

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. È 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).

Dai risultati degli studi condotti in Italia e Sudafrica emerge l'indicazione a proseguire lo sviluppo clinico del vaccino Tat con studi di efficacia (fase III), finalizzati alla sua approvazione all'uso in pazienti che rispondono male o sono poco aderenti alla terapia, e a valutare il suo impiego nella popolazione pediatrica ed in pazienti alla prima diagnosi di infezione (Test&Treat). I risultati ottenuti sono stati valutati molto positivamente dal Ministero della Salute del Sudafrica e da UNIDO (United Nations Industrial Development Organization). Entrambe le organizzazioni hanno incoraggiato il proseguimento degli studi fino a registrazione del vaccino. A tale scopo è stata creata la Tat Vaccine Partnership che raccoglie partner pubblici e privati nazionali ed internazionali sotto la coordinazione dal Medical Research Council del Sudafrica (SAMRC). La missione della partnership è l'aggregazione di soggetti implementatori e finanziatori pubblici e privati per il completamento della sperimentazione del vaccino Tat e la sua registrazione per la distribuzione alla popolazione.

**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.

### **Caratterizzazione di sottotipi di HIV-1 in pazienti del Sud Sudan.**

*Progetto privo di finanziamento per il 2017. Centro Nazionale per la Ricerca su HIV/AIDS.*

L'HIV-1 è un virus estremamente variabile, tanto che è possibile suddividerli, in base alle omologie della propria sequenza genomica, in tipi, sottotipi e forme ricombinanti circolanti (CRF). La distribuzione di queste differenti forme genetiche è geograficamente caratterizzata con l'Africa subsahariana che registra la presenza di moltissime di queste forme genetiche. Nel Sudan del sud, a causa di 40 anni di guerra civile con il Sudan del nord, sono disponibili pochi dati sulla circolazione dei ceppi di HIV-1. È stato, pertanto, avviato uno studio per la caratterizzazione delle forme genetiche di HIV in Sudan. L'analisi dei primi 10 individui studiati ha identificato HIV di sottotipo C (n = 4), sottotipo D (n = 4) e forme ricombinanti (n = 2) intervallati nell'albero filogenetico con quelli provenienti da altri paesi africani, suggerendo la comparsa di varianti dovute ad attivi movimenti delle popolazioni attraverso i confini del Sudan durante la guerra civile.

### **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 anticorpale. Nell'ambito di questo progetto, nel 2018 abbiamo effettuato l'analisi delle risposte immunologiche in seguito a prime-boost con IDLV esprimente Env su 5 scimmie cynomolgus. Il dosaggio degli anticorpi mediante saggio ELISA sui sieri raccolti mensilmente dopo la vaccinazione ha evidenziato l'induzione di elevati livelli di IgG anti-Env in tutte le scimmie. I livelli anticorpali hanno raggiunto un picco a 2 settimane dall'immunizzazione e sono diminuiti lentamente in tre scimmie mentre hanno raggiunto il picco a 4-6 settimane dopo l'immunizzazione in due scimmie, dove sono rimasti a livelli più alti. Il boost con IDLV-Env ha aumentato i titoli di IgG anti-Env in tutte le scimmie. La risposta di picco è risultata rilevabile a due settimane dopo il boost e successivamente i livelli anticorpali sono diminuiti lentamente, ma sono rimasti stabili a livelli più alti rispetto al pre-boost

(0,5-1 log) ed erano rilevabili fino a 57 settimane dopo la prima vaccinazione (ultimo punto temporale testato). La presenza degli anticorpi neutralizzanti (NAbs) è stata effettuata utilizzando il ceppo di HIV-1 wild type clade C Tier 1 MW965.26. I risultati indicano che i NAbs contro il virus HIV MW965.26 virus sono stati indotti dopo il boost con IDLVEnv, indicando che l'induzione di NAbs è correlata alla quantità totale di Abs.

**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 comorbidity 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 2018 abbiamo studiato le vie di trasduzione del segnale implicate nell'induzione dell'espressione di APOBEC3A in seguito alla neutralizzazione della CCL2 con anticorpi specifici nei macrofagi

primari. Esperimenti condotti in presenza dell'inibitore della trascrizione actinomycin D o dell'inibitore della sintesi proteica cicloesimide hanno dimostrato che l'induzione di APOBEC3A da parte della neutralizzazione della CCL2 richiede trascrizione de novo e che la sintesi proteica è essenziale nel meccanismo di attivazione trascrizionale del gene. Abbiamo poi valutato il ruolo di alcuni fattori trascrizionali e di vie di trasduzione del segnale. I dati ottenuti indicano che la neutralizzazione della CCL2 determina l'attivazione di NF-κB e della via Jak/Stat e che inibitori di questi fattori bloccano l'aumento dei trascritti di APOBEC3A indotto dal trattamento con anticorpi anti-CCL2. Abbiamo inoltre valutato il ruolo delle HDAC, enzimi che deacetilano proteine istoniche e non istoniche quali NF-κB e Stat, mettendo in evidenza che inibitori di questi enzimi determinano una forte riduzione dei livelli dei trascritti di APOBEC3A, sia basali che indotti dal trattamento con anticorpi anti-CCL2. Sono in corso esperimenti per valutare se le vie NF-κB e Jak/Stat agiscono in maniera indipendente nell'induzione dell'espressione di APOBEC3A o se sono collegate tra loro, e se il blocco delle HDAC agisce modulando l'acetilazione e l'attivazione di NF-κB e/o delle Stat.

**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 cure del paziente e maggiore abilità del personale sanitario nella raccolta dei dati epidemiologici nel corso della comune pratica clinica.

*A. Studio di coorte.* Nel 2018 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. Il totale dei pazienti arruolati fino a dicembre 2018 è pari a 2390 unità.

I dati finora raccolti hanno consentito due valutazioni della retention: la prima pubblicata nel 2016 su *PlosOne*, la seconda pubblicata su *BMJ Global Health* nel 2017. È attualmente in corso di valutazione un terzo articolo proposto alla rivista "African Journal of AIDS Research", nel quale vengono presentati e discussi i risultati preliminari relativi al programma di training.

*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 (Adherence Supporters, ADs). A seguito di prove d'esame, i candidati ritenuti particolarmente abili e motivati, avevano ottenuto dal Tigray Health Bureau adeguata certificazione di idoneità ad una futura attività di trainer. Criteri e modalità di selezione sono stati descritti nelle passate relazioni. Si riporta di seguito una breve sintesi delle attività formative svolte nel 2018. Il training è stato condotto in lingua inglese o (con l'aiuto di interpreti locali) in lingua Tigrina.

#### 1. Programma di Capacity Building su "aspetti clinici di HIV/AIDS" per personale infermieristico e altri operatori sanitari

1a. Prima sessione di training (Marzo 2018). Discussione su "Trattamento e prevenzione di HIV/AIDS" e condivisione di esperienze tra gli operatori sanitari.

1b. Seconda sessione di training (Luglio 2018). Introduzione di nuovi temi e approfondimento di argomenti (casi clinici e le decisioni terapeutiche ad essi associate) trattati in precedenza. Verifica dell'apprendimento.

1c. Terza sessione di training (Novembre 2018). Introduzione di nuovi temi e approfondimento di argomenti già trattati. Discussione interattiva e presentazione (da parte dei singoli) del lavoro svolto nel periodo di auto-apprendimento (v. punto 4). Verifica dell'apprendimento.

2. Programma di Capacity Building sulla "Comunicazione " per personale infermieristico e altri operatori sanitari

2a. Prima sessione di training (Marzo 2018). Analisi delle necessità e modalità comunicative in relazione ai diversi contesti nei quali gli operatori potrebbero più spesso venirsi a trovare.

2b. Seconda sessione di training (Luglio 2018). Introduzione di nuovi temi. Individuazione di fattori potenzialmente in grado di migliorare la *retention*. Verifica dell'apprendimento.

2c. Terza sessione di training (Novembre 2018). Introduzione di nuovi temi. Sulla base di quanto appreso, presentazione di concrete proposte (da parte di singoli sottogruppi) su come migliorare la *retention* del paziente attraverso una migliore comunicazione. Verifica dell'apprendimento.

3. Programma di Capacity Building su "Comunicazione" e "Nozioni di base su HIV/AIDS" per Adherence Supporters

3a. Primo training, in due sessioni (Marzo 2018). Discussione di argomenti di comune interesse tra i partecipanti; come fornire al paziente informazioni (essenziali ma corrette) su HIV/AIDS; analisi delle modalità di comunicazione più adeguate ai vari contesti.

3b. Secondo training, in due sessioni (Luglio 2018). Introduzione nuovi temi e approfondimento di precedenti argomenti. Verifica dell'apprendimento.

3c. Terzo training, in due sessioni (Novembre 2018). Introduzione nuovi temi. Discussione di argomenti già proposti ed approfonditi nei periodi di autoapprendimento (v. punto 4). Verifica dell'apprendimento.

4. Percorso di auto-apprendimento. È la parte del programma svolta nei periodi intercorrenti tra le sessioni di training "face-to-face", utilizzando materiale didattico selezionato e fornito dall'ISS.

5. Workshop sulle Leishmaniosi (Luglio 2018). Seminario condotto da un dirigente ISS (esperto nel campo delle Leishmaniosi) e rivolto a medici e studenti in medicina della Mekelle University (MU). Ricercatori e medici infettivologi della MU hanno poi fatto un punto sull'epidemiologia e sulle strategie di controllo delle Leishmaniosi in Etiopia. Alle presentazioni ha fatto seguito una discussione che ha fornito utili elementi di confronto tra Etiopia e paesi europei sulla gestione e la sorveglianza della malattia.

6. Protocollo d'intesa tra Tigray Health Research Institute (THRI) e Istituto Superiore di Sanità (ISS), per un rapporto di mutua collaborazione.

È stato redatto e firmato un Memorandum d'intesa tra ISS e Tigray Health Research Institute (THRI). Il documento definisce regole e responsabilità delle due Istituzioni nell'ambito di attività da svolgere in aree di ricerca di comune interesse e competenza. Il THRI 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.

**STUDIO GF-ISS Prevenzione della trasmissione materno-infantile dell'HIV in Malawi: analisi dell'aderenza materna ai programmi e salute infantile nel primo anno dal parto.**

*Progetto finanziato dall'Agenzia Italiana per la Cooperazione allo Sviluppo – Centro Nazionale per la Salute Globale.*

Dal 2011 il Malawi ha adottato, per la prevenzione della trasmissione verticale dell'HIV (PMTCT) la cosiddetta Option B+, cioè il trattamento di tutte le donne in gravidanza indipendentemente dal loro stato di malattia con continuazione del trattamento per tutta la vita. Questo ha permesso di ridurre i tassi di trasmissione ai bambini a meno del 9% nel 2013. Il successo dell'Option B+ in Malawi è dovuto all'alto tasso di accesso alle cliniche pre-natali delle donne (> 95%) e a una strategia di test di opt-out. La copertura con la terapia antiretrovirale delle donne in gravidanza ha raggiunto l'84% nel 2016.

Inoltre il Malawi ha introdotto degli identificativi unici per i bambini esposti per permettere il loro monitoraggio e l'eventuale "tracing". La diagnostica dell'eventuale infezione nel bambino viene promossa con un test a 6 settimane (EID, early infant diagnosis) e poi a 12 e 24 mesi.

Permangono alcune importanti problematiche: sebbene la copertura con la terapia antiretrovirale (ART) delle donne in gravidanza sia alta, è stato tuttavia dimostrato che solo il 73% delle donne che iniziano una terapia in gravidanza sono ancora seguite e in terapia 12 mesi dopo l'inizio della ART. Per quanto riguarda l'EID solo il 70% dei bambini riceve un test HIV entro i 2 mesi di età.

Con sempre più donne che vivono con HIV e ricevono la ART in gravidanza è inoltre molto importante capire gli outcomes a lungo termine dei loro bambini, che sono esposti già in epoca prenatale al trattamento, spesso fin dal concepimento. I bambini nati da madri HIV-positive (bambini "esposti" all'HIV e alla ART) sono sempre più riconosciuti come un gruppo con bisogni di salute specifici. Molti studi hanno dimostrato un'aumentata morbilità (soprattutto su base infettiva)

e mortalità in questi bambini prima dell'introduzione dell'Option B+ mentre non sono disponibili dati con la nuova strategia preventiva. Le cause di questa aumentata morbilità e mortalità non sono note (e la mancanza di informazioni sulle cause rende difficili eventuali interventi) ma probabilmente coinvolgono una risposta immunitaria disfunzionale anche se un possibile impatto del crescere in una famiglia con HIV non va sottovalutato.

L'alta incidenza delle malattie infettive, che va comunque confermata, in parte può essere dovuta al ridotto transfer transplacentare degli anticorpi materni (il contributo dei bassi anticorpi materni va delucidato per mettere in atto possibili strategie di immunizzazione materna) e dall'altra ad insufficienti risposte vaccinali, con un possibile impatto negativo su morbilità e mortalità.

Inoltre, gli studi effettuati in precedenza non hanno potuto raccogliere dati contemporanei su una coorte di bambini non-esposti rendendo più difficile capire i rischi effettivi di questa popolazione

Lo studio clinico osservazionale GF-ISS prevede l'arruolamento di 150 donne HIV-positive all'ultima visita pre-natale prima del parto (36° settimana) e dei loro bambini. Lo studio seguirà madri e bambini fino a 12 mesi dopo il parto. Verrà messo a punto un questionario per lo studio dell'aderenza al programma delle madri postpartum. Il questionario sarà informatizzato attraverso un software specifico, testato dallo staff locale, somministrato alle donne perse al follow-up che verranno rintracciate dal Counsellor dello studio.

Verrà inoltre arruolata, nelle stesse maternità dove nascono i bambini esposti, una coorte contemporanea di bambini nati da madri HIV-negative (150 bambini non-esposti) che parimenti verranno seguiti per 12 mesi dopo il parto.

Il Progetto ha i seguenti obiettivi:

1. contribuire a definire le cause della bassa retention nei programmi durante il postpartum delle donne in Option B+ e quindi contribuire a diminuire il tasso di perdita al follow-up;
2. contribuire ad aumentare la EID nei bambini esposti;
3. aumentare le conoscenze che permettano di definire se i bambini esposti sono o no una popolazione a rischio sanitario aumentato, che necessitino di sorveglianza e interventi specifici;
4. stabilire nei 2 gruppi di bambini la validità protettiva delle risposte vaccinali a 3 importanti vaccini (HBV, Rotavirus, Pneumococco) per definire se sono necessarie schedule vaccinali diverse nei bambini nati da madri HIV-positive.

Nel 2018 è stata ottenuta l'approvazione del Comitato Etico del Malawi per la conduzione dello studio. È stato preparato il database per la raccolta dei dati, è stato selezionato e formato il

personale locale che condurrà lo studio in Malawi. L'inizio dell'arruolamento dei pazienti è previsto per Gennaio 2019.

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

*Progetto privo di finanziamento nel 2018. 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 erpetic 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 erpetiche 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 erpetiche 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 subletale 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-erpetiche 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 finanziato 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 *resevoir* 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-approvvigionamento (*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.

Sono stati erogati i fondi ed il progetto è iniziato il 12 Ottobre 2018. È continuata 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+.

Il Protocollo di Studio in collaborazione con gli *Istituti Fisioterapici Ospedalieri* (IFO) di Roma per verificare gli effetti di Tat sulla dinamica dei serbatoi di latenza di HIV in soggetti infettati in trattamento o naïve per la terapia è stato approvato dal Comitato Etico competente (IFO). Sono in corso di allestimento i sistemi sperimentali per lo studio degli effetti di Tat sulla riattivazione di HIV latente nei linfociti T CD4+ dei pazienti.

**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 2018. 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.

L'obiettivo di questo progetto è quello di studiare gli effetti e di indagare il meccanismo di azione dei PI nella prevenzione dell'insorgenza o progressione del CC utilizzando topi transgenici per le onco-proteine E6/E7 di HPV (topi K14-HPV16/E2) che sviluppano lesioni CIN/CC dopo l'esposizione ad estrogeni, in collaborazione con l'IRCCS Istituto di Candiolo – FPO. In questo modello la progressione del CIN avviene mediante l'attivazione di un "interruttore angiogenico" che porta alla progressione in cancro invasivo, consentendoci quindi di condurre studi specifici sui meccanismi di azione dei PI a livello delle lesioni stesse. In parallelo verranno effettuati studi in vitro su colture cellulari di CIN/CC infettate da HR-HPV per valutare l'azione dei PI sulla crescita, l'apoptosi, l'invasione e la differenziazione di cellule CIN e CC, come anche sulle vie di trasduzione

del segnale deregolate dalle onco-proteine E6 e E7 di HPV. I risultati preliminari indicano che gli HIV-PI sono in grado di prevenire sviluppo, crescita e progressione di lesioni CIN nei topi transgenici.

In parallelo sono stati studiati gli effetti antitumorali degli HIV-PI in linee cellulari CIN/CC in vitro, inclusi effetti su proliferazione, differenziazione, apoptosi e invasione tumorale, espressione/attivazione di MMP come anche sulle vie di trasduzione del segnale deregolate dalle onco-proteine E6 e E7 di HPV. I risultati di questi studi indicano che gli HIV-PI sono in grado di inibire l'attività e l'espressione della metalloproteasi della matrice extracellulare MMP-9, un enzima che ha un ruolo chiave nello sviluppo del CIN e della progressione in CC, mediante un blocco della via di trasduzione del segnale AKT/Fra-1 in cellule CIN in vitro (Bacigalupo I et al., *Oncology Letters* 2017). In considerazione dell'importante ruolo patogenetico di AKT/Fra-1/MMP-9 nella progressione del CIN/CC, questi dati supportano il “drug repositioning” degli HIV-PI nel trattamento delle lesioni cervicali sia in donne con infezione da HIV che sieronegative.

**Markers predittivi di risposta persistente alla terapia antiretrovirale: correlazione della presenza di anticorpi anti-Tat con durability dell'efficacia terapeutica.**

*Progetto privo di finanziamento nel 2018. Centro Nazionale per la Ricerca su HIV/AIDS.*

La terapia antiretrovirale combinata (cART) blocca la progressione verso l'AIDS ma non è in grado di eradicare l'infezione. Benché non rilevabile nel sangue periferico (limite di rilevazione: <40 copie di RNA virale per ml di plasma) la replicazione virale residua, dovuta a incompleta soppressione virale o a riattivazione stocastica, contribuisce in maniera importante all'infiammazione cronica e disregolazione immunitaria osservate in soggetti in cART efficace ed allo stesso tempo assicura il mantenimento dei serbatoi virali e conseguente compromissione del sistema immune. In effetti la ricostituzione del sistema immune nel soggetto virologicamente soppresso è spesso parziale, come indicato da un recupero incompleto del numero dei linfociti CD4 circolanti, dal mancato ristabilimento del rapporto CD4/CD8 e delle sottopopolazioni linfocitarie (naive, memory, effector), dal persistere d'immunoattivazione (CD38, HLA-DR). Di qui l'importanza di identificare marcatori in grado di distinguere chi andrà incontro nel medio/lungo termine al fallimento terapeutico da chi invece continuerà a rispondere bene all'ART, al fine di migliorare il management clinico e fornire ai pazienti una corretta informazione sul loro stato clinico.

A questo riguardo, dati epidemiologici del nostro e di altri gruppi hanno dimostrato che anticorpi anti-Tat sono rilevabili solo in una minoranza (circa 30%) dei soggetti HIV+ e che la loro presenza si associa ad una ridotta o assente progressione della malattia e ad una più rapida e maggiore responsività alla terapia antiretrovirale. Tat (TransAttivatore della Trascrizione) è la prima proteina

prodotta dall'HIV, è essenziale per un'efficiente replicazione virale, è rilasciata dalle cellule infette ed esercita numerosi effetti disregolatori, inclusa l'attivazione e il richiamo di linfociti CD4, alimentando così la replicazione e diffusione del virus. A questo riguardo va sottolineato che la cART non ha effetto sull'espressione di geni virali, incluso Tat, che è misurabile anche dopo anni di cART. Inoltre, Tat, prodotto da provirus integrato o non integrato può indurre replicazione virale da entrambi. Tat costituisce pertanto un bersaglio critico per ridurre la replicazione virale residua ed attaccare il serbatoio virale. I risultati ottenuti con l'intensificazione della cART con il vaccino Tat in trial clinici terapeutici di fase I e II corroborano questa ipotesi. In particolare, l'intensificazione della cART con il vaccino Tat ha promosso un significativo e durevole recupero dei linfociti T, e un incremento della percentuale dei linfociti T della memoria centrale (T<sub>cm</sub>) CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, accompagnata da diminuzione delle cellule della memoria effettrice (T<sub>em</sub>, CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>), dati che nell'insieme depongono per una riduzione dell'immunodisregolazione ed un ritorno verso l'omeostasi. Infine, da notare la lenta e progressiva riduzione del DNA provirale nel sangue, che ha raggiunto la significatività dopo 2 anni e con una stima di decadimento dopo 3 anni dalla vaccinazione del 70%. Questa riduzione è significativamente associata alla presenza di anticorpi anti-Tat.

Sulla scorta di queste evidenze epidemiologiche e sperimentali ci proponiamo di investigare retrospettivamente una serie di parametri immunologici, infiammatori e virologici in una corte di soggetti (n=121) in trattamento efficace che hanno partecipato ad uno studio osservazionale prospettico (ISS OBS T-002, ClinicalTrials.gov NCT0102455) condotto in 8 centri clinici in Italia, monitorato e validato da una CRO in accordo con le regolamentazioni GCP e GLP. I soggetti arruolati fra il 2008 e 2011 sono stati seguiti in media per 2 anni con periodicità trimestrale. Dei 121 partecipanti, 33 (27,3%) avevano anticorpi anti-Tat all'arruolamento.

Con il presente progetto intendiamo delucidare in soggetti HIV<sup>+</sup> virologicamente soppressi il contributo degli anticorpi anti-Tat naturalmente presenti alla durability terapeutica, in termini di recupero immunologico, riduzione dell'infiammazione, e riduzione del reservoir virale.

A questo scopo, ci proponiamo di:

Valutare retrospettivamente biomarcatori solubili di immunoattivazione e infiammazione nei soggetti partecipanti all'ISS OBS T-002 e identificare quelli significativamente diversi in soggetti con o senza anticorpi anti-Tat.