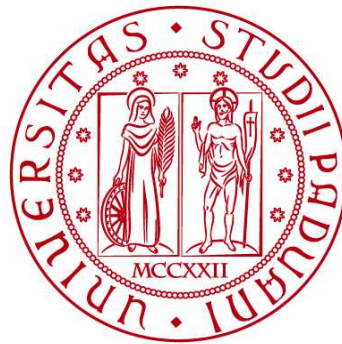


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biotecnologie



ELABORATO DI LAUREA

NUOVI FARMACI ANTI-HIV

Tutor: Prof.ssa Adriana Chilin

Dipartimento di Scienze del Farmaco

Laureando:
Matteo Michieletto

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

ABSTRACT

Dal giorno della sua scoperta, il virus dell'immunodeficienza umana ha rappresentato una delle più grandi sfide farmacologiche per il genere umano. Un virus in grado di sopravvivere opportunisticamente e latentemente negli organismi da lui infettati, in grado di attaccare le cellule del sistema immunitario inibendone la funzione.

Tra gli obiettivi a lungo termine delle nuove strategie farmacologiche vi è la scoperta di una terapia in grado di eradicare il virus dall'organismo, sebbene però risulti ancora molto complicato.

Attualmente invece lo sviluppo di nuovi farmaci ha permesso di facilitare le cure all'infezione, che precedentemente richiedevano somministrazioni frequenti, se non giornaliere, con effetti non duraturi, risultanti molto scomode nella quotidianità del paziente.

Non di minor rilevanza, inoltre, anche lo sviluppo nanotecnologico che ha permesso una diversa formulazione del farmaco, sia per la struttura microscopica che per la quantità necessaria a generare un effetto terapeutico rispetto alla formulazione precedente.

INDICE

Introduzione

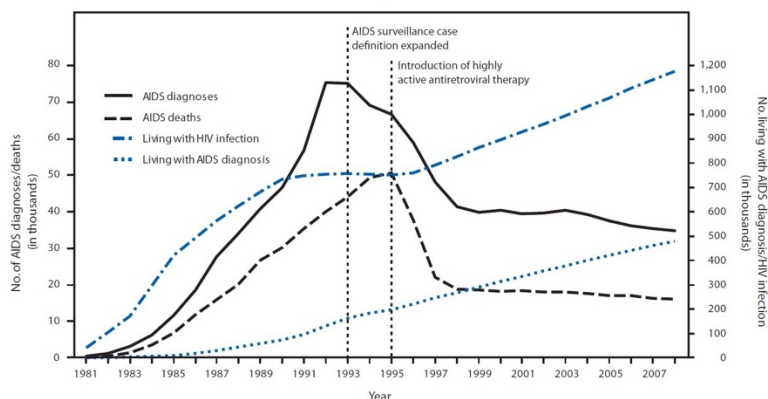
- 1. HIV: il virus dell'immunodeficienza umana**
 - 1.1 PATOLOGIA**
 - 1.2 TEST HIV**
 - 1.3 MODALITA' DI TRASMISSIONE**
 - 1.4 CICLO VIRALE**
- 2. STRATEGIE TERAPEUTICHE PER LA CURA DI HIV**
 - 2.1 TRATTAMENTI**
 - 2.2 MECCANISMO D'AZIONE DEI FARMACI ANTI-HIV**
- 3. LA NUOVA GENERAZIONE DI FARMACI**
 - 3.1 FOSTEMSAVIR**
 - 3.2 IBALIZUMAB**
 - 3.3 CABENUEVA**
 - 3.4 LENACAPAVIR**
- 4. UNO SGUARDO AL FUTURO**
 - 4.1 VEICOLAZIONE DEL FARMACO E NANOTECNOLOGIE**
 - 4.2 INGEGNERIA GENETICA: CRISPR/Cas9**
- 5. CONCLUSIONI**

BIBLIOGRAFIA

INTRODUZIONE

La diffusione dell'HIV viene generalmente attestata come pandemia nel 1981, anno in cui fu riscontrata una nuova malattia negli Stati Uniti, sebbene il primo caso di sieropositività accertato risale al 1959, da un campione analizzato in seguito derivante da un soggetto nativo dell'odierna Repubblica Democratica del Congo, infetto dal ceppo HIV-2.

Fino al 1996, anno corrispondente alla coperta dell'HAART o Highly Active Anti-Retroviral Therapy, i principali farmaci impiegati per contenere la diffusione del virus erano di tipo monoterapeutico, come ad esempio con AZT o DDI, volti a ridurre lo sviluppo della sindrome derivante dall'infezione, sebbene scarsamente efficaci a causa della facilità con cui il virus fosse in grado di produrre ceppi resistenti e dai molteplici effetti collaterali associati alla assunzione dei farmaci. Con l'introduzione di un opportuno modello matematico, fine alla misurazione della carica virale nei pazienti, e l'impiego di HAART, una terapia basata su una combinazione di inibitori contro la trascrittasi inversa e la proteasi, si vide un drastico calo di morti e diagnosi associate ad HIV, in particolare una volta che l'infezione entra nella fase definita AIDS, con un aumento dell'aspettativa di vita in portatori di HIV ma anche in coloro già portatori della sindrome di immunodeficienza.



Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR). HIV Surveillance — United States, 1981–2008 Centers for Disease Control and Prevention. June 3, 2011. Page 691.

Tali progressi farmacologici però presentavano delle limitazioni intrinseche, come la difficoltà di somministrazione e la frequenza con cui quest'ultime dovevano avvenire, pertanto, la nuova frontiera dei farmaci antiretrovirali si pone come obiettivo una formulazione consona all'autosomministrazione o perlomeno una durata prolungata nel tempo, che richieda una somministrazione periodica e schematizzata ma ad intervalli di tempo molto maggiori, garantendo altresì una copertura efficace con il minor grado di effetti collaterali associabili ad essi.

1. HIV: il virus dell'immunodeficienza umana

1.1 PATOLOGIA

L'infezione da parte di HIV può essere generalmente caratterizzata in tre fasi sequenziali di durata e sintomatologia variabile.

La prima è determinata da un periodo d'incubazione compreso tra le 3 e le 6 settimane con la successiva comparsa di una risposta acuta, come febbre, mialgia, letargia o encefalite, dovuta al raggiungimento delle sedi linfonodali da parte del virus, con conseguente produzione anticorpale.

Seguirà una latenza clinica in cui non vi saranno sintomi evidenti ma la replicazione virale sarà progressivamente più sostenuta a discapito dei linfociti T-CD4+ che invece diminuiranno.

La consistente riduzione di linfociti T-helper porterà anche una compromettente diminuzione della risposta cellulo-mediata portando alla comparsa di malattie opportunistiche e neoplasie, entrando nella fase definita AIDS o Acquired Immune Deficiency Syndrome.

Tuttavia, la patogenesi derivante dall'AIDS non può essere ricondotta alla mera riduzione linfocitaria ma anche a fenomeni associati ad essi.

Il virus stesso induce un'attivazione bystander, in linfociti T non infetti con la seguente produzione elevata di citochine e chemochine, le quali possono svolgere sia la funzione regolatrice ma anche quella pro-infiammatoria e chemiotattica, attivando macrofagi e cellule natural killer che porteranno a danni tissutali autoimmuni.

Esiste in natura, inoltre, una diversa classificazione del virus, distinto in HIV di tipo 1 e di tipo 2; il primo tipo è causa di circa il 95% delle infezioni nel mondo, mentre il secondo è prevalentemente distribuito nelle regioni dell'Africa occidentale, con minore trasmissibilità e minor progredimento verso l'AIDS.

1.2 TEST HIV

Per rilevare l'infezione di HIV è necessario effettuare dei test su campioni prelevati dal soggetto in esame e, dopo un periodo di determinato di tempo, si può identificare la positività o meno dell'esaminato.

Esistono essenzialmente due tipologie di test che differiscono in base al tempo necessario ad ottenere un risultato definitivo e sono:

- Test combinati, in cui si ricercano anticorpi o parti del virus, in particolare è spesso ricercato l'antigene p24, che permette di individuare positività dopo circa 40 giorni dall'ultimo contatto;
- Test specifici per anticorpi anti-HIV, permettono di individuare positività fino al novantesimo giorno dopo l'ultimo contatto.

Sono inoltre disponibili in commercio anche test rapidi, dal funzionamento simile a quelli per l'infezione da Sars utilizzati durante l'attuale pandemia, in grado di rilevare tracce immunoglobuliniche specifiche in campioni salivari o ematici, chiaramente con minor specificità d'azione dei test elencati in precedenza.

1.3 MODALITÀ DI TRASMISSIONE

L'infezione può essere trasmessa attraverso liquidi biologici come sangue, fluido seminale e secrezioni vaginali o latte materno di soggetti veicolanti il virus, in particolare ciò avviene a causa di penetrazione del virus stesso nell'organismo attraverso lesioni del tessuto epiteliale o mucosale.

TRASMISSIONE SESSUALE

Attualmente considerata la modalità infettiva più diffusa, con particolare rilevanza in rapporti anali a causa della scarsa stratificazione e lubrificazione dell'epitelio intestinale a livello rettale, comportante frequenti micro-lacerazioni favorevoli all'inoculazione del virus. Altamente dipendente da fattori comportamentali, come uso del profilattico, rapporti con persone non conosciute o tipo di rapporto, ma anche presenza di malattie sessualmente trasmesse comportanti lesioni cutanee ma anche una maggior concentrazione di cellule bersaglio del virus nelle zone infiammate.

TRASMISSIONE EMATICA

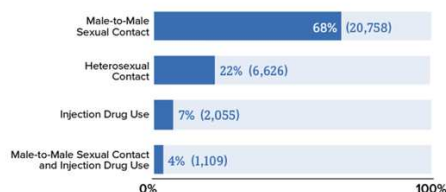
Di particolare rilevanza in soggetti tossicodipendenti condividenti siringhe, o altri dispositivi, per la somministrazione della sostanza psicoattiva o in possibili trasfusioni ematiche con campione contaminato. Generalmente si può indicare come veicolo del virus qualsiasi oggetto in grado di superare la barriera cutanea, tant'è che, se non effettuate in condizioni di sterilità, applicazioni cutanee o subcutanee come piercing e tatuaggi, possono risultare veicolo d'infezione.

TRASMISSIONE VERTICALE O PERINATALE

Durante la gravidanza, a causa della penetrazione trans-placentare, durante il parto, in seguito al contatto dell'infante con il sangue materno nel canale del parto o durante l'allattamento.

Solitamente per ridurre il rischio che il neonato contragga l'infezione da HIV, nelle donne sieropositive viene praticato il parto cesareo ed è consigliato l'allattamento artificiale [1].

New HIV Diagnoses in the US and Dependent Areas by Transmission Category, 2020*



Data for 2020 should be interpreted with caution due to the impact of the COVID-19 pandemic on access to HIV testing, care-related services, and case surveillance activities in state and local jurisdictions.

NOTE: Does not include other and perinatal transmission categories.

* Among people aged 13 and older.

Source: CDC. Diagnoses of HIV Infection in the United States and dependent areas, 2020. HIV Surveillance Report 2022:33.



1.4 CICLO VIRALE

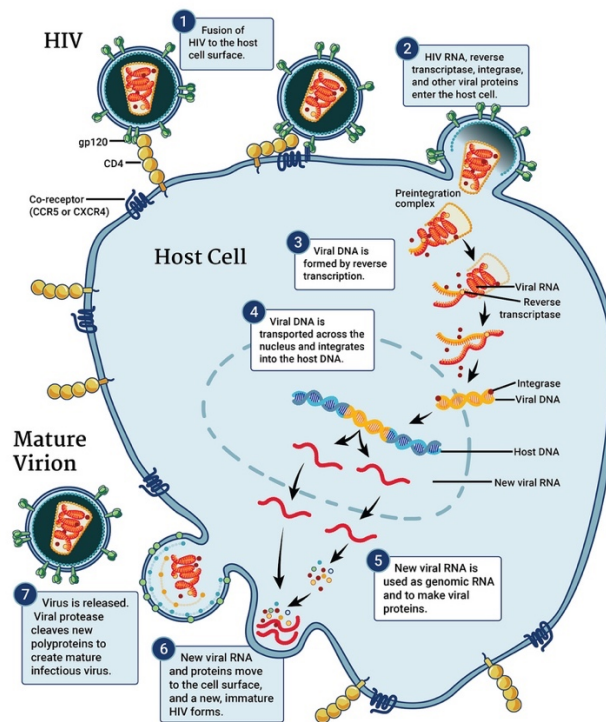
Il ciclo replicativo di HIV inizia quando le glicoproteine di membrana gp120 e gp41, presenti a livello pericapsidale del virus, incontrano il proprio recettore omologo CD4 presente in abbondanza in linfociti T-helper, ma anche in quantità minori, in linee cellulari diverse come macrofagi, cellule dendritiche dei linfonodi, cellule endoteliali o cellule ematopoietiche.

Affinché avvenga il sincizio del virus è necessaria l'interazione con un ulteriore recettore di tipo GPCR, o metabotropico, in genere CXCR4 o CCR5, che permettono un cambiamento conformazionale alla gp120, esponendo maggiormente gp41 affinché avvenga la fusione tra membrana virale e cellulare. Il virus penetrerà poi nella cellula perdendo il rivestimento glicoproteico che rimarrà all'esterno; una volta all'interno il core del virus sarà soggetto ad "uncoating", ossia, ad opera di proteasi, il virus perderà il proprio rivestimento proteico cosicché il codice genetico di HIV potrà essere trascritto e successivamente integrato nel genoma cellulare [2].

La trascrizione del virus è di tipo inverso, ad opera della trascrittasi-inversa, dove vi sarà un'iniziale sintesi di una catena di DNA complementare all'RNA virale, quest'ultimo filamento sarà poi degradato e sostituito con una seconda catena di DNA, ottenendo una molecola definita Provirus.

Successivamente il Provirus migrerà nel nucleo cellulare dove ad opera di integrasi sarà appunto integrato nel genoma cellulare dove potrà andare incontro ad una fase di latenza o ad una replicazione immediata.

L'input, non ancora noto ma strettamente associato alla stimolazione del sistema immunitario, che darà via alla trascrizione del genoma virale, comporterà, inizialmente, l'espressione dei geni regolatori e poi, successivamente, di quelli strutturali che contribuiranno alla formazione dei virioni a livello citoplasmatico. Il core del virus una volta assemblato sarà espulso attraverso gemmazione, dove sarà ulteriormente rivestito dall'envelope divenendo virione, andando a provocare danni alla superficie cellulare provocandone la morte; la loro liberazione nel circolo ematico o linfatico comporta ad una parziale loro neutralizzazione ma anche contemporaneamente a successive reinfezioni.



NIAID, www.niaid.nih.gov/diseases-conditions/hiv-replication-cycle

2. STRATEGIE TERAPEUTICHE PER LA CURA DI HIV

2.1 TRATTAMENTI

I trattamenti contro l'infezione di HIV sono applicabili sia nel caso in cui il soggetto sia effettivamente portatore del virus, ma anche nel caso in cui il esso sia ad alto rischio d'infezione, vedi luogo geografico, esposizione o condivisione di ambienti con soggetti portatori, o sia stato effettivamente esposto al virus.

I trattamenti si possono suddividere in tre tipologie, ossia:

- Trattamento come prevenzione, consiste nell'assunzione regolare di farmaci antiretrovirali da parte del portatore di HIV, con lo scopo di prevenirne la trasmissione, generalmente sopprimendo la replicazione virale;
- Profilassi pre-esposizione o PrEP, destinata a coloro che sono non portatori ma ad alto rischio di contrarre l'infezione, spesso impiegata anche in coppie sierodiscordanti che desiderano concepire naturalmente;
- Profilassi post-esposizione o PEP, consiste nell'assunzione immediata o non oltre le 72 ore successive ad una possibile esposizione o contatto con individui HIV positivi o ignoti. Il maggior rischio di insuccesso del trattamento è rappresentato dall'intervallo di tempo che intercorre tra esposizione ed inizio del trattamento [3].

2.2 MECCANISMO D'AZIONE DEI FARMACI ANTI-HIV

Il trattamento per l'infezione da HIV può definirsi composto da più classi di farmaci retrovirali, ciascuna avente come obiettivo il mancato sincizio del virus nelle cellule linfocitarie o l'inibizione degli enzimi necessari all'integrazione del genoma o alla sua replicazione.

Possono essere suddivisi in:

1. Inibitori della trascrittasi inversa (NRTIs), in grado di impedire la conversione dell'RNA in DNA, a loro volta suddivisibili in: non-nucleosidici (NNRTI), nucleotidici o nucleosidici (N_(t)RTI)
I primi due agiscono da basi competitrici in grado di bloccare la fase di retro-trascrizione, agendo da nucleotidi terminatori essendo mancanti di un gruppo ossidrilico necessario alla formazione del legame fosfodiesterico, in particolare gli inibitori nucleosidici necessitano una precedente fosforilazione a livello intracellulare per esplicare la propria funzione. I recettori non-nucleosidici invece agiscono allostericamente sull'enzima stesso.
2. Inibitori delle proteasi (PIs), permettono un errato clivaggio da parte dell'enzima proteasi delle componenti virali in forma inattiva, impedendo quindi una segmentazione corretta con conseguente inattivazione, generando virioni immaturi non in grado di diffondere ed amplificare l'infezione;
3. Inibitori della fusione e di adesione, i primi agiscono a livello di Gp41 coinvolta nella facilitazione della fusione membranale tra virus e CD4, generalmente legandosi ad una regione terminale della proteina andandone ad alterare la conformazione, e conseguentemente anche la funzione. I secondi, invece, agiscono a livello di Gp120, impedendone l'adesione ai rispettivi recettori metabotropici, CCR5 o CXCR4, presenti sulla membrana delle cellule linfocitarie;
4. Inibitori delle integrasi (INIs), bloccano l'enzima integrasi virale impedendo l'incorporazione del DNA del virus all'interno della cellula ospite, bloccando la trascrizione **[4]**.

Generalmente farmaci appartenenti a classi con meccanismo diverso vengono combinati tra loro, con il fine di migliorare la copertura del farmaco a possibili mutazioni o resistenze virali che inficerebbero sull'efficacia finale della terapia. Attualmente le strategie raccomandate per soddisfare le terapie HAART, sono quelle di combinare almeno due farmaci inibenti la trascrittasi inversa virale con un terzo farmaco appartenente ad un'altra classe di quelle descritte in precedenza.

3. LA NUOVA GENERAZIONE DI FARMACI

Il principale obiettivo da parte dei nuovi farmaci autorizzati in commercio o in fase di sperimentazione è quello di garantire una massima efficacia nel mantenimento dell'infezione, con il minor numero di rischi o effetti avversi associati alla loro somministrazione, ma anche di garantirne un'assunzione facilitata, garantendone durata nel tempo e una minor periodicità di controllo.

3.1 FOSTEMSAVIR

Tra i più recenti farmaci autorizzati all'immissione in commercio in Europa, datata 4 febbraio 2021, vi è il Fostemsavir, appartenente alla classe degli inibitori dell'adesione, individuato come farmaco di supporto ad altre terapie antiretrovirali, in adulti con infezioni multi-farmaco resistenti. Essendo un farmaco inibente l'adesione, è adatto alle prime fasi del ciclo di vita dell'HIV, con l'obiettivo di rallentare la progressione della malattia.

Trattasi di un profarmaco a rilascio prolungato assunto per via orale sottoforma di compressa, assorbito rapidamente a livello intestino mediamente in 2 ore e presenta una biodisponibilità assoluta del 26,9%, con emivita prossima alle 11 ore.

Biotrasformato in temsavir da fosfatasi alcalina nell'intestino tenue, per poi essere metabolizzato attraverso idrolisi dell'esterasi o ossidazione mediata da CYP3A4, agisce legandosi alla subunità gp120 della glicoproteina gp160 dell'envelope virale, inibendo selettivamente l'interazione tra virus e recettore cellulare CD4. [5]

Studi randomizzati e no, accompagnati da terapia di background ottimizzata hanno dimostrato l'efficacia del farmaco nel breve e nel lungo periodo, rispettivamente nella valutazione del numero di copie di HIV 1 RNA per ml di plasma in 24, 48 o 96 settimane. In particolare, confrontando i dati di numero di copie di HIV 1 RNA e conta delle cellule CD4+ basali, si è stabilito che quest'ultime sono incrementate alla settimana 24 di 41 cellule al mm³, alla settimana 48 di 64 cellule al mm³ e alla settimana 96 di 119 cellule al mm³, indicando una ricostruzione del sistema immunitario [6].

Effetti indesiderati sono generalmente quelli riscontrati anche in altre terapie anti-HIV come:

- Sindrome infiammatoria da immunricostruzione, riconducibile al primo periodo di istituzione della terapia antiretrovirale, dovuti ad un aumento di cellule immunitarie precedentemente sequestrate dal virus, in risposta a patogeni opportunisti asintomatici;
- Prolungamento del QTc, ossia dell'intervallo di tempo necessario al miocardio ventricolare per completare una completa depolarizzazione e seguente ripolarizzazione, quindi in pazienti con malattie cardiache pregresse o non curate;
- Incremento di enzimi epatici, in particolare delle transaminasi in pazienti presentanti coinfezione da epatite B o C.

3.2 IBALIZUMAB

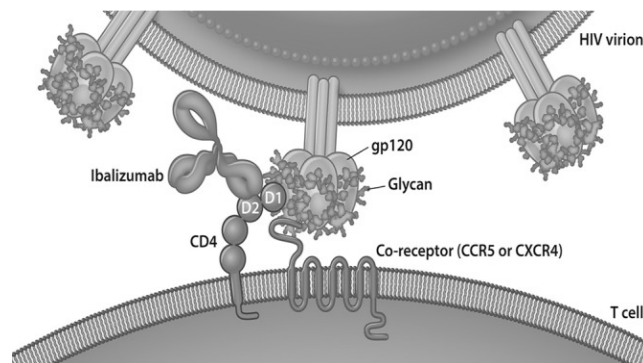
Il 26 settembre 2019 è stata autorizzata l'immissione in commercio di un anticorpo monoclonale, chiamato Ibalizumab, in grado di trattare pazienti con HIV multi-resistente, quindi, a casi patologici in cui le terapie standard sono insufficienti.

È un anticorpo monoclonale umanizzato appartenente alle immunoglobuline G di tipo 4 prodotto attraverso tecnologia del DNA ricombinante a partire da cellule di mieloma murino non secernenti, cellule utilizzate in campo biotecnologico anche nella produzione anticorpale terapeutica per altre patologie come sclerosi multipla, vedi daclizumab, o per sindromi emolitiche, come eculizumab.

La somministrazione del farmaco è di tipo parenterale invasivo, prevedendo infatti infusione endovenosa dalla durata compresa tra i 15 e i 30 minuti, con una prima dose di 2000 mg, definita anche di carico, supportata poi da dosi bisettimanali di mantenimento di 800 mg.

Ibalizumab lega i recettori CD4 sulla superficie delle cellule CD4+, impedendo l'ingresso delle particelle di HIV nel linfocita.

In particolare, esplica la propria funzione interagendo con un epitopo conformazionale situato nel dominio 2 extracellulare del recettore CD4 diverso da quello per il legame per le molecole MHC II di tipo 1, non interferendo quindi con le funzioni immunitarie mediate dalle cellule CD4. Tale legame impedisce al complesso Gp120-CD4 di interagire con CCR5 o CXCR4 prevenendo pertanto l'ingresso e la fusione virale. [7]



[Copyright](#) © 2019 American Society for Microbiology.

Lo studio preclinico del farmaco si è composto di tre fasi differenti, riconducibili alle varie fasi di screening, loading e periodo di mantenimento.

In questo studio i pazienti presentavano una carica virale elevata, superiore alle 1000 copie/ml con una terapia antiretrovirale già consolidata da almeno 6 mesi prima dell'inizio dello screening con connessa resistenza ad essa.

Nella prima fase, corrispondente alla prima settimana, sono stati studiati i comportamenti dei pazienti riceventi la propria corrente terapia, per poi nella seconda settimana, iniziare lo studio degli effetti di una prima iniezione intravenosa dell'anticorpo.

Dal quattordicesimo giorno al termine del trial, ossia la venticinquesima settimana, ai soggetti in esame è stata somministrata una terapia individuale ottimizzata, accompagnata da somministrazioni bisettimanali di Ibalizumab. Il primo controllo dell'efficacia riguardante il farmaco è avvenuto il giorno 14, a termine del periodo di loading in cui si è constatato già dopo una settimana una diminuzione di 100 copie/ml virali nel 60% degli individui, con l'83% dei casi con valori ridotti comunque di almeno 50 copie/ml.

I risultati finali invece hanno permesso di determinare l'efficacia a lungo termine, dopo 25 settimane di studio, determinando una netta diminuzione di copie virali in circolo, ossia il 43% di pazienti presentò una carica inferiore alle 50 copie/ml mentre il 50% si attestò su valori inferiori alle 200 copie/ml [8].

Possibili reazioni avverse dovute all'impiego di Ibalizumab, come per Fostemsavir, sono riconducibili a sindrome infiammatoria da immunoricostruzione, dovute da retiniti, infezioni micobatteriche o possibili polmoniti derivanti da patogeni opportunistici, oltre a possibili eruzioni cutanee riconducibili a reazioni di ipersensibilità da parte del sistema immunitario del paziente.

Inoltre, appartenendo alle immunoglobuline di classe G, è altamente sconsigliato in gravidanza, essendo in grado di attraversare la placenta.

Un grande vantaggio di questo Ibalizumab, trattandosi di un anticorpo monoclonale, è la scarsa tendenza ad interagire con altri farmaci in circolo presentando un'elevata affinità al proprio bersaglio.

3.3 CABOTEGRAVIR E RILPIRIVINA

La FDA inoltre ha approvato il 21 gennaio 2021 una formulazione a rilascio prolungato denominata Cabenuva ottenuta dall'associazione di un inibitore dell'integrasi e di un inibitore della trascrittasi inversa, studiato per il trattamento terapeutico dell'infezione da HIV-1 a lunga durata, divenendo anche il primo regime di questo genere ad essere autorizzato.

L'assunzione è indicata per il trattamento dell'infezione in caso di regime antiretrovirale stabile, in assenza di precedenti o attuali resistenze virali o a farmaci appartenenti alla stessa classe dei due componenti del formulato.

Cabenuva è il nome commerciale associato alla formulazione contenente cabotegravir (INSTI) e rilpivirina (NNRTI)

cabotegravir è un inibitore dell'integrasi dell'HIV agendo come ligando al sito attivo dell'enzima virale bloccando il trasferimento del filamento del DNA retrovirale, impedendo quindi anche l'inizio del ciclo di replicazione di HIV.

L'associazione dei due farmaci permette la contemporanea incapacità di conversione del filamento di RNA virale in DNA e la sua successiva integrazione.

La somministrazione del composto avviene attraverso iniezione intramuscolare a livello ventro-glutea, e prevede una fase di iniziazione in cui le somministrazioni devono essere effettuate mensilmente, per poi seguire una tabella posologica in

cui l'intervallo di somministrazione è bimensile. Inoltre, per verificarne la tollerabilità, sono state sviluppate delle compresse assumibili quotidianamente finché non sarà giunto il periodo di inizio della terapia.

Il complesso è stato soggetto ad un trial clinico randomizzato anche chiamato ATLAS o Long Acting Suppression, attraverso il quale sono stati studiati gli effetti a lungo termine del farmaco su pazienti maggiorenni, senza alcun fallimento virologico precedente, con terapia consolidata nei sei mesi precedenti al trial con un livello plasmatico di copie inferiore alle 50 per ml.

I partecipanti sono stati suddivisi casualmente in due gruppi, che rispettivamente continuavano la terapia attuale, anche definito di controllo, o venivano sottoposti a terapia a lungo termine.

Al gruppo sperimentale è stato somministrato un quantitativo pari a 30 mg di cabotegravir e 25 mg di rilpivirina orali per 4 settimane al fine di verificarne la sicurezza clinica.

Una volta terminata la fase di screening, lo studio prevedeva la somministrazione iniziale di 600 mg di cabotegravir e 900 mg di rilpivirina attraverso iniezione intramuscolare, per poi mantenerne il regime per 52 settimane, con iniezioni mensili.

Alla settimana 48 del trattamento sono stati raccolti i risultati che hanno permesso di determinare un'efficacia equivalente tra terapia orale e a lunga durata, che era l'obiettivo principale a conferma della nuova terapia.

Nella terapia a lunga durata d'azione, infatti i pazienti con valori inferiori alle 50 copie/ml sono stati il 92.5% mentre in quella orale il 95% [9].

Ai pazienti che hanno superato il trial ATLAS con successo, quindi con valori plasmatici inferiori alle 50 copie/ml è stata proposta una fase estensiva, in cui le somministrazioni di mantenimento avvenivano in periodi bimensili, in uno studio definito ATLAS-2M.

I soggetti furono confrontati con un gruppo di controllo assumente il farmaco in periodi mensili, e si venne a dimostrare la validità anche del trattamento bimensile in quanto differente da quello di controllo di una sola unità percentuale. [10]

Essendo un complesso, i possibili effetti avversi sono additivi; pertanto, riscontrabili sia singolarmente per i due farmaci ma anche condivisi dagli stessi, sebbene la maggior parte delle reazioni siano riconducibili alla via di somministrazione essendo dovute infatti a problematiche infiammatorie nel sito d'iniezione e all'aumento di peso.

Per quanto riguarda questo farmaco tra i più comuni effetti indesiderati, seppur lievi, sono stati segnalati disturbi riguardanti il sistema nervoso, come cefalea e ipertensione, ma anche disturbi gastrointestinali e cutanei, come nausea ed eruzione cutanea.

3.4 LENACAPAVIR

Tra i farmaci in via di sperimentazione, in particolare collocato nella fase 3 dei trial clinici, ossia in uno step in cui vengono controllati, su una coorte di pazienti portatori la patologia, gli effetti del farmaco con particolare attenzione all'insorgenza, frequenza e gravità degli effetti avversi, troviamo il Lenacapavir. Lenacapavir è un farmaco che esplica la propria funzione inibendo il capsido virale, il quale risulta essere particolarmente rilevante nell'integrazione genomica, in quanto deve attraversare la membrana nucleare della cellula attraverso i pori presenti su di essa. Il capsido del virus è costituito da una serie di monomeri proteici in grado di interagire con due particolari componenti della membrana nucleare, ossia la subunità 6 del fattore di specificità di scissione e poliadenilazione (CPSF6) e la nucleoporina 153 o Nup153. Lenacapavir esplica la propria funzione agendo competitivamente al capsido virale, esso contiene infatti un anello difluorobenzilico in grado di occupare gli stessi bersagli target a livello della membrana nucleare, impedendo in tal modo la penetrazione del core virale nel nucleo e la conseguente integrazione. [11]

Esso è sottoposto ad uno studio randomizzato in cui vengono confrontati tre coorti nelle quali rispettivamente i pazienti hanno ricevuto placebo, costituente il gruppo di controllo, mentre alle altre due coorti è stato inizialmente somministrato il farmaco per via orale accompagnato in una da terapie ottimizzate mentre nell'altra dalle precedenti terapie fallimentari.

A tutte e tre le coorti è stato poi somministrato, ad una distanza di 15 giorni, il farmaco per via subcutanea il quale poi dovrà essere somministrato ogni 6 mesi. I risultati di questo studio hanno permesso di determinare una netta diminuzione di numero di copie di HIV-1 per millilitro, di circa l'81% rispetto al numero rilevato al giorno 0, con prestazioni leggermente migliori per la coorte a cui è stata accompagnata da terapia ottimizzata.

Nel gruppo di controllo invece, la semplice somministrazione subcutanea ha dato comunque risultati positivi, ma la diminuzione del numero di copie si è attestata sul 17%.

Dagli studi non sono risultati particolari effetti avversi se non riconducibili alla tipologia di somministrazione, ossia per iniezione, causa di gonfiore o arrossamento che chiaramente non risultano essere fattori altamente discriminanti nei confronti della sicurezza del farmaco stesso.

Ulteriori effetti avversi riconducibili alla somministrazione su larga scala attualmente non sono identificabili, in quanto è necessaria un'indagine post-marketing ossia un periodo d'osservazione postumo all'immissione in commercio [12].

Tale farmaco risulterebbe, se approvato, un primo vero capostipite della nuova generazione dei farmaci antiretrovirali, in quanto unico in grado di garantire efficacia terapeutica con sole due somministrazioni l'anno.

4. UNO SGUARDO AL FUTURO

4.1 VEICOLAZIONE DEL FARMACO E NANOTECNOLOGIE

Un grande limite nella somministrazione dei farmaci antiretrovirali è dovuto alle caratteristiche chimiche dei farmaci stessi che ne alterano conseguentemente quelli che sono i processi farmacodinamici e farmacocinetici correlati.

Caratteristiche che limitano emivita o efficacia del farmaco solitamente sono riconducibili alla varia solubilità del farmaco nei diversi fluidi corporei, molto scarsa in terapie a lunga durata, associata anche a scarsa permeazione ematica con conseguente abbassamento di biodisponibilità, fattori controproducenti al fine di adottare trattamenti terapeutici a lungo termine.

Pertanto, di particolare importanza è stato lo sviluppo di nuove strategie somministrative basate su opportuni veicoli nanoparticellari sia con il fine di migliorare le caratteristiche farmacocinetiche del farmaco ma anche sul targeting specifico di questi ultimi.

Negli anni la formulazione dei medicinali ha visto l'adozione di diverse formulazioni al fine di superare i limiti legati a questi fattori.

Le prime tecniche adottate furono strettamente correlate alla scoperta e alle prime applicazioni stesse delle nanotecnologie, impieganti come primo veicolo medicinale i liposomi, vescicole funzionalizzate, come avvenne nella produzione di Zidovudine o AZT, conosciuto come uno dei primi farmaci per la terapia anti-HIV.

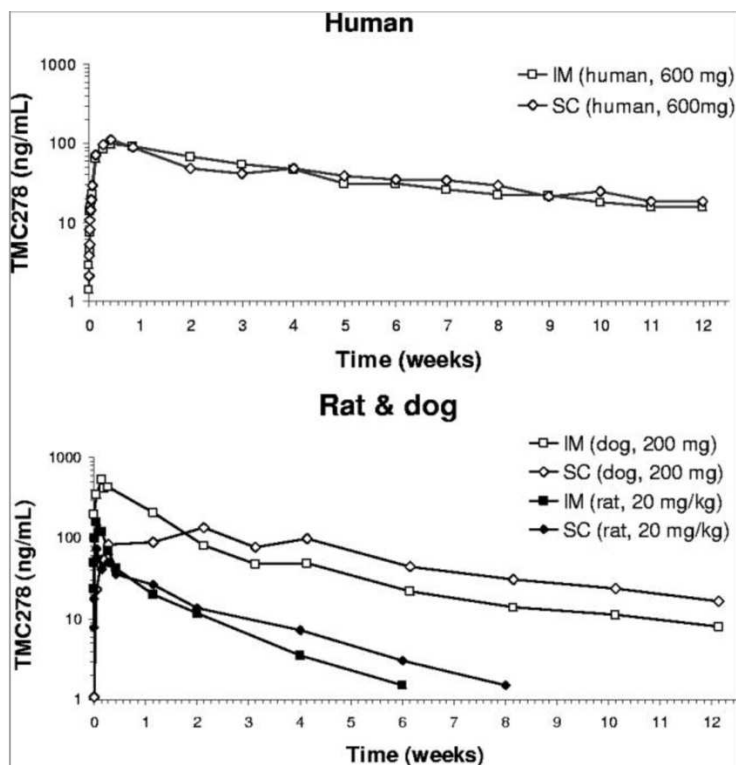
Le nuove frontiere nanotecnologiche hanno invece permesso di impiegare sia biopolimeri che polimeri artificiali nella produzione di farmaci dalle dimensioni ridotte, con maggior stabilità e targeting mirato grazie al fatto di garantire in volumi molto piccoli, aree superficiali molto elevate.

Esempi riguardanti applicazioni avanzate nanotecnologiche possono essere riscontrate nei principi attivi costituenti Cabenevra, ossia rilpivirina e cabotegravir.

Rilpivirina, necessitando di larghi volumi di carico, non poteva utilizzare vie di somministrazione utilizzate per altre terapie a lunga durata note, pertanto sono state sviluppate delle nanosospensioni, sfruttanti la scarsa solubilità del farmaco stesso, al fine di garantire una copertura e un rilascio modulato nel tempo.

Negli studi preclinici, adibiti alla identificazione di un'opportuna formulazione del farmaco sono stati inoltre comparate le curve di distribuzione in specie diverse individuando come rilpivirina nanosospesa rimanga in circolo tra i 2 e i 6 mesi, con differenze specie specifiche attribuite alla varia vascolarizzazione muscolare.

Ulteriore fattore a favore dell'impiego di nanosospensioni, è lo sfruttamento di macrofagi come ulteriore veicolo delle particelle dal sito d'iniezione ai tessuti linfoidi, sede principale del virus in fase replicativa attiva, fungendo quindi da riserve del farmaco non solo nel plasma ma anche nei tessuti linfonodali stessi.[13]



Copyright © 2010, American Society for Microbiology,
 Concentrazione nel plasma di rilpirivina o TMC278,
 sottoforma di nanosospensione

Altro impiego delle nanotecnologie è avvenuto nello studio di cabotegravir, farmaco descritto in precedenza, in grado di rivoluzionare le terapie anti-Hiv a causa della lunga durata d'azione associata ad esso.

Un particolare studio ha però preso in esame un ulteriore allungamento dell'emivita del farmaco, fino ad un anno, se formulato come profarmaco nanoestere lipofilo, pur mantenendo le caratteristiche farmacocinetiche dello stesso.

Lo studio è stato svolto su ceppi di topi e ratti, per poi proseguire in monociti umani, in particolare grazie all'iniziale indagine sui diversi ceppi animali si è riusciti a dedurre un miglioramento, ossia una prolungata concentrazione plasmatica fino a cento volte superiore a quella del farmaco non nanocristallizzato.

NM2CAB, nome attribuito al profarmaco modificato, inoltre richiederebbe un volume di iniezione minore essendo maggiormente concentrato, passando dai 200 mg/ml di cabotegravir base ai 400 mg/ml di cabotegravir cristallizzato.

Ulteriori fattori a favore della nano-applicazione, sono una maggiore permeazione a livello linfonodale e un mantenimento delle caratteristiche metaboliche che rendono invariate le peculiarità del farmaco, rimanendo invariata la propria affinità verso le principali classi citocromatiche, molto scarsa, invece generalmente responsabili della degradazione della maggior parte delle classi farmaceutiche. [14]

4.2 INGEGNERIA GENETICA: CRISPR/Cas9

Una nuova tecnologia, sviluppata dalla Excision BioTherapeutics, prevede l'impiego dell'ingegneria genetica per eradicare il DNA pro-virale dai genomi cellulari infetti.

Il farmaco in fase di sperimentazione, trial clinici di tipo I/II, si chiama EBT-101 e sfrutta la tecnologia CRISPR-Cas9, ossia un processo enzimatico tipico dei ceppi batterici, sfruttante la Cas9, un'endonucleasi, in grado di associarsi a due specifiche molecole di gRNA, o RNA guida, formando un complesso ribonucleoproteico avente come target siti specifici altamente conservati del genoma virale, guidati da carrier adeno-virali o AAV alla cellula. **[15]**

Nei batteri questo sistema funge da immunità adattiva nei confronti di possibili infezioni virali, pertanto il nuovo farmaco studiato, opportunamente ingegnerizzato, ha lo scopo di fornire all'enzima Cas9 un RNA guida in grado di ancorarla al DNA target, ossia al genoma infetto da HIV dove potrà esplicare la propria attività nucleasica, praticando 3 diverse incisioni nel frammento di HIV. Negli studi preclinici, svolti su topi umanizzati, è stata applicata una nuova strategia terapeutica definita LASER ART, o long-acting slow-effective release ART, al fine di attuare un modello associabile alla tecnologia CRISPR necessitante di un tempo prolungato per esplicare la propria funzione.

I risultati dello studio preclinico hanno permesso di determinare un'efficacia dal 60 all'80 % nell'eliminazione del DNA virale. **[16]**

L'obiettivo finale è quello di rendere HIV meno infettivo possibile, sebbene la permanenza di parti genomiche del virus non degradate siano ancora in esame durante questi primi trials, aventi come scopo principale l'indagine riguardante la sicurezza stessa del farmaco.

Infine, sebbene la percentuale di eradicazione del virus sia lontana da valori vicini al 100%, è necessario ricordare che si tratterebbe, nel caso superasse i vari trials clinici, del primo farmaco volto all'eliminazione del virus dall'organismo e non solo al mantenimento dell'infezioni in valori sicuri, potendo divenire quindi un vero capostipite nella cura di un'infezione difficilmente eliminabile con i farmaci attualmente a nostra disposizione.

5. CONCLUSIONI

Ancora oggi, una cura definitiva per il debellamento di HIV non è stata raggiunta, trattandosi di un virus difficilmente sradicabile essendo in grado di integrare il proprio genoma con quello delle cellule umane ospitanti.

Le nuove terapie hanno però permesso di rivoluzionare lo scenario derivante dall'infezione potendolo assimilare ad una malattia cronica, tale che le persone affette possano avere un'aspettativa di vita quasi sovrapponibile alla popolazione non portatrice HIV [17].

I nuovi approcci terapeutici, e i nuovi farmaci commercializzati hanno permesso infatti di garantire un mantenimento delle condizioni vitali del soggetto portatore, consentendogli di convivere con HIV diminuendo drasticamente un proseguo dell'infezione che, come descritto all'inizio dell'elaborato, può sfociare in una sindrome, l'AIDS, mortale per l'uomo.

Raggiunto l'obiettivo di garantire la sopravvivenza dei pazienti, attualmente la nuova sfida farmacologica è quella di garantire una semplificazione del trattamento.

I primi passi svolti in questa direzione sono stati quelli di introdurre più principi attivi, anche di farmaci con meccanismi d'azione differenti in un'unica compressa o iniezione in modo da facilitarne la somministrazione.

Obiettivo di non ultima importanza è anche l'aspetto della periodicità di assunzione del farmaco, tant'è che i farmaci di ultima generazione descritti in precedenza prevedono uno spettro d'azione prolungato nel tempo, con somministrazioni non più quotidiane ma mensili o addirittura semestrali.

Queste componenti se prese in esame nella loro collettività riescono a garantire al tempo stesso un'ottima copertura, più farmaci con meccanismi d'azione diversi possono garantire più vie di interazione col virus, ma anche una maggior facilità da parte del paziente di seguire la terapia a lui indicata, quindi di garantire un'aderenza maggiore altrimenti ostacolata dalla cronicità delle assunzioni o somministrazioni.

Le speranze però sono rivolte allo sviluppo della tecnologia CRISPR/Cas9 che diverrebbe una pietra miliare non solo nella cura della patologia, che è pur sempre l'obiettivo principale, ma anche nell'applicazione dell'editing genetico in organismi umani, aspetto non sempre accettato eticamente da molti.

BIBLIOGRAFIA

[1] <https://www.salute.gov.it/portale/hiv/dettaglioContenutiHIV.jsp?lingua=italiano&id=5210&area=aids&menu=vuoto>

[2] Dahlberg JE. An overview of retrovirus replication and classification. *Adv Vet Sci Comp Med*. 1988;32:1-35. doi: 10.1016/b978-0-12-039232-2.50005-0. PMID: 2847500.

[3] <https://www.salutelazio.it/il-trattamento-e-la-profilassi>

[4] <https://www.issalute.it/index.php/la-salute-dalla-a-alla-z-menu/h/hiv-trattamento>

[5] <https://go.drugbank.com/drugs/DB11796>

[6] KOZAL, Michael, et al. Fostemsavir in adults with multidrug-resistant HIV-1 infection. *New England Journal of Medicine*, 2020, 382.13: 1232-1243.

[7] <https://go.drugbank.com/drugs/DB12698>

[8] Emu, Brinda, Jeffrey Fessel, Shannon Schrader, Princy Kumar, Gary Richmond, Sandra Win, Steven Weinheimer, Christian Marsolais, and Stanley Lewis. "Phase 3 study of ibalizumab for multidrug-resistant HIV-1." *New England Journal of Medicine* 379, no. 7 (2018): 645-654.

[9] SWINDELLS, Susan, et al. Long-acting cabotegravir and rilpivirine for maintenance of HIV-1 suppression. *New England Journal of Medicine*, 2020, 382.12: 1112-1123.

[10] Overton ET, Richmond G, Rizzardini G, Jaeger H, Orrell C, Nagimova F, Bredeek F, García Delatoro M, Swindells S, Andrade-Villanueva JF, Wong A, Khuong-Josses MA, Van Solingen-Ristea R, van Eygen V, Crauwels H, Ford S, Talarico C, Benn P, Wang Y, Hudson KJ, Chounta V, Cutrell A, Patel P, Shaefer M, Margolis DA, Smith KY, Vanveggel S, Spreen W. Long-acting cabotegravir and rilpivirine dosed every 2 months in adults with HIV-1 infection (ATLAS-2M), 48-week results: a randomised, multicentre, open-label, phase 3b, non-inferiority study. *Lancet*. 2021 Dec 19;396(10267):1994-2005. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32666-0. Epub 2020 Dec 9. PMID: 33308425.

[11] <https://go.drugbank.com/drugs/DB15673>

[12] Dvory-Sobol H, Shaik N, Callebaut C, Rhee MS. Lenacapavir: a first-in-class HIV-1 capsid inhibitor. *Curr Opin HIV AIDS*. 2022 Jan 1;17(1):15-21. doi: 10.1097/COH.0000000000000713. PMID: 34871187.

- [13] Gauram, N., McMillan, J. M., Kumar, D., Bade, A. N., Pan, Q., Kulkarni, T. A., ... & Alnouti, Y. (2021). Lipophilic Nanocrystal Prodrug-Release Defines the Extended Pharmacokinetic Profiles of a Year-Long Cabotegravir. *bioRxiv*.
- [14] van 't Klooster G, Hoeben E, Borghys H, Looszova A, Bouche MP, van Velsen F, Baert L. Pharmacokinetics and disposition of rilpivirine (TMC278) nanosuspension as a long-acting injectable antiretroviral formulation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 May;54(5):2042-50. doi: 10.1128/AAC.01529-09. Epub 2010 Feb 16. PMID: 20160045; PMCID: PMC2863620.
- [15] L'editing del genoma e il sistema CRISPR/Cas9 *a cura del Gruppo di Lavoro FISV "Nuove tecnologie e scienze della vita" c/o Dip.to di Biologia e Biotecnologie Charles Darwin – Sapienza Università di Roma*
- [16] Dash, P.K., Kaminski, R., Bella, R. *et al.* Sequential LASER ART and CRISPR Treatments Eliminate HIV-1 in a Subset of Infected Humanized Mice. *Nat Commun* **10**, 2753 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10366-y>
- [17] Back D, Marzolini C. The challenge of HIV treatment in an era of polypharmacy. *J Int AIDS Soc*. 2020 Feb;23(2):e25449. doi: 10.1002/jia2.25449. PMID: 32011104; PMCID: PMC6996317.