

Il virus dell'AIDS: origine, struttura, variabilità genetica e ricerche Bio-mediche dei trattamenti e dei vaccini

Jacques Simporé, *Università di Ouagadougou; Università di Roma Tor Vergata;*
Maria Esposito, *Università di Messina*

Che cos'è l'AIDS? Da dove viene? Quale agente patogeno lo provoca. Da 25 anni l'HIV/AIDS colpisce senza pietà le sue vittime. L'intera comunità scientifica, i malati, le loro famiglie, si pongono davanti ad un quesito carico di attese: si troverà un farmaco o un vaccino contro questo flagello?

Oggi non ci sono dubbi: l'HIV (Human Immunodeficiency Virus), è l'agente eziologico che provoca l'AIDS o Sindrome da Immundeficienza Acquisita. Sindrome, perché si presenta come un insieme di patologie correlate a un'unica causa, l'immunodeficienza provocata dal virus HIV, e acquisita, perché la si contrae per contagio. Secondo il rapporto annuale dell'OMS, presentato a Ginevra l'11 maggio 1999, tra le cause dei decessi nel mondo, l'HIV/AIDS occupa il quarto posto, uccidendo più persone di ogni altra patologia infettiva. Dopo la malaria, è la seconda causa di morbilità nei Paesi in via di sviluppo. Nel mondo, 39,4 milioni di adulti vivono con l'HIV, di cui: 14,8 milioni sono donne e 1,2 milioni bambini di età inferiore a 15 anni. Dal 1980 ad oggi, più di 16,3 milioni di persone sono morte a causa di tale sindrome. Più del 95% delle persone con HIV vive nei Paesi in via di sviluppo ed è proprio in questi paesi, nel corso

degli ultimi anni, che si è verificato il 90% dei decessi per AIDS. In Nord America ed Europa Occidentale, grazie alle nuove terapie che garantiscono il prolungamento della vita dei contagiati, le morti di AIDS si sono significativamente ridotte. La diffusione del virus non è però diminuita, dato il numero delle persone sieropositive continuamente in crescita. All'alba del terzo millennio, grazie agli studi epidemiologici sull'HIV/AIDS³, una vera sfida è lanciata al mondo. Ma per sradicare questo flagello bisognerà:

– sviluppare la prevenzione del contagio mediante una scrupolosa e puntuale opera di educazione sanitaria con il coinvolgimento dei soggetti con comportamenti a rischio, attraverso una capillare informazione riguardo alle vie di trasmissione del virus: a) sessuale; b) trasmissione verticale madre-bambino (TMB); c) infezione parenterale attraverso fluidi biologici umani contaminati (sangue, liquido seminale maschile, secrezioni cervicali femminili, latte materno, liquidi amniotici).^{4,5,6} Secondo le ricerche attuali, il virus dell'AIDS si trova anche in altri fluidi biologici, potendo essere isolato in coltura in vitro dalla saliva, dal liquido cefalorachidiano, dalle uri-

³ ONUSIDA, *Rapporto sull'epidemia mortale dell'HIV/AIDS 1999*.

⁴ BARON S. – POST J. – RICHARDSON C.J. – NGUYEN D. CLOYD, *Oral transmission of human immunodeficiency virus by infected seminal fluid and milk, a novel mechanism*. J. Infect Dis 2000; 181: 498-504.

⁵ SEMBA RD. KUMWENDA N. – HOOVER DR ET AL. *Human immunodeficiency virus load in breast milk, mastitis and mother-to-child transmission of human immunodeficiency*. J. Infect Dis 1999, 180: 93-98.

⁶ KOVACS A. – WASSERMAN STEVEN S. – BURNS DAVID – WRIGHT DAVID J. – CHON JOHNATHAN – LANDAY ALAN – WEBER KATHLEEN, CHEN MARDGE – LEVINE ALEXANDRA, MONKOFF HOWARD, MIOTTI PAOLO, PALEFSKY JOL – YOUNG MARY REICHELDERFER PATRICIA. *Determinants of HIV-1 shedding in the genital tract of women*, The Lancet, Volume 358, November 10, 2001, p. 1593-1601.

- ne,^{7,8} seppure in concentrazioni non sufficienti per essere contagioso, a meno che non esistano lesioni orali o gengiviti con conseguente perdita di sangue;
- estendere ai malati una terapia combinata, come la “Tri-terapia” (con almeno tre tipi di farmaci),⁹ potenzialmente capace sia di esplicitare un più efficace blocco della replicazione virale sia di prevenire la selezione dei mutanti resistenti ai vari farmaci, diffondendo con urgenza la prevenzione della trasmissione verticale madre-bambino dell’HIV (PTMB-HIV) nei Paesi in via di sviluppo;
 - un impiego molto precoce delle terapie antiretrovirali, da iniziare quando la replicazione virale è ancora scarsa;
 - incrementare la ricerca sui vaccini contro l’HIV/AIDS.

Allo scopo di conoscere più da vicino quella che fino a pochissimi anni fa veniva considerata la “Peste del XX secolo”, tratteremo per sommi capi i seguenti argomenti:

- Storia e origine dell’HIV
- Struttura e variabilità del meccanismo d’infezione
- Differenti tipi di test HIV
- Cura dell’HIV/AIDS e prospettive di ricerca per il futuro.

I. STORIA E ORIGINI DELL’HIV

A. Storia

1980 – Michael Gottlieb, immunologo dell’UCLA Medical Center di Los Angeles, utilizzando la tecnica del T cell-counting, testa tre casi di immunodeficienza in giovani omosessuali statunitensi che presentano segni clinici particolari: dimagrimento, micosi, febbre, *Candida* buccale e polmonite. Precedentemente, tali malattie non erano associate a decorsi clinici particolarmente gravi in soggetti immunocompetenti.

1981 – Diversi medici statunitensi informano su alcuni casi simili ai precedenti, tutti soggetti omosessuali affetti da *Pneumocystis carinii pneumonia*. Il New York Times pubblica la notizia il 3 luglio dello stesso anno: la malattia inizia subito ad essere legata all’omosessualità. In breve tempo i casi diagnosticati salgono a 422. Le morti registrate per questa nuova malattia sono 159. I primi studi dimostrano le vie di trasmissione sessuale ed ematica di questa infezione sconosciuta, che da quel momento si chiamerà Acquired Immuno Deficiency Syndrome (AIDS).

Maggio 1983 – Il virologo francese Luc Montagnier e i suoi collaboratori dell’Institut Pasteur di Parigi, isolano dal linfonodo di un uomo a rischio di sviluppare l’Aids, quello che sembrava essere un nuovo retrovirus umano, al quale viene dato il nome di LAV (Lymphadenopathy Associated Virus).

Settembre 1983 - Montagnier presenta al Governo francese la richiesta di brevetto del test per individuare la presenza di anticorpi verso HIV.

Maggio 1984 – Il medico statunitense Robert Gallo, del National Cancer Institute di Bethesda, annuncia, nel corso di una conferenza stampa, la scoperta del retrovirus responsabile dell’AIDS, che chiamerà HTLV-III.

1985 – Quest’anno è segnato da tre grandi avvenimenti:

- i test che hanno permesso la scoperta dell’agente patogeno dell’AIDS vengono immessi sul mercato;
- negli Stati Uniti iniziano i primi trials clinici con l’obiettivo di rendere disponibile il prima possibile armi farmacologiche in grado di contrastare l’HIV;
- negli USA, i Centers for Diseases Control and Prevention (CDC) organizzano ad Atlanta la I^a Conferenza Internazionale sul-

⁷ HURAUX J.M., *Quantification du HIV*, Virology, vol. 3, n. 6, novembre 1999, 486-7.

⁸ SHUGARS DC - SLADE GD - PATTON LL. – FISCUS S.A., *Oral and systemic factors associated with increased levels of human immunodeficiency virus type 1 RNA in saliva*, Oral Surg Oral Pathol Oral Radiol Edod 2000, 89; 432-40.

⁹ Montaner JSG – Hogg RS – O’Shaughnessy MV., *Emerging international consensus for use of antiretroviral therapy*. Lancet 1997, 349:1042.

l'AIDS sponsorizzata dall'OMS: 2000 ricercatori in rappresentanza di 30 nazioni prendono coscienza dell'esistenza del focolaio africano. Si inizia a parlare di trasmissione eterosessuale.

1986 - La comunità scientifica internazionale adotta il nome di HIV (Human Immune-deficiency Virus) al posto di LAV e di HLTV 3. Nel corso dello stesso anno, Luc Montagnier e la sua équipe isolano, in collaborazione con i ricercatori dell'Ospedale Claude Bernard di Parigi e dell'Ospedale Ega Moniz di Lisbona, un secondo virus, l'HIV-2.

1987- Mentre l'OMS ha istituito il *Global Programme on AIDS*, la Food and Drugs Administration (FDA), approva la prima molecola contro l'AIDS: è l'*azidovudina* (AZT), un inibitore della trascrittasi inversa.

1990-1995- Dalla mono-terapia, seguita da numerosi pazienti, si passa alla bi-terapia. Lo studio Delta e l'ACTG 175 indicano senza dubbio che la strada da adottare è la terapia di combinazione. Vengono registrati il *saquinavir*, il primo inibitore della proteasi, una nuova e rivoluzionaria classe di farmaci, e il *3TC*, inibitore della trascrittasi inversa, particolarmente sinergico con altri inibitori.

1996 - È l'anno di svolta. La monoterapia e anche la duplice terapia sono da abbandonare. Il ricercatore anglocinese David Ho, propone una nuova cura: la "tri-terapia". Sono disponibili due tipi di medicinali, che vengono somministrati in diverse associazioni. Si tratta "degli inibitori della trascrittasi inversa" e degli "inibitori della proteasi". Inibendo la proteasi si formano particelle virali immature non infettive. La tri-terapia, per funzionare in maniera ottimale, dovrebbe cominciare immediatamente dopo il contagio, cioè al momento della prima infezione.

Ancora, negli ultimi sei mesi dello stesso anno, viene presentato un nuovo metodo di cura sperimentata negli Stati Uniti nota come HAART (Highly Active Anti-Retroviral Therapy), che mostra indubbi e impressionanti risultati a breve termine sugli effetti della carica virale, che ritardano la progressione della malattia e prolungano la vita. L'HAART è la doppia combinazione di inibitori e *cocktail* di tre o

quattro farmaci e si tratta di un trattamento antivirale aggressivo, del quale tuttavia mancano dati sui risultati a lungo termine, sugli effetti collaterali, sui tempi di assunzione.

Nello stesso anno viene messo a punto un metodo per misurare la carica virale.

1998 - Nonostante la tri-terapia inibisca la replicazione dell'HIV, riducendone la presenza nel plasma a livelli molto bassi prolungando la vita del paziente, si manifesta scetticismo nei riguardi di tale regime farmacologico. Tra le ragioni:

- non permette di eliminare totalmente il virus;
- il regime è piuttosto complesso, difficile da attuare e potrebbe durare tutta la vita;
- non è privo di effetti collaterali gravi, tra i quali il rischio di interferire con il processo di duplicazione del DNA che avviene al momento della mitosi, provocando effetti tossici, specialmente nelle cellule in rapida divisione come quelle del midollo osseo;
- la comparsa di ceppi virali resistenti, a causa dell'alto grado di mutazioni del virus, che provocherebbero seri problemi per il trattamento con gli anti-retrovirali (ARV), seppure, generalmente, l'impiego di questi diversi composti in modo alternato o combinato, può ritardare la comparsa dei ceppi resistenti, ridurre la tossicità e migliorare la sopravvivenza dei pazienti;
- il cocktail di farmaci (ne sono disponibili diversi tipi) è estremamente costoso, senza considerare gli esami necessari per controllare l'efficacia della cura, e ne impedisce così la diffusione nei Paesi meno ricchi.

1999-2001 - Per combattere l'HIV e sradicarlo, si aprono nuove strade per la ricerca e possibili sviluppi nella terapia antivirale, come l'immunizzazione intracellulare, la immunoterapia genetica, la terapia genica per farmacomodulazione.

B. Origine

In una ricerca retrospettiva, su campioni sierici raccolti per altri fini nel 1959, sono state effettuate analisi di laboratorio che hanno evidenziato la presenza di anticorpi contro HIV. Allo stesso anno sembrano risalire anche i casi clinici più precoci, come quello di un paziente deceduto a Manchester in Inghilterra, a

seguito di un'infezione da *Cytomégalo*virus e *Pneumocystis carinii*.

Il DNA estratto da questi campioni è stato analizzato con la Polymerase Chain Reaction (PCR) sul gene *gag*, confermandone la sieropositività.¹⁰

La storia evolutiva dell'HIV è stata ampiamente studiata con i metodi classici della biologia molecolare, fornendo importanti informazioni per la ricostruzione filogenetica e la determinazione del cladogramma del virus dell'AIDS.

Tale ricostruzione non solo mostra come l'HIV-1 e l'HIV-2 appartengono a ceppi differenti, ma permette di tracciare il dendrogramma dei diversi tipi di virus responsabili delle immunodeficienze:¹¹ scimmie (SIVmac/macaco; SIVcpz/scimpanzè), felini (FIV), bovini (BIV), umani (HIV-1/HIV-2) (cfr. schema 1).

II. STRUTTURA, MECCANISMO D'INFEZIONE E SVILUPPO DELL'HIV

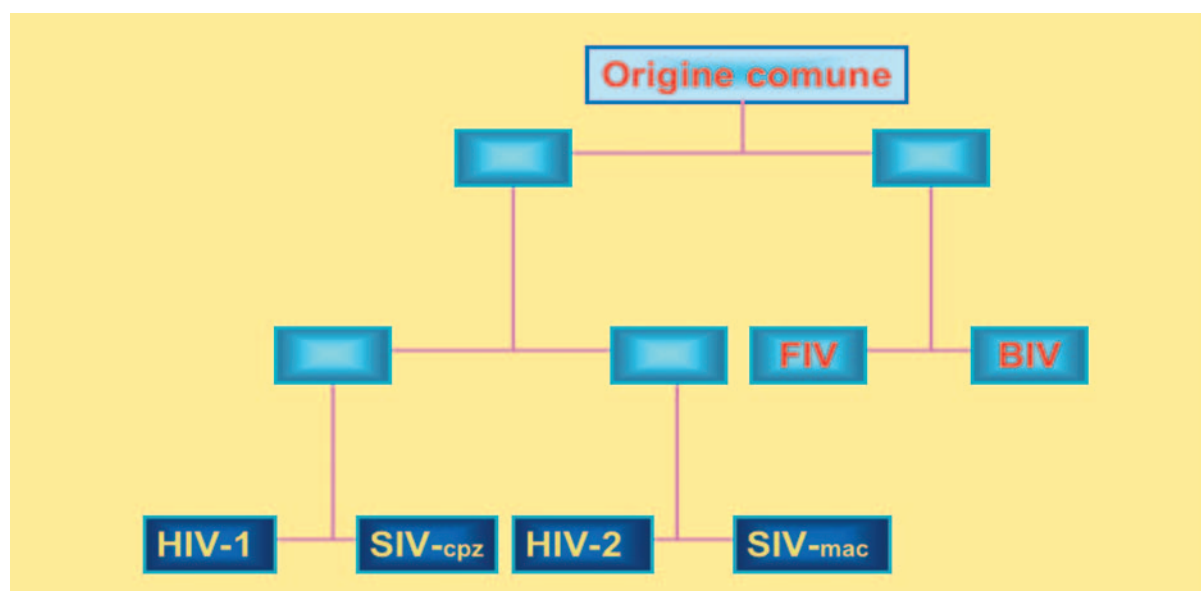
A. Struttura dell'HIV

Lo studio della struttura genetica dell'HIV ci permette di comprenderne la complessità, alcune delle sue manifestazioni cliniche e biologiche, di indagare possibili strategie per la ricerca terapeutica.

L'HIV-1 è ormai presente nel mondo intero, mentre l'HIV-2 è localizzato soprattutto in alcune zone dell'Africa. È così possibile che numerosi individui siano portatori di entrambi i ceppi virali.

Il virus dell'immunodeficienza umana è un retrovirus,¹² appartenente al sottogruppo dei *Lentiviridi*, con particella virale del diametro di 0,1 µm ed un genoma ad Acido Ribonucleico (RNA). Dall'esterno verso l'interno, osserva-

Schema n. 1 - Dendrogramma filogenetico dell'HIV



- HIV - 1 = Virus d'immunodeficienza umana tipo 1
- HIV - 2 = Virus d'immunodeficienza umana di tipo II
- SIV - cpz = Virus d'immunodeficienza dello scimpanzè
- SIV - mac = Virus d'immunodeficienza del macaco
- FIV = Virus d'immunodeficienza felina
- BIV = Virus d'immunodeficienza bovina

¹⁰ WATSON JAMES D. – GILMA MICHAEL, DNA recombinant. Zanichelli, Bologna 1994, 2ª edizione.

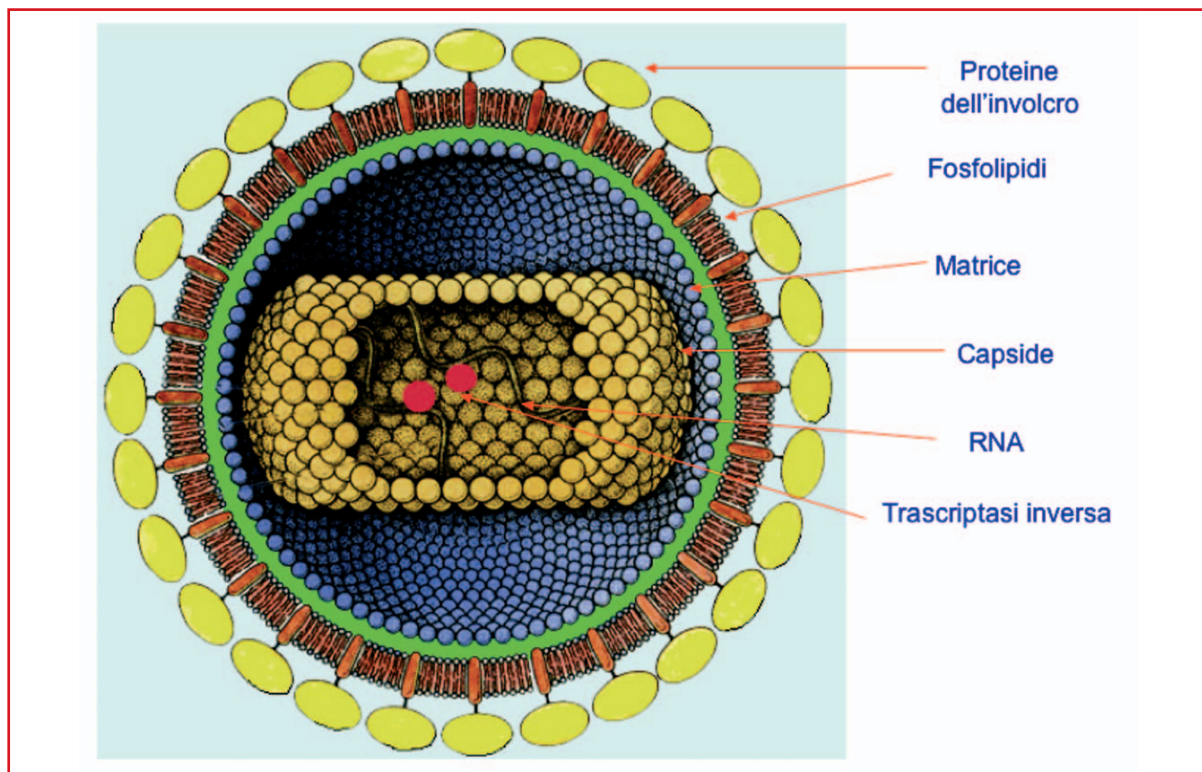
¹¹ SIMPORE JACQUES, Nouvelles Frontières de la médecine e de la génétique moléculaire, ver la globalisation thérapeutique, Università di Brescia 2001, pp. 128-132.

¹² Gallo RC – Montagnier L. The chronology of AIDS research. Nature 1987; 326: 435-436.

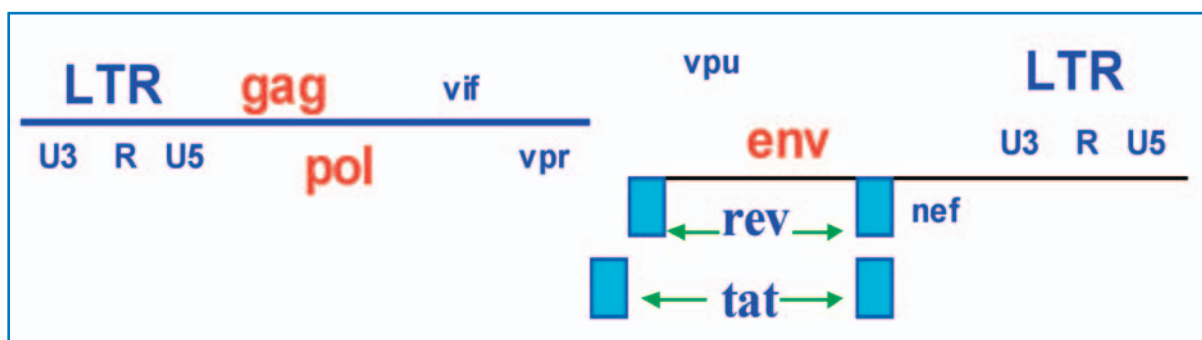
mo l'involucro del virione, la matrice e il capsid. I virioni comprendono un core nucleoproteico circondato da una membrana a doppio strato lipidico che contiene le proteine virali dell'envelope (*env*) di superficie e di transmembrana. Il core ribonucleoproteico è costituito da due copie di RNA genomico virale e da enzimi virus-associati (trascrittasi inversa, proteasi, integrasi) (cfr. schema 2). È stata determinata la sequenza nucleotidica completa dell'RNA virale, che ha reso possibile l'identificazione e lo studio delle proteine codificate. Il genoma dell'HIV consiste di circa

9000 nucleotidi e contiene nove geni, tre dei quali, fondamentali per il suo ciclo vitale, sono comuni a tutti i retrovirus: *gag* codifica per le proteine del capsid, *env* codifica per le proteine del rivestimento e *pol* codifica sia la trascrittasi inversa che l'integrasi. La presenza degli altri sei geni rende il genoma dell'HIV insolitamente complesso, poiché alcuni codificano proteine che regolano l'espressione dei geni stessi del virus. Come indicato in figura, uno *splicing* dell'RNA è necessario per produrre *rev* e *tat* (determinanti virali della trascrizione) (cfr. schema n. 3).

Schema n. 2 - Struttura dell'HIV



Schema n. 3 - Disposizione dei geni dell'HIV



B. Meccanismo d'infezione e sviluppo dell'HIV

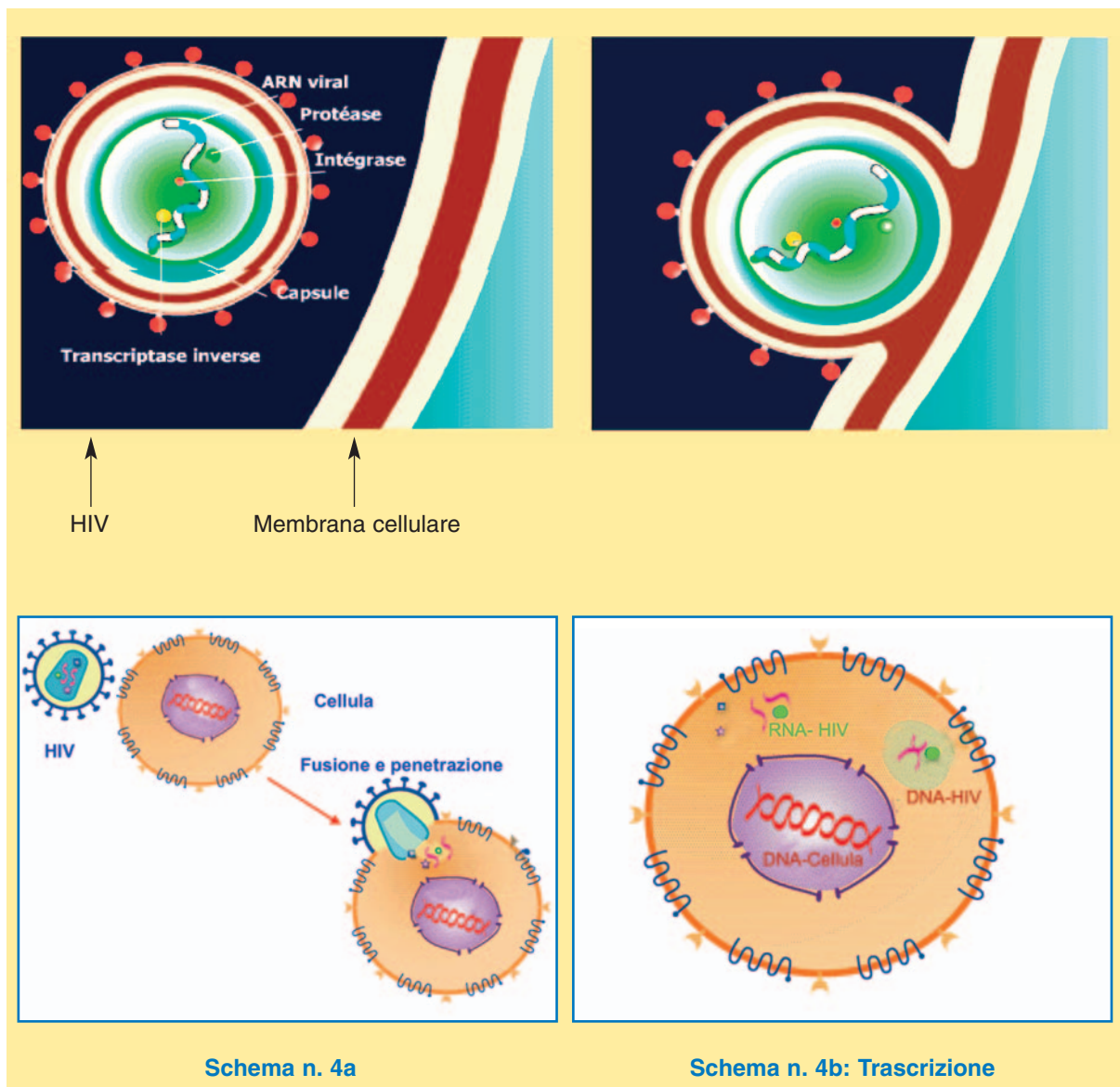
Il meccanismo d'infezione dell'HIV comporta sei tappe fondamentali, considerate dai ricercatori "il tallone d'Achille del virus", sulle quali concentrare le risorse e gli sforzi della ricerca scientifica:

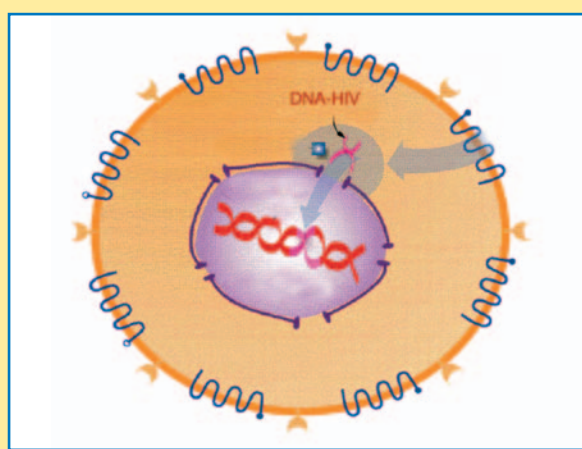
- fissazione: la particella virale si fissa alla cellula bersaglio, seguita dalla fusione delle membrane cellulari e dalla penetrazione della capsula virale (Schema 4a);
- trascrizione: penetrato nella cellula bersaglio, l'RNA virale, liberato dall'*envelope*, viene *trascritto* ad opera di un enzima vira-

le (*trascrittasi inversa*) ad acido desossiribonucleico (DNA) (Schema 4b);

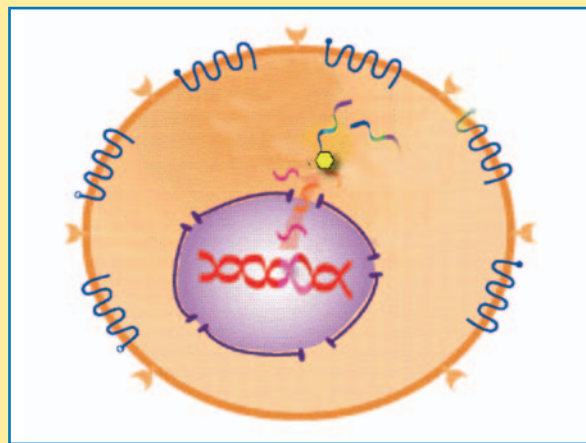
- integrazione: la doppia elica del DNA viene *integrata* nel genoma della cellula ospite (pro-virus), catalizzata dall'integrasi virale, orientando la sintesi proteica verso la produzione di nuovi virioni, da parte dell'RNA polimerasi della cellula ospite (Schema 4c);
- trascrizione e sintesi delle proteine (Schema 4d),
- assemblaggio delle nuove particelle virali, contenenti a loro volta trascrittasi inversa, seguita dalla fase germinativa (Schema 4e),
- maturazione virale dell'HIV (Schema 4f).

Schema n. 4

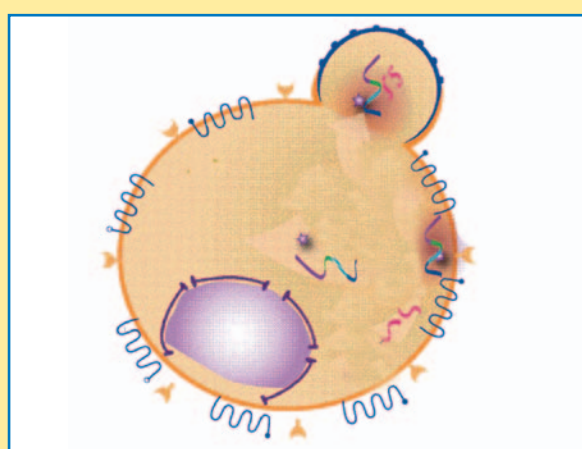




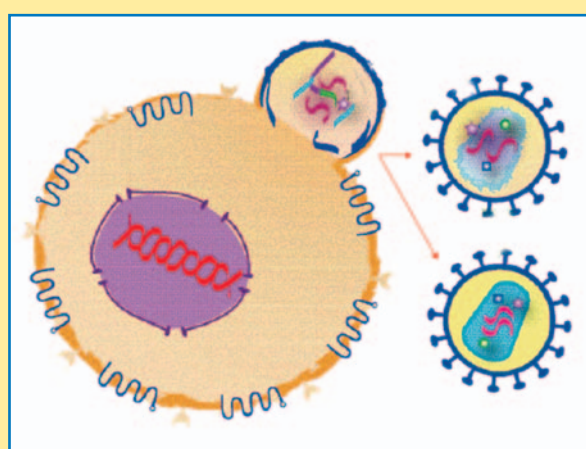
Schema 4c: Integrazione



Schema 4d: Trascrizione e sintesi delle proteine



Schema 4e: Assemblaggio



Schema 4f: Maturazione virale dell'HIV

Due caratteristiche dell'HIV sono comuni ai *Lentivirus*, consentendo una plausibile spiegazione all'assenza di risposta immunitaria dell'ospite infettato dall'HIV:

- Latenza: la copia di DNA virale costituito da una delle estremità LTR (Long Terminal Repeat), si integra nel DNA della cellula ospite. Questo pro-virus può rimanere silente per un lungo periodo prima di essere stimolato ad entrare in attività. Questa capacità di mimetizzarsi fa sì che venga trasmesso ad ogni divisione. In questa fase, il virus non trascrive né produce alcuna proteina, sfuggendo così all'azione del sistema immunitario.
- Variabilità genetica: a complicare ulteriormente ogni tentativo di trattare l'infezione con farmaci antiretrovirali (ARV), interven-

gono fenomeni di variazioni genetiche tra un paziente e un altro, tra la madre e il feto, persino nello stesso paziente. Responsabile della variabilità è soprattutto l'enzima della trascrittasi inversa del retrovirus. La replicazione virale è spesso errata e più mutazioni al giorno si sviluppano per ogni sito del genoma HIV; in questo modo, in tempi molto brevi, l'HIV sfugge alle cellule T CD8 (linfociti citotossici CTL) che inizialmente lo riconoscevano e in parte ne prevenivano la diffusione, rilasciando fattori anti HIV e distruggendo parte delle cellule infettate. Seppure altre cellule CTL riconoscano le proteine virali mutate, le continue mutazioni gradualmente diminuiscono il repertorio delle cellule T, già seriamente ridotto dalla perdita di cellule T helper CD4 (cellule bersaglio dell'HIV), inibendo la ri-

sposta immunitaria. Nella straordinaria variabilità dell'HIV è stata dimostrata la responsabilità dell'aumentata resistenza virale agli ARV.¹³

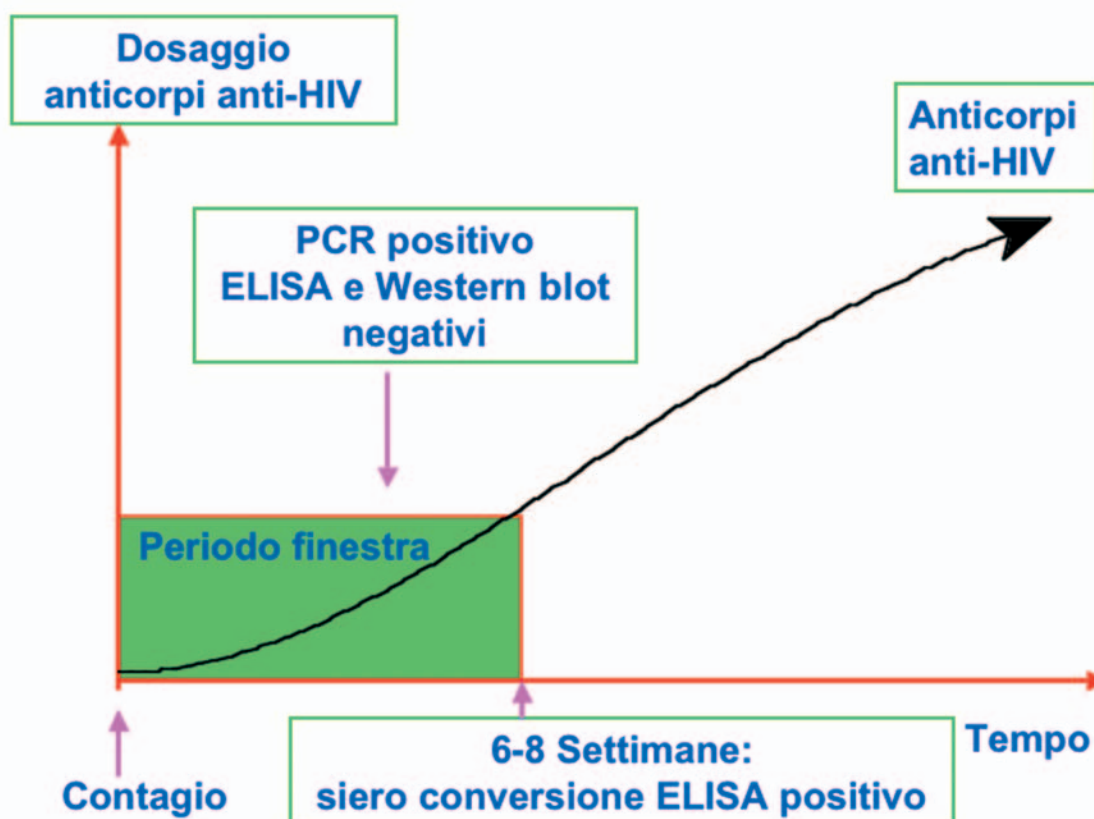
III. I DIFFERENTI TIPI DI ESAMI HIV

Il virus dell'HIV, dopo alcune settimane dal contagio, scatena una risposta immunitaria sviluppando anticorpi anti-HIV (Schema 5). In questa fase, denominata "sindrome retrovirale acuta", l'HIV si riproduce in grande quantità, circola nel sangue e si infila negli organi del sistema linfatico, in particolare linfonodi, tonsille, milza, e nel tessuto linfoide localizzato a livello dell'apparato digerente. Il virus e gli anticorpi circolanti nell'organismo possono essere testati attraverso particolari esami ematici.

A. I metodi diretti

Alcuni metodi sono indirizzati ad isolare l'HIV a partire dai linfociti o dai frammenti proteici virali. È così possibile dosare l'antigene p24, presente ad uno stadio molto precoce dell'infezione ma non evidenziabile durante tutta la fase asintomatica. L'antigene p24 (Ag p24) è una proteina del virus HIV che può essere ritrovata libera nel sangue o nei tessuti infettati dal virus. La proteina può essere presente in tutti gli stadi dell'infezione, ma prevalentemente si riscontra durante il periodo iniziale della sierconversione (cioè quando ci si infetta) e nelle fasi avanzate della malattia. La determinazione della antigenemia p24, sebbene ancora potenzialmente utile (previa dissociazione acida degli immunocomplessi) in alcune specifiche situazioni, appare dotata di bassa sensibilità ed è oggi sostanzialmen-

Schema n. 5



¹³ BRUCE ALBERTS – TENNIS BRAY - ULIAN LEWIS, *Biologie moléculaire de la cellule*, Medicine-Science, troisième édition, Parigi 1995.

te sostituita dai test di biologia molecolare (HIV-RNA, HIV-DNA).

Tuttavia il costo elevato di queste nuove tecniche, le riserva ai laboratori di ricerca altamente specializzati.

Altri metodi si avvalgono di alcune tecniche di genetica molecolare, come la PCR (Polymerase Chain Reaction) e l'RT-PCR, allo scopo di:

- a) amplificare e identificare il DNA virale integrato nella cellula ospite (HIV-DNA);
- b) titolare la viremia, ovvero la carica virale.

La ricerca del DNA virale integrato ha una sensibilità e specificità del 98% e può essere di utile impiego diagnostico durante la fase che intercorre tra l'infezione e la comparsa degli anticorpi circolanti, "periodo finestra". In particolare, la PCR è la tecnica di elezione maggiormente utilizzata nella diagnosi precoce dell'infezione neonatale. Questi bambini sono portatori degli anticorpi anti-HIV sviluppati dalla madre ed ancora presenti nel loro organismo per un periodo di 10-15 mesi dopo la nascita, potendo così sfuggire alla trasmissione verticale madre-figlio dell'HIV.

B. Metodi indiretti

Poiché l'infezione da HIV aggredisce prioritariamente il sistema immunitario, è evidente che la valutazione della competenza immunologica rappresenta un parametro fondamentale, insieme alla valutazione virologica, per ottenere un quadro preciso dello stato evolutivo dell'infezione stessa. L'esame di riferimento a tal fine è la determinazione delle sottopopolazioni linfocitarie della serie T, che consente di determinare i livelli circolanti delle cellule CD8+ (linfociti citotossici) e soprattutto CD4+ (linfociti helper), la cui quantificazione è di particolare importanza nella stadiazione del paziente sieropositivo.

- test ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) attualmente in commercio è in grado generalmente di identificare i sierri reattivi nei confronti di HIV-1 e di HIV-2. La sensibilità del test è elevatissima (> 99%), consentendo dunque di evitare i ri-

sultati falsamente negativi. Per tale motivo rappresenta il test di *screening* di primo impiego.

- Western Blot rappresenta il test di conferma, la cui positività è necessaria prima di formulare una diagnosi di sieropositività in quanto la sua elevatissima specificità (che si approssima al 100%) consente di identificare i risultati falsamente positivi che, seppur raramente, possono talora essere segnalati dal sensibilissimo test ELISA.

Tali metodiche sono però molto costose e sofisticate, pertanto non vengono utilizzate come esami di massa.

IV. LA CURA DELL'HIV/AIDS:

PROSPETTIVE DI RICERCHE PER L'AVVENIRE

Per la cura dei pazienti affetti da HIV, oggi sono disponibili diverse categorie di farmaci, i cui protocolli terapeutici, basati sulla monoterapia, la diterapia, la tri-terapia e, non ultimo, il cocktail di farmaci, hanno dimostrato un'indubbia efficacia.

Tuttavia, non tutti i pazienti possono beneficiare delle terapie multiple per diverse ragioni:

- comparsa di reazioni secondarie gravi;
- instaurarsi di uno stato di resistenza dovuto alle continue mutazioni dell'HIV;
- terapie che possono essere complesse e difficili da seguire;
- costo molto elevato, soprattutto per i Paesi in via di sviluppo.

Questi problemi non certo trascurabili, sollecitano la ricerca scientifica a proseguire non solo in vista di un vaccino o di nuove molecole, ma a spingersi verso altre possibilità terapeutiche che comprendano anche la terapia genica. Seppure alcune sperimentazioni cliniche mirate a determinare l'efficacia della terapia genica applicata all'AIDS siano già in corso, la terapia genica trova ancora oggi la sua applicazione clinica d'elezione nella cura di patologie genetiche ereditarie, di alcuni deficit immunitari acquisiti o del cancro.¹⁴

¹⁴ ANDERSON WF, *Human gene therapy*, Nature 1998; 392: 25-30.

A. Le nuove molecole antivirali in sviluppo

- Sono allo studio nuove molecole antivirali:
- inibitori della penetrazione del virus dei recettori specifici della cellula ospite;
 - inibitori nucleosidici della trascrittasi inversa (INTI);
 - inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa (INNTI);
 - inibitori della proteasi acido virale (IP).

L'utilizzazione di queste molecole ha dimostrato risultati interessanti in termini di efficacia sulle cariche virali o sui virus stessi che esprimono mutazioni.

B. Possiamo sperare di ottenere un giorno un vaccino anti-HIV?

La ricerca di un vaccino contro l'HIV ha continuato a progredire soprattutto nel corso di questi ultimi anni, anche se non ha ancora raggiunto risultati rilevanti. Sull'uomo sono già stati realizzati più di trenta trials clinici ed altri, in fase I e fase II, sono tuttora in corso.

Gli obiettivi di un vaccino contro l'HIV possono essere così sintetizzati:

- introduzione di anticorpi capaci di neutralizzare il virus, diretti contro le proteine dell'involucro (risposta umorale);
- introduzione di cellule T citotossiche (CTL) che distruggono le cellule infette.

L'elaborazione dei vaccini comprende: vaccini sotto-unitari, vaccini sintetici, utilizzazione del virus vivo attenuato da pseudo-particelle (virus-like particles), del DNA nudo e i vaccini a base di DNA ricombinante.

A questi studi, nella prospettiva di vaccini e di nuovi farmaci, di cui alcuni saranno prossimamente disponibili, deve continuare ad affiancarsi la ricerca nella direzione della terapia genetica.

C. Come l'ingegneria genetica pensa di affrontare l'HIV?

Oggi la terapia genetica, frutto dell'ingegneria genetica attuata attraverso la modifica-

zione di funzioni e capacità di singoli geni o di gruppi di geni, è molto avanzata soprattutto in oncologia ed in numerose patologie genetiche. Per quanto riguarda il trattamento dell'infezione da HIV, si è giunti alla modificazione diretta dei geni delle cellule malate e l'utilizzo di cellule già modificate.

Immunizzazione intracellulare

Mentre il vaccino protegge i soggetti non infetti, l'immunizzazione intracellulare conferisce una protezione contro il virus nei soggetti infetti. Il maggior interesse verso questa terapia risiede nella possibilità di bloccare la duplicazione della cellula infettata. Il principio è semplice e si basa sulla modificazione delle strutture genetiche delle cellule bersaglio dell'HIV (i linfociti CD4). Le cellule modificate produrranno allora dei mutanti, vere e proprie proteine virali o *leurres ARN*, che mimano l'RNA virale. Questi nuovi elementi, prodotti dalla biotecnologia, possono "ingannare" l'HIV o bloccarlo o competere con il virus nella ricerca dei substrati.

Distruzione selettiva delle cellule infette

Un altro interessante utilizzo della terapia genetica nell'infezione da HIV, mira a distruggere specificamente le cellule infette attraverso un gene che codifica una tossina. Un gene "suicida" è messo sotto il controllo trascrizionale del promotore LTR dell'HIV, per innescare la distruzione cellulare al momento della sintesi proteica di *tat*, prodotta alla replicazione virale.¹⁵

Secrezione delle proteine inibitrici

È noto come alcune proteine, secrete naturalmente dai linfociti, hanno proprietà anti-HIV. La conseguente strategia terapeutica consiste nell'introduzione di un gene che produca una quantità elevata di tali proteine.¹⁶

Farmaco-modulazione genetica

L'azione dei farmaci antivirali si svolge, nella maggior parte dei casi, all'interno della

¹⁵ CARUSO M. – KLATZMENN D., *Selective Killing of CD4 cells harboring a human immunodeficiency virus-inducible suicide gene prevents viral spread in an infected cell population*. Proc Natl Acad Sci USA 1992, 89 182,6.

¹⁶ MOULLIER P. – BOHI D. – HEARD JM. – DANOS O., *Correction of lysosomal storage in the liver and spleen of MPS VII mice by implantation of generically modified skin fibroblasts*, Nature Genet 1993; 4 154-9.

cellula infetta. Nel caso della zidovudina, la sua azione è limitata dagli effetti tossici e dalle mutazioni che aumentano la resistenza virale. Del resto, il meccanismo cellulare che permette l'attivazione di questi farmaci non è sempre ottimale, poiché una parte del farmaco è eliminata dalla cellula prima che si sia attivato. Il principio della cosiddetta *farmacomodulazione genetica* si basa sull'introduzione di un gene che rafforzi l'attività antivirale all'interno della cellula stessa. Questo metodo è molto interessante, perché garantirebbe, anche a dosi antivirali identiche a quelle attualmente in uso, un'efficacia da 3 a 10 volte maggiore. Allo stesso tempo consentirebbe sia la diminuzione degli effetti collaterali degli altri antivirali mal tollerati, che le dosi di assunzione di tali farmaci.¹⁷

Immunoterapia genetica

L'immunoterapia genetica consiste nell'utilizzare a fini terapeutici, cellule immunocompetenti geneticamente modificate,¹⁸ cellule dendritiche (DC) o altre cellule, capaci di mimare il virus che provoca l'AIDS al fine di attivare una risposta immunitaria. In effetti le DC sono capaci di sintetizzare proteine sotto forma di peptidi antigenici e presentarli sia ai linfociti T CD4+ per il complesso maggiore dell'istocompatibilità di classe II (CMH II), sia ai linfociti TCD8+ via CMHI.¹⁹

Attraverso l'immunoterapia genetica, "tratti di virus" vengono in contatto con i linfociti che, dopo averli riconosciuti, vi aderiscono attivandosi e, nello stesso tempo, poter distruggere tutti i virus presenti. Potremmo così definirli una sorta di "vaccinazione genica".

D. Ricerca sul vaccino pediatrico Anti-HIV/AIDS dell'UNESCO

Sponsorships: Cooperazione Italiana allo Sviluppo del MAE – UNESCO.

Partners:

- Università di Roma "Tor Vergata", Italia

- Università del Maryland, Baltimora, USA
- Fondazione Mondiale Ricerca e Prevenzione AIDS, Parigi, Francia
- Ministero della Sanità del Burkina Faso
- Centro Medico San Camillo (CMSC) in Burkina Faso.

Dal 2003 il CMSC partecipa alla ricerca di un vaccino pediatrico anti-HIV patrocinata dall'UNESCO e condotta dall'Università "Tor Vergata" di Roma (Professor Vittorio Colizzi) in collaborazione con i professori Montagnier e Gallo, a cui si deve la scoperta del virus dell'AIDS.

In Occidente non si verificano più casi di trasmissione verticale dell'HIV, grazie all'azione combinata del parto cesareo, del trattamento della madre e del neonato con farmaci antiretrovirali e dell'allattamento artificiale. Tutte queste procedure sono di difficile attuazione in Africa, dove ogni anno muoiono 620.000 bambini di AIDS contratto alla nascita o durante l'allattamento. Nel continente africano, mentre sembra possibile perseguire la diminuzione della carica virale e la conseguente trasmissione di HIV al momento della nascita, grazie alle terapie con ARV, a tutt'oggi è di difficile attuazione la completa sostituzione dell'allattamento materno.

Il progetto di ricerca riguarda lo sviluppo del Vaccino Pediatrico UNESCO, il cui obiettivo è di stimolare la risposta immunitaria del neonato nei primissimi giorni di vita, prevenendo l'attecchimento del virus durante l'allattamento. Il Vaccino Pediatrico UNESCO è composto di più di 20 peptidi sintetici di proteine di HIV-1 e viene somministrato nello stesso giorno e nel medesimo sito del vaccino antitubercolare BCG. Infatti, il Vaccino Pediatrico UNESCO sfrutta le proprietà del vaccino BCG per indurre una forte risposta immunitaria in grado di attivare i linfociti T helper e T citotossici specifici contro il virus. La protezione contro la trasmissione di HIV attraverso l'allattamento, viene quindi indotta in una

¹⁷ CARUSO M. – KLATZMANN D., *Genetically controlled pharmacomodulation for HIV gene therapy*, CR Aced Sci Parigi 1994; 317 1027-30.

¹⁸ LEMOINE F.M. – KLATZMANN D. – HERSON S., *Thérapie génique de l'infection par le HIV*, *Virologie*, Vol, 3, maggio-giugno 1999: 217-26.

¹⁹ LEMOINE F.M. – KLATZMANN D. – HERSON S., *Thérapie génique de l'infection par le HIV*, *Virologie*, Vol, 3, maggio-giugno 1999: 217-26.

fase molto precoce dell'infezione, quando il sistema immunitario del neonato è ancora intatto e con un alto grado di maturazione.

Il Progetto Vaccino UNESCO è suddiviso nelle seguenti 3 fasi:

- Ricerca pre-clinica di laboratorio per definire la sequenza dei peptidi sintetici che compongono il Vaccino. Questo processo è già in corso, attraverso la mappatura della sequenza dei ceppi virali presenti nei luoghi di vaccinazione prescelti in Africa e attraverso la caratterizzazione dei genotipi di istocompatibilità delle popolazioni.
- Sperimentazione clinica di *fase I* in adulti volontari sani, allo scopo di documentare la completa innocuità del Vaccino e la non alterazione della risposta antitubercolare indotta dal BCG. Questa sperimentazione sarà eseguita a Roma e a Baltimora (USA) su 30 individui sani con limitato rischio di infezione naturale da HIV. La vaccinazione consiste nell'inoculo di BCG (Institut Merieux, Francia) secondo le norme vaccinali nell'avambraccio, seguito dall'inoculo di 100 g (10 individui), 200 g (10 individui) e 400 g (10 individui) di peptidi sintetizzati secondo le direttive delle GMP (Good Manufacturing Practice) e previste dalla FDA. Sono previste le possibili reazioni locali descritte dalla vaccinazione antitubercolare.
- Sperimentazione clinica di *fase II* in neonati di madri sieropositive, allo scopo di confermare e documentare la completa innocuità ed assenza di tossicità del Vaccino Pediatrico UNESCO. Questa sperimentazione sarà eseguita in Costa d'Avorio nell'Ospedale Generale di Alepè, con la collaborazione dell'ONG delle Suore Dorotee di Vicenza, ed in Burkina Faso nel Centro Medico S. Camillo di Ouagadougou, gestito dai Religiosi Camilliani. Nei due Ospedali è in atto una campagna di sensibilizzazione e prevenzione con farmaci antiretrovirali della trasmissione materno-infantile da parte dell'OMS e della Cooperazione Italiana. La Vaccinazione consiste nell'inoculo di BCG (Institut Merieux, Francia) se-

condo le norme vaccinali nella parte interna della coscia, seguito dall'inoculo della dose di peptidi sintetizzati, identificata nella fase precedente. Sono previste le possibili reazioni locali descritte dalla vaccinazione antitubercolare.

Lo svolgimento delle tre fasi sopra descritte permetterà di programmare ed eseguire la fase successiva dello sviluppo del Vaccino Pediatrico UNESCO che ha lo scopo di valutare l'immunogenicità e la protezione del Vaccino.

Il governo burkinabè e il Comitato di Etica del Burkina Faso hanno già approvato questo progetto di ricerca l'11 agosto 2003. Nel mese di settembre 2003 questa ricerca ha avuto inizio nel nostro Centro Medico S. Camillo a Ouagadougou.

E. Etica di ricerca sull'HIV/AIDS

Con il progresso della tecnologia, il campo sperimentale non cessa di allargarsi e le frontiere della ricerca si dilatano verso l'infinito. Dall'agricoltura primitiva alla "gene-coltura", ovvero coltura in vitro dei geni per clonazione o per PCR, assistiamo a tutta una serie di esperienze bio-tecnologiche e bio-mediche sia a livello agro-alimentare che terapeutico. Le basi etiche che definiscono i trials clinici riguardo l'infezione da HIV sono contenute nelle Direttive Internazionali che regolano tutta la sperimentazione sui soggetti umani. I principi fondamentali della bioetica, da tenere sempre presenti in un progetto di ricerca che coinvolga un essere umano,²⁰ sono descritti di seguito.

1 - Il rispetto della dignità umana

Il rispetto della dignità umana presuppone il rispetto dell'invulnerabilità della vita umana, il rispetto della sua integrità, della sua identità. Questo significa che in ogni sperimentazione clinica sull'uomo bisognerà:

- avere volontari che diano il loro libero e informato consenso nell'accettare il progetto della ricerca;
- garantire la riservatezza dei dati personali raccolti.

²⁰ Simporé J., *Génie génétique: enjeux thérapeutiques et éthique de la recherche biomédicale*, Pontificia Accademia Pro Vita, Libreria Editrice Vatican, 2003, p 127-138.

2 - Il rispetto dei principi e della metodologia della scienza

La riflessione sulla ricerca biomedica, a cui ci richiama la bioetica, si pone in un contesto ben definito: da una parte, l'accettazione dell'inevitabile coinvolgimento di soggetti umani; dall'altra, il riconoscimento della singolare preziosità del soggetto di studio e di conseguenza, l'atteggiamento etico di rispetto e di responsabilità da parte del ricercatore in primis. Su questa base, la ricerca dovrebbe procedere secondo un binomio inscindibile che pone su un piano egualitario sia la crescita qualitativa e quantitativa nella conoscenza dell'uomo, che la finalizzazione di tale progresso al servizio dell'uomo stesso. La pertinenza della ricerca, la qualità metodologica del progetto sperimentale, del suo sviluppo e della restituzione dei risultati, la qualità del plateau delle tecniche usate, nonché le provate competenze e attitudini del ricercatore responsabile della ricerca e dei suoi collaboratori, costituiscono i criteri di giudizio fondamentali circa il rispetto dei principi etici e metodologici della scienza.

3 - Principio di autonomia e di indipendenza

Questo principio afferma la libertà del paziente e tende a difenderlo da ogni forma di paternalismo medico che imponesse delle scelte, senza il dovuto consenso da parte del paziente stesso o del suo tutore legale. Tale principio sottolinea l'importanza del rispetto della libera scelta individuale.

4 - Principio di beneficenza

Afferma che il medico deve sempre cercare il bene del paziente: è per questo che il paziente vi si rivolge. Il criterio del *primum non nocere*, principio guida della pratica medica, ha ben altro e più importante significato che *fare il bene*. Tale principio bioetico tende a compensare il principio di autonomia, inquadrandola in limiti che non possono essere superati dal medico. La beneficenza non può che essere alla base del contratto di cura con il paziente, permettendo di superare, almeno in gran parte, una contrapposizione tra diritti del medico e diritti del paziente. Pone infatti al centro della professione medica il bene che essa ha come suo oggetto specifico: la salute del paziente.

5 - Principio di giustizia.

Come scrive con rara efficacia e semplicità John Rawls: "La giustizia è il primo requisito dei sistemi sociali, così come la verità lo è dei sistemi di pensiero". Secondo una definizione giuridico-morale, giustizia è garantire ad ognuno il suo proprio diritto; in campo biomedico, giustizia è garantire ad ognuno il diritto alla cura che gli è necessaria, senza alcuna discriminazione di sesso, di razza, di religione o di qualsivoglia diversità tra i pazienti stessi. Dal *Codice di Norimberga* (1947) in poi, passando dalla *Dichiarazione di Helsinki*, adottata a Helsinki, Finlandia (1964) ed emendata a Tokyo, Giappone (1975), a Venezia, Italia (1983), a Hong Kong (1989), a Somerset West, Repubblica del Sud Africa (1996) ed a Edimburgo, Scozia (2000), fino alle numerose Direttive Internazionali sulla ricerca biomedica, la comunità scientifica può avvalersi di Norme che definiscono chiaramente i protocolli, l'esecuzione e l'utilizzazione dei risultati delle ricerche in cui sono coinvolti soggetti umani. La realizzazione di un protocollo clinico sperimentale necessita di fondamentali pre-requisiti:

- la scelta dei volontari adulti, liberi, disponibili e consapevoli del protocollo di trattamento;
- una dimostrazione chiara dell'efficacia dell'esperienza in vitro;
- quando si utilizza un transgene (gene esogeno), si deve fornire la prova dell'efficacia del suo trasferimento nelle cellule bersaglio con un vettore appropriato ed efficace;
- dimostrare l'innocuità della ricombinazione del vettore con il gene esogeno. Il vettore non dovrà produrre né inversioni, né delazioni, né traslocazioni, né mutazioni, così come effetti immunogeni, quali lo "shock anafilattico".

Inoltre, il protocollo della terapia per i pazienti contagiati da HIV, deve permettere:

- che i risultati dello studio siano interpretabili, riproducibili, soprattutto in rapporto alle questioni poste in termini di realizzazione, tolleranza, innocuità ed efficacia;
- che i dati scientifici ottenuti permettano lo sviluppo di ulteriori terapie o di esperienze cliniche complementari.

In questo senso, è evidente che ogni esperienza clinica sull'uomo deve essere realizzata in condizioni ben definite e secondo i principi bioetici, cercando sempre, in ogni fase della sua realizzazione, il bene integrale dell'essere umano e il rispetto della sua dignità.

CONCLUSIONE

Il virus dell'HIV rimane per i ricercatori, per le persone colpite dall'AIDS e per l'opinione pubblica, un microrganismo che simboleggia la vergogna, la tribolazione morale, la sofferenza fisica fino alla morte. Secondo il messaggio del 26 giugno 2001, inviato da Sua Santità Giovanni Paolo II a Kofi Annan, "l'epidemia dell'AIDS rappresenta una delle catastrofi maggiori della nostra epoca". Per il Papa, l'AIDS non è soltanto un problema di sanità, risolvendosi drammaticamente sulla vita sociale, economica e politica delle popolazioni colpite.²¹ L'AIDS è anche l'agente patogeno dello spirito, che distrugge non soltanto il

corpo, ma l'intera persona, nelle sue relazioni umane e nella sua vita sociale, spesso portatrice di una crisi di valori morali.²²

Quest'anno celebriamo il 25° anniversario della comparsa dell'AIDS. A memoria d'uomo nessuna malattia infettiva ha ucciso in così breve tempo tanti giovani come il virus HIV/AIDS. È ormai innegabile l'urgenza che tutti gli scienziati agiscano insieme nel progredire delle loro ricerche.

*"I padri han mangiato l'uva acerba e i denti dei figli si sono allegati"*²³. La trasmissione dell'infezione ai feti e ai neonati, la sofferenza e la morte dei bambini a causa dell'AIDS, sono le grandi sfide per la scienza, la società e la Chiesa cattolica. In questa drammatica situazione, soltanto delle giuste scelte culturali, giuridiche ed etiche possono permettere agli uomini del nostro tempo di ingaggiare, collettivamente e solidalmente, una lotta di tipo nuovo per la salvaguardia e la protezione della nostra comune umanità, rendendo più responsabili i nostri comportamenti umani.²⁴



²¹ Messaggio di GIOVANNI PAOLO II al sig. Kofi Annan, martedì 26 giugno 2001, in favore delle persone che vivono con l'HIV/AIDS, Zenit.org.

²² Intervento della SANTA SEDE in occasione della XXVI^a sessione speciale dell'Assemblea Generale dedicata alla pandemia di HIV/AIDS, 27 giugno 2001.

²³ Ez 18, 2-3.

²⁴ SIMPORE J., *Problèmes biomédicaux et étiques posés par le mariage de personnes sérodiscordantes*, "Camilianum", Anno I, terzo quadrimestre, dicembre 2001, n. 3, pp. 533-544.