

Questi incontri hanno visto la partecipazione, oltre che del personale del Centro Nazionale Malattie Rare dell'ISS, di molti ricercatori che svolgono la loro attività nell'ambito di altri Registri regionali delle malattie rare e dei registri regionali delle malformazioni congenite.

Le indicazioni scaturite da questa attività congiunta ISS-Regioni hanno fornito indicazioni utili per:

- sviluppare le attività di registrazione con un aumento del personale dedicato (due medici, uno statistico, un unità di personale tecnico), di mezzi strutturali e organizzativi;
- realizzare un nuovo software che permette la raccolta dei dati epidemiologici sulle malattie rare da parte dei centri di coordinamento Regionali.

È stata svolta e ultimata la fase di sperimentazione del software che alimenta il RNMR, che attualmente è disponibile per i centri regionali che decideranno di raccogliere dati epidemiologici sulle malattie rare attraverso questo sistema.

Per integrare nel RNMR anche le malformazioni congenite, che rappresentano una parte rilevante delle malattie rare è stata sviluppata la collaborazione con i registri delle malformazioni congenite attivi a livello regionale.

Questa collaborazione ha prodotto la pubblicazione del Rapporto ISTISAN 06/34 “Registro Nazionale Malattie Rare: malformazioni congenite e acido folico” (a cura di Anna Pierini, Fabrizio Bianchi, Paolo Salerno e Domenica Taruscio), nell'ambito del quale sono state prodotte misure epidemiologiche dei difetti congeniti sensibili all'acido folico utili per la programmazione sanitaria nazionale e il confronto internazionale.

Inoltre, sono state promosse altre iniziative volte a ottenere l'integrazione di flussi epidemiologici provenienti da fonti diverse dai presidi e centri di riferimento regionali della rete nazionale malattie rare (Schede di dimissione ospedaliera, Certificati di assistenza al parto, dati di mortalità, ecc.).

La collaborazione con le Associazioni di Pazienti e loro familiari ha permesso di realizzare e sviluppare nuovi progetti (es. Medicina Narrativa) e la seguente pubblicazione: Kodra Y, Morosini PR, Petrigliano R *et al.* “Access and quality of health and social care on rare diseases: patients' and caregivers' experiences”. *Ann Ig.* 2007;19(2).

Attività programmata 2007

Le attività del RNMR previste per il 2007 prevedono la piena operatività del software realizzato per sviluppare la raccolta e l'elaborazione di dati epidemiologici provenienti dai centri di coordinamento regionali presenti in tutte le Regioni e le Province autonome di Trento e Trieste.

Questa attività permetterà di aumentare la copertura della raccolta epidemiologica sul territorio nazionale e quindi renderà possibile la produzione di stime epidemiologiche affidabili per la programmazione sanitaria.

Inoltre, l'attività di raccolta dati del RNMR nel 2007 permetterà la realizzazione di studi combinati tra epidemiologia e biomedicina per indagini sui meccanismi patogenetici e valutazione di determinanti eziologici.

Saranno altresì mantenute e sviluppate le attività collaborative con i registri regionali dei difetti congeniti per la produzione di stime epidemiologiche sui difetti congeniti sensibili all'acido folico per la valutazione degli interventi di sanità pubblica intrapresi nel 2006 e da sviluppare nel 2007.

SARS

Il progetto di ricerca “Lotta alla SARS”, finanziato dal Ministero della Salute attraverso fondi assegnati dalla Commissione per la Ricerca Sanitaria per l’anno 2003-2004, è stato proposto dall’ISS in riconoscimento non solo della necessità di prepararsi a un’eventuale riemergenza di questa grave sindrome ma anche e soprattutto per la consapevolezza dell’importanza di studiare in maniera approfondita un gruppo di virus, i Coronavirus, francamente trascurato nel nostro Paese (e anche altrove) nonché per avviare studi più generali sulle infezioni virali respiratorie, in particolare per una loro rapida ed efficiente diagnosi, premessa quanto mai fondamentale per contrastare dette malattie. Sulla base di questi ragionamenti, sono state scelte ricerche proposte da Unità Operative che collettivamente e in maniera il più possibile integrata potessero affrontare la tematica in oggetto. Le proposte di ricerca includevano sia aspetti prettamente virologici e di patogenesi virale che finalità epidemiologiche, diagnostiche e terapeutiche, con condivisione di obiettivi di ricerca nei settori umani e veterinari, cosa di ovvia importanza per una malattia come la SARS, e più in generale per molte virosi respiratorie.

Resoconto attività 2006

Le ricerche sono iniziate attivamente solo agli inizi del 2004 e sono proseguite nel 2005 e 2006, soprattutto per la parte diagnostica e immunologica. Parecchie UO hanno già ottenuto significativi risultati, dimostrati anche da rilevanti pubblicazioni. Oltre a ciò, si vuole sottolineare qui il grande spirito di collaborazione e le sinergie già in essere nell’intero progetto, con grande scambio di tecnologie e approcci, collaborazioni e sinergie da cui ci si aspetta un forte progresso nelle ricerche entro quest’anno con il raggiungimento di molti degli obiettivi che le ricerche proposte si erano dati.

Nello specifico, fra i risultati già ottenuti che si ritiene debbano essere qui messe in luce, e all’ottenimento dei quali hanno contribuito tutte le Unità Operative, si segnala:

- La dimostrazione della capacità inibitoria dell’interferon di tipo I sulla replicazione del virus della SARS.
- La messa a punto e la validazione di metodi diagnostici avanzati, inclusi *microarrays* proteomici, per la SARS, altri Coronavirus umani e animali, nonché di altre virosi respiratorie rilevanti in clinica.
- La conoscenza approfondita della variabilità del genoma dei Coronavirus accoppiata all’ottenimento di antigeni ricombinanti del virus utili sia per studi diagnostici e di immuno-patogenesi.
- L’ottenimento di antigeni ricombinanti e anticorpi monoclonali da librerie di espressione fagica e il loro uso diagnostico.
- La capacità inibitoria di sostanze antinfiammatorie verso coronavirus umani e animali, con particolare riguardo a sostanze derivate dai prostanoici ciclopentenonici.

Tutti questi risultati sono stati pubblicati o sono in corso di pubblicazione.

Attività programmata 2007

Nel 2007 il progetto va a scadenza. Sarà eseguita una importante attività ricognitiva di tutte le ricerche eseguite e di tutte le pubblicazioni e altri prodotti generati dal progetto stesso. Un convegno finale discuterà criticamente tutti i dati e le prospettive di applicazioni in campo sanitario.

Sistema Epidemiologico Integrato dell'Epatite Virale Acuta (SEIEVA)

Lo scopo principale del SEIEVA è di promuovere a livello locale e nazionale l'indagine e il controllo sull'Epatite Virale Acuta (EVA). Attraverso l'integrazione di questionari epidemiologici con i risultati di laboratorio, i dati provenienti dalla sorveglianza possono essere utilizzati per la stima del contributo relativo dei diversi fattori di rischio. Ciò permette anche la definizione di misure preventive alle quali dare priorità e il monitoraggio degli effetti dei diversi programmi di prevenzione. Attraverso l'aggregazione dei dati è possibile una migliore conoscenza dell'epidemiologia dell'epatite a livello nazionale.

— Obiettivi specifici

- Notifica dei casi differenziata per tipo specifico di epatite virale acuta.
- Epidemiologia descrittiva dell'epatite virale acuta tipo specifico, con particolare riferimento all'incidenza per data di insorgenza, luogo, età e sesso.
- Precoce individuazione di focolai epidemici.
- Valutare la proporzione dei casi di ciascun tipo di epatite acuta esposti a fattori di rischio noti.
- Per ciascun tipo di epatite virale, studiare nel tempo le variazioni dei rischi relativo e attribuibile associati a particolari esposizioni.
- Definire appropriate strategie di controllo basate sull'importanza relativa, a livello locale, dei diversi fattori di rischio.

— Metodo generale

- Intervista dei casi usando un questionario standardizzato di raccolta dei dati (Scheda SEIEVA) contenente informazioni demografiche e sui fattori di rischio; l'intervista ha luogo prima che sia noto il tipo di epatite.
- Registrazione dei marker sierologici disponibili.
- Invio al centro trasfusionale della Scheda Trasfusioni quando il caso riferisce di essere stato trasfuso nei sei mesi precedenti la malattia.
- Ove necessario, soprattutto in caso di epidemie, verranno condotti studi analitici per valutare il ruolo dei diversi fattori di rischio, utilizzando l'approccio caso-controllo e, quando possibile, l'approccio di coorte.

— Metodo dettagliato

Tutto il sistema di sorveglianza si basa sulla collaborazione tra l'Istituto e le ASL che decidono volontariamente di aderire al SEIEVA. Attualmente, le ASL che partecipano coprono approssimativamente il 57% della popolazione italiana. Quando un caso di EVA viene notificato, il responsabile della sorveglianza della ASL contatta l'ospedale o il medico curante (nel caso di pazienti non ospedalizzati) per ottenere informazioni circa la conferma diagnostica e gli esiti della ricerca dell'antigene di superficie del virus B (HBsAg), delle IgM anti-HBc, delle IgM anti-HAV, dell'anti-HCV e dell'anti-Delta. Successivamente alla notifica di una epatite virale, ciascun caso è intervistato da un assistente sanitario o da un medico. Per raccogliere i risultati dell'intervista viene usato un questionario standardizzato: oltre alle informazioni demografiche, il questionario comprende domande sui fattori di rischio parenterali, nei sei mesi precedenti l'insorgenza della malattia, e sui fattori di rischio oro-fecali nelle sei settimane precedenti. Una volta completata l'intervista, vengono registrati sul questionario i risultati dei test di

laboratorio. Se l'intervistato riferisce di essere stato trasfuso, verranno richieste informazioni al Centro Trasfusionale mediante una apposita scheda. Tutti i questionari compilati sono alla fine inviati al Centro di coordinamento per essere immessi nell'apposito database per l'elaborazione. Quando si verificano focolai epidemici viene intrapresa un'indagine *ad hoc* per identificare le possibili fonti di rischio e, usando uno studio appositamente disegnato, per testare le ipotesi sul modo di trasmissione dell'infezione. Per la distribuzione dei fattori di rischio si è utilizzata una definizione di caso che tiene conto delle IgM anti-HBc e della positività per anti-HCV. Per il calcolo dei tassi di incidenza, il denominatore utilizzato è costituito dalla somma delle popolazioni delle singole ASL che aderiscono al SEIEVA; la popolazione divisa per fasce di età viene segnalata da ogni ASL al Centro nazionale presso il Reparto di Epidemiologia Clinica e linee guida al momento dell'adesione.

Resoconto attività 2006

Nel corso del 2006 è proseguita l'attività di routine della Sorveglianza delle Epatiti Acute Virali (SEIEVA), che era iniziata nel 1985 ad opera del Reparto di Epidemiologia Clinica dell'ISS; questa attività routinaria prevede la raccolta di tutti i casi di epatite virale acuta notificati dalle Aziende Sanitarie Locali partecipanti, in maniera volontaria alla sorveglianza.

Alla fine del 2006 il numero delle ASL che inviano dati al SEIEVA è di 148, più del 60% della popolazione italiana.

Attraverso il sito internet dell'ISS sono stati diffusi i dati di incidenza dei diversi tipi di epatite e i dati di prevalenza dei fattori di rischio relativi all'anno 2005.

– Epatite B in vaccinati

Attraverso l'archivio del SEIEVA si stanno raccogliendo sieri di soggetti con epatite acuta di tipo B che riportavano, sulla scheda epidemiologica, di essere stati vaccinati contro questo tipo di epatite. Su questi soggetti è in corso la ricerca di mutanti del virus nelle regioni "S", "pre-S", "core" e "pre-core" (*immune escape mutants*).

– Epatite Delta

Utilizzando i dati provenienti dall'archivio, è stata eseguita una elaborazione per descrivere l'andamento dell'epidemiologia dell'epatite Delta in Italia negli ultimi dieci anni.

– Epatite B e C negli operatori sanitari

Attraverso l'archivio SEIEVA sono stati analizzati i dati di incidenza delle epatiti B e C negli operatori sanitari, per verificare l'esistenza di un eccesso di rischio in questo gruppo di popolazione.

– Epatite acuta B

Sono stati raccolti sieri sequenziali di 108 pazienti con epatite acuta B per la caratterizzazione molecolare del virus.

Attività programmata 2007

Nel corso del 2007 proseguirà la raccolta di casi di epatite virale acuta.

A partire dal mese di maggio verranno sistemati assemblati ed elaborati i dati relativi al 2006 provenienti dalle diverse ASL, e i risultati in termini di incidenza e prevalenza dei diversi fattori di rischio verranno pubblicati sul sito internet del SEIEVA.

– *Epatite B in vaccinati*

Proseguirà la raccolta e analisi di sieri provenienti da casi con epatite acuta di tipo B che riportavano la vaccinazione contro questo tipo di epatite.

Nel corso del 2006 è prevista l'inizio di una "sperimentazione" e messa a punto che porterà a una sostanziale modifica nel sistema di raccolta dati. Durante l'anno verrà infatti costruita una procedura di inserimento delle schede epidemiologiche del SEIEVA attraverso un apposito sito web. Questo sistema permetterà di ricevere i dati in tempo reale e, attraverso i grafici e le tabelle previste dal sito, permetterà di evidenziare tempestivamente eventuali focolai epidemici.

– *Epatite B acuta*

Verranno analizzati i dati epidemiologici e sierologici di 108 casi di epatite acuta B.

– *Copertura vaccinale del personale sanitario*

Verrà condotto uno studio sulla copertura vaccinale antiepatite B di un campione di operatori sanitari di sette ospedali italiani.

– *Incidenza dell'infezione da HCV*

Verrà studiato l'incidenza di HCV nei tossicodipendenti con uso problematico di stupefacenti afferenti a 23 Sert distribuiti in varie regioni italiane.

Sistema per l'assicurazione della qualità

L'ISS, nell'adempimento di gran parte dei compiti istituzionali che gli vengono attribuiti, deve seguire un insieme di regole e procedure che assicuri il corretto funzionamento dei Dipartimenti e dei Servizi fornendo un'evidenza esterna obiettiva della qualità del lavoro svolto.

In altri termini, l'Istituto deve applicare il Sistema per l'Assicurazione della Qualità (SAQ). Tale Sistema – definito e controllato in maniera dinamica – è l'insieme di azioni pianificate e sistematiche necessarie per garantire che le attività da esso controllate soddisfino determinati requisiti di qualità.

È vantaggioso che l'applicazione del SAQ sia effettuata in accordo con la normativa tecnica vigente (norme delle famiglie UNI EN ISO 9000 e UNI EN 45000 e versioni successive). L'applicazione del sistema è indispensabile, tra l'altro, per lo svolgimento dell'attività istituzionale di cui al DL.vo 30 giugno 1993, n. 267. Tale attività, infatti, attribuisce all'ISS ulteriori compiti attinenti alla sanità pubblica, quali quello di accreditamento dei laboratori di prova e quello di certificazione di produttori e di prodotti.

Da quanto sopra esposto, appare chiaro che, nella sua globalità, il processo di sviluppo di un SAQ richiede un grande impegno per essere messo in opera e un'attenta conduzione per poter mantenere gli standard richiesti. Esso considera numerosi aspetti particolari e prevede, come logica sequenza temporale, in prima istanza un coinvolgimento delle strutture dell'Istituto più direttamente deputate alla erogazione di prestazioni.

In tal senso, il programma prevede, come obiettivo generale, l'adeguamento delle strutture, delle apparecchiature, delle risorse umane, delle procedure operative di controllo e del *modus operandi* del personale, così come previsto dal Sistema che assicura le corrette procedure da adottare nei controlli ufficiali.

Questo processo, tuttavia, richiede ancora un impegno notevole di uomini e mezzi perché possa raggiungere un accettabile livello, anche se lo sforzo può essere articolato in passi successivi.

In particolare sono stati già svolti i seguenti punti:

- è stato attivato un Gruppo di Lavoro che ha avviato il processo di preparazione dei Manuali di Qualità dei Laboratori e delle necessarie Procedure Operative Standard;
- sono stati svolti gli audit annuali dei laboratori coinvolti nel programma di mutuo riconoscimento europeo per il farmaco umano;
- è stato nominato il Responsabile dell'assicurazione di qualità;
- è stata emanata la politica della Qualità dal Presidente dell'Istituto;
- sono pronti in bozza il manuale della qualità, alcune procedure standard e altri documenti della Qualità per la gestione e il controllo del Sistema.

Resoconto attività 2006

Come già illustrato nei resoconti degli anni scorsi negli anni precedenti si è definito in modo parziale un SAQ, in quanto sono state realizzate le strutture della qualità in alcune strutture per le quali ciò era particolarmente urgente e necessario.

Le attività che sono state svolte da parte dei membri del gruppo dell'Assicurazione di Qualità dell'Istituto sono state:

- consulenza ai gruppi che ne hanno fatto richiesta;
- organizzazione e realizzazione di un corso sull'assicurazione della qualità a personale interno dell'Istituto (lo stesso corso è stato ripetuto su richiesta due volte);
- pubblicazione di una linea guida dal titolo "Linee guida per l'attuazione di un sistema di assicurazione della qualità in un laboratorio di prova".

Attività programmata 2007

Per l'anno 2007 è previsto il proseguimento e un possibile ampliamento delle attività svolte nel 2006.

Resta comunque la necessità di prestare attenzione al fatto che la definizione di un sistema di assicurazione della qualità e la necessità di operare in qualità è richiesta sempre più frequente e pressante.

Solidarietà contro l'AIDS nei Paesi in via di sviluppo

Il programma ESTHER, attraverso programmi di *partnership* tra strutture italiane impegnate nella lotta all'AIDS e ospedali africani, vuole favorire il trasferimento di conoscenze, professionalità, *know out* specifici nel campo dell'AIDS. Inoltre i finanziamenti collegati sono finalizzati all'acquisizione di beni e servizi relativi alla cura dell'AIDS. Sono programmati corsi di formazione per personale sanitario, interventi per migliorare l'accesso alla terapia, del VCT, e della diagnostica.

Resoconto attività 2006

Il Ministero della Salute ha stanziato, per il biennio 2004-2006, un milione di euro per il proseguimento e potenziamento del programma di solidarietà contro l'AIDS nei Paesi in via di sviluppo. Parte cospicua del contributo è stata utilizzata per finanziare, nell'anno 2005-2006, 32 centri clinici italiani. Le unità operative, dieci in più rispetto al programma del biennio 2002-2004, sono attivi in 16 Paesi in via di sviluppo.

Le attività poste in essere dai centri clinici italiani sono state finalizzate alla predisposizione di programmi formativi con lo scopo di trasferire le conoscenze e le tecnologie in campo scientifico e di fornire un supporto sanitario al personale locale.

L'ISS, in qualità di coordinatore del progetto, ha monitorato, attraverso una serie di missioni e la valutazione delle relazioni annuali presentate dai centri, la realizzazione delle attività programmate dalle unità sanitarie già stanziate in loco.

Attività programmata 2007

Per il 2007 il Ministero della Salute ha stanziato 400.000 € per permettere il rifinanziamento ai centri clinici partecipanti al programma al fine di consentire la prosecuzione delle attività in corso presso le strutture sanitarie in Africa.

Il progetto Esther prevede il mantenimento dei programmi di scambio e di gemellaggio esistenti nella rete Esther Italia, il potenziamento della ricerca clinica operativa e il miglioramento della monitorizzazione dei risultati.

Lo scopo della convezione, quindi, è di implementare le iniziative già previste dai precedenti accordi di collaborazione tra ISS e Ministero della Salute e di prevedere il coinvolgimento del Ministero degli Esteri nello svolgimento delle attività in Africa.

Inoltre, sono previsti incontri con altri Paesi europei al fine di rafforzare alleanze europee che consentano di offrire una professionalità più elevata in campo medico, e garantire così l'implementazione di centri di qualità in Africa.

Sperimentazione cliniche di vaccini contro l'HIV/AIDS

L'inesorabile diffusione dell'infezione da HIV, che conta 45 milioni di infettati nel mondo, e il numero sempre maggiore di decessi per AIDS soprattutto nei Paesi in via di sviluppo evidenziano l'urgenza della messa a punto di un vaccino sicuro ed efficace. Gli approcci vaccinali studiati negli ultimi 20 anni al fine di bloccare l'infezione da HIV-1, hanno, o hanno avuto, come principale bersaglio le proteine strutturali di HIV-1 e, quasi esclusivamente, quelle del rivestimento esterno (*envelope*, ENV), con l'obiettivo di indurre un'immunità sterilizzante in grado di proteggere dall'entrata del virus la cellula bersaglio. Tuttavia, l'estrema variabilità del virus proprio in questi antigeni di superficie nelle differenti aree geografiche, ma anche da individuo ad individuo e nello stesso individuo nel tempo, è alla base degli insuccessi finora conseguiti. Più recentemente, si è fatta strada l'ipotesi secondo la quale se, allo stato attuale delle conoscenze, è impossibile prevenire l'infezione della cellula da parte dell'HIV-1, potrebbe comunque essere possibile controllare la replicazione del virus dopo la sua entrata nelle cellule e, pertanto, bloccare l'evoluzione dell'infezione e, conseguentemente, lo sviluppo di malattia.

Il Centro Nazionale AIDS ha basato i propri studi su quest'ultimo razionale, indirizzando la ricerca su una componente virale che fosse prodotta subito dopo l'entrata del virus nella cellula, che avesse un ruolo fondamentale nella replicazione del virus, che fosse immunogenica e che fosse conservata tra i vari sottotipi di HIV-1. Questi requisiti corrispondevano a quelli posseduti dalla proteina regolatoria Tat di HIV-1. In studi preclinici nelle scimmie, è stato dimostrato che la proteina Tat, nella sua forma biologicamente attiva, è innocua e induce una risposta immune specifica in grado di controllare la replicazione del virus e di bloccare lo sviluppo della malattia.

Sulla base di questi risultati l'ISS ha sponsorizzato la sperimentazione clinica di Fase I, sia per l'approccio preventivo (nell'individuo sano) che per quello terapeutico (nell'individuo sieropositivo) del vaccino anti-HIV/AIDS basato sulla proteina ricombinante Tat.

I trial clinici di Fase I multicentrici, controllati con placebo e randomizzati in doppio cieco, sono stati condotti in quattro centri clinici italiani (Ospedale San Raffaele di Milano, Ospedale San Gallicano di Roma, Policlinico Umberto I di Roma e Ospedale Spallanzani di Roma), allo scopo di valutare l'innocuità (obiettivo primario) e l'immunogenicità (obiettivo secondario) del vaccino basato sulla proteina Tat, in 20 volontari HIV-1 negativi non appartenenti a categorie ad alto rischio (protocollo preventivo), e in 27 volontari HIV-1 positivi, appartenenti alla categoria clinica A (secondo la classificazione CDC di Atlanta) con un valore di linfociti T CD4+ >400/mL e un livello di viremia plasmatica <50.000 copie/mL (protocollo terapeutico). Il vaccino (ai dosaggi di 7.5, 15 e 30 mg) o il placebo è stato somministrato per via sottocutanea in associazione con l'adiuvante Alum, o per via intradermica senza adiuvante, nelle settimane 0, 4, 8, 12 e 16.

I risultati ottenuti indicano che il vaccino è sicuro e immunogenico avendo indotto sia anticorpi che risposte cellulari specifiche, confermando il pieno raggiungimento degli obiettivi (primario e secondario) prefissati. È pertanto necessario proseguire rapidamente nella realizzazione di trial clinici di Fase IIA e IIB del vaccino Tat, che verranno condotte su migliaia di volontari sieronegativi ad alto rischio di infezione e volontari infettati in differenti stadi di progressione della malattia, sottoposti a differenti regimi terapeutici. Nell'ambito di tali sperimentazioni saranno realizzate ulteriori valutazioni di innocuità e di immunogenicità dei candidati vaccinali. In particolare, la risposta immune specifica indotta dalla vaccinazione sarà valutata come segue:

- *Immunità umorale*: determinazione e titolazione di IgG, IgA and IgM specifiche; mappatura degli epitopi B-cellulari; valutazione della attività neutralizzante degli anticorpi identificati; *cloning* e caratterizzazione di cellule B specifiche; *microarray*.
- *Immunità cellulo-mediata*: risposta linfoproliferativa; determinazione della risposta CTL; mappatura degli epitopi T- cellulari; *cloning* e caratterizzazione di cellule T specifiche; *microarray*.
- *Immunità naturale*; analisi della produzione di chemochine e alpha-defensine; determinazione dell'attività NK.

Il programma di sviluppo clinico prevede inoltre la sperimentazione (Fase I) di vaccini innovativi basati sulla combinazione di Tat ed Env, con particolare riferimento a una modificazione di quest'ultima che ne comporta l'esposizione di epitopi conservati (deltaV2 Env). Tali combinazioni vaccinali sono state sviluppate nell'ambito dei progetti AVIP, VIAV e ISS/Chiron. In parallelo, si intende ottimizzare le formulazioni vaccinali tramite l'utilizzo di micro/nanoparticelle per la veicolazione dell'immunogeno, al fine di ottenere una maggiore stabilità del vaccino, ampliandone quindi le potenzialità applicative. Saranno condotte, pertanto, sperimentazioni cliniche con il vaccino Tat legato a questi nuovi sistemi di delivery, che sono stati sviluppati nell'ambito del programma ICAV.

Resoconto attività 2006

Le strategie utilizzate finora al fine di allestire un vaccino efficace contro l'HIV si sono basate sull'utilizzo di proteine del rivestimento esterno del virus (*envelope*), allo scopo di indurre anticorpi neutralizzanti capaci di bloccare l'entrata del virus nelle cellule. Questi approcci sono falliti a causa dell'elevata variabilità virale, soprattutto delle proteine dell'*envelope*. Il CNAIDS ha perseguito nuovi approcci vaccinali, mirati alla induzione di un'immunità capace di controllare la replicazione virale e impedire l'insorgenza e progressione della malattia, e i cui bersagli sono rappresentati da proteine del virus con un ruolo chiave nella regolazione della replicazione virale. Tali requisiti corrispondono a quelli posseduti dalla proteina Tat. Sulla base di questo razionale e dei risultati ottenuti dagli studi preclinici, l'ISS ha sponsorizzato e condotto la sperimentazione clinica di Fase I, sia per l'approccio preventivo

(nell'individuo sano) che per quello terapeutico (nell'individuo sieropositivo) del vaccino anti-HIV/AIDS basato sulla proteina ricombinante Tat biologicamente attiva.

I trial clinici di Fase I multicentrici, controllati con placebo e randomizzati in doppio cieco, sono stati condotti in quattro centri clinici italiani (Ospedale San Raffaele, Milano; Ospedale San Gallicano, Roma; Policlinico Umberto I, Roma; Ospedale Spallanzani, Roma), allo scopo di valutare l'innocuità (obiettivo primario) e l'immunogenicità (obiettivo secondario) del vaccino basato sulla proteina Tat, in volontari HIV-1 negativi non appartenenti a categorie ad alto rischio (protocollo preventivo), e in volontari HIV-1 positivi, appartenenti alla categoria clinica A (secondo la classificazione CDC di Atlanta) con un valore di linfociti T CD4+ >400/mL e un livello di viremia plasmatica <50.000 copie/mL (protocollo terapeutico). Il vaccino Tat (ai dosaggi di 7.5, 15 o 30 mg) o il placebo è stato somministrato per via sottocutanea in associazione con l'adiuvante Alum, o per via intradermica senza adiuvante, nelle settimane 0, 4, 8, 12 e 16.

Tutti i volontari arruolati (20 per il protocollo preventivo e 27 per il protocollo terapeutico) hanno ricevuto le cinque immunizzazioni previste dai protocolli clinici e hanno completato la fase di trattamento (24 settimane) e di follow up (48 settimane).

I risultati ottenuti indicano che il vaccino è sicuro e immunogenico, avendo indotto la produzione di anticorpi specifici in tutti i volontari immunizzati (100%) e risposte cellulari specifiche nel 93% degli individui sieronegativi e nell'83% degli individui sieropositivi, confermando il pieno raggiungimento degli obiettivi (primario e secondario) prefissati e sostenendo il rapido passaggio alle fasi successive di sperimentazione clinica.

Allo scopo di valutare il perdurare della risposta immunitaria umorale e cellulare specifica nei volontari che hanno partecipato al trial clinico di fase I del vaccino basato sulla proteina Tat biologicamente attiva è stato avviato uno studio osservazionale (sia per il protocollo preventivo che per quello terapeutico) durante il quale i volontari verranno controllati ogni sei mesi per ulteriori tre anni. I risultati di tale studio saranno essenziali per il disegno di futuri trial clinici di Fase II, particolarmente in riferimento alla definizione delle condizioni ottimali per immunizzazioni di richiamo. Tale studio verrà condotto secondo le Norme di Buona Pratica Clinica (DM del 15/07/1997) in tre centri clinici italiani (Ospedale San Raffaele di Milano, Ospedale San Gallicano di Roma e Ospedale Spallanzani di Roma).

Attività programmata 2007

Il CNAIDS ha sviluppato un vaccino innovativo contro l'HIV/AIDS basato sulla proteina Tat biologicamente attiva. I risultati ottenuti dalla sperimentazione clinica di Fase I preventiva e terapeutica indicano che il vaccino è sicuro e immunogenico e permettono il passaggio alle fasi successive di sperimentazione clinica (fase IIA e IIB). Il programma di sviluppo clinico prevede inoltre la sperimentazione di vaccini innovativi basati sulla combinazione della proteina Tat con proteine virali strutturali, con particolare riferimento a una modificazione della proteina dell'*envelope* virale che ne comporta l'esposizione di epitopi conservati (DV2 Env), sviluppata nell'ambito dei progetti AVIP, VIAV e ISS/Chiron. Si intende inoltre ottimizzare le formulazioni vaccinali tramite l'utilizzo di micro/nanoparticelle, sviluppate nell'ambito del programma ICAV, per la veicolazione dell'immunogeno, al fine di ottenere una maggiore stabilità del vaccino. Le sperimentazioni cliniche saranno sviluppate come segue e finanziate dal Ministero della Salute per le sperimentazioni in Italia, e dal Ministero degli Affari Esteri per la sperimentazione in Sud Africa.

- *Studio osservazionale relativo ai trial clinici di Fase I del vaccino Tat*
Monitoraggio della persistenza della risposta immune nei volontari che hanno partecipato al trial di fase I (preventivi e terapeutici) con la proteina ricombinante Tat.

- *Trial clinici (preventivo e terapeutico) di Fase IIA del vaccino Tat*
Conduzione di trial clinici di fase IIA per la valutazione della sicurezza e immunogenicità del vaccino su volontari sieronegativi ad alto rischio di infezione e su volontari infettati sottoposti a differenti regimi terapeutici al fine di valutare le interazioni tra la terapia antiretrovirale e la vaccinazione, in preparazione dei protocolli clinici delle fasi IIB.
- *Preparazione dei trial clinici di Fase IIB (proof of concept di efficacia)*
Tali trial permetteranno la valutazione delle risposte immuni al vaccino su migliaia di volontari e l'ottenimento delle prime indicazioni di efficacia. Il trial preventivo sarà condotto in Sud Africa in popolazioni ad elevata incidenza e prevalenza di infezione. Il trial terapeutico sarà condotto in Italia in popolazioni di pazienti in differenti stadi di progressione della malattia sottoposti a differenti regimi terapeutici.
- *Trial clinici di Fase I (preventivo e terapeutico) del vaccino combinato Tat/Env*
Valutazione della sicurezza e dell'immunogenicità del vaccino basato sulla combinazione delle proteine Tat e DV2 Env di HIV. I componenti di tale formulazione vaccinale sono stati già testati in trial clinici di fase I nell'ambito di sperimentazioni cliniche sponsorizzate e condotte dall'ISS (Tat) e dalla Novartis (DV2 Env).
- *Preparazione dei trial clinici di Fase I (preventivo e terapeutico) del vaccino Tat coniugato a micro/nanoparticelle*
Tali trial saranno preparati e condotti al fine di valutare la sicurezza e l'immunogenicità della formulazione vaccinale basata sull'utilizzo di micro/nanoparticelle per la veicolazione della proteina Tat. Tale formulazione è in grado di garantire una maggiore stabilità dell'immunogeno anche a temperatura ambiente, aspetto di particolare importanza nella conduzione di trial clinici nei Paesi in via di sviluppo.

Studio sull'efficacia, sulla sicurezza e sugli esiti delle tecniche di procreazione medicalmente assistita

Valutazione dell'efficacia, sicurezza ed esiti delle tecniche di PMA in dieci centri rappresentativi del panorama italiano e creazione di un database per condurre analisi epidemiologiche sulla efficacia e sicurezza ed esiti delle tecniche stesse.

Resoconto attività 2006

- Arruolamento dei centri che hanno già partecipato all'indagine e raccolta dati del precedente progetto negli anni 2003/2005.
- Invio della bozza del protocollo dello studio ai centri partecipanti.
- Riunioni del gruppo di studio presso l'ISS.
- Condivisione e approvazione della bozza del protocollo e stesura del protocollo definitivo.
- Affidamento a ciascun centro o unità operativa partecipante allo studio di un aspetto di approfondimento sulle complicanze e sugli esiti dell'applicazione delle tecniche di riproduzione (rischio di iperstimolazione durante la terapia farmacologica, abortività gemellarità gravidanze multiple) e sulle differenti prassi attuate con particolare attenzione a quelle modificate dopo l'entrata in vigore della legge 40/2004 (percentuali di fecondazione ovocitaria, numero di embrioni trasferiti).

- Preparazione del software per l'immissione dei dati delle coppie arruolate.

Attività programmata 2007

- Invio del software elaborato ai centri partecipanti.
- Utilizzo per ogni singolo centro del software elaborato dall'ISS per l'immissione dei dati dei trattamenti di riproduzione assistita svolti dai centri nel 2005.
- Recupero del follow up dei nati a seguito dei trattamenti effettuati presso i centri nell'anno 2005.
- Invio da parte dei centri all'ISS dei dati richiesti dal protocollo.
- Controllo ed elaborazione da parte dell'ISS dei dati ricevuti dai centri.
- Comparazione e analisi dei dati relativi all'anno 2005 con quelli già ricevuti nell'ambito dello studio precedente, riferiti all'anno 2003.

Sviluppo di modelli murini speciali (SCID, KNOCK-OUT e Transgenici) per lo svolgimento di progetti di ricerca di interesse sanitario

I piccoli animali da laboratorio e, in modo particolare i topi, rappresentano uno strumento fondamentale per lo studio di sistemi biologici complessi, come quelli legati alla funzione di organi e sistemi, e per la verifica della trasferibilità delle conoscenze ottenute *in vitro* verso la pratica clinica. La maggiore facilità di stabulazione, i costi ridotti, la possibilità di utilizzare un maggiore numero di animali per ottenere risultati statisticamente significativi costituiscono alcuni dei vantaggi di questi modelli sperimentali ai quali, di recente, si sono aggiunti quelli legati all'uso di topi immunodeficienti, knock-out e transgenici.

I topi knock-out e transgenici sono il frutto delle più avanzate tecniche di biologia applicate alla creazione di ceppi murini cui è stato sottratto o aggiunto un determinato gene e costituiscono uno strumento ormai irrinunciabile per lo studio *in vivo* del ruolo di specifici geni nella regolazione o nella disfunzione di determinate attività fisiologiche.

I topi affetti da una severa immunodeficienza combinata (topi SCID) consentono l'impianto e l'attecchimento di tessuti altrimenti non istocompatibili e, in particolare, di tessuti e cellule umani, fornendo, così, l'opportunità di creare chimere uomo-topo utili per eseguire *in vivo* studi di fisio-patologia e farmacodinamica umana. Nel modello SCID è, inoltre, possibile ricostruire il sistema immunitario umano per valutare la risposta immune a vaccini dedicati all'uomo.

La stabulazione di questi di topi richiede condizioni stringenti di sterilità e controlli particolari poiché l'assenza del sistema immunitario rende questi animali particolarmente suscettibili ad infezioni batteriche o virali. Lo stabulario/laboratorio speciale per il mantenimento e la sperimentazione su topi SCID del nostro Istituto è stato utilizzato in questi anni da diversi gruppi dell'ISS per progetti di ricerca in settori differenti, che vanno dall'AIDS all'oncologia sperimentale, dalle neuroscienze all'immunologia, dalla ricerca sui vaccini a quella su nuovi farmaci. La *facility* ha infatti caratteristiche uniche in Italia per la possibilità di avviare sperimentazione in modelli chimerici uomo/topo utilizzando, se necessario, anche agenti patogeni per l'uomo, grazie alla presenza di speciali laboratori P3 dotati di sistemi di barriera microbiologica sia verso l'ambiente interno che verso quello esterno.

Il personale tecnico, afferente al Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, addetto alla manutenzione degli stabulari, alla cura degli animali e alla conduzione della sperimentazione *in vivo* è stato sottoposto a un training di lunga durata per poter operare in

condizioni di sicurezza in un ambiente microbiologico ad elevato rischio e suscettibile di contaminazioni ambientali.

Altrettanto delicato il compito di stabulazione e allevamento di colonie speciali di topi transgenici e knock out per diversi geni, svolto nella struttura gemella, dotata anch'essa di sistemi di barriera microbiologica che garantisce al suo interno condizioni di sterilità superiori a quelle di una camera operatoria.

I topi transgenici e knock out costituiscono uno strumento avanzato per una ricerca moderna in campo biologico e molte delle colonie stabulate nella nostra struttura rappresentano un *unicum* non altrimenti reperibile al di fuori dell'ISS. Le colonie ospitate sono state allevate con particolare attenzione alla purezza del ceppo, alla conservazione delle caratteristiche genetiche e all'assenza di agenti infettivi. Questo lavoro ha consentito di mantenere in ottime condizioni sia gli animali destinati al mantenimento della linea sia quelli utilizzati per le sperimentazioni.

Grazie a questo lavoro è stato possibile condurre diversi studi, gran parte dei quali non eseguibili altrove a causa della unicità dei ceppi murini utilizzati.

Studi in topi SCID sono stati condotti per:

- Valutare la risposta immune umana ad antigeni virali.
- Valutare la capacità di cellule dendritiche (DC) infettate *in vitro* con HIV-1 di trasferire infezione *in vivo* nel modello Hu-PBL-SCID.
- Saggiare *in vivo* il potenziale effetto antivirale di molecole in grado di inibire *in vitro* l'ingresso e la replicazione virale in cellule umane.
- Valutare, nel settore dell'oncologia sperimentale e in altri progetti di interesse biomedico, l'attività antitumorale di cellule immuni umane e la loro capacità di *homing* a livello del tessuto tumorale.
- Valutare il potenziale tumorigenico di diverse linee linfoblastoidi umane trasformate da EBV e l'attività antitumorale e i meccanismi di azione di farmaci antineoplastici.

Colonie di topi SCID mantenute nell'ambito della *facility* speciale dell'ISS sono state anche utilizzate per progetti nel settore delle neuroscienze.

I seguenti studi sono stati svolti utilizzando topi transgenici e KO:

- Valutazione dell'attività adiuvante di interferon di tipo I nella vaccinazione contro peptidi di melanoma umano (MART-1/MelanA26-35(27L)) in topi knock out per gli antigeni di istocompatibilità murini e transgenici per HLA-A*0201 umano (HHD).
- Valutazione del ruolo dell'interferon endogeno di tipo I sul controllo dello sviluppo del carcinoma mammario in topi BALB-neuT che sviluppano spontaneamente lesioni displastiche a livello mammario che sfociano, entro 6-8 mesi in lesioni francamente neoplastiche.
- Valutazione del ruolo di IFN di tipo I endogeno nella infezione da virus MHV-68 (herpes) e nella risposta a un vaccino ricombinante, in topi 129 sv KO per il recettore di interferon di tipo I.
- Valutazione dell'effetto di IFN di tipo I come adiuvante della vaccinazione intranasale in un modello di influenza murina, in topi C3H/HeN WT e KO per il recettore di interferon di tipo I.
- Valutazione del ruolo di IRF-1, un fattore di trascrizione responsabile dell'espressione di geni che controllano la crescita cellulare, il *signalling* di alcune citochine e il differenziamento emopoietico in topi KO per IRF-1.
- Valutazione del ruolo di ICSBP (o IRF-8) nella maturazione delle cellule dendritiche (DC) in topi KO per IRF-8.

Nel complesso, il lavoro svolto in questo settore testimonia l'esperienza raggiunta e costituisce la garanzia per l'uso di modelli murini speciali in attività di ricerca di interesse dell'ISS anche in collaborazione con gruppi di ricerca esterni.

Resoconto attività 2006

Nell'anno in corso è stata svolta l'attività principale di mantenimento ed espansione delle colonie di topi KO e transgenici già elencate nella relazione del precedente anno. Grazie alla presenza di queste colonie e al mantenimento in condizioni di barriera microbiologico dei topi SCID, è stato possibile svolgere i seguenti progetti di ricerca:

- Immunoterapia dell'infezione da HIV-1 basata sull'uso di cellule dendritiche autologhe umane generate da monociti coltivati in presenza di IFN-alfa. Durante quest'ultimo anno, sono stati condotti una serie di esperimenti *in vitro* e nel modello *hu-PBL-SCID mouse*, comparando l'efficacia di differenti tipi di DC *pulsate* con il virus HIV-1 inattivato (AT-2-HIV-1) nell'indurre una risposta immune umorale e cellulare primaria contro antigeni di HIV-1. In particolare, è stato possibile dimostrare che le IFN-DC sono superiori alle DC generate in presenza di IL-4 e GM-CSF e successivamente stimulate con CD40-L nell'indurre *cross-priming* di linfociti CD8+ contro antigeni esogeni di HIV-1 quando inoculate in topi *hu-PBL-SCID* (Lapenta C. *et al.* EJI 2006). Gli studi sono stati cofinanziati con il contributo del Programma Nazionale di Ricerca sull'AIDS – Progetto ICAV 2006 e dell'*European Sixth Framework Programme* – FP6-2005-LIFESCIHEALTH-6.
- Uso del modello carcinoma ovarico/SCID per studi inerenti all'utilizzo della risonanza magnetica.
- Uso del modello Me501/SCID e Leucemia pre-B/SCID per valutare l'effetto del trattamento con omeprazolo sulla crescita tumorale.
- Uso del modello Me501/SCID per valutare l'attività proapoptotica di *New Glutathione S-Transferase Inhibitors* NBD-HEX sulla crescita tumorale.
- Uso del modello Me501/SCID per valutare l'attività proapoptotica di *Pyrimethamine*, attività proapoptotica indipendente da FAS sulla crescita tumorale.
- Uso del modello Hu- PBL-SCID/ HIV per valutare l'effetto della Rapamicyna nell'inibire l'infezione da HIV *in vivo*.
- Uso del modello Hu-PBL-SCID/ HIV per valutare l'effetto di microbicidi nell'inibire l'infezione da HIV *in vivo* nell'ambito del "*VI European Microbicides Project*".
- Uso di topi C3H/HeN WT e KO per il recettore di interferon di tipo I per valutare l'effetto di IFN di tipo I come adiuvante della vaccinazione intranasale in un modello di influenza murina.
- Uso di topi transgenici per HLA-A(*)02.01 per valutare l'immunogenicità del peptide BORIS8-17 di *Brother of the Regulator of Imprinted Sites* (BORIS), un gene *cancer testis* di nuova identificazione.
- Studio della modulazione genica in cellule dendritiche derivate dal midollo di topi IRF-8-KO.
- Studio del ruolo del fattore di trascrizione IRF-1 nel differenziamento e nell'attività funzionale di cellule dendritiche e cellule T regolatorie avvalendosi del modello dei topi IRF-1-KO.

Attività programmata 2007

Oltre alla prosecuzione degli studi in corso, si prevede lo sviluppo dei seguenti progetti:

- Studio *in vivo* nel modello CASKI /SCID sull'induzione della risposta cellulare verso antigeni di HPV16 e 18 mediante IFN-DCs caricate con la proteina virale E7, finalizzato dello sviluppo di un vaccino terapeutico per il tumore della cervice uterina.

- Studio *in vivo* nel modello Me501 /SCID sull'induzione di risposta verso l'antigene di melanoma MART-1 e gp100, ottenuta attraverso carimento di IFN-DCs con corpi apoptotici derivati da una linea cellulare di melanoma Me501.

Trial clinici di Fase II/III per la terapia dei tumori con l'inibitore della proteasi di HIV Indinavir

Il Progetto implementerà una piattaforma preclinica e clinica volta a valutare la sicurezza e l'efficacia dell'Indinavir, un farmaco antiretrovirale appartenente alla classe degli inibitori della proteasi di HIV (HIV-PI), nella terapia del sarcoma di Kaposi e di tumori ad elevata prevalenza e incidenza in soggetti infettati e non infettati da HIV in Italia e Africa.

La terapia dei tumori basata sull'impiego dei chemioterapici è caratterizzata da elevata tossicità, farmaco-resistenza e, spesso, fallimento nell'eradicazione o nel controllo della progressione neoplastica. È quindi necessario sviluppare e validare nuove strategie terapeutiche di accresciuta efficacia, volte a colpire bersagli mirati, e caratterizzate da un maggiore indice terapeutico. A questo scopo, abbiamo recentemente focalizzato la nostra attenzione sulla capacità delle nuove terapie antiretrovirali combinate (HAART) contenenti HIV-PI di ridurre l'incidenza, indurre la regressione, e/o aumentare il tempo alla progressione dei tumori associati ad AIDS, in particolare il sarcoma di Kaposi, i linfomi non-Hodgkin (NHL) e il carcinoma della cervice uterina.

I nostri studi indicano che gli HIV-PI esercitano azioni antiangiogeniche e antitumorali a causa della loro capacità di inibire l'invasione delle cellule endoteliali e tumorali. Queste azioni sono mediate da un blocco dell'attivazione proteolitica di MMP-2, una metalloproteasi della matrice che svolge un ruolo chiave nell'angiogenesi, nell'invasione tumorale e nella metastatizzazione. Grazie a questi effetti, gli HIV-PI sono in grado di bloccare la crescita di tumori solidi, leucemie, e linfomi umani di varia origine e istotipo in modelli murini.

Sulla base di questi dati abbiamo avviato, in collaborazione con Merck Italia, uno studio clinico multicentrico per valutare l'attività dell'Indinavir, uno degli HIV-PI più utilizzati, in soggetti non infettati da HIV affetti da sarcoma di Kaposi. L'analisi *ad interim* dei dati indica che il trattamento con Indinavir è ben tollerato in questi soggetti e induce un'elevata frequenza di risposta. La risposta clinica richiede livelli plasmatici di farmaco superiori a un valore soglia "terapeutico" ed è associata a una significativa diminuzione del numero di cellule endoteliali circolanti (un marcatore validato dell'angiogenesi tumorale) e alla stabilizzazione dei livelli plasmatici di MMP-2 e di fattori angiogenici, quali bFGF. In accordo alle azioni antiangiogeniche e antiinvasive del farmaco, la terapia induce la stabilizzazione dei tumori avanzati e la regressione delle lesioni iniziali. Tuttavia, l'efficacia del farmaco è assai inferiore nei soggetti con masse tumorali confluenti e complicate da edema. È perciò in corso di allestimento una sperimentazione monocentrica di fase II per il trattamento del sarcoma di Kaposi avanzato e complicato con chemioterapia *debulking* in associazione ad Indinavir.

Gli studi verranno implementati con una sperimentazione di fase II/III in Italia in pazienti HIV-negativi per il trattamento con Indinavir, associato o no a chemioterapia convenzionale, di tumori ad elevata incidenza e prevalenza quali il carcinoma del polmone e il carcinoma del rinofaringe, della prostata, del fegato, della mammella, del colon, il LNH non HIV-correlato, e il mieloma multiplo, in collaborazione con il Centro di Riferimento Oncologico di Aviano, e il sarcoma di Kaposi in soggetti HIV negativi e positivi in Africa (Tanzania).

Resoconto attività 2006

Il Progetto è volto ad implementare una piattaforma preclinica e clinica volta a valutare la sicurezza e l'efficacia dell'Indinavir, un farmaco antiretrovirale appartenente alla classe degli inibitori della proteasi di HIV (HIV-PI), nella terapia del sarcoma di Kaposi e di tumori ad elevata prevalenza e incidenza in soggetti infettati e non infettati da HIV in Italia e Africa.

Le nuove terapie antiretrovirali combinate (HAART) contenenti gli inibitori della proteasi di HIV (HIV-PI) hanno ridotto l'incidenza dei tumori associati ad AIDS, in particolare il sarcoma di Kaposi (KS), e spesso inducono la regressione e/o aumentano il tempo alla progressione di malattia nei pazienti trattati. I nostri studi hanno indicato che queste azioni sono mediate, almeno in parte, dalla capacità degli HIV-PI di inibire l'angiogenesi e l'invasione delle cellule tumorali grazie al blocco dell'attivazione proteolitica della metalloproteasi della matrice 2 (MMP-2). Sulla base di questi dati abbiamo avviato, in collaborazione con Merck Italia, uno studio clinico multicentrico *proof of concept* per valutare l'attività dell'Indinavir, uno degli HIV-PI più utilizzati, in soggetti non infettati da HIV affetti da KS. Il trial è stato completato e l'analisi finale dei dati è in corso. L'analisi *ad interim* dei dati indica che il trattamento con Indinavir è ben tollerato in questi soggetti e induce un'elevata frequenza di risposta. La risposta clinica richiede livelli plasmatici di farmaco superiori a un valore soglia "terapeutico" ed è associata a una significativa diminuzione del numero di cellule endoteliali circolanti (un marcatore validato dell'angiogenesi tumorale) e alla stabilizzazione dei livelli plasmatici di MMP-2 e di fattori angiogenici, quali bFGF. In accordo alle azioni antiangiogeniche e antiinvasive del farmaco, la terapia induce la stabilizzazione dei tumori avanzati e la regressione delle lesioni iniziali. Tuttavia, l'efficacia del farmaco è assai inferiore nei soggetti con masse tumorali confluenti e complicate da edema. È perciò in corso di allestimento una sperimentazione monocentrica di fase II per il trattamento del KS avanzato e complicato con chemioterapia *debulking* in associazione ad Indinavir. Il protocollo dello studio è già stato definito e approvato dal Comitato Etico centrale di ISS e dal comitato etico locale.

Poiché MMP-2 svolge un ruolo essenziale nell'angiogenesi e nell'invasione di tutti i tumori, abbiamo allestito studi preclinici volti a chiarire l'effetto degli HIV-PI Indinavir e Saquinavir su tumori ad elevata prevalenza e incidenza nella popolazione umana. I risultati indicano che Indinavir e Saquinavir bloccano in topi immunodeficienti, con gli stessi meccanismi, la crescita di cellule tumorali umane derivate da carcinomi del colon, del polmone e della mammella, epatocarcinomi, linfomi non-Hodgkin (LNH), e leucemie linfatiche e mielomonocitiche. In questi modelli animali, il trattamento con Indinavir e Saquinavir si è dimostrato sicuro e ben tollerato. Questi dati indicano che gli inibitori della proteasi di HIV, associati o no a chemioterapia convenzionale, possono essere usati per sviluppare nuove terapie contro tumori altamente prevalenti e incidenti nei Paesi sviluppati e in via di sviluppo.

Attività programmata 2007

Nel corso del 2007 verranno avviate le procedure per la registrazione del farmaco per la nuova indicazione d'uso. In collaborazione con la Clinica Dermatologica dell'Ospedale Maggiore di Milano, verrà avviato l'arruolamento dei pazienti per lo studio clinico monocentrico di fase II per il trattamento del sarcoma di Kaposi avanzato e complicato con Indinavir in associazione a Vinblastina e Bleomicina.

Nel quadro del Programma per la Ricerca Oncologica del Ministero della Salute, è stata presentata una proposta di progetto teso a determinare l'efficacia di Indinavir a prevenire la progressione e a ridurre la frequenza di recidiva del carcinoma intraepiteliale della cervice uterina (CIN) in donne non infettate da HIV. Nel corso di questi studi, oltre alla valutazione della risposta clinica, della фармаocinetica, e della tollerabilità del farmaco, verranno

determinati i più importanti marcatori biologici di risposta alla terapia e i marcatori predittivi di risposta clinica, inclusi livelli locali di MMP e fattori angiogenici, e il numero delle cellule endoteliali circolanti.

Infine, verranno implementati gli studi preclinici in un modello murino di CIN con particolare riguardo all'identificazione del meccanismo dell'azione antitumorale degli HIV-PI *in vivo*, mediante determinazione degli effetti sulla proliferazione, sopravvivenza, blocco della crescita, angiogenesi e invasione e progressione tumorale.

Vaccino glicoconiugato multi-bersaglio

Il Progetto vuole sviluppare un vaccino multibersaglio (“transfletico”) attraverso il quale un componente antigenico unico, adiuvantato con un opportuno *carrier* proteico, può conferire protezione contro varie malattie sistemiche e mucosali di origine fungina o protozoaria. Il componente in questione è una semplice molecola polisaccaridica, il beta-glucano, prodotto da un'alga (la laminarina) presente in vari funghi, batteri e alcuni protozoi, e il *carrier* proteicoproposto è il CRM197, cioè la tossina difterica geneticamente modificata. Natura, ragioni e prospettive di questo originale approccio vaccinale sono stati illustrati in una recente pubblicazione dell'Istituto (v. *Journal of Experimental Medicine* 202,597,2005) illustrata da vari editoriali (*Nature Reviews Immunol.* 5,2005; *Trends Mol Med.* 2005 Nov 22).

Resoconto attività 2006

Nel 2006 sono continuati i test di immunogenicità ed efficacia del vaccino glicoconiugato fra laminarina e CRM197 in modelli preclinici. È stata confermata anche l'efficacia del vaccino in modelli di animali neutropenici e sono stati generati anticorpi monoclonali protettivi in vaccinazione passiva.

Attività programmata 2007

Nel 2007 si prevede la definitiva dimostrazione dell'efficacia del vaccino e dei relativi anticorpi nel modello della criptococcosi, anche utilizzando animali neutropenici. Si prevede altresì l'espansione su altre specie di *Candida* e ricerche sulla presenza di anticorpi anti-laminarina nell'uomo. Infine, è prevista la generazione di anticorpi anti-laminarina in piante. Alla fine del 2007, di concerto con la Chiron-Novartis, sarà deciso se adire alla sperimentazione nell'uomo.

Valutazione degli esiti in relazione a interventi di cardiocirurgia

Il progetto prevede diverse linee di attività.

Il Progetto BPAC (Studio degli esiti a breve termine di interventi di By-Pass Aorto-Coronarico nelle Cardiocirurgie Italiane) è uno studio prospettico nazionale sugli esiti a breve termine degli interventi di BPAC nelle cardiocirurgie italiane che include la valutazione del rischio pre-operatorio individuale, e un sistema di raccolta dati costruito *ad hoc* ai fini di questo studio. Gli obiettivi specifici sono: i) descrivere la mortalità osservata e attesa a 30 giorni