

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA



DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN FARMACIA

TESI DI LAUREA

**HIV/AIDS: TERAPIE ANTIRETROVIRALI DI RECENTE
SVILUPPO, IN STUDIO E PROSPETTIVE PER LO
SVILUPPO DI UN VACCINO**

RELATORE: CHIAR.MA PROF.SSA ADRIANA CHILIN

LAUREANDO: ELENA MANGHISE

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

INDICE

INTRODUZIONE	Pag 5
CAPITOLO 1 – ASPETTI EZIOLOGICI E MICROBIOLOGICI DI HIV	Pag 7
1.1 VIRUS: GENERALITÀ	
1.2 HIV: MORFLOGIA E CICLO REPLICATIVO	
CAPITOLO 2 – PATOGENESI DI HIV	Pag 15
2.1 DIAGNOSI DELL' INFEZIONE DA HIV E PRINCIPALI PARAMETRI	
2.2 FASI DELL'INFEZIONE DA HIV E PATOLOGIE CORRELATE	
2.3 HIV PEDIATICO: CENNI	
CAPITOLO 3 – ORIGINE E IMPATTO SOCIALE	Pag 25
3.1 LINEA TEMPORALE	
3.2 IMPATTO SOCIALE ED INDIVIDUALE	
CAPITOLO 4 – TERAPIE FARMACOLOGICHE	Pag 32
4.1 TARGET MOLECOLARI E PROBLEMATICHE CORRELATE ALL'USO DI ANTIRETROVIRALI	
4.2 CLASSI DI FARMACI	
4.3 TERAPIA HAART	
CAPITOLO 5 – TERAPIE DI RECENTE SVILUPPO E IN STUDIO	Pag 41
5.1 FARMACI ANTIRETROVIRALI DI RECENTE APPROVAZIONE E IN SPERIMENTAZIONE	
5.2 PROSPETTIVE PER LO SVILUPPO DI UN VACCINO ANTI-HIV	
CONCLUSIONI	Pag 57
RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI E SITOGRAFIA	Pag 59

INTRODUZIONE

Il virus dell'immunodeficienza umano (HIV) è stato identificato per la prima volta nel 1983; da poco circolava negli Stati Uniti e in Europa e dopo pochi anni è stato associato alla comparsa della Sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS). In poco tempo dalla sua comparsa HIV si è diffuso in tutti e cinque i continenti. Si stima che dall'inizio della pandemia si siano infettate 75 milioni di persone e ne siano decedute 32 milioni. Nel 2020 le nuove diagnosi di HIV sono state 1,5 milioni. Le persone che vivono con un'infezione da HIV sono 37,7 milioni, di queste 1,7 milioni sono bambini di età inferiore a 15 anni.

L'HIV si è da subito distinto rispetto agli altri virus per una serie di caratteristiche uniche. È stato il primo retrovirus umano ad essere scoperto e di conseguenza si è capito che esistevano virus in grado di invertire la sequenza temporale di trasmissione dell'informazione genetica, ovvero di sintetizzare a partire da RNA il DNA. Sono state individuate le popolazioni cellulari colpite da HIV, ovvero le cellule immunitarie, in particolare i linfociti T. Si è osservato come una volta infettate queste cellule, il virus non ne provocasse immediatamente la morte, ma fosse in grado di integrare il proprio genoma nel materiale genetico della cellula e in questo modo "nascondersi" dalle difese immunitarie dell'ospite, mantenere l'infezione latente e riattivare la propria replicazione in un secondo tempo. La Sindrome da immunodeficienza acquisita non è di per sé una malattia ma una condizione conseguente all'infezione cronica da HIV. Il virus infatti non colpisce un organo o un tessuto specifico ma compromette la capacità dell'organismo di difendersi da altri patogeni che provocano altri tipi di infezioni. Sono proprio le complicanze dovute a queste infezioni e le neoplasie che insorgono non contrastate dai sistemi di difesa che portano il paziente alla morte. Dal punto di vista farmacologico, l'aspetto più interessante di HIV è la sua ampissima variabilità genetica. I due ceppi a circolazione endemica sono HIV-1 e HIV-2 ma la variabilità all'interno dei ceppi stessi è notevole. Essa pesa soprattutto nello sviluppo di un vaccino che possa prevenire la trasmissione del virus.

Non si registra ad oggi nessun caso di pazienti guariti completamente dall'infezione, difatti nessun farmaco sviluppato fino ad ora è in grado di eradicare il virus dall'organismo ospite. I primi farmaci utilizzati per arginare la replicazione virale erano farmaci già utilizzati nella cura dei tumori. I bersagli molecolari di questi farmaci consentivano, quando usati da soli o in combinazione, di rallentare l'evoluzione dell'infezione e ritardare la comparsa di AIDS. L'utilizzo di questi farmaci tuttavia è stato un uso "emergenziale" perché vi era la necessità di ridurre la mortalità dovuta alle patologie AIDS correlate. I primi antivirali usati hanno importanti problemi di tossicità soprattutto perché sono farmaci che devono essere utilizzati per tutta la vita.

Le nuove frontiere terapeutiche tengono conto di una serie di problemi legati alla tossicità e alla resistenza dei farmaci impiegati sino ad ora e alle problematiche correlate alla terapia anti-HIV che è una terapia che prevede l'assunzione di più di un farmaco.

Gli obiettivi dei farmaci in studio sono sostanzialmente tre. La prima strategia, quella più ambiziosa è quella di riattivare l'infezione per risolvere il problema della latenza del virus all'interno delle cellule ospiti ed eliminare le cellule infettate. Se i farmaci impiegati per questi obiettivi si dimostrassero efficaci, si riuscirebbe a rimuovere completamente il virus dall'organismo del malato. In alternativa sono in studio farmaci che siano in grado di mantenere l'infezione in uno stato di latenza prolungato evitando dunque che si sviluppi la Sindrome da immunodeficienza acquisita.

Essendo tuttavia un'infezione di natura virale, la strategia per eradicarla completamente è rappresentata dallo sviluppo di un vaccino. Nonostante gli innumerevoli sforzi in questa direzione non si è ancora arrivati ad un risultato soddisfacente. Tuttavia proprio in questo momento, grazie anche ai risultati incoraggianti ottenuti dalla ricerca per il vaccino per COVID-19, la ricerca di vaccini anti-HIV ha subito un'accelerazione, fornendo, dopo molti fallimenti, una prospettiva positiva.

CAPITOLO 1. ASPETTI EZIOLOGICI E MICROBIOLOGICI DI HIV

1.1 VIRUS : GENERALITÀ

I virus sono parassiti endocellulari obbligati di dimensioni ridotte (tra i 10 e 100 nm) con una struttura elementare costituita da tre elementi: acido nucleico, involucro e recettori.

Si definiscono obbligati in quanto sono inattivi dal punto di vista metabolico, non producono energia, né sono in grado di replicarsi autonomamente. Necessitano quindi di cellule ospiti che mettano loro a disposizione le strutture per metabolismo e replicazione.

- **Ordine** (- *virales*)
- **Famiglia** (- *viridae*)
- **Sottofamiglia** (-*virinae*)
- **Genere** (- *virus*)
- **Specie** (*common names*)

Immagine 1. Classificazione tassonomica dei virus. (Fonte : PDF dstunisannio.)

Vengono principalmente suddivisi in base al genoma virale, secondo la classificazione di Baltimore ed alla morfologia.

Si parla di virus a DNA quando l'acido nucleico è appunto il DNA che può essere a singolo o a doppio filamento, lineare o circolare, o di virus a RNA quando l'acido nucleico è l' RNA.

Per i virus a RNA esiste una sotto classificazione : RNA+ ed RNA-.

Le caratteristiche del singolo filamento sono diverse: RNA con polarità (+) significa che la molecola del genoma virale può essere subito tradotta in proteina dal ribosoma fungendo da mRNA e RNA con polarità (-) che è complementare a mRNA, per cui è necessario sintetizzare prima il filamento complementare funzione esplicata dall'enzima RNA polimerasi.

La distinzione sulla base della morfologia riguarda la presenza o meno di un involucro esterno detto pericapside.

I virus che lo possiedono si definiscono "virus con pericapside". Hanno una forma irregolare e sono più grandi rispetto a quelli che non lo possiedono. Il pericapside è un rivestimento esterno al capsido, ed è costituito da una membrana citoplasmatica con doppio strato fosfolipidico che deriva dalla cellula infettata in quanto una volta replicatosi e assemblatosi all'interno viene rilasciato per gemmazione o per lisi quando la cellula ospite non riesce più a sostenere il rilascio continuo di particelle virali.

Su questo involucro esterno sono presenti delle glicoproteine che diversificano i virus e dirigono l'agente patogeno verso la cellula bersaglio.

Per contro i virus che non possiedono questo involucro esterno sono definiti "virus nudi".

Questi sono più resistenti in quanto il pericapside è un punto di fragilità poiché se danneggiato ad esempio da acidi, detersivi, calore comporta una perdita di infettività. I virus che non possiedono il pericapside sono in grado di resistere alle condizioni sopracitate e possono trasmettersi più facilmente e indirettamente in quanto possono permanere a lungo su varie superfici.

I virus nudi hanno una forma geometrica e regolare: l'acido nucleico è racchiuso in un rivestimento proteico (capside) che lo protegge e lo dirige verso la cellula bersaglio.

Sono rilasciati dalla cellula ospite per lisi della stessa.

I virus del raffreddore (rinovirus) e il papilloma virus (HPV) sono dei virus nudi.

1.2 HIV: MORFOLOGIA e CICLO REPLICATIVO

L' HIV (human immunodeficiency virus) appartiene alla famiglia dei Retrovirus, alla sottofamiglia dei Lentivirus, i quali nella specie umana causano infezioni croniche. L' HIV è stato il primo lentivirus ad essere scoperto nelle specie vertebrate. Il ceppo responsabile di AIDS è HIV-1, a diffusione pandemica, vi sono poi HIV-2 biologicamente simile ma a circolazione più ridotta, presente soprattutto in Africa occidentale e con patogenicità minore, e SIV che colpisce i primati.

I Retrovirus sono una famiglia di virus a RNA che colpiscono la specie umana e numerose specie animali. L' HIV ha un genoma diploide formato da due molecole di RNA a singolo filamento. La peculiarità di questa famiglia di virus è la presenza della trascrittasi inversa (o DNA polimerasi RNA dipendente) un enzima formato da due subunità proteiche che permette di sintetizzare il DNA dall'RNA attraverso un processo cosiddetto di retro-trascrizione. I retrovirus sono inoltre in grado di integrare il proprio materiale genetico in quello della cellula ospite ad opera dell'enzima integrasi.

I retrovirus sono costituiti da un envelope di natura lipidica con simmetria icosaedrica, le dimensioni vanno dai 100 ai 120 nanometri. Sull'envelope sono presenti due glicoproteine

essenziali: gp120, che sporge leggermente dalla membrana pericapsidica e gp41 inserita all'interno.

Le due glicoproteine hanno una struttura multimerica che consente loro di assumere una conformazione ideale al riconoscimento e al legame con il recettore specifico.

Gp120 è una glicoproteina altamente glicosilata; è deputata al riconoscimento del recettore specifico ad alta affinità, CD4. Essa media il legame con CD4, antigene espresso sulla membrana dei linfociti T, attraverso l'interazione coi corecettori CXCR4 e CCR5 presenti sulla cellula ospite. Il sito della gp120, che interagisce specificamente con un dominio extracellulare della molecola CD4, risulta essere costituito da sequenze aminoacidiche non contigue. Gp41 è una glicoproteina transmembrana che ancora il complesso glicoproteico della cellula e media la fusione della membrana pericapsidica con la membrana della cellula ospite, attraverso la quale il nucleocapside viene traslocato all'interno. Gp41 permette l'ancoraggio di gp120 alla cellula. Tramite il recettore CD4 può avvenire la compenetrazione che permette un cambiamento spaziale nel pericapside virale e fa sì che il domain di fusione di gp41 possa venire in contatto con la superficie cellulare. Anche la regione della gp120 responsabile dell'interazione non covalente con gp41 presenta sequenze aminoacidiche non contigue.

Queste glicoproteine inoltre sono in grado di indurre la risposta anticorpale così come la proteina p24. Gli anticorpi anti-gp120 e anti-gp41 compaiono dopo 2-4 settimane, sono rilevabili in tutte le fasi cliniche della malattia. Gli anticorpi anti-p24 compaiono generalmente entro le prime due settimane dell'infezione e persistono in maniera elevata per tutta la fase asintomatica. La concentrazione di questi invece diminuisce man mano che la malattia progredisce.

I recettori CD4 si trovano sia su linfociti T helper che su macrofagi, monociti, i quali hanno un ruolo importante nella diffusione dell'infezione essendo cellule immunocompetenti circolanti, cellule dendritiche e microgliali. Le popolazioni cellulari colpite da HIV sono quindi presenti sia a livello del torrente circolatorio che in distretti corporei come tessuto linfoide, sistema nervoso e mucose genitali. Il virus può infettare queste cellule che costituiscono il "reservoir" o "serbatoio" dello stesso. Le popolazioni cellulari che esprimono, ma con minore densità questi co-recettori sono le cellule del tessuto linfoide, in particolare quello delle mucose genitali e rettali e del derma. Il tessuto linfoide in particolare rappresenta un importante deposito di HIV, che è allocato in questo distretto in concentrazione di 5-10 volte superiore rispetto al sangue. Nelle prime fasi dell'infezione le cellule linfoide intrappolano il virus, nelle fasi avanzate questa capacità viene persa e si assiste ad un aumento della viremia.

All'interno dell'envelope, è racchiuso un capsid proteico, il core costituito dalla proteina p24, che si trova sia nel virione che nel siero dove viene rilevata come p24Ag, le due singole eliche di RNA e le proteine necessarie per il ciclo replicativo virale, di cui trascrittasi inversa, proteasi ed integrasi.

La popolazione cellulare maggiormente colpita da HIV sono i linfociti T CD4+ o linfociti T helper. I recettori colpiti generalmente riconoscono MHC II o complesso maggiore di istocompatibilità di classe due, la cui funzione biologica è di "mostrare" ai linfociti l'antigene frammentato precedentemente incontrato. Nello specifico il legame tra gp120 ed il recettore CD4 inibisce l'interazione tra quest'ultimo e le molecole di MHC II, essenziale per la reazione

antigene specifica. L' HIV determina una riduzione di queste cellule e quindi la riduzione di alcune risposte immunitarie, come ipersensibilità ritardata e attività citotossica linfocitaria. Nell'infezione da HIV si assiste anche ad una selettiva perdita delle cellule della memoria, in quanto il virus è in grado di infettare anche queste. Le difese dell'ospite risultano indebolite a causa di una serie di fattori:

- infezione da HIV a livello dei neutrofili con riduzione della funzione fagocitica
- la funzione dei linfociti B risulta anomala: vi sono spontanee secrezioni di anticorpi e mancanze nella risposta ai segnali di attivazione
- le infezioni opportunistiche che colpiscono i pazienti affetti da HIV causano deterioramenti nelle membrane e nelle mucose che non risultano più in grado di svolgere la loro naturale funzione di barriere fisiche per i patogeni
- si verifica inoltre una diminuzione della produzione di IgA a livello salivare, e a livello del tratto respiratorio una riduzione nell'attività dei macrofagi, che costituiscono nei pazienti sani una difesa biochimica alla colonizzazione dei patogeni
- l'uso di antibiotici ad ampio spettro per trattare le molteplici infezioni da cui i pazienti sieropositivi sono affetti, provoca una riduzione delle popolazioni batteriche naturalmente presenti che hanno un ruolo nella difesa immunitaria.

Il genoma virale è molto semplice: è costituito da regioni con funzione strutturale e da regioni con funzione regolatoria:

- *gag* che codifica per le proteine del capsido.
- *pol* che codifica per trascrittasi inversa, integrasi e proteasi
- *env* che codifica per le proteine dell'envelope ovvero gp120 e gp41.
- *rev* regione con funzione regolatoria, è responsabile della replicazione virale.
- *tat* regola, attivandola, la trascrizione di HIV. Questa proteina interagisce con una breve sequenza nucleotidica all'inizio del genoma virale che induce la trascrizione di RNA messaggero dal DNA virale incrementando l'espressione dei geni virali. Sembra che questa proteina sia in grado di modulare anche la proliferazione cellulare e contribuire alla progressione di malattie neoplastiche. *Tat* inoltre contribuisce direttamente alla morte cellulare indotta da HIV ed alla sovrastimolazione del sistema immunitario.

GENE POTERE	PROTEINA	LOCALIZZAZIONE	FUNZIONE	IMMUNOGENO
<u>REGOLATORIE</u>				
<i>Tat</i> (attivatore)	p14	Nucleo/nucleolo	Transattivatore di proteine virali	+
<i>Rev</i> (regolatore selettivo)	p19	Nucleo/nucleolo	Regolazione espressione proteine virali	+
<i>Nef</i> (regolatore negativo)	p27	Citoplasma	Inibisce espressione virale	+ / ++
<i>Vif</i> (fattore di infettività)	p23	Citoplasma/membrana interna citoplasma	Determina infettività virale	++ / +++
<i>Vpr</i> (regolatore replicazione)	p18	Citoplasma	Accelera la replicazione virale	+
<i>Vpu</i> (effetto pleiotropico)	p15/20	Citoplasma	Assemblaggio, maturazione e replicazione	+
<u>STRUTTURALE</u>				
<i>Gag</i> (core)	p56, p24, p18, p15, p9 e p7	Nucleocapside e capside	Precursori o proteine del core	+++
<i>Env</i> (envelope)	gp160	Virus	Precursore di glicoproteine dell'involucro	++
	gp120	involucro	riconoscimento e adesione del virus	+++
	gp41	transmembrana	fusione tra envelope del virus e membrana cellulare	+++
<i>Pol</i> (polimerasi)	P65/51,	virus	Trascrittasi inversa	+++
	p34/31		endonucleasi	++ / +++
	p10		proteasi	+ / ++

Tabella 1. Schema delle proteine codificate dai geni del virus HIV-1. (Fonte: AIDS. M. Caremani. Ed Poletto. 1993.)

I retrovirus umani sono in grado di regolare in senso temporale l'espressione dei geni strutturali e regolatori. I primi geni ad essere trascritti codificano per proteine regolatrici e poi quelli per proteine strutturali.

Una volta penetrato all'interno il capsido si disorganizza (scapsidamento), perde gli involucri proteici, l'RNA virale viene rilasciato nel citoplasma assieme a copie di trascrittasi inversa ed integrasi. La trascrittasi inversa, utilizzando l'innesco fornito dalla molecola di RNA sintetizza una molecola di DNA complementare generando una molecola ibrida di RNA-DNA. La molecola di RNA viene poi degradata e viene sintetizzato un altro filamento complementare di DNA, che appaiandosi al primo va a formare una doppia elica.

Il DNA viene quindi traslocato nel nucleo e viene integrato nel materiale genetico della cellula ospite attraverso l'enzima integrasi. Il DNA virale così integrato prende il nome di DNA provirale e si duplica insieme ai geni cellulari ogni volta che la cellula si divide. In questa fase il virus non esiste come entità a sé ma è parte della cellula ospite, il virus può rimanere in questa forma per un tempo indefinito. La latenza dell'infezione comporta due caratteristiche di HIV: l'incapacità del sistema immunitario di riconoscere e bloccare l'infezione e la comparsa ritardata dei sintomi. Il periodo in cui il virus rimane latente è variabile e ciò è dovuto all'eterogeneità virale e al controllo dell'infezione da parte delle cellule CD8+. Esso può rimanere latente, generando una quantità relativamente bassa di materiale virale. L'attivazione della replicazione è controllata da regioni regolatorie del genoma virale.

Secondo un importante studio di Marini et al. sembra che il DNA virale venga integrato in regioni periferiche del nucleo che per la loro localizzazione ostacolano la degradazione dello stesso e assicurano la persistenza dell'infezione.

L'RNA polimerasi va quindi a tradurre sia il DNA della cellula ospite che il DNA virale, e attraverso i ribosomi vengono tradotte le proteine virali. Una volta sintetizzati i diversi componenti del virione immaturo vengono assemblati a livello della superficie interna della membrana cellulare, il core è la prima struttura a prendere forma. Le proteine vengono inserite nell'involucro virale. Viene quindi assemblata la particella virale grazie all'enzima proteasi e viene poi rilasciata per gemmazione sottraendo una porzione di membrana cellulare che forma l'envelope. Dopo la gemmazione i virioni vanno ad infettare altre cellule.

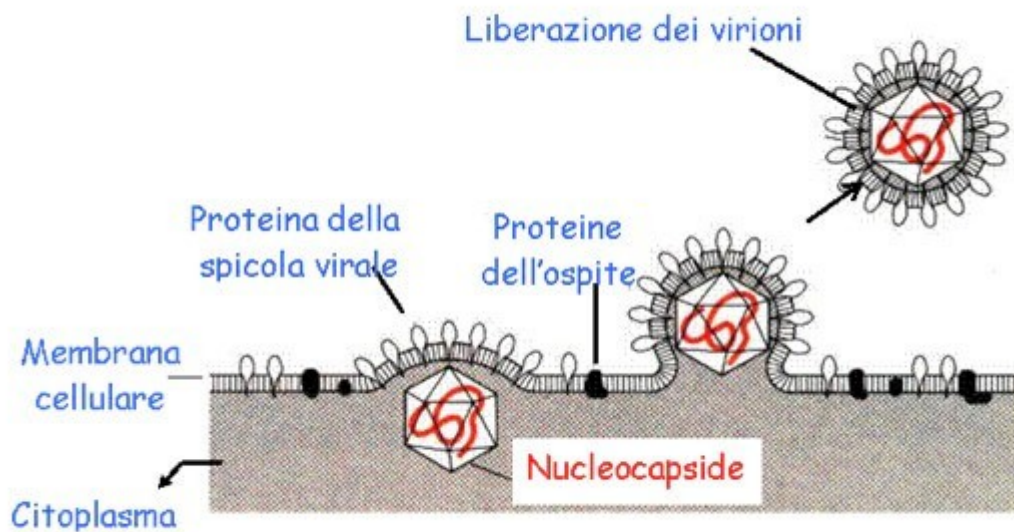


Immagine 2. Rilascio per gemmazione di una particella virale. (Fonte: <https://www.chimica-online.it>)

Il virus provoca la morte della cellula infettata attraverso diversi meccanismi:

- Rottura della membrana cellulare per danno osmotico per penetrazione di sodio, calcio ed acqua che porta ad un aumento di volume e ad una rottura della cellula.
- Cambiamento del metabolismo lipidico in particolare dell'inositolo 3-fosfato.
- Accumulo di DNA provirale prodotto ma che non viene integrato.
- Inibizione della sintesi di proteine cellulari.

L' HIV ha una variabilità genetica molto ampia per una serie di motivi; l'elevata velocità di replicazione, si stima che giornalmente vengano prodotti 10^9 virioni, l'elevata frequenza di errori operata dalla trascrittasi inversa e la pressione selettiva esercitata dalla sorveglianza immunitaria.

L'intero genoma di HIV è caratterizzato da un elevato polimorfismo. Nello stesso individuo infetto infatti possono risiedere popolazioni virali correlate ma geneticamente differenti che vengono definite quasispecie. I diversi ceppi di HIV si differenziano spesso a livello della regione codificante la gp120; il gene *env* è quello più variabile. La proteina gp120 è dotata di un elevato potere immunologico e la variabilità ad essa associata consente al virus di sviluppare un meccanismo di escape. La continua variazione delle sequenze aminoacidiche rende la risposta immunitaria inefficace contro ceppi virali mutati. Si suppone che i diversi ceppi virali siano differenti per quanto riguarda la conformazione del rivestimento, la costituzione genetica e il sistema di regolazione virale che determinano le proprietà replicative e la potenziale virulenza del ceppo.

L' HIV può manifestare tropismo in base alla capacità dello stesso di utilizzare CCR5, CXCR4 o entrambi per penetrare nella cellula.

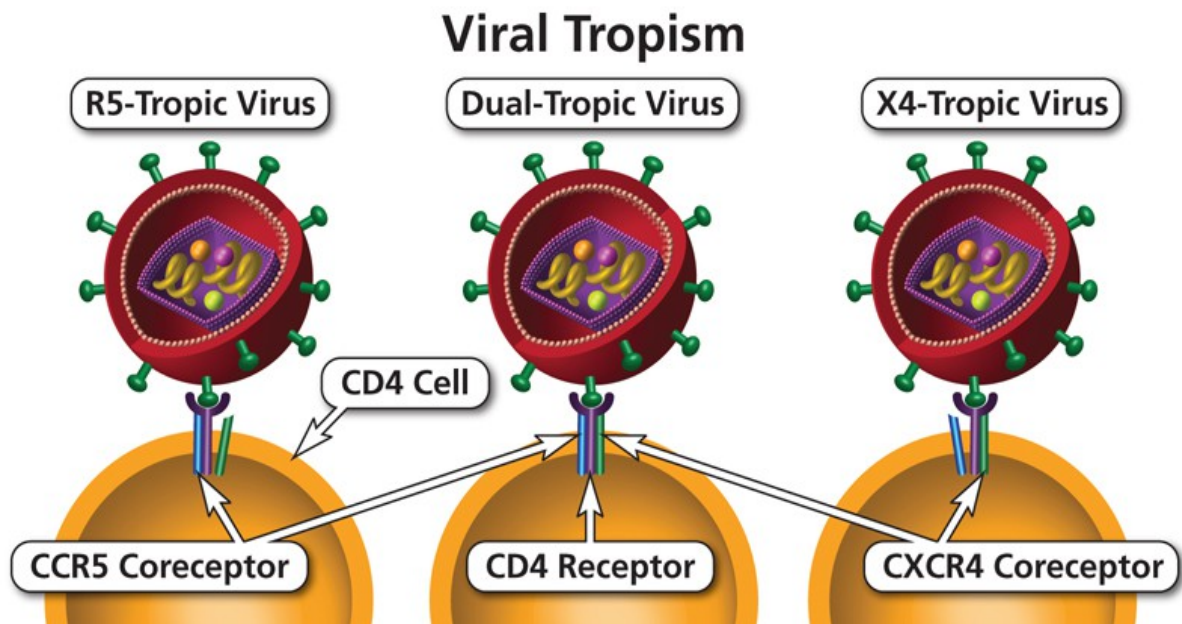


Immagine 3. Tropismo CCR5 e CXCR4 di HIV. (Fonte: <https://clinicalinfo.hiv.gov>)

Il virus penetra attraverso le mucose o nella circolazione sanguigna e viene trasportato ai linfonodi. La linfadenopatia è la conseguenza della diffusione del virus a diversi linfonodi che causa l'infezione primaria. Quando la replicazione virale rallenta si passa alla fase di latenza. (si veda capitolo 2.2 Fasi dell'infezione da HIV e patologie correlate).

CAPITOLO 2. PATOGENESI DI HIV

2.1 DIAGNOSI DELL'INFEZIONE DA HIV e PRINCIPALI PARAMETRI

L'infezione da HIV come già detto può rimanere latente per molti anni e poi, in virtù delle popolazioni cellulari colpite, manifestarsi come Sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS). La patogenicità di HIV è legata alla capacità del virus di evadere la risposta immunitaria e di integrarsi nella cellula ospite dove non è eliminabile e alla capacità di distruggere progressivamente le cellule T helper.

La sindrome da immunodeficienza acquisita è una condizione morbosa ad eziologia virale che determina, in assenza di adeguata terapia medica, una progressiva compromissione dell'immunità cellulo-mediata che, a sua volta, predispone all'insorgenza di gravi infezioni opportunistiche e neoplasie altrimenti rare nella popolazione generale.

E' possibile riconoscere una situazione di sieropositività tramite specifici test che rilevano l'eventuale presenza di anticorpi diretti contro il virus anche se esiste un cosiddetto "periodo finestra" ovvero un intervallo tra l'esposizione al virus e la positività, in cui gli anticorpi prodotti dal sistema immunitario non si trovano ad una concentrazione sufficiente per poter essere rilevati dai test stessi.

Questo periodo è stato di gran lunga ridotto grazie ai test di seconda e terza generazione che rilevano IgM, IgG anti-HIV 1 e anti HIV-2 garantendo elevata sensibilità come quelli di prima generazione ma anche elevata specificità, riducendo i risultati falsi positivi/negativi.

I test di III generazione che rilevano solo gli anticorpi anti-HIV si possono eseguire dopo i 90 giorni dal comportamento a rischio, i test di IV generazione che rilevano anche l'antigene p24 si possono eseguire già dopo 40 giorni.

I test disponibili e riconosciuti in Italia sono di due tipi:

- Test che vengono eseguiti in specifici centri dove attraverso un prelievo di sangue vengono ricercati anticorpi o parti di virus.
- Test rapidi di autodiagnosi che si possono acquistare in farmacia da effettuare su un campione di saliva.

La procedura per i soggetti a rischio prevede l'esecuzione di un primo test sul siero del paziente per la rilevazione degli anticorpi anti-HIV-1, il test ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay). Se questo saggio risulta positivo, deve essere effettuato comunque un altro saggio di conferma che prende il nome di Western blot. Il Western blot è metodologicamente diverso rispetto al test ELISA e consente di individuare gli anticorpi anti-p24 ed alcuni anticorpi contro prodotti virali come proteine strutturali. Nel caso in cui anche quest'ultimo dia un esito positivo allora viene data una diagnosi di infezione da HIV. Nel caso in cui, vi sia stato un comportamento a rischio e il 1° test ELISA o il Western blot siano negativi, il test viene

comunque ripetuto dopo alcuni mesi per il primo, e poche settimane per il secondo per confermare il primo esito e si procede anche all'eventuale verifica di anticorpi anti-HIV-2 .

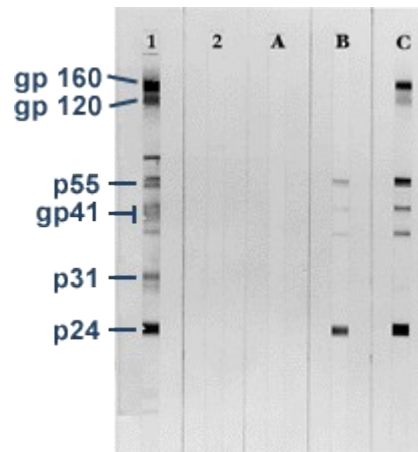


Immagine 4. Saggio Western blot per la ricerca di anticorpi anti-HIV1. (Fonte: biology.arizona.edu)

Vi sono due geni, *vpu* e *vpx* attraverso la presenza dei quali è possibile discriminare l'infezione da HIV-1 piuttosto che da HIV-2. *Vpu* è presente nel genoma di HIV-1, *vpx* in quello di HIV-2, entrambi hanno potere antigenico che porta alla formazione di specifici anticorpi.

Recentemente è stata sviluppata una tecnica per individuare RNA virale a partire dal plasma attraverso tecniche di estrazione ed amplificazione (PCR). Il periodo finestra in questo caso è ridotto a 10 giorni. Questa metodica è utilizzata specialmente nelle banche del sangue dove è necessario individuare eventuale sangue infetto in maniera tempestiva. Il limite di questo test è l'impossibilità di individuare varianti nuove o rare del virus, motivo per cui nel circuito trasfusionale sono adottati entrambi i test.

La trasmissione di HIV avviene principalmente attraverso tre vie:

- Trasmissione parenterale: trasfusioni di sangue, impiego di emoderivati, trapianti di organi infetti. Scambio di siringhe tra tossicodipendenti ed esposizione accidentale a sangue o ad altri fluidi biologici infetti da parte del personale sanitario (infezione da HIV occupazionale). Questa via di trasmissione è limitata a cute o mucose con lesioni. Questa è stata la principale causa di acquisizione dell'infezione da parte di soggetti emofiliaci e politrasfusi nei primi anni di circolazione dell'infezione. Infatti il rischio di acquisire l'infezione attraverso una trasfusione di sangue è del 100%.
- Trasmissione sessuale attraverso sperma e liquidi vaginali.
- Trasmissione verticale tra madre e figlio attraverso il contatto con i fluidi vaginali e il latte materno tramite allattamento al seno.

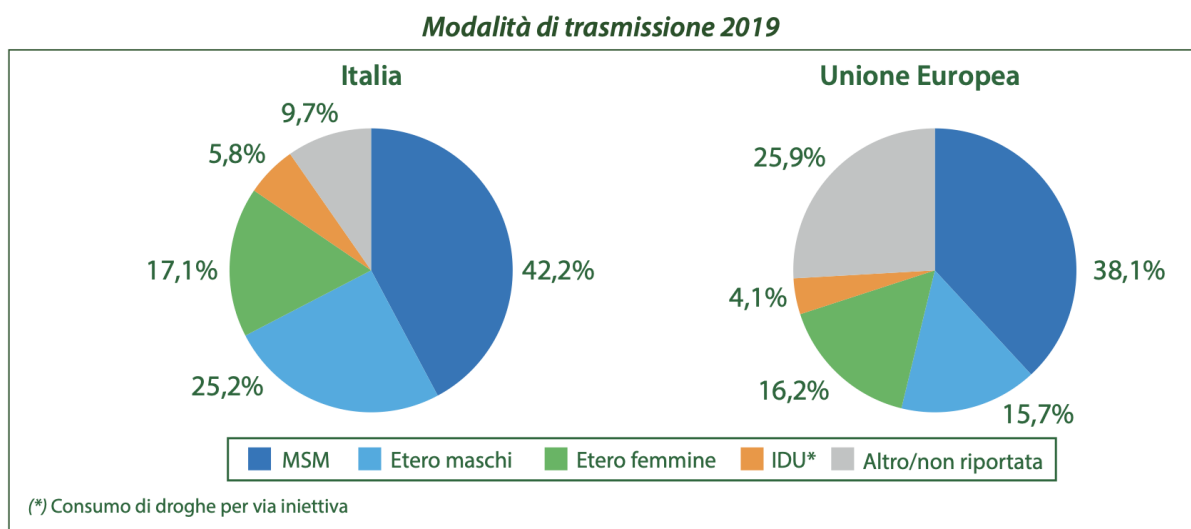
Altri fluidi biologici che presentano basse concentrazioni di virus sono sudore, lacrime, urina e saliva.

L'esito dell'impianto del virus tuttavia dipende da una serie di fattori. In primis la carica virale infettante; si calcola che in un millilitro di sangue di un soggetto infetto vi sia una quantità di particelle virali dell'ordine di 1×10^5 . Se la carica virale è modesta e l'esposizione è occasionale è difficile che l'infezione possa trasmettersi. Se il soggetto si trova invece in uno stato di immunosoppressione è più probabile che contragga l'infezione.

La trasmissione attraverso rapporti eterosessuali è al momento la via principale di infezione negli adulti in Europa e negli Stati Uniti. Inizialmente invece la via di trasmissione più comune per gli uomini erano i rapporti omosessuali e per le donne lo scambio di siringhe.

Anche se l'infezione può potenzialmente colpire chiunque vi sono categorie più a rischio di altre:

- tossicodipendenti da eroina o altre droghe iniettabili
- uomini omosessuali e bisessuali
- emofiliaci
- partner sessuali delle categorie sopracitate
- prostitute
- persone eterosessuali con partner sessuali diversi e/o che hanno rapporti sessuali non protetti
- operatori sanitari che praticano procedure invasive.



Distribuzione percentuale delle nuove diagnosi di infezione da HIV per modalità di trasmissione 2019
 Fonti: Sistema di Sorveglianza HIV nazionale, ECDC/WHO 2020 HIV/AIDS surveillance in Europe 2020-2019 data (1)

Immagine 5. Distribuzione percentuale delle infezioni da HIV per modalità di trasmissione. (Fonte: Ministero della salute. Aggiornamento delle nuove diagnosi da infezione da HIV e dei casi di AIDS in Italia.)

L'immunodeficienza insorge quando il numero di linfociti diminuisce arrivando ad un valore soglia di 150 linfociti per mm^3 di sangue. Il virus infatti provoca una morte precoce dei linfociti che gli organi linfoidi secondari quali milza e linfonodi non riescono a ripristinare. Il numero dei linfociti prodotti rimane sempre minore rispetto a quelli uccisi.

Per diagnosticare una condizione di immunodeficienza si valuta il parametro dei linfociti T-CD4+ che può essere espresso come numero assoluto di cellule per volume di sangue, percentuale delle cellule rispetto ai linfociti totali o rapporto CD4+/CD8+.

La conta dei linfociti CD4 presenti nel plasma consente di capire a quale stadio della malattia si trova il paziente, ma anche la risposta alla terapia:

- >500 cellule/ mm^3 : infezione asintomatica
- tra 200 e 500 cellule/ mm^3 : infezione sintomatica
- <50 cellule/ mm^3 : malattia avanzata

Le infezioni opportunistiche che colpiscono i pazienti con HIV sono associate al numero di linfociti presenti, che sono l'espressione della capacità del sistema immunitario di contrastarle.

In questa particolare infezione vi è uno stato di attivazione cronica del sistema immunitario causata dagli elevati livelli di virus nel sangue, con attivazione costante di citochine proinfiammatorie ed attivazione aspecifica di cellule B e linfociti citotossici. Questo stato favorisce una condizione pro-apoptica e fenomeni di auto reattività anticorpo-mediata e cellulo-mediata contro i linfociti CD4+.

2.2 FASI DELL'INFEZIONE DA HIV e PATOLOGIE CORRELATE

Dopo aver infettato la cellula il virus può provocare diversi tipi di infezione.

Se il virus si replica e nella fuoriuscita dalla cellula primaria causa la lisi della stessa si parla di "infezione litica". La prima fase dell'infezione è la sindrome da infezione acuta primaria, da tre a sei settimane dopo l'infezione con una clinica simile a quella influenzale, con sintomi come febbre, dolori muscolari, ghiandole infiammate. L'infezione primaria colpisce una percentuale tra il 50% e il 70% delle persone esposte ad HIV.

La replicazione virale è veloce e massiva, successivamente si riduce perché il sistema immunitario produce anticorpi specifici. I sintomi infatti persistono da 1-2 settimane fino ad alcuni mesi fino alla produzione degli anticorpi specifici e linfociti T citotossici.

Le manifestazioni cliniche di un'infezione primaria da HIV sono febbre, linfadenopatia ovvero l'ingrossamento dei linfonodi, comparsa di macule eritematose, cefalea a grappolo, faringiti, mialgie. Possono inoltre manifestarsi patologie neurologiche come meningiti asettiche, encefaliti e la sindrome di Guillan-Barré, una polineuropatia infiammatoria acuta. Non sono infrequenti infezioni opportunistiche da parte di *Candida albicans* a livello delle mucose della bocca e dell'esofago e di *Pneumocystis carinii*. La polmonite da *Pneumocystis carinii* (PCP), un fungo che causa una polmonite interstiziale ad andamento sub-acuto e, assieme all'esofagite da *Candida*, rappresentano la patologia opportunistica d'esordio della malattia. Può progredire in insufficienza respiratoria anche fatale come nei primi casi di pazienti infetti da HIV.



Immagine 6. Candidosi delle mucose orali e dell'esofago da Candida Albicans e manifestazioni cutanee indotte da infezione primaria HIV. (Fonte : <https://www.msmanuals.com>)

Altre polmoniti batteriche nei pazienti affetti da HIV sono a carico di *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Pseudomonas aeruginosa*.

In questa prima fase si possono inoltre verificare delle enteriti direttamente correlate ad HIV, le quali provocano nausea, diarrea, vomito, dolore addominale e malassorbimento di nutrienti.

Nella quasi totalità dei casi le manifestazioni cliniche della fase acuta si risolvono spontaneamente, segue poi un periodo di benessere che dura anni (fase di latenza clinica).

Quando si manifestano questi sintomi e non si individua inizialmente il comportamento a rischio, l'infezione da HIV può venire scambiata per epatite virale, toxoplasmosi, mononucleosi infettiva da EBV o CMV, sifilide, infezione da herpes simplex o per malattia di Lyme. L'HIV in particolare compromette il trattamento della sifilide alterandone la storia naturale, i risultati di laboratorio e la risposta alla terapia. I pazienti con sifilide hanno un alto rischio di contrarre HIV.

Già dopo le prime due settimane dall'instaurarsi dell'infezione acuta si osserva una riduzione nella conta linfocitaria, e un'inversione nel rapporto tra CD4+ e CD8+, con diminuzione dei primi.

Riconoscere da subito che l'infezione è causata da HIV significa iniziare precocemente con la terapia antiretrovirale ed aumentare quindi la risposta immunitaria.

Se non viene prodotta progenie virale e il DNA rimane integrato nel genoma dell'ospite si ha dapprima un'infezione asintomatica che evolve poi in infezione sintomatica e AIDS a cui si accompagnano infezioni opportunistiche e neoplasie. L'associazione tra infezione da HIV e neoplasie è conseguenza della deplezione linfocitaria. Nei soggetti in cui la sorveglianza linfocitaria è ridotta, l'attivazione di oncogeni, la produzione di fattori di crescita e l'aumentata resistenza all'azione delle cellule T possono favorire lo sviluppo di cellule che hanno subito mutazioni. Il decorso dei tumori che insorgono nei pazienti sieropositivi è diverso rispetto a quello nel resto della popolazione; i primi sono meno responsivi alla chemioterapia, poiché il tumore è molto aggressivo e localizzato in sedi atipiche, oltre al fatto che compare nello stadio più avanzato della malattia.

L'infezione cronicizza per il mancato contrasto del sistema immunitario. L'immunodeficienza può manifestarsi dopo 2-3 anni dall'infezione o possono trascorrere fino a 15 anni prima di individuare i primi segni di malattia. Questo dipende da fattori sia legati all'ospite che al virus.

La prima fase dove sono assenti i sintomi è definita infezione da HIV asintomatica ed è lo stadio precoce della malattia. Le manifestazioni cliniche in questa fase sono linfadenopatia generalizzata e possono comparire manifestazioni cutanee come dermatite seborroica. La durata media di questa fase è di 7-10 anni. In questa fase possono aumentare i livelli di transaminasi in particolare nei pazienti che presentano epatiti virali. In generale anche i molteplici farmaci necessari alla terapia possono causare danno epato-cellulare sia quelli utilizzati per la terapia stessa di HIV come l'AZT e la dideossinosina, che quelli utilizzati per trattare altre patologie associate come l'isoniazide, la rifampicina e il ketoconazolo.

Segue alla fase asintomatica una fase sintomatica precoce. I pazienti possono manifestare febbre, perdita di peso, diarrea, mal di testa e fatica oltre a manifestazioni cutanee come dermatite,

follicoliti e sintomi legati all'instaurarsi di infezioni opportunistiche. Il sistema nervoso può essere colpito da batteri e virus *Mycobacterium tuberculosis*, con conseguente meningite batterica, e da virus erpetici come herpes simplex 1 e 2 (HSV) e virus della varicella-zoster (VZV). Può altresì essere colpito da protozoi come *Toxoplasma gondii* che causa cefalea intensa per aumento della pressione intracranica. L'occhio può essere colpito da retinite da HCMV riconoscibile attraverso esame oftalmoscopico che se non trattato può condurre il paziente a cecità. A livello cardiovascolare i pazienti infetti possono manifestare cardiomiopatia e conseguentemente insufficienza cardiaca.

Nella fase avanzata dell'infezione pazienti dimostrano un aumentato rischio di allergia ai farmaci, intolleranza, tossicità e interazioni.

In tutte le fasi si può instaurare la tubercolosi polmonare, sia acquisita ex novo che a seguito di riattivazione con una prevalenza maggiore nei soggetti che vivono in paesi in via di sviluppo. Nella fase sintomatica tuttavia presenta alla radiografia lesioni polmonari caratteristiche. Se diagnostica precocemente è curabile, vengono utilizzati i classici farmaci per il trattamento di questa patologia, l'isoniazide e la rifampicina.

Nella fase sintomatica tardiva iniziano a manifestarsi sintomi neurologici come neuropatia e demenza associata ad AIDS. Il virus non infetta in maniera diretta i neuroni ma arriva al sistema nervoso centrale veicolato dai macrofagi-monociti che invece è in grado di infettare. In questo modo è in grado di danneggiare le cellule gliali, e assieme allo stato di infiammazione cronica provoca danni a livello centrale e periferico. In questa fase le analisi di laboratorio rivelano chiaramente una condizione patologica: si riscontrano anemia, leucopenia di cui linfopenia causa diretta dell'infezione da HIV, trombocitopenia. La produzione di piastrine è ridotta nei pazienti sieropositivi, e in alcuni casi vengono prodotti anticorpi contro le piastrine stesse o vi è deposito di immuno-complessi sulla superficie delle medesime. I livelli di lattato deidrogenasi possono aumentare e questo suggerisce la presenza di PCP, così come quelli di globuline e di creatinina con proteinuria. L'infezione a questo punto è molto avanzata viene trattata con farmaci antiretrovirali e si cerca di bloccare le infezioni opportunistiche con antibiotici e antivirali, di diagnosticare precocemente eventuali neoplasie e di trattare in generale i sintomi. A livello centrale sono frequenti il linfoma cerebrale primitivo associato alla presenza di EBV e l'encefalite da citomegalovirus umano (HCMV).

Le complicanze neurologiche in questa fase sono frequenti. Tra questi vi sono disturbi psichiatrici, depressione, disordini bipolari con manie, disordini associati ad ansia e panico, insonnia, alterazioni della personalità, demenza e dolore di natura neuropatica.

Nella fase di malattia avanzata, l'ultima, coesistono diverse infezioni le quali vengono trattate. Ai pazienti naive viene somministrata anche la terapia antiretrovirale.

La particolarità unica di questo virus è che non è direttamente responsabile della morte del paziente infetto ma il decesso avviene per patologie AIDS-correlate, come infezioni di altri patogeni o neoplasie.

I pazienti affetti da HIV sono spesso portatori di una doppia infezione, da HCV o da HBV. In questi pazienti la cirrosi epatica e l'epatocarcinoma, evoluzioni dell'epatite cronica appunto sono responsabili del 20-40% dei decessi nei pazienti affetti dalle due infezioni.

In questi pazienti poi si registra un'incidenza maggiore di tumori rispetto alla popolazione generale come conseguenza grave dell'immunodeficienza. Le neoplasie più frequenti sono: il sarcoma di Kaposi, un tumore di natura vascolare che origina dalle cellule endoteliali dei vasi linfatici, il linfoma non Hodgkin ad alto grado di malignità, il linfoma cerebrale primitivo, carcinomi della cute e il carcinoma invasivo della cervice uterina HPV-correlato. Il rischio di contrarre quest'ultimo nelle donne sieropositive è superiore di 10 volte rispetto alle donne sieronegative. Sembra che l'immuno-soppressione causata da HIV faciliti l'acquisizione, la riattivazione, la replicazione o la persistenza dell'infezione da HPV nella donna colpita in particolare dai ceppi 16, 18, 45 e 56 che hanno un maggiore potenziale oncogenetico. Il sarcoma di Kaposi non compare frequentemente nella popolazione generale, quindi la sua diagnosi è associata ad una condizione di immunodeficienza acquisita.



Immagine 7. Sarcoma di Kaposi. (Fonte : microbiologiaitalia.it)

Il paziente sieropositivo che inizia il proprio trattamento antiretrovirale viene costantemente monitorato. I parametri che vengono controllati sono l'RNA virale presente nel plasma e la concentrazione di linfociti T CD4 nel sangue. L'RNA virale definisce l'efficacia della terapia in quanto se decresce rapidamente fino a diventare non rilevabile indica che la replicazione è sotto controllo.

Le linee guida italiane indicano di determinare la carica virale, ovvero la quantità di virus circolante già dopo le prime 4 settimane di trattamento; questa determinazione viene poi ripetuta ogni 4-8 settimane fino a che non viene raggiunta la non-rilevabilità. Si prosegue poi con il controllo della viremia ogni tre mesi per verificare la continua efficacia del trattamento.

Di conseguenza se la viremia cresce la terapia non è efficace ed è quindi necessario riconsiderare il tipo di farmaci utilizzati.

È necessario fare un'osservazione in merito: per misurare la viremia si utilizzano appunto campioni di plasma prelevati dal paziente. Il plasma rappresenta solo l'1% della riserva virale

all'interno dell'intero organismo. Vi potrebbero essere altre riserve di virus in tessuti colpiti dove la quantificazione virale è difficile da ottenere.

In Italia è previsto all'inizio della terapia anche un test per individuare un eventuale resistenza ai farmaci antiretrovirali. (L'argomento è approfondito al capitolo 4.2 Impatto sociale ed individuale).

Un inizio precoce della terapia antiretrovirale può prevenire tutte le patologie sopracitate, in quanto è appunto in grado di limitare la replicazione. Un discorso a parte va fatto per le patologie neurologiche. Non tutti i farmaci antiretrovirali infatti sono in grado di penetrare la barriera ematoencefalica e di raggiungere a livello centrale una concentrazione sufficiente per inibire la replicazione virale. Per questo motivo reservoir di virus possono permanere in questo sistema.

2.3 HIV PEDIATRICO : CENNI

L'HIV è un'infezione che colpisce anche i bambini, e la ricerca su AIDS pediatrico vanta di un ampio contributo di moltissimi ricercatori italiani. La causa principale di trasmissione dell'infezione ai bambini è quella verticale, viene quindi acquisita dalla madre durante la gravidanza (per via transplacentare), al momento del parto o durante l'allattamento. Nei paesi non industrializzati, che contano la maggior parte di madri sieropositive, l'allattamento tramite latte artificiale oltre ai problemi nel reperire il prodotto, è associato a morbilità e mortalità infantili più elevati rispetto ai paesi industrializzati, per cui spesso viene consigliato in ogni caso l'allattamento al seno. La trasmissione transplacentare è meno rilevante rispetto a quella perinatale. È grazie ad una serie di studi italiani che si poté ipotizzare che la maggior parte delle infezioni avvenisse al momento della nascita attraverso il contatto con le secrezioni genitali o il sangue della madre. Per questa ragione nelle madri sieropositive è consigliato il parto cesareo come fattore protettivo per la trasmissione dell'infezione. Uno studio ha dimostrato un aspetto interessante: nei parti gemellari il primo nato ha un rischio maggiore rispetto al secondo di acquisire l'infezione. L'ipotesi proposta è che il primo gemello, attraversando il canale del parto, venga a contatto con le secrezioni vaginali infette, invece il secondo gemello trova un passaggio più deterso.

L'incidenza della trasmissione verticale, dopo l'adozione di molteplici strategie preventive è stimata all'1%. La mancata eliminazione della trasmissione verticale nel nostro Paese è da ricondurre ad una mancata diagnosi tempestiva dell'infezione nelle donne in età fertile ed allo scarso ed inefficace uso della terapia antiretrovirale in gravidanza.

Nei primi 18 mesi di vita del bambino sono rilevabili gli anticorpi anti-HIV acquisiti dalla madre, è necessario quindi attendere un periodo di tempo variabile per verificare lo sviluppo di marcatori virologici di infezione. Tuttavia anche nel caso in cui essi non vengano rilevati questo non è sinonimo di sieronegatività. Se il bambino presenta, dopo i 18 mesi anticorpi anti-HIV, se vi sono delle manifestazioni cliniche di immunodeficienza o se i test virali ed immunologici per la ricerca del virus risultano positivi allora si può accertare la diagnosi definitiva.

Ci sono dei fattori associati ad un maggiore rischio di trasmissione verticale:

- valore basso di linfociti T CD4⁺ e dell'antigene p24, nello specifico inferiore a 700 cellule/ μ L
- infiammazione della membrana placentare
- bambini nati prematuri, nello specifico prima della 34 esima settimana.

La sintomatologia si manifesta entro il primo anno di vita e prevede scarso accrescimento per una diminuita produzione dell'ormone della crescita, encefalopatia infezioni opportunistiche, febbre persistente, linfadenopatia, epatosplenomegalia ovvero aumento delle dimensioni di fegato e milza. L'encefalopatia è causata da HIV stesso e non da altri patogeni e si presenta con un ritardo nello sviluppo mentale: nei neonati si assiste ad uno sviluppo più lento e nei bambini più grandi con perdite di concentrazione e memoria e con disturbi del comportamento. Come gli adulti i bambini vengono colpiti da infezioni batteriche, virali e fungine ricorrenti, da parte degli stessi patogeni che colpiscono gli adulti con elevato rischio di sepsi e ascessi. Le infezioni opportunistiche nei bambini rappresentano forme primitive e non riattivazione di infezioni pregresse. L'infezione da PCP è quella maggiormente associata a morbilità e mortalità. Nei bambini le neoplasie sono più rare rispetto agli adulti. Il periodo di incubazione nei bambini che acquisiscono l'infezione per via verticale è inferiore rispetto ai bambini che la acquisiscono attraverso trasfusioni (rarissimo al giorno d'oggi) e agli adolescenti. L'infezione da HIV presenta un decorso molto più rapido nel bambino rispetto al decorso che ha nell'adulto, la progressione verso AIDS è molto più rapida, le manifestazioni cliniche compaiono entro il primo anno di vita. Se non trattati più di un terzo dei bambini muore durante il primo anno e circa la metà prima dei 24 mesi. L'andamento è conseguenza del fatto che il virus entra in contatto con un sistema immunitario ancora immaturo ed in fase di sviluppo.

Anche per i bambini è prevista una terapia di combinazione con due inibitori nucleosidici della trascrittasi inversa e uno non nucleosidico, un inibitore della proteasi o un inibitore dell'integrasi. Approvati per i bambini con età inferiore a 13 anni sono l'AZT, la didanosina, la stavudina, l'abacavir ed l'emtricitabina. La terapia deve essere iniziata già prima dei 12 mesi di vita.

CAPITOLO 3. ORIGINE E IMPATTO SOCIALE

3.1 LINEA TEMPORALE

1931 Si suppone che in questo periodo, in Africa probabilmente nella regione del Camerun meridionale vi sia stato il passaggio di specie di questo virus dalla scimmia, dove non causava particolari problemi all'uomo.

1970 L'HIV è ancora sconosciuto in tutto il globo. Howard Temin riesce a isolare la trascrittasi inversa dal virus del sarcoma di Rous e nel 1975 vince il premio Nobel per la Medicina. La comunità scientifica dubita dell'esistenza di retrovirus che siano in grado di colpire la specie umana.

1981 Il CDC (Center for Disease Control and Prevention) segnala un improvviso aumento di casi di polmonite da *Pneumocystis carinii* in giovani pazienti uomini omosessuali, inizialmente e inspiegabilmente si pensa che la malattia, ancora sconosciuta, colpisca solo questa categoria. In realtà verso la fine dello stesso anno, si registrano dei casi anche tra eterosessuali e si registra il primo caso Europeo, in Inghilterra.

1982 – 1983 Si registrano i primi casi tra pazienti emofiliaci e questo mette in allarme le banche del sangue. È noto ormai che la malattia colpisca il sistema immunitario e ad una conferenza viene proposto il termine "sindrome da immunodeficienza acquisita" o AIDS per indicare la patologia conseguente a questa infezione misteriosa.

Viene isolato, all'istituto Pasteur di Parigi da L. Montagnier e F. Barré-Sinoussi, il virus che si pensa essere l'agente patogeno da cellule di un paziente con linfadenopatia, per questo motivo viene denominato LAV (virus associato a linfadenopatia). Vengono registrati 1614 casi di AIDS.

Si registra il primo caso in Italia. In Italia vi è una peculiarità nella diffusione primaria del virus; i primi fenomeni sono descritti in tossicodipendenti da eroina in cui vengono riscontrate linfadenopatie generalizzate. Lo scambio di siringa è, al momento, il principale mezzo di diffusione di HIV. Roma e Milano sono le principali aree di diffusione.

Sebbene il primo caso di HIV conclamato in Italia sia stato appunto registrato nel 1982, il virus circolava già dal 1979, come dimostra un'indagine eseguita in questo stesso anno su sieri di pazienti tossicodipendenti che risultavano positivi per anticorpi anti-HIV, al contrario di quelli

prelevati nel 1978. Dalla metà degli anni ottanta la trasmissione per rapporti tra uomini è la seconda per frequenza tra le modalità di infezione.

1984 Il CDC conferma la responsabilità dell'agente patogeno individuato a Parigi nell'AIDS. Parallelamente viene isolato al National Cancer Institute l'agente patogeno e denominato HTLV-III (human lymphotropic virus-III): si scopre appartenere alla famiglia dei retrovirus che infetta i linfociti T umani, che, scoperto nello stesso anno, si serve del recettore CD4 sugli stessi per penetrare all'interno della cellula. Viene sequenziato il genoma del virus.

I casi aumentano, negli USA in particolare, 11.055 casi di AIDS, la mortalità è del 50%.

1985 Si inizia a testare la zidovudina (AZT) già utilizzata a partire dal 1964 come farmaco antitumorale. Le ricerche sui due virus isolati a Parigi e negli USA confermano che si tratta dello stesso virus che viene ufficialmente definito con il nome di HIV.

Viene approvato il primo test sierologico per la ricerca del virus. Trattasi di un test immunoenzimatico per la ricerca di anticorpi anti-HIV.

Viene identificato un secondo retrovirus umano associato ad AIDS in Africa Occidentale, HIV-2.

1986 – 1987 Si iniziano a valutare campagne preventive e di informazione sulla nuova malattia. Gli USA vietano l'ingresso nel territorio alle persone sieropositive. Gli attivisti sollecitano l'FDA a ridurre i tempi di approvazione dei farmaci anti-HIV. È approvata la zidovudina. Si registrano oltre 50.000 casi di AIDS.

In Italia un decreto ministeriale rende obbligatoria la denuncia di essere portatori di AIDS.

1988 Viene celebrata per la prima volta la giornata mondiale contro l'AIDS il 1° Dicembre. Si registrano nel mondo 96.443 casi di AIDS.

1989 Si registrano i primi casi di resistenza alla AZT, per la quale gli attivisti chiedono una riduzione del prezzo. I casi sono circa 160.000.

1991 – 1992 Approvata la didanosina (ddl) un analogo nucleosidico anti-HIV e la zalcitabina (ddC) entrambi inibitori della trascrittasi inversa. Inizia il primo trial clinico con l'associazione di più farmaci nella terapia.

1993 Viene presentata ad una conferenza internazionale sull'AIDS una nuova classe di farmaci: gli inibitori della proteasi virale.

1994 – 1995 Viene registrato il primo inibitore della proteasi, il saquinavir (SQV) e un altro inibitore della trascrittasi inversa, la lamivudina (3CT) utilizzato ancora oggi perché dotato di una buona potenza e tollerabilità.

1996 Le monoterapie e le duplici terapie vengono abbandonate in favore di terapie combinate (HAART) che gli studi dimostrano essere più efficaci. Si osserva che il tasso di mortalità nei pazienti poli-trattati scende dell'84%.

Si inizia ad utilizzare il "marcatore" della carica virale per osservare l'efficacia della terapia.

Vengono identificati i corecettori CCR5 e CXCR4.

Continuano gli studi clinici, uno in particolare dimostra che l'utilizzo della AZT in gravidanza riduce la trasmissione verticale dell'infezione.

Vengono approvati altri farmaci l'indinavir (IDV) e il ritonavir (RTV) inibitori della proteasi e la nevirapina (NVP) inibitore non nucleosidico della trascrittasi inversa.

In Italia uno studio clinico importante permette a centinaia di pazienti di accedere alle nuove terapie.

La mortalità cala.

1997 – 1998 Vengono combinati due farmaci, la lamivudina e la zidovudina in un' unica compressa: il combivir. Si assiste ai primi fallimenti terapeutici della terapia HAART e si osservano i primi fenomeni di resistenza.

Nel valutare i trattamenti farmacologici si inizia a considerare un end point importante che è la qualità della vita del paziente in terapia. Difatti i pazienti in HAART arrivano ad assumere anche 30 compresse al giorno, questo può costituire un problema nell'aderenza alla terapia che è fondamentale per tenere sotto controllo l'infezione.

1999 Viene dimostrato che la nevirapina è in grado di dimezzare la probabilità di contagio madre-figlio durante l'allattamento al seno. L'industria farmaceutica impegna ingenti risorse nella ricerca di nuovi farmaci anti-HIV: durante quest'anno sono registrati quattro nuovi farmaci ovvero l'abacavir, inibitore nucleotidico della trascrittasi inversa, il nelfinavir, inibitore della proteasi, la delaviridina e l'efavirenz, inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa.

Vengono registrate 5,6 milioni di nuove infezioni, e i decessi dall'inizio della pandemia sono 16,3 milioni. Il continente più colpito è l'Africa.

2000 La necessità di fornire farmaci a prezzi più bassi ai paesi del sud del mondo è al centro dell'attenzione. L'opinione in questo caso è divisa: chi difende la legittimità dei brevetti e chi sostiene che i paesi poveri debbano poter accedere alle cure allo stesso modo di quelli sviluppati. Nel 2001 viene siglato l'accordo di Doha secondo cui in caso di emergenza sanitaria, i paesi in via di sviluppo devono essere messi in condizione di acquistare i farmaci necessari.

Si stima che nel mondo vi siano 36,1 milioni di persone con HIV/AIDS di cui il 70% vive nell'Africa sub-Sahariana e il 16% nel sud-est asiatico.

L'industria farmaceutica indirizza l'attenzione sulle forme farmaceutiche combinate: vengono introdotti sul mercato il kaletra (lopanivir + ritonavir) e il trizivir (abacavir + lamivudina + zidovudina).

2001 Viene istituito un fondo, finanziato da enti pubblici e privati che consente ai paesi più poveri di acquistare i farmaci anti-HIV.

Sono prodotti in India i primi antiretrovirali generici.

2002 Viene approvato il primo farmaco inibitore dell'ingresso di HIV nei linfociti, l'enfuvirtide.

In Italia viene elaborato un questionario ad hoc per valutare la qualità della vita nei pazienti sieropositivi in terapia HAART.

2006 Approvato il raltegravir, inibitore di integrasi e il maraviroc, antagonista del coreettore CCR5.

2007 Paziente di Berlino. Viene scoperta la mutazione del recettore CCR5, la CCR5-Δ32 monozigote in Timothy Ray Brown, sottoposto ad un trapianto di midollo da parte di un donatore con la stessa mutazione. I soggetti con questa mutazione presentano linfociti che non hanno questo corecettore, ma sono sani perché il linfocita ha altri recettori che ne permettono l'attivazione. Gli individui che possiedono questa mutazione non contraggono l'AIDS, perché il virus non è in grado di attaccare la cellula.

2008 – 2010 L. Montagnier e F. Barré-Sinoussi vincono il premio Nobel per la medicina per aver individuato in HIV la causa dell'AIDS. Numerosi studi dimostrano che la trasmissività dell'infezione da HIV dipende dalla carica virale che le terapie riescono a ridurre, esse assumono anche un ruolo preventivo nella trasmissione.

Ormai i pazienti sieropositivi non muoiono più per le infezioni opportunistiche che si instaurano ma emergono altre patologie legate allo stato infiammatorio indotto da HIV, dall'invecchiamento della popolazione sieropositiva e dagli effetti della terapia cronica coi farmaci antiretrovirali.

Il problema dell'accesso alle cure nei paesi sottosviluppati rimane centrale. Si stima che del totale delle persone con HIV/AIDS che necessitano di farmaci antiretrovirali, solo il 40% può accedervi.

Questa rimane una questione centrale alla luce delle recenti scoperte in quanto i pazienti trattati sono meno infettivi e questo, assieme a tutti i comportamenti preventivi potrebbe portare all'eradicazione della malattia.

Nasce la prima e unica industria farmaceutica totalmente dedicata ad HIV, la VHC, che riunisce il lavoro e le conoscenze dei due principali azionisti, GSK e Pfizer.

Viene introdotta una tecnica di prevenzione, la PREP (pre-exposure prophylaxis) che consiste nell'assunzione di un farmaco, un'associazione del tenofovir e dell'emtricitabina prima di un rapporto a rischio.

OGGI L'aspettativa di vita di una persona sieropositiva che vive in occidente è inferiore di tre anni rispetto ad un coetaneo sieronegativo. Nel 2020 sono state registrate quasi 38 milioni di persone sieropositive. Di queste 2,2 milioni in Europa e 130 mila in Italia. Le persone con HIV non sempre sviluppano AIDS. Con gli attuali trattamenti si riesce a controllare in maniera efficace l'infezione ovvero nel sangue non si rileva RNA virale.

3.2 IMPATTO SOCIALE ED INDIVIDUALE

“La salute è uno stato di completo benessere fisico, mentale e sociale e non la semplice assenza di malattia”

L'HIV/AIDS è l'unica malattia dove il disagio è legato a tutti e tre questi aspetti. Naturalmente è una patologia che implica conseguenze fisiche importanti come le infezioni opportunistiche, l'insorgenza di neoplasie altrimenti rare, il dolore e gli altri sintomi legati a queste. Quando viene confermata una diagnosi di HIV inoltre il paziente immediatamente entra in una prospettiva diversa da quella intesa fino a quel momento. Inizia a prendere coscienza del fatto di dover seguire un regime terapeutico non semplice e per tutta la propria vita, di dover sottoporsi a esami e controlli periodici, di dover prestare attenzione e modificare alcuni comportamenti. L'impatto psicologico è rilevante. Per le caratteristiche discusse finora, l'infezione da HIV e la sindrome da immunodeficienza acquisita assomigliano molto alla diagnosi di tumore, dove il paziente deve sottoporsi a terapie pesanti a livello fisico (chemioterapie e radioterapie) ed allo stesso modo l'impatto psicologico sul paziente è notevole, in quanto ancora oggi e per alcuni tumori la mortalità risulta elevata. Facendo riferimento alla definizione di salute dell'OMS, le due condizioni si differenziano per un aspetto, ovvero l'impatto sociale della diagnosi di sieropositività.

Il pregiudizio sociale verso le persone con HIV/AIDS è tutt'oggi radicato nella mentalità comune. Questo oltre ad un inevitabile disagio sociale per i pazienti rischia di portare ad un ritardo nella diagnosi dei nuovi casi.

L'AIDS ha assunto fin da subito un significato quasi simbolico di punizione, tanto che l'opinione pubblica la bollava come una moderna peste. Nei primi anni di scoperta e ampia trasmissione dell'infezione, quando ancora non vi erano le conoscenze odierne, le persone affette da questa malattia venivano emarginate dalla collettività in parte per paura del contagio e in parte per l'esistenza di pregiudizi verso la condotta dei pazienti affetti.

Emarginazione inoltre spesso non era solo collettiva ma anche personale. A seguito della diagnosi di sieropositività il paziente può assumere un atteggiamento di rifiuto, di isolamento verso i propri familiari ma anche verso il proprio lavoro.

La diagnosi di infezione da HIV per alcuni pazienti potrebbe provocare negli stessi ansia, depressione, pensieri suicidi. Per questo è necessario affiancare al paziente anche un supporto di tipo psicologico. Questo costituisce una peculiarità in negativo per questa malattia, che la accomuna alle patologie tumorali in termini di carico emotivo e psicologico da affrontare.

Successivamente alla presa di coscienza e all'accettazione della diagnosi di HIV per il paziente si pone il problema della terapia, che al momento, è una terapia con cui dovrà avere a che fare per tutta la vita. La terapia cronica pone innanzitutto il problema della riduzione delle problematiche legate alla tossicità a lungo termine. Poiché la terapia anti-HIV prevede l'associazione di più farmaci, è necessario per mantenere l'aderenza terapeutica del paziente poter assumere il farmaco in maniera semplice. In questo senso le aziende farmaceutiche si sono mosse da subito indirizzando la ricerca verso forme di somministrazione adeguate alle esigenze, riuscendo ad inserire nella stessa unità posologica più di un farmaco. Oltre a questo i pazienti in terapia hanno problemi legati alla necessità di assumere la terapia più volte al giorno, allo stesso orario e magari seguire regimi dietetici che permettano un assorbimento idoneo.

Vi sono inoltre complicanze legate alla conservazione del farmaco stesso, alle possibili reazioni di ipersensibilità indotte dal farmaco, alle interazioni con farmaci assunti per altre patologie. È necessario ricordare che i pazienti con HIV sono largamente colpiti da altre patologie, in particolare da infezioni di varia natura, che necessitano di essere trattate con farmaci specifici. Spesso i pazienti utilizzano anche farmaci sintomatici per diarrea, vomito, depressione, dolore che sono associate alla malattia. In alcuni casi vengono utilizzati farmaci anti-neoplastici in presenza di neoplasie. I farmaci che un paziente in uno stadio avanzato della malattia si trova a dover assumere non sono solo quelli per controllare la malattia stessa ma anche quelli per gestire le patologie ad essa associate.

Non da ultimi gli eventuali effetti collaterali; la terapia antiretrovirale rappresenta un caso isolato nello sviluppo dei farmaci, come scrive la Dott.ssa Cristina Mussini *"L'elevata mortalità dell'AIDS ha comportato una scala di priorità nei confronti dei farmaci registrati che riguardava innanzitutto l'effetto sulla mortalità e poi solo in seconda istanza la tollerabilità. (...) I pazienti hanno dovuto assumerli, nonostante gli effetti collaterali, in quanto rappresentavano l'unica possibilità di sopravvivere."*

In aggiunta il fatto che permane il disagio per alcuni di assumere la terapia in presenza di altre persone per il forte e radicato pregiudizio che esiste verso le persone sieropositive. In ultima analisi il costo, ancora importante delle terapie, che provoca un diseguale accesso alle terapie.

Nel 1993 l'Italia si collocava al terzo posto come numero assoluto di casi di malattia. Nel nostro Paese prevaleva la diffusione del virus fra tossicodipendenti. L'epidemia è cresciuta rapidamente a partire dalla metà degli anni 80. In Italia HIV a partire dal 2008 (DM 31 marzo) è inclusa nelle nell'elenco delle malattie infettive di classe III per cui è prevista la notifica obbligatoria alle autorità sanitarie competenti. Esistono moltissime altre malattie infettive come colera, febbre gialla, tifo, per cui vi è obbligo di notifica come e anche per questo aspetto HIV presenta caratteristiche di unicità in quanto è una malattia infettiva ma in un certo senso anche cronica, come lo sono ipertensione, diabete, ed altre patologie non ad eziologia virale che quindi non vanno notificate.

Non strettamente legato all'individuo ma di rilevante importanza è invece lo sviluppo di resistenza verso i farmaci attualmente presenti. A questo proposito esiste un test, il test di resistenza effettuato su HIV RNA prelevato dal plasma. Questo consiste nel sequenziamento delle regioni genomiche che codificano per i target dei farmaci per individuare le eventuali mutazioni che possono essere all'origine della resistenza. Allo stesso modo, non legato direttamente al paziente, ma aspetto importante da considerare nell'ottica generale è la spesa sanitaria associata alla gestione del paziente affetto da HIV.



Immagine 8. Proteste dei malati e attivisti per chiedere lo sviluppo e l'accesso alle terapie per AIDS. (Fonti : <https://inchiostro.unipv.it> e <https://www.nyclgbtsites.org>)

CAPITOLO 4. TERAPIE FARMACOLOGICHE

4.1 TARGET MOLECOLARI E PROBLEMATICHE CORRELATE ALL'IMPIEGO DI FARMACI ANTIRETROVIRALI

I farmaci antivirali colpiscono target specifici come materiale genetico, capside, e pericapside del virus. Sono maggiormente attivi in tutte le fasi ma preferenzialmente in quelle di replicazione e sintesi di acidi nucleici e proteine.

Questi farmaci tuttavia sono spesso tossici poiché i virus non sono entità separate dalla cellula ospite, essi vivono e si moltiplicano dentro la cellula stessa. I farmaci utilizzati possono interferire con il ciclo replicativo della stessa e danneggiare significativamente le cellule umane. Per questo motivo le sperimentazioni di questi farmaci possono essere effettuate solo su pazienti malati e non su volontari sani.

I farmaci utilizzati contro l'infezione da HIV sono antivirali contro RNA virus ed interferiscono con l'ingresso del virione nella cellula e con l'attività di trascrittasi inversa, proteasi e integrasi.

Nella terapia contro HIV spesso vengono associati farmaci con meccanismi d'azione diversi in modo da colpire più bersagli (si veda capitolo 4.3 Terapia HAART).

Alcuni studi hanno dimostrato però che la permeabilità di questi farmaci nei distretti dove il virus si replica in maniera più importante, è ridotta e che la biodisponibilità degli stessi è modulata da alcuni polimorfismi del genoma umano rendendo alcuni individui più responsivi rispetto ad altri. I distretti dove i farmaci riescono difficilmente a penetrare sono il sistema nervoso centrale, il tessuto linfoide associato all'intestino e il compartimento genitale.

La terapia contro HIV, indipendentemente dall'associazione di farmaci utilizzati, è particolarmente efficace se somministrata sin dalle prime fasi dell'infezione. Questo è largamente dimostrato da più di uno studio dove i risultati mostrano oltre ad una riduzione del "pool" di cellule infettate, una riduzione dell'immuno-attivazione, e delle mutazioni che permettono al virus di eludere le barriere del sistema immunitario.

Ad oggi terapie in grado di eradicare completamente l'infezione non esistono, in quanto il virus avendo integrato il proprio materiale genetico in quello della cellula ospite può interrompere o riattivare la replicazione in qualsiasi momento. La ricerca tuttavia persegue questo obiettivo : ridurre le riserve di HIV latente integrato nel DNA dell'ospite tanto che ad esempio NHI, L'istituto nazionale di salute degli Stati Uniti finanzia solo i progetti di ricerca che saranno indirizzati in questo senso.

Vi sono una serie di problemi legati ai farmaci anti-HIV. Come già accennato la difficoltà a raggiungere distretti difficilmente penetrabili dove comunque il virus si replica (sistema nervoso centrale) e l'insorgenza di resistenza ai farmaci determinata dalla selezione di ceppi con

mutazioni che conferiscono resistenza al virus stesso. I farmaci dovrebbero poi essere dotati di selettività, come riportato in precedenza, il farmaco dovrebbe essere in grado di eliminare il patogeno senza danneggiare l'ospite. La sicurezza e la tossicità del farmaco antiretrovirale costituiscono un'altra problematica. L'indice terapeutico ovvero il rapporto tra il dosaggio tossico e quello efficace, è espressione della sicurezza. In generale i farmaci antiretrovirali hanno un indice terapeutico basso. La tossicità è legata al dosaggio e alla durata della terapia; essendo una terapia long-life la tossicità si manifesta negli stadi avanzati e in tutti i pazienti.

Il farmaco ideale dovrebbe avere le seguenti caratteristiche:

- essere virus-statico o citotossico per le cellule infettate a concentrazioni ideali in vitro
- essere protettivo per le cellule non infette
- avere una bassa tossicità a lungo termine
- non avere effetti inibitori sul sistema immunitario
- essere in grado di penetrare nel sistema nervoso centrale
- avere sinergismo con altri farmaci anti-HIV
- avere un'emivita relativamente lunga
- essere assorbito a livello orale
- avere bassi costi.

4.2 CLASSI DI FARMACI UTILIZZATI CONTRO HIV

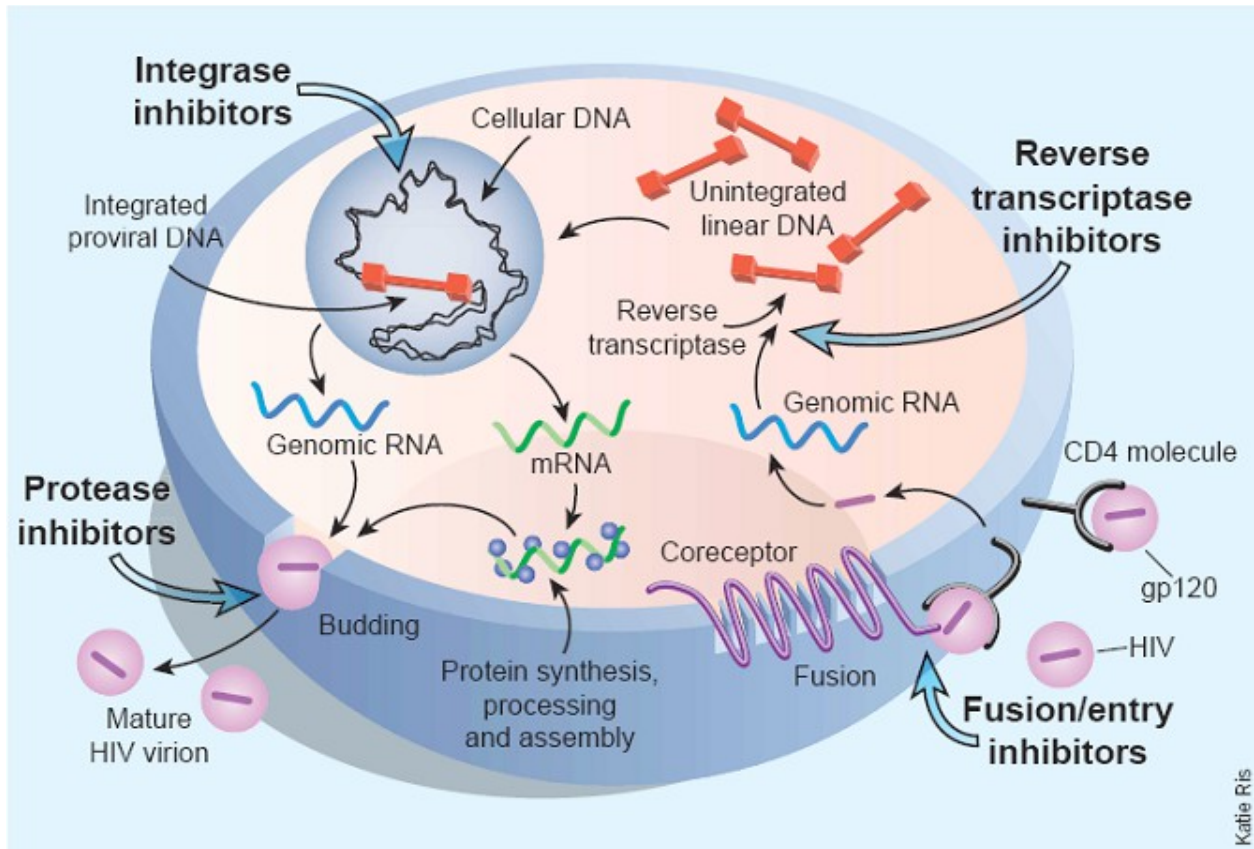


Immagine 9. Ciclo di HIV e fasi in cui intervengono le diverse classi di farmaci. (Fonte : Dott R. Bernabei " Le infezioni da HIV e AIDS " Ananke News.)

Inibitori dell'interazione gp120-CD4 e inibitori della fusione

Partendo dal primo contatto con la cellula ospite, i farmaci utilizzati in questa fase sono gli inibitori dell'interazione gp120-CD4, o inibitori dell'ingresso del virus che bloccano il legame coi corecettori CXCR4 e CCR5 (l'ibalizumab), farmaci che bloccano solo il legame con il corecettore CCR5 (il maraviroc) somministrabili quindi se il virus presenta tropismo R5 e infine gli inibitori della fusione virus- membrana che impediscono l'adesione dell'envelope virale a quella cellulare, attraverso la competizione con la proteina virale e bloccano la formazione dell'apertura che consente l'accesso (l'enfuvirtide, utilizzato per via sottocutanea).

Il rischio nell'utilizzo di questi farmaci è che bloccando le sopracitate vie di entrata, il virus potrebbe essere spinto a trovarne altre, oppure ad infettare altri bersagli cellulari o tissutali rendendo quindi questi farmaci non più efficaci.

Inibitori della trascrittasi inversa

Un'altra classe di farmaci utilizzati è quella degli inibitori dell'enzima trascrittasi inversa. Il primo approccio terapeutico che si è pensato di tentare è stato quello di interrompere il ciclo replicativo del virus, difatti questi sono stati i primi farmaci ad essere sviluppati ed utilizzati. Si distinguono in nucleosidici (NRTI) e nucleotidici (NtRTI) in base alla presenza o meno di un gruppo fosfato. Vengono fosforilati (nucleosidici) o fosfonati e/o defosforilati (nucleotidici) ad opera di chinasi cellulari. Queste molecole esercitano la loro attività dopo essere stati convertiti a livello intracellulare, nella forma attiva, quella fosforilata.

Durante la trascrizione vengono incorporati al posto dei nucleotidi corretti e provocano l'arresto della sintesi dell'acido nucleico poiché mancano dei gruppi funzionali necessari per completare la catena del DNA. La sintesi di DNA viene quindi bloccata terminando la produzione di DNA provirale. Questi nucleosidi sono sostituiti in posizione 2 e 3 e la semplice sostituzione dell'ossidrile con idrogeno o altri gruppi li trasforma da substrati a terminatori della catena per l'assenza del gruppo ossidrile.

Questi farmaci prevencono l'infezione di nuove cellule ma non agiscono su quelle già infettate. Sono attivi su HIV-1 e HIV-2.

La Zidovudina o AZT originariamente sviluppato come antitumorale, appartiene a questa classe di farmaci. È stato il primo farmaco approvato per la terapia dell'AIDS e può essere utilizzato in tutti gli stadi della malattia. È anche il farmaco di prima scelta per la profilassi post-esposizione da sola o in combinazione ad altri farmaci attivi su altri target. Questo farmaco è coinvolto nel miglioramento di alcuni parametri immunologici tra cui aumento (o meglio non diminuzione) delle cellule TCD4+, e riduzione dei livelli cerebrali e serici dell'antigene p24, miglioramento dei sintomi neurologici e riduzione nella frequenza di infezioni opportunistiche. Inoltre utilizzato precocemente può prevenire l'esordio dei sintomi dell'infezione. Non è, come tutti i farmaci, esente da effetti collaterali. Quelli maggiormente segnalati sono mal di testa, nausea, fatica, anemia, neutropenia (riduzione dei neutrofilo circolanti) e trombocitopenia (carenza di piastrine nel sangue) e miopia in particolare negli stadi tardivi della malattia. Gli effetti collaterali di AZT in combinazione sono generalmente più lievi. L'AZT è utilizzata da molto tempo e se ne conosce l'interazione con altri farmaci come il Probenecid utilizzato nell'iperuricemia e l'acido valproico, utilizzato per trattare l'epilessia che aumentano la biodisponibilità di AZT, al contrario la rifampicina la diminuisce.

Anche la didanosina o ddI, la lamivudina o 3CT appartengono alla classe degli inibitori nucleosidici di trascrittasi inversa. Questi due farmaci hanno pressoché gli stessi effetti collaterali di AZT a cui si aggiungono neuropatie periferiche e pancreatiti (infiammazioni del pancreas e conseguente perdita delle capacità secretive). In particolare la didanosina è associata a disordini endocrini ed esocrini del pancreas e conseguente iperglicemia per l'incapacità di bilanciare i livelli plasmatici di insulina e glucagone e quindi insorgenza di diabete mellito secondario associato quindi a patologia. La didanosina è associata ad altri disordini metabolici come ipocalcemia, ipokaliemia e iperuricemia per le quali è necessario un monitoraggio frequenti degli ioni e delle molecole coinvolte. La lamivudina se utilizzata insieme all'AZT ne aumenta i livelli plasmatici.

Attivi solamente su HIV-1 sono invece gli inibitori non nucleosidici (NNRTI) che sono inibitori specifici, reversibili e non competitivi che inibiscono l'enzima legandosi ad un sito allosterico della trascrittasi inversa diverso rispetto ai nucleosidici/nucleotidici. Essi sono in grado di bloccare la tasca idrofobica all'interno della polimerasi della trascrittasi inversa. Il sito a cui si legano tuttavia può essere soggetto a mutazioni per cui anche in questo caso sono associati soprattutto agli NRTI per garantire un'azione sinergica. Utilizzati specialmente nei casi di resistenza all'AZT.

La nevirapina appartiene a questa classe. L'utilizzo di questo farmaco può dare mal di testa, nausea, vomito, diarrea, mialgia, senso di affaticamento e depressione. L'emivita di questo farmaco è notevole: 40-45 ore. La nevirapina riduce la biodisponibilità dell'AZT fino ad un 20%, e riduce i livelli plasmatici di un'altra classe di farmaci utilizzati per trattare HIV ovvero gli inibitori di proteasi. La rifampicina invece riduce la biodisponibilità della nevirapina, accelerandone il metabolismo. La nevirapina è anche un induttore della famiglia dei citocromi P450.

Per quanto riguarda gli NRTI, una delle prime classi di farmaci sviluppati e quindi fra i primi ad essere impiegati in terapia, è nota una tossicità a lungo termine che riguarda reni, tessuto osseo e apparato cardiovascolare.

Inibitori della proteasi virale

Gli inibitori della proteasi virale sono stati progettati in base alla struttura tridimensionale dell'enzima bersaglio : hanno struttura peptidomimetica con un gruppo idrossietilenico che sostituisce un gruppo ammidico.

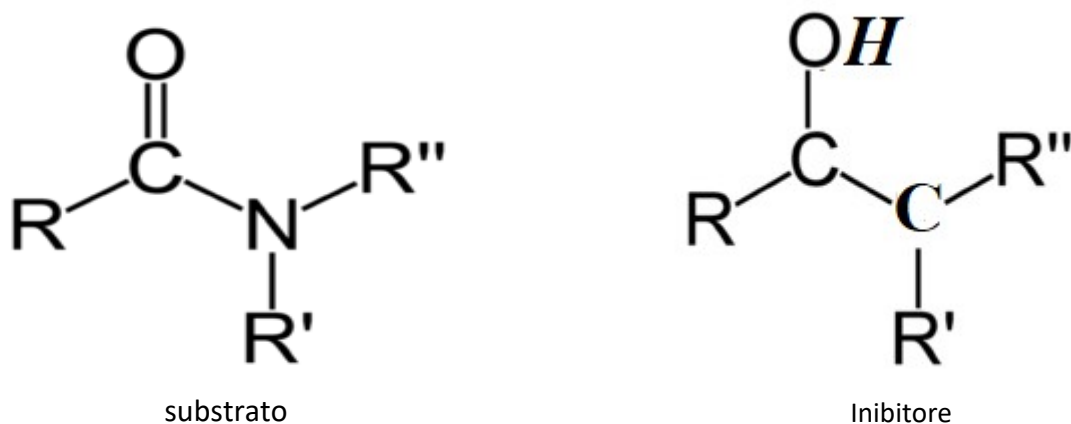


Immagine 10. Differenze nella struttura fra substrato ed inibitore di proteasi.

L'enzima proteasi come già detto è coinvolto nella scissione dei precursori delle proteine virali e conseguentemente nell'assemblaggio di quelle funzionali. In particolare questo enzima va a scindere legami peptidici tra aminoacidi, in particolare tra prolina, tirosina e fenilalanina. Bloccando quest'enzima viene bloccata la produzione di virioni.

La capacità di scindere legami peptidici tra questi aminoacidi che sono tutti aromatici rende l'enzima differente rispetto alle proteasi umane e lo rende quindi un bersaglio ottimale in termini di selettività.

Il meccanismo d'azione di questi farmaci è di bloccare le reazioni enzimatiche con le quali le macromolecole proteiche, espresse dal genoma di HIV, vengono frazionate in proteine minori essenziali per completare il ciclo replicativo, impedendo alla particella virale di raggiungere la forma matura dunque quella infettante.

Il punto di fragilità di questa categoria di farmaci è che sono dei potenti inibitori dei citocromi ed è quindi possibile che interagiscano con altri farmaci, aumentando i livelli plasmatici di questi. I farmaci con cui interagiscono maggiormente sono statine, antibiotici, anticoagulanti e altri antiretrovirali e anche con alimenti quali l'aglio. I farmaci più recenti appartenenti a questa categoria tuttavia manifestano in maniera minore queste interazioni. Inoltre sono molecole di grosse dimensioni per cui difficili da inserire in forme farmaceutiche per via orale, conseguentemente la biodisponibilità orale di questi farmaci è ridotta. In ultima analisi gli inibitori di proteasi utilizzati da soli danno frequentemente luogo a resistenza verso il farmaco stesso e verso tutti gli altri farmaci appartenenti alla categoria, per cui sono spesso utilizzati in associazione nella terapia HAART.

L'aggiunta di questa classe di farmaci ad altri due farmaci con differenti meccanismi d'azione, come inibitori nucleosidici e non-nucleosidici è stata la base per la creazione della terapia antiretrovirale altamente efficace.

A questa categoria di farmaci appartiene l'indinavir utilizzato in associazione perlopiù. È un farmaco molto complesso da utilizzare in quanto ha un elevato rischio di sviluppo di calcoli renali per cui il paziente deve consumare un'importante quantità di acqua per prevenire questo rischio. Si può manifestare inoltre iperbilirubinemia. Sono entrambi effetti collaterali che si risolvono con una sospensione del farmaco per 1-3 giorni.

Il saquinavir e il ritonavir appartengono anch'essi a questa classe. Gli effetti collaterali del saquinavir sono principalmente disturbi gastrointestinali come diarrea, nausea e vomito. La rifampicina e farmaci che inibiscono i CYP3A4, da cui è metabolizzato il saquinavir, come il fenobarbitale, la carbamazepima, la fenitoina e il desametasone riducono la biodisponibilità dello stesso. Il saquinavir invece aumenta la biodisponibilità dei calcio antagonisti. I farmaci appartenenti a questa classe manifestano resistenza crociata.

Il ritonavir ha gli stessi effetti avversi del precedente a cui si aggiungono però mal di testa, vasodilatazione, alterazione del gusto e aumento dei livelli ematici di colesterolo e trigliceridi. Per questo farmaco poi sono conosciute tutta una serie di interazioni con altri farmaci. I farmaci che ne riducono la biodisponibilità sono gli stessi del caso precedente. Il ritonavir aumenta i livelli plasmatici dell'amiodarone, del bupropione, della cisapride, di diverse benzodiazepine e del piroxicam; riduce invece i livelli dei contraccettivi orali e della teofillina. Il ritonavir è un farmaco che deve essere conservato in frigorifero.

Se somministrati insieme questi farmaci interagiscono fra di loro : il ritonavir aumenta la biodisponibilità del saquinavir fino a livelli tossici. Ma poiché quest'ultimo ha una scarsa

biodisponibilità orale questa interazione può essere sfruttata, per raggiungere i livelli plasmatici ideali di entrambi con dosi ridotte.

Inibitori di integrasi

L'ultima categoria di farmaci utilizzati nella terapia contro HIV sono gli inibitori di integrasi (INSTI). Questo enzima catalizza l'integrazione del DNA provirale nel DNA dell'ospite in presenza di metalli bivalenti nel sito attivo. Questi farmaci possiedono un gruppo dicheto-enolico con il quale chelano questi metalli sottraendoli alla reazione. Il raltegravir, l'elvitegravir e il dolutegravir sono annoverati in questa classe.

Questi farmaci sono di recente sviluppo ed approvazione e rappresentano un'opportunità interessante in quanto bloccando l'integrazione del materiale genetico virale nel materiale genetico della cellula ospite, questa non andrebbe più a produrre le proteine virali, bloccando quindi l'infezione di altre cellule. Senza la funzione dell'enzima integrasi infatti HIV non è infettivo.

4.3 TERAPIA HAART

La terapia HAART (Highly Active Anti Retroviral Therapy) anche detta cART (Combination Antiretroviral Therapy) è una terapia di combinazione che prevede l'associazione di almeno tre molecole ritenute efficaci. L'introduzione della terapia di combinazione ha ridotto sia la mortalità per patologie AIDS-correlate che i sintomi clinici dell'infezione.

Le linee guida nazionali per il trattamento del paziente naive indicano la somministrazione di tre farmaci: due analoghi nucleosidici o nucleotidici della trascrittasi inversa associati ad un inibitore della proteasi virale, ad un inibitore dell'integrasi o ad un inibitore non nucleosidico. Tuttavia si è dimostrata efficace anche l'associazione fra i soli dolutegravir (inibitore di integrasi) e lamivudina (inibitore nucleosidico della trascrittasi inversa).

In caso di fallimento terapeutico vengono sostituiti l'inibitore dell'integrasi o l'inibitore non nucleosidico con l'inibitore di proteasi.

Poiché sussiste il problema della penetrazione dei farmaci antiretrovirali in alcuni distretti chiave nella replicazione del virus come encefalo e testicoli, che sono compartimenti separati dal circolo periferico, è necessario studiare e quindi applicare strategie terapeutiche per risolvere questo problema. Il trattamento ottimale dell'infezione a livello del sistema nervoso centrale è costituito dall'associazione del tenofovir, dell'AZT e della stavudina che attraversano la barriera emato-encefalica. La terapia HAART è in grado di ridurre la carica virale di HIV nei fluidi genitali ma il virus può essere comunque trovato in cellule seminali di uomini sieropositivi.

Questa terapia ha da subito dimostrato una serie di vantaggi fra cui il controllo della progressione della malattia, la riduzione delle infezioni opportunistiche e dei decessi correlati ad esse e quindi l'aumento della sopravvivenza. Inoltre la sinergia nell'azione di più farmaci garantisce un ampio

spettro di attività. La terapia di combinazione si è dimostrata efficace nel ridurre i livelli di virus in cellule del sangue, del tessuto linfatico e dell'epitelio intestinale.

Questo approccio terapeutico tuttavia ha manifestato anche dei problemi primo fra tutti la tossicità : alterazione del metabolismo lipidico e glucidico con insorgenza di iperlipidemie e diabete di tipo II, anomalie nella distribuzione del grasso corporeo, grave tossicità epatica. Infatti l'utilizzo di più farmaci può portare alla sommazione degli effetti tossici del singolo. La strategia più efficace è quella di associare farmaci con meccanismo di azione diverso e con differenti effetti tossici.

EFFETTO COLLATERALE	FARMACO
Reazione allergica	Abacavir, nevirapina, efavirenz
Anemia, anomalie del midollo osseo	ATZ
Aterosclerosi accelerata	Ritonavir e altri inibitori di proteasi
Disturbi del SNC (cefalea, vertigini, disturbi psichiatrici)	Efavirenz
Disturbi GI (nausea, vomito, diarrea)	AZT e tutti gli inibitori della proteasi
Epatotossicità ed epatite	Nevirapina, efavirenz, inibitori di proteasi e tutti gli NRTI
Iperbilirubinemia	Indinavir
Resistenza all'insulina e disturbi nel metabolismo del glucosio	Ritonavir ed inibitori di proteasi
Reazioni al sito di iniezione	Enfuvirtide
Acidosi lattica e tossicità mitocondriale	Tutti gli NRTI
Anomalie lipidiche	Inibitori della proteasi, stavudina e efavirenz
Lipoatrofia	NRTI
Pancreatite	Didanosina e stavudina
Neuropatia periferica	Didanosina e stavudina
Disturbi renali	Tenofovir (insufficienza renale e indinavir (nefrolitiasi)
Teratogenicità	Efavirenz

Tabella 2. Effetti collaterali comuni della terapia antiretrovirale.

Oltre a questo nel corso del tempo l'utilizzo dei farmaci classici ha portato alla selezione di ceppi resistenti, e una serie di problemi legati all'aderenza alla terapia, oltre all'inevitabile aumento del costo delle terapie.

■ FIG. 1 Trend della TDR negli anni (popolazione generale)

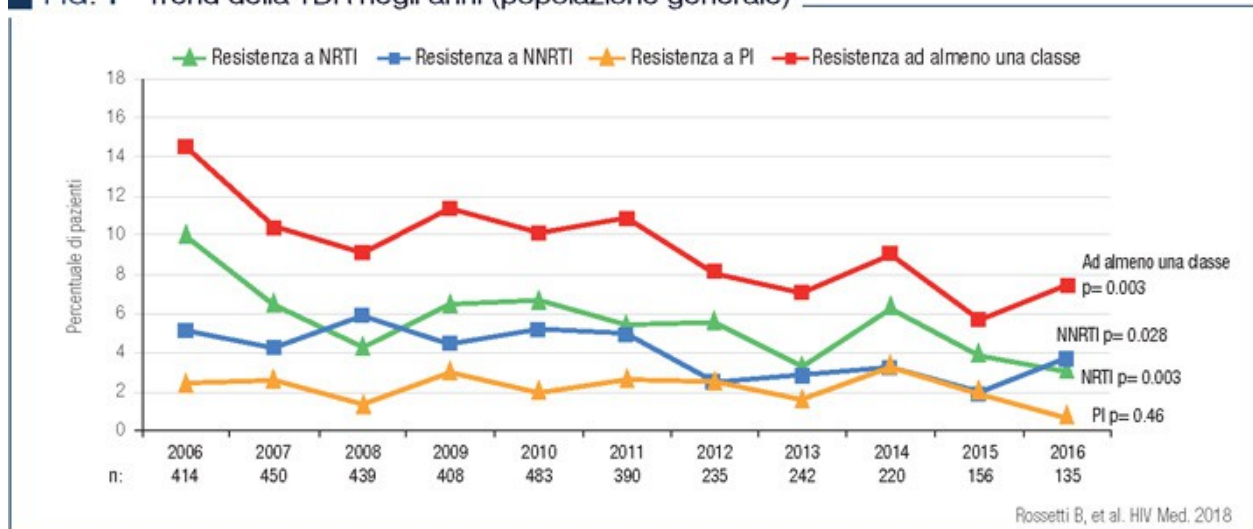


Immagine 11. Andamento della resistenza ai farmaci antiretrovirali più comunemente utilizzati. (Fonte : Rossetti B, Di Giambenedetto S, Torti C, et al. Evolution of transmitted HIV-1 drug resistance and viral subtypes circulation in Italy from 2006 to 2016. HIV Med. 2018.)

La terapia HAART è un importantissimo traguardo nel contrasto all'infezione da HIV, altrettanto degni di nota sono i trattamenti sviluppati per la prevenzione dell'infezione, che consentono in particolare alle coppie sierodiscordante di proteggere il/la partner sieronegativo/a dal contrarre l'infezione, e la terapia post-esposizione, un trattamento d'urgenza per prevenire il contagio a seguito di esposizione al patogeno. La terapia pre-esposizione (PreP) è assunta da persone ad alto rischio di contrarre HIV, tutti i giorni se esposte a rischi ripetuti o nei giorni precedenti ai comportamenti a rischio. La terapia post-esposizione (PEP) invece deve essere assunta entro le 48 ore dal comportamento o dalla situazione a rischio. È utilizzata soprattutto dagli operatori sanitari entrati accidentalmente in contatto con materiali biologici infetti.

CAPITOLO 5. TERAPIE DI RECENTE SVILUPPO E IN STUDIO

5.1 FARMACI ANTIRETROVIRALI DI RECENTE APPROVAZIONE E IN FASE DI SPERIMENTAZIONE

Si sono descritti finora i farmaci utilizzati già da molti anni nei pazienti per HIV/AIDS per i quali l'efficacia nel contenimento dell'infezione è ampiamente stata dimostrata. Tuttavia tutti questi farmaci sono stati pensati e sviluppati mentre l'epidemia dilagava e vi era la necessità di ridurre drasticamente la mortalità. Ora che si è compreso come tenere sotto controllo l'infezione la ricerca scientifica guarda a come eradicarla completamente, i nuovi farmaci vengono pensati e sviluppati in quest'ottica.

Riattivazione HIV latente

Il problema principale è costituito dal fatto che nelle cellule colpite dal virus, i linfociti T CD4 in particolare, l'infezione rimanga latente e quindi "nascosta", non permettendo al sistema immunitario di colpire selettivamente quella cellula com'è invece in grado di fare con le altre infezioni dove le proteine virali vengono espresse sulla superficie delle cellule infette e riconosciute dalle cellule effettrici come macrofagi e cellule natural killer.

Una parte della ricerca sui nuovi farmaci anti-HIV è indirizzata a capire come riattivare l'infezione latente.

Le molecole più studiate a questo scopo al momento sono gli inibitori delle deacetilasi istoniche (HDAC) degli enzimi che contribuiscono al meccanismo di latenza del virus. A livello biologico le deacetilasi istoniche deacetilano gli istoni facilitando la compattazione della cromatina e interrompendo così la trascrizione. Sono enzimi con funzione di repressione trascrizionale. Ne esistono varie isoforme ognuna delle quali è in grado di deacetilare una specifica zona istonica e bloccare selettivamente la trascrizione di geni specifici. Il sito attivo dell'enzima presenta come cofattore Zn^{2+} , gli inibitori delle deacetilasi devono quindi avere dei gruppi funzionali in grado di complessarsi con esso. Questa attività enzimatica è presente in tutte le cellule, comprese quelle infettate da HIV. Questo approccio terapeutico necessita di una replicazione attiva al fine di individuare i serbatoi d'infezione, attraverso l'utilizzo di farmaci definiti "agenti di retroversione di latenza (LAR)" di cui fanno parte anche gli agonisti della protein-chinasi trattati più avanti. In vitro hanno dimostrato una grande efficacia nell'attivare HIV dallo stato di quiescenza, ma come per gli altri farmaci antiretrovirali, hanno problemi di tollerabilità in quanto non selettivi, compromettono alcuni processi molecolari della cellula.

Il primo inibitore, il vorinostat ha avuto risultati deludenti, sono invece ancora in corso studi su altri due inibitori, il panobinostat per il quale si è osservato un aumento nel numero di cellule T

regolatorie e la romidepsina già approvata per la terapia dei linfomi cutanei, ancora in fase II, utilizzati da soli o in associazione a vaccini che stimolino le risposte immuni.

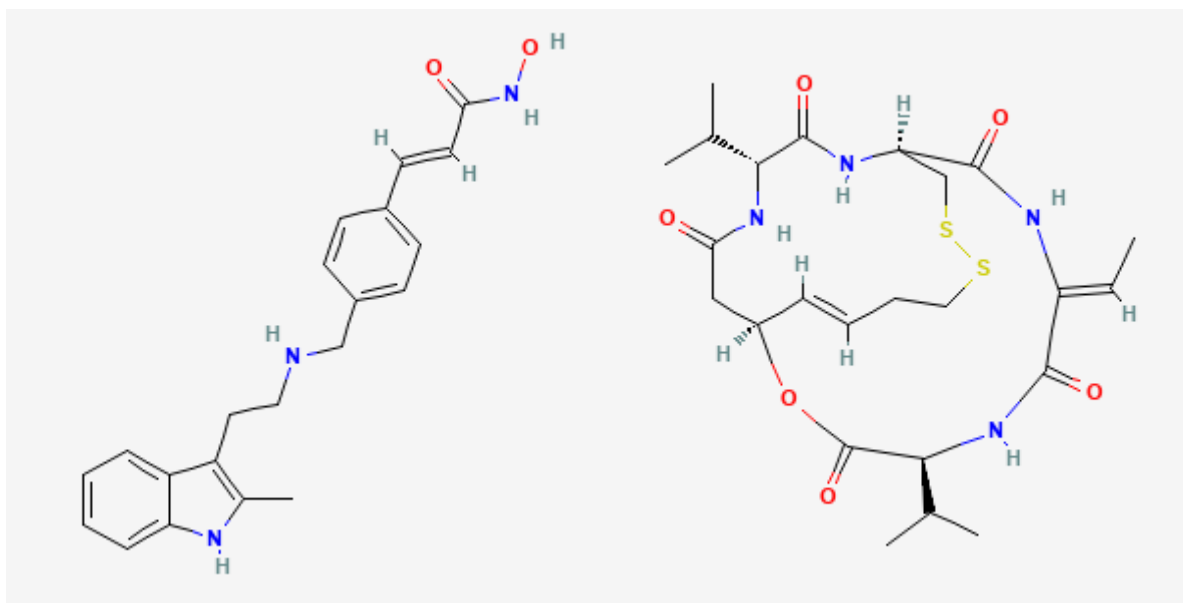


Immagine 12. Strutture chimica del panobinostat (a sinistra) e della romidepsina (a destra). (Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

In alcuni studi sono stati associati agli HDAC gli agonisti della protein-chinasi C (PKC) che utilizzati si sono dimostrati più efficaci rispetto all'uso di uno dei due farmaci da solo. Il ruolo molecolare della PKC è quello di andare a fosforilare, ovvero trasferire gruppi fosfato da ATP ad un substrato, residui di serina o treonina su molecole bersaglio per trasmettere un segnale. Esse attivano i meccanismi di trasduzione del segnale attraverso cui regolano diversi processi cellulari come proliferazione, metabolismo, trascrizione e differenziazione. Gli agonisti di questa chinasi, si è visto, sono in grado di attivare e indurre la produzione di HIV da linfociti T CD4+. La molecola attualmente in studio è la briostatina-1 un composto di origine naturale, ottenuto da un organismo marino, la *Bugula neritina*. La sintesi del composto attivo risulta difficoltosa per cui l'utilizzo è limitato. Sono stati ad ogni modo condotti degli studi utilizzando questo composto per valutare gli effetti nei pazienti con HIV-1. Briostatina-1 si è dimostrata efficace nell'aumentare i livelli di mRNA virale in studi ex vivo. Preoccupa l'utilizzo di questi farmaci per quel che riguarda l'attivazione non controllata di citochine e il profilo carcinogenetico.

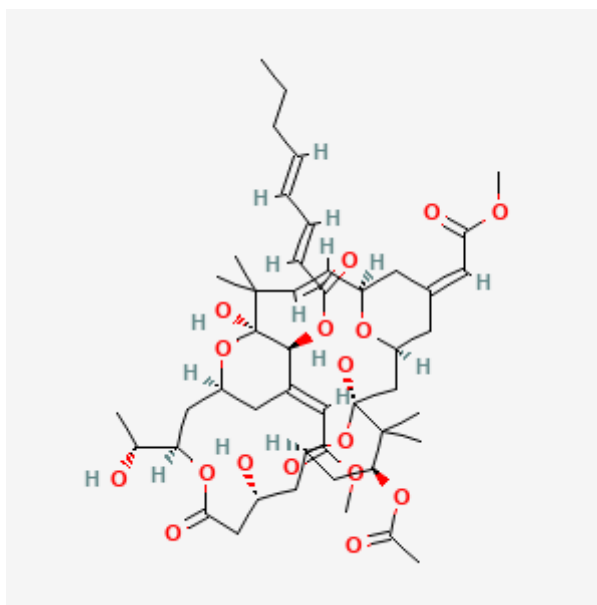


Immagine 13. Struttura chimica della briostatina-1. (Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

Associati sia agli inibitori delle deacetilasi istoniche sia agli agonisti della protein-chinasi C sono gli inibitori di BET. Le proteine BET regolano la trascrizione di alcuni geni che promuovono la proliferazione del ciclo cellulare e regolano lo stesso. In associazione ai farmaci sopracitati sembra vi sia un'azione sinergica nella regolazione dell'espressione genica di HIV-1.

Un'altra strategia è quella di attivare i toll like receptor (TLRs) i quali hanno la funzione di modulare l'immunità innata attraverso molecole agoniste. Questi recettori si possono trovare sulla superficie della cellula oppure all'interno di endosomi. Essi riconoscono molecole o porzioni di molecole caratteristiche di alcuni patogeni quindi non-self sia all'interno che all'esterno della cellula. Questi recettori si trovano su macrofagi, cellule dendritiche, neutrofili, linfociti B, cellule endoteliali ed epiteliali e linfociti T. Il legame di questi recettori con il proprio ligando induce la produzione e il reclutamento di citochine e l'attivazione dell'immunità innata e quindi il coinvolgimento delle cellule immunocompetenti. Nella specie umana sono stati identificati 11 TLR attivi e in particolare TLR-7 sembra in grado di riconoscere il singolo filamento di RNA di HIV. Gli agonisti dei TLR-7 sono in grado di indurre citochine che a loro volta potenziano immunità innata e specifica. In vivo ci sono già i primi risultati che mostrano come queste molecole siano in grado di attivare HIV latente e di aumentare l'attività dei linfociti T CD8 e delle cellule natural killer. Sono attualmente in studio agonisti di TLR-7 (studio in vivo) e di TLR-9 (studio clinico). Due farmaci agonisti di TLR-7 sono in fase di studio preclinico e clinico di fase I, GS-9620 (il vesatolimod) e GS-986 i quali si sono dimostrati in grado di indurre attivazione immunitaria. Il vesatolimod è stato somministrato a pazienti affetti da HIV e si è dimostrato efficace sia nell'indurre una risposta immunitaria a dosi elevate, che nell'aumentare il tempo che precede il rialzo della carica virale rispetto al placebo in primati, in particolare in infanti di macachi rhesus con infezione da SIV ed anche in questo caso si è riscontrata una risposta immunostimolante.

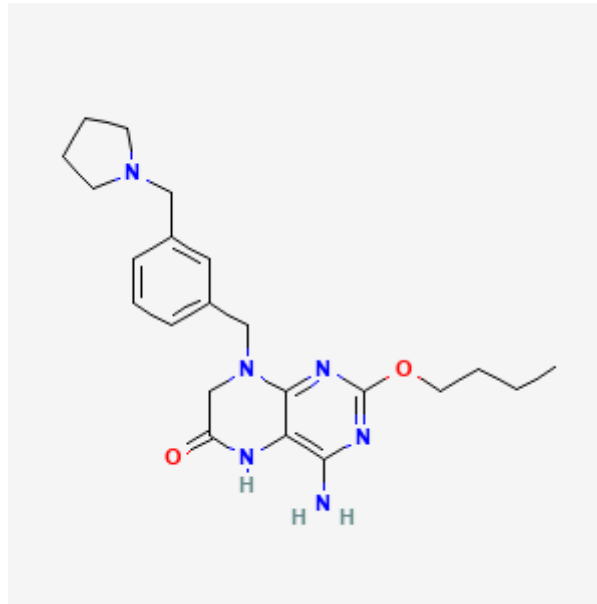


Immagine 14. Struttura chimica del vesatolimod. (Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

La progressione di malattia e infezione da HIV può essere influenzata da particolari citochine. L'infezione da HIV è infatti associata ad una ridotta produzione di IL-15 e di altre interleuchine quali IL-12, IL-2 ed IL-10. IL-2 è una citochina secreta dai linfociti T attivati e regola maturazione e proliferazione delle cellule linfatiche. Vi sono evidenze cliniche di lunga data di come la somministrazione di IL-2 sia in grado di aumentare il numero di CD4+ nel sangue periferico e nei linfonodi e di cellule NK nei soggetti con infezione primaria in particolare quando è somministrata contemporaneamente la terapia antiretrovirale combinata. Uno studio italiano del Prof. Moroni pubblicato sul "Journal of infectious diseases" nel 2002 ha evidenziato come la somministrazione di IL-2 a pazienti sieropositivi possa ritardare o evitare l'insorgenza di infezioni opportunistiche. Questa evidenza è correlata al fatto che vi è un aumentato numero di cellule immunocompetenti in grado di contrastare queste infezioni. Anche IL-15 al pari di IL-2 è stata utilizzata come tale portando ad incoraggianti risultati. IL-15 ha una doppia azione in quanto è in grado di stimolare l'attivazione di HIV latente e allo stesso tempo la risposta immunitaria che ha un ruolo chiave nella proliferazione ed attivazione delle cellule NK e dei linfociti T CD8+. Si è visto infatti che è in grado di aumentare la risposta cellulare di CD8+ senza indurre l'espressione di HIV in particolare di espandere le cellule T di memoria e la differenziazione delle cellule NK. Dopo queste osservazioni l'interesse verso un approccio terapeutico di questo tipo è cresciuto conducendo anche a ricerche sugli agonisti delle interleuchine e in particolare su IL-15. La molecola attualmente in studio è un super-agonista ricombinante del recettore di IL-15. Questo composto è definito un super agonista in quanto ha un'attività biologica 25 volte superiore a quella del corrispondente endogeno. Questo super-agonista ha dimostrato di essere in grado di stimolare l'espressione di antigeni HIV in linfociti T CD4+ quiescenti e di aumentare la loro eliminazione da parte dei linfociti T. Uno studio clinico di fase II iniziato a marzo 2021 che utilizza N-803 (stesso farmaco utilizzato nella sperimentazione precedente) si propone di valutare la riduzione della persistenza di HIV nei linfonodi. L'utilizzo di interleuchine per la riattivazione dell'infezione tuttavia può comportare il rischio di aumentare l'infiammazione già presente nei pazienti trattati.

Vi sono alcuni studi che dimostrano che anche il disulfiram, farmaco utilizzato per la dissuefazione da alcol è in grado di riattivare la trascrizione di HIV quiescente nelle cellule T. Il vantaggio dell'utilizzo di questo farmaco è la già nota sicurezza clinica perché già utilizzato per un'altra patologia, lo svantaggio è che per ottenere questa attivazione deve essere somministrato in un dosaggio elevato di 2000 mg/die.

Eliminazione del virus latente riattivato

Una volta riattivata l'infezione però questa deve essere eliminata.

Mentre i livelli di IgA nei pazienti affetti da HIV resta costante anche negli stadi avanzati dell'infezione, i livelli di IgG ed IgM diminuiscono. L'attenzione è stata quindi rivolta all'immunoterapia passiva con plasma o immunoglobuline purificate da individui HIV-sieropositivi asintomatici. Il plasma iperimmune è ottenuto da persone che a seguito di guarigione da una malattia o di vaccinazione hanno sviluppato un'elevata quantità di anticorpi contro il microrganismo responsabile dell'infezione. Somministrato in pazienti affetti da quella stessa infezione è in grado di neutralizzare l'agente responsabile o renderlo visibile al sistema immunitario. Questo approccio terapeutico è stato usato nella cura di molteplici malattie come scarlattina, morbillo, varicella e recentemente nell'infezione da Sars-Cov-2. Alcuni studi dove è stato utilizzato plasma anti-HIV hanno dimostrato risultati significativi migliorando la condizione clinica nei pazienti con AIDS e stabilizzando la conta delle cellule CD4+. Sono attualmente in studio in fase I gli anticorpi neutralizzanti specifici per HIV (bNAbs- broadly neutralizing antibodies). Questi anticorpi si legano alle proteine virali e al recettore Fc. Essi derivano da anticorpi isolati da cellule B di soggetti infetti con infezione controllata: essi promuovono la distruzione delle cellule infettate attraverso citotossicità anticorpo-mediata o una fagocitosi cellulare anticorpo-mediata. L'anticorpo si lega all'antigene di HIV espresso dalle cellule infettate, vengono reclutate le cellule natural killer o i monociti che le distruggono. VRC01 è l'anticorpo più studiato ed ha come target il sito di legame di gp120 e il recettore CD4. Diversi studi hanno preso in considerazione questo anticorpo, provandone il profilo di sicurezza, l'ampia emivita e l'elevata attività neutralizzante. È stato valutato anche l'utilizzo di questi anticorpi nel prevenire il rischio di acquisire nuove infezioni da HIV-1 con ottimi risultati ovvero la riduzione del rischio del 75% di acquisire l'infezione, sostenuta da varianti sensibili all'azione dell'anticorpo, limitatamente alla trasmissione per via sessuale. Recentemente si è concluso uno studio che ha testato la capacità di un anticorpo neutralizzante ad ampio spettro somministrato per via endovenosa o sottocutanea di bloccare l'infezione da parte di diversi ceppi di HIV. Questo anticorpo è stato in grado di bloccare il 30% dei ceppi di HIV testati. La potenza di un anticorpo di bloccare HIV si può misurare con un test di recente sviluppo. Esiste una soglia che l'anticorpo deve essere in grado di superare per essere in grado di bloccare quel ceppo, e grazie all'ausilio di questo test si è scoperto che VRC01 dovrebbe essere 10 volte più potente per poter essere efficace.

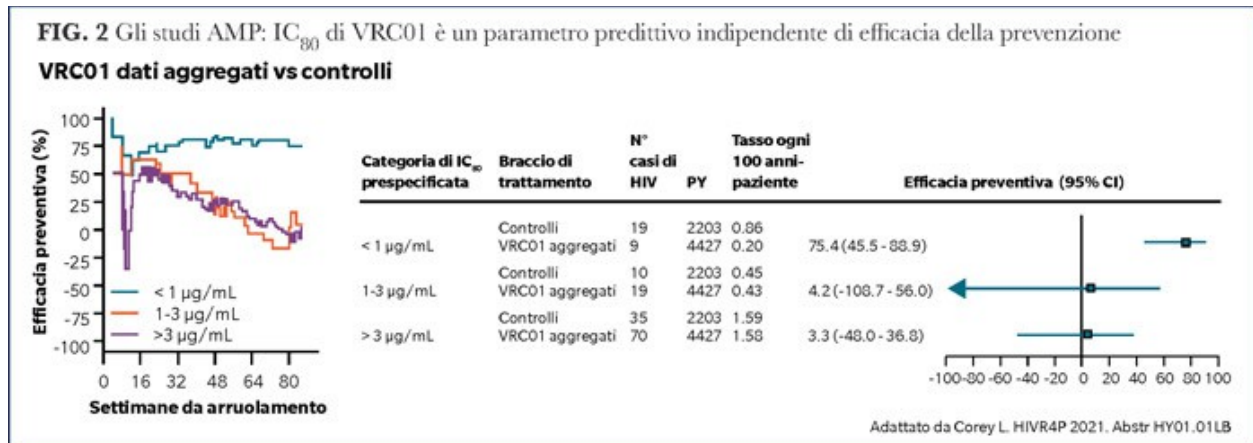


Immagine 15. Utilizzo di VRC01 nella prevenzione di acquisizione dell'infezione da HIV-1. (Fonte: Huang Y et al. "Pharmacokinetics and predicted neutralizations coverage of VRC01 In HIV-uninfected participants of the Antibody Mediated Prevention (AMP) trials." EBiomedicine 2021.)

Un altro approccio in questo senso è basato sull'infusione di linfociti T CD8+ estratti dal paziente, stimolati con antigeni HIV in laboratorio e poi re-introdotti. Si tratta di un'immunoterapia già utilizzata in campo oncologico e sperimentata recentemente nell'infezione da HIV.

Blocco della riattivazione virale nei reservoirs

Un'altra strategia antiretrovirale in studio, opposta a quella discussa finora è il blocco della riattivazione virale e il mantenimento di uno stato di latenza dell'infezione profonda e prolungata, come approccio alternativo all'eradicazione completa.

A questo scopo sono studiati gli inibitori della proteina Tat. La proteina Tat è una proteina virale, una delle prime che il virus induce a produrre dopo aver infettato la cellula, essa regola la trascrizione virale ampliando la replicazione in quanto accelera enormemente la trascrizione del DNA nelle cellule. Inibendo questa proteina la produzione di nuovi virioni avviene molto più lentamente. Un farmaco inibitore della trascrizione virale Tat-dipendente è la dideidrocorticostatina A o dCA. Nelle sperimentazioni dove è stato utilizzato questo farmaco si è osservato un blocco della trascrizione virale e conseguentemente ad un blocco della riattivazione virale.

Modulazione della risposta immunitaria

Nei pazienti con infezione da HIV è fondamentale tenere sotto controllo anche lo stato di infiammazione cronico e cercare di ridurlo, in modo che il sistema immunitario possa lavorare in maniera ottimale. Il primo approccio studiato è quello di ridurre la fibrosi all'interno dei linfonodi e l'infiammazione indotte da HIV attraverso farmaci come il pirfenidone, un agente anti-fibrotico dotato di proprietà antinfiammatorie, utilizzato nella fibrosi polmonare idiopatica, il losartan e il telmisartan, due farmaci antipertensivi. Appartengono alla categoria degli antagonisti per il recettore AT1 per l'angiotensina II. Perseguendo lo stesso obiettivo si è studiato anche un modo per ridurre le citochine pro-infiammatorie attraverso l'utilizzo dell'aprepitant, un antiemetico per il quale è stato dimostrato un effetto antinfiammatorio nei pazienti affetti da HIV e una riduzione di IL-6, IL-7 e TNF α e canakinumab che sembra in grado di bloccare IL-1 e modulare alcuni marcatori di rischio cardiovascolare. Si sta studiando anche la metformina, farmaco anti-diabetico in questo senso poiché è stato dimostrato anche per questa molecola un meccanismo d'azione antinfiammatorio. Anche il vorapaxar, un antagonista del recettore PAR-1 per la trombina, utilizzato per la prevenzione di eventi cardiaci, è stato studiato per valutare l'efficacia nel ridurre marker di infiammazione e coagulopatia indotte dall'infezione da HIV.

Anticorpi monoclonali come nivolumab, pembrolizumab, ipilimumab già approvati e utilizzati in terapie oncologiche sono anche in studio. Questi anticorpi sono diretti contro proteine di superficie definite checkpoint immunitari, interessate nella regolazione della risposta immunitaria. Possono inoltre limitare le risposte in presenza di virus e cellule cancerose, impedendo l'attività del sistema immunitario. Sono modulatori della risposta immunitaria in quanto la spengono o la riducono. Alcuni di questi recettori come PD-1, LAG-3 e TIGIT sono preferenzialmente espressi sulla superficie delle cellule infettate da HIV e permettono quindi di individuare le cellule che fungono da reservoir per il virus.

In generale per gli anticorpi monoclonali il problema più importante è il rischio di sviluppare, nei pazienti trattati, reazioni autoimmunitarie, motivo per cui anche le sperimentazioni cliniche sono limitate a pazienti HIV positivi e con tumori che non rispondono a terapie standard.

Sempre nell'ottica di potenziare l'azione del sistema immunitario sono in studio strategie per rendere le cellule dell'ospite più resistenti all'infezione attraverso terapie geniche. Dal paziente sieropositivo sono rimossi i linfociti T CD4⁺ e viene modificato geneticamente il corecettore CCR5. È noto infatti che la delezione 32 nel gene CCR5 riduce significativamente la probabilità per il linfocita di essere infettato. Una volta modificati i linfociti vengono ampliati ex vivo e poi re-infusi nel paziente.

È interessante notare come molti dei farmaci in studio per contrastare l'infezione da HIV siano già impiegati nelle terapie oncologiche. Questo perché le cellule cancerose e quelle infettate da HIV hanno delle similitudini come la sovraregolazione di alcuni geni coinvolti nella risposta immunitaria, il rilascio di alcune citochine immunosoppressive, la capacità di indurre uno stato infiammatorio generalizzato, con immunosoppressione.

5.2 PROSPETTIVE PER LO SVILUPPO DI UN VACCINO ANTI-HIV

Le molecole in sviluppo viste finora avevano come obiettivi quelli di riattivare l'infezione latente per poi eliminare le cellule infette, o quello di mantenere l'infezione in uno stato di latenza prolungato.

La principale e più efficace strategia terapeutica di contrasto ad un virus tuttavia rimane lo sviluppo di un vaccino specifico contro quel patogeno, attraverso il quale si può migliorare la risposta immune dell'organismo e attivare un processo di immunizzazione preventiva in modo da preparare il sistema immunitario a produrre anticorpi specifici per quel patogeno nel momento in cui entra a contatto con esso. In questo modo si sviluppa la memoria immunologica. Il vaccino è l'unica strategia terapeutica attraverso la quale è possibile prevenire il contagio.

Nel caso di HIV lo sviluppo di un vaccino risulta maggiormente difficoltoso rispetto ad altri patogeni contro cui ad oggi esiste una profilassi tramite la vaccinazione. Il virus di HIV infatti ha un'ampia variabilità genetica e muta molto rapidamente rispetto ad altri virus. È in grado di integrare il proprio genoma in quello dell'ospite, caratteristica unica. Ha come bersaglio prevalentemente le cellule del sistema immunitario, e l'immunità innata, costituita da cellule immunocompetenti quali neutrofili, macrofagi e cellule NK, non riesce di per sé a controllare l'infezione e a sopprimerla. Gli anticorpi prodotti contro il virus compaiono nelle primissime fasi dell'infezione e successivamente non vengono più prodotti e non vengono indotti dai vaccini. E in ultima analisi, i modelli animali, su cui testare l'eventuale vaccino in vivo non sono ideali e predittivi. Il modello animale ideale è costituito dallo scimpanzé, il quale può essere infettato con HIV-1 e simulare in maniera fedele la situazione umana. La sperimentazione su questo primate tuttavia è costosa e nello scimpanzé la replicazione virale è bassa e lo sviluppo della malattia è scarso. Viene utilizzato per cui un altro primate il macaco rhesus che tuttavia è infettato da SIV e non da HIV-1.

Rispetto ai vaccini contro altri patogeni sviluppati fino ad ora ci sono delle importanti differenze per quanto riguarda appunto HIV. In primis questi vaccini proteggono a lungo dall'infezione verso patogeni che non mutano o lo fanno molto lentamente. I vaccini sviluppati nella prevenzione di altre malattie sono stati ottenuti utilizzando virus uccisi o inattivati. Questo approccio non è sicuro nel caso di HIV. Inducono inoltre uno stato di immunità naturale contro la reinfezione simile a quello rilevato negli individui che superano l'infezione naturale. Ad oggi non esistono persone sieropositive che abbiano eliminato completamente l'infezione. La via di trasmissione di HIV più diffusa è rappresentata dalla trasmissione per via sessuale, i virus contro i quali è stato possibile sviluppare un vaccino prevalentemente hanno vie di trasmissione respiratoria e gastrointestinale. I vaccini convenzionali sono poi rivolti contro microrganismi non associati a specifici comportamenti a rischio e sono diretti contro microrganismi liberi e non intracellulari. Gli altri patogeni per concludere, dopo l'infezione causano la malattia. Nel caso di HIV la malattia non segue immediatamente l'infezione, ma questa cronicizza grazie all'integrazione del genoma virale nel DNA.

Vaccino	Scoperta dell'agente eziologico	Sviluppo del vaccino o registrazione negli Stati Uniti	Intervallo di tempo (anni)
Tifo	1884	1896	12
Pertosse	1906	1926	20
Poliomielite	1908	1955	47
Morbillo	1953	1983	30
Epatite B	1965	1981	16
Rotavirus	1970	1998	28
Epatite A	1973	1995	22
Malattia di Lyme	1982	1998	16
HIV	1983	?	>20

Tabella 3. Fasi di sviluppo di alcuni vaccini registrati. (Fonte : HIV. Patogenesi dell'AIDS. Risposte immunitarie. Terapia antivirale. Sviluppo di vaccini. Jay A. Levi. Ed italiana a cura di M. Clerici e G. Rizzardini. Piccin 2007. Fornita da S. Buchbinder e J. Fuchs.)

Il vaccino contro HIV dovrebbe avere caratteristiche specifiche:

- indurre un'immunità locale in tutti i potenziali siti di ingresso di HIV quindi non solo a livello ematico ma anche a livello delle mucose vaginale, rettale ed orale
- indurre risposte immunitarie cellulo-mediate (produzione di citochine) ed umorali (produzione di anticorpi) dirette contro le cellule infettate da virus
- indurre anticorpi capaci di neutralizzare il virus ma non favorire l'infezione
- indurre risposte immunitarie capaci di riconoscere le cellule infettate
- non indurre risposte autoimmuni
- essere sicuro e capace di stimolare una risposta persistente

É inoltre necessario aggiungere che l'efficacia di un vaccino dipende in maniera importante dall'adiuvante utilizzato, che deve contenere la sostanza immunostimolante, l'antigene più idoneo ed il veicolo più adatto per sollecitare nella maniera più adeguata sia la risposta innata che quella specifica. I liposomi sembrano essere la scelta migliore per la veicolazione in quanto trasportano l'antigene direttamente alle cellule presentanti l'antigene quali macrofagi, cellule dendritiche e cellule di Langerhans della cute e in quanto rilasciano gradualmente la proteina nel sito di inoculo garantendo una stimolazione antigenica stabile.

Nel caso di HIV sono in studio sia vaccini preventivi che terapeutici da affiancare alla terapia HAART. Un vaccino terapeutico si differenzia da un vaccino preventivo in quanto viene somministrato ad una persona che ha già contratto l'infezione, con lo scopo quindi non di prevenirla ma di controllare l'evoluzione della malattia. Nello sviluppo di questo tipo di vaccini l'attenzione è stata rivolta alla proteina Tat, che come già detto ha una funzione regolatoria attivante. È una proteina contro la quale vengono prodotti anticorpi specifici e da studi osservazionali si è visto come la presenza di questi sia associata ad una più lenta progressione della malattia e ad una risposta più efficace alla terapia. Due studi in particolare su quest'ultimo tipo di vaccini hanno dimostrato un aumento significativo di linfociti T CD8+ HIV specifici verso cellule che presentano HIV riattivato e la produzione di anticorpi specifici per la proteina Tat. Entrambi questi vaccini terapeutici sono stati testati in associazione alla HAART. Nell'ultimo studio citato, sostenuto dall'ISS e condotto da una ricercatrice italiana, ha dimostrato una riduzione dei serbatoi di virus latente e un miglioramento di alcuni parametri immunitari dopo 8 anni dalla vaccinazione. In particolare nei pazienti vaccinati e contemporaneamente in terapia, si è riscontrata, alla sospensione della terapia una capacità spontanea di controllare la replicazione virale per un periodo di tempo variabile.

Per quanto riguarda invece lo sviluppo di un vaccino preventivo gli approcci sono molteplici, sia tradizionali che innovativi.

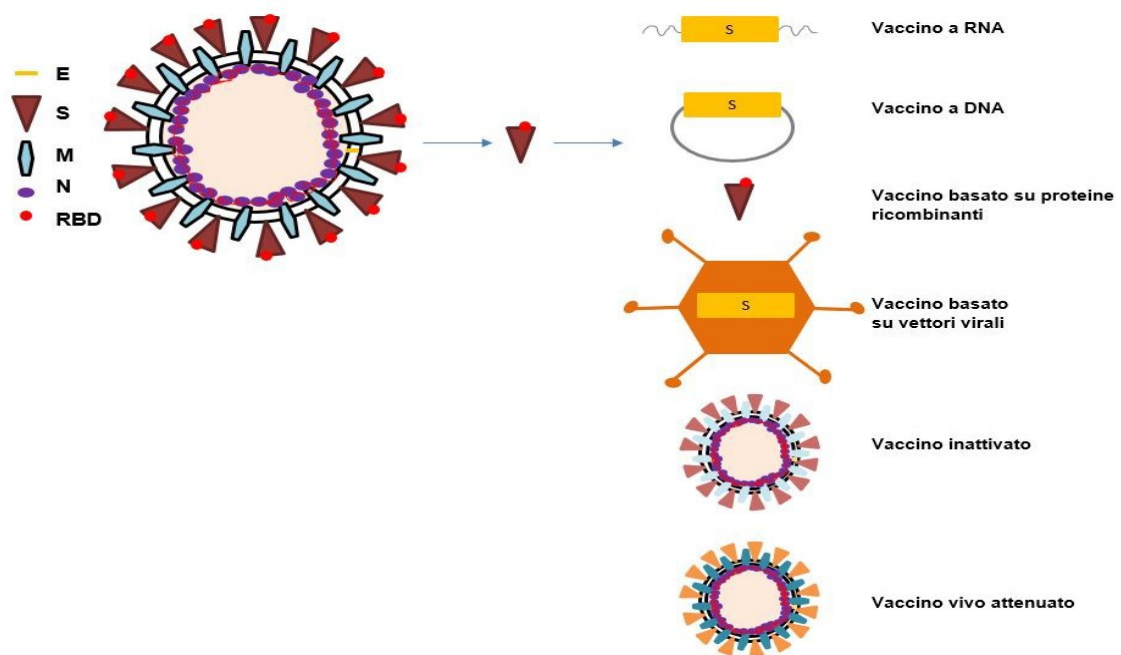


Immagine 17. Tipologie di vaccini. (Fonte : Zanichelli.)

Virus inattivati ed attenuati

L'approccio classico utilizzato nello sviluppo di molteplici vaccini è quello di utilizzare microrganismi vivi ma attenuati, che vengono privati della capacità di causare la malattia e inattivati ottenuti da microrganismi uccisi, che conservano entrambi le proprietà antigeniche. I vaccini inattivati sono più sicuri rispetto a quelli attenuati perché il microrganismo non può riacquistare la sua patogenicità. Tuttavia la protezione immunitaria di questi vaccini è limitata nel tempo per cui sono necessarie un numero variabile di dosi di richiamo. Nei vaccini costituiti da virus vivi attenuati questi vengono trattati con tecniche chimiche e fisiche affinché perdano la capacità di causare malattia. È prevista un'unica somministrazione.

I primi studi con virus interi inattivati non hanno dimostrato capacità protettiva pur riuscendo a indurre anticorpi anti-HIV. Furono utilizzati vaccini con SIV ucciso in modelli animali, ma dopo i primi risultati incoraggianti venne dimostrato che il vaccino non era efficace ricorrendo a virus eterologo oltre al fatto che alcune vaccinazioni con SIV inattivato producevano una risposta anticellulare piuttosto che una risposta virus specifica.

Per quel che riguarda invece virus vivi attenuati, alcuni studi hanno dimostrato efficacia nel prevenire la malattia, in neonati e in adulti sempre in modelli animali. Altre strategie nell'utilizzo di vaccini attenuati sono state di modificare alcuni geni come *nef* o *vpr* i quali regolano la replicazione virale. In entrambi i casi si verificava una potente stimolazione della risposta anticorpale.

Il principale problema legato a vaccini anti-HIV strutturati in questo modo, come è pure stato dimostrato, è che in alcuni casi sono in grado di indurre AIDS e quindi lo sviluppo della malattia, oppure l'innescò di altri processi patologici quali le neoplasie. Per questa tipologia di vaccini non si è mai arrivati alla sperimentazione umana.

Vaccini ad antigeni purificati : gp120 dell'envelope o Tat.

La glicoproteina gp120 dell'envelope virale viene purificata e viene fatta esprimere su sistemi di cellule (ad esempio CHO) dove si ottiene una glicosilazione quasi normale. Sono stati ottenuti dei risultati positivi nella prevenzione dell'infezione con adiuvanti differenti, e ciò ha permesso la conduzione di una sperimentazione umana.

Gp120 è risultata il migliore immunogeno fra le varie proteine dell'envelope in diversi studi. Si è inoltre osservato che un complesso solubile CD4:gp120 è un buon induttore di anticorpi neutralizzanti in grado di neutralizzare isolati di HIV-1 sia con tropismo X4 che con tropismo R5, che riconoscono HIV anche dopo il legame con CD4.

Un limite nell'utilizzo di proteine virali di superficie è che sono estremamente variabili in funzione del tipo di cellula in cui è avvenuta la replicazione. Da qui il problema dell'infezione da virus eterologhi.

Tat è una proteina con funzione regolatoria, nello specifico ha la funzione di attivare la replicazione virale. È stata somministrata nella forma attiva ed ha stimolato sia una risposta di

tipo umorale che cellulo-mediata con la produzione di anticorpi neutralizzanti anti-Tat, una risposta CD8-mediata non citotossica e una ridotta attività replicativa negli animali utilizzati.

Le proteine sopracitate possono essere somministrate come tali nella forma purificata oppure attraverso l'utilizzo di vettori replicanti quali virus vivi inattivati che si sono dimostrati efficaci nell'indurre una significativa e specifica risposta anti-HIV sia da parte di cellule CD4+ che di cellule CD8+. Le proteine virali vengono in questo modo prodotte nelle cellule dell'ospite infettate con questi virus risultando esse stesse immunogene eliminando quindi il rischio che frammenti di acido nucleico virale possano essere trascritti o integrati nel DNA dell'ospite, al contrario i vaccini con virus vivi attenuati o inattivati potrebbero possedere un'infettività residua. I virus-vettori utilizzati appartengono alle famiglie dei poxvirus da cui si sono ottenute buone risposte umorali e cellulo-mediate e quella degli adenovirus, i quali possiedono un genoma relativamente grande e quindi facilmente manipolabile, con cui analogamente si sono individuati degli effetti protettivi tanto che si sono condotti degli studi anche sull'uomo con questo tipo di vettore. Gli studi condotti sull'uomo hanno utilizzato le proteine purificate dell'envelope virale gp120 e gp160 e la proteina Tat. I risultati ottenuti non hanno mostrato un beneficio clinico concreto: ci sono state evidenze di bassi livelli di anticorpi neutralizzanti e una moderata risposta dei linfociti T citotossici. Molti trials clinici sono stati interrotti perché non vi erano evidenze di protezione dalla malattia o perché la risposta immunitaria era assente.

Un altro virus che è stato utilizzato è il virus della polio a cui sono stati sostituiti un paio di geni con proteine di HIV-1. In particolare in una sperimentazione dove è stato utilizzato questo virus che conteneva frammenti dei geni *gag*, *pol*, *env*, e *tat* di SIV gli animali hanno sviluppato anticorpi anti-SIV e una aumentata risposta dei linfociti T citotossici.

Nelle sperimentazioni in cui sono stati utilizzati questa tipologia di vaccini spesso si è utilizzata la strategia di induzione-richiamo che prevede una prima immunizzazione seguita a distanza di alcuni mesi da una seconda basata su un metodo differente con l'obiettivo di stimolare sia la risposta umorale che quella cellulo-mediata. Ad esempio una prima vaccinazione con virus uccisi, vettori di virus o vaccini a DNA e successivamente un richiamo con le sole proteine dell'envelope purificate.

Vaccini a VPLs (Virus-like particles)

Sono dei vaccini di tipo virale in cui gli antigeni acquisiscono struttura simil virale complessa tipica del virus ma che non hanno all'interno DNA o RNA. Si ottengono dall'assemblaggio di proteine strutturali virali in strutture macromolecolari (capsidi) ma essendo prive dell'acido nucleico non possono replicarsi e provocare la malattia.

Nel caso specifico di HIV questo approccio prevede la realizzazione di particelle del core virale contenente proteine dell'envelope di HIV senza il rischio associato alla somministrazione del virione intero, ma mantenendo la stessa capacità di indurre immunità verso l'infezione. Le VPLs ottenute esprimono in superficie gp120 ma sono prive del genoma di HIV.

Vaccini a DNA e a RNA

L'immunizzazione con DNA o RNA virale si basa sull'iniezione diretta di DNA/RNA in modo da ottimizzare l'espressione delle proteine nelle cellule umane ed ottenere una migliore risposta. Gli approcci utilizzati per l'incorporazione del DNA sono stati appunto l'iniezione diretta, l'utilizzo di "gene guns", dove il DNA viene apposto su sfere di metalli inerti e "sparato" nella cellula, o attraverso particelle lipidiche (liposomi, di cui si è parlato in precedenza). Negli esperimenti su animali si sono ottenute buone risposte come la produzione di anticorpi neutralizzanti e un'aumentata risposta T linfoproliferativa ma allo stesso tempo si è visto che la comparsa di anticorpi neutralizzanti della risposta T citotossica era transitoria ed associata ad una attenuazione della fase acuta dell'infezione e non alla protezione. Infatti la caratteristica dei vaccini a DNA di indurre una risposta cellulare limitata e di breve durata, senza un'adeguata risposta umorale ha ridotto l'interesse nella ricerca di un vaccino di questo tipo. Tuttavia sono stati condotti protocolli di vaccinazione sull'uomo che hanno mostrato la comparsa di risposte antivirali promettenti.

Per quanto riguarda i vaccini a mRNA invece recentemente è stata annunciata l'inizio di una nuova sperimentazione di due vaccini a mRNA, rispettivamente mRNA-1644 e mRNA-1644-V2core. La tecnica di sfruttare RNA messaggero è già stata sfruttata per altri vaccini, ad esempio nel vaccino per COVID-19 e consiste nell'introdurre all'interno della cellula un'informazione con la quale essa è in grado di produrre un frammento di una proteina, l'antigene, riconosciuto come non-self contro cui il sistema immunitario può sviluppare una risposta specifica. Dovrebbe infatti, come osservato nei modelli animali, essere in grado di sviluppare anticorpi neutralizzanti contro HIV-1 (bn-Abs) che attaccano nello specifico la glicoproteina gp120. La sperimentazione è iniziata il 19 agosto 2021 e coinvolge 56 volontari sani, fra i 18 e i 50 anni e si stima si concluderà nella primavera 2023.

Lo sviluppo e l'efficacia dimostrata dal vaccino a mRNA per COVID-19 ha dato una spinta importante alla ricerca di un vaccino dello stesso tipo per HIV anche se il progetto di un vaccino a mRNA era già stato avviato nel 2016-2017. Gli studi preclinici su modelli animali, nello specifico su primati affetti da SHIV, condotti da un gruppo di ricerca con a capo il Dott. Paolo Lusso, hanno dimostrato che il vaccino è sicuro ed efficace; alla 58esima settimana tutti i primati vaccinati presentavano gli anticorpi neutralizzanti e una risposta immunitaria aumentata sostenuta dalle cellule T helper e una diminuzione del rischio di infezione del 79% dopo la somministrazione di dosi booster. L'RNA messaggero fornisce alla cellula umana l'informazione per sintetizzare le proteine dell'envelope (env) e della struttura virale (gag) che vengono assemblate in VLP ed in questo modo è possibile by-passare il problema legato all'eterogeneità delle proteine del rivestimento sopracitato per i vaccini a proteine purificate, inducendo anticorpi che riconoscono e colpiscono le particelle virali con struttura analoga.¹ Non vi è inoltre il rischio di insorgenza di infezione in quanto manca il genoma virale. Le dosi booster somministrate contengono mRNA per l'espressione di gag ed env di diversi sottotipi virali in questo modo lo spettro di protezione si amplia. Difatti dopo 58 settimane sono stati individuati anticorpi contro 12 diversi ceppi virali.

1 N.d.A. Prof. P. Lusso, intervista a La Repubblica.

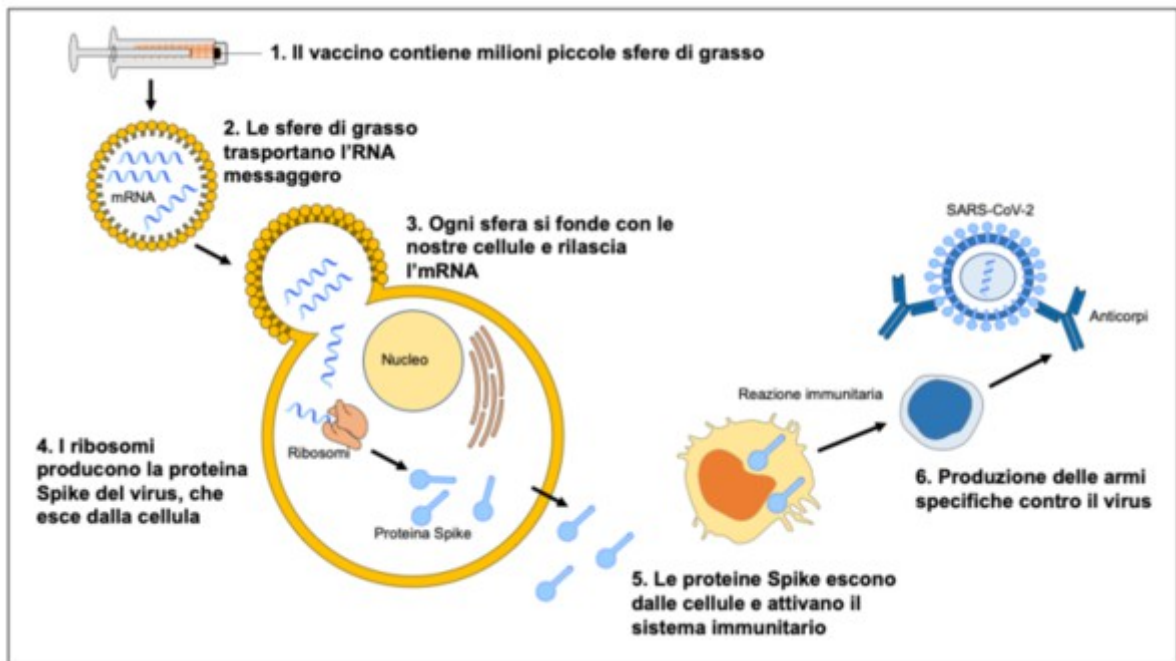


Immagine 18. Meccanismo d'azione di un vaccino a mRNA. (Fonte: ospedalebambinogesù.it)

Per risolvere il problema dell'eterogeneità delle proteine virali sono stati studiati dei vaccini definiti “a mosaico” i quali contengono frammenti di proteine virali provenienti da diversi ceppi di HIV in modo da indurre una risposta ad ampio spettro. Sono in corso uno studio in fase II in donne sieronegative in Sud Africa, ed uno studio in fase III dove i partecipanti sono stati arruolati in Europa ed America, entrambi valutano l'efficacia e la sicurezza di questo tipo di vaccino. I due studi valutano inoltre la risposta ai due sottotipi dominanti nelle rispettive regioni geografiche dove sono condotti gli studi: il sottotipo C più comune in Sud Africa e il sottotipo B più comune in occidente.

Da citare è anche il vaccino sviluppato da un gruppo di ricerca spagnolo nel 2011, MVA-B il quale si è dimostrato efficace nell'indurre una risposta immunologica nel 92% dei soggetti sani. MVA-B o vaccino Ankara modificato B è stato sviluppato a partire dal vaccino anti-vaiolo MVA, vaccino attenuato che usa come vettore un poxvirus. La lettera “B” si riferisce al sottotipo di HIV più diffuso in Europa.

Esistono alcuni potenziali rischi associati alla vaccinazione. In alcuni casi si è verificato il fenomeno del potenziamento immunitario (ADE) dove il legame virus-anticorpo ha migliorato l'ingresso nelle cellule o ha favorito la replicazione. Nel caso specifico di HIV vi sono stati casi in cui la viremia negli animali vaccinati era superiore rispetto ai controlli o in cui la produzione di anticorpi contro il virus non proteggeva dall'infezione. È stato per contro osservato che il fenomeno del potenziamento da anticorpi diminuisce all'aumentare della quantità di anticorpi neutralizzanti, e questo suggerisce la necessità di effettuare più richiami per evitare tale fenomeno, considerando anche il fatto che vi sono alcuni polimorfismi genetici che aumentano la probabilità che questo si verifichi. Questo è un ulteriore ostacolo per lo sviluppo di un vaccino che per l'appunto non dovrebbe contribuire al rischio di contagio. Un altro fenomeno che si è

osservato nella vaccinazione è stato il così detto “peccato originale antigenico”. Questo determina la propensione del sistema immunitario a utilizzare la memoria immunologica piuttosto di creare nuovi anticorpi una volta esposto per la seconda volta ad un patogeno. La tipologia di risposte è dunque sempre la stessa, anche se il patogeno ha caratteristiche diverse rispetto a quello della prima esposizione, il sistema immunitario non riesce a maturare nuove risposte. Nel caso di HIV si è creata una risposta dominante capace di inibire la risposta da parte di altri cloni ad altri antigeni. Al contrario che per i farmaci antiretrovirali per la sperimentazione dei vaccini possono essere arruolati volontari sani; gli end point valutati sono la frequenza dell'infezione ed il decorso della malattia.

Vi sono poi alcune evidenze di come le strategie vaccinali possano essere potenziate attraverso alcune tecniche. La somministrazione di citochine in combinazione all'immunizzazione attraverso vaccini in modelli animali sembra possa aumentare la risposta immunitaria e migliorare la protezione. La risposta al vaccino sembra inoltre migliorata se nel sito di iniezione vengono convogliate in vettori plasmidici cellule dendritiche che esprimono chemochine o fattori di attivazione. Le cellule dendritiche o APC fanno parte del sistema immunitario, la loro funzione è quella di internalizzare l'antigene per poi presentarlo frammentato ai linfociti T o in forma nativa ai linfociti B. La presenza di cellule dendritiche mature nel sito di iniezione può aumentare significativamente la capacità immunogena di vaccini a DNA. È stata inoltre valutata la possibilità di indurre una risposta immunitaria a livello mucosale, in quanto l'immunizzazione a livello locale di un sito potrebbe portare ad una risposta immunitaria anche in siti diversi. Nel tratto genitale di donne e uomini affetti da HIV è presente un'attività citotossica e nel tratto genitale dei primati è stata evidenziata la presenza di macrofagi, linfociti T e B che costituiscono una prima risposta (innata) al virus. Inoltre anticorpi specifici contro HIV sono stati rinvenuti a livello nasale e rettale. Questo evidenzia come un eventuale vaccino somministrato nei siti con cui HIV entra in contatto primariamente potrebbe indurre una risposta protettiva immediata e locale, ma anche che la risposta anticorpale potrebbe essere localizzata in molteplici punti di ingresso per il virus. Uno studio in particolare riporta come l'immunizzazione per via nasale induce protezione a livello delle vie respiratorie superiori e anche a livello genitale.

CONCLUSIONI

Dall'esordio della diffusione e della scoperta di HIV ad oggi sono trascorsi più di 20 anni. In questo lasso di tempo moltissimi passi avanti sono stati fatti sia dal punto di vista dello sviluppo di farmaci, dell'accesso alle terapie, della prevenzione che dal punto degli aspetti che riguardano la condizione sociale ed umana del malato di AIDS. Altrettanti rimangono da fare, in quanto ancora non esiste un vaccino sperimentato, approvato e commercializzato per la prevenzione di questa malattia.

I dati registrati negli ultimi 10 anni nei paesi occidentali sono stati incoraggianti, l'incidenza delle nuove diagnosi è in continua diminuzione, l'aspettativa di vita dei pazienti sieropositivi grazie alle terapie aumenta, la consapevolezza dei comportamenti a rischio è maggiore. L'attenzione che la malattia aveva acquisito negli anni '80 è andata via via scemando, perché l'impressione generale è che l'infezione non circoli più. I dati che arrivano da altre parti del mondo però raccontano un'altra storia. I paesi dell'est Europa hanno la più alta incidenza di nuove diagnosi rispetto a quelli dell'ovest, ed è in crescita. Nei paesi dell'Africa sub-sahariana e del sud-est asiatico la diffusione dell'infezione non si è mai arrestata.

Le zone del mondo dove HIV sta ancora circolando in maniera pressoché invariata sono zone dove le risorse economiche e sanitarie sono limitate, spesso compromesse dall'instabilità politica, e dove vi sono culture diverse rispetto a quelle occidentali ma poiché la cultura può influenzare i comportamenti, essa è un aspetto da tenere in considerazione sulla base delle modalità di trasmissione di questa infezione. La cura della malattia attraverso le avanzatissime terapie antiretrovirali che, pur avendo costi elevati sono accessibili ai paesi occidentali, non è praticabile nei paesi non industrializzati, se non grazie a finanziamenti da paesi terzi o da associazioni private, per i motivi sopracitati e per il numero di pazienti che ne avrebbe bisogno. Ma oltre alla necessità di curare le persone già malate, vi è anche quella di limitare e alla fine di bloccare definitivamente la circolazione del virus.

La ricerca scientifica infatti si è impegnata sui due fronti della cura e della prevenzione della malattia. I primi farmaci utilizzati, AZT ad esempio, sono stati approvati in tempi record per la cura della malattia, anche grazie al fatto che erano già utilizzati per altre patologie ed avevano quindi un profilo di sicurezza noto. La struttura di HIV è stata studiata nel dettaglio per poter individuare tutti i possibili target farmacologici portando allo sviluppo di farmaci che colpiscono ogni enzima e proteina che questo virus possiede. Esistono infatti inibitori dei principali enzimi coinvolti nella replicazione del materiale genetico, nell'integrazione di questo all'interno di quello della cellula ospite e nell'assemblaggio del virione maturo e farmaci che bloccano la funzione di adesione delle proteine di superficie. È stata individuata inoltre una terapia ad alta efficacia che potesse controllare l'infezione in maniera ottimale associando più farmaci appartenenti a classi diverse. La HAART rappresenta già di per sé un'innovazione terapeutica. Nella ricerca di nuovi farmaci per l'infezione da HIV non sono stati considerati solamente gli enzimi coinvolti nei vari processi cellulari ma anche le condizioni fisiologiche che HIV compromette, ad esempio la riduzione della capacità di far fronte a varie infezioni, e tutti i

processi biomolecolari coinvolti, dal rilascio di interleuchine ai geni che regolano la trascrizione nelle cellule infette. Nei pazienti sieropositivi sono stati monitorati alcuni parametri che permettessero di comprendere quali processi fisiologici venivano compromessi dall'infezione e in questo modo sono stati sviluppati o individuati farmaci utilizzati in altre patologie ad esempio, che potessero controllare quei parametri. Da qui la necessità di agire anche su questi target allo scopo di riattivare l'infezione latente per poi eliminarla o di mantenerla in uno stato di latenza prolungato. Attualmente la ricerca di nuovi farmaci non è più indirizzata al controllo dell'infezione e alla riduzione della mortalità ma all'eradicazione completa del virus dai reservoirs cellulari.

Lo sviluppo di un vaccino è invece una questione ancora aperta. Non appena si comprese che AIDS era causata da un agente virale, si iniziò a lavorare per creare un vaccino che potesse prevenire l'infezione, con le conoscenze fino ad allora acquisite. Inizialmente i fallimenti sono stati molteplici. La tecnica di utilizzare virus inattivati o vivi attenuati infatti non ha dato i risultati sperati. Le caratteristiche uniche di HIV hanno reso, e stanno tutt'ora rendendo difficile l'ottenimento di risultati positivi. L'utilizzo di antigeni purificati aveva inizialmente indotto una buona risposta anticorpale, salvo poi scoprire che risultavano inefficaci non appena il virus assumeva caratteristiche diverse. Tuttavia i successi recenti legati in particolare ai vaccini a mRNA utilizzati per SARS-CoV-2 hanno accelerato la ricerca di vaccini anti-HIV, utilizzando la stessa tecnica. L'utilizzo di mRNA virale introdotto in liposomi sembra l'approccio più promettente anche per questo tipo di infezione.

In riferimento alle fonti bibliografiche utilizzate è importante fare una considerazione. Nei testi realizzati fino agli anni 2000 pur essendo già in uso farmaci antiretrovirali, la sensazione che si percepiva dagli autori era quella di disillusione, le percentuali riferite a quegli anni riguardo la mortalità erano ancora molto alte, si faceva inoltre spesso riferimento alle terapie palliative per i pazienti affetti da AIDS, e si stimava la pandemia in crescita. Nelle fonti più recenti le percentuali riportate sia per quanto riguarda la mortalità che per quanto riguarda la trasmissione dell'infezione sono inferiori. Si guarda con ottimismo ai nuovi farmaci in sviluppo e ad un potenziale vaccino e si considera l'infezione da HIV una patologia cronica che crea diversi disagi nelle persone affette ma gestibile e non associata a morte certa.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI E SITOGRAFIA

Per la stesura di questa tesi sono stati consultati i seguenti testi:

AIDS. M. Caremani. Ed Poletto 1993.

HIV/AIDS: storia, cura, prevenzione. Un' epidemia globale tra passato e futuro. M. Galli e S. Vella. Ed Franco Angeli 2016.

HIV. Patogenesi dell'AIDS. Generalità. Trasmissione. Replicazione. Infezione Acuta. Controllo intracellulare. Proprietà citopatiche. Proteine virali. Ruolo di HIV sui tessuti dell'ospite. Jay A. Levi. Ed italiana a cura di M. Clerici e G. Rizzardini. Piccin 2007.

HIV. Patogenesi dell'AIDS. Risposte immunitarie. Terapia antivirale. Sviluppo di vaccini. Jay A. Levi. Ed italiana a cura di M. Clerici e G. Rizzardini. Piccin 2007.

Manual of HIV Therapeutics. William G. Powderly, M.D. Ed Lippicott-Raven 1999.

The origin of AIDS, J. Pepin, Cambridge University Press, 2011.

Per la stesura di questa tesi sono stati consultati i seguenti siti:

www.ansa.it consultato in data 23.12.2021

www.epicentro.iss.it consultato in data 15.01.2022

www.fondazioneveronesi.it consultato in data 5.12.2021

www.infettivibrescia.it consultato in data 21.12.2021

www.issalute.it consultato in data 21.12.2021

www.intermediapub.com consultato in data 21.12.2021

www.medinews.it consultato in data 21.12.2021

www.microbiologiaitalia.it consultato in data 15.01.2022

www.msdmanuals.com consultato in data 31.12.2021

www.notiziariochimicofarmaceutico.it consultato in data 20.12.2021

www.paginemediche.it consultato in data 16.12.2021

www.pharmastar.it consultato in data 14.01.2022

www.prepinfo.it consultato in data 21.12.2021

www.salute.gov.it consultato in data 29.12.2021

www.theconversation.com consultato in data 23.12.2021

www.unaids.org consultato in data 26.12.2021

www.webmd.com consultato in data 23.12.2021

Per la stesura di questa tesi sono stati consultati i seguenti articoli:

1. Gabrilovich DI. Et al. "Clinical significance of HIV DNA in polymorphonuclear neutrophils from patients with HIV infection". Journal of acquired immunodeficiency syndromes, 1993.
2. H.C. Lane et al. "Abnormalities of B-cells activation and immunoregulation in patients with acquired immunodeficiency syndrome". New England Journal of Medicine, 1983.
3. Marini et al. "Nuclear architecture dictates HIV-1 integration site selection". Nature, 2015.
4. De Rossi et al. "Vertical transmission of HIV-1: lack of detectable virus in peripheral blood cells of infected children at birth", 1992.
5. De Andreis et al. "Absence of detectable maternal DNA and identification of proviral HIV in the cord blood of two infants who became HIV-infected", 1997.
6. J.J. Goedert et al. "High risk of HIV1 infection for first-born twins." Lancet, 1992.
7. European Collaborative Study "Risk factors for mother-to-child transmission of HIV-1." 1992.
8. M.E. St Louis et al. "Risk for perinatal HIV transmission according to maternal immunologic, virologic and placental factors." JAMA, 1993.
9. Galli et al. 1995.
10. Abela I.A. et al. "Cell-cell transmission enables HIV-1 to evade inhibition by potent CD4bs directed antibodies", Plos Pathog, 2012.
11. Saez-Ciron et al. "Post-treatment HIV-controllers with a long-term virological remission after the interruption of early initiated antiretroviral therapy ANRS VISCONTI study", Plos Pathog, 2013.
12. Okoye et al. "Early treatment in Acute SIV infection limits the size and distribution of the viral reservoir", CROI, 2014.
13. Peterson J. et al. "Early antiretroviral therapy appears to normalize intratechal markers of immune activation", CROI, 2014.

14. Deng K et al. "Stimulation of subdominant CTL response is required for the elimination of HIV-1 latent reservoir" CROI, 2014.
15. E. Dournon et al. "Effects of zidovudina in 365 consecutive patients with AIDS or AIDS-related complex." Lancet, 1988.
16. Karras A. et al "Tenofovir-related nephrotoxicity in human immunodeficiency virus-infected patients: three cases of renal failure, Fanconi syndrome and nephrogenic diabetes insipidus.", Clin Infect Dis, 2003.
17. Zimmermann A.E. et al "Tenofovir-associated acute and chronic kidney disease: a case of multiple drug interactions.", Clin Infect Dis, 2006.
18. Perrot S. et al "Bone pain due to fractures revealing osteomalacia related to tenofovir-induced proximal renal tubular dysfunction in a human immunodeficiency virus-infected patient." J. clin rheumatol, 2009.
19. Sabin C.A. et al "Use of nucleoside reverse transcriptase inhibitors and risk of myocardial infarction in HIV-infected patients enrolled in the D:A:D study: a multi cohort collaboration" Lancet, 2008.
20. S.G. Deeks et al. "HIV-1 protease inhibitors." JAMA, 1997.
21. S.C. Piscitelli et al. "Interactions among drugs for HIV and opportunistic infections." New England Journal of Medicine, 2001.
22. S.C. Piscitelli et al. "The effect of garlic supplements on the pharmacokinetics of saquinavir." Clin. Infect. Dis. 2002.
23. C. Merry et al. "Saquinavir pharmacokinetics alone and in combination with ritonavir in HIV-infected patients." AIDS, 1997.
24. R. Detels et al. "Effectiveness of potent antiretroviral therapy on time to AIDS and death in men with known infection duration." JAMA, 1998.
25. K.C. Chan et al. "Survival rates after initiation of antiretroviral therapy stratified by CD4 cell counts in two cohorts in Canada and the United States." AIDS, 2002.
26. D. Torre et al. "Effect of highly active antiretroviral therapy on ischemic cardiovascular disease in patients with HIV-1 infection." Clin. Infect. Dis. 2002.
27. A. Antinori et al. "Efficacy of cerebrospinal fluid (CSF)-penetrating antiretroviral drugs against HIV in the neurological compartment: different patterns of phenotypic resistance in CSF and plasma." Clin. Infect. Dis. 2005.
28. P.L. Vernazza et al. "Potent antiretroviral treatment of HIV-infection results in suppression of the seminal shedding of HIV." AIDS, 2000.
29. H. Zhang et al. "Human immunodeficiency virus type 1 in the semen of men receiving highly active antiretroviral therapy." N. Engl. J. Med. 1998.

30. W. Cavert et al. "Kinetics of response in lymphoid tissues to antiretroviral therapy of HIV-1 infection." *Science*, 1997.
31. A.S. Perelson et al. "Decay characteristics of HIV-1-infected compartments during combination therapy." *Nature*, 1997.
32. D.P. Kotler et al. "Effect of combination antiretroviral therapy upon rectal mucosal HIV RNA burden and mononuclear cell apoptosis." *AIDS*, 1998.
33. Rasmussen T.A. et al. "Panobinostat, a histone deacetylase inhibitor, for latent-virus reactivation in HIV-infected patients on suppressive antiretroviral therapy: a phase 1/2, single group, clinical trial.", *Lancet*, 2014.
34. C. Rothe Brinkmann et al. "Treatment of HIV-infected individuals with the Histone Deacetylase Inhibitor Panobinostat results in increased number of regulatory T-cells and limits ex vivo lipopolysaccharide -induced inflammatory response." *PubMed*, 2018.
35. Sogaard O.S. et al. "The HDAC inhibitor romidepsin is safe and effectively reserves HIV-1 latency in vivo as measured by standard clinical assays." *International AIDS conference*, 2014.
36. B. Mothe et al. "HIV consv vaccines and romidepsin in early-treated HIV-1 infected individuals: safety, immunogenicity and effect on the viral reservoir." *Front. Immunol.* 2020.
37. Laird G.M. et al. "Ex-vivo analysis identifies effective HIV-1 latency-reversing drug combination". *J Clin invest*, 2015.
38. P. Kollar et al. "Marine natural products: bryostatins in preclinical e clinical studies." *Pharmaceutical Biology*, 2014.
39. Boehm D. et al. "BET bromodomain-targeting compounds reactivate HIV from latency via a Tat-independent mechanism", *Cell cycle*, 2013.
40. H. Hemmi et al. "Small antiviral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway." *Nat. Immunol.* 2002.
41. F. Heil et al. "Species- specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8." *Science*, 2004.
42. A. S. Beignon et al. "Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor viral RNA interactions." *J. Clin. Investig.* 2005.
43. Whitney J. et al. "Treatment with a TLR-7 agonist induces transient viremia in SIV-infected ART-suppressed monkeys." *CROI*, 2015.
44. NCT02443935

45. S. A. Riddler et al. "Vesatolimod, a toll-like receptor 7 agonist, induces immune activation in virally suppressed adults living with human immunodeficiency virus-1." *Clin. Infect. Dis.* 2021.
46. U. C. Meier et al. "Shared alteration in NK cell frequency, phenotype and function in chronic human immunodeficiency virus and hepatitis C virus infections." *J. Virol.* 2005.
47. J. A. Kovacs et al. "Increases in CD4 T lymphocytes with intermittent courses of interleukin-2 in patients with human immunodeficiency virus infection." *N. Eng. J. Med.* 1995.
48. U.R. Hengge et al "Lymphocytes proliferate in blood and lymph nodes following interleukin-2 therapy in addition to highly active antiretroviral therapy." *AIDS*, 2002.
49. J. A. Kovacs et al. "Induction of prolonged survival of CD4 T lymphocytes by intermittent IL-2 therapy in HIV infected patients." *J. Clin. Investig.* 2005.
50. M. Moll et al. "Expansion of CD1 drestricted NKT cells in patients with primary HIV-1 infection treated with interleukin-2." *Blood*, 2006.
51. T. Kanai et al. "IL-15 stimulates the expansion of AIDS virus-specific CTL." *J. Immunol.* 1996.
52. X. Zhanfg "Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15." *Immunity*, 2000.
53. Jones R.B. et al. "Cytotoxic T-lymohocytes in combination with the IL-15 superagonist ALT-803 eliminate latently HIV-infected autologus CD4+ T-cells from natural reservoirs."
54. NCT04505501
55. H.J. Elliot et al "Short-term disulfiram to reverse latent HIV infection: a phase 2 dose escalation study." *Lancet*, 2015.
56. S. Matsuda et al. "Characterstics of IgA anti-HIV antibodies in plasma from patients with HIV infection." *Microbiol. Immunol.* 1997.
57. A. Karpas et al "Polymerase chain reaction evidence of human immunodeficiency virus 1 neutralization by passive immunization in patients with AIDS and AIDS-related complex." *Proc. Natl. Acad Sci. USA*, 1990.
58. D. Vittecoq et al. "Passive immunotherapy in AIDS: a randomized trial of serial human immunodeficiency virus-positive transfusions of plasma rich in p-24 antibodies versus transfusions of seronegative plasma." *J. Infect. Dis.* 1992.
59. Gaudinski M.R. et al. "Safety and pharmacokinetics of the FC-modified HIV-1 human monoclonal antibody VRC01LS: a phase 1 open-label clinical trial in healthy adults." *Plos Med*, 2018.

60. Gaudinski M.R. et al. "Safety and pharmacokinetics of broadly neutralising human monoclonal antibody VRC07-523LS in healthy adults: a phase 1 dose-escalation clinical trial." *Lancet HIV*, 2019.
61. Corey L. et al. "The AMP Studies: Phase 2b Proof-of-concept Trials Designed to test the Efficacy of VRC01 Antibody to prevent HIV acquisition. HIV Research for Prevention (HIVR4P)" virtual conference. Abstract, 2021.
62. Huang Y et al. "Pharmacokinetics and predicted neutralizations coverage of VRC01 In HIV-uninfected participants of the Antibody Mediated Prevention (AMP) trials." *EBiomedicine* 2021.
63. "A phase I study of autologous, activated CD8+ lymphocytes expanded in vitro and infused with or without recombinant interleukin-2 to patients with AIDS or severe ARC." clinicaltrials.gov, 2001.
64. K.L. Smith et al. "An unexpected journey: how cancer immunotherapy has paved the way for an HIV cure." *Discov. Med.* 2015.
65. J.A. Sung et al. "Expanded cytotoxic T-cell lymphocytes target the latent HIV reservoirs." *J. Infect. Dis.* 2015.
66. Mousseau G et al "The tat inhibitor didehydro-cortistatin A prevents HIV-1 reactivation from latency." *mBIO*, 2015.
67. S. Mediouni et al. "Didehydro-cortistatin A inhibits HIV-1 by specifically binding to the unstructured basic region of Tat." *mBio*, 2019.
68. Estes J.D. et al "Antifibrotic therapy in simian immunodeficiency virus infection preserves CD4+ T cell population and improves immune reconstitution with antiretroviral therapy." *J infect Dis*, 2015.
69. J.V. Baker et al. "Losartan to reduce inflammation and fibrosis endpoint in HIV disease." *AIDS*, 2021.
70. "Telmisartan to reduce AIDS-related fibrotic and inflammatory contributors (TRAFIC study)." clinicaltrials.gov, 2017.
71. S. Spitsin et al. "Antiinflammatory effects of aprepitant coadministration with cART regimen containing ritonavir in HIV-infected adults." *JCI insights*, 2017.
72. Barret J.S. et al "Pharmacological rationale for the NK1R antagonist, aprepitant as adjunctive therapy in HIV." *J Transl Med*, 2016.
73. "Effects of IL-1 inhibition on inflammation and cardiovascular risk." clinicaltrials.gov, 2014.
74. Saisho Y. "Metformin and inflammation: its potential beyond glucose-lowering effect" *Endocr metab immune disord drug targets*, 2015.

75. ADVICE study group “Vorapaxar for HIV-associated inflammation and coagulopathy (ADVICE): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial.” *Lancet HIV*, 2018.
76. E. Chang et al. “Nivolumab Treatment for Cancers in the HIV-infected Population.” *J. Immunother.* 2018.
77. T.S. Uldrick et al. “Assessment of the Safety of Pembrolizumab in Patients With HIV and Advanced Cancer-A Phase 1 Study..” *JAMA*, 2019.
78. M.R. Cook et al. “Safety and Efficacy of Immune Checkpoint Inhibitor Therapy in Patients With HIV Infection and Advanced-Stage Cancer: A Systematic Review.” *JAMA oncol.* 2019.
79. Tebas P et al "Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV" *New England Journal Med*, 2014.
80. Robinson HL et al. "Elicitation of immune responses by DNA/MVA vaccine in ART treated patients in a treatment interruption trial HIV research HIV, Research for prevention conference, 2014.
81. Ensoli B. et al "HIV-Tat immunization induces cross-clade neutralizing antibodies and CD4+ T cells increases in antiretroviral-treated South African volunteers: a randomized phase II clinical trial" *Retrovirology*, 2016.
82. C. Stahl-Hennig et al. “Immunization with tween-ether-treated SIV adsorbed onto aluminum hydroxide protects monkeys against experimental SIV infection.” *Virology*, 1992.
83. R.C. Desrosiers et al. “Vaccine protection against simian immunodeficiency virus infection “ *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989.
84. M. Murphey-Corb et al “A formaline-inactivated whole SIV vaccine confers protection in macaques.” *Science*, 1989.
85. S. Sutjipo et al. “Inactivated simian immunodeficiency virus vaccine failed to protect rhesus macaques from intravenous or genital mucosal infection but delayed disease in travenously exposed animals.” *J. Virol.* 1990.
86. E.J. Stott “ Anti-cell antibody in macaques.” *Nature*, 1991.
87. A.J. Langlois et al. “The ability of certain SIV vaccine to provoke reaction against normal cells.” *Science*, 1992.
88. M.P. Cranage et al. “Studies on the specificity of the vaccine effect elicited by inactivated simina immunodeficiency virus.” *AIDS*, 1993.
89. M.L. Marthas et al. “Immunization with a live, attenuated simian immunodeficiency virus (SIV) prevents early disease but not infection in rhesus macaques challenged with pathogenic SIV.” *J. Virol.* 1990.

90. M.G. Ostsyula et al. "Fetal or neonatal infection with attenuated simian immunodeficiency virus results in protective immunity against oral challenge with pathogenic SIVmac251." *Virology*, 1996.
91. H. Kestler et al. "Induction of AIDS in rhesus monkeys by molecularly cloned simian immunodeficiency virus." *Science*, 1990.
92. W.M. Bogers et al. "Protection from HIV-1 envelope-bearing chimeric simian immunodeficiency virus (SHIV) in rhesus macaques infected with attenuated SIV : consequences of challenge." *AIDS*, 1995.
93. T. Igarashi et al. "Protection of monkeys vaccinated with vpr and/or nef-defective simian immunodeficiency virus strain mac/human immunodeficiency virus type 1 chimeric viruses : a potential candidate live-attenuated human AIDS vaccine." *J. Gen. Virol.* 1997.
94. T.W. Baba et al. "Pathogenicity of live, attenuated SIV after mucosal infection of neonatal macaques." *Science*, 1995.
95. B. Droprulic "Genetic modification of hematopoietic cells using retroviral and lentiviral vectors : safety considerations for vector design and delivery into target cells." *Curr. Hematol. Rep.* 2005.
96. L.O. Arthur et al "Challenge of chimpanzees immunized with human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120." *J. Virol.* 1989.
97. P.W. Berman et al. "Protection of chimpanzees from infection by HIV-1 after vaccination with recombinant glycoprotein gp120 but not gp160." *Nature*, 1990.
98. M. Girard et al. "Immunization of chimpanzees confers protection against challenge with human immunodeficiency virus." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991.
99. S.W. Barnett et al. "The ability of an oligomeric human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) envelope antigen to elicit neutralizing antibody against primary HIV-1 isolates is improved following partial deletion of the second hypervariable region." *J. Virol.* 2001.
100. C.-Y. Kang et al. "Immunization with a soluble CD4-gp120 complex preferentially induces neutralizing anti-human immunodeficiency virus type 1 antibodies directed to conformation dependent epitopes of gp120." *J. Virol.* 1994.
101. I.K. Srivastava et al. "Neutralizing antibody responses to HIV: role in protective immunity and challenges for vaccine design." *Expert Rev. Vaccines*, 2004.
102. A. Cafaro et al. "Control of SHIV-89.6P-infection of cynomolgus monkeys by HIV-1 Tat protein vaccine." *Nat. Med.* 1999.
103. C.D. Pauza et al. "Vaccination with tat toxoid attenuates disease in simian/HIV-challenged macaques." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000.

104. J. Engelmayer et al. "Mature dendritic cells infected with canarypox virus elicit strong antihuman immunodeficiency virus CD8⁺ and CD4⁺ T-cells responses from chronically infected individuals." *J. Virol.* 2001.
105. H.L. Robinson et al. "T cell vaccine for microbial infections." *Nat. Med.* 2005.
106. D.H. Barouch et al. "Adenovirus vectorbased vaccine for human immunodeficiency virus type 1." *Hum. Gene Ther.* 2005.
107. D.P. Francis et al. "Candidate HIV/AIDS vaccines : lessons learned from the world's firsts phase III efficacy trials." *AIDS*, 2003.
108. P.B. Gilbert et al. "Correlation between immunologic responses to a recombinant glycoprotein 120 vaccine and incidence of HIV-1 infection in a Phase 3 HIV-1 preventive vaccine trial." *J. Infect. Dis.* 2005.
109. M.R. Betts et al. "Characterization of functional and phenotypic changes in anti-Gag vaccine-induced T-cell responses and their role in protection after HIV-1 infection." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005.
110. S. Crotty et al. "Protection against simian immunodeficiency virus vaginal challenge by using sabin poliovirus vectors." *J. Virol.* 2001.
111. O. Haffar et al. "Human immunodeficiency virus-like, nonreplicating, gag-env particles assemble in a recombinant vaccinia virus expression system." *J. Virol.* 1990.
112. T. Shioda et al. "Production of human immunodeficiency virus (HIV)-like particles from cells infected with recombinant vaccinia viruses carrying the gag gene of HIV." *J. Virol.* 1990.
113. B.P. Hughes et al. "Morphogenic capabilities of human immunodeficiency virus type 1 gag and gag-pol proteins in insect cells." *Virology*, 1993.
114. B. Wang et al "Induction of humoral and cellular responses to the human immunodeficiency virus type 1 in non human primates by in vivo DNA inoculation." *Virology*, 1995.
115. L. Levitin "Simian immunodeficiency virus specific cytotoxic T-lymphocyte induction through DNA vaccination of rhesus monkeys." *J. Virol.* 1996.
116. S. Lu et al. "Simian immunodeficiency virus DNA vaccine trial in macaques." *J. Virol.* 1996.
117. S.A. Calarota et al. "Immune response in asymptomatic HIV-1 infected patients after HIV-DNA immunization followed by highly active antiretroviral treatment." *Science*, 1999.
118. P. Lusso, A. Fauci et al. "A multiclade env-gag VLP mRNA vaccine elicits tier-2 HIV-1 neutralizing antibodies and reduces the risk of heterologous SHIV infection in macaques." *Nature Medicine*, 2021.

119. "A study to assess the efficacy of heterologous prime/boost vaccine regimen of Ad26.Mos4.HIV and aluminum phosphate-adjuvanted clade C gp140 in preventing human immunodeficiency virus (HIV)-1 infection in women in Sub-Saharan Africa." clinicaltrials.gov, 2017.
120. "A study of heterologous vaccine regimen of adenovirus serotype 26 mosaic4 human immunodeficiency virus (Ad26.Mos4.HIV), adjuvanted clade C gp140 and mosaic gp140 to prevent HIV-1 infection among cis-gender men and transgender individuals who have sex with cis-gender men and/or transgender individuals. (MOSAICO)." clinicaltrials.gov, 2019.
121. K. Schlienger et al. "Human immunodeficiency virus type 1 major neutralizing determinant exposed on hepatitis B surface antigen particles is highly immunogenic in primates." *J. Virol.* 1992.
122. D.C. Montefiori et al. "Studies of complement-activating antibodies in the SIV/macacaques model of acute primary infection and vaccine protection." *AIDS*, 1995.
123. H. Kohler et al. "Clonal dominance: cause for a limited and failing immune response to HIV-1 infection and vaccination." *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1992.
124. D.H. Barouch et al "Control of viremia and prevention of clinical AIDS in rhesus monkeys by cytokine-augmented DNA vaccination." *Science*, 2000.
125. S.M. Sumida et al. "Recruitment and expansion of dendritic cells in vivo potentiate the immunogenicity of plasmid DNA vaccine." *J. Clin. Investig.* 2004.
126. A.W. Artenstein et al. "Mucosal immune responses in four distinct compartments of women infected with human immunodeficiency virus type 1: a comparison by site and correlation with clinical information." *J. Infect. Dis.* 1997.
127. J. Holmgren et al. "Mucosal immunity and vaccines." *Nat. Med.* 2005.