

partecipanti nello studio è l'identificazione del periodo della sierconversione (disponibilità di un test sierologico negativo seguito da un altro test positivo nello spazio di 24 mesi). In particolare, gli obiettivi dello studio consistono nella stima della distribuzione dei tempi di incubazione di AIDS e di sopravvivenza, e nella identificazione di determinanti e indicatori di progressione clinica. A tal fine, viene utilizzata una scheda per la raccolta dei dati demografici (sesso ed età) e dei parametri clinico-immunologici (sintomi e stadio clinico, sottopopolazioni linfocitarie, indicatori di attivazione immunitaria, antigenemia, misura della carica virale), nonché di alcuni dati comportamentali.

Le tecniche usualmente utilizzate rientrano in gran parte nella cosiddetta analisi di sopravvivenza; vengono inoltre utilizzate tecniche regressive per l'analisi di dati longitudinali per dati quantitativi con misure ripetute, non equispaziate e dati potenzialmente mancanti. Sino ad oggi, presso i 17 centri clinici che collaborano allo studio, sono stati arruolati circa 1800 individui. I dati sinora acquisiti hanno permesso una serie di analisi che hanno fornito utili informazioni sul periodo di incubazione, tempo di sopravvivenza, marker e cofattori della progressione dell'infezione da HIV. In particolare, si è evidenziato come l'età alla sierconversione sia un importante determinante di progressione clinica, mentre il sesso e la categoria di esposizione non sembrano influenzare il decorso dell'infezione da HIV. Il numero di linfociti CD4+ misurato entro un anno dopo la sierconversione e la presenza di malattia acuta risultano essere indicatori precoci di evoluzione clinica. Al contrario, la comparsa dell'herpes zoster non sembra essere un marker di progressione. La coinfezione con HCV, HTLV e HHV-6 non sembra accelerare la progressione verso la malattia conclamata, mentre l'infezione con HHV-8 predice la comparsa del KS. Lo studio ha permesso inoltre di valutare l'effetto della terapia antiretrovirale e della profilassi contro le principali infezioni opportunistiche, evidenziando un forte effetto protettivo, a livello di popolazione, della terapia antiretrovirale combinata. Lo studio della carica virale ha permesso di studiarne le dinamiche nei primi 10 anni dopo la sierconversione e di valutarne il valore prognostico tenendo conto del livello dei CD4. Inoltre, i dati raccolti da questo studio sono stati utilizzati per la valutazione di diversi tipi di *bias* (esattamente, *survival bias* e *right censoring bias*) negli studi di coorte.

La prospettiva principale dello studio, che è ora inserito in un'azione concertata dell'Unione Europea, è quella di valutare l'effetto a lungo termine della terapia sul periodo di incubazione dell'AIDS e sulla sopravvivenza globale delle persone con infezione da HIV, nonché di valutare gli andamenti temporali differenziati delle diverse patologie che definiscono l'AIDS.

- **Studio della mortalità per AIDS in Italia**

*Responsabile scientifico*

Susanna Conti (Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica)

*Sintesi dell'attività svolta*

Dopo aver effettuato, in collaborazione con il Centro Operativo AIDS (COA) dell'Istituto, un follow-up attivo su tutti i casi italiani di AIDS, è stato possibile svolgere una completa e approfondita analisi di sopravvivenza dei pazienti italiani.

Nell'ambito della collaborazione con l'ISTAT, che ha messo per la prima volta a disposizione i dati sulle cause di morte sottostanti a quella principale, è stato avviato uno studio sulla mortalità delle persone sieropositive, che non hanno ancora sviluppato l'AIDS.

È proseguito lo studio della mortalità per AIDS, nell'ambito della mortalità generale e per causa, sui dati più aggiornati disponibili, risalenti al 1997.

- **Utilizzo di diverse fonti informative per la stima dell'incidenza di infezione da HIV e di altre malattie sessualmente trasmesse in una città italiana**

*Responsabile scientifico*

Barbara Suligoi (Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica)

*Sintesi dell'attività svolta*

Al fine di identificare tutte le persone affette da una malattia sessualmente trasmessa (MST) e tutti i soggetti con una nuova diagnosi di infezione da HIV, è stata costituita una rete di strutture cliniche che assicurasse una copertura totale per la segnalazione di questi casi. La rete includeva: medici generici, consultori familiari, ambulatori ginecologici, dermatologici e infettivologici del Policlinico di Modena; il Laboratorio di Virologia del Policlinico di Modena; ginecologi e dermatologi privati e il Servizio

Pubblico per le Tossicodipendenze (SERT) della stessa città. Lo studio è stato condotto tra l'aprile 1999 e il maggio 2000. Sono stati identificati 550 casi di MST, pari ad un'incidenza di 313,3 casi per 100.000 abitanti (550/176.990) all'anno nel comune di Modena. Le patologie segnalate sono state le seguenti: infezioni non-gonococciche/non-clamidiali (45,9%), condilomi piatti (32,4%), condilomi acuminati (9,1%), vaginiti da *Trichomonas* (3,3%), sifilide (3,1%), herpes genitale (1,8%), infezioni da *Chlamidia* (1,5%), infezioni gonococciche (0,4%), altro (2,5%). Il 27% di questo gruppo è stato testato per HIV. Tra questi pazienti sono state segnalate due nuove diagnosi di HIV-positività.

Nel periodo in studio sono state effettuate 18 nuove diagnosi di infezione da HIV (inclusi i due soggetti identificati tra i pazienti MST), pari ad un'incidenza annua di 10,2 casi per 100.000 abitanti nel comune di Modena. Tutti i 18 casi sono pervenuti al centro di riferimento locale per il monitoraggio e terapia dell'AIDS/infezione da HIV. Tutti gli HIV-positivi riferivano un'esposizione a rapporti sessuali, la maggior parte dei quali (77,8%) con soggetti il cui sierostato HIV non era noto.

Il progetto ha dimostrato la fattibilità di uno studio basato su una rete di diverse strutture sanitarie che garantiscano la copertura territoriale per la rilevazione di specifiche malattie. È stata stimata per la prima volta l'incidenza delle MST su un'area geografica ben definita. Tuttavia, una quota elevata di pazienti con MST non è stata sottoposta a test anti-HIV, né si è riusciti in questo sottogruppo a far eseguire il test HIV in modo anonimo. Tutte le nuove diagnosi di infezione da HIV sono state rilevate dalla Clinica delle Malattie Infettive; pertanto, unicamente ai fini dell'analisi di incidenza dell'infezione da HIV, sarebbe stata sufficiente la partecipazione della sola Clinica delle Malattie Infettive.

Il flusso dei dati ha garantito la totale riservatezza delle informazioni personali, attraverso l'uso di codici anonimi (soundex code) e della trasmissione codificata dei dati. Lo stesso disegno di studio è riproponibile in altre città italiane al fine di confrontare e validare i risultati ottenuti.

## **PATOLOGIA, CLINICA E TERAPIA DELL'INFEZIONE DA HIV**

*Responsabile:* Stefano Vella

- **Approcci sperimentali alla terapia dell'infezione da HIV: a) correlazione tra velocità di riduzione della carica virale e durata nel tempo della soppressione virale indotta dalla terapia; b) studi sulla persistenza HIV durante terapia antiretrovirale potente: serbatoi cellulari con infezione latente; c) resistenza di HIV ai farmaci antiretrovirali**

*Responsabile scientifico*

Stefano Vella (Laboratorio di Virologia)

*Sintesi dell'attività svolta*

È proseguito lo studio collaborativo con la Cattedra di Ematologia dell'Università degli Studi "La Sapienza" di Roma, su pazienti con linfoma Non Hodgkin HIV - correlato, sottoposti a chemioterapia più terapia antiretrovirale. Sono attualmente disponibili i dati relativi a 11 soggetti, trattati con regime CIOD (Ciclofosfamide Idarubicina Oncovin Dexametasona) e osservati all'esordio, alla fine del 3° ciclo di chemioterapia e dopo un mese da questo. Il confronto tra il gruppo trattato con chemioterapia e, successivamente, terapia antiretrovirale, e quello trattato con le due modalità in contemporanea, ha mostrato un vantaggio, in quest'ultimo, per quanto riguarda il recupero immunologico. Lo studio dell'HIV-DNA cellulare ha invece evidenziato una persistenza del virus all'interno delle cellule infette, nonostante una marcata riduzione dell'HIV-RNA plasmatico. Questo sembra indicare l'incapacità dell'associazione chemioterapia/terapia antiretrovirale di indurre una "sterilizzazione" dei serbatoi dell'HIV.

- **Attività di coordinamento e monitoraggio - studio INITIO**

*Responsabile scientifico*

Marco Floridia (Laboratorio di Virologia)

*Sintesi dell'attività svolta*

I centri partecipanti sono stati visitati dai "monitor" per la verifica della documentazione e delle strutture e per illustrare ai centri le procedure della sperimentazione. Sono state svolte, al 30 novembre

2000, 16 visite di monitoraggio in vari centri clinici. Dopo lo svolgimento delle visite di apertura, i primi pazienti in Italia sono stati arruolati nella sperimentazione. Le procedure operative dello studio, comprendenti randomizzazione, raccolta e gestione dei dati, monitoraggio, gestione dei campioni biologici e segnalazione degli eventi avversi sono state inviate ai centri e la loro applicazione verificata in occasione delle visite di monitoraggio.

Attraverso i monitor si è iniziata la raccolta dei dati e delle schede cliniche, necessaria per la spedizione dei dati al centro di coordinamento internazionale di Londra. Sono stati svolti due invii di dati, nel luglio 2000 e nel settembre 2000, per permettere la valutazione dei dati da parte del comitato di revisione dello studio.

- **Caratterizzazione delle alterazioni comportamentali da esposizione ontogenetica a combinazione di farmaci inibitori della trascrittasi inversa (3TC, AZT, DDI e altre combinazioni) mediante modello di riferimento**

*Responsabile scientifico*

Enrico Alleva (Laboratorio di Fisiopatologia di Organo e di Sistema)

*Sintesi dell'attività svolta*

Sono proseguite le ricerche pluriennali sugli effetti di potenziale danno in seguito a esposizione ontogenetica ad agenti antiretrovirali utilizzando un modello animale. Nel corso del 2000 è proseguito lo schema di trattamento combinato AZT+3TC secondo un dosaggio e uno schema di trattamento durante lo sviluppo, messo a punto nel precedente triennio. Mediante l'uso di tecniche convenzionali di farmacologia comportamentale (e utilizzando l'agente gabaergico muscimolo e colinergico scopolamina) sono state evidenziate alterazioni specifiche nel periodo neonatale precoce al muscimolo. Il trattamento scopolaminergico ha invece rivelato alterazioni selettive riconducibili a elementi comportamentali (*selfgrooming*) sotto controllo dopaminergico. Tali dati confermano precedenti risultati riportati nella letteratura teratologico-comportamentale e sono anche riconducibili ad alcune osservazioni cliniche condotte da autori francesi su neonati e bambini esposti ad agenti antiretrovirali. Inoltre, sono stati caratterizzati ulteriormente alcuni effetti di lungo termine sul comportamento aggressivo, a conferma di dati già osservati nello scorso biennio.

- **Coordinamento e monitoraggio analisi dei campioni biologici, spese per impianti tecnologici di acquisizione e gestione dati – studio ISS-PART**

*Responsabile scientifico*

Stefano Vella (Laboratorio di Virologia)

*Sintesi dell'attività svolta*

Lo studio ISS-PART ha l'obiettivo di confrontare, in termini di risposta immunologica, una terapia antiretrovirale continua con una terapia intermittente (con interruzioni strutturate).

Allo studio, che inizierà nel marzo 2001, parteciperanno 101 centri clinici italiani. Nel corso dell'anno 2000 sono state effettuate le attività preparatorie per l'inizio dello studio. In particolare:

- è stato finalizzato il protocollo dello studio che è stato sottoposto all'approvazione del comitato etico;
- è stata messa a punto una strategia per la gestione dei dati, che permetterà l'utilizzo di un sistema informatico per l'immissione dei dati, il loro controllo e la comunicazione del centro coordinatore (Istituto Superiore di Sanità) con i centri partecipanti;
- è stata stipulata l'assicurazione per i pazienti dello studio;
- sono state finalizzate le procedure operative di laboratorio che permetteranno ai centri clinici di raccogliere e inviare i campioni biologici al Laboratorio di Virologia dell'Istituto.

- **Coordinamento studi clinici multicentrici - Italia-USA**

*Responsabile scientifico*

Stefano Vella (Laboratorio di Virologia)

*Sintesi dell'attività svolta*

Nel corso dell'anno 2000 sono proseguiti i due studi clinici (ACTG 388, ACTG 384) che vengono effettuati in collaborazione con l'AIDS Clinical Trial Group della Division of AIDS dei National

Institutes of Health degli Stati Uniti. Gli studi si svolgono contemporaneamente in centri clinici italiani e statunitensi. Il centro coordinatore in Italia (Laboratorio di Virologia dell'Istituto) è responsabile delle seguenti attività:

- collaborazione con i team americani per la conduzione degli studi;
- rapporti con i comitati etici dei centri italiani partecipanti per l'ottenimento delle approvazioni;
- registrazione dei centri clinici italiani per le nuove versioni dei protocolli presso la Division of AIDS;
- diffusione di tutte le comunicazioni dal Data Management Centre degli USA ai centri clinici italiani;
- raccolta dei dati clinici, verifica e inserimento in un software specifico;
- supervisione del monitoraggio eseguito presso i centri clinici;
- farmacovigilanza sugli effetti collaterali gravi.

• **Coordinamento studio multicentrico ACTG 384**

*Responsabile scientifico*

Stefano Vella (Laboratorio di Virologia)

*Sintesi dell'attività svolta*

Il centro di coordinamento si è occupato nel corso dell'anno di seguire e portare a termine i seguenti compiti:

- registrazione dei centri clinici alle nuove versioni del protocollo di ricerca, curando direttamente i rapporti con i comitati etici;
- sottomissione ai comitati etici delle Investigator's Brochures e dei Safety Reports;
- raccolta dati relativi ai pazienti in studio, la loro inputazione al terminale e trasmissione in elettronico al Data Management Centre negli USA;
- risoluzione delle queries;
- supervisionare delle attività di follow-up clinico e il riposizionamento dei pazienti nei bracci dello studio;
- supervisione delle attività di monitoraggio clinico eseguite in outsourcing;
- attività di approvvigionamento farmaco del magazzino centrale e dei centri clinici, compresa la gestione dei permessi ministeriali e doganali all'importazione di farmaco sperimentale;
- esecuzione degli esami virologici di laboratorio previsti dal protocollo di ricerca.

• **Coordinamento studio multicentrico ACTG 388**

*Responsabile scientifico*

Stefano Vella (Laboratorio di Virologia)

*Sintesi dell'attività svolta*

Lo studio ACTG 388 è uno studio clinico controllato, multicentrico, effettuato in collaborazione con l'AIDS Clinical Trial Group (ACTG) dei National Institutes of Health degli Stati Uniti. Lo studio, in Italia, viene coordinato dal Laboratorio di Virologia dell'Istituto, che supervisiona tutte le attività dei centri clinici partecipanti, coordina le attività di monitoraggio clinico, è responsabile della raccolta e dell'invio dei dati in tempo reale presso il Data Management Centre dell'ACTG (Amherst, NY). Tutti i campioni biologici raccolti nel corso delle visite periodiche vengono inviati al Laboratorio di Virologia dove vengono effettuate, in tempo reale, tutte le determinazioni dell'HIV-RNA e gli isolamenti virali per i pazienti italiani dello studio.

Il centro di coordinamento italiano è responsabile inoltre di tutte le comunicazioni tra il Data Management Centre degli USA e i centri clinici italiani (risoluzioni queries, analisi dati di laboratorio) e di diffondere tutte le informazioni relative allo studio ai centri clinici partecipanti.

- **Coordinamento dell'unità di ricerca "Immunoricostruzione"**

*Responsabile scientifico*

Stefano Vella (Laboratorio di Virologia)

*Sintesi dell'attività svolta*

Con l'avvio dello studio ISS-PART, per favorire l'ottimizzazione delle risorse nazionali, i partecipanti all'azione concertata "Immunoricostruzione" hanno deciso di focalizzare il loro interesse su alcuni aspetti specifici riguardanti le modificazioni del sistema immunitario in corso di Interruzioni Strutturate di Terapia (STI). Si ipotizza infatti che le STI, e il rebound virologico ad esse associato, possano agire come "autovaccinazione" e promuovere la stimolazione della risposta HIV-specifica. Questo effetto potrebbe però variare a seconda dello stadio di malattia (infezione primaria, infezione cronica stabilizzata, infezione cronica progressiva). Nell'ambito dell'azione concertata, verranno studiati soggetti con infezione cronica stabilizzata, nei quali il trattamento antiretrovirale abbia indotto una persistente ( $\geq 6$  mesi) soppressione della replicazione virale, sottoposti ad Interruzioni Strutturate di Terapia.

- **Infezione da HIV e sistema immunitario: 1) studio dei meccanismi di immunoricostruzione in corso di terapia antiretrovirale; 2) risposta specifica anti-HIV. Studio del suo andamento in diverse fasi cliniche e in corso di terapia antiretrovirale**

*Responsabile scientifico*

Stefano Vella (Laboratorio di Virologia)

*Sintesi dell'attività svolta*

È stato ultimato lo studio del recupero immunologico in bambini HIV+ sottoposti a terapia HAART. Nella popolazione studiata è stato osservato:

- un aumento dei CD4 dovuto prevalentemente a linfociti con fenotipo *naive*;
- un recupero della risposta linfoproliferativa verso antigeni ubiquitari e antigeni dell'HIV;
- una tendenza alla normalizzazione del repertorio V $\beta$  sui linfociti CD4 e CD8.

È stata messa a punto una metodica per la valutazione della risposta citotossica (CTL) HIV - specifica, che potrebbe consentire il superamento di alcuni svantaggi delle metodiche attualmente utilizzate per valutare la risposta CTL (metodica classica; *limiting dilution assay*; test Elispot). La metodica messa a punto è una variante del test Elispot, basata sull'impiego, come cellule attivatrici, di cellule B autologhe infettate con vaccini a virus HIV ricombinanti.

- **Modelli xenochimerici di topi SCID trapiantati con linee cellulari umane e suscettibili di infezione acuta e persistente da HIV per lo studio preclinico di terapie antiretrovirali**

*Responsabile scientifico*

Enrico Proietti (Laboratorio di Virologia)

*Sintesi dell'attività svolta*

Gli studi svolti nel 2000 si sono focalizzati prevalentemente sulla messa a punto di un modello xenochimerico costituito da topi SCID, ricostituiti intra peritoneo con linfociti umani e inoculati con cellule umane infettate con HIV per via intravaginale.

Questo modello, nelle intenzioni dei proponenti la ricerca, vuole riprodurre *in vivo*, nel topo, le condizioni di trasmissione sessuale dell'infezione da HIV per potere, successivamente, valutare l'efficacia di farmaci antivirali da utilizzare per uso topico nella donna per la prevenzione dell'AIDS. La ricerca ha dato esito positivo dimostrando che il modello xenochimerico proposto è in grado di infettarsi con il virus HIV e che l'infezione intravaginale può essere facilmente monitorata attraverso l'analisi della p24 virale presente nel plasma.

- **Nanoparticelle come sistemi di delivery di molecole attive per scopi terapeutici e vaccinali nell'infezione da HIV**

*Responsabile scientifico*

Stefano Buttò (Laboratorio di Virologia)

*Sintesi dell'attività svolta*

Il progetto prevede l'utilizzo di nanoparticelle, nanosfere di diversa composizione chimica, per veicolare DNA o proteine all'interno della cellula per scopi terapeutici o vaccinali. Nel presente progetto sono state preparate nanoparticelle costituite da complessi policationici in grado di legare il DNA codificante per la proteina Tat di HIV-1, sulla base della quale è stato recentemente allestito un vaccino contro l'AIDS, che si è dimostrato efficace nel controllare la replicazione virale e lo sviluppo di malattia in studi preclinici. I risultati degli studi hanno dimostrato che il DNA di Tat legato a tale nanoparticella risulta resistente all'azione della DNAasi e che il complesso DNA/nanoparticella non è tossico in saggi su linee cellulari. Parallelamente, sono state preparate nanoparticelle di polimetilmetacrilato in grado di legare la proteina Tat. Saggi *in vitro* e *in vivo* su topi hanno dimostrato che i complessi nanosfera/proteina Tat non sono tossici e inducono una risposta immune di tipo sia anticorpale che cellulo-mediato. Questi esperimenti gettano le basi per l'identificazione di ottimali strategie di somministrazione di Tat (sia proteina che DNA) per scopi vaccinali.

- **Patogenesi del sarcoma di Kaposi associato ad AIDS: ruolo di HIV-1 Tat, herpesvirus 8, citochine e oncogeni, e nuove strategie terapeutiche**

*Responsabile scientifico*

Barbara Ensoli (Laboratorio di Virologia)

*Sintesi dell'attività svolta*

Citochine Th-1 inducono nel topo lesioni simili al sarcoma di Kaposi (KS) mediante l'induzione di fattori angiogenici (bFGF, VEGF). La proteina Tat di HIV coopera sinergicamente con bFGF in questi effetti tramite l'induzione e l'attivazione di proteasi della matrice extracellulare (MMPs). Tat e bFGF inducono sinergicamente Bcl-2 e proteggono le cellule endoteliali dall'apoptosi.

È stata identificata, nei soggetti con KS, una diminuita attività citotossica NK e, nelle cellule infettate produttivamente da HHV8, l'espressione di geni virali che mediano meccanismi di immunoevasione.

Sono state isolate dalle lesioni KS cellule spindle (KSC) che esprimono il VEGF-R3, un marker dell'endotelio linfatico. Oligonucleotidi antisenso contro recettori integrinici inibiscono la proliferazione delle KSC. Il taxolo, un farmaco usato nella terapia del KS, agisce promuovendo l'apoptosi delle KSC poiché inibisce l'espressione di Bcl-2.

Gli inibitori della proteasi di HIV (PI) inducono la regressione del KS poiché bloccano la migrazione e l'invasione cellulare indotte da bFGF.

- **Presentazione antigenica, risposta immune e variabilità nucleotidica e antigenica di Tat di HIV-1 in popolazioni infette italiane e ugandesi**

*Responsabile scientifico*

Barbara Ensoli (Laboratorio di Virologia)

*Sintesi dell'attività svolta*

Lo studio dei meccanismi di *uptake* di Tat da parte delle cellule endoteliali (coinvolte nei processi immunitari e di angiogenesi) ha dimostrato che tale *uptake* è mediato dai recettori integrinici  $\alpha 5\beta 1$  e  $\alpha v\beta 5$ . Altri esperimenti sulle cellule dendritiche (cellule presentanti l'antigene nella risposta immune) hanno suggerito che Tat può esercitare un'azione stimolatoria nei confronti della funzione di tali cellule, fondamentali per l'instaurarsi della risposta immune verso antigeni di origine infettiva.

Lo studio della risposta immune a Tat nell'infezione naturale è stato focalizzato, per il momento, sulla risposta anticorpale specifica. I dati in possesso hanno messo in evidenza che la risposta anticorpale a Tat correla con lo stato di non progressione dell'infezione. Inoltre, i sieri di individui provenienti da popolazioni con origine geografica ed etnica diverse e infettati da differenti sottotipi di HIV riconoscono la proteina Tat derivata dal sottotipo B di HIV-1, che verrà utilizzata in prossimi trial clinici per la sperimentazione allo scopo di verificare l'innocuità e l'immunogenicità di un vaccino contro l'AIDS, indicando che la vaccinazione con la proteina Tat potrebbe essere in grado di conferire un'ampia immunità verso sottotipi di HIV differenti.

- **Ruolo di HHV-8, citochine infiammatorie e Tat di HIV nel sarcoma di Kaposi e nei linfomi ad effusione primaria: studio ultrastrutturale e immunocitochimico**

*Responsabile scientifico*

Fabiana Superti (Laboratorio di Ultrastrutture)

*Sintesi dell'attività svolta*

È stata analizzata, a livello ultrastrutturale, la crescita litica di HHV-8 in cellule (BCBL-1) derivate da linfomi ad effusione primaria (PEL) al fine di definirne il ciclo morfogenetico. Fino ad oggi le limitazioni relative ai sistemi che permettono la replicazione virale produttiva avevano impedito la caratterizzazione del ciclo vitale di HHV-8 e l'ulteriore definizione del suo ruolo nello sviluppo del sarcoma di Kaposi (KS) e dei PELs. Sebbene sia difficile da coltivare nelle cellule derivate dalle lesioni KS, questo virus è mantenuto indefinitamente in fase latente nelle cellule derivate dai PELs e può essere indotto alla replicazione litica dal trattamento con TPA. Poiché le cellule BCBL-1 hanno la prerogativa, a differenza di altre linee di stessa derivazione, di essere infettate latentemente da HHV-8 ma non da altri herpesvirus quali EBV, questo sistema rappresenta un modello ideale per lo studio della morfogenesi di HHV-8. I risultati di questo studio, oltre ad aumentare le conoscenze relative alla morfogenesi di HHV-8 e alle lesioni cellulari provocate dalla sua replicazione in cellule derivate dai PELs, costituiscono la base per la comprensione del meccanismo di azione di specifiche sostanze antivirali. Per esempio, un primo contributo da parte dello studio è stato dato alla dimostrazione che l'alfa-interferon, già utilizzato con successo nella terapia del CKS e dell'AIDS-KS, inibisce la riattivazione dell'HHV-8 in cellule derivate dai PELs e riduce la carica virale *nelle Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMC), provenienti da pazienti con KS o a rischio di contrarlo.

- **Ruolo della P-glicoproteina e di altri meccanismi cellulari di trasporto nella resistenza di HIV agli inibitori delle proteasi (PIs)**

*Responsabile scientifico*

Maurizio Cianfriglia (Laboratorio di Immunologia)

*Sintesi dell'attività svolta*

Recentemente è stato dimostrato che il saquinavir, ritonavir e indinavir (PIs) vengono riconosciuti e attivamente espulsi dalla P-glicoproteina presente in cellule tumorali a fenotipo MDR. La ricerca ha l'obiettivo di determinare se e come la P-glicoproteina alteri la biodisponibilità dei PIs in cellule sede di infezione di HIV.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che in varie sottopopolazioni linfocitarie sono presenti sistemi di efflusso capaci di ridurre la concentrazione intracellulare dei PIs. Inoltre la P-glicoproteina presente in cellule CD4 mostra nei confronti di ciascun singolo PIs una diversa capacità di trasporto. Identico fenomeno è stato osservato analizzando l'efflusso di composti antitumorali marcati con fluorocromi. Parallelamente, i dati relativi alla espressione e rilascio di IL-2 e IFN gamma da parte di linfociti attivati ed esposti al trattamento con PIs sembrano indicare che l'impegno della P-glicoproteina possa alterare in modo significativo il ruolo di alcuni mediatori della risposta immune.

- **Studio ACTG 384 sull'uso di inibitori della proteasi e/o inibitori non-nucleosidici della trascrittasi inversa in combinazione con due analoghi nucleosidici nella terapia iniziale dell'infezione da HIV**

*Responsabile scientifico*

Stefano Vella (Laboratorio di Virologia)

*Sintesi dell'attività svolta*

Nell'ambito della collaborazione scientifica Italia-USA nel settore della ricerca clinica sull'AIDS, questo studio viene effettuato in collaborazione con l'AIDS Clinical Trial Group (ACTG), organo del National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), dipartimento dei National Institutes of Health (NIH). I centri clinici italiani partecipanti allo studio hanno ottenuto l'accreditamento del Regulatory Operations Centre della Division of AIDS dei NIH.

L'ACTG 384 è uno studio clinico multicentrico internazionale randomizzato in doppio-cieco (per gli inibitori della proteasi e per gli inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa), che ha arruolato circa 900 persone con infezione da HIV, *naive* o con precedente terapia antiretrovirale non superiore ai

sette giorni, con HIV-1 RNA > 500 copie/ml. Lo studio è disegnato per valutare la capacità di diverse strategie terapeutiche a lungo termine nel mantenere un'elevata soppressione virale con il minimo rischio di tossicità e di non-aderenza ai regimi terapeutici. In Italia sono stati arruolati, tra giugno e settembre 1999, 83 pazienti da parte di 23 centri clinici. I pazienti arruolati hanno ricevuto uno dei sei regimi terapeutici previsti e saranno seguiti prospetticamente per un tempo massimo di tre anni. In caso di fallimento virologico o tossicità, i pazienti saranno assegnati ad uno schema terapeutico complementare. I risultati definitivi dello studio sono attesi per l'autunno del 2001.

- **Studio clinico ADHOC (ADHOC trial)**

*Responsabile scientifico*

Stefano Vella (Laboratorio di Virologia)

*Sintesi dell'attività svolta*

Lo studio si è chiuso nel dicembre 1999. Nel 2000 si è proceduto ad ultimare la raccolta e i controlli sui dati e a trasmettere i dati al centro di coordinamento internazionale (Medical Research Council, Londra).

- **Studio clinico randomizzato, multicentrico, internazionale, Italia-USA, per la valutazione comparativa di combinazioni di tre o quattro farmaci antiretrovirali nel trattamento dell'infezione da HIV in fase avanzata**

*Responsabile scientifico*

Marina Giuliano (Laboratorio di Virologia)

*Sintesi dell'attività svolta*

Lo studio ACTG 388 è terminato il 10 novembre 2000. Alla fine del follow-up (due anni), su 65 pazienti arruolati in Italia, 52 erano ancora in studio. La perdita al follow-up è stata del 20%. Si sono verificati 15 fallimenti virologici (definiti come 2 determinazioni consecutive di HIV-RNA > 200 copie/ml). Sono state effettuate le verifiche sui dati clinici e di laboratorio tali da permettere l'analisi dei dati che dovrebbe essere completata per l'aprile 2001. La presentazione dei risultati è prevista per il mese di luglio 2001.

Sono iniziate le attività preparatorie per uno studio *rollover* per i pazienti che hanno partecipato allo studio ACTG 388 e che hanno ottenuto la soppressione della replicazione virale (HIV-RNA < 200 copie/ml). L'inizio dello studio *rollover* è previsto per il maggio 2001 e pertanto il follow-up dei pazienti eleggibili per il nuovo studio prosegue, dopo il novembre 2000, con le modalità dello studio ACTG 388.

- **Studio delle interazioni tra HIV e cellule del sistema nervoso centrale**

*Responsabile scientifico*

Giulio Levi (Laboratorio di Fisiopatologia di Organo e di Sistema)

*Sintesi dell'attività svolta*

Alterazioni indotte da Tat in cellule microgliali purificate:

- Tat, alle stesse dosi (1µg/ml) necessarie all'induzione di iNOS, stimola la sintesi di IL-1β e la formazione di isoprostani (marker attendibili di stress ossidativo). Utilizzando TPCK, inibitore specifico di NF-kB, e sostanze antiossidanti è stato dimostrato che alcuni effetti di Tat (NO, IL-1β), ma non altri (radicali dell'O<sub>2</sub>) sono mediati da NF-kB;
- è stato dimostrato che l'effetto inibitorio di Tat sulla sintesi di cAMP è dovuto a una inibizione dell'adenilato ciclasi, non è mediato da NO ed è prevenuto in presenza di inibitori di NF-kB;
- dopo trattamento con Tat (≥100 ng/ml), registrazioni elettrofisiologiche hanno mostrato la comparsa di una consistente corrente di potassio outwardly rectifying, riferibile alla presenza di canali funzionali del tipo Kv1.3, virtualmente assente in cellule microgliali non trattate. L'effetto di Tat era in gran parte prevenuto da inibitori di NF-kB.

Alterazioni indotte da Nef in cellule astrocitarie:

- per comprendere come Nef possa interferire con funzioni astrocitarie, è stata studiata l'influenza di Nef sulla produzione di fattori con attività neurotrofica, utilizzando linee di astrocitoma stabilmente trasfettate con Nef. Dati preliminari indicano che cloni Nef+ attivati con citochine proinfiammatorie rilasciano una quantità cinque volte maggiore di NGF (ma non BDNF) rispetto ai controlli.

- **La tossicità degli inibitori delle proteasi limita la loro efficacia nella terapia antiretrovirale: meccanismi coinvolti e modulazione farmacologica**

*Responsabile scientifico*

Valter Malorni (Laboratorio di Ultrastrutture)

*Sintesi dell'attività svolta*

In questo studio sono stati analizzati sia il profilo redox di pazienti HIV+ in differenti stadi della malattia sia alcuni parametri immunitari, come il numero di linfociti circolanti CD4+ e CD8+. A tal fine sono state prelevate cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC), sia da donatori sani che da pazienti HIV+ nelle varie fasi della malattia: fase asintomatica, *Long Term non Progressors* (LTNPs) e AIDS conclamato sottoposti ad HAART. I PBMC isolati sono stati sottoposti *in vitro* a stress ossidativo indotto da menadione, un agente proossidante capace di indurre la formazione dell'anione superossido.

È stata inoltre valutata la possibilità di diminuire la suscettibilità allo stress ossidativo, pretrattando le cellule con un farmaco ad attività antiossidante, l'N-acetilcisteina (NAC) che agisce come donatore di gruppi tiolici e altri composti ad attività simile ma con meccanismo differente. In parallelo, sono stati condotti studi sull'indice di perossidazione nel plasma di tutti i pazienti. Sono inoltre iniziati gli studi *ex vivo* sui PBMC volti a valutare l'effetto degli inibitori delle proteasi (indinavir, saquinavir e ritonavir) su: a) suscettibilità ad apoptosi Fas mediata e b) espressione del recettore dell'insulina.

- **Trattamento dell'infezione da HIV, studi di coorte: Registro IP ed EUROSIDA. Studi sull'impatto della terapia antiretrovirale e della profilassi delle infezioni opportunistiche sulla storia naturale della malattia. Studi di farmacovigilanza su tossicità e tollerabilità di trattamenti a lungo termine. Studi di compliance sui trattamenti**

*Responsabile scientifico*

Stefano Vella (Laboratorio di Virologia)

*Sintesi dell'attività svolta*

Il Registro nazionale delle persone con infezione da HIV in trattamento con inibitori della proteasi (Registro IP), avviato nel gennaio del 1997 su iniziativa del Ministero della Sanità, raccoglie in maniera prospettica dati su oltre 8.000 soggetti con infezione da HIV in trattamento con inibitori della proteasi da circa 200 centri clinici italiani autorizzati a livello regionale al trattamento dei pazienti con infezione da HIV.

Lo studio di coorte europeo EUROSIDA, avviato nel 1994, raccoglie dati prospettici su oltre 8.500 persone con infezione da HIV (CD4+<500 cell/mm<sup>3</sup>), arruolate consecutivamente in 60 centri clinici di 20 Paesi europei e dello stato di Israele.

Lo studio multi-coorte internazionale *Data Collection on Adverse Events of Anti-HIV Drugs* (DAD) raccoglie in due anni dati su 15.000 pazienti in trattamento protratto con HAART per lo studio dell'incidenza degli eventi avversi rari e, in particolare, del rischio cardiovascolare.

- **Valutazione di strategie terapeutiche nell'infezione da HIV: studio multicentrico INITIO**

*Responsabile scientifico*

Marco Floridia (Laboratorio di Virologia)

*Sintesi dell'attività svolta*

Dopo aver ottenuto le approvazioni di legge, i primi pazienti in Italia sono stati arruolati nel giugno 2000. Si sono svolte nuove riunioni del comitato di coordinamento, del Data Exchange Group e due audioconferenze fra tutti i centri partecipanti in Italia. L'Istituto ha formalizzato e stipulato le

convenzioni per la maggior parte dei centri. Tutti i centri continuano il programma di controlli di qualità previsti dal protocollo.

Si è iniziata la raccolta dei dati e delle schede cliniche e, parallelamente, le attività di immissione dati, verifica sugli stessi e spedizione dei dati al centro di coordinamento internazionale di Londra. Il comitato indipendente di controllo sullo studio ha esaminato nell'agosto 2000 i dati dello studio e il suo andamento, e si è espresso indicando l'assenza di motivi per raccomandare l'interruzione o la modifica dello studio. I nuovi arruolamenti continueranno fino alla prima metà del 2001 e lo studio si chiuderà nel 2004.

### **PATOGENESI E IMMUNITÀ MIRATE ALLA INDIVIDUAZIONE DI NUOVI BERSAGLI CHEMIOTERAPICI, IMMUNOTERAPICI E DI PREVENZIONE VACCINALE**

*Responsabile:* Paola Verani

- **Controllo della replicazione dell'HIV: studio dei meccanismi di regolazione pre- e post-trascrizionali mediati da Tat e Rev**

*Responsabile scientifico*

Filomena Nappi (Laboratorio di Virologia)

*Sintesi dell'attività svolta*

L'HIV e gli altri lentivirus utilizzano la proteina Rev, che legandosi all'RRE dell'RNA, regola l'export dei propri mRNAs dal nucleo. Utilizzando un clone molecolare di HIV mutato nelle regioni RRE e Rev, in esperimenti di complementazione, abbiamo identificato un nuovo elemento di regolazione posttrascrizionale di origine murina, chiamato RTE. L'elemento funzionale, identificato in un frammento di 247-nucleotidi, è in grado di promuovere la replicazione dell'HIV-1 difettivo sia in linee linfocitarie umane che in linfociti primari. L'RTE risulta funzionale in molti tipi di cellule, suggerendo che i fattori cellulari che lo riconoscono sono ampiamente conservati. Il trasporto dell'RNA mediato dall'RTE è indipendente dalla CRM-1 e non presenta affinità per il TAP/NXF. I risultati indicano, quindi, che l'RTE utilizza un meccanismo diverso dai due recettori associati ai meccanismi finora noti di export nucleare degli mRNA.

Si sono inoltre eseguiti studi per verificare gli effetti del Tat extracellulare nell'infezione da HIV-1.

- **Effetto di Tat transgenico sulla mitosi e la meiosi**

*Responsabile scientifico*

Piero Augusto Battaglia (Laboratorio di Biologia Cellulare)

*Sintesi dell'attività svolta*

Tat produce sia perdita che aumento del numero dei cromosomi. È questo il risultato più interessante che si è ottenuto nel corso del 2000, facendo esprimere Tat transgenico nelle cellule del cervello della *Drosophila*. Il risultato ha importanza sia per la patogenesi indotta da Tat che per il controllo di un eventuale vaccino basato sulla proteina Tat. Per quanto riguarda la patogenesi, è stato messo in evidenza quale importante meccanismo possa essere alla base del comportamento più aggressivo e invasivo dei tumori associati all'AIDS. Per quanto riguarda il controllo del vaccino, il suggerimento che viene dagli esperimenti svolti è quello di saggiare se, una volta inoculato Tat, induca insieme ad una risposta immunitaria anche aneuploidia nelle cellule dell'ospite. Si tratta di un controllo di "tossicità moderna" necessario, visto anche che l'aneuploidia correla sempre con l'induzione della malignità. Certamente il modello *in vivo* della *Drosophila* suggerisce l'importanza di fare questo controllo, ma sono noti i limiti di questo modello: quantità notevole di Tat espressa, la presenza di una p53 nella *Drosophila* che induce apoptosi, ma non sembra coinvolta nei meccanismi di *repair*, cosa che potrebbe facilitare l'aneuploidia. È necessario approfondire e confermare il risultato con altri esperimenti. La logica che ha condotto al risultato appena descritto è stata la seguente: Tat interagisce con la tubulina nel dominio che permette l'attacco dei motori e di conseguenza li spiazza producendo modificazioni nella struttura del fuso, mitotico e meiotico, e nel movimento dei cromosomi, funzioni presiedute dai motori stessi.

- **Infezione *in vitro* da HIV dei progenitori ematopoietici: sviluppo di modelli terapeutici anti-HIV a livello delle cellule staminali e progenitrici**

*Responsabile scientifico*

Cesare Peschle (Laboratorio di Ematologia ed Oncologia)

*Sintesi dell'attività svolta*

Nell'ambito del progetto di ricerca sull'AIDS sono stati studiati gli effetti di HIV-1 su cellule ematopoietiche indotte alla differenziazione dendritica: progenitori CD34+ e precursori monocitari anch'essi derivati da cellule CD34+. Cellule CD34+ purificate dal sangue periferico sono state cimentate con HIV R5 (BaL) o X4 (NL4-3) e quindi indotte a differenziazione dendritica mediante uno specifico cocktail di fattori di crescita; alternativamente, precursori monocitari ottenuti coltivando cellule CD34+ con appropriati fattori di crescita, sono stati infettati e quindi indotti a differenziazione dendritica. Dopo 10-12 giorni di coltura, nonostante si osservi replicazione virale solo nell'1% della popolazione cellulare, le cellule dendritiche (DC) ottenute da CD34+ infettate non raggiungono la maturazione, non è in grado di stimolare una risposta T-lymfocitaria e circa il 50% muore per apoptosi. Le DC derivate da precursori monocitari infettati proliferano normalmente nonostante richiedano efficientemente HIV R5 e X4. Anche in questo tipo di colture si osserva comunque una ridotta capacità di stimolazione di linfociti-T eterologhi.

- **Interazione tra i fattori di trascrizione cellulari della famiglia IRF (Interferon Regulatory Factor), HIV-1 e HHV-8: effetti sulla replicazione virale e sullo sviluppo di neoplasie associate**

*Responsabile scientifico*

Angela Battistini (Laboratorio di Virologia)

*Sintesi dell'attività svolta*

Il progetto riguarda lo studio della regolazione dell'espressione di HIV-1 e HHV-8 da parte di fattori di trascrizione cellulari della famiglia IRF. I risultati ottenuti nel 2000 hanno evidenziato una cooperazione tra il fattore di trascrizione IRF-1 e Tat nell'indurre la trascrizione LTR mediata e l'induzione precoce di IRF-1 da parte di HIV-1 antecedente alla sintesi di proteine virali. Questi dati, assieme ai dati funzionali, rafforzano la conclusione che IRF-1 è un fattore cellulare chiave nella trascrizione di HIV-1 nelle fasi precoci dell'infezione e/o durante la riattivazione del virus dalla latenza. Per quanto riguarda lo studio relativo all'HHV-8, tale virus contiene sul genoma 4 *open ready frame*, che codificano per proteine analoghe ai fattori IRFs cellulari. Tra gli omologhi degli IRFs cellulari, v-IRF-1 è in grado di inibire la transattivazione indotta da IRF-1, IRF-3 e IRF-7 non solo dell'IFN di tipo I, ma anche di geni interferon-indotti. È stato dimostrato che questo effetto è mediato per quanto riguarda IRF-3 dall'interazione di v-IRF-1 con il coattivatore CBP/p300 che blocca la formazione del complesso trascrizionalmente attivo IRF-3-CBP/p300.

- **Interazioni HIV-1/cellula target nei fenomeni di persistenza dell'infezione e di deplezione dei linfociti CD4+. Ruolo della proteina vpr di HIV e sviluppo di modelli chimerici con cellule umane in topi SCID per studi *in vivo* di patogenesi**

*Responsabile scientifico*

Filippo Belardelli (Laboratorio di Virologia)

*Sintesi dell'attività svolta*

Sono state studiate le funzioni della proteina vpr di HIV-1 nella replicazione virale e nel controllo dell'apoptosi. L'espressione costitutiva di vpr in cellule Jurkat conferisce resistenza all'infezione da HIV come evidenziato da una minore espressione di retrotrascritti virali, proteine e rilascio di p24. L'analisi al citofluorimetro (FACS) di recettori e corecettori di HIV-1 ha rivelato che vpr, costitutivamente espressa o prodotta nell'infezione, regola negativamente l'espressione di CD4, ma non di corecettori, alla superficie cellulare.

In uno studio successivo è stato dimostrato che la vpr esercita ruoli opposti nel controllo dell'apoptosi. In particolare, l'espressione di vpr in fasi precoci dell'infezione correla con l'inibizione dell'apoptosi indotta da stimoli esogeni mentre, in fasi tardive, rappresenta il fattore principale responsabile per l'apoptosi HIV-indotta.

- **Isolamento e caratterizzazione di mutanti Vif e Nef capaci di inibire diversi effetti patogenici di HIV: studi sul meccanismo d'azione e approcci di terapia genica**

*Responsabile scientifico*

Maurizio Federico (Laboratorio di Virologia)

*Sintesi dell'attività svolta*

Il gruppo di ricerca si è impegnato essenzialmente su due fronti:

- messa a punto di vettori lentivirali per un possibile utilizzo in protocolli di terapia genica anti-HIV. È stato individuato un mutante della proteina regolatrice Nef di HIV in grado di bloccare il rilascio di HIV. Questo ha permesso di creare vettori lentivirali originali per un uso in terapia genica anti-HIV che sono risultati essere molto efficaci in linfociti umani;
- in collaborazione con diversi laboratori dell'Istituto, e anche europei e americani, si sono sviluppati studi finalizzati ad individuare i meccanismi d'azione attraverso i quali l'infezione da HIV, e in particolare la proteina Nef, è in grado di influenzare la patogenesi e lo sviluppo dell'AIDS.

- **Linfomagenesi nel modello SIV/SHIV-*macaca fascicularis*: ruolo dei cofattori virali (SIV, SHIV, HVMF-1, HHV-8), lesioni genetiche e strategie di vaccinazione e terapia**

*Responsabile scientifico*

Fausto Titti (Laboratorio di Virologia)

*Sintesi dell'attività svolta*

In precedenza è stata dimostrata la presenza di SIV in linfomi di scimmie infettate. I dati in possesso indicano che SIV può avere un ruolo nel processo linfomagenico. Infatti SIV induce *in vitro* una infezione cronica in cellule B tumorali di scimmia e una up-regolazione di marker di superficie CD23 e CD40 in assenza di una concomitante riattivazione di HVMF-1 (EBV-like). Di notevole interesse è il dato sulla presenza di lesioni genetiche (p53, Bcl-6 e c-myc) osservate tramite SSCP in alcuni linfomi. È stato inoltre estesa l'analisi di possibili marcatori prognostici di degenerazioni linfoproliferative (CD40, CD95, S-ICAM-1, SE-Selectin, SP-Selectin, S-Pecam- citochine).

Per quanto riguarda approcci terapeutici antitumorali, è stato costruito un vettore retrovirale esprimente IL-15 di scimmia il cui effetto antitumorale sarà studiato *in vivo* nei topi e *in vitro* su linee derivate da scimmia. Inoltre, per quanto riguarda la standardizzazione di un modello animale per l'infezione con HVMF-1, utilizzando scimmie *naive* appartenenti ad un cluster familiare con un'alta incidenza di tumori, si sta tentando di isolare *in vitro*, ed eventualmente reinoculare, in altre scimmie HVMF-1.

- **Ruolo del citoscheletro actinico nell'infezione da HIV-1, nella apoptosi virus-indotta Fas-dipendente, nella risposta immune specifica e naturale all'infezione e nella resistenza ai farmaci antivirali**

*Responsabile scientifico*

Stefano Fais (Laboratorio di Immunologia)

*Sintesi dell'attività svolta*

Il progetto si propone di valutare il ruolo del citoscheletro actinico in vari aspetti dell'infezione da HIV, fra cui:

- i meccanismi di infezione cellula-cellula;
- i meccanismi alla base della deplezione dei linfociti CD4+;
- i meccanismi alla base della disfunzione delle cellule NK;
- i meccanismi alla base della farmacoresistenza verso i farmaci antivirali.

È stato già dimostrato che la associazione tra Fas e il citoscheletro actinico, tramite l'ezrina, rappresenta un meccanismo preponderante nel conferire ai linfociti suscettibilità all'apoptosi mediata da Fas. Studi sono in corso per verificare l'importanza di tale meccanismo nella patogenesi dell'AIDS. Inoltre, saranno verificati il ruolo delle proteine della famiglia ERM (Ezrina, Radixina, Moesina) nella funzione NK e delle modificazioni della funzione citoscheletrica inseguito a stimolo con proteine di HIV o virioni inattivati, e il ruolo dell'actina nella farmacoresistenza mediata dalla P-gp in linfociti T umani con alti livelli di espressione di P-gp in membrana.

- **Ruolo delle interazioni tra determinanti della matrice e il dominio citoplasmatico di Env e meccanismi di infezione virale CD4 indipendente nello studio del tropismo cellulare di HIV-1**

*Responsabile scientifico*

Alessandra Borsetti (Laboratorio di Virologia)

*Sintesi dell'attività svolta*

È noto che cellule CD4 umane possono essere produttivamente infettate da SIV; diversamente, cellule CD4 di scimmia non vengono infettate da HIV-1. Recentemente è stata stabilizzata *in vitro* una linea cellulare di scimmia SL691, la cui analisi fenotipica ha rivelato l'espressione dei marcatori della linea B. Per valutare la suscettibilità all'infezione della linea cellulare SL691 con ceppi diversi di SIV e di HIV-1, le cellule sono state infettate con virus ricombinanti contenenti le glicoproteine dell'*envelope* di ceppi di HIV-1 T tropici, M tropici, dualtropici e con le proteine dell'*envelope* del SIVmac316 e SIVmac239. Inaspettatamente, le cellule SL691 non solo potevano essere infettate con SIV ma soprattutto con differenti ceppi di HIV-1.

È stato recentemente dimostrato che un vaccino basato sulla proteina Tat può controllare l'infezione primaria dello SHIV89.6P. Per determinare i cambiamenti molecolari che sono avvenuti durante il passaggio del virus SHIV89.6P *in vivo*, le sequenze nucleotidiche del gene Tat delle scimmie vaccinate non protette e di controllo sono state esaminate e comparate con il clone molecolare SHIV89.6P (KB9). I dati in possesso indicano che la pressione selettiva dell'ospite è diversa nei due gruppi di scimmie poiché conduce alla formazione di diversi cluster di mutazioni del gene Tat. Infatti, l'analisi di sequenza ha mostrato varianti virali principalmente nella regione amino-terminale del gene Tat nelle scimmie vaccinate non protette. Poiché la regione amino-terminale è stata descritta come quella più immunogenica, un'ipotesi suggestiva suggerirebbe che la vaccinazione con la proteina Tat potrebbe spingere il sistema immune ad esercitare una pressione selettiva proprio verso questa regione della proteina.

- **Ruolo dei recettori per citochine immunoregatorie e chemochine e dei loro pathways di trasduzione del segnale nell'infezione da HIV e nella patogenesi dell'AIDS**

*Responsabile scientifico*

Sandra Gessani (Laboratorio di Virologia)

*Sintesi dell'attività svolta*

L'attività di ricerca svolta nell'anno 2000 è stata principalmente focalizzata allo studio degli effetti della gp120 di HIV-1 sull'espressione di  $\beta$ -chemochine in monociti/macrofagi umani. È stato osservato che il trattamento di monociti a diverso stadio differenziativo con la gp120 induce un aumento dose-dipendente della secrezione di alcune  $\beta$ -chemokine (MCP-1, MIP-1 $\beta$  e RANTES) così come dei loro trascritti. L'espressione di  $\beta$ -chemochine viene anche potenziata a seguito dell'esposizione di monociti/macrofagi a ceppi T e M tropici di HIV-1 inattivati. Studi successivi mirati alla caratterizzazione di recettori di superficie coinvolti nel fenomeno hanno evidenziato che le interazioni CD4-gp120 non sono responsabili dell'induzione di secrezione di  $\beta$ -chemochine. Al contrario, anticorpi diretti contro recettori CCR5 e CXCR4 o i loro ligandi specifici (MIP-1 $\alpha$  e SDF-1) potenziano significativamente la produzione di  $\beta$ -chemochine. Sono stati anche avviati studi per caratterizzare il ruolo della produzione spontanea di chemochine (MCP-1 e MIP-1 $\beta$ ) nel differenziamento macrofagico e nella risposta all'infezione da HIV-1.

- **Studio dell'effetto immunomodulante di proteine e farmaci antiretrovirali**

*Responsabile scientifico*

Marina Viora (Laboratorio di Immunologia)

*Sintesi dell'attività svolta*

Nel 2000 è stato dimostrato che la proteina rNef di HIV-1 inibisce l'induzione di anticorpi specifici per *Candida albicans* in PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell) umani normali mediante un meccanismo che coinvolge l'up-regolazione della produzione di IL-15. È stato, inoltre, osservato che rNef induce la differenziazione fenotipica, funzionale e morfologica delle cellule dendritiche umane normali.

È stato dimostrato che il peptide aa 417-425, compreso un pannello di peptidi di 7-12 residui aminoacidici selezionati dalla regione 414-434 di gp120, esercita la massima attività inibitoria del legame del CD4/gp120.

È stato dimostrato che le lipoproteine a bassa densità ossidate down-modulano *in vitro* le funzioni immuni di PBMC umani normali e inducono alterazioni morfologiche e funzionali sulla linea A431 abrogate rispettivamente dall'aggiunta di antiossidanti utilizzati nella terapia dell'AIDS quali la N-acetilcisteina (NAC) e l' $\alpha$ -tocoferolo.

È stato osservato che la NAC inibisce l'induzione di anticorpi specifici per *C. albicans* in PBMC umani normali down-regolando l'espressione delle molecole costimolatorie CD40 e CD27 sulle cellule B.

- **Virus dell'influenza come vettore di antigeni HIV-1**

*Responsabile scientifico*

Maria Rita Castrucci (Laboratorio di Virologia)

*Sintesi dell'attività svolta*

Virus influenzali ricombinanti contenenti epitopi P18IIIB di gp160315-329 e di p24 gag193-212 di HIV-1 nella neuraminidasi sono in grado di indurre una risposta CTL specifica per gli epitopi estranei, comparabile al proprio epitopo immunodominante NP147-155. Con lo stesso approccio, topi preimmunizzati con virus influenzale esprimente l'epitopo CTL di NP324-332 del virus Sendai risultano protetti da dose letale di quest'ultimo. Tale virus ricombinante inattivato con u.v. è pure in grado di stimolare una risposta CTL per il virus Sendai. Conferma e analisi del suo valore protettivo sono in corso.

L'immunizzazione con virus vaccinia o influenzale esprimenti un epitopo CTL da  $\gamma$ -herpesvirus murino in topi infetti da tale virus e mancanti di linfociti CD4+T produce un aumento transitorio non protettivo dei corrispondenti CTL.

Studi di attenuazione della virulenza del virus influenzale debole della regione gambo della neuraminidasi rivelano mutazioni nella emoagglutinina responsabili di una ridotta affinità al recettore, indicando una interdipendenza funzionale.

## **INFEZIONI OPPORTUNISTICHE E TUBERCOLOSI**

*Responsabile:* Antonio Cassone

- **Aspetti eziopatogenetici, immunologici e terapeutici delle infezioni da *Mycobacterium avium* in pazienti AIDS**

*Responsabile scientifico*

Graziella Orefici (Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica)

*Sintesi dell'attività svolta*

La somministrazione per via intranasale di chaperonina 10 ricombinante di *Mycobacterium avium* e di un adiuvante oligonucleotidico di tipo CpG è risultata essere protettiva verso topi infettati per la stessa via con dosi challenge dello stesso organismo. Per quanto riguarda lo studio di antigeni overespressi all'interno dei macrofagi umani, è stato osservato che *M. avium* sintetizza precocemente tre proteine (*macrophage-induced proteins*- MIP) impegnate nel metabolismo degli acidi grassi, quali kasA ( $\beta$ -chetooacil-ACP sintetasi), coinvolta nella sintesi degli acidi micolici della parete, fadE2 (acil-CoA deidrogenasi) e fixA (una flavoproteina coinvolta nel trasporto di elettroni). FadE2 e fixA sono essenziali per la  $\beta$ -ossidazione degli acidi grassi, una via importante per la sopravvivenza nell'ambiente intrafagosomiale.

I meccanismi fini di patogenicità di *M. celatum* (un micobatterio simile a *M. avium*) investigati mediante microscopia elettronica hanno mostrato che il batterio è dotato di materiale capsulare e che entrambe le varianti (opaca e trasparente) sono in grado di riprodursi a livello intracellulare.

- **Controllo delle patologie AIDS associate: sviluppo di nuove strategie per la diagnosi, la profilassi e la terapia delle infezioni da papillomavirus**

*Responsabile scientifico*

Colomba Giorgi (Laboratorio di Virologia)

*Sintesi dell'attività svolta*

Il cancro alla cervice uterina, associato a papillomavirus (HPV) ad alto rischio (tipi 16, 18, 31 e 45), è, dopo quello alla mammella, il cancro con più alta incidenza nelle donne. Il progetto si prefigge di dare un contributo per lo sviluppo di test diagnostici più semplici e meno costosi di quelli attualmente usati e per lo sviluppo di un vaccino. Alcune proteine virali (L1, E7, E6, E2) sono state espresse in sistemi procarioti e purificate. Le proteine purificate sono state usate per produrre in topo anticorpi policlonali monospecifici, da usare come sieri di riferimento.

È stata sviluppata la produzione e purificazione di *virus-like particles* (VLPs) di HPV16 espresse in cellule di farfalla mediante un vettore baculovirus. Questi antigeni virali saranno usati per studiare in ELISA e Western blotting la risposta immunitaria all'HPV al fine di metterla in relazione alla progressione tumorale dell'infezione virale.

- **Costituenti immunogenici e immunomodulatori e fattori di virulenza di *Candida albicans* in AIDS**

*Responsabile scientifico*

Antonio Cassone (Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica)

*Sintesi dell'attività svolta*

La ricerca ha essenzialmente evidenziato l'identificazione di antigeni e fattori di virulenza di *C. albicans* di particolare rilievo nella infezione da HIV. Inoltre è stato affrontato il tema dell'attività anti-*Candida* degli inibitori della proteasi di HIV. Questa attività è stata pienamente dimostrata sia in modelli sperimentali che nella sperimentazione clinica con risultati in corso di pubblicazione.

È stato, inoltre, clonato il gene dell'antigene immunodominante MP65 ottenendone la proteina ricombinante, che si è dimostrata un validissimo reagente per saggiare lo stato della risposta immune e cellulosa-mediata durante la terapia anti-retrovirale. Sono state anche studiate alcune caratteristiche dei cloni T linfocitari specifici per MP65.

- **Presentazione dell'antigene e insorgenza di infezioni opportunistiche in pazienti con AIDS. Modelli sperimentali *ex vivo* e approcci terapeutici**

*Responsabile scientifico*

Roberto Nisini (Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica)

*Sintesi dell'attività svolta*

Sono stati eseguiti test di proliferazione e conta della frequenza delle cellule T specifiche per antigeni di *C. albicans*, *M. avium*, per tossoide tetanico (TT) e PPD in una coppia di gemelli monozigoti discordanti per infezione da HIV.

La proliferazione dei PBMC del soggetto HIV+ è risultata estremamente deficitaria. Ma quando i PBMC del soggetto HIV sono stati testati in presenza di APC irradiate del gemello identico sano, si è osservato un parziale ripristino della proliferazione. Questi dati suggeriscono che la mancata risposta agli antigeni non è solamente legata ad un'alterata funzione linfocitaria, ma anche ad un'inappropriata presentazione.

È stata valutata la frequenza delle cellule antigene specifiche con metodica ELISPOT. I precursori per TT e *C. albicans* sono in numero più elevato nel soggetto sano, mentre i precursori per PPD e *M. avium* sono più elevati nel soggetto HIV+. Sono stati inoltre selezionati cloni T specifici per antigeni di *C. albicans*, *M. avium*, per TT e PPD dal soggetto sano e sono state stabilizzate linee LCL da entrambi i gemelli.

In un primo test di efficienza di presentazione comparativa tra PBMC del sano e del malato, utilizzando come *read-out* della funzione APC, i cloni T isolati dal gemello sano e sicuramente non infettati da HIV, si è potuta quantizzare nell'ordine del 30% in meno l'efficacia di presentazione degli antigeni da parte di PBMC del soggetto malato.

- **Ruolo delle proteine di trasporto nei meccanismi di farmacoresistenza di ceppi di *Candida albicans* isolati da pazienti HIV-positivi**

*Responsabile scientifico*

Giuseppe Arancia (Laboratorio di Ultrastrutture)

*Sintesi dell'attività svolta*

Questo progetto si propone di studiare i meccanismi di resistenza di *C. albicans* agli agenti antifungini in pazienti HIV-positivi. In particolare, è stata condotta l'analisi dei trasportatori ATP-binding cassette *transporters* (ABC) in diversi ceppi di *C. albicans* che mostrano diversi gradi di farmacoresistenza. Sono state quindi analizzate l'espressione, la localizzazione e la funzione di molecole P-gp simili nei diversi ceppi di *Candida*, con particolare riferimento a quelli ottenuti da ripetuti isolamenti dallo stesso soggetto sotto trattamento antimicotico. Studi condotti mediante microscopia elettronica, citometria a flusso e test di suscettibilità agli antimicotici, hanno confermato l'esistenza di una molecola simil-P-glicoproteina in *C. albicans*, la cui espressione aumenta con l'aumentare del grado di resistenza agli agenti azolici. Tale proteina inoltre non sembra venire espressa nella *C. krusei*, la cui resistenza viene mediata da alterata suscettibilità dei sistemi enzimatici agli agenti azolici.

## **SVILUPPO DI UN VACCINO CONTRO HIV-AIDS**

*Responsabile:* Barbara Ensoli

- **Immunizzazione mucosale con antigeni di HIV e di patogeni opportunisti utilizzando adiuvanti mucosali di nuova generazione**

*Responsabile scientifico*

Maria Teresa De Magistris (Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica)

*Sintesi dell'attività svolta*

Lo scopo del progetto è di valutare la fattibilità di vaccini mucosali bivalenti, diretti contro HIV e contro patogeni opportunisti rilevanti per l'AIDS.

Topi Balb/c sono stati vaccinati per via intranasale con proteine di HIV (Tat, gp120) da sole o in concomitanza con la mannoproteina MP65 di *Candida albicans*. Come adiuvanti mucosali sono stati usati la enterotossina termolabile di *E. coli* (LT) o dei suoi mutanti privi di tossicità. I risultati dimostrano che la somministrazione di Tat + MP65 con LT o con i suoi mutanti induce un'elevata risposta IgG e IgA verso le due proteine nel siero così come una risposta specifica IgA nelle secrezioni vaginali. Inoltre, la risposta verso i due antigeni somministrati contemporaneamente è simile a quella ottenuta immunizzando con le proteine singole, indicando l'assenza di fenomeni di immunodominanza o immunosoppressione tra questi due antigeni nelle condizioni sperimentali usate.

- **Italian Concerted Action on the Development of a Vaccine Against HIV/AIDS (ICAV)**

*Responsabile scientifico*

Barbara Ensoli (Laboratorio di Virologia)

*Sintesi dell'attività svolta*

Il controllo della diffusione dell'infezione da HIV è uno dei più importanti obiettivi del Piano sanitario nazionale. La via più efficace per ottenere tale controllo è l'allestimento di un vaccino contro l'HIV e l'AIDS. Per tale motivo, l'Italian Concerted Action on Vaccine Research against AIDS (ICAV) è sorta con lo scopo di studiare differenti strategie vaccinali, di tipo sia preventivo che terapeutico, di sviluppare ulteriormente l'approccio vaccinale basato sulla proteina Tat di HIV-1, che ha mostrato efficacia nel controllare lo sviluppo della malattia nel modello della scimmia, e di effettuare la sperimentazione clinica di tale vaccino.

Per il raggiungimento di questi obiettivi sono stati selezionati 27 gruppi di ricerca italiani che hanno presentato differenti progetti raggruppati in quattro specifiche aree: ricerca di base, studi preclinici, studi clinici, studi su modelli animali alternativi alla scimmia. Dall'anno 2000 l'ICAV è confluita nel progetto collaborativo tra Italia e USA per lo sviluppo di un vaccino contro l'HIV, firmato nel 1996.