi anni una diffusione sempre maggiore. Gli anticorpi in formato scFv possono essere di derivazione umana già a livello di selezione, permettendo così di evitare gli effetti deleteri della somministrazione di anticorpi murini. La possibilità di ottenere multimeri contro diversi epitopi per interferire contro più di un meccanismo di progressione neoplastica allarga e rinforza le potenzialità di questi anticorpi. Grazie alle loro proprietà, gli scFv potrebbero rappresentare molecole-chiave anche per quella che è la sfida più grande della terapia contro i tumori, vale a dire eliminare contemporaneamente massa tumorale e cellule metastatiche. Tuttavia, gli studi sono ancora in fase iniziale e molti aspetti devono essere approfonditi prima che le applicazioni diagnostiche e terapeutiche possano diventare di routine. Tra questi, il monitoraggio della tossicità, la capacità di penetrazione nel tumore, la caratterizzazione accurata dei meccanismi molecolari di regolazione della crescita cellulare e della risposta immunitaria.

Una bassissima percentuale, circa il 10%, degli scFv che sono oggetto di studio, riesce a completare l'iter dei *trial* clinici ed essere approvata per l'uso nell'uomo e, quando lo completa, il tempo che intercorre tra il laboratorio e la clinica è di circa 10 anni. Questo non dipende da

una scarsa efficacia dei prodotti ma piuttosto dalla inadeguatezza di fondi e investimenti che sostengono la sperimentazione.

Attualmente, nel nostro laboratorio è in corso uno studio finanziato propedeutico alla valutazione dell'applicazione dei scFv anti-E6 /E7 in terapia genica. A questo scopo vengono effettuate:

- la caratterizzazione *in vitro* dell'anticorpo scFv contro la proteina E6;
- le trasduzioni di cellule tumorali HPV TC-1 con retrovirus ricombinanti esprimenti gli scFv anti-E6 e anti-E7, anche in combinazione, e la valutazione del loro effetto su proliferazione, tumorigenicità e adesività/invasività cellulare;
- la caratterizzazione *in vitro* degli scFv contro la proteina L1 di HPV16.

Successivamente, la potenziale attività antitumorale degli anticorpi scFv verrà valutata *in vivo* in un modello preclinico misurando la crescita tumorale (dimensioni e tempo di insorgenza) in topi C57 Black/6 inoculati con cellule Tc-1 trasdotte con i retrovirus ricombinanti.

L'attività degli anticorpi anti-L1 verrà invece valutata *in vitro* in saggi di neutralizzazione di pseudovirioni, allo scopo di esplorarne la potenziale applicazione alla profilassi dell'infezione da HPV.

In una ulteriore applicazione, gli scFv specifici per E6 ed E7 potrebbero essere utilizzati nella diagnosi precoce e per un affinamento della prognosi delle malattie HPV-correlate. Questo alla luce dell'alta percentuale di regressione che si ha in tutti gli stadi della malattia e anche del fatto che la presenza di HPV-DNA rilevato negli *screening* primari non ha valore prognostico, poiché indica la presenza e non l'attività virale.

## Bibliografia

1. Zur Hausen H. Papillomavirus infections: A Major Cause of Human Cancer. In: Zur Hausen H (Ed). Infections Causing Human Cancer. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2006. p. 145-243.
2. De Sanjose S, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. Retrospective international survey and hpv time trends study group. Lancet Oncol 2010;11:1048-56.
3. Wise-Draper TM, Wells SI: Papillomavirus E6 and E7 proteins and their cellular targets. Frontiers in Bioscience 2008;13:1003-17.
4. Su JH, Wu A, Scotney E, Ma B, Monie A, Hung CF, Wu TC: Immunotherapy for cervical cancer: Research status and clinical potential. BioDrugs 2010;24:109-29.
5. Accardi L, Di Bonito P. Antibodies in single-chain format against tumour-associated antigens: present and future applications. Curr Med Chem 2010;17(17):1730-55.
6. van der Burg SH, Melief CJ. Therapeutic vaccination against human papillomavirus induced malignancies. Curr Opin Immunol 2011;23:1-6.
7. Franconi R, Di Bonito P, Di Bello F, Accardi L, Muller A, Cirilli A, Simeone P, Donà MG, Venuti A, Giorgi C. Plant-derived human papillomavirus 16 E7 oncoprotein induces immune response and specific tumor protection. Cancer Res 2002;62:3654-8.
8. Franconi R, Massa S, Illiano E, Muller A, Cirilli A, Accardi L, Di Bonito P, Giorgi C, Venuti A. Exploiting the plant secretory pathway to improve the anticancer activity of a plant-derived HPV16 E7 vaccine. Int J Immunopathol Pharmacol 2006;19:187-97.

9. Di Bonito P, Grasso F, Mangino G, Massa S, Illiano E, Franconi R, Fanales-Belasio E, Falchi M, Affabris E and Giorgi C. Immunomodulatory activity of a plant extract containing Human Papillomavirus 16-E7 protein in Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2006;19:187-97.
10. Di Bonito P, Grasso F, Mochi S, Petrone L, Fanales-Belasio E, Mei A, Cesolini A, Laconi G, Conrad H, Bernhard H, Dembek CJ, Cosma A, Santini SM, Lapenta C, Donati S, Muratori C, Giorgi C, Federico M. Anti-tumor CD8(+) T cell immunity elicited by HIV-1-based virus-like particles incorporating HPV-16 E7 protein. *Virology* 2009;395:45-55.
11. Petrone L, Ammendolia MG, Cesolini A, Caimi S, Superti F, Giorgi C, Di Bonito P. Recombinant HPV16 E7 assembled into particles induces an immune response and specific tumour protection administered without adjuvant in an animal model. *J Transl Med* 2011;9:69.
12. Casini G, Petrone L, Bakry A, Francolini I, Di Bonito P, Giorgi C, Martinelli A, Piozzi A, D'Ilario L. Functionalized poly(l-lactide) single crystals coated with antigens in development of vaccines. *J Control Release* 2010;148:e106-8.
13. Hoogenboom, H. R., Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat Biotechnol* 2005;23(9):1105-16.
14. Tanaka T, Lobato MN, Rabbitts TH. Single domain intracellular antibodies: a minimal fragment for direct in vivo selection of antigen-specific intrabodies. *J Mol Biol* 2003;331(5):1109-20.
15. Pini A, Viti F, Santucci A, Carnemolla B, Zardi L, Neri P, Neri D. Design and use of a phage display library. Human antibodies with subnanomolar affinity against a marker of angiogenesis eluted from a two-dimensional gel. *J Biol Chem* 1998;273(34):21769-76.
16. Persic L, Righi M, Roberts A, Hoogenboom HR, Cattaneo A, Bradbury A. Targeting vectors for intracellular immunisation. *Gene* 1997;187(1):1-8.
17. Accardi L, Dona MG, Di Bonito P, Giorgi C. Intracellular anti-E7 human antibodies in single-chain format inhibit proliferation of HPV16-positive cervical carcinoma cells. *Int J Cancer* 2005;116(4):564-70.
18. Dona MG, Giorgi C, Accardi L. Characterization of antibodies in single-chain format against the E7 oncoprotein of the human papillomavirus type 16 and their improvement by mutagenesis. *BMC Cancer* 2007;7:25.
19. Accardi L, Donà MG, Mileo AM, Paggi MG, Federico A, Torreri P, Petrucci TC, Accardi R, Pim D, Tommasino M, Banks L, Chirullo B, Giorgi C. Retinoblastoma-independent antiproliferative activity of novel intracellular antibodies against the E7 oncoprotein in HPV 16-positive cells. *BMC Cancer* 2011;11:17.
20. Visintin M, Tse E, Axelson H, Rabbitts TH, Cattaneo A. Selection of antibodies for intracellular function using a two-hybrid in vivo system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96(21):11723-8.
21. Giorgi C, Di Bonito P, Grasso F, Mochi S, Accardi L, Donà MG, Branca M, Costa S, Mariani L, Agarossi A, Ciotti M, Syrjänen K, the HPV-PathogenISS group. Clinical and epidemiological correlates of antibody response to human papillomaviruses (HPVs) as measured by a novel ELISA based on denatured recombinant HPV16 late (L) and early (E) antigens. *Infect Agent Cancer* 2008;3(1):9.
22. Di Bonito P, Grasso F, Mochi S, Accardi L, Donà MG, Branca M, Costa S, Mariani L, Agarossi A, Ciotti M, Syrjänen K, Giorgi C. Serum antibody response to Human papillomavirus (HPV) infections detected by a novel ELISA technique based on denatured recombinant HPV16 L1, L2, E4, E6 and E7 proteins. *Infect Agent Cancer* 2006;1:6.