

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

Il progetto, coordinato dal Reparto di “Farmacologia e Terapia delle malattie da virus” del Dipartimento del Farmaco, prevede lo sviluppo di un vaccino basato su un nuovo e sicuro sistema di veicolazione dell’antigene di HIV. Nell’ambito dello studio dei vaccini preventivi è importante sviluppare nuove strategie in grado di indurre una risposta immunologica forte e persistente nel tempo. E’ stato ampiamente dimostrato che i vettori lentivirali sono ottimi candidati vaccinali in quanto sono in grado di esprimere in maniera efficiente l’antigene di interesse, generando una forte risposta immunitaria antigene-specifica in seguito a immunizzazione. La limitazione dell’uso di questo vettore nell’uomo è legata alla capacità di integrazione nel genoma dell’ospite e quindi al rischio di mutazioni. Per ovviare a questa limitazione abbiamo generato un vettore lentivirale incapace di integrarsi nel genoma, pur mantenendo la capacità di esprimere efficientemente l’antigene di interesse. Tale vettore lentivirale integrasi-difettivo (IDLV) esprime antigeni di HIV è in grado di stimolare una forte risposta immunologica antigene-specifica in diversi modelli preclinici. Inoltre cellule dendritiche umane trasdotte con IDLV sono molto efficienti nell’espandere linfociti T antigene-specifici in esperimenti in vitro, dimostrando una potenzialità di sviluppo e di utilizzo nell’uomo.

Nell’ambito di questo progetto, nel 2012 è stata migliorata la capacità di trasduzione di IDLV nel contesto delle cellule dendritiche umane, inserendo nel vettore la proteina Vpx di SIV. Tale proteina aumenta significativamente la capacità di trasduzione da parte dei lentivirus e dei vettori lentivirali bloccando un fattore di restrizione (SAMHD1) presente nelle cellule mieloidi umane. I dati sperimentali pubblicati dimostrano che gli IDLV potenziati (IDLV/Vpx) sono in grado di trasdurre in maniera significativamente più efficiente le cellule dendritiche umane per renderle in grado di presentare l’antigene ai linfociti CD8+ e di permettere una migliore espansione di cellule T CD8+ antigene specifici.

Mucosal vaccine against HIV-1: development of a novel mucosal route of immunization

Il progetto, coordinato dal Reparto di “Immunità Anti-infettiva” del Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate, prevede lo studio di nuove vie di immunizzazione

in grado di indurre una efficace risposta immunologica a livello delle mucose. La trasmissione di HIV avviene prevalentemente per via mucosale, quindi un vaccino preventivo efficace dovrebbe indurre una forte e persistente risposta immunologica HIV-specifica a questo livello. E' stato dimostrato che i vaccini somministrati per via mucosale sono molto efficienti nell'indurre questo tipo di risposta rispetto ai vaccini somministrati per altre vie. Lo scopo del progetto è di valutare la capacità di differenti strategie vaccinali nell'indurre risposte cellulari e anticorpali HIV-specifiche sia a livello sistemico, che mucosale. In particolare, in modelli preclinici murini vengono valutati diversi sistemi di veicolazione dell'antigene, diverse vie di immunizzazione e combinazioni di prime-boost per ottimizzare la risposta immunologica nei diversi distretti dell'organismo. A tale scopo è stato scelto come antigene la proteina Envelope di HIV somministrata sia sotto forma di proteina insieme a un adiuvante mucosale, sia veicolata da VLP o da vettori lenti virali integrasi-difettivi (IDLV). Tali vaccini vengono somministrati attraverso vie mucosali, quali la via intranasale e sublinguale o per via sistemica intramuscolare. In seguito a immunizzazione la presenza di linfociti T antigene-specifici e di anticorpi anti-Envelope viene analizzata in termini di frequenza, qualità e persistenza sia nel sangue periferico, sia a livello delle mucose e dei linfonodi.

I risultati ottenuti nel 2012 hanno dimostrato che IDLV, somministrato una sola volta per via intramuscolare, è molto efficiente nell'indurre una persistente risposta cellulare CD8 antigene-specifica sia a livello sistemico che a livello mucosale (lamina propria dell'intestino) fino a 6 mesi dalla singola immunizzazione. In particolare, linfociti T CD8+ specifici per l'antigene sono stati misurati nella milza, nel sangue periferico, nei linfonodi drenanti la vaccinazione, nei linfonodi distali e nella lamina propria del colon. Tali linfociti sono polifunzionali, in grado cioè di produrre contemporaneamente più citochine, quali IFN γ e TNF α .

ReFlu viruses: a platform for genital delivery of HIV-1 antigens

Il progetto in svolgimento presso il Reparto di "Immunità Anti-infettiva" del Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate riguarda un'analisi preclinica in modello murino dell'induzione di una immunità specifica verso antigeni HIV-1 in seguito ad

infezione con virus influenzali ricombinanti esprimenti la proteina Tat o poliepitopi derivati da proteine di HIV-1. L'attività e i risultati ottenuti nel 2012 sono di seguito riportati: i) si è inizialmente valutata l'immunogenicità del virus influenzale ricombinante WSN/CKG/Eldkwa contenente il principale determinante antigenico neutralizzante della proteina gp41 fuso nel poliepitopo CKG, precedentemente generato e caratterizzato quale immunogeno in grado di evocare un'immunità umorale e cellulare specifica per HIV-1. Oltre a rivelarsi geneticamente stabile dopo numerosi passaggi seriali in coltura, il virus ricombinante WSN/CKG/Eldkwa è in grado di indurre una efficace risposta immune specifica per gli antigeni HIV-1 nei topi infettati sia per via intranasale che vaginale, come precedentemente rilevato con il virus ricombinante WSN/CKG. ii) L'impiego di virus intero inattivato al calore mostra una significativa capacità di induzione della risposta dei linfociti T CD8+ specifici per gli epitopi immunodominanti della nucleoproteina virale e ancor più nei riguardi dell'epitopo HIV-1 contenuto in CKG, sebbene tali risposte siano ridotte rispetto a quelle indotte dal virus infettivo. Inoltre la risposta anticorpale appare polarizzata verso le proteine di superficie del virus influenzale e i livelli residui di anticorpi verso gli antigeni HIV-1 sono minimi o non rilevabili, indicando una riduzione generalizzata della immunogenicità del virus inattivato rispetto al virus infettivo. Questa ridotta immunogenicità del virus influenzale ricombinante inattivato risulta nel complesso non sufficiente a garantire una completa protezione dei topi da successiva infezione con virus vaccिनico ricombinante vPE16. iii) Ulteriori studi sono stati condotti per valutare la risposta immune indotta dal virus influenzale ricombinante WSN/Tat esprimente la proteina Tat. Il virus replica a buon titolo nelle cellule *in vitro* ma molto poco *in vivo* e la sua connaturata attenuazione della virulenza non sembra influire sulle capacità immunogeniche. In particolare i dati ottenuti indicano l'induzione di un buon livello di risposta anticorpale specifica per Tat dopo singola immunizzazione di topi BALB/c che aumenta notevolmente in seguito ad una seconda immunizzazione. L'analisi della risposta cellulo-mediata specifica in particolare verso l'epitopo VCF della proteina Tat, riconosciuto da linfociti CD4 e CD8, rileva una positività *ex vivo* in cellule di organi linfoidei tramite IFN-g ELISPOT che aumenta in seguito a stimolazione antigene-specifica *in vitro*.

Nel complesso i dati prodotti indicano una tollerabilità della emagglutinina virale ad accomodare inserti antigenici estranei di una certa entità pur mantenendo la sua funzionalità e le proprietà immunogeniche.

Immunomodulatory effects of HIV-1 in antigen presenting cells and their role in the pathogenesis of AIDS.

Le cellule dendritiche e i macrofagi rappresentano i primi bersagli cellulari dell'infezione da HIV-1 *in vivo* e sono attivamente coinvolte nel trasporto di virioni infettanti dalla periferia agli organi linfoidi secondari, rappresentando quindi una strategia usata dal virus per assicurare la sua sopravvivenza e diffusione nell'organismo. Queste cellule svolgono un ruolo molto importante nella patogenesi dell'infezione da HIV-1 poiché alterazioni delle loro attività funzionali indotte dall'infezione o esposizione a prodotti genici virali, interferiscono con lo sviluppo di una risposta immunitaria appropriata, rappresentando pertanto uno dei meccanismi adottati dall'HIV per evadere la sorveglianza immunitaria. Nonostante sia ben noto che le alterazioni funzionali di queste cellule svolgono un ruolo importante nella patogenesi dell'AIDS, i meccanismi coinvolti sono ancora largamente inesplorati. Gli studi condotti nel corso del 2012 nel Reparto di "Immunoregolazione" del Dipartimento di Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare, hanno consentito di caratterizzare gli effetti immunomodulatori della glicoproteina virale di superficie gp120, in assenza di infezione produttiva in DC, e di identificare alcuni meccanismi molecolari e fattori responsabili delle alterazioni funzionali osservate in queste cellule e della loro capacità di interagire con linfociti T $\gamma\delta$, un'altra componente importante nella patogenesi virale. I risultati ottenuti dimostrano come l'interazione della gp120 con recettori di superficie determini in DC l'attivazione del pathways MAPK/NFKB e del fattore trascrizionale STAT3, entrambi coinvolti nella induzione di IL-6.

In collaborazione con l'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù di Roma, abbiamo inoltre caratterizzato il profilo di espressione di microRNA, noti regolatori dell'espressione genica, in risposta alla gp120 in DC. L'analisi bioinformatica dei geni bersaglio dei miR deregolati da gp120 in DC, ha evidenziato come possibili target, proteine potenzialmente coinvolte nella regolazione della risposta immune ad HIV-1. I risultati di questa analisi dimostrano

che questa glicoproteina altera in DC l'espressione di miR precedentemente associati alla regolazione della risposta immunitaria, che rappresentano quindi ulteriori bersagli virali per sovvertire la risposta immunitaria appropriata.

Role of CCL2 in the regulation of host factors involved in HIV resistance and evaluation of the potential of CCL2 blocking for the therapy of AIDS

La terapia antiretrovirale (ART) attualmente disponibile per i pazienti con AIDS ha rappresentato un grosso passo avanti nella ricerca nel campo dell'HIV, ma presenta diversi limiti, quali l'elevato costo, la necessità di proseguire la terapia per tutta la durata della vita del paziente, gli effetti collaterali avversi e la comparsa di virus resistenti. Pertanto, l'identificazione e lo sviluppo di interventi terapeutici alternativi rappresentano un punto cruciale della ricerca in questo campo. Con il progetto, coordinato dal Reparto di "Immunoregolazione" del Dipartimento di Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare, si intende studiare i meccanismi molecolari alla base dell'inibizione della replicazione di HIV-1 in seguito al blocco della chemochina CCL2 nel macrofago. In particolare, lo scopo del progetto è di definire il ruolo della CCL2 nella regolazione di fattori dell'ospite rilevanti per la restrizione della replicazione di HIV-1. Infatti, le risposte antivirali intracellulari rappresentano la prima linea di difesa nella prevenzione delle infezioni da retrovirus. In particolare, membri delle famiglie APOBEC3 (apolipoprotein B mRNA-editing, enzyme-catalytic, polypeptide-like 3, A3) e il SAMHD1 (SAM domain and HD domain-containing protein 1) svolgono un ruolo importante nella restrizione della replicazione di HIV-1 nelle cellule bersaglio. Inoltre, questi studi mirano a valutare il potenziale terapeutico di un approccio basato sul blocco della CCL2 mediante il bindarit, un farmaco sviluppato dall'Angelini che inibisce la sintesi della CCL2. Nel corso del 2012 gli studi relativi al progetto hanno riguardato il ruolo della CCL2 nella regolazione di membri della famiglia APOBEC3, in modo principale APOBEC3A, e SAMHD1, e il contributo di questi fattori nell'inibizione della replicazione di HIV-1 mediata dal blocco della CCL2 endogenamente prodotta dal macrofago. Inoltre, si è valutato l'effetto del bindarit sulla replicazione di HIV-1 e sull'espressione della CCL2 in macrofagi.

Study on SHIVSF162P4 pathogenicity in Cynomolgus monkeys and molecular analysis of species-specific virus variants

I nostri studi hanno dimostrato che lo SHIVSF162P4cy è patogenico in scimmie *macaca fascicularis*, e l'evento clinico sembra essere correlato con la quantità dell'inoculo virale e con determinanti individuali dell'ospite. Inoltre si è evidenziato come i fattori dell'ospite, ad esempio l'aplotipo MHC, possano contribuire a cambiamenti molecolari del genoma virale e alla progressione della malattia. A tale scopo è stato determinato il genotipo MHC di scimmie infettate da SHIVSF162P4 ed effettuata un'analisi statistica utilizzando i valori di plasmaviremia, DNA provirale, cellule T CD4+ in congiunzione con l'aplotipo MHC. L'analisi ha indicato che possedere l'aplotipo M2 della classe II, ha un effetto svantaggioso sul corso dell'infezione, evidenziato dai bassi livelli di cellule T CD4+ per tutte le 46 settimane di follow up. Inoltre, si è mostrato che l'aplotipo M2 (classi IA e IB) correla con la presenza di un alto numero di copie provirali durante la fase cronica dell'infezione, anch'esso segnale negativo e svantaggioso nel corso di infezione. Diversamente, i ricombinanti nella classe IA correlavano con una significativa riduzione dei livelli di RNA e DNA durante la fase acuta d'infezione, quindi con un effetto protettivo. Una associazione statisticamente significativa era presente tra l'aplotipo M4 (classi IA e IB) e bassi livelli di cellule CD4+ T durante il corso dell'infezione acuta e cronica. Inoltre, le classi IA e II aplotipo M4 erano associate con basso numero di copie provirali durante la fase acuta di infezione. Questo è il primo report che documenta gli effetti dell'MHC dell'ospite sull'infezione del virus SHIVSF162P4cy in *macaca fascicularis*. I nostri dati forniscono chiare informazioni sull'importanza dei fattori dell'ospite per la progressione della malattia nelle scimmie.

Clinica e terapia

Nel campo della ricerca clinica e della terapia della malattia da HIV i principali progetti portati avanti anche nell'anno 2012 sono elencati nelle pagine successive:

Studi sulla prevenzione della trasmissione materno-infantile nei paesi con risorse limitate

Nel corso del 2012 sono proseguiti gli studi volti ad ottimizzare le strategie di prevenzione della trasmissione materno-infantile nei paesi con risorse limitate.

Nei paesi industrializzati la profilassi con farmaci antiretrovirali durante la gravidanza, l'utilizzo del taglio cesareo e l'abolizione dell'allattamento materno hanno ridotto i tassi di trasmissione al di sotto del 2%. Diversa è invece la situazione nei paesi con risorse limitate dove devono essere messe a punto strategie di profilassi semplificate e che tengano in considerazione la necessità dell'allattamento materno in relazione ai tassi di morbidità e mortalità associati all'allattamento artificiale in quei paesi.

Gli studi in ISS, che inizialmente sono stati rivolti a definire regimi antiretrovirali brevi, sostenibili nei contesti dei paesi con risorse limitate, si sono recentemente indirizzati a mettere a punto strategie che possano consentire l'allattamento al seno, ma che non siano associate al rischio di trasmissione del virus. In particolare si è lavorato sull'ipotesi che la somministrazione di una profilassi antiretrovirale alle donne durante la gravidanza e durante l'allattamento possa rappresentare una strategia efficace. È stato disegnato uno studio clinico su larga scala per determinare se una combinazione di 3 farmaci antiretrovirali somministrata dal secondo trimestre di gravidanza e per 6 mesi dopo il parto è in grado di ridurre significativamente la trasmissione associata all'allattamento e se la strategia è sicura e ben tollerata sia dalla madre sia dai bambini. Lo studio, in collaborazione con il progetto DREAM (Drug Resource Enhancement against AIDS and Malnutrition) della Comunità di S. Egidio, è stato effettuato in due ospedali del Malawi: uno in area urbana (a Blantyre) e uno in area rurale (nelle vicinanze di Lilongwe). Tra il 2008 e il 2009 sono state arruolate 300 donne in gravidanza. Successivamente le donne e i loro bambini sono stati seguiti con visite mensili per la valutazione clinica, inoltre sono stati raccolti campioni biologici a diversi momenti del follow-up per la valutazione di parametri di sicurezza e di farmacocinetica della terapia antiretrovirale. Il follow-up è terminato nell'agosto del 2011 quando tutte le donne e i bambini hanno raggiunto 24 mesi di follow-up dopo il parto.

Nel 2011 è iniziata quindi l'analisi dei dati raccolti che ha mostrato come con questa strategia si siano verificati pochissimi casi di trasmissione verticale (8 su 300 donne arruolate) supportandone l'ipotesi della validità. Inoltre, nelle donne e nei bambini dello

studio non si sono riscontrati significativi problemi di tossicità. Nel corso del 2012 sono stati effettuati inoltre una serie di studi volti a valutare le concentrazioni dei farmaci antiretrovirali nelle donne e nei bambini della coorte, a determinare l'insorgenza di resistenze agli antiretrovirali nelle donne trattate e in quelle che interrompono il trattamento e a valutare il possibile impatto della coinfezione da epatite B.

I risultati di questo studi potranno fornire informazioni rilevanti per definire le strategie preventive per la trasmissione verticale nei paesi con risorse limitate.

Studio di coorte NIA (Nuovi Inibitori Anti-HIV)

Nel corso degli ultimi anni si è consolidato nella pratica clinica l'uso di alcuni nuovi farmaci anti-HIV che si basano su meccanismi alternativi di inibizione della replicazione dell'HIV (inibitori dell'integrasi, antagonisti del co-recettore CCR5). Questi nuovi farmaci appaiono particolarmente promettenti sia come regimi di salvataggio terapeutico destinati a pazienti nei quali le comuni terapie hanno perso efficacia terapeutica, sia come componenti di regimi di prima linea in pazienti che devono iniziare il trattamento anti-HIV. Peraltro, le informazioni disponibili sulla efficacia e sulla tossicità a lungo termine di questi nuovi farmaci nella reale pratica clinica, al di fuori del contesto degli studi clinici, sono tuttora limitate. Per valutare questi aspetti in un contesto di pratica clinica è in corso di completamento uno specifico studio di coorte, coordinato dall'ISS, su circa venti centri clinici nazionali della durata minima prevista di 3 anni. Lo studio ha come obiettivi la valutazione della risposta immunologica, clinica e virologica ai nuovi regimi di trattamento antiretrovirale, l'identificazione dei motivi di interruzione della terapia e delle caratteristiche di tossicità e la potenziale identificazione delle migliori modalità di utilizzo e di associazione di questi farmaci. I dati raccolti, basati su oltre 300 pazienti, la maggior parte dei quali ha ormai raggiunto i 36 mesi di follow up, hanno permesso le prime valutazioni preliminari, valutazioni che indicano una buona tollerabilità e una favorevole risposta al trattamento in pazienti che hanno limitate possibilità terapeutiche con i farmaci precedentemente disponibili, suggerendo che l'introduzione di questi nuovi farmaci sia in grado, attraverso l'ampliamento delle possibilità terapeutiche, di migliorare ulteriormente la prognosi a lungo termine nei pazienti con HIV. Si è inoltre evidenziato che anche nella pratica clinica, al di

fuori del contesto sperimentale degli studi clinici, questi farmaci sono in grado di inibire in maniera efficace la replicazione dell'HIV anche in pazienti con una lunghissima storia di precedenti terapie ed in gruppi di pazienti particolari, come quelli con coinfezione da virus dell'epatite B o C. Complessivamente, i dati raccolti, alcuni dei quali già pubblicati, indicano che i presupposti migliori di efficacia si hanno combinando questi farmaci appartenenti a nuove classi terapeutiche con altri farmaci di nuova generazione delle classi già precedentemente utilizzate, per i quali il rischio di insorgenza di farmacoresistenza è minore. Studi pubblicati nell'ultimo anno hanno inoltre identificato aspetti virologici e di risposta terapeutica di rilevanza ai fini di un utilizzo ottimale di questi nuovi farmaci.

Studio dell'impatto della terapia antiretrovirale a livello della mucosa intestinale

Studi recenti hanno evidenziato che l'infezione da HIV è caratterizzata da una massiva deplezione di linfociti CD4 a livello della mucosa intestinale. È stato dimostrato che nelle fasi acute dell'infezione più dell'80% delle cellule CD4 della mucosa intestinale, deputate alla difesa immunitaria, vengono infettate ed eliminate dal virus. Nel corso della malattia, la continua replicazione del virus a livello intestinale danneggia l'epitelio, causando il rilascio di prodotti microbici (come i lipopolisaccaridi), che, entrando nel circolo sanguigno (traslocazione batterica) causano immunoattivazione a livello sistemico. È stato recentemente ipotizzato che l'immunoattivazione cronica generalizzata, dovuta alla disregolazione della mucosa intestinale, possa essere responsabile della progressione della malattia nei pazienti infetti da HIV. Al momento nessuno studio longitudinale ha valutato l'impatto della terapia antiretrovirale sulla replicazione del virus HIV e sulla immunoricostruzione nel distretto gastroenterico; è stato pertanto intrapreso uno studio clinico longitudinale volto a valutare, nei pazienti naive che entrano in trattamento, la capacità della terapia antiretrovirale di controllare, a livello della mucosa intestinale, la replicazione di HIV e a determinare il suo effetto sul recupero funzionale e numerico dei linfociti T CD4.

Dal 2010 ad oggi sono stati arruolati 10 pazienti naive che incontravano i criteri per iniziare la terapia antiretrovirale. Al basale e dopo 6 mesi dall'inizio della terapia sono stati valutati

parametri di immunoattivazione e risposte ad antigeni batterici sia da cellule linfocitarie derivanti dal sangue periferico che da biopsie della mucosa intestinale.

I dati fino ad ora raccolti suggeriscono che sei mesi di intervento terapeutico con antiretrovirali in pazienti naïve per la terapia antiretrovirale: i) sono in grado di aumentare in maniera statisticamente significativa la percentuale dei linfociti CD4 nell'intestino; ii) inducono un aumento della percentuale dei linfociti CD4 Th17 mucosali in grado di rispondere ad antigeni specifici; iii) a fronte di una diminuzione dei marcatori cellulari di attivazione nei linfociti del sangue periferico e delle citochine plasmatiche Th2 determinano una riduzione della quantità di antigene lipopolisaccaride nel plasma che correla positivamente con l'aumento delle cellule CD4 nella mucosa intestinale.

I nostri dati indicano che il recupero indotto dalla terapia antiretrovirale nella mucosa intestinale di cellule fondamentali per il fisiologico funzionamento del sistema immunitario ha un riflesso diretto sull'attivazione delle cellule immunitarie del periferico, sottolineando l'importanza di questo distretto nella patogenesi della infezione da HIV.

Sono in corso studi virologici che forniranno informazioni sulla efficacia della terapia antivirale nel ridurre la replicazione del virus a livello della mucosa intestinale.

Il completamento di questo studio fornirà nuove informazioni sulla patogenesi dell'infezione da HIV che potranno essere utili nel disegnare nuove strategie terapeutiche.

Studi su nuove attività degli inibitori dell'integrasi di HIV

Gli inibitori dell'integrasi dell'HIV sono una delle classi di antiretrovirali di più recente introduzione. Per il loro meccanismo d'azione, basato sul blocco dell'integrazione di nuove particelle virali nel genoma dell'ospite, questi farmaci hanno caratteristiche diverse da quelle di altri antiretrovirali. Il capostipite di questa classe, raltegravir, è stato registrato per la somministrazione nelle persone sieropositive nel 2007.

E' stato ipotizzato che raltegravir possa esercitare effetti sul sistema immunitario indipendenti dalla sua attività antivirale. Le basi razionali di questa ipotesi sono varie: 1) in topi geneticamente predisposti, il raltegravir accelera lo sviluppo di malattie autoimmuni; 2) raltegravir può interferire con la replicazione di altri retrovirus, diversi da HIV e coinvolti nella patogenesi di malattie immunomediate; 3) esistono delle similitudini tra l'integrasi e le

recombinasi, enzimi chiave nel meccanismo della sintesi degli anticorpi; infine 4) raltegravir sembra avere un'attività anche nei confronti del virus di Epstein Barr (l'agente eziologico della mononucleosi infettiva), che potrebbe essere una delle concause della sclerosi multipla. Tutto questo apre interessanti prospettive per potenziali nuovi impieghi terapeutici del raltegravir, ma anche dubbi su potenziali effetti indesiderati di questo farmaco a carico del sistema immunitario. Per approfondire se ciò possa verificarsi in vivo, nel corso del 2011-2012 sono stati studiati più di 100 pazienti con HIV , trattati con raltegravir per oltre 2 anni, nei quali è stata valutata sia la comparsa di eventuali segni clinici di disregolazione del sistema immunitario che la presenza nel sangue di autoanticorpi e altri marcatori di autoimmunità. Questo studio è stato realizzato in collaborazione con il Dipartimento di Medicina Clinica dell'Università La Sapienza di Roma, ed ha dimostrato la "safety" del raltegravir in questi pazienti, in quanto non sono stati osservati effetti significativi del farmaco né a livello clinico, né subclinico. Tali risultati sono importanti perché supportano la sicurezza e la fattibilità di ulteriori studi clinici con questo inibitore dell'integrasi di HIV.

Infezioni opportunistiche

Neoplasie causate da Papillomavirus in individui HIV positivi: sviluppo di un vaccino terapeutico per la cura delle lesioni precancerose e cancerose causate da HPV16 basato su particelle lentivirali che incorporano gli antigeni tumorali E6 ed E7

I Papillomavirus umani sono virus associati allo sviluppo di tumori ano-genitali; hanno in comune con il virus HIV i fattori di rischio di trasmissione dell'infezione e, come l'HIV, sono trasmessi tramite rapporti sessuali. L'incidenza delle infezioni da HPV e dei tumori ad essi correlati è più alta nelle persone sieropositive per HIV rispetto alla popolazione generale. Donne HIV-positive presentano con maggior frequenza lesioni della cervice uterina dovute ad un Papillomavirus. Tali lesioni progrediscono più rapidamente a carcinoma della cervice e sono resistenti ai trattamenti convenzionali. Per questi motivi il carcinoma invasivo della cervice è stata incluso tra le patologie che definiscono l'AIDS. Lo sviluppo di vaccini terapeutici per l'infezione da HPV rimane di grande interesse soprattutto per un loro possibile impiego nei soggetti sieropositivi. I vaccini in genere sono farmaci specifici, ben tollerati e hanno effetti a lungo termine. L'uso in combinazione di vaccini HPV profilattici e

terapeutici, consentirebbe nelle persone HIV-positive un controllo più efficiente, sia delle infezioni da HPV che delle lesioni pre-cancerose e cancerose.

Le proteine E6 e E7 di HPV16 sono antigeni tumorali (TSA) e antigeni per il rigetto del tumore, target ideali per un vaccino HPV terapeutico. Il finanziamento ricevuto ha consentito lo sviluppo di un vaccino anti-HPV basato su particelle lentivirali (VLPs), prive di genoma, contenenti elevate quantità di E6 e E7 fuse ad un mutante della proteina Nef di HIV-1 (NEF7C3G). Tale vaccino è efficace nel proteggere dallo sviluppo del tumore HPV-dipendente in topi C57BL6 preventivamente vaccinati (Di Bonito et al 2011). Durante la sperimentazione di tale vaccino che prevedeva la preparazione di elevate quantità di VLPs mediante centrifugazione frazionata di lisati cellulari abbiamo scoperto che il mutante NEF7C3G era anche presente in una frazione di vescicole cellulari meglio identificate come esosomi. Abbiamo quindi studiato questo aspetto e scoperto che anche i prodotti di fusione NEF-E7 e NEF-E6 erano localizzati in tali vescicole cellulari. Poiché NEF7C3G poteva funzionare come carrier esosomiale lo sviluppo del vaccino terapeutico HPV ha cambiato direzione e invece di utilizzare le particelle lentivirali come carrier di E6 ed E7 abbiamo pensato di utilizzare le vescicole esosomiali. Tali vescicole di 40-100 nanometri si generano dalle membrane endosomiali di tutte le cellule. Vengono rilasciati nell'ambiente extracellulare e fanno parte della rete di comunicazione intercellulare. Il vantaggio nell'uso degli esosomi nella terapia tumorale risiede nella possibilità di produrre esosomi da cellule dei pazienti in cura con tumore. Gli esosomi una volta armati con antigeni tumorali o chemioterapici possono essere reinfusi nel paziente.

Una serie di studi preliminari sono stati necessari per ottimizzare la produzione di esosomi ricombinanti contenenti NEF-E7 e NEF-E6. Dopo aver prodotto e caratterizzato quantità ottimali di esosomi NEF-E7 e NEF-E6, sono stati effettuati esperimenti di immunogenicità in topi C57BL6. I risultati dimostrano che gli esosomi NEF-E7 e NEF-E6 sono in grado di elicitarne una potente risposta immunitaria di tipo T, simile a quella generata dalle VLP NEF-E7 e NEF-E6 precedentemente prodotte e usate come confronto. Gli esperimenti che prevedono la somministrazione del tumore HPV sono ancora in corso, tuttavia risultati preliminari indicano che anche gli esosomi NEF-E7 e NEF-E6 sono in grado di generare una immunità protettiva nei confronti del tumore HPV, nel modello murino di HPV-16.

Evaluation of the anti-angiogenic and anti-tumor activity of HIV protease inhibitors in 2 proof-of-concept clinical trials conducted in patients affected by classical Kaposi's sarcoma or cervical intraepithelial neoplasia

Gli studi preclinici e clinici effettuati presso il Centro Nazionale AIDS indicano che gli inibitori della proteasi di HIV-1 (HIV-PI) esercitano azioni anti-angiogeniche e anti-tumorali a causa della loro capacità di inibire l'invasione delle cellule endoteliali e tumorali, fornendo quindi una spiegazione alla ridotta incidenza, regressione, e/o aumentato tempo di progressione dei tumori associati all'AIDS, in particolare il sarcoma di Kaposi (KS), linfomi non-Hodgkin e neoplasie intraepiteliali della cervice uterina (CIN), osservati dopo l'introduzione delle moderne terapie antiretrovirali combinate (HAART). Queste azioni anti-angiogeniche e anti-tumorali sono mediate da un blocco dell'attivazione proteolitica di MMP-2, una metalloproteasi della matrice che svolge un ruolo chiave nell'angiogenesi, nell'invasione tumorale e nella metastatizzazione.

Obiettivo del progetto è quello di determinare i meccanismi dell'attività antitumorale dei farmaci inibitori della Proteasi di HIV (HIV-PI) mediante lo studio della modulazione di marcatori dell'angiogenesi, della progressione tumorale, o della risposta immune verso il tumore o verso infezioni virali in campioni di plasma o tessuti tumorali di pazienti HIV negativi affetti da KS classico o CIN trattati con HIV-PI, arruolati in 2 studi clinici "proof-of-concept", sponsorizzati dall'ISS. In particolare, sono valutati la modulazione dei livelli plasmatici/tessutali di MMP, fattori angiogenici, cellule endoteliali circolanti (CEC), e marcatori di immunoattivazione, apoptosi, proliferazione/ciclo cellulare e attività proteosomale. Inoltre, nell'ambito dello studio clinico su pazienti affetti da KS, sono valutate in modo specifico la viremia, la risposta immune umorale e l'attività NK per HHV8, mentre per lo studio sul CIN, la carica virale per HPV.

Per quanto riguarda lo studio clinico sul KS, nel corso del 2012 si è concluso l'arruolamento dei 25 pazienti previsto dal protocollo presso l'Unità di Dermatologia, Ospedale Maggiore, Milano.

Per studiare il meccanismo dell'attività antitumorale degli HIV-PI nei pazienti con KS classico, si stanno analizzando campioni di plasma e di lesioni KS raccolti al baseline,

durante il trattamento ed il follow-up post-terapia. Le analisi da condurre su campioni di sangue (PBMC) non congelati (CEC, numero di cellule T CD4⁺ e CD8⁺, attività NK) sono già in corso. Le rimanenti valutazioni vengono eseguite su campioni congelati e pertanto verranno studiate alla conclusione dello studio (prevista per il giugno 2015), in modo da garantire omogeneità di analisi e valutazione.

Riguardo al trial CIN, in attesa di reperire fondi sufficienti alla sua conduzione, è proseguita la preparazione della documentazione clinica necessaria all'approvazione da parte delle autorità regolatorie competenti. In particolare, sulla base degli studi epidemiologici di background effettuati nel territorio dove verrà condotta la sperimentazione, è in corso la definizione del disegno dello studio, la dimensione campionaria, gli obiettivi primari e secondari, e gli endpoint biologici dello studio. Lo studio si configura come una fase II condotta in donne HIV-negative affette da CIN1 ad alto rischio di progressione (positive per high-risk HPV e con over-espressione di p16^{INK4a}). Lo studio inoltre sarà multicentrico, randomizzato, in aperto, e sarà diretto a valutare l'efficacia degli HIV-PI indinavir o saquinavir con boosting di ritonavir nel promuovere la regressione delle lesioni CIN.

Nel corso dello studio, al fine di studiare il meccanismo d'azione degli HIV-PI nelle pazienti CIN, campioni istologici/citologici raccolti prima e dopo trattamento verranno studiati per la presenza e genotipo di HPV, la sua clearance o la sua persistenza. Verranno inoltre studiati l'espressione di p16^{INK4a}, di marcatori di proliferazione tumorale e angiogenesi, inclusi i livelli e l'attività di MMPs.

In entrambi i trial, la modulazione dei marcatori biologici verrà correlata ai livelli di farmaco misurati nel plasma dei pazienti trattati.

Studio su anticorpi in formato a singola catena per la prevenzione e il trattamento delle lesioni associate a HPV negli individui HIV-positivi

Le infezioni da Papillomavirus umani (HPV), e in particolare i tumori ad esse associati, sono molto frequenti nei pazienti con AIDS, e non sembrano diminuire con i trattamenti convenzionali (HAART). Inoltre questi pazienti, per le loro caratteristiche di immunodepressione, non possono trarre pieno vantaggio dal vaccino per l'HPV attualmente in commercio. I benefici di questa vaccinazione saranno comunque effettivi

nella popolazione solo tra alcuni decenni. Gli anticorpi ricombinanti, in particolare nel formato a singola catena (scFv), sono un valido strumento per contrastare l'attività delle loro proteine "bersaglio", sia nel caso di patologie virali che tumorali. Alcuni anticorpi scFv selezionati contro le proteine di papillomavirus umano di tipo 16 vengono studiati sia *in vitro*, per le loro capacità di neutralizzare le particelle virali o di inibire la proliferazione cellulare, sia *in vivo* in modelli preclinici, per il loro effetto antitumorale. Il fine ultimo è quello di valutare il possibile uso di questi anticorpi nella prevenzione e nel trattamento delle lesioni associate a HPV, in particolare nei pazienti sieropositivi per HIV, somministrandoli come molecole purificate o come anticorpi intracellulari (*intrabodies*). Nel corso del 2012, il gruppo HPV del dipartimento di Malattie Infettive, in collaborazione con l'Istituto dei tumori Regina Elena, ha condotto esperimenti per la validazione *in vivo* di un anticorpo scFv selezionato tramite tecnologia *Phage Display* contro l'oncoproteina E7 del genotipo ad alto rischio tumorale HPV16, di cui era stata precedentemente saggiata la capacità anti-proliferativa *in vitro*, utilizzando un modello murino per tumori da HPV. L'anticorpo è stato espresso intra-cellularmente come *intrabody* in cellule tumorali (TC-1 e C3) che, se iniettate in topi C57/BL6 senza essere trattate, causano l'insorgenza di tumori sottocutanei. L'inoculo di tali cellule infettate con retrovirus esprimenti l'*intrabody* anti-E7 a localizzazione nel reticolo endoplasmatico ha invece fatto revertire la loro tumorigenicità, al punto che la maggior parte dei topi non ha sviluppato tumore o lo ha sviluppato con un ritardo di 2 settimane rispetto ai controlli. I risultati ottenuti sono promettenti per un possibile uso clinico di questo o altri anticorpi contro le proteine oncogene di HPV.

3.1.2. Attività di ricerca nel campo dell'HIV/AIDS finanziata da altri Programmi

Queste attività si riferiscono a progetti finanziati dall'ISS o da altre Istituzioni internazionali e nazionali nel 2011, al di fuori del Programma Nazionale AIDS, nei quali l'ISS è leader e promotore o collaboratore. Le attività di ricerca sono, di seguito, brevemente descritte.

Finanziamenti internazionali

Accordo ISS/NIH finanziato per le due controparti da ISS ed NIH nell'ambito del Programma Italia/USA

Il Centro Nazionale AIDS è promotore della cooperazione ISS/NIH per la generazione di un vaccino contro l'HIV/AIDS, volto allo sviluppo di nuovi approcci vaccinali e/o terapeutici. Questa cooperazione rappresenta anche un'importante base per accordi con le industrie, per l'applicazione a progetti europei e per collaborazioni scientifiche con prestigiosi Istituti ed Istituzioni internazionali.

Tat and Env bind to form a novel HIV entry complex that targets cells at the portal of entry: implications for HIV/AIDS pathogenesis and development of preventative and therapeutic intervention

Per caratterizzare il complesso Tat/Env, sono in corso studi, coordinati dal Reparto "Interazione Virus-Ospite e Core Lab. di Immunologia", del Centro Nazionale AIDS ed in collaborazione con l'Eppley Institute for Research in Cancer and Allied Diseases, University of Nebraska Medical Center (Omaha, NE), volti a: i) caratterizzare la struttura cristallografica del complesso Tat/Env; ii) approfondire gli effetti sul tropismo e l'infettività dell'HIV; iii) valutare l'impatto di questi cambiamenti sulle attività anticorpali antivirali (neutralizzanti e non neutralizzanti); iv) mettere a punto nuovi saggi per la valutazione di queste attività allo scopo di trasferirli in ambito clinico-diagnostico per la valutazione di nuovi vaccini e per il monitoraggio della persona infettata da HIV. Gli studi condotti nel 2012 hanno evidenziato la difficoltà a coesprimere le due proteine insieme, mentre i problemi incontrati per l'espressione delle proteine singolarmente sono stati, seppur dopo numerosi tentativi, brillantemente superati. Pertanto sono state adottate nuove strategie per l'espressione del complesso che si spera diano i risultati attesi.

Non-human Primate Model for HIV/AIDS: a platform to evaluate the humoral correlate(s) of protection and to generate therapeutic antibodies against structural and non-structural HIV-1 proteins

Il virus dell'immunodeficienza umana (HIV-1) come gli altri comuni patogeni infettivi guadagna l'accesso all'ospite attraverso le membrane mucosali, sia per trasmissione