

Inoltre, la vaccinazione dei volontari sudafricani con Tat B ha indotto anticorpi in grado di riconoscere Tat appartenenti ad altri sottotipi (A, C, D), suggerendo che il vaccino Tat B potrebbe funzionare contro molti dei sottotipi virali circolanti nel mondo. Sulla base di questi risultati è proseguita la messa a punto delle condizioni sperimentali per valutare questa attività neutralizzante in altri tipi cellulari di rilevanza patogenetica nell'infezione da HIV-1 (linfociti T, cellule endoteliali, monociti/macrofagi). A questo riguardo la nostra attenzione si è concentrata sulle cellule endoteliali (EC) perché studi pregressi avevano dimostrato che EC, attivate da citochine infiammatorie alle concentrazioni presenti nel siero di soggetti HIV-1+, acquisivano la capacità di legare ed internalizzare Tat. In effetti abbiamo determinato che la capacità di EC (HUVEC, human umbilical vein EC) attivate da citochine infiammatorie (IC-EC) d'internalizzare la proteina Tat dipende, come per le DC, dall'espressione di integrine che legano il dominio RGD di Tat. Questi dati sono stati confermati in esperimenti di competizione, nei quali si è ottenuto il blocco dell'internalizzazione di Tat preincubando le cellule con i ligandi naturali (vitronectina e fibronectina) delle integrine leganti l'RGD, con anticorpi diretti contro queste stesse integrine e da anticorpi contro Tat, naturali od indotti dal vaccino Tat. Infine, anche in questo caso Tat forma un complesso con oligomeri di Env promuovendone l'entrata in EC. Il dato è molto importante perché le EC costituiscono il 7% di tutte le cellule dell'organismo, facendone potenzialmente uno dei serbatoi più importanti di HIV. È stata pertanto valutata in vitro la suscettibilità delle EC all'infezione con HIV ed il ruolo di Tat. I dati ottenuti hanno dimostrato che le EC sono suscettibili, sebbene in misura inferiore ai linfociti T CD4+, all'infezione produttiva con virus R5- e X4-tropici e che la proteina Tat aumenta considerevolmente detta suscettibilità, soprattutto quando la dose virale infettante è bassa. A questo riguardo, sono iniziati studi di co-cultura di EC con cellule mononucleate del sangue periferico, linfociti T CD4+, linee cellulari, per chiarire il contributo delle EC alla propagazione e mantenimento dell'infezione HIV nell'ospite e, di converso, le alterazioni/disfunzioni da queste subite e che potrebbero contribuire all'insorgenza di patologie cardiovascolari, occorrenti con una frequenza maggiore rispetto alla popolazione generale in soggetti HIV+ in trattamento antiretrovirale efficace.

### **Studi clinici sull'immunità naturale anti-Tat e sul vaccino basato sulla proteina Tat in Italia**

*Progetto finanziato dal Ministero della Salute. Centro Nazionale per la Ricerca su HIV/AIDS.*

In studi preclinici condotti dal Centro Nazionale per la Ricerca su HIV/AIDS, è stato dimostrato che la proteina Tat, nella sua forma biologicamente attiva, è sicura ed induce una risposta immune

specifico ed efficace, in quanto in grado di controllare la replicazione del virus e di bloccare lo sviluppo della malattia in primati non umani (*Macaca fascicularis*). Sulla base di questi incoraggianti risultati, l'ISS ha sponsorizzato una sperimentazione clinica multicentrica di fase I del vaccino anti-HIV/AIDS basato sulla proteina Tat di HIV-1 in individui sieronegativi (approccio preventivo, ISS P-001) e sieropositivi (approccio terapeutico, ISS T-001), arruolati in 3 centri clinici in Italia. Lo studio, condotto dal Centro Nazionale per la Ricerca su HIV/AIDS, ha dimostrato sia la sicurezza del candidato vaccinale somministrato a differenti dosi, sia la sua elevata capacità di indurre un'ampia risposta immunitaria (sia anticorpale che cellulo-mediata). Il programma di sviluppo clinico del vaccino Tat, finanziato dal Ministero della Salute è proseguito con una sperimentazione clinica terapeutica di fase II, randomizzata ed *open label*, condotta su 168 soggetti HIV-infetti in trattamento HAART, arruolati in 11 centri clinici in Italia (ISS T-002). I risultati dello studio non solo hanno confermato l'immunogenicità e la sicurezza dell'immunizzazione terapeutica con la proteina Tat, ma hanno indicato anche che questa vaccinazione è in grado di ridurre significativamente la disregolazione immunitaria e l'immunoattivazione che persistono nonostante la terapia antiretrovirale, promuovendo il ritorno del sistema immunitario all'omeostasi. Inoltre, l'immunizzazione con Tat ha indotto nel sangue periferico una riduzione significativa dei livelli di DNA provirale di HIV. Tale riduzione è associata alla presenza di anticorpi anti-Tat capaci di neutralizzare l'entrata di Env mediata da Tat in cellule bersaglio. Questi risultati hanno confermato il ruolo centrale della proteina Tat nella patogenesi dell'infezione, della riattivazione cellulare, della trasmissione da cellula-cellula e nella formazione dei reservoir virali, e la validità di questo candidato vaccinale nell'immunizzazione terapeutica.

Al fine di valutare la persistenza nel tempo degli effetti immuno-virologici indotti dall'immunizzazione terapeutica con la proteina Tat, è stato condotto uno studio osservazionale (ISS T-002 EF-UP) con l'obiettivo di estendere il follow-up dei pazienti che hanno preso parte allo studio di fase II ISS T-002. In particolare, lo scopo dello studio era l'acquisizione di informazioni sulla persistenza delle risposte anticorpali indotte dalla vaccinazione e sugli effetti nel tempo sul DNA provirale. I risultati di questo studio, attivato nel 2011 e concluso nel 2016, confermano il persistere fino a 8 anni di anticorpi specifici e dell'immunoricostituzione promossi dal vaccino Tat. In particolare, i livelli di linfociti T CD4<sup>+</sup> sono continuati ad aumentare durante il corso dello studio, con aumenti di circa 100 cellule/ $\mu$ l rispetto ai livelli basali (pre-vaccinazione) a partire dal 4° anno di follow-up, anche in soggetti con un nadir di linfociti T CD4<sup>+</sup>  $\leq$ 250 cellule/ $\mu$ l, un marcatore associato con un ridotto recupero immunologico dopo terapia e prognosi infausta sul lungo termine.

La stratificazione di questi risultati secondo il livello di linfociti T CD4+ al basale indica che il recupero immunologico è particolarmente evidente nei pazienti che hanno livelli di linfociti T CD4+ particolarmente ridotti e quindi più immunocompromessi.

L'immunoricostruzione promossa dal vaccino Tat è associata da una progressiva riduzione del DNA provirale di HIV a partire dal 3° anno dopo l'immunizzazione, che è continuata per tutti gli 8 anni di follow-up. Il DNA provirale, inoltre, è risultato non rilevabile nel 34% dei pazienti in più di una determinazione e nel 48% di soggetti a cui è stata somministrata la dose di 30 µg, 3X. È interessante osservare che il DNA provirale è significativamente ridotto anche nei pazienti con alti livelli di linfociti T CD4+ al basale, nei quali le cellule CD4+ hanno mostrato un andamento stabile durante lo studio.

Nel loro insieme questi dati indicano che l'immunizzazione con Tat rappresenta un approccio patogenetico promettente per l'intensificazione della cART che potrebbe portare una cura funzionale dell'infezione.

### **Program to support the Ministry of Health of South Africa in the implementation of a national program of global response to HIV & AIDS**

*Progetto finanziato dal Ministero degli Affari Esteri. Centro Nazionale per la Ricerca su HIV/AIDS.*

Il Programma, implementato dal Centro Nazionale per la Ricerca su HIV/AIDS (CNAIDS), in cooperazione con il Department of Health del Sudafrica ed il South African Medical Research Council, prevedeva attività di supporto i piani strategici del Ministero della Salute del Sudafrica (National Department of Health, NDOH) miranti a contenere la diffusione dell'infezione da HIV nel territorio nazionale. Il Programma, è concluso nel febbraio del 2017.

Il Programma è stato strutturato in tre componenti: Componente 1. Rafforzamento del Servizio Sanitario del Sudafrica in siti sudafricani selezionati; Componente 2. Trasferimento tecnologico ad una azienda sudafricana a partecipazione pubblica per la creazione di una struttura per la produzione di vaccini in ottemperanza alla normativa GMP (Good Manufacturing Practice); Componente 3. Sperimentazione del vaccino contro l'HIV/AIDS basato sulla proteina Tat di HIV-1, sviluppato dal Centro Nazionale AIDS: preparazione e conduzione del trial vaccinale di fase II denominato ISS T-003.

Componente 1: L'intervento, a supporto dei piani strategici nazionali e provinciali, prevede il coinvolgimento dei "Department of Health" provinciali e delle Comunità locali nelle seguenti Province: i) Gauteng, Distretto Sanitario "Tswane 1"; ii) Eastern Cape, Distretto Sanitario "OR

Thambo”; iii) Mpumalanga, Distretto Sanitario “Ehlanzeni”, Distretto Sanitario “Gert Sibande”, Distretto Sanitario “Nkangala”; iv) Kwazulu Natal (KZN), Distretto Sanitario “Umzinyathi”.

L’intervento è stato attuato mediante l’implementazione di 3 direttrici:

A. Fornitura di equipaggiamento volto a:

- Rafforzare l’assistenza medica quotidiana attraverso fornitura di piccole attrezzature cliniche.
- Favorire il raggiungimento degli Standard Nazionali (National Core Standards).
- Potenziare l’archiviazione e la gestione delle cartelle cliniche e dei “registri ART”.
- Potenziare l’informatizzazione dei dati, tramite la fornitura di computer, hard-driver e software.

B. Mobilitazione di risorse umane: personale medico e paramedico.

Il Programma ha provveduto al reclutamento e alla dislocazione presso le cliniche pubbliche di personale locale specializzato in supporto al Sistema Sanitario Distrettuale, ed in particolare:

- 4 medici e 2 assistenti sociali nei distretti sanitari delle Province di Mpumalanga e dell’Eastern Cape; il personale è stato organizzato in “team mobili” per il supporto alle Health Facility più disagiate.
- 10 “Data Capturers” nel distretto OR Thambo (Eastern Cape) con l’obiettivo di potenziare la raccolta dei dati nel quadro del Sistema Informativo Sanitario Distrettuale (DHIS).

C. Addestramento e Formazione Professionale mediante l’organizzazione di corsi volti a:

- Qualificare il personale infermieristico per la somministrazione della terapia anti-retrovirale (corsi NIMART – Nurse Initiated Management of ART).
- Aggiornare e formare personale medico ed infermieristico nei seguenti settori: management dell’infezione da HIV; management della terapia antiretrovirale e dell’aderenza alla terapia; controllo della Tuberculosis e delle malattie sessualmente trasmesse; qualificare e certificare il personale medico e infermieristico nella dispensazione dei farmaci.

La Componente 1 del Programma prevedeva inoltre la creazione di una piattaforma clinica e laboratoristica per la conduzione di ricerca clinica nel settore pubblico. In questo contesto, è stata potenziata una Unità di Ricerca Clinica (MeCRU, Università di Limpopo Medunsa Campus) nella provincia del Gauteng ed è stata sviluppata una nuova Unità di Ricerca Clinica (WSUHVRU; Università di Walter Sisulu) nella regione di Mthatha (Provincia dell’Eastern Cape). Le Unità di Ricerca Clinica sono state fornite di laboratori attrezzati e Farmacia ed il personale formato secondo *Good Clinical Practice* (GCP) e *Good Clinical Laboratory Practice* (GCLP). La piattaforma

clinico-laboratoristica è stata realizzata mediante l'integrazione con le Cliniche pubbliche, i laboratori diagnostici pubblici, ed i laboratori centralizzati (ISS, IFO, S. Orsola) in Italia. La piattaforma è stata validata con la conduzione di uno studio osservazionale (ISS OBS T-004) conclusosi con l'arrolamento di 534 volontari a MeCRU e WSUHVURU.

Nel corso del 2016, è stato completato l'intervento volto al raggiungimento degli standard di qualità nazionali per quanto concerne le sale di attesa e le farmacie delle cliniche pubbliche nelle aree di progetto ed al rafforzamento del sistema informativo sanitario distrettuale.

Componente 2. L'intervento, volto a generare e sedimentare nel paese capacità per la produzione di vaccini ricombinanti per uso umano, prevede la fornitura di risorse, formazione e trasferimento tecnologico in supporto allo sviluppo della struttura GMP presso "BIOVAC", a Città del Capo (Provincia del Western Cape). L'intervento si è concluso con la realizzazione della struttura GMP ed il completo trasferimento della tecnologia per la produzione della proteina Tat, il cui processo produttivo è stato riprodotto con successo presso BIOVAC. Nel 2014 sono proseguite le attività volte alla certificazione della struttura produttiva GMP di vaccini BIOVAC da parte del Medicines Control Council (MCC). In particolare, è stata eseguita una visita di valutazione presso BIOVAC da parte di un esperto WHO in preparazione alla ispezione MCC. La visita di valutazione MCC si è conclusa con la relazione valutativa inviata a BIOVAC per l'implementazione di alcune raccomandazioni. BIOVAC è ora impegnata nella produzione di lotti riproducibili di vaccini per la certificazione GMP da parte di MCC.

Componente 3. L'intervento prevede la conduzione del trial vaccinale terapeutico di fase II basato sulla proteina Tat (ISS T-003) presso l'Unità di Ricerca MeCRU (Gauteng Province, South Africa), l'analisi dei dati e la diffusione dei risultati conseguiti. A questo scopo, sono state espletate tutte le attività preparatorie (formazione, attività regolatorie - ivi incluse la sottomissione dei protocolli ai comitati etici e ad MCC - potenziamento delle strutture, finalizzazione delle "standard operational procedures" (SOP), simulazione di tutte le attività, importazione, stoccaggio e distribuzione del vaccino a MeCRU, rilascio dell'autorizzazione per l'invio di campioni biologici in Italia presso il "Core Lab ISS/IFO Joint Unit" per le analisi di laboratorio durante la fase di screening dei volontari e le determinazioni di prima e seconda linea durante le fasi successive dello studio. Il trial vaccinale ISS T-003 (in doppio cieco controllato da placebo) ha avuto inizio nel febbraio 2012 in 200 pazienti HIV+ in trattamento con HAART ed è stato completato nel 2014. Nel 2015 è stato inviato alle autorità competenti il report finale dello studio. La "Contract Research Organization" locale

“Triclinium” è stata ingaggiata per il monitoraggio delle procedure di esecuzione, nonché per il supporto allo sponsor nella conduzione del trial. L’analisi dei dati conferma che il vaccino è sicuro ed immunogenico e promuove la ricostituzione del sistema immune anche in pazienti con differente background genetico ed infettati da un virus di sottotipo diverso.

Nell’autunno 2016 si è concluso uno studio osservazionale di follow-up (ISS T-003 EF-UP) iniziato nel 2015, con l’obiettivo di valutare la persistenza degli effetti immuno-virologici indotti dall’immunizzazione con la proteina Tat nei volontari che avevano aderito allo studio ISS T-003.

I risultati di questo studio hanno evidenziato un aumento del numero di linfociti T CD4+ nei soggetti vaccinati e la persistenza a lungo termine di anticorpi specifici anti-Tat capaci di reagire contro diversi ceppi virali. E’ stata inoltre effettuata la valutazione del profilo farmacocinetico e farmacogenetico di farmaci antiretrovirali nei partecipanti ai due studi ISS T-003 e ISS T-003 EF-UP, dato che la valutazione dei livelli plasmatici di ARV è l’unico mezzo affidabile ed obiettivo per identificare pazienti con concentrazioni adeguate, sub-terapeutiche o tossiche di farmaci, come anche ad identificare pazienti non aderenti alla terapia. Questo studio permetterà inoltre di verificare i range terapeutici in questa popolazione e la loro applicabilità in soggetti infettati con altri sottotipi virali e diverso background genetico.

Le attività del Programma sono state completate nei mesi di gennaio e febbraio 2017, con termine ufficiale del programma il 28 febbraio 2017. In questi mesi sono state organizzate visite finali ai siti di progetto e gli incontri conclusivi con le controparti governative sudafricane. Sono inoltre state effettuate tutte le procedure amministrative relative alla chiusura di tutte le attività. Il personale ISS è definitivamente rientrato in Italia nel marzo 2017. La rendicontazione finanziaria ed il rapporto conclusivo sul programma sono stati consegnati alla Agenzia Italiana per la Cooperazione allo Sviluppo (per il MAECI).

La valutazione indipendente del programma è stata affidata da MAECI alla United Nations Industrial Development Organization (UNIDO), che ha effettuato le visite di valutazione in due fasi, nel 2014 e nel 2015, stilando un positivo rapporto conclusivo di valutazione nel settembre 2015. Nel Maggio 2016, il rapporto è stato appeso al sito web ufficiale di UNIDO (<https://open.unido.org/projects/ZA/projects/100086,doc:ISACReportFIN30Sept2015.pdf>).

**Studi clinici di fase II per il trattamento del sarcoma di Kaposi con gli inibitori della proteasi di HIV**

*Progetto finanziato dal Ministero della Salute e da AIFA. Centro Nazionale per la Ricerca su HIV/AIDS.*

Il Progetto è condotto dal Centro Nazionale per la Ricerca su HIV/AIDS ed è volto ad implementare una piattaforma preclinica e clinica per valutare la sicurezza e l'efficacia degli inibitori della proteasi di HIV (HIV-PI) nella terapia dei tumori. Dopo l'introduzione delle nuove terapie anti-retrovirali combinate (HAART) contenenti gli inibitori della proteasi di HIV (HIV-PI) è stata osservata una riduzione dell'incidenza dei tumori associati ad HIV, incluso il sarcoma di Kaposi (KS), i linfomi non-Hodgkin e le neoplasie intraepiteliali della cervice uterina (CIN) come anche una regressione dei tumori nei soggetti che ne erano già affetti. Con l'avvento dell'HAART è stata inoltre registrata una significativa riduzione di ricorrenza di CIN dopo asportazione chirurgica nelle donne sieropositive. Questi effetti della terapia HAART non sono interamente spiegabili con la ricostituzione immunologica promossa con il trattamento antiretrovirale, ed è oggi ampiamente documentato che la HAART esercita effetti antitumorali indipendenti dalla soppressione della replicazione di HIV. Gli studi condotti dal Centro Nazionale per la Ricerca su HIV/AIDS hanno dimostrato che gli HIV-PI esercitano azioni anti-angiogeniche e antitumorali mediate da un blocco della migrazione e dell'invasione cellulare, e dell'attività delle metalloproteasi della matrice (MMP)-2.

Sulla base di questi studi è stato avviato e concluso uno studio clinico di fase II per valutare l'attività dell'HIV-PI indinavir in pazienti con KS classico non infettati da HIV. I risultati della sperimentazione hanno indicato che il trattamento con indinavir è ben tollerato ed è associato ad una evoluzione clinica favorevole, particolarmente nei soggetti con tumore iniziale. Questi dati hanno suggerito che nei tumori avanzati potrebbe essere indicato associare una chemioterapia debulking al fine di ridurre la massa tumorale e l'edema e migliorare la perfusione tissutale. È stato perciò avviato uno studio di fase II volto a valutare il trattamento del KS classico avanzato con indinavir in associazione a chemioterapia convenzionale con vinblastina e bleomicina. Lo studio si proponeva di determinare il numero e la tipologia delle risposte ottenute al termine della terapia, la tossicità ed il profilo farmacocinetico dei farmaci in studio, la modulazione dei più importanti marcatori biologici di risposta alla terapia ed i marcatori biologici predittivi della risposta. Lo studio, che ha ricevuto un finanziamento AIFA nell'ambito della ricerca indipendente sui farmaci ed un finanziamento nell'ambito del Programma Nazionale AIDS del Ministero della Salute, ha confermato la sicurezza e



l'attività antitumorale degli HIV-PI anche in pazienti con KS classico avanzato. Sono attualmente in corso studi per la valutazione dei biomarcatori di risposta alla terapia.

### **Development and use of non-integrating lentiviral vectors as a novel and safe delivery system for a vaccine against HIV-1**

*Progetto finanziato dalla Ricerca Finalizzata – Ministero della Salute. Centro Nazionale Salute Globale.*

Il progetto, coordinato dal Centro Nazionale per la Salute Globale, prevede lo sviluppo di un vaccino basato su un nuovo e sicuro sistema di veicolazione dell'antigene di HIV in grado di indurre una risposta immunologica forte e persistente nel tempo. Tale vettore lentivirale integrasi-difettivo (IDLV) esprimente Env di HIV è in grado di stimolare una forte risposta immunologica antigene-specifica in diversi modelli preclinici. Questo progetto prevede di immunizzare primati non umani (NHP) con IDLV esprimenti antigeni di HIV e di valutare la risposta immunologica sia cellulare che anticorpale. Nell'ambito di questo progetto, nel 2017 abbiamo utilizzato un IDLV basato sul SIV, più efficiente nella trasduzione di cellule dendritiche (DC) di scimmia se confrontato con IDLV basati su HIV-1, e che risulta quindi migliore anche per saggiare l'efficacia di questi vaccini in NHP. Il vettore IDLV esprime l'antigene Env di HIV stabilizzato, ovvero teoricamente capace di indurre una migliore quantità e qualità di anticorpi, potenzialmente in grado di proteggere in caso d'infezione. Abbiamo quindi immunizzato dei primati non-umani (*cynomolgus macaques*) ed abbiamo valutato la produzione degli anticorpi nel corso del tempo (8 mesi dall'inoculo). I risultati indicano che una sola somministrazione del vettore è in grado di indurre alti livelli anticorpali che perdurano nel tempo.

### **CCL2/CCR2 blocking: molecular insights into a potential therapeutic strategy against HIV Replication**

*Progetto finanziato dalla Ricerca Finalizzata – Ministero della Salute. Centro Nazionale Salute Globale*

La terapia antiretrovirale combinata (cART) ha rappresentato un grosso passo avanti nella ricerca nel campo dell'HIV, determinando una notevole riduzione della mortalità dei pazienti infettati con HIV e della trasmissione e la cronicizzazione della malattia. La cART non rappresenta però una cura, poiché nei pazienti trattati il virus persiste in serbatoi cellulari e anatomici e l'interruzione



della terapia determina l'aumento della viremia. Questo problema, insieme a altri fattori, quali la tossicità e le difficoltà di aderenza associate alla terapia a lungo termine, e l'insorgere di resistenze virali rende necessario lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche che consentano trattamenti più brevi e maggiormente sostenibili anche dal punto di vista economico. Inoltre, la cART non è in grado di eliminare l'attivazione del sistema immunitario e l'infiammazione, che rappresentano fattori che contribuiscono alla persistenza del virus e alle comorbidità associate all'infezione da HIV. Il progetto, coordinato dal Centro per la Salute Globale, prevede di definire i meccanismi alla base del ruolo patogenetico della chemochina pro-infiammatoria CCL2 e del suo recettore CCR2 nell'infezione da HIV. La valutazione del potenziale terapeutico del blocco dell'asse CCL2/CCR2 per il controllo dell'infezione da HIV permetterà di porre le basi per un'applicazione clinica di questo approccio. Gli obiettivi specifici prevedono: i) definire il ruolo della CCL2 nella regolazione dell'espressione e della funzione di fattori di restrizione dell'ospite già identificati e l'impatto sulla replicazione e sulla trasmissione di HIV; ii) identificare nuovi fattori regolati dalla CCL2 nelle cellule infettate da HIV mediante studi di genomica "high-throughput"; iii) investigare l'effetto antivirale dell'inibitore di CCR5/CCR2 cenicriviroc mediato dal blocco di CCR2/CCL2. Nel corso del 2017 abbiamo continuato gli studi riguardanti la valutazione dell'effetto del blocco in vivo dell'asse CCL2/CCR2 in pazienti HIV-1 infetti trattati con un nuovo farmaco, il cenicriviroc, antagonista di CCR5 e CCR2, nell'ambito di uno studio clinico di fase IIb (NCT0133888). In particolare, l'analisi longitudinale dell'espressione di fattori di restrizione su campioni derivati dallo stesso paziente prima dell'inizio del trattamento e dopo 4, 12, 24, e 48 settimane di trattamento è stata estesa a APOBEC3G, un altro membro della famiglia APOBEC3. I dati ottenuti indicano che l'espressione proteica di questo enzima non è modificata dalla terapia, al contrario di quanto precedentemente osservato per APOBEC3A, la cui espressione aumenta dopo trattamento con cenicriviroc rispetto al basale. Per valutare il significato clinico dei livelli osservati di espressione di APOBEC3G e APOBEC3A, abbiamo analizzato la correlazione con alcuni marcatori surrogati della progressione della malattia, quali il carico virale, la conta delle cellule CD4<sup>+</sup> e il rapporto CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> misurati al basale e alla fine del periodo di follow-up (settimana 48), utilizzando il test di Spearman. Non abbiamo trovato correlazione tra espressione di APOBEC3G o APOBEC3A e carica virale. Tuttavia, l'analisi ha messo in evidenza una correlazione diretta tra i livelli basali di APOBEC3G e la conta delle cellule CD4<sup>+</sup> al basale (coefficiente = 0.541; p = 0.002) e il rapporto CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> alla settimana 48 di trattamento (coefficiente = 0.451; p = 0.01). Non abbiamo invece osservato alcuna correlazione tra questi parametri e l'espressione di APOBEC3A. L'analisi ha però

messo in evidenza un'interessante correlazione inversa tra i livelli basali di APOBEC3A e i livelli basali del marcatore infiammatorio CD14 solubile (coefficiente = -0,435; p = 0,03). La correlazione inversa tra i livelli di APOBEC3A e CD14 solubile è ancora più significativa alla settimana 48 del trattamento (coefficiente = -0,46; p = 0,009).

**Progetto CASA** (progetto di ricerca operativa)

*Progetto finanziato dal Ministero della Salute e, da giugno 2015, dalla Cooperazione Italiana allo Sviluppo (Convenzione: MAE-DGCS, REP 1798 del 19/06/2015). Centro Nazionale Salute Globale.*

L'Africa subsahariana rimane l'area geografica maggiormente colpita dalla pandemia da HIV, nonostante le molteplici iniziative internazionali dirette a contrastare la diffusione dell'infezione. La fragilità dei sistemi sanitari, la scarsa integrazione dei servizi e la mancanza di finanziamenti adeguati sono i principali ostacoli alla possibilità di garantire all'intera popolazione di questa regione africana l'accesso ai servizi sanitari e gli stessi standard di cura dei paesi economicamente più sviluppati. In un contesto di estrema fragilità e povertà, come quello subsahariano, è centrale il ruolo assunto dalla ricerca operativa, il cui obiettivo è l'ottimale utilizzo delle risorse disponibili per una maggiore efficacia degli interventi.

Il primo paese coinvolto nel progetto è l'Etiopia. Il contributo italiano alla lotta alla povertà è stato, in Etiopia, di notevole rilevanza, con interventi in settori di cruciale importanza, come l'istruzione, l'energia e l'organizzazione dei servizi sanitari. La lotta all'epidemia HIV/AIDS in Etiopia rientra negli obiettivi prioritari che il nostro paese intende perseguire.

Il progetto CASA è in linea con le priorità sanitarie stabilite dal Governo etiope, che riconosce una stretta correlazione tra miglioramenti in campo sanitario e sviluppo economico del paese.

Lo studio ha l'obiettivo generale di contrastare la diffusione dell'infezione da HIV e l'insorgenza delle principali patologie ad essa associate. Condotta dall'ISS in partenariato con due Istituzioni Etiopi (Tigray Health Bureau e Mekelle University), il progetto prevede un'articolata attività di training e la raccolta multicentrica di dati epidemiologici su una coorte di pazienti con HIV/AIDS che intraprendono la terapia antiretrovirale. Lo studio CASA è stato inizialmente finanziato dal Ministero della Salute e, in tempi successivi (giugno 2015), dalla Cooperazione Italiana allo Sviluppo (oggi Agenzia Italiana per la Cooperazione allo Sviluppo, AICS). Nel 2017 allo studio è stato attribuito un ulteriore finanziamento (AICS, Ministero della Salute) per la prosecuzione delle attività nei prossimi tre anni, fino alla prevista chiusura.

Sono attesi risultati in termini di maggiore competenza del personale sanitario, aumento della retention in care del paziente e maggiore abilità del personale sanitario nella raccolta dei dati epidemiologici nel corso della comune pratica clinica.

A. Studio di coorte. Nel 2017 l'Istituto ha proseguito l'attività di coordinamento relativa alla raccolta multicentrica di dati epidemiologici su pazienti con HIV che hanno intrapreso il trattamento antiretrovirale. I pazienti arruolati nel 2017 superano le 2000 unità. I dati finora raccolti hanno consentito una seconda valutazione della retention (la prima pubblicata lo scorso anno su PlosOne), i cui risultati sono stati pubblicati nel 2017 sulla rivista scientifica *BMJ Global Health*.

B. Attività di formazione. Attività di training, iniziata nel 2017, in prosecuzione del percorso formativo rivolto al personale sanitario (prevalentemente infermieristico) ed a membri di Associazioni dei pazienti con HIV (community health workers, CHWs). A seguito di prove d'esame, i candidati ritenuti particolarmente abili e motivati, avevano ottenuto dal Tigray Health Bureu adeguata certificazione di idoneità ad una futura attività di trainer. Criteri e modalità di selezione sono stati descritti nella passata relazione (attività 2016). Come da programma, nel 2017 i soggetti selezionati hanno iniziato un nuovo percorso di formazione, dopo il quale (secondo l'approccio "train the trainer") saranno a loro volta "trainer" in corsi di formazione presso le locali strutture sanitarie.

1. *Workshop per i Community Health Workers (CHWs) selezionati per costituire un gruppo di futuri trainer*. Si tratta dei candidati che avevano superato con maggior successo gli esami di fine corso (corso base). Nel corso del seminario sono stati definiti ed avviati i corsi di formazione che i CHWs selezionati seguiranno nei prossimi tre anni per acquisire la qualifica di trainer.

2. *Workshop per il personale sanitario (prevalentemente infermieristico), selezionato per costituire un gruppo di futuri trainer*. Sono anch'essi candidati che avevano meglio superato gli esami finali (al termine del corso base) e che più di altri avevano dimostrato di possedere le abilità necessarie a diventare trainer. Nel corso del workshop sono stati definiti ed avviati i corsi di formazione che i soggetti selezionati seguiranno nei prossimi tre anni per acquisire la qualifica di trainer.

3. *Convegno/Workshop "Ethiopia and Partners: the Response to HIV/AIDS", ad Addis Abeba*.

Il seminario ha posto in rilievo progressi e problematiche nella lotta alla diffusione dell'infezione da HIV in Etiopia. Ha inoltre evidenziato obiettivi e stato di avanzamento del progetto CASA. Al

workshop hanno partecipato esponenti di istituzioni internazionali e locali: UNAIDS/Ethiopia; USAID/Ethiopia; Clinton Health Access Initiative (CHAI); The Global Fund to Fight AIDS, TB and Malaria; Ethiopian Ministry of Health; Agenzia Italiana per la Cooperazione allo Sviluppo; Istituto Superiore di Sanità (ISS), Comitato Collaborazione Medica (CCM), Doctors with Africa (CUAMM), Tigray Regional Health Bureau (THB).

C. Subentro del “Tigray Health Research Institute” (THRI). Definizione di un memorandum di intesa per un rapporto di collaborazione tra ISS e THRI. Il THRI contribuirà allo sviluppo del progetto CASA fornendo dati relativi alla misurazione della carica virale (HIV-RNA). L’Istituto è punto di riferimento ed unica struttura regionale in possesso di adeguata apparecchiatura e competenza per la rilevazione di HIV-RNA, esame inattuabile presso altri centri partecipanti al progetto.

### **Sviluppo di vaccini innovativi contro l’Herpes simplex virus di tipo 1 e 2.**

*Progetto privo di Finanziamento nel 2017. Proposto per il finanziamento nell’ambito della Ricerca Finalizzata – Ministero della Salute. Centro Nazionale per la Ricerca su HIV/AIDS.*

Scopo del progetto è lo sfruttamento delle attività immunomodulatorie di Tat di HIV-1 per lo sviluppo di un vaccino anti-Herpes 1 e 2. Infatti, nonostante i progressi scientifici ed i numerosi tentativi fatti, non esiste ad oggi un vaccino preventivo o terapeutico contro Herpes simplex di tipo 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2) che può essere causa di gravi patologie nell’infante e nel soggetto immunodepresso o immunodeficiente, incluso l’anziano. Inoltre, la cronicità delle infezioni erpetiche in generale, che ciclicamente vanno incontro a riattivazioni, è ritenuta un fattore importante nell’immunosenescenza e nell’invecchiamento stesso della persona infetta. Benché sia ancora controverso, si ritiene che la risposta cellulare linfocitaria, ed in particolare la risposta citotossica dei linfociti T CD8+ (CTL), sia determinante nel controllo ed eventuale eradicazione dell’infezione erpetica.

Nostri studi hanno dimostrato che la proteina Tat ha importanti attività immunomodulatorie che comprendono: i) l’induzione dell’attivazione e maturazione di cellule dendritiche verso un fenotipo capace di indurre risposte di tipo Th1 (richieste per l’induzione di risposte antivirali e CTL); ii) la modulazione dell’attività proteolitica dell’immunoproteasoma che si traduce nell’aumento del numero degli epitopi antigenici riconosciuti da CTL, potenzialmente rilevanti per la protezione; iii) l’aumento del rilascio da parte di CTL anti-herpes di fattori solubili importanti per la risposta

antivirale quali IFN $\gamma$ , granzyme B e IL2; iv) l'aumento di linfociti T CD8+ memoria effettori anti-herpes che nell'uomo sono associati al controllo dell'infezione (fase asintomatica); l'aumento in linfociti T CD8+ attivati dell'espressione di T-bet, Eomes, Blimp-1 e BCL2, geni associati alla fase asintomatica dell'infezione.

Pertanto, un ceppo HSV-1 è stato attenuato o reso non replicante ed ingegnerizzato per esprimere la proteina Tat di HIV-1. Il vettore attenuato è stato inoculato in due diversi ceppi di topi ed in entrambi è stata dimostrata l'induzione di CTL contro un più ampio spettro di epitopi virali e la protezione contro l'infezione con una dose letale di un ceppo erpetico patogeno. Questi dati indicano che l'inclusione di *tat* in vettori erpetici HSV, attenuati e/o incompetenti per la replicazione rappresenta una strategia nuova e molto promettente per lo sviluppo di un vaccino antierpetico preventivo o terapeutico, che potrebbe essere applicata anche ad altre infezioni erpetiche quali quelle da EBV, CMV, VZV. Il progetto si propone pertanto di confermare la sicurezza, l'immunogenicità e l'efficacia dei vettori erpetici esprimenti *tat* già disponibili e dei nuovi che verranno prodotti nell'ambito del progetto, in piccoli animali (topi e cavie). Per quanto concerne la sicurezza, saranno costruiti vettori esprimenti il gene della luciferasi per studiare la biodistribuzione in vivo negli animali vaccinati. I vettori erpetici attenuati e/o incompetenti per la replicazione verranno poi confrontati per la loro immunogenicità nei due modelli animali, e quelli più promettenti (uno scelto fra quelli solo attenuati ed uno fra quelli attenuati ed incompetenti per la replicazione) saranno scelti per gli studi di efficacia sia preventiva che terapeutica. L'efficacia preventiva verrà valutata come la capacità degli animali vaccinati di resistere all'infezione sperimentale con una dose letale o sub-letale di un virus erpetico di tipo 1 o 2 patogeno. Quella terapeutica valuterà la capacità del vaccino di impedire la riattivazione erpetica in cavie infettate latentemente con herpes. Verranno infine investigate le correlazioni fra le risposte immuni anticorpali e cellulari indotte dai vaccini sperimentati e la protezione osservata, al fine di identificare correlati di protezione potenzialmente utili per la valutazione di vaccini anti-erpetici nell'uomo ma anche per determinare lo stato di immunocompetenza contro HSV-1 e HSV2 in soggetti infetti e non vaccinati.

#### **Ruolo della proteina Tat di HIV-1 nella genesi e persistenza dei *reservoir* virali.**

*Progetto privo di finanziamenti per il 2017. Approvato per il finanziamento nell'ambito della Ricerca Finalizzata – Ministero della Salute. Centro Nazionale per la Ricerca su HIV/AIDS.*

Benché l'uso di farmaci antiretrovirali nella terapia dell'infezione da HIV risulti nella soppressione della replicazione virale e della carica virale, il virus persiste indefinitamente nei così detti *reservoir*

(serbatoi) di virus latente. In questi compartimenti, HIV è presente in forma di DNA virale silente integrato (*DNA provirale*) o non integrato (*DNA extra-cromosomico*) nel genoma della cellula ospite. Le cellule T CD4+ “memoria” ed “helper” follicolari costituiscono i principali *reservoir* di *DNA provirale*. Macrofagi e cellule dendritiche sono, inoltre, in grado di accumulare e conservare particelle virali di HIV per lunghi periodi di tempo e rappresentano, pertanto, ulteriori importanti serbatoi di virus. I *reservoir* vengono generati assai precocemente nell’infezione e sono insensibile alla terapia, in quanto i farmaci antiretrovirali inibiscono solo il virus replicante. I *reservoir* persistono pertanto indefinitamente, anche dopo l’inizio della terapia cART. I serbatoi di virus latente non sono statici ma, al contrario, vanno incontro ad un processo dinamico di continua deplezione e ri-provvigionamento (*replenishment*) di cellule latentemente infettate. Questo processo dinamico assicura al virus il costante ed indefinito equilibrio dei serbatoi virali, anche nei soggetti in trattamento con i farmaci antiretrovirali. Si ritiene che la continua deplezione di cellule *reservoir* sia prevalentemente determinata dalla loro naturale caducità e dalla riattivazione spontanea del virus. Il virus latente è infatti accumulato in cellule dall’*emivita* assai elevata ma non illimitata. Inoltre, la riattivazione di HIV causa effetti *citopatici* che portano a morte la cellula ospite. Benché la riattivazione di HIV possa avvenire anche in assenza di effetti *citopatici*, particolarmente in macrofagi e cellule dendritiche, l’espressione del virus espone la cellula ospite all’azione eradicante delle cellule T CD8+ citotossiche (CTL). Pertanto, la morte naturale (caducità) e la riattivazione di HIV sono i principali meccanismi di deplezione dei *reservoir*. Si ritiene che il *replenishment* dei *reservoir* sia determinato dai seguenti fattori: proliferazione omeostatica delle cellule T infettate volta a reintegrare la deplezione per morte cellulare, espansione di cloni di cellule T infettate latentemente, produzione di virus infettante in seguito a riattivazione di HIV latente, replicazione/re-infezione residua in compartimenti caratterizzati da concentrazioni sub-ottimali di farmaci (tessuto linfatico). Studi recenti indicano, inoltre, che le cellule endoteliali promuovono attivamente sia la replicazione produttiva che la latenza di HIV in cellule T CD4+ non attivate (*resting T CD4+ cells*). Le cellule endoteliali sembrano, pertanto, svolgere un ruolo chiave sia nella creazione dei serbatoi di latenza che nel loro continuo *approvvigionamento*.

Allo scopo di eradicare i *reservoir* virali, sono state recentemente approntate specifiche strategie basate sulla somministrazione di composti in grado di riattivare HIV in pazienti trattati con farmaci antiretrovirali per prevenire la re-infezione (strategie *shock-and-kill*). I trials clinici controllati effettuati per verificare queste terapie hanno tuttavia prodotto risultati insoddisfacenti. Per contro, i trial vaccinali di fase II condotti in Italia e Sud Africa hanno indicato che la vaccinazione terapeutica



con il vaccino Tat induce una significativa riduzione del DNA provirale nel sangue. I pazienti in follow-up hanno infatti mostrato una riduzione >70% del DNA provirale. In particolare, a otto anni dalla vaccinazione, il DNA provirale è sceso al di sotto della soglia di rilevazione in una o più misurazioni nel 33% dei pazienti. Questi risultati aprono nuove prospettive per l'allestimento di terapie "funzionali" e per l'eradicazione del virus. Il progetto si propone pertanto di chiarire i meccanismi con cui il vaccino Tat agisce sui *reservoir* virali, allo scopo di identificare nuove cure contro HIV in grado di "attaccare" i serbatoi di virus latente. In particolare, gli obiettivi del progetto sono i seguenti:

1. Valutare gli effetti di Tat sulla riattivazione di virus latente. Studi recenti indicano che Tat sia in grado di riattivare HIV in cellule T CD4+ senza indurre attivazione cellulare ed effetti citopatici, ovvero senza danni per la cellula *reservoir*. Ciò configura, pertanto, un meccanismo per l'indefinito mantenimento ed accrescimento dei *reservoir*. Il vaccino Tat potrebbe bloccare questo meccanismo poiché è in grado di indurre anticorpi anti-Tat neutralizzanti. Questa parte degli studi verrà condotta aggiungendo Tat a cellule infettate latentemente o isolate da pazienti trattati e misurando la produzione di virus, parametri di attivazione cellulare e la sopravvivenza delle cellule trattate in presenza-assenza di anticorpi anti-Tat.
2. Valutare gli effetti di Tat nella replicazione di HIV nei compartimenti ove i farmaci antiretrovirali raggiungono concentrazioni subottimali. La replicazione/infezione "residua" di HIV in questi compartimenti è estremamente limitata ed i livelli viremici raggiunti nei pazienti sono identificabili solo con saggi ad elevatissima sensibilità. Pertanto, l'infezione procede in questi compartimenti a dosi di virus (molteplicità di infezione) assai basse e sub-ottimali. I nostri dati indicano che Tat lega Env sulla superficie del virus, formando un complesso di entrata in grado di favorire l'infezione a bassa molteplicità di infezione. Questo meccanismo potrebbe pertanto essere chiave per la capacità di HIV di infettare cellule target in presenza di dosi sub-ottimali di farmaci e per il costante approvvigionamento dei *reservoir*. Questi studi verificheranno la capacità di anticorpi anti-Tat di bloccare l'infezione Tat-mediata in presenza di concentrazioni sub-ottimali di farmaci antiretrovirali in vari modelli cellulari.
3. Valutare il ruolo di Tat nell'induzione della replicazione produttiva e della latenza di HIV in cellule T CD4+ da parte di cellule dendritiche, endoteliali e monociti/macrofagi. I nostri studi e studi di altri gruppi di ricerca hanno dimostrato che Tat svolge un ruolo chiave nel *cross talk* tra cellule endoteliali e monociti/macrofagi, cellule dendritiche, e cellule T CD4+. Pertanto, verranno studiati gli effetti di Tat sull'infezione di cellule endoteliali e sulla trans-infezione e la



trasmissione di HIV da parte di cellule endoteliali a monociti/macrofagi, cellule dendritiche, e cellule T CD4+. L'effetto di anticorpi anti-Tat verrà studiato anche in questi modelli di infezione. In attesa dell'erogazione dei finanziamenti è iniziata la sperimentazione degli effetti di Tat sull'infezione di cellule endoteliali e sulla trans-infezione e la trasmissione di HIV da parte di cellule endoteliali a monociti/macrofagi, cellule dendritiche, e cellule T CD4+.

In collaborazione con gli *Istituti Fisioterapici Ospedalieri* (IFO) di Roma è stato inoltre stilato un Protocollo di Studio per verificare gli effetti di Tat sulla dinamica dei serbatoi di latenza di HIV in soggetti infettati in trattamento o naïve per la terapia. Il protocollo è pronto per la valutazione del Comitato Etico competente (IFO).

### **Studi preclinici e clinici sugli effetti anti-angiogenici ed antitumorali degli inibitori della proteasi di HIV nella prevenzione dello sviluppo e progressione del carcinoma della cervice uterina**

*Studio privo di finanziamenti per il 2017. Proposto per il finanziamento nell'ambito della Ricerca Finalizzata – Ministero della Salute. Centro Nazionale per la Ricerca su HIV/AIDS.*

Nonostante l'introduzione dello screening di prevenzione di massa, il carcinoma cervicale invasivo (CC) è il terzo tumore più frequente nelle donne a livello mondiale e il primo in Africa, rappresentando una causa importante di morbosità e mortalità. Il rischio di sviluppo CC è fortemente aumentato dall'infezione persistente di cellule epiteliali cervicali con ceppi di papillomavirus umano (HPV) ad alto rischio oncogenico (HR), l'agente causale del CC. È importante sottolineare che una frazione significativa di CC è causata da ceppi HR-HPV non coperti dai vaccini HPV attualmente in uso, e che lesioni displastiche della cervice uterina (CIN) possono progredire in CC invasivo nonostante trattamento chirurgico. La terapia del CIN/CC potrebbe quindi trarre notevoli benefici da interventi farmacologici efficaci, volti a colpire bersagli mirati.

L'incidenza e l'aggressività del CIN sono particolarmente drammatici in donne co-infettate da HIV/HPV. Nelle pazienti HIV+, tuttavia, le nuove terapie antiretrovirali combinate (cART) hanno ridotto la comparsa di lesioni CIN o la loro progressione in CC. In tale contesto numerosi dati preclinici e clinici indicano che farmaci antiretrovirali appartenenti alla classe degli inibitori della proteasi di HIV (PI) esercitano effetti diretti anti-angiogenici e antitumorali contro diversi tumori, compreso il CC, indipendentemente dalla loro attività anti-HIV, indicando che questi farmaci potrebbero rappresentare nuovi candidati antitumorali.