

FARMACI BIOTECNOLOGICI E DI PRECISIONE PER IL COVID-19

Elisabetta Vegeto, Adriana Maggi, Paola Minghetti, Mariangela Garofalo,
Giuseppe Danilo Norata
Compendio al libro "Farmaci biotecnologici", CEA - Casa Editrice Ambrosiana

Il 31 dicembre 2019 venivano notificati all'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) alcuni casi di polmonite di origine sconosciuta registrati a Wuhan, nella provincia di Hubei in Cina. Per la maggior parte erano collegati a un mercato alimentare, e dunque alla possibilità di una trasmissione fra animali selvatici e uomo. In pochi giorni veniva dimostrata la trasmissibilità della malattia da uomo a uomo e il 10 gennaio 2020 veniva resa pubblica la sequenza del genoma dell'agente patogeno, permettendo di classificarlo come un nuovo membro del genere *Beta-coronavirus*, altamente correlato a un virus di questa famiglia che causa la **sindrome respiratoria acuta grave** (*Severe Acute Respiratory Syndrome*, o **SARS**) chiamato SARS-CoV. Il nuovo coronavirus veniva così denominato **SARS-CoV-2**, sebbene sia maggiore la somiglianza a un coronavirus del pipistrello (RaTG13), e la malattia denominata **malattia da coronavirus 2019** o **COVID-19**. Nei 17 anni precedenti al 2019 si erano verificate altre due epidemie da *Beta-coronavirus*, la SARS nel 2002 e la **sindrome respiratoria medioorientale** (*Middle East Respiratory Syndrome*, **MERS**) nel 2012, che però furono controllate in modo efficiente, al punto che i vaccini prodotti per limitarne la diffusione si rivelarono inutili. Viceversa, COVID-19 ha avuto una rapida diffusione globale e l'OMS ha dichiarato la situazione di pandemia, un'emergenza sanitaria di carattere globale. Nonostante gli enormi sforzi e le pesanti misure di distanziamento e isolamento adottate per contenere l'infezione, il virus SARS-CoV-2 continua a diffondersi in tutto il mondo; pertanto, si è reso necessario lo sviluppo di strategie efficaci per la prevenzione e cura della malattia.

1. Cenni di fisiopatologia dell'infezione COVID-19

Il genoma di SARS-CoV-2

I Coronavirus (CoV) sono una famiglia di virus a RNA a singolo filamento a polarità positiva di circa 30 kilobasi, dimensioni molto più grandi rispetto ad altri virus a RNA. Fra i quattro generi che appartengono alla sottofamiglia di interesse per COVID-19, gli *Alfa-coronavirus* e i *Beta-coronavirus* possono infettare diverse specie di mammiferi, gli altri (i *Gamma-* e i *Delta-coronavirus*) non solo i mammiferi ma anche alcune specie aviarie. Strutturalmente, SARS-CoV-2 (**Figura 1**) è composto da particelle virali di diametro di 50-200 nm con un involucro lipidico esterno a doppio strato che presenta proiezioni costituite dalla glicoproteina **Spike (S)**. Sull'involucro sono presenti anche la proteina **Envelope (E)**, la **glicoproteina di membrana (M)**, che interagisce con un'altra proteina strutturale interna al virione, e la **proteina nucleocapsidica (N)**, che ha la funzione di stabilizzare il genoma virale. Il genoma è, di fatto, un lungo mRNA, con regioni all'estremità 5' e 3' non tradotte (5' UTR e 3' UTR), una coda di poli(A) in 3' e 14 moduli di lettura aperti (*Open Reading Frame*, ORF), che codificano per 27 proteine diverse. I primi due ORF (ORF1a e ORF1b), sovrapposti fra di loro e di dimensioni molto grandi rispetto agli altri, contengono il gene **Replicasi**, che viene tradotto

immediatamente dai ribosomi della cellula umana una volta infettata. ORF1a codifica la **poliproteina pp1a**, un precursore da cui si generano 10 proteine non strutturali (*non structural protein*, **nsp**), nsp1-nsp10; ORF1b codifica la **poliproteina pp1ab**, tagliata anch'essa a dare 16 proteine, da nsp1 a nsp16. Le nsp sono coinvolte nella sintesi di RNA virale. A valle del gene Replicasi è contenuta l'informazione per la produzione delle proteine strutturali S, E, M ed N e di sei proteine accessorie (3a, 6, 7a, 7b, 8, 10), il cui ruolo non è ancora ben noto.

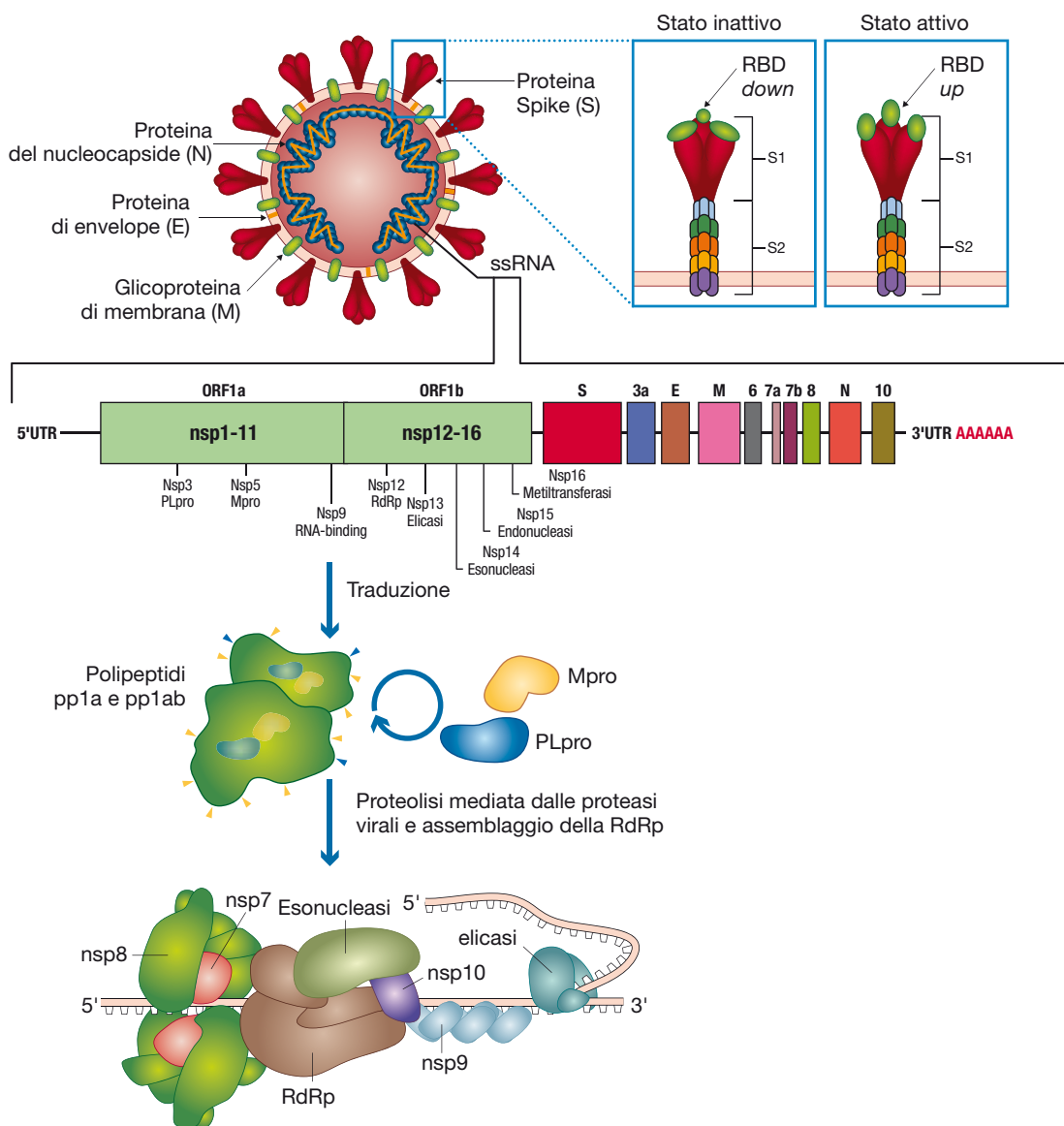


Figura 1 Struttura del genoma di SARS-CoV-2. L'RNA a singolo filamento di SARS-CoV-2 è associato alla proteina N all'interno di un involucro lipidico in cui sono presenti le proteine strutturali S, E ed M. Il genoma di SARS-CoV-2 presenta un'organizzazione tipica dei beta-coronavirus, poiché contiene: il gene Replicasi che codifica le proteine non strutturali nsp1-nsp16, fra cui nsp3 e nsp5 che codificano le proteasi virali PLpro e Mpro, quattro geni che codificano le proteine strutturali, Spike, Envelope, Membrana e Nucleocapside e i geni accessori, distribuiti tra i geni strutturali. [Fonte: modificata da M. Rastogi et al. *Respir Res* 21:318 (2020).]

Il ciclo vitale di SARS-CoV-2

Il ciclo vitale di SARS-CoV-2 inizia con la fase di riconoscimento che avviene nel tratto respiratorio. Tutti i CoV utilizzano la proteina S per entrare nelle cellule ospiti tramite un legame altamente specifico con recettori sulla superficie cellulare, che variano a seconda del CoV. L'infezione da SARS-CoV-2 inizia con il legame all'**enzima di conversione dell'angiotensina 2** (*Angiotensin-Converting Enzyme 2*, **ACE2**), una proteina coinvolta nel sistema renina-angiotensina ed espressa sulla membrana plasmatica delle cellule epiteliali del polmone (in particolare sulle alveolari di tipo 2), dell'intestino e, in misura minore, nel rene, nel cuore, nel tessuto adiposo e nei tessuti riproduttivi (**Figura 2**). Anche SARS-CoV-1 (e un altro CoV, HCoV-NL63) utilizzano ACE2, invece MERS utilizza la dipeptidil peptidasi-4 e HCoV-229E l'amminopeptidasi N.

Attacco e ingresso. La glicoproteina S è formata da due subunità, S1 e S2. La subunità S1 contiene il **dominio di legame del recettore** (*Receptor Binding Domain*, **RBD**) ed è quindi responsabile dell'attacco del

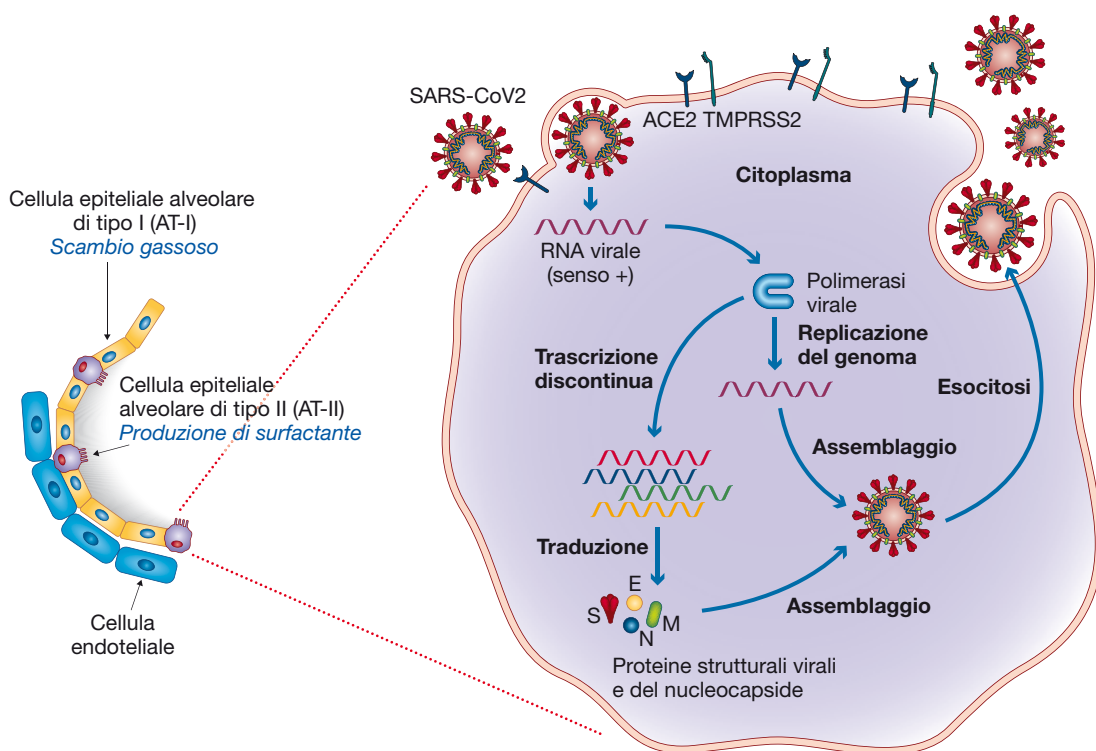


Figura 2 Il ciclo vitale di SARS-CoV-2. Il ciclo vitale di SARS-CoV-2 inizia quando la proteina virale S si lega al recettore ACE2 presente sulla cellula ospite. Questo legame media la fusione dell'involucro virale con la membrana cellulare e l'ingresso dell'RNA virale nella cellula. L'RNA con orientamento + è subito tradotto dai ribosomi cellulari in una poliproteina scissa in prodotti più piccoli per autodigestione e per azione della proteinasi virale Mpro. La RNA polimerasi RNA dipendente (RdRp) è uno di questi prodotti che produce RNA a senso negativo, replicato interamente a dare RNA genomico +, o copiato tramite trascrizione discontinua in una serie di frammenti che generano mRNA codificanti proteine virali sia strutturali sia non strutturali. In seguito, l'RNA genomico e le proteine virali si assemblano nel reticolo endoplasmatico e nell'apparato di Golgi a formare particelle virali, che vengono poi rilasciate dalle cellule infette. [Fonte: modificata da M. Shankar et al. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2020 Nov 23:1-9. doi:10.1080/10826068.2020.1848869.]

virus alla cellula ospite, ma è la subunità S2 a mediare congiungimento e fusione della membrana del virus con quella cellulare. S2 è attivata mediante scissione da S1 indotta da una proteasi dell'ospite chiamata **serin proteasi transmembrana di tipo II (TMPRSS2)**. Dopo il taglio, S2 subisce una serie di modificazioni conformazionali che portano all'attacco del peptide di fusione, presente nella porzione C-terminale di S2, alla membrana cellulare, con conseguente fusione delle membrane virale e cellulare e ingresso dell'RNA virale all'interno del citoplasma cellulare. L'ingresso di materiale genetico virale può avvenire in due modi: tramite la fusione delle membrane virale e cellulare, appena descritta e mediata dall'azione di TMPRSS2, o tramite endocitosi mediata da ACE2 e successiva attivazione di S2 ad opera di proteasi endosomiali, come le catepsine, con conseguente liberazione di RNA virale dagli endosomi al citoplasma.

Studi cristallografici dimostrano che SARS-CoV-2 si lega ad ACE2 con affinità maggiore rispetto a SARS-CoV, fornendo una spiegazione dell'elevata infettività e grado di lesione a livello sia polmonare sia multiorgano riscontrato in pazienti infettati da SARS-CoV-2, anche considerato che ACE2 è molto espressa nell'endotelio vascolare.

Traduzione e proteolisi. Nel citoplasma cellulare ORF1a e ORF1ab vengono tradotti dai ribosomi della cellula ospite. I polipeptidi pp1a e pp1ab vengono processati a peptidi più piccoli e funzionalmente distinti grazie alle proteasi virali PLpro (*Papain-Like protease*, nsp3) e Mpro (*Main protease*, nsp5), generate per scissione autoproteolitica dei polipeptidi. L'attività di Mpro porta alla formazione delle proteine del macrocomplesso di replicazione ed è perciò essenziale nei primi passaggi della replicazione virale. Il DNA codificante Mpro di SARS-CoV-2 ha un'omologia di sequenza del 98% con SARS-CoV; inoltre, Mpro contiene diversi domini ad attività proteolitica, strutturalmente correlati anche ad altre proteasi di CoV, mentre ha bassa omologia con quelle umane. Queste caratteristiche rendono Mpro un target ideale per inibitori altamente specifici, efficaci e ad azione su altri CoV, attualmente rappresentati da peptido-mimetici o alfa-chetoammidi che legano Mpro e ne inibiscono l'attività.

Replicazione e assemblaggio (Figura 2). La **RNA polimerasi RNA-dipendente (RdRp)**, codificata da nsp12 e generata dall'azione di Mpro su pp1ab, è un enzima virale che, in tutti i coronavirus umani, è responsabile della **sintesi di RNA**. RdRp attua la replicazione, ossia genera nuove copie del genoma virale, sintetizzando un filamento intermedio negativo (3'-5') che serve da stampo per produrre **RNA genomico positivo**. Le proteine strutturali e accessorie vengono invece prodotte passando attraverso il processo di sintesi di **mRNA sub-genomici (sgRNA)** sullo stampo dei geni presenti a valle del gene Replicasi. Il meccanismo di sintesi degli sgRNA è un processo molto complesso, detto di **trascrizione discontinua**, in cui si verificano dei "salti" tramite appaiamenti interni sullo stampo di RNA. Si ipotizza che la trascrizione discontinua possa favorire la ricombinazione genica nei CoV e dunque la produzione di varianti, fenomeno molto importante per l'instaurarsi di resistenza ai vaccini, ai farmaci e al sistema immunitario stesso. Peraltro, i CoV esprimono un'esonucleasi dotata di attività di correzione dell'RNA; da ciò deriva un tasso di mutazione dei CoV molto più basso rispetto ad altri virus a RNA. La replicazione e la trascrizione discontinua avvengono in vescicole interconnesse che si formano sul reticolo endoplasmatico, chiamate **complessi di replicazione e trascrizione**.

Infine, l'assemblaggio delle particelle virali avviene nel reticolo endoplasmatico e nell'apparato di Golgi tramite l'attività della proteina N, che racchiude il genoma virale in un complesso ribonucleoproteico, della glicoproteina M e della proteina E, importante anche nella patogenesi (Figura 1). I virioni generati vengono rilasciati per escitosi o morte cellulare e sono pronti a legarsi ad altre cellule ospiti e a far ripartire il ciclo vitale.

Presentazione clinica e test diagnostici

La storia clinica della malattia si sviluppa in tre stadi (Figura 3):

- il **primo stadio**, o fase virale, è imputabile alla propagazione del virus e al danno da esso conferito nel tratto respiratorio;

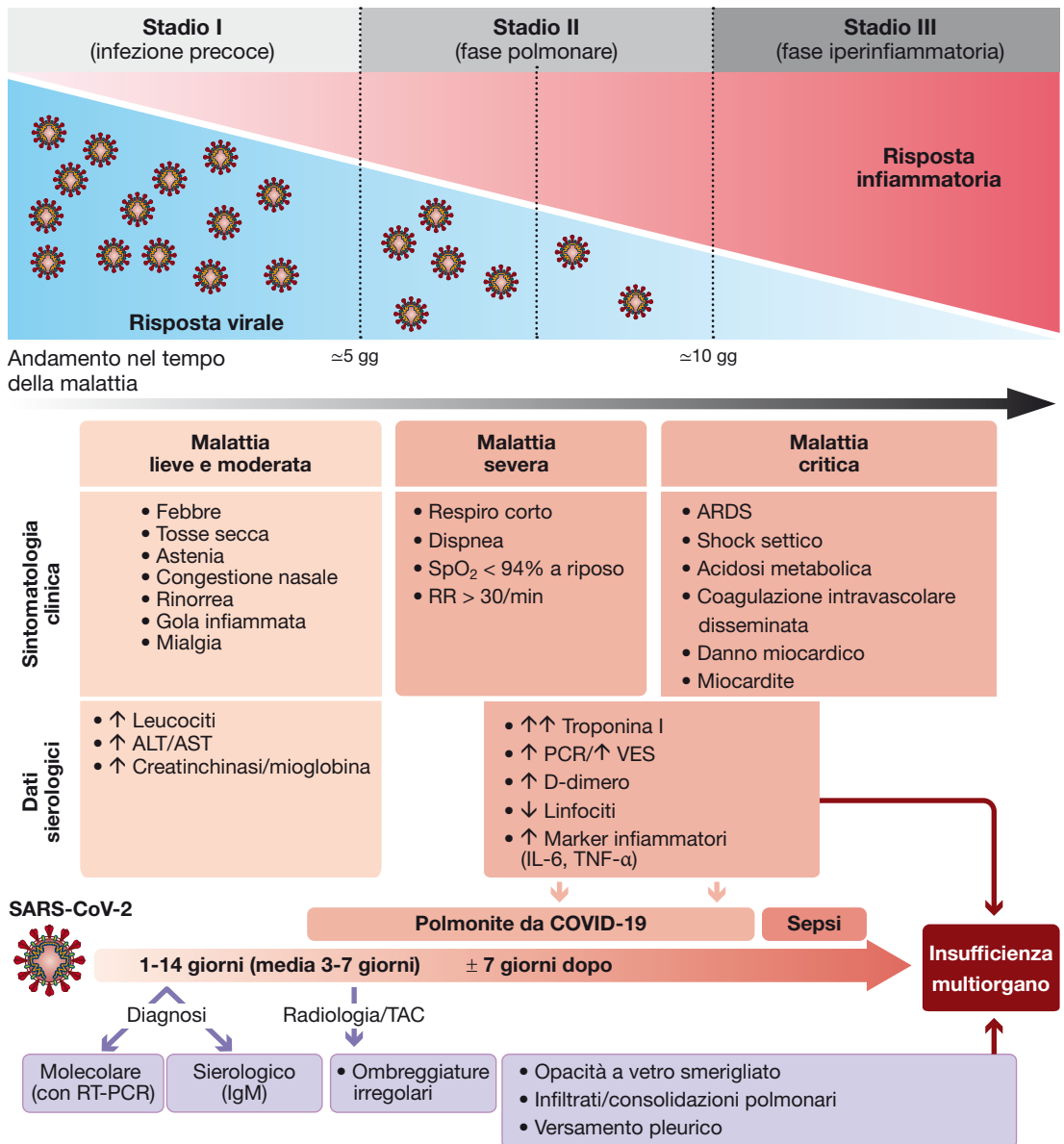


Figura 3 Progressione, sintomatologia e parametri clinici dell'infezione da SARS-CoV-2. La malattia può procedere dalla fase precoce a quella polmonare e poi iperinflammatoria, con sintomatologia che varia da lieve e moderata a grave.

- il **secondo stadio** si associa all'interessamento polmonare dell'infezione, in cui le lesioni cellulari e parenchimali portano al collasso degli alveoli e all'edema, che nelle forme più gravi determinano l'insufficienza respiratoria grave (*Acute Respiratory Distress Syndrome*, ARDS);
- il **terzo stadio** è caratterizzato dalla reazione iperinfiammatoria, in cui il sistema immunitario attivato dal danno polmonare aggrava ancora di più l'insufficienza respiratoria, attiva i processi di coagulazione e gli eventi trombotici interessando anche altri organi infettati dal virus, come il miocardio e i reni.

La risposta anticorpale a SARS-CoV-2 inizia con la produzione di IgA durante la prima settimana di infezione, raggiungendo un picco verso la terza settimana, seguita dalla comparsa di IgM che decrescono dopo circa 3 settimane, mentre le IgG, sebbene più tardive, permangono per diverse settimane, anche in base alla gravità dell'infezione. Questi anticorpi sono direzionati verso le proteine virali Spike ed N e possiedono attività neutralizzante, ossia impediscono l'entrata del virus nelle cellule umane. Il **siero convalescente** è la miscela di anticorpi presenti nel plasma di soggetti che hanno superato la malattia e che può essere impiegato nella terapia di soggetti gravemente ammalati di COVID-19 (*vedi* oltre). Cellule B di memoria, affini alla proteina S, sono state rilevate anche diversi mesi dopo l'infezione, mentre la risposta cellulare che coinvolge linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ è diretta contro Spike e altre proteine strutturali ma anche non strutturali del virus (come nsp3 e ORF 3). È importante ricordare che l'infezione naturale potrebbe non provocare un'immunità protettiva di lunga durata.

Alle diverse fasi di malattia corrispondono manifestazioni cliniche caratteristiche. Nell'80% dei casi di COVID-19 le manifestazioni cliniche sono lievi e autolimitanti e solo per il 20% dei casi gravate da complicanze. La fase asintomatica o pre-sintomatica è caratteristica di COVID-19, talvolta associata ad alterazioni polmonari silenti; questo periodo di incubazione è stato stimato raggiungere anche 14 giorni, un tempo più lungo rispetto a SARS e MERS, fatto che si traduce in un tasso di infettività molto maggiore di COVID-19. Le forme sintomatiche della malattia si distinguono in lievi o moderate (circa l'81%), gravi (14%) e critiche (5%). La letalità (2-4%) è più bassa rispetto a SARS (10%) e MERS (34%), ma più elevata rispetto alle epidemie stagionali di influenza (1%), infezione causata dal virus dell'influenza, un virus a singolo filamento negativo di RNA.

I sintomi comuni dello stadio iniziale includono sintomi respiratori, come tosse secca e dispnea, che si possono associare a febbre, mialgia, dolori articolari, nausea, diarrea, perdita dell'olfatto e del gusto, congiuntivite e manifestazioni dermatologiche. L'aggravarsi di COVID-19 è dovuto a polmonite interstiziale, pleurite ed edema con sintomatologia respiratoria a decorso imprevedibile, complicanze cardiache come aritmie e tromboembolia, fino al danno multiorgano per disseminazione dell'infezione. Come detto in precedenza, la reazione infiammatoria scatenata dal danneggiamento del tessuto polmonare può aggravare ulteriormente il quadro clinico tramite la produzione incontrollata di citochine, fenomeno definito **tempesta citochinica**, simile a quella sviluppata dai pazienti affetti da SARS-CoV-1 e MERS, con conseguenze spesso letali (*vedi* oltre).

Il virus colpisce le persone in modo diverso a seconda della predisposizione genetica, dello stato immunitario e delle malattie associate al sistema respiratorio. Le persone di età superiore a 70 anni corrono un rischio maggiore di aggravamento della malattia, come pure i pazienti con

comorbilità come diabete, ipertensione, malattie renali acute, cardiache, cerebrovascolari o disfunzioni epatiche. Questi segni clinici si accompagnano ad alterazioni di valori sierologici e biochimici, come linfopenia, aumento del D-dimero e delle transaminasi.

Diagnosi e sierologia (Tabella 1). Per la diagnosi di COVID-19 si effettua il cosiddetto **test molecolare**, con cui si indaga la presenza di RNA virale nel **tampone naso- od orofaringeo** o **salivare** o nel fluido polmonare. Tale ricerca consiste in una doppia reazione di retrotrascrizione a cDNA e PCR quantitativa in tempo reale (RT-qPCR), in cui si utilizzano primer e sonde che si appaiano ai geni ORF1b ed N. I livelli di RNA di SARS-CoV-2 diminuiscono rapidamente durante la seconda settimana di infezione e possono diventare anche non rilevabili al test molecolare. Anche i **test antigenici** rilevano la presenza di infezione in atto, ricercando le proteine del virus, in particolare le proteine S ed M, e dunque gli antigeni virali, nei campioni respiratori del paziente. Le indagini molecolari e antigeniche si rivelano efficaci anche per le varianti del virus, poiché queste interessano prevalentemente la proteina S, ma non per quelle dovute a mutazioni o delezioni nelle sequenze indagate dalla reazione di PCR o per eventuali varianti M nel caso dei test antigenici. I **test sierologici** sono invece progettati per rilevare la presenza nel sangue di anticorpi specifici contro SARS-CoV-2, utilizzando le proteine virali come sonde sperimentali. La positività di un test sierologico indica che il paziente è entrato in contatto con il virus, non discriminando però tra infezioni in atto, risolte di recente o pregresse. I test sierologici e quelli antigenici si basano sulla reazione di riconoscimento antigene-anticorpo, dove la presenza del composto di interesse, o analita (l'antigene nei test antigenici, gli anticorpi per i sierologici), è rilevata grazie all'utilizzo del corrispettivo reagente, coniugato con molecole cromofore o fluorescenti durante la preparazione del dispositivo diagnostico specifico. I test sierologici classici sono saggi quantitativi che determinano i livelli di IgG, IgM o IgA utilizzando procedure come ELISA, chemiluminescenza o citometria a flusso con diverso grado di automazione, ma richiedono un prelievo di sangue venoso e sono perciò condotti in laboratori specializzati.

Tabella 1 Test diagnostici per SARS-CoV-2.

Test	Sede analisi	Campione biologico	Tempistica	Modalità di esecuzione
Molecolare	Centri specializzati accreditati	Tampone naso/orofaringeo	2-6 ore/2 giorni	PCR quantitativa, condotta su RNA estratto dal campione biologico e retrotrascritto a cDNA <i>in vitro</i>
Antigenico	Laboratorio analisi	Sangue	6 ore	Immunodetezione qualitativa, effettuata sul campione biologico posto su un dispositivo di analisi in cui sono presenti anticorpi marcati con sostanze cromogene o, nel caso di POCT, coniugati a composti fluorescenti
	POCT	Tampone naso/orofaringeo Saliva	15-30 minuti	
Sierologico	Laboratorio analisi	Sangue	6 ore	
	POCT	Sangue	15-30 minuti	
Sierologico quantitativo	Laboratorio analisi	Sangue	6 ore	Immunodetezione quantitativa, effettuata su un prelievo di siero analizzato in un saggio ELISA contenente anticorpi specifici

Molto diffusi sono anche i **test rapidi**, antigenici e sierologici, che forniscono risultati di tipo qualitativo in 15-30 minuti, grazie a dispositivi portatili, definiti *point-of-care testing* (POCT), utilizzabili al di fuori della struttura ospedaliera e senza l'ausilio di strumentazione. In generale questi dispositivi si basano sulla microfluidica e immunocromatografia a flusso laterale e permettono di effettuare rapidamente test antigenici su tampone nasoro-faringeo (“tampone rapido”) e test sierologici su gocce di sangue.

2. I vaccini per SARS-CoV-2

Come evidenziato nel Capitolo 11, i vaccini sono preparati biologici dotati di elevato potere antigenico e in grado di indurre uno stato d'immunità nei confronti di determinati microrganismi patogeni. A tal fine, appena è stata disponibile la sequenza di SARS-CoV-2, la ricerca si è attivata immediatamente per produrre vaccini in grado di evocare una risposta anticorpale che fosse efficace nel neutralizzare SARS-CoV-2 stimolando la risposta immunitaria e producendo una memoria immunologica.

A maggio 2021 sono dieci i vaccini anti-SARS-CoV-2 approvati nel mondo e tra questi 4 sono approvati in via definitiva o per utilizzo emergenziale in Italia. Accanto ad approcci tradizionali per la formulazione dei vaccini (virus inattivato o a DNA ricombinante) sono stati prodotti vaccini innovativi, come quelli ad acidi nucleici oppure a proteina (**Figura 4**).

Vaccini a virus inattivato

Lo sviluppo di vaccini inattivati richiede che il virus sia inizialmente inattivato con agenti chimici o mediante irradiazione. Ciò consente la distruzione degli acidi nucleici del virus, mantenendo intatte le proteine e la loro proprietà antigenica. Le caratteristiche immunologiche e l'efficacia dei vaccini a base di CoV inattivato sono state studiate in modelli animali durante l'emergenza causata dal primo virus della SARS.

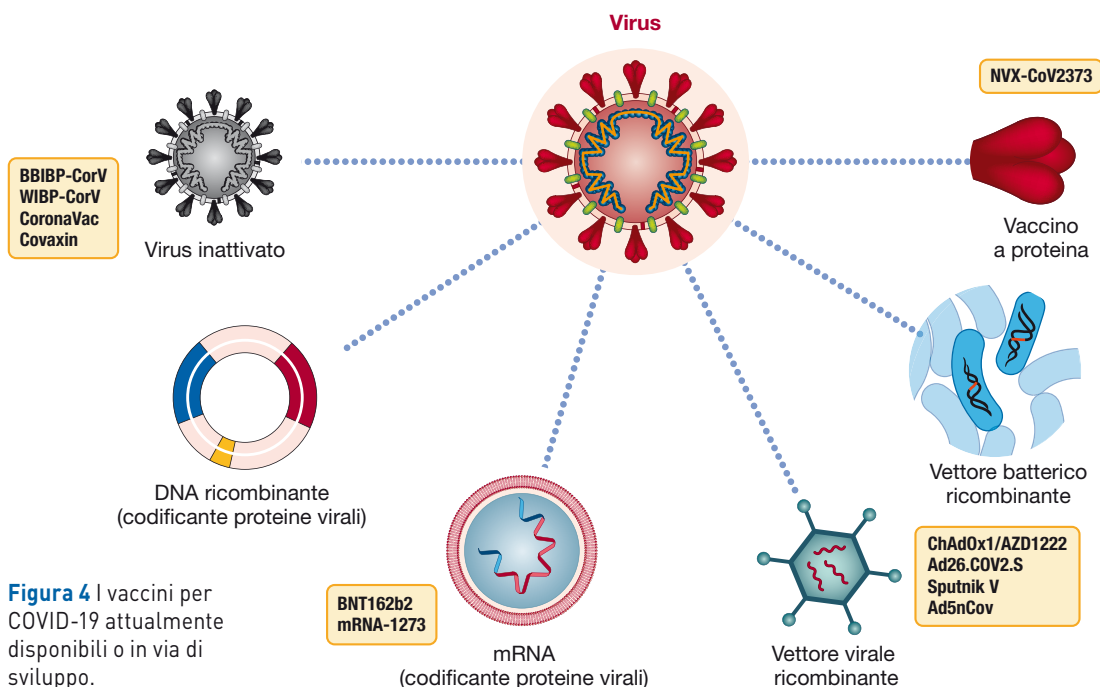


Figura 4 I vaccini per COVID-19 attualmente disponibili o in via di sviluppo.

Un vaccino inattivato contro SARS-CoV è stato valutato per la prima volta nelle scimmie Rhesus ed è risultato efficace nell'indurre immunità umorale e mucosale. In ambito di SARS-CoV-2 sono diverse le aziende che hanno generato vaccini inattivati. Si tratta in tutti i casi di formulazioni a base di varianti di SARS-CoV-2 fatte replicare in sistemi cellulari e inattivate mediante trattamento con sostanze chimiche, come il beta-propiolattone, un agente alchilante che blocca la capacità del virus di replicarsi e contemporaneamente permette di preservare la struttura proteica, compresa quella della proteina Spike, in modo da favorire la risposta immunitaria.

Pur essendo molto efficace, questa tipologia di vaccini presenta un potenziale rischio associato a un'inattivazione incompleta, che potrebbe portare a reazioni immunitarie o infiammatorie esagerate e indesiderate.

In **Tabella 2** sono elencati i principali vaccini per SARS-CoV-2 con queste caratteristiche. I risultati di alcuni studi di efficacia dei vaccini elencati non sono stati ancora pubblicati ufficialmente e i dati mostrati si basano sulle comunicazioni delle analisi *ad interim* da parte dei ricercatori.

Vaccini a base di acidi nucleici

I vaccini a base di DNA e RNA hanno il grosso vantaggio di poter essere sviluppati velocemente ed essere privi di grossi effetti collaterali. L'obiettivo è quello di convogliare l'informazione genetica necessaria a sintetizzare una o più proteine virali e in questo modo indurre la risposta immunitaria umorale e cellulare (**Box 1**).

Inizialmente sono stati ideati alcuni vaccini prototipo a DNA che esprimono varie proteine di SARS-CoV-2 successivamente testati su macachi Rhesus. I macachi vaccinati, una volta infettati, hanno mostrato una notevole riduzione della replicazione virale nel tratto respiratorio superiore e inferiore. Gli animali immunizzati hanno mostrato risposte specifiche legate alla capacità di produrre anticorpi in grado di neutralizzare SARS-CoV-2 bloccando l'interazione tra la proteina Spike e ACE2. Diversi sono i vaccini a DNA attualmente in fase clinica e alcuni vengono modificati per migliorare la risposta.

Tabella 2 Vaccini per COVID-19 basati su SARS-CoV-2 su virus inattivato.

Nome vaccino	Azienda produttrice	Caratteristiche	Efficacia
BBIBP-CorV	Sinopharm (Cina)	SARS-CoV-2 isolato da un paziente a Pechino, replicato in cellule Vero; inattivato con β-propiolattone e utilizzato insieme a idrossido di alluminio come adiuvante	78,1%
WIBP-CorV	Sinopharm-Wuhan (Cina)	SARS-CoV-2 isolato da un paziente a Wuhan, replicato in cellule Vero; inattivato con β-propiolattone e utilizzato insieme a idrossido di alluminio come adiuvante	Non nota con esattezza ma inferiore a BBIBP-CorV
CoronaVac	Sinovac (Cina)	SARS-CoV-2 inattivato con β-propiolattone e utilizzato insieme a idrossido di alluminio come adiuvante	50-90% (Brasile) 91% (Turchia)
Covaxin (BBV152)	Bharat Biotech (India)	SARS-CoV-2 (strain NIV-2020-770 contenente la mutazione Asp614Gly della proteina Spike), replicato in cellule Vero; inattivato con β-propiolattone e utilizzato insieme a due adiuvanti, allume e imidazochinolina	81%

Box 1

Vaccini a DNA e RNA: i successi della ricerca biologica degli ultimi 50 anni

Il 31 dicembre 2019 le autorità cinesi ammettono per la prima volta pubblicamente la presenza nella città di Wuhan di un'epidemia causata da un nuovo sottotipo di coronavirus. Dopo solo 15 giorni, i ricercatori cinesi rendono disponibile al mondo intero la sequenza del genoma del SARS-CoV-2, il nuovo virus della famiglia dei Coronavirus che si pensa possa causare un'epidemia di dimensioni mondiali. Questa rapidità di per sé indica la forza della ricerca biologica attuale, che nel giro di pochissimi giorni riesce non solo a conoscere a fondo un nuovo agente patogeno per l'uomo, ma anche a condividere questa conoscenza con la comunità scientifica a livello globale. Una diffusione di conoscenze fondamentale per allertare e riunire in tempo reale i migliori esperti, che, con l'isolamento dell'agente virale e la conoscenza della sequenza del genoma, possono definire l'intero ciclo vitale del patogeno, le modalità con le quali si trasmette, infetta e si moltiplica nella cellula del suo ospite per mettere a punto strategie per combattere gli effetti drammatici della sua diffusione.

Infatti, grazie alla disponibilità della sequenza del genoma del SARS-CoV-2, si scatenò una gara internazionale di dimensioni forse senza precedenti per la ricerca di modalità per l'identificazione dei soggetti infettati e di un vaccino specifico che possa frenare le singolari capacità pandemiche di questo virus. In tempi record (che addirittura superano i tempi di produzione e distribuzione delle mascherine di protezione) si mettono a punto i metodi diagnostici che permettono, inizialmente nel giro di poche ore e poi addirittura di minuti, il riconoscimento dei soggetti infettati. A soli due mesi dalla denuncia dell'epidemia cinese, a marzo 2020 hanno inizio le prime sperimentazioni di fase 1 sull'uomo di prototipi del vaccino.

Nel frattempo gli studi sull'infettività del virus spiegano il perché dell'aggressività, letalità e gravità dell'infezione da coronavirus e nel maggio 2020 la prestigiosa rivista *Cell* pubblica un articolo nel quale si dimostra che il virus per entrare nelle cellule umane lega una **proteina della superficie cellulare**: l'enzima di conversione dell'angiotensina 2, che, essendo la proteina che permette di agire a uno degli ormoni coinvolti nei meccanismi di regolazione della pressione sanguigna, è largamente presente nell'epitelio polmonare (ma anche a livello cardiaco, nell'intestino, nei reni e nei vasi sanguigni). Il meccanismo quindi di

azione di questo virus è simile a quello già descritto nel 2013 per gli altri coronavirus da Xing-Yi Ge e collaboratori sulla rivista *Nature*, tuttavia il COVID-19 ha una capacità di riconoscere e legarsi a questo "recettore" di almeno 10 volte superiore agli altri virus.

Nel frattempo, la corsa al vaccino continua e nel luglio-agosto 2020 già si è alla fase 3 di sperimentazione clinica che prevede la somministrazione a decine di migliaia di soggetti. Utilizzando le procedure di emergenza tra novembre e dicembre 2020 gli enti regolatori americano, Food and Drug Administration (FDA), ed europeo, European Medicines Agency (EMA), approvano i voluminosi dossier che provano la sicurezza e grande efficacia dei vaccini Pfizer-BioNTech e Moderna-NIH. Il 21 dicembre 2020, a meno di un anno dal riconoscimento da parte delle autorità cinesi della pericolosità del virus, il mondo ha a disposizione i primi vaccini, altri arriveranno a breve.

La spiegazione di questo record di rapidità consiste nel fatto che per la prima volta il vaccino è composto di **RNA che codifica per la sintesi delle proteine virali di innesco per la risposta anticorpale**. Ma la scelta di utilizzare un acido nucleico quale vaccino non è casuale, al contrario è fortemente radicata su almeno un trentennio di ricerca che aveva provato le enormi potenzialità dell'uso di queste molecole quali farmaci per la rapidità di realizzazione, precisione di azione, sicurezza e costi. Fino allora gli acidi nucleici erano stati utilizzati solo per farmaci di nicchia per le difficoltà di somministrazione e, nel caso dell'RNA, per la sua instabilità. Questa emergenza mondiale lo ha fatto emergere dai laboratori di ricerca superando le barriere di una distribuzione difficoltosa ($-70\text{ }^{\circ}\text{C}$), ma anche permettendo di mettere a punto prodotti che in parte superano la vulnerabilità della molecola (il farmaco Moderna-NIH che utilizza un RNA con una piccola modifica chimica in una delle basi che stabilizza la molecola). Accanto ai vaccini a RNA altri, come il vaccino AstraZeneca, sono stati rapidamente sviluppati grazie a lustri di ricerca di vettori virali sicuri da utilizzare soprattutto per terapia genica. L'utilizzo di adenovirus geneticamente modificati per impedirne la replicazione infatti è stato perfezionato negli anni per farne vettori per la produzione di proteine umane in soggetti portatori di malattie genetiche (Capitolo 14): i risultati di questa ricerca fatta nei laboratori dell'Università di Oxford hanno consentito ad AstraZeneca

Box 1 Vaccini a DNA e RNA: i successi della ricerca biologica degli ultimi 50 anni

di creare molto rapidamente un vaccino estremamente efficace e sicuro in quanto incapace di integrarsi nel genoma dell'ospite.

Negli anni passati grazie alla genetica molecolare abbiamo imparato a fare i farmaci proteici: dal primo prodotto delle biotecnologie negli anni '80 (insulina umana), la ricerca ci ha regalato farmaci via via sempre più complessi e mirati (si pensi ai farmaci oncologici quali il Rituxan® o il Keytruda®, oppure i nuovi farmaci per l'artrite reumatoide quali Humira®, Enbrel®, Remicade®, o tutti quelli come Stelara® per malattie rare come la malattia di Crohn o la psoriasi) che ci hanno permesso di curare malattie rare per le quali non esistevano cure efficaci. Il 2020 ha messo una nuova freccia nella faretra dei farmacologi aprendo una nuova e importante via per la farmacologia e la medicina "su misura". Ci stiamo tutti chiedendo come

sarà l'era post-COVID: forse la pandemia COVID, avendo tenuto a battesimo un nuovo passo fondamentale della ricerca farmacologica, ci mostra comunque uno spiraglio di un futuro positivo per la salute di tutti noi.

Un enorme successo, quindi, per la ricerca biologica, che pochi hanno voluto sottolineare, ma che è il frutto di cinquant'anni di investimenti, di ricerca a piccoli ma travolgenti passi segnati da almeno trenta ricercatori premiati con il premio Nobel. Tutto a partire dall'apparentemente semplice osservazione fatta da Arber, Nathan e Smith (Nobel per la Medicina nel 1978) che esistevano enzimi nei microrganismi capaci di fare quello che l'uomo sognava da tempo, cioè domare una macromolecola di enormi dimensioni e apparentemente inattaccabile come il DNA, tagliandola e ricucendola con la precisione di un sarto!

Tabella 3 Vaccini a base di acidi nucleici.

Nome vaccino	Azienda produttrice	Caratteristiche	Efficacia
BNT162b2	Pfizer/BioNTech (Stati Uniti/Germania)	RNA modificato tramite inserimento di nucleotidi artificiali, non riconosciuti dal sistema immunitario, e sostituzioni silenti a formare codoni di maggior utilizzo nelle cellule umane. L'mRNA è incapsulato in nanoparticelle lipidiche. La versione mutata della proteina Spike contiene due sostituzioni di prolina (designate "2P") che forzano la proteina Spike ad adottare una forma che stimola gli anticorpi neutralizzanti	95%
mRNA-1273	Moderna (Stati Uniti)	mRNA codificante per la proteina Spike stabilizzata e incapsulato in particelle lipidiche	94,1%

I vaccini a base di mRNA sono considerati più vantaggiosi dei vaccini a base di DNA poiché non devono essere trasportati nel nucleo per essere trascritti e possono essere somministrati a dosi inferiori. Inoltre, i vaccini a base di mRNA evitano il rischio di integrazione con il genoma della cellula ospite. La tecnologia associata a questo vaccino permette di accelerarne notevolmente la produzione commerciale. Esistono due vaccini che sfruttano questa tecnologia, **BNT162b2** ed **mRNA-1273**, che hanno mostrato una notevole efficacia clinica (*vedi* oltre) e sono disponibili in Italia (**Tabella 3**).

Per quanto riguarda la conservazione: BNT162b2 necessita di essere conservato a -70 °C per lungo tempo e a -20 °C per periodi più brevi; mRNA-1273 può essere conservato a -20 °C. Questa differenza di conservazione è legata al fatto che mRNA-1273 presenta una sequenza di RNA modificato che ne migliora la stabilità.

Gli studi di efficacia di entrambi i vaccini sono stati effettuati su popolazioni molto ampie. Di seguito vengono discussi i risultati clinici degli studi più significativi.

Box 2

Nanomateriali nella formulazione dei vaccini a mRNA

Affinché i vaccini a mRNA esercitino un effetto terapeutico è necessario che l'mRNA raggiunga in forma intatta il citoplasma delle cellule bersaglio, per essere tradotto in proteina e diventare un antigene per il sistema immunitario. Tuttavia, l'ingresso di un mRNA in una cellula presenta numerose difficoltà dovute alla forte carica negativa e alle grandi dimensioni, che possono variare fra 300 e 5000 kDa. Inoltre, gli mRNA utilizzati come farmaci sono altamente suscettibili alla degradazione da parte delle nucleasi plasmatiche, alla clearance renale e al riconoscimento da parte del sistema immunitario innato. D'altro canto, il vantaggio nell'utilizzo degli mRNA risiede nella facilità, sicurezza e duttilità del processo di sintesi. Infatti, l'mRNA presente nel vaccino è prodotto tramite una reazione di **trascrizione *in vitro*** in cui si utilizza una RNA polimerasi DNA-dipendente e un DNA plasmidico linearizzato, contenente il gene codificante la proteina S posto a valle di un promotore forte della trascrizione, consentendo rese elevate. Eventualmente, il gene può essere modificato per codificare forme più o meno diverse di antigene, come nel caso dei vaccini in via di sviluppo contenenti forme mutate di mRNA di Spike che mimano le mutazioni individuate nelle varianti *of concern* del COVID-19. La sequenza codificante è adattata sostituendo codoni di maggior utilizzo dalle cellule umane e nucleotidi modificati (come la pseudouridina) non riconosciuti dal sistema immunitario ed è fiancheggiata da porzioni non tradotte (cap in 5', 5' e 3' UTR e la coda di poliadenine) con conseguente aumento dell'efficienza di traduzione dell'antigene *in vivo*. A fine reazione, la purificazione dell'mRNA intero tramite HPLC consente di ottenere un prodotto a elevato grado di purezza, privo di prodotti secondari che impedirebbero la traduzione dell'mRNA una volta raggiunta la cellula bersaglio.

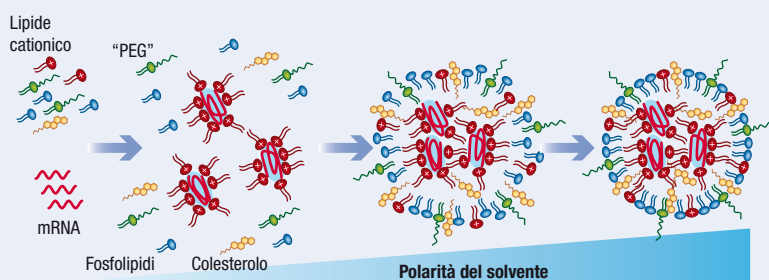
Alla luce di queste considerazioni, affinché l'mRNA raggiunga integro e in quantità suffi-

cienti il citoplasma cellulare e senza attivare il sistema immunitario contro di esso, è essenziale l'incapsulazione in un *drug delivery system*. I vaccini a mRNA sviluppati per prevenire il COVID-19 sono state formulati come **nanoparticelle lipidiche** (*lipid nanoparticles* o **LNP**) delle dimensioni di circa 100 nanometri, la cui composizione è fondamentale per la stabilità e la veicolazione dell'mRNA, ma anche per l'attivazione del sistema immunitario, agendo al contempo da adiuvante del vaccino, favorendo l'insorgenza di processi proinfiammatori che potenziano l'effetto terapeutico.

Le LNP sono costituite da 4 componenti principali: un lipide cationico ionizzabile con pKa compresa fra 6.2 e 6.5, un lipide coniugato a polietilene glicole (lipide-PEGilato), un fosfolipide neutro e il colesterolo. Il lipide cationico presenta un'estremità polare formata da gruppi amminici carichi positivamente a pH acido. Nel processo di formazione delle LNP, la carica positiva di questo lipide è fondamentale per creare interazioni elettrostatiche con l'mRNA, carico negativamente. Successivamente, la variazione di pH verso valori vicini alla neutralità permette di completare il processo di formazione delle LNP e l'incapsulamento dell'mRNA, anche se ad oggi la localizzazione esatta dell'mRNA è ancora molto dibattuta.

Ciò che differenzia le LNP dai liposomi (vescicole sferiche con un core acquoso e almeno un doppio strato lipidico) è la presenza di lipidi nel core, sebbene la presenza dell'acqua non sia completamente esclusa. Nonostante il core lipidico sia comune a tutte le LNP che incapsulano mRNA, la sua struttura dipende dalla composizione quali-quantitativa in termini di rapporto molare dei lipidi che lo costituiscono. Le LNP formulate con questi lipidi pH-sensibili non sono cariche a pH fisiologico, il che si traduce in una migliore biocompatibilità dovuta alla riduzione del legame alle proteine plasmatiche e alla minor possibilità di essere sequestrate nei tessuti, come il fegato e la milza.

Figura B2.1 Formazione delle nanoparticelle lipidiche contenenti mRNA e ruolo della polarità del solvente. [Fonte: modificata da M.L. Guevara et al., *Frontiers in Chemistry*, 23 ottobre 2020.]



Box 2 Nanomateriali nella formulazione dei vaccini a mRNA

D'altro canto, l'ambiente acido degli endosomi intracellulari induce la protonazione del lipide ionizzabile nell'ambiente acido degli endosomi e favorisce la fusione delle particelle con i fosfolipidi della membrana endosomiale, convertendo le LNP in una nuova struttura meno stabile che facilita il rilascio dell'mRNA dalle LNP nel versante citoplasmatico.

Il **lipide PEGhilato** è utilizzato per controllare la dimensione delle LNP, favorendo la formazione di una barriera sterica che previene l'aggregazione delle LNP durante il periodo di conservazione del vaccino. Dopo somministrazione, il PEG la si dissocia rapidamente dal lipide permettendo l'interazione delle LNP con le cellule dell'ospite. Il colesterolo e altri lipidi hanno la funzione di migliorare la stabilità della struttura delle LNP, facilitare l'interazione con la membrana plasmatica della cellula bersaglio e permettere l'interazione con gli endosomi.

I vaccini a mRNA incapsulati in LNP sono preferenzialmente somministrati per via intramuscolare. Il muscolo è un tessuto ampiamente vascolarizzato e ricco di diverse cellule immunitarie, caratteristiche che permettono

di dare luogo a una risposta infiammatoria localizzata e transiente che contribuisce al richiamo di cellule immunitarie nel sito di iniezione del vaccino; inoltre, la via intramuscolare permette di utilizzare volumi sufficienti di farmaco in una singola somministrazione e indurre minori effetti collaterali al sito di iniezione rispetto ad altre vie potenzialmente più immunogeniche. In seguito all'internalizzazione nelle cellule, probabilmente attraverso un processo di endocitosi mediata dall'apolipoproteina E, le LNP sono captate dal compartimento endolisomiale, dove la maggior parte di esse rimane intrappolata e si degrada nel tempo. Non è stato ancora pienamente compreso il *trafficking* intercellulare e i meccanismi alla base del rilascio dell'mRNA dagli endosomi per raggiungere il citoplasma.

Fonti: P. Patel, N.M. Ibrahim, K. Cheng. The Importance of Apparent pKa in the Development of Nanoparticles Encapsulating siRNA and mRNA. *Trends Pharmacol Sci* 42(6): 448-460 (2021).

J.A. Kulkarni, D. Witzigmann, J. Leung, R. van der Meel, J. Zaifman, M.M. Darjuan, H.M. Grisch-Chan, B. Thöny, Y.Y.C. Tam, P.R. Cullis. Fusion-dependent formation of lipid nanoparticles containing macromolecular payloads. *Nanoscale* 11: 9023-9031 (2019).

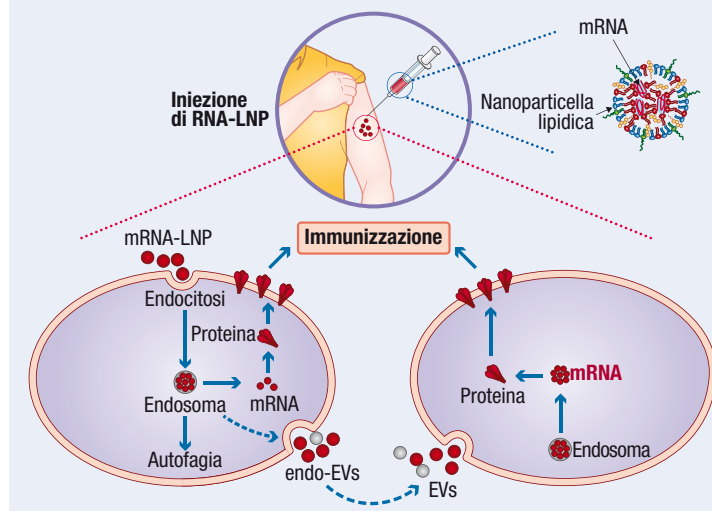


Figura B2.2 Immunizzazione indotta dai vaccini contenenti RNA-LNP. [Fonte: modificata da M. Maugeri et al. *Nat Commun* 10, 4333 (2019).]

Per quanto riguarda BNT162b2, in uno studio clinico multicentrico internazionale, controllato in doppio cieco con placebo, 43 448 soggetti di età pari o superiore a 16 anni sono stati randomizzati 1:1 per ricevere due dosi, a 21 giorni di distanza, di placebo o del vaccino candidato BNT162b2 (30 µg per dose). Gli endpoint primari erano l'efficacia del vaccino contro COVID-19 confermata mediante analisi di laboratorio e la sicurezza. BNT162b2 è stato somministrato a 21 720 soggetti, gli altri 21 728 hanno ricevuto placebo. Ci sono stati 8 casi di COVID-19 con

po mRNA-1273; l'efficacia del vaccino è stata quindi del 94,1% (95% CI, da 89,3 a 96,8%; $P < 0,001$). Il profilo di sicurezza ha mostrato una moderata reattogenicità transitoria dopo la vaccinazione nel gruppo mRNA-1273. Gli eventi avversi gravi sono stati rari, con un'incidenza simile nei due gruppi.

Questo studio di fase 3 ha permesso di concludere che il vaccino mRNA-1273 mostra un'efficacia del 94,1% nel prevenire la malattia da COVID-19, inclusa la malattia grave. A parte reazioni locali e sistemiche transitorie, non sono stati identificati problemi di sicurezza.

Un'analisi successiva ha incrociato i dati del registro americano relativo all'andamento delle gravidanze con quello dei soggetti che hanno effettuato la vaccinazione con uno dei vaccini a mRNA. L'analisi non ha mostrato differenze particolari legate al decorso della gravidanza in chi ha ricevuto il vaccino rispetto a chi non l'ha ricevuto, essendo simile la percentuale di gravidanze portate a termine.

Vaccini a vettori virali ricombinanti

I vettori virali rappresentano una delle strategie più efficaci, grazie alla loro spiccata capacità di infettare le cellule, rilasciare la sequenza di DNA e indurre una risposta immunitaria molto efficace. È stato valutato un vaccino COVID-19 ricombinante basato su adenovirus di tipo 5 (Ad5) che esprime la proteina S di SARS-CoV-2 per la sperimentazione di fase 1 a Wuhan, Cina. L'aumento degli anticorpi neutralizzanti specifici e della risposta delle cellule T è stato già osservato il 14° giorno dopo la vaccinazione. I risultati sono stati promettenti e si aspettano ulteriori valutazioni. Diversi altri ricercatori hanno riportato risultati di studi preclinici con vaccini SARS-CoV-2 utilizzando altri virus come vettori, incluso il vettore virale replicante del morbillo (ZyduS Cadila, Institut Pasteur/Themis/University of Pittsburgh Center per la ricerca sui vaccini), il vettore dell'influenza che esprime RBD (Università di Hong Kong) e il vettore virale non replicante basato su adenovirus che esprime la proteina Spike SARS-CoV-2 (Altimmune). Uno dei vaccini con vettore dell'adenovirus dello scimpanzé (ChAdOx1 nCoV-19) che esprime la proteina Spike di SARS-CoV-2 sviluppato dall'Università di Oxford e AstraZeneca è stato il primo a essere testato su larga scala.

Questa tipologia di vaccini utilizza adenovirus modificati in modo da convogliare nelle cellule umane le informazioni per produrre la proteina Spike, ma privi della capacità di replicarsi; questo fa sì che una volta eliminato il virus da parte del sistema immunitario l'espressione della proteina S viene meno.

Una volta somministrato per via intramuscolare, il vaccino virale, contenente la sequenza di DNA codificante la proteina Spike, penetra all'interno delle cellule dell'ospite, e ne favorisce l'espressione sulla superficie cellulare. Analogamente a quanto avviene nell'infezione naturale, il riconoscimento della proteina Spike "not self" da parte delle cellule immunitarie attiva la risposta immunitaria, in particolare quella adattativa, portando alla produzione di anticorpi. Contemporaneamente si genera un pool di linfociti B (cellule della memoria) che, localizzandosi in distretti immunitari secondari, sarà in grado di riattivarsi in seguito a un'infezione successiva proteggendo dalla malattia.

I vaccini che si basano su questo approccio utilizzano principalmente due tipologie di adenovirus ricombinante, il tipo 5 (Ad5) (CanSinoBio) o il tipo 26 (Ad26) (Johnson & Johnson). Il vaccino Sputnik V, invece, sfrutta adenovirus umano Ad26 per la prima dose e Ad5 per la seconda dose, migliorando in questo modo la risposta immunitaria al richiamo (Tabella 4).

Per quanto riguarda la conservazione: Sputnik V necessita di essere conservato a -20°C ; Ad26.COVS è stabile fino a 3 mesi a temperature di $2-6^{\circ}\text{C}$, come pure ChAdOx1/AZD1222 e Ad5nCOV.

La sicurezza ed efficacia del vaccino ChAdOx1 nCoV-19 è stata valutata attraverso un'analisi *ad interim* aggregata di quattro studi clinici in cieco, randomizzati e controllati, condotti nel Regno Unito, in Brasile e nel Sud Africa. I partecipanti di età pari o superiore a 18 anni sono stati randomizzati in modo casuale (1:1) a ricevere vaccino ChAdOx1 nCoV-19 o placebo (vaccino coniugato meningococcico gruppo A, C, W e Y o soluzione salina). I partecipanti al gruppo ChAdOx1 nCoV-19 hanno ricevuto due dosi standard; un sottogruppo nello studio del Regno Unito ha ricevuto una mezza dose come prima dose (dose bassa) e una dose standard come seconda dose. L'analisi di efficacia primaria includeva la presenza di COVID-19 sintomatico nei partecipanti inizialmente sieronegativi confermato da un tampone positivo al test mediante PCR dopo più di 14 giorni dalla seconda dose di vaccino. L'analisi di efficacia *ad interim* è stata svolta in 11 636 partecipanti (7548 nel Regno Unito, 4088 in Brasile). Nei partecipanti che avevano ricevuto due dosi standard, l'efficacia del vaccino è stata del 62,1% (95% CI 41,0-75,7; 27 casi di COVID-19 [0,6%] su 4440 partecipanti nel gruppo ChAdOx1 nCoV-19 vs 71 [1,6%] su 4455 partecipanti nel gruppo di controllo). Nei partecipanti che avevano ricevuto una prima somministrazione a basso dosaggio seguita da una dose standard, l'efficacia è stata del 90,0%. L'efficacia complessiva del vaccino in entrambi i gruppi è stata del 70,4%. A partire da 21 giorni dopo la prima dose, ci sono stati dieci casi ospedalizzati per COVID-19, tutti nel braccio di controllo; due sono stati classificati come COVID-19 gravi, incluso un decesso. Sono stati osservati 175 eventi avversi gravi che si sono verificati in 168 partecipanti, 84 eventi nel gruppo ChAdOx1 nCoV-19 e 91 nel gruppo di controllo. Analisi ulteriori hanno mostrato come in 1 soggetto ogni 100 000 vaccinati si possano osservare effetti collaterali gravi come comparsa di coaguli di sangue asso-

Tabella 4 Vaccini a vettori virali.

Nome Vaccino	Azienda produttrice	Caratteristiche	Efficacia
ChAdOx1/AZD1222	AstraZeneca/Oxford (Regno Unito/Svezia)	Adenovirus umano tipo 5 ricombinante (Ad5) con sequenza di DNA codificante per la proteina Spike	71% (Regno Unito e Brasile)
Ad26.COVS	Johnson & Johnson (USA)	Adenovirus umano tipo 26 (Ad26) ricombinante con sequenza di DNA codificante per la proteina Spike	72% (Stati Uniti) 68% (Brasile) 64% (Sud Africa)
Sputnik V	Gamaleya (Russia)	Prima dose Ad26 ricombinante, seconda dose Ad5 ricombinante, entrambi con sequenza di DNA codificante per l'intera proteina Spike	91,6%
Ad5nCOV	CanSinoBio (Cina)	Adenovirus umano tipo 5 ricombinante (Ad5) con sequenza di DNA codificante per la proteina Spike	65%

ciati a bassi livelli di piastrine. A inizio marzo 2021 sono stati riportati 30 eventi tromboembolici (prevalentemente venosi) in circa 5 milioni di soggetti che hanno ricevuto ChAdOx1. La spiegazione più accreditata indica che la vaccinazione con ChAdOx1 nCov-19 potrebbe causare lo sviluppo di una rara forma di trombocitopenia trombotica su base immuno-mediata da anticorpi attivanti le piastrine anti-PF4 che clinicamente mimano la trombocitopenia indotta da eparina. Tutti i casi si sono verificati in soggetti di età inferiore ai 60 anni, prevalentemente donne, e hanno portato a suggerire una preferenza di utilizzo di questo vaccino nei soggetti con più di 60 anni di età.

Gli studi con ChAdOx1 hanno poi portato a valutare con attenzione l'efficacia contro le varianti emergenti di SARS-CoV-2 preoccupanti, tra cui la variante B.1.351 (501Y.V2) identificata per la prima volta in Sud Africa. In questo caso la somministrazione di due dosi di ChAdOx1 nCov-19 non è risultata efficace nel proteggere dalle forme lievi e moderate dovute a infezione da parte della variante B.1.351.

Per quanto riguarda la sicurezza ed efficacia di Ad26.COV2.S, lo studio di fase 3 internazionale, randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo, ha randomizzato 19 630 partecipanti negativi a SARS-CoV-2 a ricevere Ad26.COV2.S e 19 691 a ricevere placebo. La somministrazione di Ad26.COV2.S ha protetto contro COVID-19 sia moderato che grave-critico almeno 14 giorni dopo la somministrazione (116 casi nel gruppo che ha ricevuto il vaccino vs 348 nel gruppo placebo; efficacia, 66,9%). L'efficacia del vaccino è risultata maggiore nei confronti della comparsa di COVID-19 grave-critico (76,7% per esordio \geq 14 giorni e 85,4% per esordio \geq 28 giorni). La sotto-analisi dei soggetti infettati con variante sudafricana ha mostrato un'efficacia inferiore. Per quanto riguarda le reazioni avverse, sono risultate superiori nel gruppo Ad26.COV2.S rispetto al placebo, ma sono state generalmente da lievi a moderate e transitorie. L'incidenza di eventi avversi gravi è stata simile tra i due gruppi. Questi dati hanno mostrato come una singola dose di Ad26.COV2.S protegge dall'infezione sintomatica da COVID-19 e da SARS-CoV-2 asintomatica ed è efficace contro le forme gravi e critiche, inclusi ricovero e morte. Come già successo per ChAdOx1 nCov-19, anche per Ad26.COV2.S sono stati osservati alcuni casi rari di formazione di coaguli di sangue in presenza di bassi livelli di piastrine. Anche in questo caso è stato suggerito l'utilizzo in soggetti con età superiore a 60 anni.

Vaccini basati su proteine di SARS-CoV-2

Come sopra già ricordato, la glicoproteina Spike è fondamentale per il legame e la fusione del coronavirus con la cellula ospite. Realizzare un vaccino basato sulla proteina S può quindi rappresentare una strategia per indurre efficacemente la produzione di anticorpi e la neutralizzazione del virus.

I ricercatori hanno inizialmente fuso un involucro e la proteina nucleocapsidica con una serie di epitopi derivati dalla proteina S e dalla RdRp per costruire un vaccino di fusione. La stabilità strutturale e le proprietà fisico-chimiche e immunologiche sono state studiate in una serie di screening preliminari; attualmente non esiste nessun vaccino approvato che si basi su questa tecnologia, ma ci sono alcuni candidati in fase avanzata di sviluppo clinico, tra cui COVID-19 NVX-CoV2373. Si tratta di un vaccino basato su proteine di fusione contenenti la proteina Spike e

generate attraverso un baculovirus, organizzate in nanoparticelle. Questo candidato ha mostrato un'elevata immunogenicità e la stimolazione di alti livelli di anticorpi neutralizzanti negli studi preclinici. L'adiuvante Matrix-M™ registrato da Novavax è stato incorporato in NVX-CoV2373 per consentire una risposta immunitaria e la stimolazione di alti livelli di anticorpi neutralizzanti.

Gli studi di fase 3 hanno coinvolto più di 15 000 soggetti e le prime analisi *ad interim* hanno mostrato come tra i primi 62 casi confermati con PCR di COVID-19, 56 sono stati riscontrati nel gruppo placebo mentre 6 nel gruppo trattato con NVX-CoV2373, indicando un'efficacia del vaccino pari all'89,3%. L'analisi stratificata in funzione delle varianti ha mostrato un'efficacia del 95,6 contro la forma iniziale e dell'85,6 contro la variante inglese.

Diversi altri vaccini a base di proteine in fase di sviluppo sfruttano una combinazione tra proteine o subunità virali e proteine di altro tipo con funzione di adiuvanti, che stabilizzano la formazione di nanoparticelle multimeriche a maggiore attività immunogenica.

3. Farmaci di precisione nel trattamento dell'infezione da SARS-CoV-2

La formazione di quantità sufficienti di anticorpi neutralizzanti il virus, indotte da qualsiasi vaccino anti-COVID-19 a difesa dall'infezione, è un processo che richiede alcune settimane. Rimane quindi fondamentale avere a disposizione farmaci che permettano di curare l'infezione in corso e le reazioni da essa scatenate, altrettanto importanti nella patogenesi della malattia. Lo **standard di cura** attuale della malattia di grado moderato e severo prevede terapia a base di corticosteroidi a basse dosi, per limitare i danni di un'inflammatione eccessiva e incontrollata, con il supporto eventuale di altri immunosoppressori, di eparina a basso peso molecolare, per mitigare le sequele tromboemboliche dell'infezione, e di antibiotici utilizzati allo scopo di evitare sovrainfezioni batteriche. Alla definizione di questi presidi si è giunti con numerosi trial clinici che si sono svolti nei mesi successivi all'inizio della pandemia con la pressante necessità di arruolare una popolazione sempre più eterogenea di individui di ogni provenienza ed etnia per confermare efficacia e sicurezza dei prodotti testati sulla popolazione mondiale. In parallelo, una vastissima attività di ricerca sta studiando nuovi farmaci: **farmaci antivirali**, ossia molecole dirette contro bersagli del ciclo vitale del virus, e **farmaci sintomatici**, fondamentali per mitigare i danni indotti dall'infezione sull'organismo (**Figura 6** e **Tabella 5**). Gli strumenti terapeutici attuali sono principalmente focalizzati sul legame proteina S-ACE2; tuttavia, altre strutture virali, come i domini di S2, Mpro e RdRp, sono altrettanto interessanti perché, essendo essenziali per il ciclo vitale virale, sono altamente conservate fra diversi CoV e soggette con scarsa probabilità a mutazioni. La comprensione dei passaggi chiave e delle molecole coinvolte nell'infezione, insieme allo studio dei meccanismi di risposta immunitaria ad essa associata, è un percorso lungo ma necessario per individuare i bersagli su cui possano agire nuovi farmaci di precisione, per contrastare in modo più efficace la malattia e la diffusione dell'infezione da SARS-CoV-2 e da possibili nuovi CoV che potranno emergere in futuro.

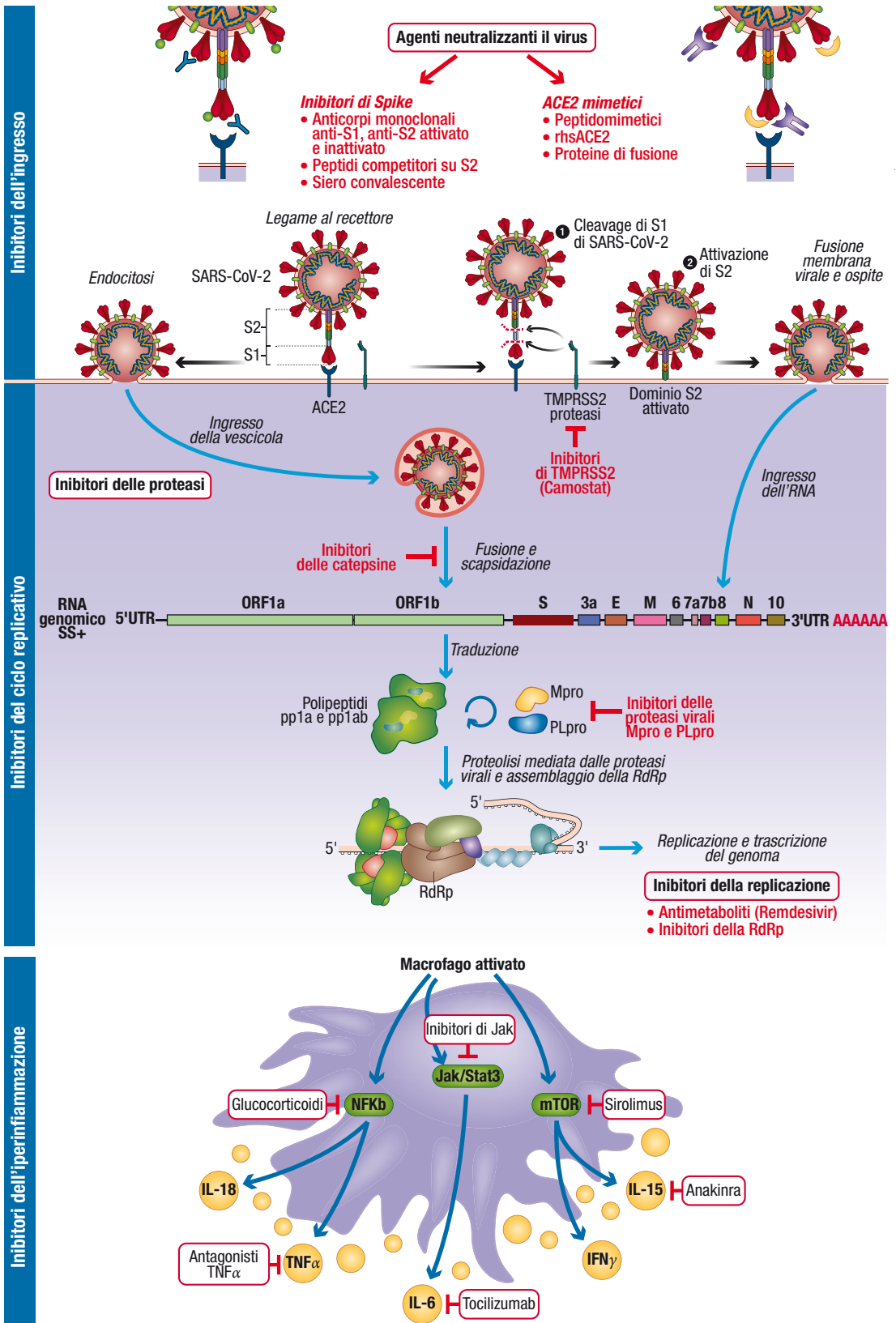


Figura 6 Bersagli farmacologici nel ciclo vitale del virus e nella risposta immunitaria di COVID-19.

Farmaci antivirali

Gli inibitori dell'ingresso del virus

L'interazione fra proteina Spike e ACE2 è un passaggio essenziale per l'entrata del virus nella cellula ospite. Esistono diversi farmaci studiati in clinica che hanno come bersaglio la componente virale o le proteine dell'ospite coinvolte in questo contatto molecolare e che risultano perciò altamente efficaci nel ridurre la carica virale (Figura 6).

Inibitori di Spike. Sono stati generati **anticorpi monoclonali** inibitori della proteina Spike, che riconoscono epitopi presenti nella porzione RBD del dominio S1 o vicini ad essa. Il meccanismo d'azione prevede il **sequestro delle particelle virali**, riducendo o impedendo l'interazione con le cellule dell'ospite, oppure la **destabilizzazione del complesso di pre-fusione**, senza in questo caso inibire il legame con ACE2. La strategia più efficace e concreta in quest'ambito è l'utilizzo di cocktail di anticorpi monoclonali, progettati per riconoscere epitopi differenti di Spike. Ne è un esempio l'associazione dei due anticorpi monoclonali umani **casirivimab e imdevimab** (Regeneron/Roche) e quella più recente di **bamlanivimab ed etesevimab** (Eli Lilly), autorizzati alla temporanea distribuzione per il trattamento di pazienti COVID-19 lievi o moderati non ospedalizzati e che non necessitano di ossigenoterapia ma che sono ad alto rischio di progredire verso forme più severe di malattia. I risultati indicano un miglior effetto di questi farmaci in associazione, rispetto alla monoterapia, sulla riduzione della carica virale in pazienti all'esordio della malattia grave. La posologia prevede una singola infusione endovenosa nel più breve tempo possibile dall'esito positivo del test per SARS-CoV-2 o entro 10 giorni dall'insorgenza dei sintomi. I due anticorpi di entrambe queste associa-

Tabella 5 Terapie in uso o in via di sviluppo per la prevenzione e la cura di COVID-19.

Tipologia	Bersaglio virale	Bersaglio umano
Farmaci convenzionali		
Corticosteroidi		Risposta infiammatoria
Eparina		Coagulazione
Ritonavir	RdRp (antimetabolita)	
Plasma convalescente	Virus intero	
Inibitori polimerasi	RdRp	
Inibitori proteasi	Mpro	
Farmaci biotecnologici		
Vaccini	Spike	
Anticorpi monoclonali neutralizzanti	Spike	
rhsACE2	Spike	
ACE2 peptido-mimetici	Spike	
Proteine di fusione ACE2-Fc	Spike	
Anticorpi monoclonali anti-citochine		IL-6, infiammazione
Proteine ricombinanti immunosoppressorie		IL-1R, infiammazione

zioni legano epitopi differenti nel dominio RBD della proteina Spike, bloccando il legame al recettore ACE2; solamente etesevimab presenta sostituzioni amminoacidiche nella regione Fc per ridurre la funzione effettrice (vedi Capitolo 10). Esiste comunque il rischio potenziale di insuccesso del trattamento dovuto all'emergere di varianti del virus resistenti sia alla monoterapia sia alle associazioni.

Sulla fase iniziale dell'infezione agisce anche una terapia in corso chiamata **siero convalescente** che consiste nella somministrazione di una miscela di **immunoglobuline umane iperimmuni** poiché isolate dal plasma di soggetti convalescenti, ossia infettati e guariti di recente dal COVID-19. Alcune evidenze suggeriscono che le diverse IgG/IgM presenti in questa miscela "naturale" agiscano in modo sinergico, con efficacia superiore rispetto agli anticorpi monoclonali utilizzati singolarmente, e possano aiutare a eliminare il virus e le cellule infettate, analogamente a quanto sperimentato in precedenza con i sieri convalescenti per SARS e MERS.

Per impedire il legame fra S e ACE2 si è anche valutata la possibilità di utilizzare frammenti di proteina S, come l'RBD, che fungano da competitori per il legame con ACE2. La disponibilità di queste proteine solubili sembra però non portare a vantaggi terapeutici a causa della possibilità che la risposta anticorpale, sviluppata dal paziente durante l'infezione, possa inibirne l'efficacia.

Oltre ai farmaci ad azione diretta sulla subunità S1, si sta indagando l'attività di altri competitori a base peptidica che interagiscano in modo selettivo su alcune porzioni di S2 o sul peptide di fusione, attivati dopo il distacco di S1. Questi peptidi hanno mostrato attività antivirale in modelli preclinici per effetto di inattivazione della subunità S2.

Purtroppo, le terapie ad azione sulla proteina S possono essere soggette a riduzione di efficacia, essendo questa un epitopo geneticamente instabile a causa della continua emersione di variazioni genetiche che frequentemente interessano la sequenza codificante per questa proteina. Queste mutazioni portano a evasione sia dai monoclonali sia dai sieri convalescenti (**Box 3**).

sACE2 mimetici. Il secondo bersaglio per modulare la fase di attacco del virus è la proteina cellulare ACE2. Quest'enzima fa parte del **sistema renina-angiotensina (RAS)**, che regola la pressione sanguigna e il bilanciamento elettrolitico e dei fluidi corporei, in cui ACE2 ha una funzione fondamentale nel bilanciare gli effetti negativi prodotti dai metaboliti del sistema RAS (**Box 4**). Il legame con SARS-CoV-2 determina una riduzione della quantità di ACE2 disponibile sulle membrane plasmatiche, e dunque uno sbilanciamento in senso negativo del sistema RAS, che si dimostra più elevato in relazione alla gravità della malattia. Di conseguenza, se da una parte la riduzione di espressione di ACE2 potrebbe portare a un blocco dell'entrata del virus nelle cellule bersaglio, dall'altra la perdita della funzione benefica di ACE2 porta a iperattivazione del sistema RAS e conseguente danno tissutale. È interessante ricordare che COVID-19 si sviluppa spesso in forma peggiore in pazienti con patologie, quali ipertensione, diabete, malattie cardiovascolari e renali. Tutte queste sono associate a RAS iperattivo e vengono infatti trattate con ACE-inibitori o antagonisti del recettore dell'angiotensina II. L'infezione stessa porta ad aumentare i livelli di Ang II. Attualmente, le linee guida consigliano di continuare la terapia con questi farmaci in

Box 3

Le varianti di SARS-CoV-2: infettività, patogenicità, diagnosi, terapia

Le varianti di SARS-CoV-2 sono diffuse in tutto il mondo e sono classificate dai Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Le varianti "di preoccupazione" (**variants of concern, VOC**) circolanti al mese di giugno 2021 sono riportate in **Figura B3.1**.

Gli studi condotti hanno dimostrato che le mutazioni N501Y, E484K e K417N aumentano l'affinità di legame del dominio RBD di Spike con ACE2.

Le criticità principali derivanti dall'emergenza di varianti virali sono quattro: trasmissibilità, gravità della malattia, velocità di reinfezione (ossia elusione del sistema immunitario) ed efficacia dei vaccini (cioè evasione dall'immunità indotta dal vaccino). Se la campagna di vaccinazione non ha ancora raggiunto coperture sufficienti, la diffusione di varianti a maggiore trasmissibilità può avere un impatto rilevante laddove non vengano adottate misure di mitigazione adeguate a mantenere l'incidenza entro valori che permettano il sistematico tracciamento dei casi e dunque il contenimento dei focolai nascenti.

Individuazione delle varianti con sequenziamento del genoma virale. Le linee guida emanate dalle agenzie regolatorie raccomandano di sequenziare il genoma virale di pazienti COVID-19 quando sussistono evidenze riconducibili con elevata probabilità alla presenza di varianti, come la positività di soggetti già vaccinati e che successivamente si infettano nonostante una risposta immunitaria al vaccino, oppure nei contesti ad alto rischio come gli ospedali che ricoverano pazienti immunocom-

promessi positivi per COVID-19 e per lunghi periodi, o in individui positivi in arrivo da Paesi con alta incidenza di varianti. Questa caratterizzazione molecolare viene condotta tramite metodiche di *next generation sequencing* (Capitolo 3) a partire dall'estrazione dell'RNA dai tamponi naso- e orofaringei, successiva retrotrascrizione a cDNA utilizzando dei random primer come innesco della reazione e amplificazione dell'intero genoma virale con PCR multiplex, utilizzando primer che generano ampliconi di 400 bp e che coprono l'intero genoma di 30 kb sovrapponendosi per 70 bp. Questi prodotti di amplificazione vengono ulteriormente amplificati per generare librerie di frammenti di DNA sequenziati con strumenti di nuova generazione, i *reads* assemblati e allineati con il genoma di riferimento, individuando così eventuali mutazioni. Il test di sequenziamento del genoma del virus viene effettuato ogni settimana in centri specializzati a livello nazionale su almeno 500 campioni selezionati casualmente fra i pazienti positivi, in modo da individuare quali mutazioni siano eventualmente presenti e controllarne l'incidenza.

Trasmissibilità. La caratterizzazione molecolare di nuovi *lineage* o ceppi varianti di SARS-CoV-2 permette di effettuare una ricostruzione filogenetica tramite analisi bioinformatiche di comparazione con genotipi di riferimento e comprendere l'evoluzione temporale e territoriale della diffusione. Per esempio, è stato stimato che la variante sudafricana rappresentasse l'11% dei virus sequenziati (44 di 392) in Sud Africa alla prima settimana di ottobre 2021,






	Variants of concern (Paese di primo isolamento)	WHO label	Mutazioni di interesse di Spike	Impatto su trasmissibilità	Impatto su immunità	Impatto su gravità
 D614G (Cina)	 B.1.1.7 (Regno Unito)	alfa	N501Y, D614G, P681H	Si	No	Si
	 B.1.351 (Sud Africa)	beta	K417N, E484K, N501Y, D614G, A701V	Si	Si	Si
	 P1 (Brasile)	gamma	K417T, E484K, N501Y, D614G, H655Y	Si	Si	Si
	 B.1.617.2 (India)	delta	L452R, T478K, D614G, P681R	Si	Si	?

Figura B3.1 Varianti di preoccupazione di SARS-CoV-2 identificate a maggio 2021

Box 3 (Continua)

il 60% (302 di 505) a un mese di distanza e l'87% (363 di 415) all'inizio di dicembre 2021. La trasmissibilità maggiore è stata stimata superiore del 50% rispetto alle varianti preesistenti in questo Paese. Una volta identificate, queste varianti vengono studiate tramite saggi di infettività per valutare i cambiamenti nel legame del nuovo fenotipo ad ACE2.

La variante B.1.617.2 o "variante Delta", inizialmente identificata in India a ottobre 2020, è stata annoverata a maggio 2021 come *variant of concern* sulla base dell'elevata trasmissibilità e ridotta neutralizzazione ed è considerata parzialmente responsabile della seconda ondata pandemica registrata a febbraio 2021 in India. Contiene numerose mutazioni nella proteina Spike rispetto alla sequenza del virus isolato a Wuhan, ma non quelle nell'RBD comunemente riscontrate nelle altre VOC. Questa variante rappresenta la forma dominante di SARS-CoV-2 nel Regno Unito, avendo soppiantato lo strain B.1.1.7. L'efficacia dei vaccini attualmente in uso sembra ridotta contro la variante Delta; l'argomento è oggetto di numerosi studi che comparano la capacità di questa variante di eludere gli anticorpi neutralizzanti stimolati dai diversi vaccini.

Gravità di malattia e mortalità. Gli studi effettuati nel Regno Unito hanno collegato i casi con variante inglese con un aumento della gravità di malattia, maggior rischio di ospedalizzazione e decesso. Un aumento di gravità e letalità non è stato ancora collegato alle altre varianti. Infatti, è stato ipotizzato che l'aumento (+ 20%) della mortalità in Sud Africa sia da attribuire all'elevata trasmissibilità della variante locale, che ha causato un'ondata di ammissioni ospedaliere con conseguente sovraffollamento del servizio sanitario e compromissione della possibilità di accedere tempestivamente alle cure o ricevere trattamenti adeguati.

Evasione dall'immunità naturale. I ceppi varianti sono studiati anche tramite test di neu-

tralizzazione in cui vengono analizzati eventuali cambiamenti di efficacia del siero convalescente o degli anticorpi neutralizzanti nel bloccare la loro replicazione. Con la variante B.1.1.7 l'attività di neutralizzazione degli anticorpi è ridotta in modo lieve (1 volta e mezzo), mentre la variante sudafricana elude gli anticorpi neutralizzanti nel 48 % dei campioni di siero convalescente (21 di 44) ottenuti da pazienti infettati precedentemente da COVID-19. In un trial clinico condotto in Sud Africa su un vaccino, è emerso che fra le persone arruolate che avevano ricevuto il placebo l'incidenza di COVID-19 fosse del 7,9% fra i sieronegativi e del 4,4% nelle persone arruolate che erano state precedentemente infettate da SARS-CoV-2. Questo ha indicato che la variante 501Y.V2 sfugge al sistema immunitario attivato dall'infezione con ceppi preesistenti.

Evasione dall'immunità indotta dai vaccini.

Saggi di neutralizzazione vengono anche condotti utilizzando il siero di soggetti vaccinati per comprendere se il sistema immunitario attivato da un particolare vaccino abbia efficacia contro una variante. In questo caso, si possono avere risposte diverse a seconda del tipo di vaccino utilizzato. La riduzione di efficacia è considerevole nei casi di infezione delle varianti brasiliana e sudafricana; alcuni studi mostrano che il siero di soggetti immunizzati con AZD1222 (AstraZeneca) presenta attività neutralizzante contro B.1.351 ridotta dell'86% o totalmente assente.

Terapia antivirale. L'efficacia dei farmaci antivirali cambia in base alla frequenza e localizzazione delle mutazioni virali. Le mutazioni geniche che portano a cambiamenti nella struttura della proteina S, come discusso nel testo, si verificano con maggior frequenza e probabilità, causando riduzione dell'efficacia dei farmaci ad azione su questo bersaglio.

Fonti: *New England Journal of Medicine* 384, 2021; www.cdc.gov; www.iss.it; www.ecdc.europa.eu.

caso di infezione poiché non esistono ad oggi evidenze che suggeriscano effetti di peggioramento sull'evoluzione della patologia. Un approccio terapeutico valido per contrastare l'ingresso di SARS-CoV-2 senza alterare l'equilibrio endogeno prevede di sfruttare l'attività della **forma solubile di ACE2 (sACE2)**, che si genera nel nostro organismo ad opera di proteasi di membrana e che mantiene il sito di legame per il virus. Le forme ricombinanti di sACE2 ostacolano il legame del virus ad ACE2 di membrana, mantenendo così intatto il ruolo di quest'ultimo nel sistema RAS. Diversi trial clinici stanno valutando l'attività di preparati contenenti sACE2 umana ri-

Box 4 ACE2: meccanismo d'azione fisiologico e ruolo nel COVID-19

ACE2 è un enzima che appartiene al sistema renina-angiotensina (RAS), che include l'angiotensinogeno (ANG), l'angiotensina I (Ang I), Ang II, Ang-(1-7), Ang-(1-9), la renina, l'enzima che converte l'angiotensina (ACE) e ACE2. Tramite l'azione della renina, ANG viene convertita nel metabolita inattivo Ang I, successivamente tagliato dall'enzima ACE ad Ang II, un peptide di 8 amminoacidi biologicamente attivo. Ang II è ulteriormente metabolizzata da Ang-(1-7) da ACE2, che può anche agire su Ang I a dare Ang-(1-9). La funzione biologica di Ang II è mediata essenzialmente dal **recettore di tipo 1 di Ang II (AT1R)**, la cui attivazione è frequentemente associata a condizioni patologiche che comportano infiammazione, fibrosi e danno tissutale. L'effetto deleterio di Ang II/AT1R è controbilanciato da ACE2. Infatti, l'azione di questo enzima, oltre che a ridurre i livelli di Ang II, porta alla formazione di Ang-(1-7) e Ang-(1-9), che, attraverso il legame con i propri recettori, rispettivamente Mas1R e AT2R, causano risposte antinfiammatorie e protettive.

ACE2 è perciò un elemento essenziale nel controllo della pressione, del bilanciamento dei fluidi e delle funzioni cardiovascolari. Questa proteina è espressa in quantità elevate nella mucosa nasale e orale e nell'e-

pitelio alveolare polmonare, il che spiega perché SARS-CoV-2 si trasmette attraverso l'inhalazione di particelle virali. ACE2 è anche espresso da altri tessuti, come i reni, il cuore e l'intestino; questo fa supporre che attraverso il sangue il virus possa raggiungere altri organi che esprimono ACE2, come suggerito dall'osservazione di carica virale in campioni di saliva, feci o urina di pazienti COVID-19. È stata descritta anche l'esistenza di una forma solubile di ACE2, **sACE2**, generata tramite **shedding**, ossia taglio enzimatico di ACE2 di membrana per opera della proteasi ADAM17, che rilascia ACE2 nel circolo sanguigno. Contenendo ancora il sito di legame per Ang II, sACE2 mantiene attività biologica poiché lega Ang II e ne blocca l'attività, fungendo da recettore *decoy* per Ang II ma anche per SARS-CoV-2. Dati incoraggianti relativi a un ruolo terapeutico di sACE2 si sono ottenuti con la somministrazione per infusione di ACE2 umana ricombinante (**rhsACE2**) in pazienti con sindrome respiratoria acuta a eziologia virale, che ha portato alla riduzione dei livelli plasmatici di Ang II innalzando quelli dei peptidi Ang-(1-7) e Ang-(1-9).

Nel COVID-19 si è osservato che il virus causa down-regulation di ACE2, ossia la ri-

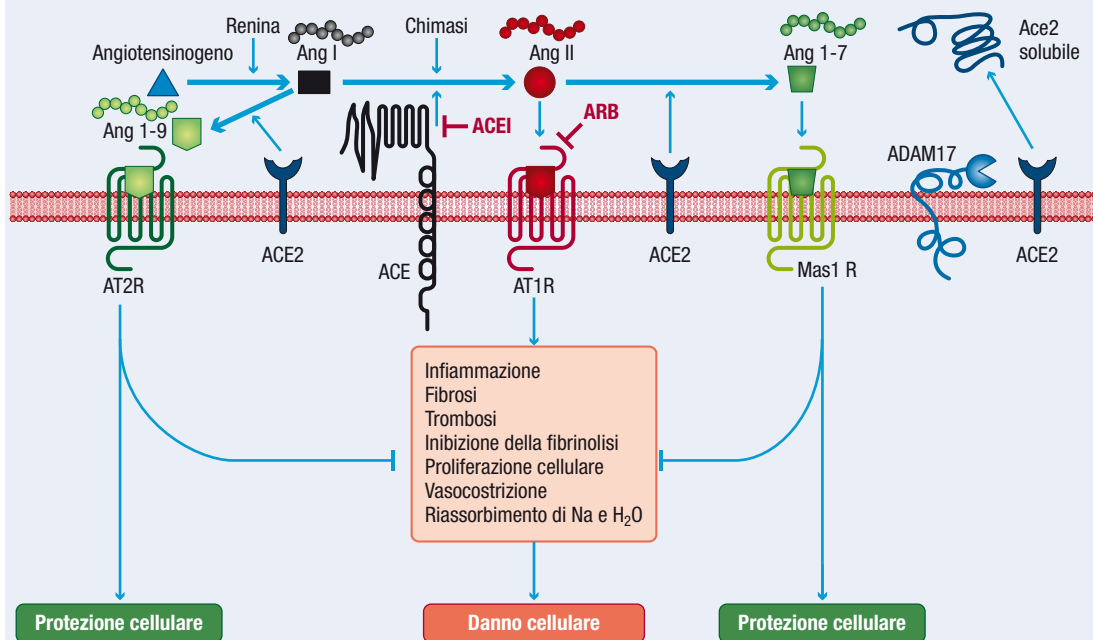


Figura B4.1 Sistema renina-angiotensina e interazione con ACE2. (Modificata da Dean A.Q. et al., The fight against COVID-19: Striking a balance in the renin-angiotensin system, *Drug Discovery Today*, in press.)

Box 4 (Continua)

duzione dell'espressione del recettore sulla membrana plasmatica poiché il legame con Spike induce la sua **internalizzazione**. Alcune evidenze hanno mostrato che la proteina Spike di SARS-CoV-2 induce anche *shedding* di ACE2, producendo sACE2. È ancora da stabilire con chiarezza il ruolo sulla malattia della riduzione di espressione di ACE2 e dell'attività di interferenza di sACE2 sul sistema RAS. Evidenze sperimentali hanno dimostrato che la mancanza di ACE2 porta a un aumento del danno polmonare dovuto all'infezione da SARS-CoV-2 o a ridotta protezione renale o del sistema cardiovascolare in patologie infiammatorie, a suggerire un ruolo protettivo di ACE2 attraverso la regolazione del sistema RAS. Analogamente, l'utilizzo di ACE inibitori o di antagonisti di AT1R, che portano a un blocco

del sistema RAS, si associa a un effetto benefico che riduce il danno polmonare misurato in diversi modelli sperimentali.

L'aumento di espressione di ACE2 indotto da ACE inibitori (ACE-I) o dagli antagonisti di AT1R (ARB, es. i sartani), riportato in diversi modelli animali, non è ancora confermato nell'uomo. Gli studi osservazionali non hanno identificato nessun aumento di rischio di malattia grave nei pazienti COVID-19 in trattamento con agenti bloccanti di RAS rispetto ad altri trattamenti o a nessun trattamento. La possibile sospensione anche temporanea di questi farmaci ipotizzata dal timore che potessero favorire l'ingresso e la diffusione del virus, non è giustificabile sulla base dei dati attuali. Anzi, l'aumento di Ang II causato dall'internalizzazione di ACE2 nel COVID-19 è prevenuta dai sartani.

combinante (**rhsACE2**), che agiscono da sACE2-mimetici tramite un doppio meccanismo: da recettori *decoy* di Spike che, sequestrando il virus, impediscono l'attacco alla cellula ospite, e da rigeneratori di ACE2 endogeno che, rimanendo escluso dall'infezione, ripristina il bilanciamento di RAS. Numerosi studi preclinici hanno dimostrato l'efficacia di rhsACE2 nella riduzione del numero di particelle virali e sono in via di sviluppo numerose forme ingegnerizzate: peptido-mimetici della porzione NH₂-terminale di ACE2, prodotti contenenti rhsACE2 wild type e sue forme mutate per aumentare l'affinità di legame a Spike, e proteine di fusione ACE2-Fc in cui il frammento cristallizzabile (Fc) delle IgG umane è utilizzato per prolungare l'emivita della proteina ricombinante (vedi Capitolo 9).

Gli inibitori della replicazione virale

Inibitori delle proteasi. Come già descritto in precedenza, il legame con ACE2 comporta modificazioni conformazionali della proteina S che espongono sulla superficie un sito di riconoscimento per proteasi cellulari, come TMPRSS2, furina e catepsina, che tagliano la proteina S e generano la subunità S2. Attraverso il peptide di fusione nella porzione COOH-terminale, S2 si ancora alla membrana e subisce dei ripiegamenti che portano alla fusione delle membrane virali e cellulari (Figura 6). **Gli inibitori delle proteasi**, come TMPRSS2 e le catepsine, sono una modalità terapeutica molto promettente per bloccare in modo specifico questo processo. **Camostat** mesilato e **nafamostat**, utilizzati in alcuni Paesi per altre indicazioni cliniche, sono ora sotto studio per inibire l'infezione da SARS-CoV-2 in qualità di **inibitori della proteasi TMPRSS2**, attiva sulla serina. Analogamente, si stanno testando degli **inibitori delle catepsine**: queste proteasi, ad attività sulle cisteine, si trovano sulla membrana degli endosomi e modificano la subunità S2 che è presente nei virioni internalizzati tramite fagocitosi, favorendo la fusione delle membrane e il rilascio di RNA genomico virale all'interno della cellula; sono associati a questo meccanismo anche gli antibiotici glicopeptidici **teicoplanina** e **dalbavancina**, e la molecola **BLD-2660**, inibitore della catepsina L.

Sono stati presi in considerazione anche inibitori di proteasi utilizzati nella terapia di altre infezioni, come quelle da HIV e HCV, poiché la loro azione potrebbe estendersi in modo aspecifico anche alla proteasi di SARS-CoV-2, permettendo il loro riposizionamento nella terapia di COVID-19. **Lopanavir**, un inibitore della proteasi ad aspartato di HIV utilizzato in associazione con **ritonavir** (poiché quest'ultimo inibisce il metabolismo epatico e quindi aumenta l'emivita di lopanavir), o altri inibitori di proteasi, quali simeprevir, danoprevir e boceprevir, utilizzati nelle infezioni d HCV, non hanno però dimostrato miglioramento degli *outcomes* clinici, come mortalità e degenza ospedaliera. Per raggiungere efficacia clinica sembrano molto promettenti gli **inibitori di Mpro**, molecole ad azione inibitoria specifica della proteasi necessaria ad attivare il primo passaggio della replicazione virale nell'ospite. Sono in via di sviluppo preclinico sostanze peptido-mimetiche ad azione sui diversi siti di legame della proteasi al substrato; questi composti potrebbero diventare mezzi insostituibili, anche tramite terapie di associazione, per inibire direttamente la proteasi e distruggere il ciclo vitale del virus nei pazienti all'esordio di malattia.

Nelle fasi iniziali della pandemia di COVID-19 alcuni studi hanno analizzato l'efficacia della **cloroquina** e del suo metabolita, l'**idrossicloroquina**. Questi farmaci, già ampiamente utilizzati nella pratica clinica come antimalarici e dunque più rapidamente approvati come utilizzo *off-label*, inibiscono l'acidificazione degli endosomi e si è pensato perciò che quest'azione potesse estendersi anche al rilascio intracellulare di RNA di SARS-CoV-2, come di fatto è stato dimostrato solo *in vitro*. I dati clinici successivi non hanno però evidenziato efficacia nel ridurre morbilità e mortalità, mentre si sono verificati importanti effetti collaterali.

Antimetaboliti. Per il suo ruolo chiave nella replicazione virale, RdRp è oggetto di numerosi studi per individuare terapie antivirali. La sua struttura altamente conservata nella famiglia delle polimerasi virali può portare grandi vantaggi, poiché molti membri di questa famiglia sono stati precedentemente già studiati e le informazioni ottenute possono essere utili per ideare nuovi agenti terapeutici. Gli **analoghi nucleosidici** a RNA sono dei profarmaci convertiti in metaboliti attivi trifosfato all'interno della cellula ospite. Incorporati nell'RNA nascente da parte della RNA polimerasi virale, causano la terminazione della sintesi di RNA e dunque della replicazione virale. Sebbene i coronavirus esprimano enzimi, le esonucleasi, che hanno la capacità di rimuovere i nucleotidi incorporati in modo difettoso nelle catene di neosintesi e quindi portano a resistenza contro i farmaci nucleosidici, alcuni **analoghi ribonucleosidici inibitori di RdRp** hanno dimostrato efficacia nella riduzione della carica virale in modelli sperimentali a concentrazioni non tossiche.

Ne è un esempio importante **remdesivir** (noto come Veklury[®]), che è un analogo nucleotidico dell'adenosina, sviluppato anni fa per trattare Ebola, MERS e SARS; avendo mostrato attività contro SARS-CoV-2 in modelli sperimentali, è stato il primo farmaco antivirale ad aver ricevuto l'autorizzazione dall'EMA con indicazione specifica per il trattamento del COVID-19 in casi selezionati di pazienti con polmonite e che ricevono ossigenoterapia. Somministrato una volta al giorno mediante infusione endovenosa, per una durata di trattamento dai 5 ai 10 giorni, mostra un accorciamento del tempo di recupero e riduzione della morta-

lità; i principali rischi connessi all'utilizzo di remdesivir sono legati alla tossicità epatica e renale.

Inoltre, **inibitori di RdRp** ad azione sul sito di legame sono stati utilizzati con successo nella terapia di numerose infezioni da coronavirus, come SARS-CoV e MERS, ma anche HIV o HCV. Appare perciò interessante la possibilità di utilizzare questi composti anche nella terapia del COVID-19.

Farmaci sintomatici

In assenza di farmaci inibitori della malattia, il paziente COVID-19 necessita di terapia di supporto per il trattamento dei sintomi, dai più moderati a quelli più gravi fino alla terapia intensiva. La dispnea e l'ipossiemia richiedono **ossigenoterapia**, ossia l'inalazione di ossigeno supplementare tramite ventilazione meccanica non invasiva con mascherine, caschi o cannule nasali, ricorrendo a intubazione nell'aggravamento del paziente per insufficienza respiratoria acuta. I principali farmaci sintomatici, anche detti **adiuvanti** o **di supporto**, utilizzati per il trattamento di pazienti ospedalizzati COVID-19 sono i corticosteroidi e l'eparina. A questi si possono aggiungere farmaci anti-citochine per ridurre i danni causati dalla tempesta di citochine, evento frequente negli stadi avanzati dell'infezione. Non verranno qui trattati i farmaci utilizzati per le manifestazioni cardiovascolari associate al COVID-19.

Corticosteroidi. Come gli ormoni endogeni naturali, questi farmaci di sintesi hanno proprietà antinfiammatoria e immunosoppressiva e regolano il metabolismo sistemico. Sono ampiamente utilizzati in casi di infiammazione cronica, reazioni allergiche e malattie autoimmuni, e in patologie strettamente correlate a COVID-19, come SARS, MERS e ARDS. Sebbene all'inizio della pandemia di COVID-19 non fossero disponibili prove sufficienti a giustificarne l'utilizzo, i corticosteroidi sono l'unico trattamento farmacologico che ha dimostrato un beneficio in termini di riduzione della mortalità. Sono raccomandati nei pazienti COVID-19 gravi che necessitano di supplementazione di ossigeno, per limitare l'infiammazione polmonare e la ARDS. Il beneficio di questi farmaci, come il **desametasone**, dipende dalla tempistica di trattamento in funzione della gravità della condizione clinica, ossia vanno assunti quando dalla fase iniziale di infezione virale si sono verificate quelle successive di risposta infiammatoria e immunitaria. I dosaggi bassi (6 mg 1 volta/die) e limitati nel tempo (per un massimo di 10 giorni) sono adattati al paziente e i loro eventuali effetti indesiderati costantemente monitorati, visto che l'utilizzo di questi farmaci si associa a effetti collaterali seri che espongono maggiormente il paziente a infezioni secondarie, ritardano l'eliminazione del patogeno e riducono il numero dei linfociti. È anche da ricordare l'effetto avverso nei pazienti diabetici, in cui sia l'infezione sia l'utilizzo dei glucocorticoidi possono destabilizzare gravemente il controllo glicemico. Altri corticosteroidi utilizzabili sono **metilprednisolone**, **prednisone** e **idrocortisone**.

Eparina a basso peso molecolare (EBPM). L'eparina è un farmaco anticoagulante utilizzato nella terapia della trombosi venosa profonda, dell'embolia polmonare e della sindrome coronarica acuta. Esempi di questa classe di farmaci sono **enoxaparina**, **parnaparina** e **fondaparinux**. Nelle fasi iniziali del COVID-19, nei pazienti ospedalizzati e quindi costretti a letto, con conseguente maggiore rischio di eventi tromboembolici, e che presentano polmonite e sintomi respiratori, è raccomandato a scopo profilattico l'uso di EBPM per prevenire il tromboembolismo

polmonare. È stato anche ipotizzato un effetto trombogeno diretto del virus. Nelle fasi più avanzate, EBPM è utilizzata a dosi terapeutiche per trattare fenomeni tromboembolici vascolari, associati a iperinflamazione e iperreattività piastrinica, e per contenere gli effetti sulla coagulazione della tempesta citochinica. Il meccanismo d'azione di EBPM si associa a protezione dell'endotelio vascolare, diminuzione dei biomarcatori infiammatori e riduzione della disfunzione polmonare micro- e macro-circolatoria e del danno d'organo. È importante ricordare che l'infezione da SARS-CoV-2 non rappresenta una controindicazione a continuare la terapia già in corso con anticoagulanti orali o antiaggreganti.

Altri farmaci di supporto

Farmaci anti-citochine. Il danno ai polmoni e ad altri organi che si può verificare nel decorso dell'infezione è dovuto in gran parte a una risposta immunitaria alterata e amplificata che coinvolge l'iperattivazione delle cellule immunitarie e livelli circolanti molto elevati di citochine. Questo fenomeno è chiamato **tempesta di citochine**, o *cytokine storm*, una sindrome infiammatoria sistemica che mette in pericolo di vita (**Box 5** e Capitolo 19). Gli anticorpi monoclonali diretti contro molecole chiave di questa reazione, come le citochine infiammatorie IL-6 o TNF α , o altri mediatori della risposta innata, sono farmaci biotecnologici importanti nella terapia sintomatica del COVID-19. Sulla base dell'azione di antagonismo del recettore di IL-6 e dell'ampio utilizzo nel trattamento dell'artrite reumatoide (*vedi* Capitolo 21), **tocilizumab** è studiato nei trial clinici per la terapia delle forme severe e critiche dell'infezione a causa, come detto, del ruolo di IL-6 nell'amplificazione della risposta immunitaria in questi pazienti. Altri farmaci in via di sperimentazione clinica sono **anakinra**, una proteina ricombinante identica all'antagonista del recettore di IL-1 (IL-1RA), che sequestra IL-1 dal legame con il recettore sulle cellule bersaglio spegnendone l'azione biologica, e **baricitinib**, un inibitore della chinasi JAK coinvolta nell'attivazione delle cellule immunitarie.

Paracetamolo e FANS. Questi farmaci sono antipiretici (paracetamolo e FANS), antidolorifici e antinfiammatori (solo FANS); possono perciò essere utilizzati in caso di febbre e dolori articolari e muscolari nella gestione a domicilio dei casi di COVID-19 lievi o moderati.

Azitromicina. È un antibiotico della classe dei macrolidi con attività antibatterica mediata dalla sua azione sul ribosoma batterico, con conseguente inibizione della sintesi proteica. Con meccanismi ancora sconosciuti, i macrolidi hanno anche dimostrato un'attività immunomodulante e antinfiammatoria, perché il loro utilizzo si associa a riduzione di mediatori, quali le molecole di adesione e le citochine proinfiammatorie. Per questo motivo sono stati studiati in pazienti con infezioni respiratorie virali, anche in associazione con cloroquina, con risultati ancora incoerenti e assenza di prove di efficacia nel trattamento di pazienti COVID-19.

4. Autorizzazione condizionata e il caso del COVID-19

Nell'interesse della salute pubblica, l'Agenzia Europea per i Medicinali (EMA) sostiene lo sviluppo di medicinali che rispondono a bisogni medici insoddisfatti per i quali è possibile ottenere un'autorizzazione all'immis-

Box 5 La tempesta di citochine

L'infiammazione è un sistema che si è evoluto dagli organismi multicellulari più semplici fino all'uomo come mezzo di difesa contro l'invasione di microrganismi patogeni e contro danni tissutali di vario tipo. Le **citochine** sono mediatori essenziali di questa risposta poiché coordinano le cellule effettrici deputate all'eliminazione microbica e direzionano, amplificano e poi spengono la risposta immunitaria. Infatti, in una fase successiva alla loro attivazione, le cellule immunitarie producono varie molecole in grado di antagonizzare e spegnere l'infiammazione, come i **recettori decoy per citochine proinfiammatorie**, per esempio **IL-1RA**, e le citochine antinfiammatorie, come IL-10. Il raggio di azione delle citochine è generalmente limitato agli organi linfatici e al sito infiammato. Il loro innalzamento temporaneo nel sangue può essere considerato come una risposta fisiologica necessaria a controllare le infezioni disseminate, ma una produzione eccessiva, come nella tempesta di citochine, si associa a effetti sistemici e danni collaterali a organi vitali. In una situazione di iper-infiammazione e iper-attivazione immunitaria i meccanismi naturali negativi

diventano insufficienti a contrastare e spegnere l'azione delle citochine proinfiammatorie.

In generale, la tempesta di citochine è un insieme di disturbi di origine immunitaria caratterizzati da sintomi costituzionali, infiammazione sistemica, livelli elevati di citochine e danni secondari principalmente a reni, fegato e polmoni che possono sfociare in insufficienza multiorgano (*multiorgan failure*). I sintomi della tempesta di citochine sono la febbre, di grado elevato nei casi gravi, affaticamento, anoressia, mal di testa, eruzione cutanea, diarrea, artralgia, mialgia e segni neuropsichiatrici. Questi segni possono essere dovuti al danno tissutale indotto dalle citochine, alle risposte di fase acuta o a quelle mediate da cellule immunitarie. Questa situazione può evolvere rapidamente a coagulazione intravascolare disseminata, disfunzioni respiratorie, renali e cardiovascolari, e morte. È ancora aperta e accesa la discussione su quali siano i mediatori e le risposte che distinguono la tempesta di citochine da una risposta infiammatoria sostenuta ma fisiologica. Anche nell'infezione COVID-19 di tipo grave riconoscere la tempe-

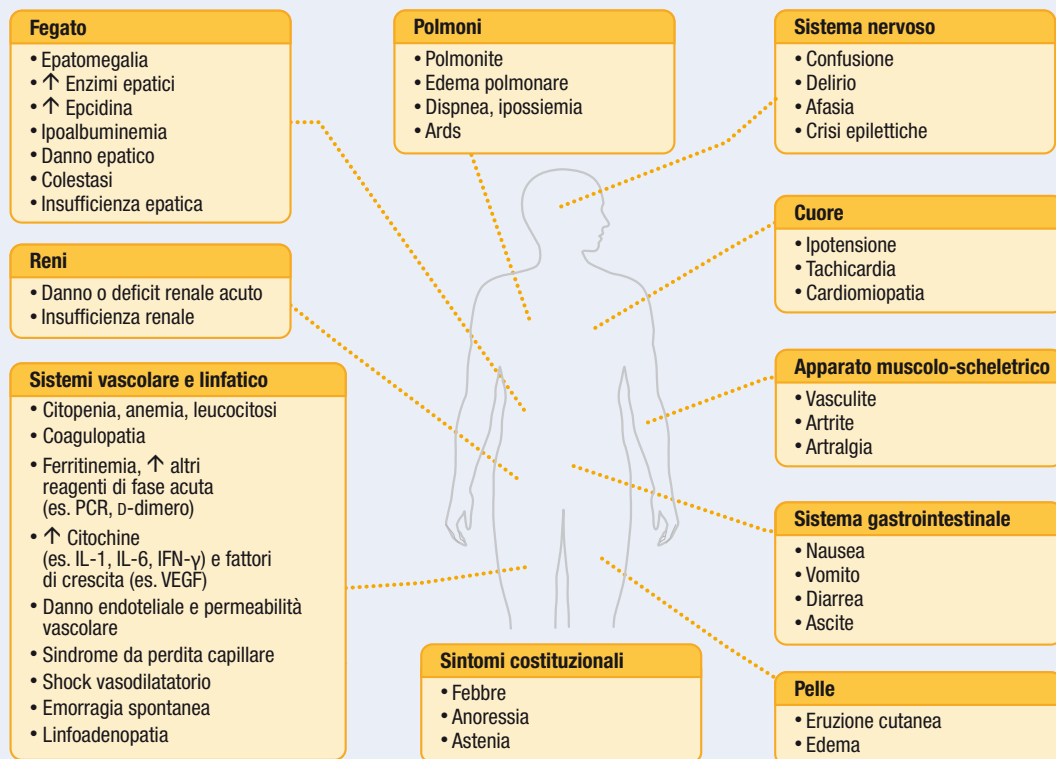


Figura B5.1 Segni e sintomi di infiammazione nei diversi apparati

Box 5

La tempesta di citochine

sta di citochine ha importanza prognostica e terapeutica essenziale.

Nel COVID-19, le risposte immunitarie e i sintomi immuno-mediati sono estremamente variabili fra pazienti, sia fra gli asintomatici che fra quelli gravi. Questo fa presupporre che solo in alcuni casi la patogenesi sia correlata a un sistema immunitario difettoso, dovuto per esempio a fenomeni di autoimmunità scatenati da pattern molecolari di SARS-CoV-2, oppure a condizioni patologiche preesistenti, come ipertensione, diabete e obesità che si associano a stati proinfiammatori cronici e che faci-

litano la disfunzione d'organo. In ogni caso, il fatto che la risposta immunitaria al patogeno, e non il patogeno in sé, contribuisca alla disfunzione multiorgano ha portato all'utilizzo di immunomodulatori, come i **corticosteroidi**, e di farmaci mirati contro le citochine. Fra questi ultimi, di utilizzo clinico per il COVID-19 sono l'**anticorpo monoclonale anti-recettore di IL-6**, il **tocilizumab**, utilizzato già dagli anni '90 per malattie infettive e autoimmuni, e **anakinra**, l'**antagonista del recettore di IL-1** e quindi inibitore dell'azione proinfiammatoria della citochina **IL-1β**.

sione in commercio subordinata a obblighi specifici, cosiddetta **condizionata**, prevista dall'articolo 14 del Regolamento CE n. 726/2004 implementato da ulteriori disposizioni di cui al Regolamento CE n. 507/2006.

L'autorizzazione condizionata viene rilasciata per medicinali destinati al trattamento, alla prevenzione o alla diagnosi di malattie gravemente invalidanti o potenzialmente letali e per medicinali da utilizzare in situazioni di emergenza per rispondere tempestivamente a minacce per la salute pubblica, debitamente riconosciute dall'Organizzazione Mondiale della Sanità, come la pandemia causata da SARS-CoV-2.

Un'autorizzazione condizionata può essere rilasciata quando il Comitato per i Medicinali per Uso umano (CHMP) ritiene che, malgrado non siano stati forniti dati clinici completi in merito alla sicurezza e all'efficacia del medicinale, siano rispettate tutte le seguenti condizioni: il rapporto rischio/beneficio del medicinale risulta positivo, è probabile che il richiedente possa in seguito fornire dati clinici completi, il medicinale risponde a esigenze mediche insoddisfatte e i benefici per la salute pubblica derivanti dalla disponibilità immediata sul mercato del medicinale in questione superano il rischio inerente al fatto che occorranza ancora dati supplementari.

Nelle situazioni di emergenza può essere rilasciata un'autorizzazione condizionata anche in assenza di dati farmaceutici o preclinici completi, purché siano comunque rispettate le condizioni menzionate precedentemente. Ne consegue che gli standard di sicurezza, efficacia e qualità del medicinale sono garantiti, così come gli obblighi, le garanzie e i controlli post-autorizzativi a carico del richiedente dell'autorizzazione sono legalmente vincolanti. Per tali motivazioni, l'Autorizzazione all'Immissione in Commercio (AIC) condizionata è diversa rispetto a un'autorizzazione "di emergenza" usata in alcuni Paesi (per esempio Stati Uniti), infatti la seconda non è una vera e propria AIC ma solo un'autorizzazione a utilizzare temporaneamente un medicinale non autorizzato per una situazione di emergenza.

L'autorizzazione condizionata è valida per un anno, può essere rinnovata annualmente e prevede che il richiedente continui a raccogliere nuovi dati e a condurre studi che confermino un rapporto rischio/beneficio positivo. Se i nuovi dati dimostrano che i rischi del medicinale sono superiori ai benefici, EMA intraprende un'azione regolatoria, come la sospensione o la revoca dell'autorizzazione.

In risposta alla pandemia da COVID-19 sono stati sviluppati e autorizzati con procedura centralizzata medicinali biotecnologici, tra cui vaccini e anticorpi monoclonali. Data la necessità di velocizzare l'approvazione di trattamenti sicuri ed efficaci contro il COVID-19, l'autorizzazione condizionata è stata lo strumento più appropriato per garantire l'accesso ai vaccini a tutti i cittadini europei nello stesso tempo e così intraprendere massive campagne vaccinali.

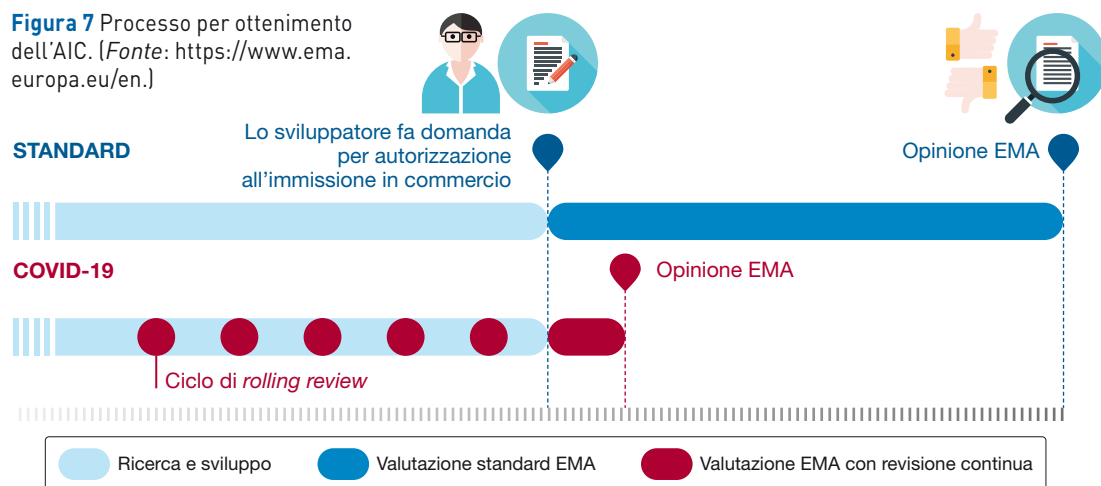
Ai sensi della legislazione farmaceutica europea, la valutazione del dossier di un medicinale sottoposto a procedura centralizzata viene eseguita entro 210 giorni. Tuttavia, a causa dell'impellente emergenza sanitaria, EMA si è avvalsa di un secondo strumento legislativo, la **valutazione accelerata**, per diminuire il periodo di tempo necessario per l'approvazione dei medicinali a meno di 150 giorni.

Al fine di ridurre ulteriormente le tempistiche per l'ottenimento dell'AIC, contemporaneamente all'autorizzazione condizionata è stata impiegata la procedura di **rolling review** per i medicinali più promettenti. Tale procedura consente di iniziare a valutare i dati appena questi sono disponibili, ovvero mentre il processo di sviluppo è ancora in corso. Questo permette che, una volta sottomessi gli ultimi dati, la procedura di valutazione formale possa avvenire in tempi brevissimi perché la maggior parte dei dati sono già stati esaminati durante la *rolling review*. In **Figura 7** è riportato un confronto tra il processo di valutazione standard per l'ottenimento dell'AIC e quello impiegato per i vaccini contro il COVID-19.

Essendo vaccini approvati con un'AIC condizionata, non sono ancora disponibili informazioni complete riguardanti gli studi clinici. Benché siano stati effettuati degli studi clinici, anche su ampia scala, questi non sono ancora conclusi e, di conseguenza, non è stato possibile, al momento dell'autorizzazione, definire con esattezza il periodo di copertura vaccinale. Anche i dati sul processo produttivo non sono completi, tuttavia si ritiene che non siano indispensabili in un contesto emergenziale per definire il rapporto rischio/beneficio del medicinale.

Con la somministrazione massiva dei vaccini e con la progressiva riduzione della presenza del virus SARS-CoV-2, si registrerà un calo del bisogno medico insoddisfatto e un allungamento dei tempi della sperimentazione clinica; inoltre, probabilmente EMA richiederà diversi endpoint

Figura 7 Processo per ottenimento dell'AIC. (Fonte: <https://www.ema.europa.eu/en/>.)



clinici che potrebbero essere raggiunti in tempi più lunghi, poiché non riguarderanno più soltanto la riduzione della mortalità e dell'ospedalizzazione da COVID-19. Per tali motivi, l'approvazione dei vaccini che verranno sviluppati nel prossimo periodo potrebbe non essere così rapida come avvenuto fino ad oggi e come avverrà per quelli in valutazione nei prossimi mesi.

Bibliografia

- Baden L.R. et al., Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine, *New England Journal of Medicine*, 384:403-416 (2021).
- Banu, N., Panikar S.S., Leal L.R., Leald A.R., Protective role of ACE2 and its down-regulation in SARS-CoV-2 infection leading to Macrophage Activation Syndrome: Therapeutic implications. *Life Sciences* 256 (2020).
- Chan J.F.-W., et al., A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: A study of a family cluster. *Lancet* 395: 514–523 (2020).
- Jameson et al., *Harrison, Principi di Medicina Interna*, 20ª edizione CEA, 2020.
- Krumm Z.A., et al., Precision therapeutic targets for COVID-19. *Virology* 18, 66 (2021).
- Lu R., et al., Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: Implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* 395: 565–574 (2020).
- Mahenthiran A.K., Mahenthiran A.K., Mahenthiran J., Cardiovascular system and COVID-19: manifestations and therapeutics. *Reviews in Cardiovascular Medicine* 2020, 21(3): 399-409 (2020).
- Polack F.P. et al., Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine, *New England Journal of Medicine* 383:2603-2615 (2020).