

antiretrovirali vanno frequentemente incontro e il fallimento di tutte le strategie di eradicazione del virus sperimentate finora.

I risultati di questi studi sono stati oggetto di una pubblicazione (Cafaro et al, 2020).

### **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 specifica 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 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 con infezione da HIV in trattamento antiretrovirale (cART), 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, un "serbatoio di virus latente" che rimane invisibile al sistema immunitario ed è inattaccabile dalla terapia cART. I risultati di questo studio, attivato nel 2011 e concluso nel 2016, confermano il persistere fino a 8 anni di anticorpi specifici e dell'immuno-ricostituzione promossi dal vaccino Tat. In particolare, i livelli di linfociti T CD4+ 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+  $\leq$ 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'immunoricostituzione promossa dal vaccino Tat è inoltre associata ad una progressiva riduzione di DNA provirale di HIV a partire dal 3° anno dopo l'immunizzazione, che è continuata per tutti gli 8 anni di follow-up. Il calo de DNA provirale è avvenuto con una velocità in media 4-7 volte maggiore di quella osservata in studi analoghi in pazienti trattati solo con cART. Nei volontari vaccinati, inoltre, la riduzione del serbatoio di virus latente si è associata ad un aumento delle cellule T CD4+ e del rapporto delle cellule T CD4+/CD8+, considerati parametri importanti di ricostituzione del sistema immune. Livelli molto bassi di DNA provirale ed un elevato rapporto dei linfociti T CD4+/CD8+ sono presenti anche in rari pazienti denominati post-treatment controllers, che sono in grado di controllare spontaneamente la riattivazione della replicazione virale dopo aver sospeso la terapia.

Nel loro insieme questi dati indicano che la vaccinazione con Tat possa conferire ai pazienti la capacità di divenire "post-treatment controllers", cioè di controllare il virus senza assunzione di farmaci per periodi di tempo la cui durata dovrà essere valutata con specifici studi clinici. Pertanto, i risultati dello studio aprono la strada a studi di interruzione programmata e controllata della terapia nei volontari in trattamento con cART vaccinati con Tat, attualmente in corso di pianificazione proprio allo scopo di verificare questa ipotesi.

Sempre nell'ambito di questo programma, sono proseguite le valutazioni immuno-virologiche di uno studio osservazionale di 3 anni su 118 persone infette da HIV-1 in trattamento con cART a lungo termine volto a valutare gli effetti della risposta immunitaria anti-Tat sui determinanti virologici e immunologici della malattia (studio ISS OBS T-002). Lo studio, sponsorizzato e condotto dal

Centro Nazionale per la Ricerca su HIV/AIDS è stato attivato nel 2007 e completato nel 2012 presso 9 centri clinici italiani. Le analisi condotte nel corso di questo anno e che sono in corso di pubblicazione indicano che gli anticorpi anti-Tat sono poco frequenti (20% dei partecipanti), confermando i risultati di studi precedenti, persistono nel tempo e promuovono un aumento progressivo del numero di cellule T CD4+ e del rapporto dei linfociti T CD4+/CD8+, come riscontrato anche nei soggetti vaccinati con la proteina Tat. Allo stesso tempo abbiamo osservato che la presenza di anticorpi anti-Tat prodotti naturalmente nel corso dell'infezione è associata al controllo della viremia residua, che potrebbe riflettere un blocco della riattivazione del virus latente presente nei serbatoi virali da parte degli anticorpi anti-Tat. Al contrario, sebbene le risposte cellulari anti-Tat siano presenti ma in effetti riscontrabili nella maggior parte dei soggetti (83%) ma generalmente in maniera incostante, la loro frequenza e qualità sono associate a riduzione dei livelli di DNA provirale nel sangue. Tuttavia è stato anche evidenziato che l'immunità anti-Tat cellulo-mediata, da sola o combinata all'immunità umorale, è correlata ad un significativo aumento delle cellule NK o delle cellule B. Questi risultati confermano che le strategie vaccinali volte a indurre risposte umorali e cellulari contro Tat possono portare a immunoterapie efficaci sia per l'intensificazione della cART che per la riduzione o l'eradicazione del reservoir dell'HIV.

Nel corso del 2020 è proseguito il nuovo studio osservazionale longitudinale sponsorizzato dal Centro Nazionale per la Ricerca su HIV/AIDS in collaborazione con l'IFO-S. Galliciano, volto a identificare gli effetti della proteina Tat e della risposta immunitaria anti-Tat (indotta dall'infezione o dalla vaccinazione con Tat) nella formazione e mantenimento dei serbatoi dell'HIV-1 nel sangue periferico di 50 pazienti infetti da HIV in trattamento con cART anti-Tat+ verso 50 pazienti senza anticorpi anti-Tat (ISS OBS T-005). Dopo il completamento della fase pre-screening, le operazioni di arruolamento sono proseguite nonostante le limitazioni imposte al centro clinico dalla pandemia da COVID-19 tuttora in corso e che ha suggerito di emendare il protocollo per includere la valutazione della sierologia per SARS CoV-2 tra le indagini previste dallo studio, dato che le infezioni concomitanti possono promuovere la proliferazione di cellule latentemente infettate da HIV con effetti sulla dimensione dei serbatoi di DNA provirale, obiettivo primario dello studio. Infatti, lo stato di immunodeficienza e la disregolazione immunitaria che caratterizzano l'infezione da HIV espongono le persone con infezione da HIV a maggior rischio di co-infezioni, incluso SARS-CoV-2, oltre che di un decorso clinico più grave.

**<sup>a</sup> 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 e della Cooperazione Internazionale. Centro Nazionale per la Ricerca su HIV/AIDS.*

Il Programma è stato implementato dal 2008 al 2017 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, e 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 era 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.

Breve descrizione del programma:

Componente 1: L' intervento, a supporto dei piani strategici nazionali e provinciali, prevedeva il coinvolgimento dei <sup>a</sup>Department of Health<sup>o</sup> provinciali e delle Comunità locali nelle seguenti Provincie: i) Gauteng, Distretto Sanitario <sup>a</sup>Tswane 1<sup>o</sup>; ii) Eastern Cape, Distretto Sanitario <sup>a</sup>OR Thambo<sup>o</sup>; iii) Mpumalanga, Distretto Sanitario <sup>a</sup>Ehlanzeni<sup>o</sup>, Distretto Sanitario <sup>a</sup>Gert Sibande<sup>o</sup>, Distretto Sanitario <sup>a</sup>Nkangala<sup>o</sup>; iv) Kwazulu Natal (KZN), Distretto Sanitario <sup>a</sup>Umzinyathi<sup>o</sup>. Nel quadro di questa componente, è stata potenziata una Unità di Ricerca Clinica (MeCRU) nella provincia del Gauteng ed è stata sviluppata una nuova Unità di Ricerca Clinica (WSUHVRU) nella provincia dell'Eastern Cape. La piattaforma clinico-laboratoristica è stata realizzata mediante l'integrazione delle Unità di Ricerca Clinica 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 WSUHVRU.

Componente 2. L'intervento prevedeva il supporto ed il trasferimento tecnologico per lo sviluppo di una struttura GMP per la produzione di vaccini presso <sup>a</sup>BIOVAC<sup>o</sup>, nella provincia del Western Cape. L'intervento si è concluso con la realizzazione della struttura GMP ed il trasferimento della

tecnologia per la produzione del vaccino Tat contro HIV/AIDS sviluppato dal Centro Nazionale per la Ricerca su HIV/AIDS.

Componente 3. L'intervento prevedeva la conduzione del trial vaccinale terapeutico di fase II basato sulla proteina Tat (ISS T-003). Il trial vaccinale ha avuto inizio a MeCRU nel febbraio 2012 in 200 pazienti HIV+ in trattamento con HAART ed è stato completato nel 2014. Nell'autunno 2016 è stato inoltre 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 arruolati nello studio ISS T-003. I risultati di questi studi hanno confermato 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, come osservato nel trial vanale italiano di fase II ISS T-002.

I risultati ottenuti sono stati valutati positivamente dal Department of Health 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. Nel frattempo, i risultati di uno studio di prolungato follow-up del trial vaccinale italiano ISS T-002 hanno evidenziato un significativo decadimento dei <sup>a</sup> serbatoi di virus latente<sup>o</sup> nei soggetti vaccinati. I serbatoi di virus latente sono insensibili alla terapia farmacologica e, a causa della sporadica riattivazione del virus, sono causa di co-morbidità, ospedalizzazione e costringono i pazienti ad un trattamento farmacologico cronico non privo di effetti collaterali. Il decadimento dei serbatoi virali nei soggetti vaccinati apre quindi nuove prospettive per l'eradicazione del virus. Pertanto, nel 2019 è iniziata la preparazione di un piano operativo per la conduzione di uno studio ulteriore di <sup>a</sup> follow-up<sup>o</sup> in Sudafrica (ISS T-003 EF-UP2020) volto a confermare gli effetti immuno-virologici a lungo termine della vaccinazione, con particolare focus sulla cinetica di decadimento dei serbatoi di virus latente. Lo studio viene finanziato con fondi della Ricerca Corrente del Ministero della Salute. Nel 2020 è stato finalizzato, in condivisione con i partner Sudafricani, il protocollo clinico dello studio. Il protocollo è stato sottoposto all'approvazione del Comitato Etico locale (Sefako Makgatho University Research Ethics Committee); l'approvazione è rilasciata nel dicembre 2020.



**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 (cART) 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 della cART è stata inoltre registrata una significativa riduzione di ricorrenza di CIN dopo asportazione chirurgica nelle donne sieropositive. Questi effetti della terapia cART non sono interamente spiegabili con la ricostituzione immunologica promossa con il trattamento antiretrovirale, ed è oggi ampiamente documentato che la cART 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. I risultati delle analisi dei marcatori biologici associati alla patogenesi del KS esaminati durante questo studio che sono in corso di pubblicazione non indicano cambiamenti sostanziali nella popolazione totale valutata dopo la fase di induzione rispetto al tempo basale dell'arruolamento, ad eccezione di un aumento della MMP-2 totale e latente e di una riduzione del numero assoluto di cellule CD4+, CD8+, NK e in particolare di cellule B. Al contrario, sono stati osservati cambiamenti rilevanti durante la fase di mantenimento ed il follow-up post terapia. In particolare, la MMP-2 totale e attiva sono risultate ridotte, mentre le cellule CD4+ e NK sono aumentate in numero assoluto. Tra i marcatori biologici sono state valutate anche le cellule endoteliali circolanti (CEC) e progenitrici di cellule endoteliali (EPC) che non hanno evidenziato variazioni significative rispetto ai livelli basali all'arruolamento.

#### **Caratterizzazione dei genotipi circolanti dell'integrasi di HIV-1 nel Sud del Sudan.**

*Studio privo di finanziamento per il 2020. Centro Nazionale per la Ricerca su HIV/AIDS.*

La diversità genetica di HIV-1 e le mutazioni associate alla resistenza ai farmaci rimangono una sfida per la salute pubblica a livello mondiale, soprattutto in quelle regioni dove il trattamento antiretrovirale è limitato o assente. A causa di decenni di guerra civile nel Sud Sudan, le informazioni sulla diversità genetica di HIV-1 e sulla resistenza del virus ai farmaci antiretrovirali sono assenti. Lo scopo di questo studio, è stato quello di caratterizzare il polimorfismo del gene dell'integrasi HIV-1 (IN) e le mutazioni di resistenza ai farmaci in 30 pazienti infetti da HIV-1 e naïve al trattamento con inibitori dell'integrasi. L'analisi filogenetica ha rivelato la presenza di sottotipi D, C, G, A1 e di forme ricombinanti rispettivamente per il 40%, 10%, 13,3%, 23,4% e 13,3%. Inoltre, l'analisi ha evidenziato come i ceppi esaminati, siano posizionati all'interno dell'albero filogenetico, insieme a ceppi virali campionati in altri paesi africani, evidenziando le complesse dinamiche di trasmissione e le loro elevate connessioni. Nonostante non siano state trovate mutazioni principali di resistenza agli INSTI, tuttavia sono state rilevate mutazioni accessorie polimorfe nelle posizioni M50ILR (26,6%), L74I (3,3%) e D232ND (10%), suggerendo che i pazienti sudanesi infetti da HIV-1 non trattati potrebbero essere suscettibili agli INSTI. I nostri dati suggeriscono che i polimorfismi naturali possono influenzare l'esito clinico dei pazienti sottoposti a diversi regimi di trattamento.



**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) esprime Env di HIV e 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 2019 abbiamo valutato il ruolo delle cellule muscolari nell'immunità a lungo termine indotta dalla vaccinazione IDLV. Abbiamo iniziato a valutare se IDLV persiste nel sito di iniezione e fornisce un'espressione dell'antigene prolungata nel tempo. A questo scopo abbiamo immunizzato topi BALB/c con IDLV-GFP per via intramuscolare (IM) o sottocutanea (SC). L'espressione di GFP nel sito di iniezione e nei linfonodi drenanti (dLN) è stata valutata mediante microscopia confocale. Cellule che esprimono GFP sono state rilevate nel sito di iniezione e in dLN 3 giorni dopo sia l'iniezione IM che SC, ma persistevano a livelli inferiori solo nel muscolo di topi immunizzati IM fino a 3 mesi dopo l'iniezione. Abbiamo quindi confrontato l'intensità e la persistenza delle risposte delle cellule T antigene-specifiche indotte dalle due vie di immunizzazione mediante saggio IFN- $\gamma$  ELISPOT. La risposta delle cellule T è stata rilevata fino a 90 giorni dopo la vaccinazione, indipendentemente dalla via di iniezione. Tuttavia, nei topi immunizzati con SC l'intensità della risposta è diminuita più rapidamente rispetto ai topi iniettati con IM ( $p < 0,05$ ). Al contrario, non è stato rilevato alcun calo significativo nelle risposte delle cellule T nei topi immunizzati con IM a 90 giorni, suggerendo che la via di iniezione e l'espressione persistente dell'antigene dalle cellule bersaglio trasdotte giocano un ruolo nella durata dell'immunità indotta da IDLV. Successivamente abbiamo valutato se le cellule muscolari di topi immunizzati IDLV-GFP possono presentare l'antigene alle cellule T tramite MHC-I. L'espressione di MHC-I è stata osservata in alcune delle fibre muscolari GFP+, supportando l'ipotesi che le cellule muscolari sono in grado di presentare l'antigene alle cellule T in vivo. Per verificare questa ipotesi abbiamo isolato mioblasti dai tessuti muscolari di topi BALB/c naïve di 3 settimane e li abbiamo differenziati

in miociti per eseguire esperimenti di co-coltura con splenociti isolati da topi immunizzati IDLV-GFP. Mioblasti e miociti trasdotti con IDLV-GFP sono stati in grado di stimolare splenociti specifici per GFP, valutato mediante saggio IFN- $\gamma$  ELISpot. Il trattamento con un anticorpo anti-MHC-I ha determinato una significativa riduzione delle risposte dei linfociti T, confermando la capacità delle cellule muscolari primarie di presentare l'antigene attraverso MHC-I. Questi dati suggeriscono che il muscolo scheletrico è un serbatoio di antigeni per IDLV che contribuisce all'immunità a lungo termine indotta da IDLV.

In sistemi in vitro abbiamo valutato la capacità della particella IDLV di pseudotipizzare sequenze envelope contenenti la porzione transmembrana. Abbiamo quindi costruito un vettore lentivirale esprimente una proteina Envelope contenente la porzione di ancoraggio alla membrana cellulare (tmEnv) ed un vettore esprimente l'antigene Env solubile (sENV). Gli IDLV sono stati prodotti, normalizzati per l'attività enzimatica della trascrittasi inversa e analizzati mediante Western Blot (WB) e microscopia confocale (CLSM). I filtri WB sono stati ibridizzati con un anticorpo anti-Env, così come anche le particelle di IDLV valutate mediante CLSM. Nel WB, come previsto, una banda corrispondente a HIV Env è stata trovata solo nei campioni in cui era presente IDLV esprimente tmENV, confermando che l'Env è legato alla membrana IDLV mentre sENV produce trimeri solubili e non è presente nelle particelle IDLV. Per l'analisi CLSM, abbiamo prodotto IDLV-tmENV marcato con il gene reporter green fluorescence protein (GFP). Questo è stato fatto aggiungendo il plasmide pSIV-GagGFP, in cui il carbossi-terminale della proteina SIV-Gag è fuso al GFP, durante la produzione di IDLV-tmENV, consentendo l'incorporazione della proteina di fusione Gag-GFP in particelle IDLV. Gli IDLV marcati con GFP sono stati osservati al CSLM per valutare la stabilità della conformazione Env trimerica sulle particelle virali. La marcatura con anticorpo anti-Env 2G12 o PGT145 specifico per la conformazione nativa trimerica della proteina Env ha evidenziato la co-localizzazione della proteina tmENV con la proteina SIV-Gag su particelle virali, confermando che IDLV-tmENV è pseudotipizzato con trimeri Env nativi.

**Innovative human bispecific Ab construct targeting HIV replication, chronic inflammation and immune activation: a route for the cure and beyond.**

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

La maggior parte degli individui con infezione da HIV in terapia antiretrovirale presentano viremia residua e infiammazione cronica sistemica persistente, che rappresentano i principali ostacoli per il raggiungimento di una cura. Approcci terapeutici finalizzati al loro controllo possono rappresentare



una strategia efficace per interferire con il circolo vizioso che s'instaura tra l'attivazione immunitaria e la persistenza di HIV e che è alla base del deterioramento della risposta immunitaria e dello sviluppo di condizioni patologiche. In questo contesto, l'obiettivo di questo progetto, coordinato dal Centro per la Salute Globale e iniziato a dicembre 2019, è di sviluppare nuovi costrutti anticorpali umani monoclonali bispecifici (bs-mAbs) che hanno come bersaglio due molecole/meccanismi patologici, ovvero CCR5 e CCR2/CCL2. Questi bs-mAbs avranno il vantaggio di interferire simultaneamente con l'ingresso/replicazione dell'HIV e con l'infiammazione e potranno essere utilizzati come componenti di strategie terapeutiche complesse mirate alla cura funzionale dell'infezione da HIV, così come per bersagliare l'infiammazione mediata da CCR2 e CCR5 nelle malattie croniche non trasmissibili e nei tumori. Gli obiettivi specifici del progetto prevedono: 1) definire l'effetto del blocco singolo e combinato di CCR5 e CCR2/CCL2 sulla replicazione virale e sulle risposte antivirali nelle cellule immunitarie che rappresentano i principali bersagli dell'infezione da HIV; 2) isolare un pannello di mAbs monospecifici (ms-mAbs) umani contro CCR5, CCR2 e CCL2 e ingegnerizzare bs-mAbs contro CCR5 e CCR2 e contro CCR5 e CCL2; 3) definire l'effetto antivirale dei mAbs sviluppati in appropriati modelli ex vivo e in vivo. Nel corso del 2020 abbiamo continuato lo studio proof-of-concept basato su due mAbs noti: PRO140 (anti-CCR5) e Plozalizumab (anti-CCR2), espressi in formato scFv. Abbiamo confermato che questi mAbs riconoscono in modo specifico l'antigene espresso in cellule trasfettate. Sono attualmente in corso saggi biologici per verificare la funzionalità di questi mAbs in esperimenti di blocco dell'ingresso di HIV-1 in PBMCs per il PRO140 e di inibizione della chemiotassi in risposta alla CCL2 in monociti per il Plozalizumab. Abbiamo inoltre iniziato lo sviluppo di nuovi mAbs contro CCR5, CCR2 e CCL2. Questi mAbs monospecifici vengono isolati da librerie fagiche umane in formato scFv. A questo scopo, poiché CCR5 e CCR2 hanno una complessa struttura transmembrana, stiamo utilizzando delle viral like particles (VLP) che esprimono CCR5 o CCR2 per le selezioni, mentre per la CCL2 utilizziamo la proteina ricombinante. Infine, abbiamo portato a termine uno studio di mRNA sequencing volto a caratterizzare l'effetto del blocco dell'asse CCL2/CCR2 sul trascrittoma di macrofagi primari umani infettati o meno con HIV-1. I risultati di questo studio sono stati pubblicati su una rivista internazionale peer reviewed con IF.

**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.

Condotto 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.

**Obiettivi e risultati attesi.** Lo studio ha l'obiettivo di contrastare la diffusione dell'infezione da HIV attraverso il miglioramento della *retention in care* dei pazienti. Tale obiettivo è perseguibile attraverso la realizzazione di un modello di cura caratterizzato dal coinvolgimento attivo delle Associazioni di volontariato dei pazienti con HIV (Adherence Supporters, ADSs) nel percorso terapeutico dei singoli pazienti. Sono attesi risultati in termini di [1] abilitazione del personale infermieristico all'attività di trainer (*train the trainer approach*); [2] miglioramento di capacità comunicative e conoscenze su HIV/AIDS sia da parte del personale infermieristico che degli ADSs; [3] maggiore partecipazione degli ADSs alla gestione della cura del paziente.



Nel 2020, lo studio CASA è stato temporaneamente sospeso, sia a causa della locale situazione emergenziale legata alla pandemia COVID-19 (lockdown in Tigray), sia a seguito dell'improvviso e tuttora in atto conflitto armato, che ha condotto la regione tigrina a un totale isolamento e reso impossibile qualsiasi comunicazione con l'esterno. Il blocco di Internet ha impedito la trasmissione dei dati aggiornati relativi allo studio di coorte, così come gran parte delle attività didattiche svolte normalmente a distanza.

In tempi più recenti si è tentato di ripristinare i contatti, con esiti modesti ma sufficienti a trasmettere allo staff locale un senso di continuità dello studio.

Tali contatti hanno consentito di comprendere alcuni dei problemi che le varie strutture coinvolte nello studio hanno dovuto affrontare per garantire continuità all'assistenza sanitaria, le conseguenze della sospensione di alcuni servizi essenziali, le difficoltà dei collaboratori locali a raggiungere dette strutture; ostacoli più spesso riconducibili all'assoluta mancanza di sicurezza o a danni infrastrutturali causati dai bombardamenti.

La consapevolezza dei potenziali rischi ai quali il personale CASA sarebbe stato esposto nel tentativo di portare avanti le attività dello studio in tali avverse condizioni, ha indotto ad interrompere ogni attività in loco e a chiedere una proroga della chiusura dello studio, inoltrata all'ente finanziatore (AICS) e dallo stesso concessa.

*Si riporta, di seguito, uno schema metodologico, riassuntivo delle attività finora svolte. Si rimanda alle passate relazioni per descrizioni dettagliate delle singole attività svolte negli anni precedenti il 2020.*

#### A. Attività formativa

Training rivolto al personale sanitario (prevalentemente infermieristico) e agli ADSs. Le programmate sessioni evolvono verso un crescente livello di complessità e specificità, tramite la graduale introduzione di nuovi temi. Il training prevede l'alternarsi di sessioni <sup>a</sup>face-to-face<sup>o</sup> e periodi di formazione a distanza. Fine ultimo del programma, è quello di abilitare i discenti al trasferimento delle acquisite conoscenze, inizialmente agli ADSs coinvolti nel progetto e successivamente (al termine del percorso formativo) al personale infermieristico operante in altre strutture sanitarie.

*1. Training <sup>a</sup>face-to-face<sup>o</sup>.* Sono annualmente organizzati in loco tre seminari <sup>a</sup>face-to-face<sup>o</sup>, in cui vengono introdotti e discussi nuovi argomenti, oggetto di successivo approfondimento negli

intervalli tra un seminario e l'altro (periodo di autoapprendimento). Il materiale formativo viene direttamente fornito ai partecipanti o reso disponibile sul sito web CASA. Le lezioni sono generalmente strutturate in modo analogo per entrambi i gruppi: [1] condivisione degli elaborati realizzati dai partecipanti al training nell'ambito dell'apprendimento a distanza; [2] individuazione dei concetti poco chiari e dei punti chiave negli stessi elaborati; [3] discussione in gruppo; [4] introduzione di un nuovo argomento di studio; [5] assegnazione delle attività di auto-apprendimento.

2. *Valutazione finale.* Durante l'ultimo seminario di ogni anno (dicembre), viene organizzati esami finalizzati alla valutazione complessiva del percorso formativo svolto. Le prove hanno caratteristiche diverse per ADSs e personale infermieristico. Una volta sostenute le prove, i partecipanti ricevono un feedback individuale che ne evidenzia punti di forza ed eventuali criticità.

3. *Apprendimento a distanza.* Nel corso dei seminari "face-to-face", viene consegnato ad ogni discente il materiale didattico sugli argomenti da approfondire ed assegnati compiti da svolgere nel successivo quadrimestre di auto-apprendimento. In tale periodo verranno svolte attività di gruppo e organizzati momenti di condivisione tra ADSs e personale infermieristico. Lo staff locale ha incontri regolari con i discenti al fine di verificare l'avvenuto svolgimento dei compiti, stimolare la riflessione sugli argomenti trattati, rilevare le difficoltà incontrate durante il percorso di apprendimento.

## B. Ricerca operativa

1. *Studio longitudinale (coorte CASA).* La raccolta multicentrica di dati epidemiologici ha avuto inizio a gennaio 2013, su una coorte di pazienti con HIV/AIDS che iniziavano la terapia antiretrovirale presso le sette strutture sanitarie partecipanti al progetto. I dati aggiornati, regolarmente prelevati dal personale locale (*monitor*) nel corso delle periodiche visite di monitoraggio presso le strutture sanitarie partecipanti, vengono assemblati in un database centrale (Mekelle University) e successivamente trasmessi all'ISS attraverso l'area condivisa di un sito web (virtual office). Sui dati raccolti viene mensilmente eseguita un'analisi descrittiva, visualizzabile nel sito web del Progetto ([www.casaproject.info](http://www.casaproject.info)).

2. *Ruolo degli Adherence Supporters.* Gli ADSs hanno un ruolo chiave nel processo di integrazione e recupero delle informazioni sui pazienti persi al follow-up. Mobilitati sul territorio, essi cercano di rintracciare tali pazienti per poi indurre gli stessi a riprendere i controlli clinici e il percorso terapeutico, attraverso l'utilizzo di strategie persuasive apprese durante il training. Gli ADSs raccolgono sistematicamente, su apposita modulistica, specifiche informazioni poi trasferire in un

database per successive analisi. L'intervento diretto degli ADSs è talvolta necessario a rilevare l'avvenuto decesso del paziente, informazione non sempre ottenibile da altre fonti.

**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 <sup>a</sup>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 <sup>a</sup>esposti° all'HIV e alla ART) sono sempre più riconosciuti come un gruppo con bisogni di salute specifici. Molti studi hanno dimostrato un'aumentata morbidità (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 morbidità 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. È stato messo a punto, in collaborazione con il personale locale, un questionario per lo studio dell'aderenza al programma delle madri postpartum. Il questionario viene somministrato alle donne perse al follow-up che vengono rintracciate dal Counsellor dello studio e registrato su un software specifico.

È stata 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 corso del 2020 è terminato l'arruolamento delle donne e dei bambini delle 2 coorti dello studio. Nel corso delle visite mensili che vengono effettuate dopo il parto sono stati raccolti i dati antropometrici e le informazioni cliniche relativamente ai bambini arruolati. Sono state effettuate 100 visite domiciliari per la valutazione dell'aderenza al programma delle donne HIV-positive e sono stati compilati i relativi questionari. Nel corso della visita che viene effettuata 6 settimane dopo il parto sono stati raccolti dai bambini arruolati campioni di Dried Blood Spots che permetteranno la valutazione del passaggio transplacentare delle immunoglobuline materne. Nel corso delle visite



effettuate 6 mesi e 12 mesi dopo il parto sono stati raccolti campioni di sangue dai bambini per la valutazione delle risposte immunitarie ai principali vaccini. La fine del follow-up è prevista per agosto 2021.

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

*Progetto finanziato 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 contro Herpes simplex di tipo 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2). Infatti, nonostante i progressi scientifici ed i numerosi tentativi fatti, non esiste ad oggi un vaccino preventivo o terapeutico contro HSV-1 e HSV-2 che possono 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 preliminari hanno dimostrato che la vaccinazione di due diversi ceppi di topi con un ceppo di HSV-1 attenuato o reso non replicante ed ingegnerizzato per esprimere la proteina Tat di HIV-1 induceva in entrambi i ceppi murini CTL contro un più ampio spettro di epitopi virali rispetto a quanto osservato dopo infezione con un ceppo erpetico non modificato e ha conferito protezione contro l'infezione con una dose letale di un ceppo erpetico patogeno.

Sulla base di questi risultati è stata avanzata proposta di finanziamento ed il progetto ha ricevuto nel 2020 un finanziamento dal Ministero della Salute nell'ambito della Ricerca Finalizzata. Il progetto, della durata di 3 anni, si propone 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).

Le attività inizieranno non appena il ministero metterà a disposizione i fondi assegnati, probabilmente nella prima metà del 2021.

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