

l'identificazione dei fattori con effetti adiuvanti nei confronti microbici noti e lo sviluppo di interventi efficaci contro l'HIV/AIDS.

Cellular transcription factors of the Interferon Regulatory Factors family in HIV-1 pathogenesis and reactivation from latency: mechanisms and development of therapeutic tools

Il progetto si svolge all'interno del Reparto "Patogenesi Molecolare" del Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed immunomediate ed ha come principale obiettivo lo sviluppo di tools e strategie terapeutiche da utilizzare per limitare o impedire la fase di infezione latente ed eliminare poi le cellule in cui la replicazione virale sia stata riattivata, attraverso l'utilizzo di target cellulari ed in particolare fattori di trascrizione cellulari appartenenti alla famiglia IRF (interferon regulatory factors). I fattori cellulari IRF sono fondamentali per la replicazione virale prima della sintesi del transattivatore virale e sono bersagli delle strategie virali di escape dalla risposta immune dell'ospite. I risultati ottenuti nel corso del 2011 indicano che, in particolare, IRF-1 sia il fattore cellulare in grado, nelle cellule T che costituiscono anche il maggior reservoir virale, di fare il "recruitment" di PTEF-b e quindi permettere l'elongazione e la trascrizione completa del genoma virale. L'acido retinoico, composto già in uso in terapia umana, anche se per altre patologie non correlate all'infezione da HIV, si è dimostrato in grado di stimolare in maniera significativa e specifica l'espressione di IRF-1 che a sua volta è in grado di stimolare, assieme ad attivatori di NF-kB, la riattivazione di HIV-1 dalla latenza in sistemi modello di cellule latentemente infettate.

Inoltre, le interazioni fisiche e funzionali tra il transattivatore virale Tat e IRF-1 oltre a determinare un silenziamento dell'attività trascrizionale di IRF-1 sui suoi geni target che includono importanti geni antivirali e immunomodulatori, portano ad un sequestro di IRF-1 in compartimenti cellulari che favoriscono il blocco della sua attività. Infine, l'interazione con Tat favorisce il legame ad una E3 ligasi che determina la degradazione proteasoma-dipendente di IRF-1. Inibitori specifici di tale ligasi, o più generici dell'attività del proteasoma, possono pertanto essere utilizzati per ripristinare l'espressione e l'attività di IRF-1. Si stanno testando alcuni inibitori di fosfatasi in grado di modificare l'attività di IRF-8, che funziona in maniera opposta a IRF-1 ed è quindi un fattore inibitore della replicazione e favorente l'instaurarsi della latenza.

L'utilizzo di target cellulari presenta molti vantaggi, incluso quello di evitare la propensione del virus a mutare come invece accade per le terapie farmacologiche in uso. La possibilità di modulare l'espressione dei fattori IRFs in differenti tipi cellulari sia per stimolare che per inibire una risposta immune innata, con piccole molecole o con un approccio di terapia genica, può aiutare a controllare l'infezione e potrebbe mimare ciò che avviene negli individui detti "elite controllers" bilanciando la

risposta innata in favore dell'ospite e non del virus come invece accade nella maggioranza delle infezioni.

Modulation of primary R5 HIV-1 isolate infectivity in macrophages, dendritic cells and CD4+ cells: role of distal C-terminal region of gp41 in R5 tropism

I meccanismi tramite i quali varianti di HIV-1 con aumentato tropismo macrofagico causano deplezione dei linfociti CD4+ T *in vivo* non sono attualmente definiti. Scopo di questo lavoro sperimentale è di valutare la patogenicità dell'infezione da HIV-1 tramite lo studio dell'infettività di ceppi con tropismo macrofagico (R5-tropici), ampiamente diffusi nella popolazione mondiale, in cellule primarie quali linfociti T CD4+, cellule dendritiche (DC) e macrofagi.

Nel corso del 2011, i virus sono stati caratterizzati su linee cellulari esprimenti superficialmente una combinazione di livelli alti o bassi di recettori virali CD4 e CCR5. E' stata così rilevata una grande variabilità d'infettività virale rispetto alla concentrazione di CD4 e CCR5, quindi di dipendenza recettoriale da parte dei virus R5-tropici. Infatti i risultati d'infezione su di DC, macrofagi e PBL indicano una differenza di circa 100 volte nelle capacità infettante dei sottotipi virali analizzati. In generale, le infezioni condotte su PBL erano più efficienti rispetto a quelle condotte su DC e macrofagi indipendentemente dai virus utilizzati. Il sottotipo "D" infettava più efficientemente i linfociti. Le DC invece venivano infettate in modo più efficiente dai virus appartenenti al sottotipo "B" ad eccezione del ceppo AC10.0.29 che mostrava una bassissima infettività.

La suscettibilità delle DC ai sottotipi "A" (92RW020.5), "C" (92BR025.9), "D" (92UG005), "E" (92Th023), "F" (93BR029.2) e "G" (92UG975.10) era piuttosto variabile ma con valori d'infettività nettamente inferiori al sottotipo "B". In generale l'infettività dei sottotipi R5-tropici analizzati sembrerebbe maggiore nelle DC rispetto ai macrofagi ad eccezione del sottotipo "C". La differente capacità infettiva dei virus classificati come R5-tropici riscontrata in questi esperimenti, suggerisce che il solo tropismo per il corecettore non comporta obbligatoriamente anche il tropismo per i macrofagi.

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 e 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. Questo progetto prevede di immunizzare primati non umani con IDLV esprimenti antigeni di HIV e di valutare la risposta immunologica sia cellulare che anticorpale. Nell'ambito di questo progetto, nel 2011 sono state prodotte quantità sufficienti di IDLV esprimente HIV-Env o HIV-Gag per immunizzare 8 soggetti. Tali vettori sono stati validati in vitro per la capacità di esprimere l'antigene e per confermare l'assenza di integrazione nel genoma cellulare. I risultati dell'immunizzazione saranno analizzati sia a tempi precoci che dopo molti mesi dalla vaccinazione in modo da valutare la persistenza della risposta immunologica indotta dalla vaccinazione.

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 lentivirali 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 2011 hanno dimostrato che IDLV, somministrato una sola volta per via intramuscolare, è molto efficiente nell'indurre una forte e persistente risposta cellulare sia a livello sistemico che a livello mucosale (lamina propria dell'intestino), ma che per l'induzione di anticorpi specifici anti-HIV a livello mucosale è necessario un boost proteico con adiuvante somministrato per via mucosale. Tali risultati suggeriscono che la strategia vaccinale migliore prevede un protocollo "prime-boost" che combina differenti vie di immunizzazione e sistemi di veicolazione dell'antigene.

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

Il progetto si svolge presso il Reparto di "Immunità Anti-infettiva" del Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate e prevede uno studio preclinico in modello murino riguardante l'induzione di una immunità verso antigeni HIV-1 ottenuta mediante infezione vaginale con virus influenzali ricombinanti esprimenti la proteina Tat o poliepitopi derivati da proteine di HIV-1. Diversi studi dimostrano l'efficacia di un'immunizzazione operata direttamente sulle mucose genitali nell'induzione e localizzazione di cellule immuni effettrici e memory aventi un'azione protettiva immediata nel caso di infezione da HIV-1 trasmessa per via sessuale. La capacità di indurre un'efficiente risposta immune utilizzando virus influenzali ricombinanti nel tratto vaginale dei topi e la disponibilità di diverse varianti antigeniche virali offrono l'opportunità di condurre studi pre-clinici mirati a comprendere le limitazioni che possono derivare da una pre-esistente immunità dell'ospite a vettori virali esprimenti antigeni HIV-1 e impiegati nelle correnti strategie di sviluppo di vaccini per l'AIDS. L'attività e i risultati ottenuti nel 2011 hanno riguardato la costruzione di un nuovo poliepitopo esprimente sia epitopi per linfociti T, sia determinanti anticorpali di HIV-1. E' stato inoltre ottenuto un set di plasmidi contenenti i geni del virus A/PR/8/34 necessari all'applicazione di "reverse genetics" per l'ottenimento dei virus influenzali ricombinanti ed è stata generata una cassetta di clonaggio per l'inserimento delle sequenze geniche codificanti gli antigeni di interesse. Sarà così possibile generare virus influenzali ricombinanti contenenti antigeni HIV-1 sul background genetico del virus A/PR/8/34 correntemente utilizzato nella produzione di prodotti vaccinali antinfluenzali per l'uomo. Il lavoro fin qui prodotto consentirà

di concludere uno studio che può essere di ausilio nella elaborazione di efficaci strategie di vaccinazione per l'HIV-1.

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

La capacità del virus HIV-1 di contrapporsi alla risposta del sistema immunitario dell'ospite rappresenta un ostacolo per lo sviluppo di strategie terapeutiche e preventive volte all'eradicazione dell'infezione. Le conoscenze acquisite negli ultimi anni sulla patogenesi dell'infezione da HIV-1 hanno chiaramente evidenziato l'importanza delle disfunzioni immunologiche, in particolare dello stato di attivazione generalizzata del sistema immunitario, nella patogenesi dell'AIDS, rispetto all'effetto distruttivo del virus in cellule infettate. E' adesso ben noto che molte delle disfunzioni immunologiche osservate in pazienti infettati da HIV-1 possono essere indotte dal contatto di diversi tipi cellulari con fattori solubili virali, rilasciati al sito d'infezione, tra i quali la glicoproteina di superficie gp120, in assenza di infezione produttiva. Le cellule che presentano l'antigene, quali le cellule dendritiche (DC) e i monociti/macrofagi rappresentano degli importanti bersagli cellulari dell'infezione da HIV-1. Al tempo stesso, queste cellule sono effettori critici nello sviluppo di risposte immunitarie efficaci nell'eliminazione di patogeni. Nonostante sia ben noto che le alterazioni funzionali di queste cellule svolgono un ruolo importante nella patogenesi dell'AIDS, i meccanismi coinvolti sono invece ancora poco chiari. Pertanto, lo scopo principale di questo progetto è quello di identificare i segnali molecolari innescati dall'interazione iniziale di HIV-1 con cellule che presentano l'antigene (DC e monociti/macrofagi) e definire come questo complesso set di segnali contribuisca alle disfunzioni di queste cellule e controlli la replicazione di HIV-1 in vitro. Una migliore comprensione delle interazioni virus-cellula ospite è di fondamentale importanza per l'identificazione di bersagli molecolari e cellulari per immunoterapie, e per la generazione di risposte immuni protettive indotte da vaccini. Nel corso del 2011 sono stati condotti studi volti a valutare gli effetti della gp120 sull'attivazione di vie di trasduzione del segnale coinvolte nella produzione di mediatori solubili quali le citochine e chemochine. L'attivazione di segnali specifici è stata poi correlata con la capacità del virus di indurre alterazioni nelle funzioni delle DC e della loro capacità di interagire con altri tipi di cellule immuni, quali i linfociti T $\gamma\delta$.

Ruolo della CCL2 nella regolazione di fattori di restrizione coinvolti nella resistenza all'infezione da HIV e valutazione del potenziale terapeutico del blocco della CCL2 in 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. Inoltre, questi studi mirano a valutare il potenziale terapeutico di un approccio basato sul blocco della CCL2 in pazienti HIV infetti. A tal fine, verrà valutato l'effetto sulla replicazione virale di un farmaco che inibisce la sintesi della CCL2 e di una molecola antagonista che blocca il recettore della CCL2 e che è attualmente in studio in un trial clinico in pazienti HIV infetti. Nel corso del 2011 gli studi relativi al progetto hanno riguardato in modo principale il ruolo della CCL2 nella regolazione di fattori di restrizione cellulari importanti nel determinare la resistenza/suscettibilità dei macrofagi all'infezione da HIV-1.

Clinica e terapia

Nel campo della ricerca clinica e della terapia della malattia da HIV i principali progetti portati avanti anche nell'anno 2011 sono elencati nelle pagine successive:

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

Nel corso del 2011 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 morbilità 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 (7 su 300 donne arruolate) supportando l'ipotesi della validità di questa strategia. Inoltre, nelle donne e nei bambini dello studio non si sono riscontrati significativi problemi di tossicità. I risultati di questo studio 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 svolgimento 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 24 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.

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.

Nel corso del 2010 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 naive 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 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 associati allo sviluppo di tumori ano-genitali, hanno in comune con 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-positivo presentano con maggior frequenza lesioni della cervice uterina dovute a 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 sono specifici, ben tollerati e hanno effetti a lungo termine. L'uso in combinazione di vaccini HPV profilattici e terapeutici, consentirebbe nelle persone HIV-positivo un controllo più efficiente sia delle infezioni da HPV che delle lesioni precancerose e cancerose.

Le proteine E6 e E7 di HPV sono antigeni tumorali (TSA) e antigeni per il rigetto del tumore, target ideali per un vaccino terapeutico. Lo studio propone l'impiego di un vaccino anti-HPV innovativo basato su particelle lentivirali (VLPs), prive di genoma, contenenti elevati livelli di E6 e E7 fuse ad un mutante per la proteina Nef di HIV-1 (NEF7C3G). Il mutante, usato come carrier, è incorporato in quantità elevate nelle VLPs. E' noto che particelle lentivirali sono in grado di indurre una risposta immunitaria di tipo Th1, quindi nel nostro modello di studio sono state generate particelle lentivirali contenenti E7 e E6. Nel corso del 2011, le particelle lentivirali ricombinanti portatrici degli antigeni

E6 ed E7 di HPV16 sono stati utilizzati come immunogeni per indurre una immunità antitumorale nel modello murino HPV16. Gli esperimenti sugli animali hanno dato degli ottimi risultati per quanto riguarda l'antigene E7, mentre l'antigene E6 anche veicolato con le VLPs non è efficace nell'indurre una attività antitumorale. Nel corso dell'anno il lavoro si è anche indirizzato verso lo studio di sistemi per migliorare la resa di particelle lentivirali da cellule in coltura. A tale scopo, è stata espressa la proteina NEF7C3G in un vettore di espressione in cellule di insetto (Sf9), pBiex-3, per verificare se la proteina viene incorporata nelle VLPs di HIV-1 prodotte in queste cellule. Gli esperimenti preliminari indicano che NEF7C3G è palmitoilata anche nelle Sf9, viene incorporata nei rafts e si sta verificando se è incorporata nella membrana lentivirale. collaborazione con l'Istituto Nazionale Tumori, "Fondazione G. Pascale" di Napoli.

Diagnosi dell'infezione da *Mycobacterium tuberculosis* in soggetti HIV positivi mediante la determinazione di specifici biomarkers sierici concentrati da nanoparticelle.

La diagnosi di infezione tubercolare attiva e latente è spesso complessa e si avvale, fra gli altri, di metodi che sfruttano la risposta di linfociti T CD4+ specifici per antigeni tubercolari. Tali metodi hanno molti vantaggi e alcuni svantaggi, come ad esempio quello di non avere una sensibilità sufficiente nei soggetti HIV positivi a causa dell'immunodepressione prevalente del compartimento dei linfociti T stessi. D'altra parte, a causa dell'inadeguata funzione linfocitaria, l'infezione tubercolare può essere particolarmente severa in tali soggetti e andare incontro a riattivazione se presente in forma latente. Per tale ragione, una diagnostica efficace è fondamentale al fine di iniziare precocemente un'eventuale terapia specifica. Con tale progetto si vuole valutare la validità della determinazione di biomarkers specifici del micobatterio tubercolare come metodo diagnostico, utilizzando nanoparticelle di idrogel capaci di concentrare dai liquidi biologici piccole molecole di definite caratteristiche molecolari e chimiche. Tali particelle hanno dimostrato di poter concentrare alcuni specifici biomarkers del micobatterio tubercolare che sono secreti nei liquidi biologici e quindi si potrà valutare l'efficacia del loro impiego nella diagnostica in alternativa o parallelamente all'impiego dei test attualmente disponibili.

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, l'arruolamento dei pazienti nello studio è stato avviato 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. Al momento (2011), sono stati raccolti campioni di 9 dei 25 pazienti previsti. Le analisi da condurre su campioni di sangue (PBMC) non congelati (CEC, cellule T CD4⁺ and CD8⁺, attività NK) sono già in corso. Le rimanenti valutazioni vengono eseguite su campioni congelati e pertanto verranno studiate alla conclusione della fase di trattamento (giugno 2013), in modo da garantire omogeneità di analisi e valutazione.

Riguardo al trial CIN, il protocollo clinico è attualmente in preparazione sulla base degli studi epidemiologici di background effettuati nel territorio dove verrà effettuata la sperimentazione clinica. 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 livelli ed 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).

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.

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 orizzontale (rapporto sessuale) che verticale (il parto e l'allattamento al seno) e dopo una viremia iniziale può rimanere in uno stato di latenza in diversi santuari virali. HIV-1 induce un grave danno alle attività funzionali delle cellule B con il conseguente esaurimento del "pool" di cellule B memoria e declino della risposta umorale. Anticorpi neutralizzanti anti-Env (NAbs) o indotti da vaccinazione o prodotti nel corso dell'infezione naturale, seppur rilevanti non sono da soli sufficienti per l'ottenimento di una protezione sterilizzante e non sono in grado di neutralizzare il virus latente nei "reservoir virali". I progressi nella patogenesi dell'HIV, hanno, inoltre, indicato che anticorpi contro HIV-1 Tat e Nef sono associati alla fase asintomatica ed al un ritardo nella progressione clinica. La comprensione dei meccanismi che generano l'equilibrio tra anticorpi con diverse specificità ed attività antivirali (quali l'attività citotossica mediata da anticorpi e l'inibizione della trasmissione virale cellula-cellula) e anticorpi con attività "enhancing" dell'infezione virale, è determinante per generare nuovi antigeni vaccinali attraverso la identificazione di nuovi "B cell epitopes". Infine, la generazione di anticorpi anti-Tat e -Env di HIV-1 capaci di bloccare l'infezione potrebbe rappresentare un passaggio importante anche per la generazione di interventi terapeutici non invasivi nelle fasi precoci dell'infezione di HIV a livello delle mucose od in pazienti già esposti. In tale ambito, il progetto

coordinato dal reparto di “Retrovirologia Sperimentale e Modelli di Primati non Umani”, del Centro Nazionale AIDS, ha come obiettivi: i) lo studio delle risposte umorali in scimmie vaccinate con Tat e $\Delta V2$ -Env (Env deleto della regione V2) di HIV o con antigeni di SIV e ii) generazione di anticorpi antivirali ricombinanti (mono- o bi-specifici) per interventi terapeutici (adulti, età pediatrica, gravidanza) a sostituzione o ad ausilio delle correnti terapie antiretrovirali che, seppur efficaci, si caratterizzano per la loro potenziale tossicità nei pazienti trattati. A questo proposito, sono state stabilizzate linee cellulari derivate da PBMCs di scimmie vaccinate con proteine Tat e $\Delta V2$ -Env da soli o in combinazione che sono state in grado di controllare *in vivo* l’infezione dopo challenge con il virus a livello delle mucose. Sono state anche sviluppate strategie miranti alla amplificazione e al sequenziamento della regione Fc e VDJ di IgG/IgM di *Macaca fascicularis*.

Induction of a drug-free remission of lentiviral infection: a drug repositioning approach

Progetto co-finanziato nell’ambito del Programma Italia/USA e dalla Fondazione Roma Progetti Intramurali.

Nonostante le attuali terapie antiretrovirali (ART) siano in grado di inibire la replicazione del virus HIV-1, esse sono tuttavia incapaci di eradicarlo. Pertanto, anche in considerazione degli elevati costi di tali terapie e della difficoltà a sviluppare vaccini efficaci contro l’HIV, risulta di particolare importanza identificare nuovi approcci per l’eradicazione virale.

Il virus HIV persiste principalmente in forma silente nei linfociti T $CD4^+$ *long-lived* central memory (T_{CM}) e transitional memory (T_{TM}), grazie al mantenimento di bassi livelli di proliferazione dei linfociti T stessi. Inoltre, il virus può replicarsi a basso livello in alcuni cosiddetti “santuari” farmacologici. Queste sottopopolazioni cellulari esprimono, sulla loro superficie l’antigene CD27, il quale è associato alla sopravvivenza delle cellule a lungo termine mentre è assente sui linfociti T $CD4^+$ a breve emivita, tra cui le cellule effector memory (T_{EM}). Per l’eradicazione dell’infezione virale sono state proposte diverse potenziali strategie, tra cui il trapianto di cellule staminali resistenti all’infezione, la strategia dello “shock and kill” o quella dell’auto-rinnovo delle T_{CM} in associazione con ART. Queste ultime strategie sono atte alla sostituzione delle cellule a lunga emivita attraverso la rimozione o la distruzione delle cellule latentemente infettate. Su questa linea, una nuova strategia ipotizzata in questo progetto prevede l’utilizzo di composti in grado di promuovere la differenziazione delle cellule T_{CM} , che fungono da *reservoir* del virus, in cellule T_{EM} , a emivita più breve, contribuendo in tal modo all’eliminazione del virus dall’organismo. Tale azione è svolta dall’”Auranofin”, un composto a base di sali di oro, già utilizzato, per somministrazione orale, nel trattamento dell’artrite reumatoide e nel trattamento sperimentale della leucemia

promielocitica. Auranofin è un farmaco pro-ossidante, che agisce attraverso l'induzione di specie reattive all'ossigeno (ROI) e che contribuisce all'apoptosi e alla differenziazione *in vitro* di cellule leucemiche, in combinazione con strategie anticancro. *In vitro*, Auranofin induce differenziamento e morte cellulare a carico delle cellule T_{CM}, che, come menzionato sopra, costituiscono uno dei principali *reservoir* di HIV-1. Risultati preliminari *in vivo*, ottenuti da questo progetto, condotto nel Dipartimento MIPI, hanno dimostrato che la somministrazione di Auranofin a macachi infettati da SIVmac251, e trattati con ART, induceva deplezione di *reservoir* cellulari, e riduzione della viremia, a seguito della sospensione della terapia. Altri risultati di questo progetto, più recenti, indicano che il farmaco sperimentale butionina sulfossimina (BSO), un inibitore della sintesi di glutazione, incrementa notevolmente gli effetti pro-differenzianti e pro-apoptotici di Auranofin a livello del compartimento memory. Quando la BSO è somministrata per via intraperitoneale ad un macaco trattato con terapia antiretrovirale a cinque farmaci (mega-ART) ed Auranofin si osserva un fenomeno estremamente interessante: nella scimmia di controllo trattata con la sola mega-ART, è evidenziabile, a seguito di sospensione della terapia, un *rebound* della carica virale che cresce con il tempo; al contrario, nei macachi sottoposti al trattamento anti-reservoir, alla sospensione della terapia segue un iniziale picco seguito da discesa della carica virale a livelli rilevabili ma di due ordini di magnitudine inferiori ai livelli pre-terapia nei macachi trattati con auranofin, e a livelli non rilevabili nella scimmia trattata con auranofin e BSO. Quest'ultima, a tre mesi di sospensione della terapia, mantiene anche livelli elevati di linfociti CD4⁺ (> 1000/μl di sangue intero).

Se i risultati si riveleranno riproducibili in un maggior numero di macachi, ci si troverebbe per la prima volta di fronte alla possibilità di avere in mano una cura funzionale della malattia. Le potenzialità applicative di tale strategia nell'uomo sarebbero immense poiché si potrebbe sospendere la terapia ART anche per periodi prolungati, con notevoli vantaggi in termini di benessere e qualità di vita del paziente oltre che di riduzione dei costi per il Sistema Sanitario Nazionale.

European Vaccines and Microbicides Enterprise (EUOPRISE).

Progetto finanziato dalla Comunità europea.

EUOPRISE è un "Network of Excellence" (NoE), il cui obiettivo principale è quello di riunire insieme i maggiori scienziati europei nel campo dei vaccini contro l'HIV/AIDS e dei microbicides allo scopo di coordinare le attività di prevenzione contro l'infezione da HIV. I partner nel consorzio Europrise, tra i quali il Centro Nazionale AIDS, sono coordinatori di 14 progetti finanziati dalla Comunità Europea nell'ambito del VI Programma Quadro e rappresentano ben 122 Istituzioni di 22 paesi diversi. Il Centro Nazionale AIDS, in particolare, partecipa al progetto in due Workpackages