

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 2013 abbiamo prodotto un vettore IDLV basato sul virus dell'immunodeficienza della scimmia SIV (Simian Immunodeficiency Virus), in quanto più efficace nel trasdurre cellule di scimmia. In collaborazione con la Duke University (Durham, North Carolina, USA), abbiamo costruito un vettore esprimente gp140 HIV-Env 1086.C (IDLV-Env) e abbiamo immunizzato 6 scimmie (*Macaca rhesus*) con una sola dose intramuscolo. La risposta immunologica Env-specifica, sia cellulare che anticorpale, è stata valutata a diversi tempi nel sangue periferico fino a 11 mesi dalla singola vaccinazione. I dati ottenuti, non ancora pubblicati, confermano i risultati descritti nei modelli murini, indicando che IDLV-Env è un potente ed efficace delivery system in grado di indurre una risposta immunitaria specifica e duratura nel tempo verso l'antigene di interesse.

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. È 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 2013 hanno dimostrato che la strategia vaccinale di "prime-boost" eterologo, basato sulla immunizzazione con IDLV, somministrato una sola volta per via intramuscolare, seguito da immunizzazione per via sublinguale con la proteina insieme a un adiuvante è molto efficiente nell'indurre una completa risposta immunologica, sia cellulare che anticorpale, sia sistemica che mucosale. Infatti è stata evidenziata una persistente risposta umorale e cellulare CD8 antigene-specifica sia a livello sistemico che a livello mucosale fino a 6 mesi dall'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 mesenterici (distali) e nella lamina propria del colon e dell'apparato genitale. Tali linfociti sono polifunzionali, in grado cioè di produrre contemporaneamente più citochine, quali IFN γ e TNF α . Anticorpi IgG specifici diretti verso l'antigene sono stati riscontrati nel plasma degli animali vaccinati. Secrezioni mucosali, quali saliva e lavaggi vaginali, sono state prelevate e saggiate per la presenza di anticorpi specifici. In tutti gli animali vaccinati sono state evidenziate IgA mucosali specifiche dirette contro l'antigene. Tali risposte immunologiche antigene-specifiche sono state comparate con campioni provenienti da gruppi di animali immunizzati con la sola proteina o il solo vettore. In conclusione la strategia vaccinale di "prime-boost" ha indotto una risposta molto potente e completa, duratura nel tempo rappresentando un approccio molto promettente. Ulteriori esperimenti nel modello dei primati non umani saranno necessari per confermare e validare tale approccio.

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

Lo studio preclinico svolto nel 2013 presso il Reparto di "Immunità Anti-infettiva" del Dipartimento MIPI, ISS, è a conclusione della proposta di indagini relative all'induzione di una immunità specifica verso antigeni HIV-1 veicolati mediante virus influenzali ricombinanti del sottotipo H1N1 precedentemente descritti. In particolare, l'impiego del virus WSN/CKG, contenente epitopi della proteina gp160 Env e Gag di HIV-1 inseriti nella emagglutinina virale,

per immunizzare sia topi naive che topi precedentemente vaccinati per via respiratoria con un virus influenzale di differente sottotipo antigenico allo scopo di mimare gli effetti di una pre-esistente immunità al vettore virale, ha avuto le seguenti principali finalità:

a) correlare lo stato di pre-esistente immunità al vettore virale con una sua diminuita capacità di induzione dell'immunità per HIV-1. Ciò costituisce un aspetto di rilevante interesse richiamato dalle molte evidenze a favore del possibile impiego di vettori virali in nuove strategie di vaccinazione per lo sviluppo di vaccini per l'AIDS.

b) determinare quanto una pre-esistente immunità specifica verso proteine interne dei virus influenzali, quali vettori di antigeni HIV, possa influire sul grado di immunità protettiva inducibile con essi attraverso somministrazione nelle distinte mucose respiratoria o genitale.

I risultati ottenuti dimostrano che, diversamente dall'eccellente grado di protezione osservato nei topi naive immunizzati con WSN/CKG sia per via intranasale che vaginale, i topi pre-immuni al virus dell'influenza X-31 (H3N2) non sono protetti in seguito ad immunizzazione per via intranasale con virus eterologo WSN/CKG, nonostante sia rilevabile nella milza una pronta amplificazione di linfociti CD8+ specifici per l'epitopo immunodominante della proteina gp160 Env dopo infezione con virus vaccinia ricombinante vPE16 esprimente la proteina gp160 di HIV-1. Al contrario, topi pre-immuni a X-31 e successivamente immunizzati con WSN/CKG per via vaginale risultano protetti dalla replicazione virale di vPE16 nelle ovaie. Questi dati, sebbene riferiti a studi di protezione da infezione con virus vaccinia ricombinante in un modello murino e non direttamente trasferibili a protocolli di vaccinazione nell'uomo, mettono comunque in evidenza alcune importanti relazioni fondamentali per lo sviluppo di vaccini per l'AIDS che a tutt'oggi sembrano poco recepite e vagliate nei più appropriati contesti clinici. Soprattutto nelle condizioni in cui possano sussistere tracce di un'immunità pre-esistente al vettore, i risultati qui ottenuti rimarcano l'opportunità di effettuare una immunizzazione direttamente sulle mucose genitali nella speranza di indurre un sufficiente numero di cellule memoria effettrici residenti nei tessuti linfatici locali che siano in grado di rispondere prontamente e proteggere da infezione i tessuti genitali drenati dagli stessi linfonodi locali stimolati nella vaccinazione.

Studi condotti in parallelo con il virus ricombinante WSN-Tat, esprimente la proteina chimera HA-Tat Δ 51-59, dimostrano una sua efficiente espressione attraverso la via secretoria classica, sottolineando un certo interesse per tale immunogeno quale potenziale vaccino basato sull'antigene Tat. Nonostante la limitata replicazione del virus WSN-Tat nei tessuti di topi naive, è possibile rilevare una significativa risposta immune specifica a Tat, che tuttavia risulta

sostanzialmente ridotta in topi pre-immuni al virus influenzale. Questi dati indicano nel complesso come l'immunità non neutralizzante specifica per le proteine interne conservate del virus influenzale possa contribuire ad una limitazione della disponibilità degli antigeni HIV-1 veicolati e della loro presentazione mediata da cellule presentanti l'antigene. Tale limitazione potrebbe non sussistere con l'utilizzo di derivati virusomali da virus influenzali ricombinanti per i quali una pre-esistente immunità è ritenuta potenziarne l'immunogenicità.

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

La patogenesi del virus HIV-1 è il risultato di eventi immunologici multipli innescati dagli alti livelli di replicazione virale e la conseguente drammatica deplezione delle cellule T CD4⁺. Estensive conoscenze sono state ormai raggiunte circa la dinamica delle cellule T CD4⁺ nel corso dell'infezione, mentre il contributo delle cellule mieloidi alla patogenesi dell'AIDS rimane relativamente poco chiaro. Le cellule dendritiche (DC) e i monociti/macrofagi rappresentano degli importanti bersagli cellulari dell'infezione da HIV-1.

Scopo principale di questo progetto coordinato dal Reparto di "Immunoregolazione" del Dipartimento di Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare), è stato quello di identificare i meccanismi 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 e fattori contribuisca alle disfunzioni cellulari osservate in pazienti HIV-infetti. L'obiettivo principale degli studi condotti nel 2013 è stato una ulteriore caratterizzazione dei segnali trasdotti dalla glicoproteina di superficie gp120 di HIV-1 in monociti/macrofagi umani, estendendo l'osservazione che questo prodotto virale attiva l'asse STAT3/IL-6 in DC anche in queste cellule, ed evidenziando una nuova via di attivazione di membri della famiglia delle fosfolipasi che in ultimo determina la produzione della chemochina CCL2, un importante regolatore della replicazione di HIV-1 in questo modello cellulare. Lo studio sul profilo di espressione di miR in risposta alla gp120, già condotto in DC, è stato inoltre esteso ad altre cellule bersaglio di HIV-1, le cellule stellate epatiche (HSC), in collaborazione con l'Università di Firenze, individuando alterazioni nei livelli di espressione del miR29b, noto per la sua capacità di regolare l'espressione del collagene di tipo I. In aggiunta, in macrofagi e HSC, è stato evidenziato un coinvolgimento dei Toll-Like Receptors (TLRs) nell'induzione di pathway di trasduzione del segnali e produzione di fattori solubili precedentemente

descritti essere attivati dalla gp120 in macrofagi, così come nella capacità di migrazione e di attivazione di componenti dell'inflammasoma in HSC.

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 2013 gli studi relativi al progetto hanno riguardato il ruolo della CCL2 nella regolazione della replicazione di HIV-1 e dell'espressione di fattori di restrizione cellulari, in modo particolare 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.

Infine, una parte degli studi hanno riguardato lo studio dei meccanismi molecolari responsabili dell'induzione di CCL2 da parte di HIV-1 nel macrofago. In particolare, è stato studiato il ruolo delle fosfolipasi C (PLC) nella cascata di trasduzione del segnale, attivata dall'interazione della glicoproteina di superficie gp120 di HIV-1 con il co-recettore CCR5, coinvolta nella produzione di CCL2.

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:

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.

Sono proseguite per il 2013 le attività di valutazione dello studio di coorte NIA, mirato a valutare efficacia e sulla tossicità a lungo termine di alcuni nuovi farmaci inibitori di HIV (inibitori dell'integrasi, antagonisti del co-recettore CCR5) nella reale pratica clinica. Lo studio, coordinato dall'ISS, interessa circa venti centri clinici su tutto il territorio nazionale. 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 nei quali le comuni terapie hanno perso efficacia terapeutica, hanno permesso le prime valutazioni preliminari, valutazioni che indicano una buona tollerabilità e una favorevole risposta al trattamento, suggerendo che l'introduzione di questi nuovi farmaci sia in grado di migliorare ulteriormente la prognosi a lungo termine nei pazienti con HIV che hanno limitate possibilità terapeutiche. 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.

Nell'ambito di questo progetto, nel 2013 abbiamo anche valutato la presenza e la struttura delle forme circolari di HIV non integrate con 2-LTR. Queste strutture di DNA virale con 2-LTR vengono prodotte in alternativa alle forme integrate ed aumentano quantitativamente nei pazienti trattati con farmaci inibitori dell'integrasi come il Raltegravir. Nonostante i circoli con 2-LTR rappresentino solo una frazione del DNA virale totale presente nel paziente, l'analisi delle sequenze delle giunzioni tra i due LTR rivela informazioni critiche riguardo alla sintesi del DNA retrovirale ed alla natura del virus replicante. L'analisi ha evidenziato che nei pazienti trattati con Raltegravir vi è un significativo aumento delle forme circolari 2-LTR e che la maggior parte delle sequenze giunzionali sono mutate, contenenti delezioni o inserzioni.

Infezioni opportunistiche

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

Durante lo studio del vaccino HPV terapeutico basato sulle particelle lentivirali contenenti gli antigeni tumorali di HPV16, E6 ed E7 legate alla proteina cargo NEF7, abbiamo scoperto che le cellule trasfettate con i plasmidi necessari per la produzione di VLPs producevano anche esosomi con gli antigeni di interesse. Abbiamo quindi proseguito la ricerca utilizzando questi esosomi come sistema di delivery per gli antigeni E6 ed E7 di HPV16, consapevoli di utilizzare un sistema più sicuro perché privo di proteine di HIV-1 ad eccezione della variante mutata NEF7. Gli esperimenti preliminari di immunogenicità effettuati nel topo C57BL/6 nel corso del 2012 avevano dato dei risultati incoraggianti in quanto gli esosomi elicitarono negli animali una potente risposta cellulare mediata simile, e in alcuni casi superiore, a quella generata dalle VLPs NEF-E7 e NEF-E6, usate come confronto. Alla fine del 2012 e nel corso del 2013 sono state prodotte elevate quantità di esosomi ricombinanti contenenti NEF-E7 e NEF-E6, e sono stati effettuati diversi esperimenti nel

modello tumorale di HPV16 in topi C57/BL6, utilizzato il modello tumorale sia in un setting sperimentale di tipo preventivo che di tipo terapeutico. Nella prima serie di esperimenti gli animali sono stati immunizzati con 3 dosi di esosomi contenenti gli antigeni NEF-E7 e NEF-E6, insieme o separati, a distanza di 2 settimane. L'efficacia della vaccinazione si misura dopo l'ultima dose, sfidando gli animali con cellule tumorali HPV-dipendenti, inoculate sottocute nel fianco destro. I risultati hanno dimostrato che solo gli esosomi portatori di NEF-E7 erano in grado di elicitare nel topo una risposta immune in grado di rallentare la crescita del tumore. Nel setting sperimentale di tipo terapeutico l'induzione di una risposta antitumorale nei topi immunizzati con esosomi NEF-E7 è ancora più evidente, perché gli animali con un tumore palpabile di 4 mm, immunizzati con 3 dosi di NEF-E7 a distanza di una settimana, erano in grado di controllare la crescita del tumore, durante più di un mese di osservazione, rispetto ai topi naive o immunizzati con un antigene non correlato al tumore.

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 ed MMP-9, metalloproteasi della matrice che svolgono un ruolo chiave nell'angiogenesi, nell'invasione tumorale e nella metastatizzazione.

Obiettivo del presente progetto è quello di determinare i meccanismi dell'attività antitumorale degli HIV-PI mediante lo studio della modulazione di marcatori dell'angiogenesi, della progressione tumorale, o della risposta immune verso il virus HHV8, un herpes virus considerato l'agente eziologico del KS, in campioni di plasma o tessuti tumorali (raccolti al baseline e dopo trattamento) di pazienti HIV negativi affetti da KS classico arruolati in uno studio clinico "proof-of-concept" sponsorizzato dall'ISS trattati con HIV-PI. Nell'ambito di questo studio, nel corso del 2013 è proseguito il monitoraggio clinico dei 25 pazienti arruolati 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 testoni KS raccolti al baseline, durante il trattamento ed il follow-up post-terapia. Le analisi da condurre su campioni di sangue (PBMC) non congelati [cellule endoteliali circolanti (CEC), numero di cellule T CD4⁺ e CD8⁺, attività NK diretta contro l'HHV8] sono già in corso. Le rimanenti valutazioni (valutazione dei livelli plasmatici/tessutali di MMP, fattori angiogenici; marcatori di immunoattivazione, apoptosi, proliferazione/ciclo cellulare e attività proteo somale; i livelli plasmatici di HHV8, la risposta immune umorale diretta contro HHV8) 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. La modulazione di questi parametri verrà messa in correlazione con la risposta clinica alla terapia e con i livelli plasmatici di Indinavir.

Inoltre, avendo concluso gli studi epidemiologici preliminari alla definizione del disegno dello studio clinico da effettuare in donne affette da CIN ed in attesa di reperire i fondi necessari alla sua conduzione, ci siamo proposti l'obiettivo di effettuare ulteriori studi preclinici per approfondire l'attività degli HIV-PI in vitro ed in vivo in modelli sperimentali di angiogenesi e CIN, e che saranno fondamentali per la precisa definizione di quali marcatori biologici da valutare nell'ambito in futuri studi clinici. Gli studi condotti nel corso del 2013 hanno dimostrato che il blocco dell'invasione e dell'attivazione dell'MMP-2 operato dagli HIV-PI in cellule endoteliali è mediato dall'inibizione dell'espressione del suo maggiore attivatore, MT1-MMP, e che tale effetto è preceduto dall'inibizione del legame del fattore di trascrizione Specific protein (Sp)1 al promotore del gene MT1-MMP nel nucleo di cellule endoteliali.

Studio su anticorpi in formato a singola catena per la prevenzione e il trattamento delle testoni 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 testoni associate a HPV, in particolare nei pazienti sieropositivi per HIV, somministrandoli come molecole purificate o come anticorpi intracellulari (*intrabodies*). Nel corso del 2012, il nostro 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 antiproliferativa *in vitro*, utilizzando un modello murino per tumori da HPV. L'anticorpo è stato espresso intracellularmente 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.

Nel corso del 2013, lo studio del potenziale antitumorale degli *intrabodies* è proseguito con la caratterizzazione di un anticorpo intracellulare in formato scFv contro la proteina E6 di HPV16, selezionato tramite la *Intracellular Antibody Capture Technology* (IACT). *In vitro* questo anticorpo, con caratteristiche di alta stabilità intracellulare, è stato saggiato in cellule HPV16-positivo particolarmente in relazione alla sua capacità di influire su proliferazione, apoptosi e morte cellulare, i principali *pathways* che vedono coinvolto il suo *target* E6. Inoltre, l'analisi della sua attività antitumorale è proseguita *in vivo* con l'osservazione dell'effetto di protezione da tumore nello stesso modello murino utilizzato per l'anticorpo anti-E7. Questi risultati incoraggiano l'uso combinato di *intrabodies* contro le due proteine oncogene di HPV16 allo scopo di ottenere un effetto antitumorale a più ampio spettro e possibilmente sinergico.

Attività di ricerca finanziata da Programmi differenti dal Programma Nazionale AIDS

Queste attività si riferiscono a progetti finanziati dall'ISS o da altre Istituzioni internazionali e nazionali nel 2013, 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 Programmama 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 2013 hanno confermato, nonostante l'adozione di nuove strategie per l'espressione del complesso la difficoltà a coesprimere le due proteine insieme. Pertanto sono allo studio nuove strategie per superare le difficoltà finora incontrate.

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 (parto ,'allattamento al seno) e dopo una viremia iniziale può rimanere in

uno stato di latenza in diversi santuari virali. 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 chiaramente 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 rappresentano un passaggio importante anche per la generazione di interventi terapeutici non invasivi a livello delle mucose od in pazienti già esposti ad HIV. 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 Δ V2-Env (Env delecto della regione V2) di HIV da sole o in combinazione, con particolare riguardo al profile delle sottoclassi di IgG ed al loro ruolo nel controllo dell'infezione. Da questo punto di vista abbiamo dimostrato che il livello di protezione osservato nelle scimmie vaccinate con la proteina Tat di HIV è associato ad anticorpo contro Tat appartenenti alla sottoclasse IgG1 e, anche se in minor grado, IgG3 e IgG3 e ii) la 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: a) sono state generate linee cellulari stabilmente esprimenti antigeni vaccinali (Δ V2 Env e Tat) che possono rappresentare cellule target in un test di ADCC e che possono essere validamente utilizzate oltre ad ELISA, per lo screening di anticorpi a catena singola (scFV) prodotti in vitro come sotto descritto; b) sulla base della produzione di anticorpi in vitro determinati con metodiche immunoenzimatiche abbiamo selezionato due linee cellulari derivanti da scimmie vaccinate con Tat e Δ V2ENV o solo con Tat e protette dopo infezione con virus chimerico HIV/SIV. Partendo da RNA estratto da queste linee cellulari, abbiamo sviluppato una metodologia molecolare per l'amplificazione tramite RT-, DNA-PCR dei frammenti anticorpali (VH/VL) e l'inserimento di VH/VL) in vettori plasmidici per l'espressione in vitro di scFV. Abbiamo creato una libreria e la prosecuzione del lavoro prevede il clonaggio, e la selezione di cloni con metodiche immunoenzimatiche per la selezione dei cloni

mostranti attività di binding verso le proteine Tat e Env di HIV. Un altro approccio alternativo che abbiamo sviluppato si è basato sulla generazione e screening di scFV ricombinanti tramite la “phage display library”. Dopo diverse selezioni, sono stati identificati, clonati e sequenziati due scFV con attività di binding contro la proteina Tat di HIV e che presentano uniche sequenze. La prosecuzione del lavoro prevede il loro inserimento nel vettore di espressione pOPE101-215Yol e la valutazione delle attività di binding e biologiche di questi due scFV.

European AIDS Treatment Network (NEAT)

Progetto finanziato dalla Comunità europea.

Nell’ambito del VI Programma Quadro di Ricerca Europeo [FP6-2005-LIFESCIHEALTH-6, nell’area LSH-2005-2.3.0-1 “HIV/AIDS Therapeutic Clinical trials network - NETWORK OF EXCELLENCE”], la Commissione Europea (VI Programma Quadro – DG Research and Innovation) ha assegnato all’Istituto Superiore di Sanità, in particolare al Dipartimento del Farmaco, il coordinamento di un esteso Network of Excellence sulla ricerca clinica HIV/AIDS in Europa (2007-2012).

Le attività del Network (NEAT – European AIDS Treatment Network) sono focalizzate allo sviluppo di nuovi approcci e strategie terapeutiche (dalle terapie antiretrovirali di combinazione, alle terapie immuno-mediate, al trattamento delle coinfezioni), all’incentivazione delle attività di networking, alla promozione della ricerca traslazionale e alla conduzione di sperimentazioni cliniche multicentriche internazionali di fase III e IV. NEAT interagisce, inoltre, con le autorità regolatorie nazionali ed europee per armonizzare la raccolta dei dati di efficacia e tossicità e contribuisce ad implementare le nuove direttive Comunitarie sulla sperimentazione clinica, ad ottimizzare risorse e infrastrutture e a diffondere tecnologia e norme etiche.

Il Programma comune delle attività del NEAT è strutturato in 4 aree principali:

- A) Funzionamento del Network - prevede le attività di gestione del network, come management, ricerca di fondi, contatti internazionali, tecnologia di informazione e qualità;
- B) Ricerca clinica - conduzione coordinata di attività di ricerca clinica focalizzata in particolare su studi clinici randomizzati;
- C) Promozione dell’integrazione e armonizzazione della ricerca clinica a livello europeo;
- D) Diffusione dell’eccellenza attraverso programmi di formazione.

Il Network coinvolge 44 Istituzioni partner in 16 Paesi Europei, con oltre 350 centri clinici affiliati. La missione di NEAT è quella di rafforzare la capacità europea nella ricerca clinica per il settore HIV. Il network clinico e di laboratorio realizzato costituisce una massa critica di risorse e competenze in grado di promuovere, guidare ed accelerare le attività di ricerca clinica in questo delicato settore, integrando l'attività di ricerca condotta dalle industrie farmaceutiche.

Obiettivo secondario del NEAT è quello di tracciare la roadmap per una durevole revisione del modo di condurre la ricerca clinica nel settore HIV/AIDS in Europa al fine di giungere ad una progressiva e duratura integrazione tra gli stati membri. Nel fare ciò, NEAT prepara il terreno per la realizzazione di un organismo di coordinamento centrale capace di promuovere e condurre programmi di ricerca integrati, indipendenti ed interdipendenti, rafforzando così il concetto di European Research Area.

Nel 2010, NEAT ha continuato le attività di training focalizzate sulla ricerca clinica nel campo dell'HIV/AIDS e mirate soprattutto ai Paesi dell'Europa dell'Est.

Le attività di ricerca clinica sono portate avanti attraverso gli Integration Grants, che comprendono oltre 20 progetti approvati.

Nel 2012 l'attività più rilevante è stata la realizzazione del primo grande trial randomizzato pan-europeo (NEAT-001) che compara due strategie terapeutiche iniziali di trattamento antiretrovirale e che coinvolge 92 siti clinici in 15 paesi della comunità europea. Le due strategie confrontate sono: darunavir/r + raltegravir (strategia innovativa) versus darunavir/r + emtricitabina/tenofovir (terapia standard di riferimento), somministrati per 2 anni. Oltre al "core study", sono stati pianificati 9 sottostudi su aspetti viro-immunologici, metabolici, farmacologici e riguardanti aderenza alle terapie e qualità della vita. Solo in Italia, inoltre, viene condotto un sottostudio di valutazione farmacoeconomica. Lo studio è iniziato nell'ottobre 2010. Nell'ottobre 2011 è stato completato l'arruolamento degli 800 pazienti previsti. In Italia sono stati inclusi 115 pazienti provenienti da 9 centri clinici. L'ISS partecipa attivamente alla gestione dello studio, sia con una partecipazione nel Trial Management team e nel Trial Steering Committee, sia con il coinvolgimento delle persone HIV positive nei 9 centri clinici partecipanti. Nel 2012, come previsto dal piano statistico, è stata condotta un'analisi statistica preliminare a 48 settimane di follow up. I risultati dell'analisi sono stati valutati dall'IDMC (comitato indipendente di esperti per la valutazione della safety) del NEAT 001, che non ha rilevato problemi di sicurezza in nessuno dei due trattamenti e ha raccomandato la continuazione dello studio fino alla sua fine naturale. Lo studio è terminato, come previsto, nell'ottobre 2013, quando l'ultimo paziente arruolato ha ultimato i 2 anni di trattamento. Negli

ultimi due mesi è iniziata l'analisi statistica del "core trial", con l'obiettivo di inviare un abstract alla CROI Conference di Boston, marzo 2014 (deadline per la sottomissione degli abstract: gennaio 2014).

È stato realizzato il Sito web che descrive le attività di NEAT, oltre che dare un continuo aggiornamento sulle novità nel mondo della ricerca sull'HIV/AIDS (www.neat-noe.org).

Infine, nel 2010, è iniziato, in ambito NEAT, uno studio osservazionale sull'epidemiologia, il decorso naturale e le strategie di trattamento dei pazienti HIV positivi con co-infezione da epatite C in Europa. Questo gruppo collaborativo ha prodotto una imponente quantità di lavori scientifici, oltre che linee-guida europee sul trattamento dell'infezione acuta da HCV in pazienti HIV+.

EARNEST Trial

Progetto finanziato dalla European Developing Countries Clinical Trial Partnership

L'Istituto Superiore di Sanità è uno dei 5 partner europei partecipanti al trial EARNEST (Europe – Africa Research Network for Evaluation of Second-line Therapy), finanziato dall' EDCTP (European Developing countries Clinical Trials Partnership) e coordinato dal Medical Research Council (UK). Lo studio ha l'obiettivo di valutare diverse strategie per la seconda linea di terapia rivolta a pazienti con infezione da HIV nei paesi in via di sviluppo. È stato, infatti, ritenuto prioritario in questo momento condurre un trial strategico con questo obiettivo, dal momento che la necessità di un trattamento di salvataggio aumenterà considerevolmente nel prossimo futuro, in considerazione del gran numero di pazienti che iniziano in questi anni una terapia antiretrovirale nei paesi con risorse limitate. Inoltre, il recente sviluppo di nuove classi di farmaci ha aumentato le possibilità di disegnare regimi terapeutici potenzialmente efficaci.

Il trial ha arruolato, tra l'aprile 2010 e l'aprile 2011, 1200 pazienti in fallimento (in base a criteri clinici e immunologici) con l'obiettivo di valutare l'efficacia di 2 regimi innovativi (inibitore della proteasi + inibitore della integrasi o inibitore della proteasi in monoterapia) nei confronti di una terapia standard (2 analoghi nucleosidici + un inibitore della proteasi). I pazienti sono stati seguiti per 144 settimane e l'endpoint principale era rappresentato dalla proporzione dei pazienti nei vari bracci dello studio con risposta clinica e immunologica. Lo studio ha avuto anche l'obiettivo di creare un network per la conduzione di trial clinici nei siti partecipanti (7 siti in 3 paesi dell'Africa sub-sahariana: Uganda, Zimbabwe e Malawi).

I primi risultati (ottenuti alla 96° settimana di follow-up) dimostrano che il regime contenente un inibitore della proteasi + un inibitore dell'integrasi ed il regime standard hanno avuto un'efficacia

simile con 64% e 60% dei soggetti rispettivamente con soddisfacente risposta alla terapia, mentre il regime di monoterapia con un inibitore della proteasi ha avuto un'efficacia significativamente inferiore.

Nell'ambito del trial, l'ISS, oltre a partecipare al Coordinamento generale dello studio, è anche co-responsabile (insieme ai membri del team di uno degli ospedali ugandesi) del sotto-studio sulle secrezioni genitali che ha l'obiettivo di determinare, nei vari gruppi di trattamento, l'impatto virologico (in termini di replicazione virale e profilo di resistenze) e i livelli dei farmaci nelle secrezioni genitali. Il protocollo del sotto-studio è stato definito e approvato dal Comitato Etico Nazionale Ugandese (paese dove è stato effettuato il sotto-studio). Nel 2013 è stato completato l'arruolamento dei pazienti nel sottostudio. Complessivamente sono stati arruolati 124 pazienti (97 donne e 27 uomini). I campioni delle secrezioni genitali sono stati raccolti alla 96° settimana di trattamento. I campioni verranno quindi inviati presso il laboratorio del Dipartimento del Farmaco dell'ISS dove verranno effettuate le valutazioni virologiche e di farmacocinetica.

Finanziamenti Nazionali

Patient Reported Outcomes (PROs)

Progetto finanziato dalla Ricerca corrente ISS.

L'attività di ricerca sui PROs (esiti riferiti dal paziente) ha l'obiettivo di utilizzare gli outcomes paziente-centrati come parametri di valutazione della salute e degli esiti di interventi sanitari, sia nella ricerca che nella pratica clinica. In quest'ambito rientra la costruzione e la validazione di una scala di sintomi (ISS-HIV-Symptoms-Scale) concepita in base all'ipotesi, già dimostrata in numerosi studi, che un efficace controllo della sintomatologia possa migliorare la qualità di vita dei pazienti con HIV. L'attività finora svolta si è sviluppata in diverse fasi, attraverso revisioni accurate della letteratura, confronti tra esperti nel settore, focus group con i pazienti, fino alla stesura definitiva della lista e a un suo primo impiego nella pratica clinica. Nel 2013 è proseguita la raccolta dei dati per confermare la validità psicometrica dello strumento nell'individuare i sintomi che maggiormente incidono sulla qualità della vita di questi pazienti.

Studio NIAQoL

Progetto finanziato dal Ministero della Salute