

una correlazione inversa tra i livelli di IP-10 e la conta totale delle cellule CD4+. Inoltre in alcuni pazienti si è rilevato un aumento dei livelli di IP-10 al secondo prelievo rispetto a quello all'arruolamento e la contemporanea diminuzione delle cellule CD4+, nonostante i pazienti fossero stabilmente soppressi virologicamente durante le fasi dello studio.

Diventa quindi importante monitorare nei pazienti stabilmente soppressi virologicamente la carica virale, la conta delle cellule T CD4+ e soprattutto i livelli plasmatici del biomarcatore IP-10 che potrebbero aiutare a rilevare la popolazione a rischio di progressione in AIDS.

### **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, condotto dal Centro Nazionale per la Ricerca su HIV/AIDS, 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 HIV-infetti in trattamento HAART, arruolati in 11 centri clinici in Italia (ISS T-002). I risultati finali 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), attivato nel 2011 e concluso nel 2016, con l'obiettivo di estendere il follow-up dei pazienti che hanno preso parte allo studio di fase II. 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. I dati preliminari indicano il permanere di anticorpi anti-Tat fino a 365 settimane dalla prima immunizzazione, l'incremento persistente nel tempo dei linfociti T CD4+ e la riduzione significativa e persistente del DNA provirale, che è risultato non rilevabile in una o più determinazioni nel 33% dei pazienti arruolati.

**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. Centro Nazionale per la Ricerca su HIV/AIDS.* Il Programma, implementato 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, prevede 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 è stato 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.

Componente 1: L'intervento, a supporto dei piani strategici nazionali e provinciali, prevede il coinvolgimento dei "Department of Health" provinciali e delle Comunità locali nelle seguenti Province: i) Gauteng, Distretto Sanitario "Tswane 1"; ii) Eastern Cape, Distretto Sanitario "OR



Thambo”; iii) Mpumalanga, Distretto Sanitario “Ehlanzeni”, Distretto Sanitario “Gert Sibande”, Distretto Sanitario “Nkangala”; iv) KwaZulu Natal (KZN), Distretto Sanitario “Umzinyathi”.

L'intervento è stato attuato mediante l'implementazione di 3 direttive:

A. Fornitura di equipaggiamento volto a:

- Rafforzare l'assistenza medica quotidiana attraverso fornitura di piccole attrezzature cliniche.
- Favorire il raggiungimento degli Standard Nazionali (National Core Standards).
- Potenziare l'archiviazione e la gestione delle cartelle cliniche e dei “registri ART”.
- Potenziare l'informatizzazione dei dati, tramite la fornitura di computer, hard-driver e software.

B. Mobilizzazione di risorse umane: personale medico e paramedico.

Il Programma ha provveduto al reclutamento e alla dislocazione presso le cliniche pubbliche di personale locale specializzato in supporto al Sistema Sanitario Distrettuale, ed in particolare:

- 4 medici e 2 assistenti sociali nei distretti sanitari delle Province di Mpumalanga e dell'Eastern Cape; il personale è stato organizzato in “team mobili” per il supporto alle Health Facility più disagiate.
- 10 “Data Capturers” nel distretto OR Thambo (Eastern Cape) con l'obiettivo di potenziare la raccolta dei dati nel quadro del Sistema Informativo Sanitario Distrettuale (DHIS).

C. Addestramento e Formazione Professionale mediante l'organizzazione di corsi volti a:

- Qualificare il personale infermieristico per la somministrazione della terapia anti-retrovirale (corsi NIMART – Nurse Initiated Management of ART).
- Aggiornare e formare personale medico ed infermieristico nei seguenti settori: management dell'infezione da HIV; management della terapia antiretrovirale e dell'aderenza alla terapia; controllo della Tubercolosi e delle malattie sessualmente trasmesse; qualificare e certificare il personale medico e infermieristico nella dispensazione dei farmaci.

La Componente 1 del Programma prevede inoltre la creazione di una piattaforma clinica e laboratoristica per la conduzione di ricerca clinica nel settore pubblico. In questo contesto, è stata potenziata una Unità di Ricerca Clinica (MeCRU, Università di Limpopo Medunsa Campus) nella



provincia del Gauteng ed è stata sviluppata una nuova Unità di Ricerca Clinica (WSUHVRU; Università di Walter Sisulu) nella regione di Mthatha (Provincia dell'Eastern Cape). Le Unità di Ricerca Clinica sono state fornite di laboratori attrezzati e Farmacia ed il personale formato secondo *Good Clinical Practice* (GCP) e *Good Clinical Laboratory Practice* (GCLP). La piattaforma clinico-laboratoristica è stata realizzata mediante l'integrazione 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.

Nel corso del 2016, è stato completato l'intervento volto al raggiungimento degli standard di qualità nazionali per quanto concerne le sale di attesa e le farmacie delle cliniche pubbliche nelle aree di progetto ed al rafforzamento del sistema informativo sanitario distrettuale.

Componente 2. L'intervento, volto a generare e sedimentare nel paese capacità per la produzione di vaccini ricombinanti per uso umano, prevede la fornitura di risorse, formazione e trasferimento tecnologico in supporto allo sviluppo della struttura GMP presso "BIOVAC", a Città del Capo (Provincia del Western Cape). L'intervento si è concluso con la realizzazione della struttura GMP ed il completo trasferimento della tecnologia per la produzione della proteina Tat, il cui processo produttivo è stato riprodotto con successo presso BIOVAC. Nel 2014 sono proseguiti le attività volte alla certificazione della struttura produttiva GMP di vaccini BIOVAC da parte del Medicines Control Council (MCC). In particolare, è stata eseguita una visita di valutazione presso BIOVAC da parte di un esperto WHO in preparazione alla ispezione MCC. La visita di valutazione MCC si è conclusa con la relazione valutativa inviata a BIOVAC per l'implementazione di alcune raccomandazioni. BIOVAC è ora impegnata nella produzione di lotti riproducibili di prodotti GMP. Si è ora in attesa della certificazione GMP da parte di MCC.

Componente 3. L'intervento prevede la conduzione del trial vaccinale terapeutico di fase II basato sulla proteina Tat (ISS T-003) presso l'Unità di Ricerca MeCRU (Gauteng Province, South Africa), l'analisi dei dati e la diffusione dei risultati conseguiti. A questo scopo, sono state espletate tutte le attività preparatorie (formazione, attività regolatorie - ivi incluse la sottomissione dei protocolli ai comitati etici e ad MCC – potenziamento delle strutture, finalizzazione delle "standard operational procedures" (SOP), simulazione di tutte le attività, importazione, stoccaggio e distribuzione del vaccino a MeCRU, rilascio dell'autorizzazione per l'invio di campioni biologici in Italia presso il



“Core Lab ISS/IFO Joint Unit” per le analisi di laboratorio durante la fase di screening dei volontari e le determinazioni di prima e seconda linea durante le fasi successive dello studio. Il trial vaccinale ISS T-003 (in doppio cieco controllato da placebo) ha avuto inizio nel Febbraio 2012 in 200 pazienti HIV+ in trattamento con HAART ed è stato completato nel 2014. Nel 2015 è stato inviato alle autorità competenti il report finale dello studio. La “Contract Research Organization” locale “Triclinium” è stata ingaggiata per il monitoraggio delle procedure di esecuzione, nonché per il supporto allo sponsor nella conduzione del trial. L’analisi dei dati conferma che il vaccino è sicuro ed immunogenico e promuove la ricostituzione del sistema immune anche in pazienti con differente background genetico ed infettati da un virus di sottotipo diverso.

Nell’autunno 2016 si è concluso uno studio osservazionale di follow-up (ISS T-003 EF-UP) iniziato nel 2015, con l’obiettivo di valutare la persistenza degli effetti immuno-virologici indotti dall’immunizzazione con la proteina Tat nei volontari che avevano aderito allo studio ISS T-003.

### **Studi clinici di fase II per il trattamento del sarcoma di Kaposi con gli inibitori della proteasi di HIV**

*Progetto finanziato dal Ministero della Salute e da AIFA. Centro Nazionale per la Ricerca su HIV/AIDS.*

Il Progetto è condotto dal Centro Nazionale per la Ricerca su HIV/AIDS ed è volto ad implementare una piattaforma preclinica e clinica per valutare la sicurezza e l’efficacia degli inibitori della proteasi di HIV (HIV-PI) nella terapia dei tumori. Dopo l’introduzione delle nuove terapie anti-retrovirali combinate (HAART) contenenti gli inibitori della proteasi di HIV (HIV-PI) è stata osservata una riduzione dell’incidenza dei tumori associati ad HIV, incluso il sarcoma di Kaposi (KS), i linfomi non-Hodgkin e le neoplasie intraepiteliali della cervice uterina (CIN) come anche una regressione dei tumori nei soggetti che ne erano già affetti. Con l’avvento dell’HAART è stata inoltre registrata una significativa riduzione di ricorrenza di CIN dopo asportazione chirurgica nelle donne sieropositive. Questi effetti della terapia HAART non sono interamente spiegabili con la ricostituzione immunologica promossa con il trattamento antiretrovirale, ed è oggi ampiamente documentato che la HAART esercita effetti anti-tumorali 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 anti-tumorali 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 (IND) in pazienti con sarcoma di Kaposi classico (CKS) non infettati da HIV. I risultati della sperimentazione hanno indicato che il trattamento con IND 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. E' stato perciò avviato uno studio di fase II volto a valutare il trattamento del CKS avanzato con IND 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 ha ricevuto un finanziamento nell'ambito della ricerca indipendente sui farmaci promossa dall'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA) ed un finanziamento nell'ambito del Programma Nazionale AIDS del Ministero della Salute. Nel corso del 2016 è stata completata la fase di monitoraggio post-terapia dei pazienti arruolati ed è stato inviato alle autorità competenti il report finale dello studio, che ha dimostrato l'attività anti-tumorale degli HIV-PI anche in pazienti con CKS avanzato.

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

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

Il progetto, coordinato dal Centro Nazionale per la Salute Globale, prevede lo sviluppo di un vaccino basato su un nuovo e sicuro sistema di veicolazione dell'antigene di HIV in grado di indurre una risposta immunologica forte e persistente nel tempo. Tale vettore lentivirale integrasi-difettivo (IDLV) esprimente Env di HIV è in grado di stimolare una forte risposta immunologica antigene-specifica in diversi modelli preclinici. Questo progetto prevede di immunizzare primati non umani (NHP) con IDLV esprimenti antigeni di HIV e di valutare la risposta immunologica sia cellulare che anticorpale. Nell'ambito di questo progetto, nel 2016 abbiamo selezionato un IDLV basato sul SIV, più efficiente nella trasduzione di cellule dendritiche (DC) di scimmia se confrontato con IDLV



basati su HIV-1, e che risulta quindi migliore anche per saggiare l'efficacia di questi vaccini in NHP. Lo stesso esperimento ripetuto su DC umane ha dato un risultato analogo, cioè il vettore IDLV basato su SIV risulta più efficiente nella trasduzione di DC umane rispetto al vettore IDLV basato su HIV. Per verificare che entrambi gli IDLV basati su SIV e HIV-1 siano egualmente efficienti nel modello murino, abbiamo immunizzato topi BALB/c con SIV-IDLV e HIV-IDLV esprimenti la proteina GFP. Dopo un mese dall'immunizzazione abbiamo valutato la risposta antigene-specifica mediante la misurazione del rilascio di citochine con il saggio ICS (intracellular staining). Poiché i risultati hanno dimostrato che la risposta antigene specifica era simile, è stato scelto di utilizzare per gli esperimenti successivi i vettori basati su SIV per la loro migliore efficienza di trasduzione delle cellule di NHP e umane. Per immunizzare i NHP sono quindi stati costruiti IDLV basati su SIV esprimenti proteine di HIV-1. L'espressione della proteina Env di HIV è stata valutata mediante ELISA in vitro in seguito alla trasduzione di cellule 293T e DC.

Nel contesto di un vaccino efficace, oltre all'induzione di anticorpi diretti verso la proteina Env, è di cruciale importanza generare cellule T effettive specifiche per geni strutturali di HIV-1 quali la proteina Gag. Per questo motivo stiamo costruendo IDLV esprimenti antigeni mosaico Gag-Pol di HIV.

### **CCL2/CCR2 blocking: molecular insights into a potential therapeutic strategy against HIV Replication**

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

La terapia antiretrovirale combinata (cART) attualmente disponibile per i pazienti con AIDS ha rappresentato un grosso passo avanti nella ricerca nel campo dell'HIV, determinando una drastica riduzione della mortalità e la cronicizzazione della malattia. La cART però non rappresenta una cura, poiché nei pazienti trattati il virus persiste in serbatoi cellulari e anatomici, e l'interruzione della terapia determina l'aumento della viremia. Questo problema, insieme a altri fattori, quali la tossicità e le difficoltà di aderenza associate alla terapia a lungo termine, e l'insorgere di resistenze virali rendono necessario lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche che consentano trattamenti più brevi e maggiormente sostenibili anche dal punto di vista economico. Inoltre, la cART non è in grado di eliminare l'attivazione del sistema immunitario e l'infiammazione, che rappresentano



fattori che contribuiscono alla persistenza del virus e alle comorbosità associate all'infezione da HIV. Il progetto, coordinato dal Centro per la Salute Globale, prevede di definire i meccanismi alla base del ruolo patogenetico della chemochina pro-infiammatoria CCL2 nell'infezione da HIV, ponendo così le basi per una terapia per l'AIDS basata sul blocco di questo fattore. La valutazione del potenziale terapeutico del blocco dell'asse CCL2/CCR2 per il controllo dell'infezione da HIV permetterà di porre le basi per una applicazione clinica di questo approccio. Gli obiettivi specifici prevedono: i) definire il ruolo della CCL2 nella regolazione dell'espressione e della funzione di fattori di restrizione dell'ospite già identificati e l'impatto sulla replicazione e sulla trasmissione di HIV; ii) identificare nuovi fattori regolati dalla CCL2 nelle cellule infettate da HIV mediante studi di genomica "high-throughput"; iii) investigare l'effetto antivirale dell'inibitore di CCR5/CCR2 Cenicriviroc mediato dal blocco di CCR2/CCL2. Nel corso del 2016 gli studi relativi al progetto hanno riguardato la valutazione dell'effetto del blocco in vivo dell'asse CCL2/CCR2 in pazienti HIV-1 infetti trattati con un nuovo farmaco, il Cenicriviroc, antagonista di CCR2 e CCR5, nell'ambito di uno studio clinico di fase IIb (NCT0133888). In particolare, abbiamo condotto un'analisi longitudinale dell'espressione di fattori di restrizione su campioni derivati dallo stesso paziente prima dell'inizio del trattamento e dopo 4, 12, 24, e 48 settimane di trattamento. I dati ottenuti indicano un aumento di espressione del fattore di restrizione APOBEC3A dopo trattamento con Cenicriviroc rispetto al basale, con una variabilità dipendente dal tempo e dal paziente. Questo aumento è significativo dopo 48 settimane di trattamento rispetto sia al basale che ai pazienti di controllo trattati con terapia convenzionale.

#### **Progetto CASA (progetto di ricerca operazionale)**

*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 operazionale, il cui obiettivo è l'ottimale utilizzo delle risorse disponibili per una maggiore efficacia degli interventi.



Il primo paese coinvolto nel progetto è l'Etiopia. Il contributo italiano alla lotta alla povertà è stato, in Etiopia, di notevole rilevanza, con interventi in settori di cruciale importanza, come l'istruzione, l'energia e l'organizzazione dei servizi sanitari. La lotta all'epidemia HIV/AIDS in Etiopia rientra negli obiettivi prioritari che il nostro paese intende perseguire.

Il progetto CASA è in linea con le priorità sanitarie stabilite dal Governo Etiope, che riconosce una stretta correlazione tra miglioramenti in campo sanitario e sviluppo economico del paese.

Lo studio ha l'obiettivo generale di contrastare la diffusione dell'infezione da HIV e l'insorgenza delle principali patologie ad essa associate. 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.

Sono attesi risultati in termini di maggiore competenza del personale sanitario, aumento della retention in care del paziente e maggiore abilità del personale sanitario nella raccolta dei dati epidemiologici nel corso della comune pratica clinica.

Studio di coorte. Nel 2016 l'Istituto ha proseguito l'attività di coordinamento relativa alla raccolta multicentrica di dati epidemiologici su pazienti con HIV che hanno intrapreso il trattamento antiretrovirale. I pazienti arruolati nel 2016 sono stati oltre 200, per un totale che ha superato le 2000 unità alla fine dello stesso anno. I dati raccolti nel 2016 hanno consentito una seconda valutazione della retention (la prima pubblicata lo scorso anno su PlosOne), i cui risultati sono stati proposti ad una rivista scientifica per una prossima pubblicazione.

Attività di formazione. Si riporta una sintesi delle attività formative svolte nel 2016, con relativi risultati. I risultati si riferiscono al livello di formazione (valutato attraverso prove d'esame) raggiunto dagli operatori sanitari che avevano seguito e completato i corsi previsti.

1. *Corsi di formazione* (aprile 2016 - settembre 2016). Il programma ha previsto un'articolata attività di training rivolta a due distinte categorie di operatori sanitari: (1) personale sanitario, prevalentemente infermieristico e (2) membri di Associazioni dei pazienti (community health workers, CHWs). I corsi vertevano su temi analoghi ("Comunicazione" e "Aspetti clinici dell'infezione da HIV"), ma trattati in maniera diversa e con diverso grado di approfondimento



a seconda delle figure professionali destinatarie. Per la verifica dei benefici ottenuti, sono state svolte prove d'esame (scritte e orali) presso l'Adishundum Medical Center di Mekelle nell'ottobre 2016. Il superamento degli esami è stato ufficialmente riconosciuto dal Tigray Health Bureau (THB) e adeguatamente certificato. Coloro ritenuti particolarmente abili e motivati, hanno invece ottenuto dal THB diversa certificazione (accomplishment), comprovante idoneità e attitudine ad una futura attività di trainer. Le Commissioni esaminatrici erano composte da esponenti delle tre Istituzioni partner nel progetto (THB, MU e ISS).

2. *Workshop su “Communication & health information literacy”.* Nel corso del seminario sono stati ufficialmente avviati i corsi di formazione per operatori sanitari e CHWs. L'incontro ha fornito spunti di riflessione sulla necessità di migliorare la comunicazione con il paziente ed acquisire elementi sui principali aspetti clinici dell'infezione da HIV.

3. *Workshop sulle comorbidità nell'infezione da HIV.* Seminario di aggiornamento sulle principali comorbidità nei pazienti con HIV/AIDS. Un problema di salute globale, legato all'instaurazione sempre più frequente di malattie croniche non trasmissibili in questi pazienti.

L'ISS ha inoltre continuato a fornire attrezzature essenziali, materiali di consumo e supporto tecnico adeguati allo sviluppo del progetto.

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

*Progetto privo di Finanziamento nel 2016. Proposto per il finanziamento 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 anti-Herpes 1 e 2. Infatti, nonostante i progressi scientifici ed i numerosi tentativi fatti, non esiste ad oggi un vaccino preventivo o terapeutico contro Herpes simplex di tipo 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2) che può essere causa di gravi patologie nell'infante e nel soggetto immunodepresso o immunodeficiente, incluso l'anziano. Inoltre la cronicità delle infezioni erpetiche in generale, che ciclicamente vanno incontro a riattivazioni, è ritenuta un fattore importante nell'immunosenescenza e nell'invecchiamento stesso della persona infetta. Benché sia ancora controverso, si ritiene che la risposta cellulare linfocitaria, ed in particolare la risposta citotossica dei linfociti T CD8+ (CTL) , sia determinante nel controllo ed eventuale eradicazione dell'infezione erpetica.

Nostri studi hanno dimostrato che la proteina Tat ha importanti attività immunomodulatorie che comprendono: i) l'induzione dell'attivazione e maturazione di cellule dendritiche verso un fenotipo



capace di indurre risposte di tipo Th1 (richieste per l'induzione di risposte antivirali e CTL); ii) la modulazione dell'attività proteolitica dell'immunoproteasoma che si traduce nell'aumento del numero degli epitopi antigenici riconosciuti da CTL, potenzialmente rilevanti per la protezione.; iii) l'aumento del rilascio da parte di CTL anti-herpes di fattori solubili importanti per la risposta antivirale quali IFNg, granzyme B e IL2; iv) l'aumento di linfociti T CD8+ memoria effettori anti-herpes che nell'uomo sono associati al controllo dell'infezione (fase asintomatica); l'aumento in linfociti T CD8+ attivati dell'espressione di T-bet, Eomes, Blimp-1 e BCL2, geni associati alla fase asintomatica dell'infezione.

Pertanto, un ceppo HSV-1 è stato attenuato o reso non replicante ed ingegnerizzato per esprimere la proteina Tat di HIV-1. Il vettore attenuato è stato inoculato in due diversi ceppi di topi ed in entrambi è stata dimostrata l'induzione di CTL contro un più ampio spettro di epitopi virali e la protezione contro l'infezione con una dose letale di un ceppo erpetico patogeno. Questi dati indicano che l'inclusione di *tat* in vettori erpetici HSV, attenuati e/o incompetenti per la replicazione rappresenta una strategia nuova e molto promettente per lo sviluppo di un vaccino antierpetico preventivo o terapeutico, che potrebbe essere applicata anche ad altre infezioni erpetiche quali quelle da EBV, CMV, VZV.

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

*Progetto privo di finanziamenti per il 2016. Proposto per il finanziamento nell'ambito della Ricerca Finalizzata – Ministero della Salute. Centro Nazionale per la Ricerca su HIV/AIDS.*

Benché l'uso di farmaci antiretrovirali nella terapia dell'infezione da HIV risulti nella soppressione della replicazione virale e della carica virale, il virus persiste indefinitamente nei così detti *reservoir* (serbatoi) di virus latente. In questi comparti, HIV è presente in forma di DNA virale silente integrato (*DNA provirale*) o non integrato (*DNA extra-cromosomico*) nel genoma della cellule ospite. Le cellule T CD4+ "memoria" e "helper" follicolari costituiscono i principali *reservoir* di *DNA provirale*. Macrofagi e cellule dendritiche sono, inoltre, in grado di accumulare e conservare particelle virali di HIV per lunghi periodi di tempo e rappresentano, pertanto, ulteriori importanti serbatoi di virus. I *reservoir* vengono generati assai precocemente nell'infezione e sono insensibile alla terapia, in quanto i farmaci antiretrovirali inibiscono solo il virus replicante. I *reservoir* persistono pertanto indefinitamente, anche dopo l'inizio della terapia cART. I serbatoi di virus



latente non sono statici ma, al contrario, vanno incontro ad un processo dinamico di continua deplezione e ri-approvigionamento (*replenishment*) di cellule latentemente infettate. Questo processo dinamico assicura al virus il costante ed indefinito equilibrio dei serbatoi virali, anche nei soggetti in trattamento con i farmaci antiretrovirali. Si ritiene che la continua deplezione di cellule *reservoir* sia prevalentemente determinata dalla loro naturale caducità e dalla riattivazione spontanea del virus. Il virus latente è infatti accumulato in cellule dall'*emivita* assai elevata ma non illimitata. Inoltre, la riattivazione di HIV causa effetti *citopatici* che portano a morte la cellula ospite. Benché la riattivazione di HIV possa avvenire anche in assenza di effetti *citopatici*, particolarmente in macrofagi e cellule dendritiche, l'espressione del virus espone la cellula ospite all'azione eradicante delle cellule T CD8+ citotossiche (CTL). Pertanto, la morte naturale (caducità) e la riattivazione di HIV sono i principali meccanismi di deplezione dei reservoir. Si ritiene che il *replenishment* dei *reservoir* sia determinato dai seguenti fattori: proliferazione omeostatica delle cellule T infettate volta a reintegrare la deplezione per morte cellulare, espansione di cloni di cellule T infettate latentemente, produzione di virus infettante in seguito a riattivazione di HIV latente, replicazione/re-infezione residua in compatti caratterizzati da concentrazioni sub-ottimali di farmaci (tessuto linfatico). Studi recenti indicano, inoltre, che le cellule endoteliali promuovono attivamente sia la replicazione produttiva che la latenza di HIV in cellule T CD4+ non attivate (*resting T CD4+ cells*). Le cellule endoteliali sembrano, pertanto, svolgere un ruolo chiave sia nella creazione dei serbatoi di latenza che nel loro continuo *approvigionamento*.

Allo scopo di eradicare i *reservoir* virali, sono state recentemente approntate specifiche strategie basate sulla somministrazione di composti in grado di riattivare HIV in pazienti trattati con farmaci antiretrovirali per prevenire la re-infezione (strategie *shock-and-kill*). I trials clinici controllati effettuati per verificare queste terapie hanno tuttavia prodotto risultati insoddisfacenti. Per contro, i trial vaccinali di fase II condotti in Italia e Sud Africa hanno indicato che la vaccinazione terapeutica con il vaccino Tat induce una significativa riduzione del DNA provirale nel sangue. I pazienti in follow-up hanno infatti mostrato un riduzione >70% del DNA provirale. In particolare, a otto anni dalla vaccinazione, il DNA provirale è sceso al di sotto della soglia di rilevazione in una o più misurazioni nel 33% dei pazienti. Questi risultati aprono nuove prospettive per l'allestimento di terapie "funzionali" e per l'eradicazione del virus. Il progetto si propone pertanto di chiarire i meccanismi con cui il vaccino Tat agisce sui *reservoir* virali, allo scopo di identificare nuove cure contro HIV in grado di "attaccare" i serbatoi di virus latente. In particolare, gli obiettivi del progetto sono i seguenti:



1. Valutare gli effetti di Tat sulla riattivazione di virus latente. Studi recenti indicano che Tat sia in grado di riattivare HIV in cellule T CD4+ senza indurre attivazione cellulare ed effetti citopatici, ovvero senza danni per la cellula *reservoir*. Ciò configura, pertanto, un meccanismo per l'indefinito mantenimento ed accrescimento dei *reservoir*. Il vaccino Tat potrebbe bloccare questo meccanismo poiché è in grado di indurre anticorpi anti-Tat neutralizzanti. Questa parte degli studi verrà condotta aggiungendo Tat a cellule infettate latentemente o isolate da pazienti trattati e misurando la produzione di virus, parametri di attivazione cellulare e la sopravvivenza delle cellule trattate in presenza-assenza di anticorpi anti-Tat.
2. Valutare gli effetti di Tat nella replicazione di HIV nei comparti ove i farmaci antiretrovirali raggiungono concentrazioni subottimali. La replicazione/infezione “residua” di HIV in questi comparti è estremamente limitata ed i livelli viremici raggiunti nei pazienti sono identificabili solo con saggi ad elevatissima sensibilità. Pertanto, l'infezione procede in questi comparti a dosi di virus (molteplicità di infezione) assai basse e sub-ottimali. I nostri dati indicano che Tat lega Env sulla superficie del virus, formando un complesso di entrata in grado di favorire l'infezione a bassa molteplicità di infezione. Questo meccanismo potrebbe pertanto essere chiave per la capacità di HIV di infettare cellule target in presenza di dosi sub-ottimali di farmaci e per il costante approvvigionamento dei *reservoir*. Questi studi verificheranno la capacità di anticorpi anti-Tat di bloccare l'infezione Tat-mediata in presenza di concentrazioni sub-ottimali di farmaci antiretrovirali in vari modelli cellulari.
3. Valutare il ruolo di Tat nell'induzione della replicazione produttiva e della latenza di HIV in cellule T CD4+ da parte di cellule dendritiche, endoteliali e monociti/macrofagi. I nostri studi e studi di altri gruppi di ricerca hanno dimostrato che Tat svolge un ruolo chiave nel *cross talk* tra cellule endoteliali e monociti/macrofagi, cellule dendritiche, e cellule T CD4+. Pertanto, verranno studiati gli effetti di Tat sull'infezione di cellule endoteliali e sulla trans-infezione e la trasmissione di HIV da parte di cellule endoteliali a monociti/macrofagi, cellule dendritiche, e cellule T CD4+. L'effetto di anticorpi anti-Tat verrà studiato anche in questi modelli di infezione.



**Studi preclinici e clinici sugli effetti anti-angiogenici ed anti-tumorali degli inibitori della proteasi di HIV nella prevenzione dello sviluppo e progressione del carcinoma della cervice uterina**

*Studio privo di finanziamenti per il 2016. Proposto per il finanziamento nell'ambito della Ricerca Finalizzata – Ministero della Salute. Centro Nazionale per la Ricerca su HIV/AIDS.*

Nonostante l'introduzione dello screening di prevenzione di massa, il carcinoma cervicale invasivo (CC) è il terzo tumore più frequente nelle donne a livello mondiale e il primo in Africa, rappresentando una causa importante di morbosità e mortalità. Il rischio di sviluppo CC è fortemente aumentato dall'infezione persistente di cellule epiteliali cervicali con ceppi di papillomavirus umano (HPV) ad alto rischio oncogenico (HR), l'agente causale del CC. È importante sottolineare che una frazione significativa di CC è causata da ceppi HR-HPV non coperti dai vaccini HPV attualmente in uso, e che lesioni displastiche della cervice uterina (CIN) possono progredire in CC invasivo nonostante trattamento chirurgico. La terapia del CIN/CC potrebbe quindi trarre notevoli benefici da interventi farmacologici efficaci, volti a colpire bersagli mirati.

L'incidenza e l'aggressività del CIN sono particolarmente drammatici in donne co-infettate da HIV/HPV. Nelle pazienti HIV+, tuttavia, le nuove terapie antiretrovirali combinate (cART) hanno ridotto la comparsa di lesioni CIN o la loro progressione in CC. In tale contesto numerosi dati preclinici e clinici indicano che farmaci antiretrovirali appartenenti alla classe degli inibitori della proteasi di HIV (PI) esercitano effetti diretti anti-angiogenici e anti-tumorali contro diversi tumori, compreso il CC, indipendentemente dalla loro attività anti-HIV, indicando che questi farmaci potrebbero rappresentare nuovi candidati anti-tumorali.

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



Infine, in collaborazione con l’Ospedale Sacco di Milano, verranno effettuati studi clinici in donne HIV+/HPV+ trattate con PI rispetto a inibitori della transcriptasi inversa (RTI) o naïve alla terapia ed arruolate nello studio osservazionale prospettico VALHIDATE, coordinato dall’Ospedale Sacco. In particolare i 3 gruppi di donne verranno studiati per la prevalenza dell’infezione da HPV e di lesioni cervicali all’ingresso nello studio, l’incidenza di nuove lesioni durante il follow-up, la progressione o la regressione delle lesioni basali, l’incidenza e la clearance o la persistenza dell’infezione da HPV, e la possibile influenza di marcatori biologici di angiogenesi e progressione tumorale sull’esito clinico.

Questo progetto, che è stato presentato al Ministero della Salute nell’ambito del bando per la Ricerca Finalizzata 2016, contribuirà a chiarire gli effetti dei PI sullo sviluppo e la progressione del CIN/CC indipendentemente dall’infezione da HIV, e a sviluppare nuove terapie per prevenire o curare i tumori che insorgono sia in pazienti HIV+ che sieronegativi.

**Effetto della terapia anti-HCV con farmaci DAAs sull’outcome virologico ed immunologico in pazienti in terapia ART co-infetti HIV/HCV.**

*Progetto privo di finanziamento per il 2016. Proposto per il finanziamento nell’ambito della Ricerca Finalizzata – Ministero della Salute. Centro Nazionale per la Ricerca su HIV/AIDS*

Nelle infezioni croniche da HCV, l’infiammazione a livello del fegato è mediata in parte dal sistema interferonico dell’ospite che può contribuire all’immunodisfunzione correlata alla progressione ad AIDS nei pazienti HIV/HCV coinfetti. L’ipotesi da convalidare è quella per cui la soppressione della replicazione dell’HCV tramite farmaci antivirali ad azione diretta (Directly Acting Antivirals, DAA) può essere associata ad un outcome più favorevole della malattia indotta da HIV in termini di risposta viologica e immunologica. In questo contesto, sarà inoltre interessante valutare la possibile influenza “di genere” nel corso dell’infezione da HIV nei pazienti coinfetti. Cambiamenti nel profilo di espressione dei componenti del sistema interferonico durante la terapia DAA potrebbero essere utili nel determinare il trattamento dei pazienti, specialmente in aree “resource-limited settings”.

**Biomarcatori di rischio cardiovascolare dopo intensificazione della terapia con vaccinazione anti Tat: correlazione con biomarcatori solubili d’infiammazione, numero dei CD4 e reservoir virale nel sangue periferico.**



*Progetto privo di Finanziamento nel 2016. Proposto per il finanziamento nell'ambito del Gilead Fellowship Program - Gilead Sciences Srl – Italia. Centro Nazionale per la Ricerca su HIV/AIDS.*

La terapia antiretrovirale combinata (cART) blocca la progressione verso l'AIDS ma rende il paziente affetto da HIV (HIV+) più soggetto ad una serie di complicanze non legate all'AIDS. Di particolare importanza per prevalenza di morbilità e mortalità sono le complicanze cardiovascolari (CVD). Nei paesi sviluppati il 9-20% dei pazienti HIV+ presenta un rischio a 10 anni di infarto del miocardio da moderato ad alto mentre nei paesi in via di sviluppo circa il 20% delle morti quotidiane a causa dell'HIV/AIDS sono attribuite a CVD. La cART, la maggiore prevalenza di fattori di rischio per CVD (fumo, ipertensione, dislipidemia, diabete, HCV) nella popolazione HIV+ rispetto alla popolazione generale, e l'infezione da HIV stessa, sono ritenute contribuire all'incremento di CVD nei soggetti HIV+. In particolare, molti dei marcatori di flogosi e di immunoattivazione associati ad un maggiore rischio di CVD nella popolazione generale permangono elevati nella popolazione HIV+ in cART efficace.

La residua replicazione virale, da incompleta soppressione o da riattivazione stocastica contribuisce in maniera importante all'infiammazione cronica e disregolazione immunitaria osservate in soggetti in cART efficace che, a loro volta, si ritiene alimentino l'espressione virale, in una sorta di circolo vizioso che assicura il mantenimento dei serbatoi virali e consuma l'ospite.

In questo contesto, il transattivatore della trascrizione Tat riveste particolare importanza perché è la prima proteina di HIV ad essere prodotta ed è essenziale per un'efficiente replicazione virale anche in soggetti in cART efficace. Inoltre, rilasciata dalle cellule infette, Tat promuove l'infiammazione e la disregolazione del sistema immunitario. Ancora, Tat altera profondamente le funzioni e la morfologia delle cellule endoteliali (EC), modificandone espressione genica e sopravvivenza, ed è plausibile che contribuisca alla risposta infiammatoria che si osserva nell'endotelio vascolare e che porta a reclutamento di leucociti, incremento dell'adesività delle piastrine e attivazione del sistema della coagulazione, un'alterazione ritenuta cruciale nella patogenesi della malattia aterosclerotica anche nel soggetto non infetto. Tat appare pertanto una proteina chiave da bloccare per ridurre le comorbilità ed attaccare il serbatoio virale. I risultati ottenuti con l'intensificazione della cART con il vaccino Tat in trial clinici terapeutici di fase I e II corroborano questa ipotesi.

In particolare, i risultati del trial terapeutico di fase II, randomizzato, open label, (ISS T-002, Clinicaltrials.gov NCT00751595), condotto in Italia in 11 centri clinici su 168 individui in terapia cART efficace, indicano che l'intensificazione della cART con il vaccino Tat ha promosso un significativo e durevole recupero dei linfociti T, B e delle cellule natural killer (NK).

