

lavaggio camici e gestione/funzionamento delle aule dell'Istituto destinate a convegni, meeting e attività di formazione.

Vanno segnalate, infine, con riferimento all'attività contrattuale, che ha già costituito oggetto di specifica relazione svolta dall'Ente, le significative e rilevanti modifiche apportate dal DL.vo 12 aprile 2006, n. 163 (Codice dei contratti pubblici relativi a lavori, servizi e forniture in attuazione delle direttive 2004/17/CE e 2004/18/CE, pubblicato sulla GU n. 100 del 02/05/2006 – Supplemento Ordinario n. 107).

Tale normativa ha determinato delle indubbie ripercussioni sullo svolgimento dell'attività contrattuale dell'Ente, nella sua qualità di "stazione appaltante", intervenendo sugli istituti di maggiore rilevanza in materia di appalti, realizzando l'accorpamento (di cui, *ictu oculi*, non può non individuarsi la portata innovativa), in un unico *corpus* normativo, della disciplina contrattuale afferente ai servizi, forniture e lavori.

In relazione all'attività contrattuale che dovrà essere svolta nel corso dell'anno 2008, si darà luogo alla predisposizione delle procedure relative ai contratti che nel corso di tale anno avranno scadenza, ove l'Amministrazione non eserciti (nel caso in cui la relativa facoltà sia contrattualmente prevista) la facoltà di procedere al rinnovo del contratto in scadenza, disciplinato secondo la normativa previdente alla introduzione del DL.vo n. 163/2006.

Si procederà, altresì, alla indizione di nuove procedure di gara, laddove se ne ravvisi la necessità, al fine di assicurare l'esecuzione di lavori o servizi, ovvero di garantire l'approvvigionamento di beni necessari per il funzionamento dell'Ente.

Occorre segnalare, per completezza di informazione, come nella materia *de qua* l'Amministrazione abbia, da tempo, fatto ricorso alle convenzioni stipulate dalla CONSIP SpA, in ossequio all'iniziale vincolo e, successivamente, all'opportunità, di acquisire beni e servizi mediante l'adesione a convenzioni stipulate dalla stessa CONSIP.

Attualmente, e per citare l'ultimo intervento normativo in ordine cronologico, nella materia *de qua*, la Legge 27 dicembre 2006, n. 296 (Legge Finanziaria 2007), all'art. 1, comma 449, ha previsto l'obbligatorietà del ricorso alle convenzioni CONSIP per talune tipologie di beni e servizi, e l'utilizzo dei parametri "prezzo-qualità" come limiti massimi per la stipulazione dei contratti, per le amministrazioni non annoverabili nelle "amministrazioni statali centrali e periferiche", di cui alla prima parte del citato art. 1, comma 449.

A tale riguardo si segnala come l'adesione alle citate convenzioni abbia consentito – a titolo di esempio – il noleggio dei fotocopiatori per l'Istituto, il noleggio ovvero l'acquisto di personal computer, o il noleggio/acquisto di autoveicoli di servizio.

A ciò si aggiunga che, conformemente a quanto disposto dal DPR n. 101/2002, l'Amministrazione ha proceduto a dare un significativo impulso al c.d. "mercato elettronico" della PA, garantendo – attraverso l'utilizzo di tale innovativo strumento di approvvigionamento di beni e servizi – la fornitura di materiale di cancelleria.

Analoga iniziativa è stata assunta in ordine all'acquisto di materiale informatico di varia natura (stampanti, cartucce e toner per stampanti già in dotazione, personal computer, monitor ecc.), rispetto al quale la relativa acquisizione tramite il mercato elettronico comporta almeno due significativi vantaggi:

- il prezzo di vendita sicuramente più basso, rispetto al normale prezzo di mercato (soprattutto allorquando il richiedente decida di procedere con quella che tecnicamente viene definita "richiesta di offerta");
- uno snellimento delle procedure amministrative deputate all'acquisto di tali prodotti, che rinviengono, nello strumento informatico, un mezzo in grado di ridurre i tempi di attesa e le procedure volte alla esecuzione dell'ordine del prodotto richiesto.

Tanto premesso, e anche alla luce del buon esito del ricorso allo strumento del mercato elettronico, rispetto al quale, a rigore, può dirsi conclusa la fase di “sperimentazione”, si conta nel corso del 2008 di dare una ulteriore implementazione al ricorso di tale procedura di acquisto, garantendone la fruizione anche ai Dipartimenti, nella loro qualità di CRA e di soggetti in grado di procedere, in autonomia, all’acquisto di beni e servizi.

A tal fine si è già proceduto, e si procederà nei prossimi mesi, a realizzare specifici incontri tra i rappresentati CONSIP, e il personale amministrativo dei Dipartimenti, al fine di fornire, nel dettaglio, tutte le informazioni e le istruzioni necessarie per lo svolgimento della corretta procedura volta all’acquisto del bene sul mercato elettronico della PA.

– *Predisposizione regolamenti*

Con Decreto 17 luglio 2007 il Presidente ha emanato il “Regolamento sul trattamento dei dati sensibili e giudiziari dell’Istituto Superiore di Sanità”, pubblicato nel Supplemento Ordinario n.188 alla Gazzetta Ufficiale n. 197 del 25 agosto 2007.

Il Regolamento consta di un articolato e di 14 schede allegate riguardanti le categorie omogenee di attività svolte in ISS, aventi per oggetto trattamenti di dati sensibili effettuati per finalità di rilevante interesse pubblico; in ciascuna di esse sono individuati la specifica disposizione di legge che origina o regola l’attività istituzionale in relazione alla quale l’Istituto effettua il trattamento, le tipologie dei dati che possono essere trattati, le operazioni eseguibili e le finalità di rilevante interesse pubblico perseguite.

Analoga iniziativa è stata assunta in materia di diritto di accesso ai documenti amministrativi dell’Istituto, infatti con Decreto 18 settembre 2007 il Presidente ha emanato il “Regolamento in materia di diritto di accesso ai documenti amministrativi dell’Istituto Superiore di Sanità”, pubblicato in Gazzetta Ufficiale del 26 ottobre 2007, n. 250 finalizzato a disciplinare uniformemente le procedure per l’espletamento di tale diritto, integrando e superando così la previgente normativa interna dell’Istituto (circolare del 25 ottobre 1995 prot. n. 38521/SAP 3.3 e circolare del 23 settembre 1997 prot. n. 33092/SP 3.3).

Nel regolamento, che recepisce le novità introdotte dal DPR 184/2006, sono state regolamentate le modalità di richiesta di accesso ai documenti amministrativi, che può avvenire direttamente o tramite servizio postale a mezzo di raccomandata con avviso di ricevimento o via fax alla struttura dell’Istituto (Ufficio, Dipartimento, Centro nazionale, Servizio tecnico-scientifico) competente a formare l’atto conclusivo o a detenerlo stabilmente.

È stato predisposto anche un modulo per la presentazione dell’istanza, allegato al regolamento e pubblicato sul sito Internet dell’ISS sotto la sezione “Trasparenza e Privacy”).

Quanto precede per l’attività svolta nel 2007, di seguito si individuano gli obiettivi per l’anno 2008 che sono:

- valutazione dell’impatto finanziario delle procedure di stabilizzazione ex art. 519 e 520 Legge Finanziaria anno 2007;
- analisi delle possibili semplificazioni procedurali da apportare all’attuale struttura organizzativa della Direzione amministrativa;
- analisi delle attuali procedure informatiche e predisposizione per la parte di competenza di uno studio di fattibilità volta alla semplificazione della stessa.

PARTE 3
Progetti speciali

Accordo di collaborazione Italia-USA

Nel marzo 2003 l'Italia e gli Stati Uniti hanno firmato un accordo che prevede la collaborazione tra i ricercatori dei due Paesi nei seguenti campi:

- malattie rare;
- oncologia;
- malattie infettive di grande rilievo sociale e di possibile utilizzo con armi non convenzionali. Problemi di salute pubblica.

Gli Istituti Nazionali di Sanità degli Stati Uniti d'America (*National Institutes of Health*, NIH) e l'ISS della Repubblica Italiana, desiderando rafforzare la collaborazione in essere, confermata nel Memorandum di Intesa firmato il 17 aprile 2003 dal Dipartimento per la Salute e i Servizi Umani degli Stati Uniti d'America e dal Ministero della Salute della Repubblica Italiana, hanno incrementato la cooperazione nella ricerca e nella formazione nel campo delle scienze biomediche e comportamentali.

Da questo accordo sono derivate azioni molto importanti che hanno fatto scaturire collaborazioni di altissimo contenuto professionale e di ricerca.

Entrambe le parti intendono collaborare negli ambiti del proprio mandato istituzionale per promuovere la riduzione delle disuguaglianze nella salute a livello globale.

Le attività previste includono:

- l'organizzazione e l'attuazione congiunta di workshop;
- l'identificazione di opportunità di formazione congiunta per ricercatori, inclusi i ricercatori provenienti da Paesi in Via di sviluppo e da Economie in Transizione;
- lo scambio di ricercatori;
- lo scambio di informazioni;
- lo scambio di materiali;
- la realizzazione di progetti di ricerca congiunti che includono la ricerca traslazionale e clinica;
- la conduzione di progetti di ricerca congiunti in Paesi terzi in via di sviluppo e in transizione;
- altre forme di cooperazione che comprendano il sostegno a ricercatori provenienti dai Paesi in via di sviluppo e in transizione.

Malattie rare

L'accordo bilaterale fra ISS (Italia) e gli NIH (Stati Uniti) è finalizzato a sviluppare e a potenziare attività di ricerca e sanità pubblica su selezionate malattie rare.

In tale contesto l'ISS ha promosso la *Call for proposal – Rare Diseases, 2006-7* in cui laboratori di ricerca afferenti a strutture pubbliche italiane (Istituti di ricovero e cura a carattere scientifico, ISS, e Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri) sono stati invitati a presentare progetti finalizzati ad incrementare le conoscenze scientifiche su eziopatogenesi, diagnosi e trattamento di specifiche malattie rare.

I progetti sono stati sviluppati nell'ambito di tematiche relative a:

- modelli di studio per la prevenzione (primaria, secondaria, terziaria) di malattie rare;
- caratterizzazione di entità nosologiche e condizioni morbose senza diagnosi certa (dal sospetto diagnostico, alla caratterizzazione fenotipica e management clinico), con il coordinamento dell'ISS;

- sviluppo di nuovi approcci (molecolari, biochimici, strumentali, ecc.) diagnostici e prognostici;
- modelli sperimentali per lo sviluppo di nuove terapie (fase pre-clinica) e per la valutazione della loro sicurezza ed efficacia;
- ricerche in ambito epidemiologico e clinico, con particolare riferimento a studi su: incidenza, prevalenza, fattori di rischio, ritardo diagnostico, percorsi e linee guida diagnostico-assistenziali, a partire da dati del Registro Nazionale Malattie Rare;
- validazione e ottimizzazione di modelli per la valutazione della qualità della vita dei cittadini affetti da malattie rare, anche in relazione alla qualità dei servizi erogati.

Sono stati presentati un totale di 184 progetti di cui 82 sono stati selezionati per finanziamento. La selezione è avvenuta previa identificazione di *referee* (principalmente internazionali) con competenze scientifiche nei progetti proposti.

La valutazione si è basata su: i) qualità scientifica del progetto (originalità, argomenti oggetto di studio, ecc.); ii) studio di fattibilità del progetto (adeguatezza del metodo impiegato, budget, tempistica); iii) potenziale innovativo e risultati attesi; iv) qualità scientifica del gruppo di ricerca.

Resoconto attività 2007

I responsabili dei progetti finanziati hanno svolto parte delle attività sperimentali relative ai progetti presentati.

I risultati preliminari raggiunti durante i primi sei mesi di attività, sono stati presentati durante il workshop che si è tenuto in occasione della Conferenza internazionale sulle malattie rare e i farmaci orfani (5-8 novembre 2007, ISS).

Le tematiche affrontate nei progetti, e presentate nel corso del workshop, possono essere riassunte in quattro gruppi: patogenesi, diagnosi, trattamento e gestione clinica di varie malattie rare.

Il gruppo relativo alla patogenesi comprende studio e analisi di specifiche patologie (es. sindrome di Rett e sindrome Niemann Pick), meccanismi fisiopatologici (es. alterazioni della differenziazione neuronale e funzione dell'emostasi in forme severe di emofilia); meccanismi di differenziamento neuronale fisiologico e patologico; patogenesi della malattia di Niemann Pick e studi su geni implicati in sclerosi tuberosa, linfoangiomiomatosi e malattie dei vasi linfatici.

Il gruppo patogenesi e diagnosi comprende studi sull'analisi di geni coinvolti nel riparo di danno indotto al DNA in sindromi neurodegenerative (es. atassia cerebellare); studi mirati a stabilire le possibili correlazioni genotipo-fenotipo nella leucodistrofia metacromatica e alcuni risultati preliminari relativi allo sviluppo di nuovi test biochimici per la diagnosi di encefalopatie spongiformi; studio di nuove mutazioni in geni coinvolti in malattie rare caratterizzate da difetti congeniti del cuore, in alcuni rari tumori epatici quali l'epatoblastoma e nella sindrome di Noonan.

Nel gruppo diagnosi e classificazione di malattie rare afferiscono i progetti relativi all'analisi di malattie rare, caratterizzate da ritardo mentale, atrofia muscolare, progressiva neurodegenerazione nonché studi sulla correlazione genotipo-fenotipo per identificazione e caratterizzazione di geni coinvolti in malattie rare multisistemiche, malattie rare caratterizzate da ritardo mentale, problemi neurologici e muscolari e sindromi da de-regolazione dei meccanismi di riparazione del danno indotto al DNA.

Nel gruppo relativo a trattamento e gestione clinica, sono comprese tematiche relative a impiego terapeutico e relative criticità di cellule staminali nel trattamento di sindromi e tumori rari.

Gli *abstract* di ciascun contributo sono stati raccolti e pubblicati all'interno di uno specifico volume dei Rapporti ISTISAN Congressi (http://www.iss.it/binary/publ/cont/0393-5620_2007_I_07_C8.1193212133.pdf), edito dall'ISS.

Attività programmata 2008

Nel corso del 2008 verranno continuate le attività di ricerca sui progetti finanziati nell'ambito della *call for proposal* 2006-7.

Si prevede la realizzazione di un nuovo workshop durante la Conferenza annuale sulle malattie Rare e Farmaci Orfani durante il quale verranno presentati i risultati ottenuti dai responsabili di ciascun progetto di ricerca.

Oncologia

– La sieroproteomica per la diagnosi precoce delle neoplasie

Lo studio dell'insieme delle proteine e delle loro reciproche interazioni ("proteomica") ha acquistato in questi anni un ruolo fondamentale nella ricerca oncologica. L'analisi proteomica è oggi possibile mediante nuove metodiche di spettrometria di massa, messe a punto dal gruppo statunitense di L. Liotta ed E. Petricoin presso gli NIH e utilizzate con successo per valutare le modifiche del corredo proteico nel siero di pazienti affetti da neoplasie, specificamente nei tumori dell'ovaio. Questo corredo proteico, confrontato con quello di soggetti sani, ha rivelato interessanti differenze che hanno aperto la strada all'identificazione di nuovi marcatori precoci di malignità oncologica ed eventualmente nuovi bersagli terapeutici. Le informazioni derivate dalla sieroproteomica applicata ai tumori umani può consentire di individuare dei pattern predittivi per la diagnosi precoce e il trattamento personalizzato dei tumori. Il programma Italia-USA di Oncoproteomica si propone di applicare tali metodiche ad alcune neoplasie molto diffuse, mettendo in stretta collaborazione il gruppo statunitense di Liotta-Petricoin presso la George Mason University e i principali IRCCS e Centri Oncologici di ricerca italiani, coordinati dall'ISS.

Il programma prevede la raccolta di circa 11.000 sieri corredati da schede anamnestiche e di informazioni emato-chimiche provenienti da pazienti affetti da tumori della mammella, colon, ovaio, polmone, prostata, fegato, leucemie, melanoma e da soggetti sani.

– I microRNA: la nuova frontiera dell'oncologia

I micro RNA (miR) sono dei piccoli RNA (21-25 nucleotidi) non codificanti capaci di inibire la sintesi di specifiche proteine attraverso una modulazione della stabilità e della efficienza traslazionale di specifici RNA messaggeri. I miR sono prodotti come trascritti primari (long pri-miR) processati successivamente da complessi enzimatici nucleari (Drosha) e citoplasmatici (Dicer) fino a produrre i maturi miR. È stato dimostrato che l'espressione dei miR è specifica per tessuti e per stadi di sviluppo, sia in modelli animali che nell'uomo, ma i meccanismi di produzione/maturazione dei miR e soprattutto le loro funzioni e specificità di azione su specifici bersagli sono attualmente oggetto di approfondito studio e di grande interesse, soprattutto nel campo oncologico.

– Progetto Cellule Staminali e Terapie Cellulari Rigenerative

La terapia cellulare rappresenta l'ultima frontiera terapeutica per la cura di patologie degenerative, ad esempio di quelle causate da una riduzione del numero di cardiomiociti a seguito di infarto del miocardio, o da un alterato funzionamento degli stessi, come nel caso delle cardiomiopatie primarie. Queste malattie possono essere curate con la

sostituzione delle cellule mancanti o alterate con altre ottenute da donatori sani istocompatibili o dallo stesso paziente. La terapia cellulare è quindi basata sul trapianto di cellule differenziate o in grado di differenziare in tipi e sottotipi diversi all'interno di specifici tessuti o organi bersaglio, contribuendo così a rigenerare la struttura degenerata. Negli ultimi anni, la terapia cellulare è stata oggetto di un enorme interesse, a seguito della possibilità di indurre *in vitro* la proliferazione e il differenziamento di cellule staminali embrionali-fetali, perinatali e di adulto. L'uso di queste cellule potrà consentire l'allestimento di cloni di cellule utili per i trapianti e la rigenerazione dei tessuti, la messa a punto di tecniche diagnostiche preventive per alcune malattie ereditarie, oltre che contribuire allo sviluppo di farmaci, di vaccini e di molecole di interesse terapeutico.

Resoconto attività 2007

– *Oncoproteomica: sieroproteomica per la diagnosi precoce dei tumori solidi*

Nel corso del 2007 è stata continuata e ampliata l'attività iniziata in precedenza. In particolare, è stato allargato il numero di centri oncologici coinvolti e ingrandito il numero di tumori oggetto dello studio. Infatti si sono aggiunti anche alcuni gruppi per lo studio del cancro della prostata e altri per lo studio del melanoma cutaneo. Il numero di sieri raccolti nei Centri è stato significativamente aumentato, raggiungendo un numero totale >5.000, che comprende sia i sieri da pazienti oncologici che i sieri da soggetti sani. Un importante risultato ottenuto dal lavoro dei nostri ricercatori presso i laboratori della George Mason University (GMU) è stato lo sviluppo di un prodotto nanotecnologico, nanosfere ingegnerizzabili, che immesse in un liquido biologico sono in grado di "catturare" piccoli peptidi, altrimenti impossibili da analizzare. Questa nuova promettente biotecnologia, del tutto innovativa, può risultare molto utile per la ricerca di nuovi biomarcatori e quindi per la diagnosi precoce dei tumori. Inoltre, nell'ambito degli studi di *Protein Discovery*, svolti in collaborazione con i laboratori della GMU sui sieri raccolti nei Centri italiani e spediti in USA, sono stati identificati 11 candidati marcatori per lo studio sul carcinoma della mammella e quattro per lo studio sul carcinoma del colon-retto. Questi candidati-biomarcatori sono attualmente sottoposti a studi di validazione mediante tecniche alternative per verificarne l'efficacia come strumenti di diagnosi precoce e per caratterizzarne la sensibilità e la specificità. Questi studi sono stati condotti grazie all'impiego dei primi otto borsisti che hanno svolto il primo anno di attività in USA e che hanno svolto, nel corso del 2007, il secondo anno in Italia. Per poter continuare e ampliare i suddetti studi, sono stati quindi selezionati altri otto borsisti che hanno rimpiazzato in USA i primi. Alcuni borsisti hanno chiesto di prolungare per un altro anno la permanenza nei laboratori USA e altri due borsisti partiranno nei primi mesi del 2008. I risultati fino ad ora ottenuti sono stati presentati a meeting internazionali (16 presentazioni) e in parte pubblicati su riviste internazionali (sette manoscritti), e sono state anche depositate alcune richieste di brevetto (tre).

– *I microRNA: la nuova frontiera dell'oncologia*

Nel secondo anno di svolgimento del progetto è stata effettuata una serie di studi che costituiscono una eccellente base di partenza per possibili applicazioni dei microRNA (miR) nella diagnosi e nella terapia dei tumori. Le pubblicazioni relative sono numerose e spesso in riviste di eccellenza (*N. Engl. J. Med.*, *Nature*, *Nature Med.*, *Nature Cell Biol.*, *Cancer Cell*, *Molec. Cell*, *Genes Dev.*, ecc.).

Attività programmata 2008

- *La sieroproteomica per la diagnosi precoce delle neoplasie*
 - Nel corso del 2008 si procederà all'ulteriore raccolta di sieri e di schede da parte dei Centri, con relativo stoccaggio e spedizione dei sieri alla Biobanca dell'Ospedale Maggiore di Milano e immissione delle schede nel database da parte del Coordinamento.
 - Verranno inoltre curate le spedizioni di campioni in USA dove verranno analizzate nel centro di spettrometria di massa dell'NCI di Bethesda e della George Mason University. Presso tali centri verranno continuate le analisi di spettrometria di massa dei sieri del Progetto Pilota, confrontati con i sieri da soggetti sani, per identificare un *pattern* di proteine che differenziano i soggetti neoplastici da quelli sani e saranno iniziati gli studi di validazione dei progetti iniziati nel 2007.
 - Verrà coordinata l'attività di raccolta sieri e schede cliniche per lo studio multicentrico di sieroproteomica sul carcinoma della prostata.
- *I microRNA: la nuova frontiera dell'oncologia*
 - Studi sulla espressione dei miRs mediante *microarray*.

È stata messa a punto una nuova metodologia di *microarray* per l'analisi della espressione dei geni di miR in cellule umane. Sulla base di questa metodologia, l'espressione dei miRs è stata e verrà valutata in una larga serie di tessuti umani normali e neoplastici, ematopoietici e di altro tipo.

Uno studio approfondito è stato effettuato sulla espressione dei miR nei singoli *lineages* ematopoietici (eritroide, megacariocitario, granulocitico e monocitico), generati in colture di progenitori CD34+ indotti a differenziazione-maturazione unilinea. In questi studi l'espressione dei miR è risultata lineare e stadio-specifica, oltre che nettamente differenziata da quella dei T linfociti, come evidenziato dall'analisi del *clustering*. L'analisi di espressione è stata estesa a un gruppo di 40 leucemie acute, 20 linfoidi e 20 mieloidi. I risultati saranno valutati nel corso del prossimo anno.

Verrà anche studiata l'espressione dei miRs in: i) cellule mesenchimali primitive e in cellule adipose, ossee e condrocitarie da esse generate; ii) cellule neurali primitive normali ("neurosferi") e cellule primitive di glioblastomi.
 - Espressione e funzione dei miRs elevata nel carcinoma prostatico: significato prognostico, ruolo oncogenetico e potenziale terapeutico

Nel carcinoma prostatico, il cluster miR-15a/miR-16-1 localizzato in 13q14 è spesso deletato, particolarmente nelle forme avanzate. Le indagini da noi condotte suggeriscono che miR-15a/miR-16-1 agiscono da soppressori tumorali nelle cellule tumorali, attraverso il controllo di molteplici target (Bcl-2, ciclina D1, Wnt-3a). In effetti, studi preliminari indicano che la soppressione di miR-15a/miR-16-1 in cellule prostatiche normali (mediante *knockdown* da sequenze antisense trasdotte con vettori lentivirali) determina un aumento dell'espressione dei suddetti target. Gli studi futuri determineranno le alterazioni funzionali dovute al *knockdown* di miR-15a/miR-16-1, quali incremento della sopravvivenza, proliferazione e invasività cellulare e formazione di tumori in xenotrapianti nei topi immunodeficienti NOD-SCID. All'inverso, alterazioni funzionali come arresto della crescita, aumento dell'apoptosi e riduzione dei tumori indotti in topi NOD/SCID verranno monitorate dopo il ripristino dell'espressione di miR-15a/miR-16-1 in cellule prostatiche neoplastiche. Queste indagini possono costituire la base per future terapie molecolari nel carcinoma della prostata.

- La funzione pivotale dei miR nella regolazione della proliferazione-differenziazione ematopoietica leucemica

I miRs 155/221/222 controllano la megacariotopoiesi attraverso il target Ets-1. L'analisi dei profili di espressione dei miR durante il differenziamento megacariocitario umano suggerisce che i miRs 155, 221, 222 controllano la megacariopoiesi, sia a livello di progenitori che di precursori. Lo studio bioinformatico suggerisce che tale regolazione si realizza attraverso il target Ets1. Queste ipotesi verranno validate e approfondite nel corso del prossimo anno.

Il circuito soppressorio PLZF a miR-146 a CXCR4: ruolo funzionale di controllo nella megacariotopoiesi normale e nelle leucemie mieloidi. Studi preliminari suggeriscono che il controllo esercitato dal PLZF sull'espressione del miR 146a potrebbe rappresentare una tappa fondamentale nella regolazione del CXCR4 durante la proliferazione delle cellule MK normali e delle cellule leucemiche mieloidi. Il ruolo funzionale del circuito soppressorio PLZF a miR-146 a CXCR4 verrà validato e approfondito nel prossimo anno.

Malattie infettive di grande rilievo sociale e di possibile utilizzo con armi non convenzionali. Problemi di salute pubblica

Al contrario di pochi anni fa, quando un atto di bioterrorismo era ritenuto piuttosto remoto, gli eventi recenti e la situazione internazionale complessiva, inducono oggi a ritenere che un attacco bioterroristico anche su larga scala sia di fatto possibile. In questo contesto, tutte le istituzioni di ricerca internazionali sono impegnate da un lato nella validazione puntuale degli strumenti di lotta ai vari agenti di classe A ora esistenti e, contemporaneamente, alla individuazione delle deficienze e alla programmazione di ricerche atte a colmare queste deficienze il più rapidamente possibile. Strumento da tutti ritenuto comunque essenziale per la riuscita di questa strategia è una forte collaborazione internazionale che integri e sinergizzi le forze in campo, come anche riconosciute da tutte le Istituzioni finanziatrici di grandi progetti internazionali nel settore (NIH, Programmi Quadro Europei, ecc.).

Brillante esempio di questo approccio è stato il successo goduto dai laboratori del network WHO per la lotta alla SARS, certamente non un attacco bioterroristico ma con in più tutte le caratteristiche di un nuovo e inaspettato evento epidemico su scala globale.

Fra tutti i possibili agenti di attacco bioterroristico, *Bacillus anthracis* e precisamente le sue forme sporali, è unanimemente riconosciuto come uno dei più probabili per un attacco su larga scala in futuro per quasi tutte le caratteristiche che un buon agente bioterroristico "deve" avere e cioè :

- indurre una patologia grave a basso dosaggio per via inalatoria
- avere caratteristiche di elevata resistenza ambientale
- non essere prevenibile da un efficace e sicuro vaccino esistente
- poter essere preparato in grandi quantità
- poter essere conservato e disseminato con facilità
- avere un corto periodo di incubazione (nella forma inalatoria).

Inoltre, è da considerare che un attacco bioterroristico con antrace è già avvenuto con successo (lettere all'antrace negli Stati Uniti) sia pure non nelle forme e negli scenari catastrofici più comunemente immaginati.

Quantunque molte siano le conoscenze già possedute sull'agente della malattia e sulla malattia stessa, esistono molti gap di conoscenze che è necessario affrontare organicamente per

poter disporre di strumenti efficaci e sicuri di prevenzione e controllo di un eventuale attacco bioterroristico.

Oltre a nuove ricerche di base, è soprattutto necessario traslare l'ampia mole di ricerche già in corso in utili strumenti di lotta, attraverso progetti di ricerca applicata e operativa, in particolare mirati a generare:

- Test diagnostici sicuri e affidabili sul campo e in laboratorio
- Farmaci innovativi
- La preparazione laboratoristica ad un eventuale attacco.

La sinergia fra i migliori gruppi di ricerca italiana e americana impegnati nel settore o reclutati *ex novo* potrà costituire il valore aggiunto per la rapida generazione di nuovi strumenti. La collaborazione pubblico-privato con meccanismi di cofinanziamento è anche da ritenersi fondamentale, con l'individuazione e la generazione di piattaforme e reti integrate di validazione diagnostica e *high-throughput* screening di nuovi prodotti terapeutici nonché per la generazione di vaccini e anticorpi terapeutici.

Resoconto attività 2007

L'attività del 2007 ha completato le linee di ricerca del programma in tutti i settori dalla diagnostica alla generazione di un vaccino anti-antrace già sperimentato nel modello animale. Tutte le UO hanno collaborato attivamente nel raggiungere gli obiettivi proposti con un largo numero di pubblicazioni internazionali.

Attività programmata 2008

L'attività del 2008 concluderà il progetto esaminando in particolare le applicazioni diagnostiche avanzate, con applicazione delle tecnologie più evolute e già sperimentate per l'antrace anche ai batteri di classe bioterroristica A cioè *Francisella tularensis* e *Yersinia pestis*. Una pubblicazione preliminare sulla biotipizzazione molecolare di questi due agenti è già stata effettuata.

Progetti tra Istituto Superiore di Sanità e *National Institutes of Health*

L'accordo con gli NIH rappresenta un importante traguardo per l'ISS per la straordinarietà e la peculiarità del rapporto di collaborazione tra i due gemelli NIH americani e ISS poiché si tratta di un accordo che per la prima volta viene coperto finanziariamente da entrambi i Paesi. Una nuova intesa che promuove progetti di ricerca su numerosi e importanti settori della biomedicina quali: le neoplasie, le malattie cardiovascolari, le malattie respiratorie, la salute della donna, le neuroscienze (che includono le malattie neurodegenerative), la ricerca sulla riabilitazione in campo medico, le malattie infettive (tra cui l'infezione da HIV/AIDS) e il tabagismo. L'accordo riserva, inoltre, una parte delle risorse per la creazione di partnership in Paesi terzi finalizzate a ridurre le disuguaglianze nella salute a livello globale. Attraverso questa azione, poi, oltre a valorizzare le eccellenze, si creano sinergie in modo nuovo con la mobilità dei ricercatori e lo scambio delle competenze, che sono parte essenziale di quest'accordo, formano una nuova importante rete per l'avanzamento della conoscenza e costituiscono un investimento importante e sistematico sui nuovi talenti in base a una visione comune della politica della ricerca.

Nell'ambito di tale collaborazione è stato individuato, valutato e deliberato, da parte del Comitato Scientifico dell'ISS, il finanziamento di circa 70 progetti che verranno portati avanti nelle varie strutture dipartimentali di Ambiente e connessa prevenzione primaria, Biologia

cellulare e neuroscienze, Ematologia, oncologia e medicina molecolare, Farmaco, Malattie infettive, parassitarie ed immunomediate, Sanità alimentare ed animale, Tecnologie e salute e nel Centro nazionale di epidemiologia, sorveglianza e promozione della salute insieme agli Istituti degli NIH di seguito elencati: *National Cancer Institute; National Institute of Allergy and Infectious Diseases; National Institute of Environmental Health Sciences; National Institute for Alcohol abuse and Alcoholism; National Institute of Neurological Disorders and Stroke; National Institute on Drug Abuse; National Institute of Mental Health; National Institute of Child Health and Human Development; Department of Transfusion Medicine; National Heart, Lung and Blood Institute; National Eye Institute; National Human Genoma Research Institute; National Institute of Aging; National Center for Complementary and Alternative Medicine; National Center for Medical Rehabilitation Research.*

Altri progetti sono stati avviati tra l'ISS e istituzioni americane finanziate dagli NIH quali: *John Hopkins University; Public Health Research Institute; Washington University School of Medicine; Rockefeller University; University of Illinois at Chicago; University School of Medicine Boston; Vanderbilt University Medical Center.*

Nel corso del 2006 si è tenuto in ISS un convegno dal titolo "ISS/NIH Collaboration Programme. 2006 Meeting" durante il quale sono stati comunicati i risultati conseguiti nell'ambito della collaborazione Italia/USA e più in particolare tra l'ISS e gli NIH. Tale convegno ha visto la partecipazione anche dei partner americani e ha riscosso grande successo, per questo motivo sono state raccolte le sintesi degli interventi dei relatori che sono state pubblicate a cura dell'ISS (*ISS/NIH Collaborative Programme. 2006 Progress Report Meeting, Rapporti ISTISAN 06/50*).

Nel 2007 i progetti esistenti hanno ricevuto ulteriori finanziamenti per continuare a svolgere le ricerche in programma e per proseguire la proficua collaborazione messa in atto anche grazie all'attività svolta in USA da giovani ricercatori provenienti da varie istituzioni nazionali che hanno usufruito di una borsa di studio.

Accordo ISS-Novartis (ex Chiron) per lo sviluppo di un vaccino combinato contro l'HIV/AIDS

Nel 2002 è stato ratificato tra l'ISS e Novartis (ex Chiron Corporation) un accordo scientifico finalizzato allo sviluppo di vaccini di seconda generazione contro l'HIV/AIDS comprendenti Tat in associazione ad altri antigeni di HIV. Obiettivo dell'accordo, finanziato pariteticamente dal Ministero della Salute e da Novartis, è la creazione di una task force accademico-industriale, competitiva a livello internazionale, volta a sviluppare ricerche innovative nel campo dei vaccini contro l'AIDS. L'accordo è fondato su risultati ottenuti indipendentemente da Novartis e ISS con i rispettivi vaccini. Il contributo di ISS è basato sull'esperienza pluriennale nel vaccino basato sulla proteina Tat, di cui si è recentemente conclusa con successo la fase I di sperimentazione clinica preventiva e terapeutica in Italia, per valutarne l'innocuità e l'immunogenicità. Novartis sta concludendo la fase I della sperimentazione clinica di un vaccino preventivo basato sulla molecola trimerica ΔV2 Env, un immunogeno di nuova concezione in grado di indurre anticorpi neutralizzanti *cross-clade* grazie ad una migliorata esposizione del dominio responsabile del riconoscimento dei co-recettori per HIV (Env V3 loop).

L'accordo prevede studi preclinici, condotti in primati non umani, volti a valutare l'efficacia della combinazione degli approcci vaccinali ISS e Novartis. Il programma di ricerca e sperimentazione è organizzato in sei fasi distinte e consecutive: i) produzione di antigeni e di

sistemi di *delivery*; ii) sfruttamento di Tat come adiuvante per Env e identificazione delle formulazioni appropriate per gli antigeni combinati; iii) studi vaccinali preclinici parenterali e mucosali nel modello murino; iv) trial preclinici di efficacia mucosali e sistemici nei primati non umani; v) produzione in condizioni GLP del candidato vaccinale selezionato per i trial clinici di fase I; vi) studi di tollerabilità e immunogenicità del candidato vaccinale prodotto in condizioni GLP per il futuro sviluppo GMP e per l'approvazione dell'uso nell'uomo.

Parte di questi obiettivi è già stata raggiunta. In particolare, nel biennio 2003-2005 l'ISS ha prodotto e validato la proteina Tat di HIV-1 (biologicamente attiva) e un mutante di Tat (Tatcys22), privo di attività transattivante. Novartis ha prodotto antigeni strutturali virali, tra cui la proteina Gag di HIV-1 e il DNA di HIV-1 esprimente Gag, il DNA e la proteina Δ V2 Env, peptidi di HIV-1 Env, la proteina Gag di SIV mac239, e adiuvanti mucosali (MF59, LT-K63). Grazie all'accordo, sono stati compiuti nel Centro Nazionale AIDS esperimenti di immunizzazione combinando Tat di HIV-1 e Gag di SIV o Tat e Δ V2-Env, nel topo e nella scimmia. Gli studi vaccinali condotti nel topo hanno evidenziato che l'associazione Tat/Env è superiore alla combinazione di Tat con Gag o di Tat con Env e Gag nell'indurre risposte immuni umorali e cellulari specifiche. Questi studi hanno indicato che la proteina Tat ha la capacità di polarizzare in senso Th1 la risposta immune cellulare, confermando dati recenti emersi dalle ricerche del Centro Nazionale AIDS.

È attualmente in corso un protocollo di vaccinazione con Tat ed Env nella scimmia in cui viene valutata la combinazione di una fase di immunizzazione sistemica con Tat/Env ad una successiva fase di *boosting* mucosale.

Resoconto attività 2007

Scopo dell'accordo ratificato nel 2002 tra l'ISS e Novartis (ex Chiron Corporation) è lo sviluppo di un vaccino innovativo rappresentato dall'associazione del vaccino ISS (Tat), con il vaccino Novartis (Δ V2 Env), entrambi in fase avanzata di sperimentazione clinica. Il programma scientifico è articolato nei seguenti sei obiettivi.

1) Produzione di antigeni e di sistemi di veicolazione

L'ISS ha prodotto e validato nuovi lotti della proteina Tat di HIV-1 (biologicamente attiva) e di un suo mutante (Tatcys22), privo di attività transattivante. Novartis ha prodotto antigeni strutturali virali di HIV-1, tra cui Gag (DNA e proteina), Δ V2 Env (DNA, proteina e peptidi), la proteina Gag di SIV, e gli adiuvanti di sua proprietà (MF59 e LT-K63). Inoltre Novartis ha prodotto nuove microparticelle, di cui detiene il brevetto, composte da polimeri di poly-lactide-co-glycolide (PLG) e da un detergente cationico, l'hexadecyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) che ottimizzano l'immunogenicità di vaccini a DNA, nota per essere piuttosto limitata specie per l'induzione di anticorpi. Infine, Novartis ha prodotto, con metodologie di sua proprietà, particelle denominate alphavirus replicon (ARP) che combinano elementi del virus Sindbis con quelli del virus responsabile della encefalite equina venezuelana (VEE). Studi preclinici hanno dimostrato che questi repliconi aumentano l'immunogenicità degli antigeni eterologhi che esprimono e hanno il vantaggio di non richiedere livelli di sicurezza superiori a BL 2.

2) Sfruttamento di Tat come adiuvante per Env e/o Gag e identificazione delle formulazioni appropriate per gli antigeni combinati

Cellule dendritiche (*Dendritic Cells*, DC) derivate da monociti del sangue periferico (MDDC) sono state utilizzate per studiare l'*uptake* di Tat da solo o in combinazione con Env o Gag e la loro attivazione in risposta a Tat. I risultati indicano che non c'è interferenza quando Tat è associato a Gag o ad Env, né in termini di *uptake*, né per quanto

concerne l'attivazione delle MDDCs da Tat. Nel corso di questi studi si è evidenziato che Tat e $\Delta V2$ Env formano un complesso che entra nelle MDDCs mediante il *pathway* di entrata di Tat. Studi volti a chiarire la rilevanza biologica di questo dato sono programmati per il 2008.

3) *Studi pre-clinici sul vaccino somministrato nel modello murino per via parenterale e mucosale*

Nel 2007 sono stati condotti tre studi di vaccinazione nel modello murino.

- Il primo studio ha valutato la somministrazione per via intranasale (IN) di un vaccino costituito dall'associazione di Tat con altri antigeni virali, in particolare il $\Delta V2$ Env, e il Gag di SIV, utilizzando come adiuvante l'LT-K63. Tutte le combinazioni sono risultate sicure e, seppur in vario grado, capaci di indurre durevoli risposte immuni umorali e cellulari, mucosali e sistemiche. In particolare, è stata confermata l'adiuvanza di Tat anche dopo somministrazione mucosale e l'assenza di interferenza fra i vari antigeni quando amministrati insieme (Caputo et al, *Vaccine* 26:1214-1227, 2008).
- Il secondo studio ha valutato l'efficacia di un vaccino costituito da Tat, Env e Gag e somministrato, in topi transgenici per HLA-A2, per via intramuscolare con varie modalità: solo DNA, solo proteine, o mista (*prime-boost* eterologo: DNA per il *priming*, proteine ricombinanti per il *boost*, o viceversa). Per la vaccinazione con le proteine è stato utilizzato l'adiuvante MF59 di proprietà della Novartis. Terminata l'immunizzazione (tre somministrazioni) gli animali sono stati inoculati intraperitonealmente con splenociti murini singenici infettate con pseudovirioni HIV-1/MuLV (*murine leukemia virus*). Dieci giorni dopo gli animali sono stati sacrificati, gli splenociti raccolti e coltivati con PBMC umani per verificare la presenza di HIV. In questo modello l'efficacia maggiore (100%) è stata rilevata per il vaccino costituito da solo DNA o da DNA seguito da *boost* proteico, mentre le altre modalità di vaccinazione hanno dato un livello di protezione inferiore (Brave et al. *Vaccine* 25: 6882-6890, 2007).
- In un terzo studio, questa volta di vaccinazione sistemica, è stata valutata la capacità di Tat di espandere il repertorio di epitopi riconosciuti dai linfociti T ed appartenenti all'antigene associato alla proteina Tat. I risultati di questo studio indicano che la vaccinazione sottocutanea con Tat combinato con ovalbumina (OVA), HIV-1 Gag, HIV-1 Env, o HIV-1 $\Delta V2$ Env induce in tutti i casi un aumento di risposte cellulari Th1 e citotossiche (CTLs) dirette contro ciascuno degli antigeni menzionati rispetto a quelle rilevate dopo immunizzazione con gli stessi antigeni in assenza di Tat (Gavioli et al., *Vaccine* 26:727-737, 2008).

4) *Sperimentazioni precliniche sull'efficacia del vaccino somministrato per via sistemica e mucosale in primati non umani*

Nel 2007 si è concluso il protocollo sperimentale iniziato nel 2006 (vedi rendiconto precedente) nel quale si è valutata l'immunogenicità e l'efficacia della vaccinazione con Tat e $\Delta V2$ Env in cui ad un *priming* mucosale (IN, x3 con LT-K63) è seguito un richiamo sistemico (SC, x2 con Alum). Nel corso dell'immunizzazione non si è evidenziato alcun effetto indesiderato a conferma dell'innocuità del vaccino. Per quanto concerne le risposte immuni, anticorpi anti-Env sono comparsi in tutti gli animali vaccinati (6/6) solo dopo il primo *boost* sistemico, mentre dopo il *priming* IN erano presenti in quattro delle sei scimmie. Un simile andamento è stato registrato anche per gli anticorpi anti-Tat che erano rilevabili in cinque dei sei animali solo dopo i due *boost* sistemici. Per quanto concerne l'immunità cellulare risposte proliferative specifiche anti-Env e Tat erano

misurabili in tutti gli animali vaccinati solo dopo il *boost* sistemico, in sostanziale accordo con il *pattern* di produzione di citochine misurato mediante ELISpot che vedeva una netta prevalenza di risposte positive per IL-2 rispetto a IFN-gamma o IL-4.

Nell'insieme i dati indicano una buona immunogenicità del vaccino che però richiede un richiamo sistemico per evidenziarsi adeguatamente, ad indicare una limitata capacità del *priming* mucosale ad indurre risposte sistemiche.

Otto settimane dopo l'ultimo *boost* gli animali sono stati inoculati per via intrarettale con 70 MID50 di SHIVSF162P4cy595. Uno dei sei macachi vaccinati è rimasto aviremico mentre negli altri cinque c'è stata una notevole riduzione, statisticamente significativa, del picco di viremia plasmatica rispetto alle scimmie di controllo, ad indicare un controllo precoce dell'infezione. Questi dati hanno trovato conferma nell'analisi del contenuto provirale nei vari tessuti. Mentre a livello rettale il numero di copie provirali rilevato nelle scimmie vaccinate era comparabile a quello riscontrato nei controlli (ad esclusione dell'unica scimmia vaccinata e non infetta nella quale non è stata evidenziata alcuna presenza di provirus, esempio di probabile immunità sterilizzante), nei linfonodi inguinali questo era significativamente ridotto ad indicare un efficace contenimento della disseminazione del virus a livello sistemico nei macachi vaccinati.

Nel 2007 è stato iniziato un nuovo protocollo di vaccinazione sistemica con le proteine Tat e ΔV2 Env nel quale due *priming* intradermici (ID, 0 e 4 settimane) sono seguiti da due richiami sottocute (SC, 24 e 36 settimane). Per i richiami le proteine sono state inoculate insieme con l'adiuvante Alum. I gruppi sperimentali, costituiti ciascuno da otto animali, includevano un gruppo inoculato solo con Tat (gruppo A), solo con ΔV2 Env (gruppo B), con entrambe le proteine in rapporto equimolare (gruppo C), o con il solo adiuvante o nulla (controllo, gruppo D). La vaccinazione è stata completata nel febbraio 2008, come le precedenti è risultata innocua, ed esperimenti sono in corso per determinarne l'immunogenicità. Risultati preliminari dimostrano l'induzione di risposte anticorpali contro Env dopo il primo richiamo SC nella maggioranza degli animali vaccinati con ΔV2 Env (gruppo B: 8/8; gruppo C: 5/8), mentre anticorpi contro Tat sono stati rilevati solo in quattro scimmie del gruppo A (Tat da solo) ed erano di tipo IgM. Per valutare l'efficacia della vaccinazione, 14 settimane dopo l'ultimo *boost* gli animali saranno inoculati per via intrarettale con 70 MID50 di SHIVSF162P4cy595.

- 5) *Produzione GLP del candidato vaccinale selezionato per le sperimentazioni cliniche di fase I*
La Novartis ha preparato entrambi i sottotipi B e C delle proteine di Env (ΔV2 Env) in condizioni di GMP e sono disponibili per test preclinici e clinici insieme con il candidato vaccinale Tat prodotto in condizioni di GMP. Attualmente è in corso la valutazione della stabilità a lungo termine del sottotipo C di ΔV2 Env che si concluderà nel 2010.

Analogamente, ISS ha identificato in Italia la struttura per la produzione di Tat GMP, che è stato prodotto e rilasciato come richiesto dall'attuale normativa regolatoria. Gli studi di stabilità a lungo termine hanno dimostrato che il Tat GMP ritiene la sua attività biologica per due anni.

I protocolli per la sperimentazione clinica sono stati preparati ed è iniziato lo scambio di informazioni fra ISS e Novartis necessario per la preparazione dei documenti regolatori richiesti per la conduzione in Italia di un trial clinico di fase I con il vaccino basato sulla combinazione di Tat e ΔV2 Env.

- 6) *Studi atti a valutare la sicurezza e l'immunogenicità del candidato vaccinale prodotto in GLP in piccoli animali come richiesto per l'approvazione del suo uso nell'uomo*

A questo riguardo ISS ha condotto studi, in un modello murino immunocompetente, per accertare l'innocuità e immunogenicità di Tat GMP e del sottotipo C del ΔV2 Env GMP,

dopo inoculo singolo o multiplo delle due proteine somministrate singolarmente o insieme. Il protocollo sperimentale, identico a quello che verrà sperimentato nell'uomo, prevedeva due *priming* per via intradermica con le proteine senza adiuvanti, seguiti da due richiami sottocute, questa volta insieme all'adiuvante Alum. I risultati ottenuti dopo singola o multipla somministrazione del vaccino Tat/Env indicano che questo è sicuro e che l'immunogenicità, valutata come risposta anticorpale contro i due antigeni, della combinazione Tat/Env è superiore a quella ottenuta vaccinando con le singole proteine.

Attività programmata 2008

Per l'anno 2008 il programma continuerà, secondo gli obiettivi indicati nell'accordo, il cui scopo ultimo è l'ottenimento di un vaccino combinato contro l'HIV-1/AIDS. Ovviamente sono anche previsti nuovi studi volti a caratterizzare sia aspetti biochimici e molecolari dell'interazione fra Tat ed Env che studi virologici e immunologici volti a stabilire la rilevanza patogenetica nel corso dell'infezione primaria e nella fase cronica dell'interazione Tat/Env e ottenere informazioni rilevanti per lo sviluppo di un vaccino preventivo e terapeutico.

Verranno proseguiti gli studi volti a caratterizzare l'attività di adjuvanza di Tat su diversi tipi cellulari (monocitarie, dendritiche, endoteliali, NK, B, e T) a livello di immunità innata e adattativa (umorale e cellulare) in risposta all'immunizzazione con Tat ed Env.

Scopo ultimo è l'identificazione di risposte che correlino con un buon controllo dell'infezione, al fine di poterle riprodurre in corso di vaccinazione e dopo *challenge*.

Per quanto concerne gli studi preclinici, verrà concluso lo studio attualmente in corso (vedi sopra). Un protocollo identico di fase I verrà condotto nell'uomo e perciò consentirà di confrontare, pressoché in parallelo, la sicurezza e l'immunogenicità dello stesso vaccino in primati non umani e nell'uomo. Nella scimmia si procederà poi al *challenge* intrarettale con SHIVSF162P4cy595 per valutare l'immunità conferita dalla vaccinazione.

AIDS Vaccine Integrated Project (AVIP)

Vaccini basati su prodotti di geni strutturali (Env/Gag/Pol), da soli o in combinazione, non sono stati capaci di prevenire l'infezione con SIV/HIV nel modello preclinico, mentre vaccini basati sui geni regolatori (Tat/Rev/Nef) sono stati capaci di contenere la replicazione virale e di bloccare la progressione clinica dell'infezione. Un vaccino basato sulla combinazione sia di geni strutturali che regolatori, potrebbe avere una efficacia superiore poiché indurrebbe risposte immuni contro antigeni virali sia precoci che tardivi. La missione del progetto AVIP è quella di sviluppare nuovi vaccini preventivi e terapeutici da utilizzare in trial clinici di fase I in Europa nell'arco dei cinque anni di durata del progetto. A questo scopo sono stati selezionati quattro candidati vaccinali sulla base di due presupposti: i) combinazione di geni regolatori di HIV (Tat, e/o Rev, e/o Nef) con geni strutturali (Env, e/o Gag/Pol), e ii) lo stadio di avanzamento dei singoli candidati vaccinali con l'inclusione di studi di efficacia in modelli preclinici. Il razionale e l'obiettivo di questi vaccini è l'induzione di risposte immuni antivirali che, modificando sin dall'inizio l'interazione virus-ospite, assicurino il controllo della replicazione virale e, conseguentemente, la progressione clinica dell'infezione e, a causa della ridotta carica virale, anche la trasmissione di HIV ad individui sani. Questa strategia sarà utilizzata sia in approcci preventivi che terapeutici che prevedono la combinazione di geni e prodotti genici sia regolatori che strutturali. A questo proposito, i partecipanti a questo Consorzio hanno introdotto modificazioni nel gene Env di HIV (delezione nella regione V2 di Env) che permettono la esposizione di epitopi immunogenici che sono conservati tra i diversi sottotipi virali. Questo

dovrebbe impedire la selezione o la comparsa di mutanti virali non più controllabili dal sistema immune.

In particolare, la formulazione dei candidati vaccinali selezionati dall'AVIP si basa su due strategie fondamentali. In un primo approccio il vaccino è costituito da una proteina regolatoria (Tat o Nef) e una proteina strutturale (Env V2 deleto - deltaV2 Env).

1. Tat ± deltaV2 Env (*prime* e *boost* con proteina)
2. Nef ± deltaV2 Env (*prime* e *boost* con vettori virali e proteina)

Lo scopo di questa combinazione è quello di valutare il contributo del singolo gene regolatore nell'indurre immunità protettiva sia di tipo cellulare che umorale (anticorpi neutralizzanti).

Un secondo approccio che vuole mimare il vaccino basato sul virus vivo attenuato, considera invece la combinazione di molteplici proteine sia strutturali che regolatorie.

3. Multi-HIV antigeni/epitopi [geni rev, tat, nef, gag (p17, p24), e più di 20 epitopi T delle proteine Pol, Proteasi ed Env di *clade* virali diverse (A,B,C, FGH).

4. HIV vaccino basato su una combinazione multigenica (nef, rev, tat, gag, rt, env).

L'efficacia dei diversi antigeni che compongono i candidati vaccinali di AVIP, è stata dimostrata in modelli preclinici. Inoltre, per alcuni di questi antigeni (HIV Tat *clade* B, MVA-HIV Nef *clade* B, Multi-HIV antigeni/epitopi *clade* B, HIV multigene *clade* B) trial clinici sono stati già completati, o sono in corso (HIV deltaV2 Env *clade* B, Multi-HIV antigeni/epitopi multiclade, HIV multigene *clade* A,B,C), mentre per altri (HIV Tat + deltaV2 Env e HIV Nef + deltaV2 Env) i trial clinici sono iniziati nel 2006.

L'analisi comparativa dei trial preclinici e clinici di fase I di questi candidati vaccinali permetterà la selezione di candidati vaccinali da valutare in trial clinici di fase II/III nell'ambito di una partnership tra Europa e Paesi in via di sviluppo (EDCTP).

Le attività del progetto AVIP sono le seguenti:

- Studi preclinici (topi, scimmie) per la selezione della migliore formulazione e protocollo vaccinale dei candidati da testare in trial clinici di fase I.
- Produzione in GMP degli antigeni vaccinali, valutazione della tossicità, preparazione del dossier per l'approvazione dell'uso sull'uomo.
- Esecuzione di trial clinici preventivi di fase I e follow-up.
- Esecuzione di trial clinici terapeutici di fase I e follow-up.
- Studi immunologici focalizzati al riconoscimento *cross-clade* dei candidati vaccinali di AVIP preparatori a futuri trial clinici di fase II/III da condurre nei Paesi in via di sviluppo.
- Utilizzo di *European Vaccine against AIDS (EVA) Programme – Centralised Facility for AIDS Reagents (NIBSC, UK)* come banca centralizzata che, attraverso la distribuzione di reagenti standardizzati, supporta tutte le attività di ricerca, sviluppo e dimostrazione di AVIP.

Tra gli scopi generali del progetto vi sono anche le attività di formazione e trasferimento tecnologico considerate come preparatorie per studi clinici di fase avanzata da condurre nel prossimo futuro in Europa e nei Paesi in via di sviluppo. Il Consorzio AVIP è costituito da 20 centri di ricerca di provata esperienza e professionalità appartenenti a diversi Paesi europei (Italia, Germania, Francia, Finlandia, Svezia, Regno Unito) e al SudAfrica.

Il progetto AVIP è coordinato dal Centro Nazionale AIDS, e finanziato dalla Comunità Europea (FP6).

Il Consorzio è governato da una *Steering Committee* che, a sua volta, si avvale di un *Advisory Board* e *Monitoring Committee*, i cui membri sono esperti internazionali. Inoltre, l'AVIP pone particolare enfasi in programmi di educazione e ha creato l'*AVIP International*