

Prospettive terapeutiche farmacologiche e vaccinali per SarsCov2. Stato dell'Arte.

di Stefano Pellicanò

Andando indietro nel tempo, dall'inizio del secolo, ogni decade abbiamo avuto un'epidemia da coronavirus: nel 2000 la SARS (*Severe Acute Respiratory Syndrome*), nel 2010 la MERS (*Middle-East Respiratory Syndrome*) e ora, nel 2020, la COVID-19 (*CoronaVirus Disease 19*) o *Malattia Respiratoria Acuta da SARS-CoV-2* (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*) o *Malattia da coronavirus 2019*. È notorio che i coronavirus tendono a dare delle pandemie e poi a spegnersi gradualmente, soprattutto quando c'è una riduzione della loro entropia sociale pertanto l'attuale virus, grazie all'isolamento domiciliare, potrebbe auto-spegnersi anche con i primi caldi, quando ci sarà anche una riduzione delle goccioline che si essiccheranno e, quindi, con minori possibilità di passare da un soggetto all'altro. Come già avvenuto per l'AIDS, di fronte a questa pandemia, la ricerca di nuovi mezzi diagnostici e di una possibile terapia, farmacologica o vaccinale, è partita subito. In atto nel mondo ci sono oltre 2 milioni di pazienti affetti, la maggior parte guarirà senza bisogno di alcuna terapia ma il 20%-30% circa svilupperà una grave polmonite o una cardiopatia.

1) Prospettive farmacologiche

Mancando un trattamento specifico, i CDC statunitensi (*Centri per la prevenzione e il controllo delle malattie*) hanno consigliato farmaci antinfluenzali, liquidi, riposo (*fonte: CDC, 09/08/2019*) e, nei casi più gravi, la ventilazione artificiale o l'ECMO (*Ossigenazione Extracorporea a Membrana*). In atto, fine aprile 2020, per questi pazienti non esistono trattamenti efficaci, quindi individuare dei



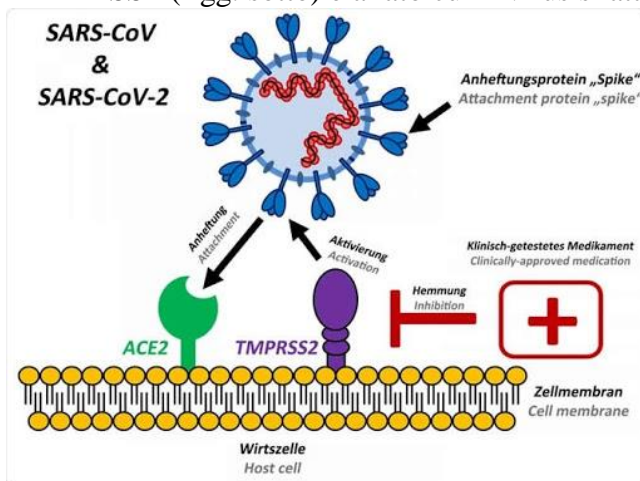
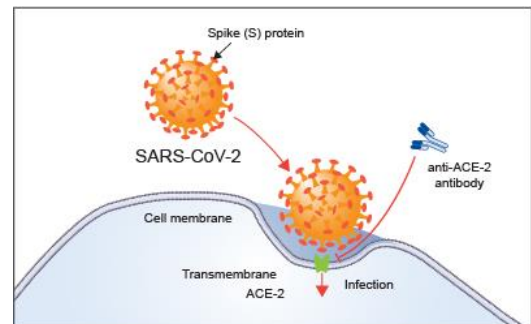
farmaci, tra quelli già esistenti per altre malattie, è sicuramente il modo più rapido per trovarne uno valido mentre i più efficaci sono probabilmente quelli specifici ma per ottenerli, però, occorrono in genere anni in quanto bisogna studiare e comprendere il meccanismo d'azione del virus, mettere a punto delle molecole *ad hoc*, testarle in vitro, in laboratorio, e iniziare gli studi clinici sui pazienti. Anche se i primi hanno un profilo di sicurezza noto, non si sa che effetto possano avere nei pazienti affetti da COVID-19 e non si conoscono gli effetti

collaterali in quelli con patologie pregresse, come diabete, malattie cardiovascolari o neoplasie, che rappresentano la maggior parte dei casi gravi di polmonite, insieme agli anziani. In atto sul sito *ClinicalTrials.gov* sono registrati 745 studi, 697 nel database dell'OMS; gli studi europei

registrati sull'*EU Clinical trial register*, sono 114; uno sforzo enorme ed inedito della comunità scientifica internazionale infatti ogni giorno vengono proposti nuovi studi e nuove terapie.

Le fasi dell'infezione del virus SARS-COVID-19 e i bersagli principali dei farmaci sperimentali

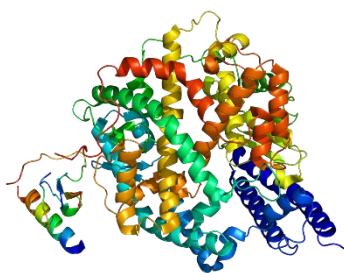
Ripercorriamo le fasi dell'infezione virale per capire come e dove agiscono i farmaci attualmente oggetto di studio. Un team multicentrico di Boston, tra cui il *Massachusetts Institute of Technology*, ha scoperto, rispettivamente nei passaggi nasali, nei polmoni e nell'intestino le cellule “a calice” che producono muco, i pneumociti di classe 2 che servono al funzionamento degli alveoli polmonari e gli enterociti assorbenti i nutrienti dopo la digestione, agendo da apripista al processo infettivo. Questo sottogruppo di cellule presentano, contemporaneamente, le proteine TMPRSS2 (figg. sotto) e a lato cui il virus si attacca, e il



recettore per l'enzima ACE-2 (figg. sopra), indispensabili per dar luogo all'infezione, pertanto lo studio di esse potrebbe consentire di capire come bloccarne l'ingresso (*fonte: Cell, 2020*).

Entrato, quindi, per via aerea SARS-COVID-2 punta alle cellule del tratto respiratorio, in particolare inferiore, quindi bronchi e polmoni, che presentano in superficie ACE-2 (fig.sotto),

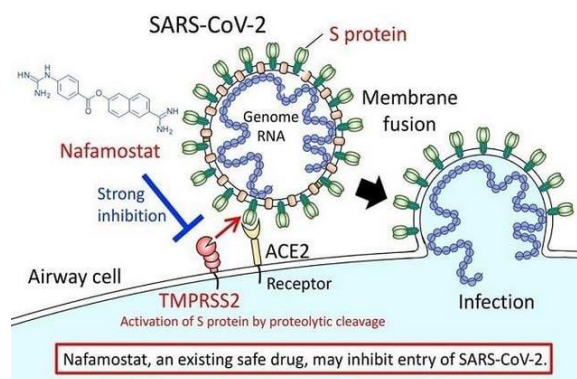
l'aggancio usato dalla proteina *Spike* del virus per entrare e la TMPRSS2 necessaria per l'attivazione di *Spike*. Il virus, quindi, entra nelle cellule per endocitosi [modificazione della forma della sua membrana plasmatica, che crea uno spazio per racchiudere il materiale da introdurre] mediata dal



recettore ACE-2, molto espressa sulle cellule epiteliali polmonari alveolari AT2 particolarmente suscettibili alle infezioni virali. Uno dei regolatori noti dell'endocitosi è la proteina AP2 associata alla chinasi 1 (AAK1) la cui interruzione potrebbe, a sua volta, interrompere l'ingresso del virus nelle cellule. Come vedremo suoi diversi inibitori sono stati approvati. Dopo l'aggancio (attraverso ACE-2), il virus

fonde la sua membrana con quella della cellula e il suo materiale genetico, una molecola di RNA,

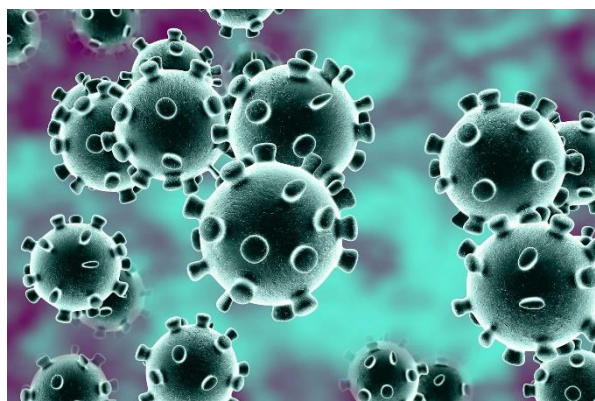
viene rilasciato all'interno della cellula in una specie di "bolla", una vescicola acida con tutte le informazioni necessarie alla vita del microrganismo, proprio come il nostro DNA. Quindi, con l'aiuto della cellula ospite, alcune formano il capsido (l'involucro del virus), altre servono per replicare l'RNA e produrne molte altre copie quindi, dopo essere stato tradotto in proteine e col loro assemblamento, si creano moltissime altre particelle virali. Una sola cellula può rilasciarne milioni prima di essere distrutta e tutte queste particelle possono infettare nuove cellule, provocando la reazione del sistema immunitario che, a volte, per una sua reazione eccessiva può portare all'attacco delle cellule polmonari stesse e all'ostruzione dei polmoni che può sfociare in sindrome da *distress* respiratorio acuto e infine alla morte. Da notare che la proteina *Spike*, la punta della corona esterna del coronavirus usata nei nuovi vaccini per stimolare il sistema immunitario, ha alcune similitudini, con quelle dell'HIV, ancora inesistente (vedremo cosa comporta). Ricercatori della *Sybilla Biotech* e dell'*Istituto Nazionale di Fisica* hanno scoperto, nel recettore ACE-2, due tasche o stati intermedi che si formano col suo ripiegamento su se stesso. In meno di un mese hanno quindi esaminato 9.000 farmaci esistenti e individuato 35 in grado di legarsi alle due tasche. Ora potranno iniziare i test per capire se potranno diventare farmaci anti-COVID-19.



A) La sperimentazione farmacologica nella Repubblica Popolare di Cina

Passiamo adesso sinteticamente in rassegna i trattamenti proposti, cominciando dalla Repubblica Popolare di Cina, dove, a Wuhan, città in cui si svolgevano esperimenti sul genoma del coronavirus sui pipistrelli, tutto è cominciato (deliberatamente, secondo un'*ipotesi complottista*).

Il **6-metilprednisolone** (6-MP) è stato studiato positivamente su 201 pazienti con polmonite COVID-



19 o ARDS (*Sindrome da Distress Respiratorio Acuto*; fonte: *JAMA Intern Med*, March 2020).

Ricercatori della *Qingdao University* hanno individuato trenta potenziali farmaci (fonte: *Drug Discov Ther*, vol. 14, n° 1, 2020: 58 - 60) ed è previsto uno studio più ampio (fonte: *Chin Med. J.*, March 2020). Proposto il **Montelukast** (fonte: *Drug Discov Ther*, vol. 14, n° 1, 2020: 58-60), già proposto

per l'infezione da virus Zika, specie in gravidanza. Ancora sono in corso di sperimentazione:

Arfilzomib (fonte: *Drug Discov Ther*, vol. 14, n° 1, 2020: 58-60); il **Pirfenidone** (Esbriet®) usato finora per la fibrosi polmonare idiopatica (fonte: *News.abplive.com*, 07/03/2020); **TAK-888** (fonte: *www.koreabiomed.com*, 06/03/2020); **Disulfiram** che agirebbe da inibitore competitivo o misto (fonte: *Antiviral Res.*, vol. 150, February 2018: 155–163); **Chalcone** o **Calcone**; **Cinanserin**, un inibitore della proteasi simil-3C del virus; **Deoxyrhapontin**; **Polydatin** o **Piceide**; **Px12**, un inibitore della tioredossina, una proteina facilmente inducibile da molti tipi di stress esogeno; **Remestemcel-L**, prodotto con cellule staminali mesenchimali, è in fase di studio in ARDS virus-associata (fonte: *Medrxiv* 2020); **Bortezomi**, il primo inibitore del proteasoma [complesso multiproteico che degrada i polipeptidi cellulari] sperimentato sulla febbre e piastrinopenia da flebovirus, nell'infezione da virus herpes simplex in associazione con aciclovir (fonte: *MBio*, vol. 10, n° 3, May 2019) e in vitro in alcune forme aggressive di linfoma non-Hodgkin; **Ebselen**, molecola sintetica di organo-selenio con attività antinfiammatoria, citoprotettiva e antiossidante (fonte: *Mol. Biol. Rep.*, vol. 41, n° 8, August 2014: 4865–79). Varie Associazioni cinesi studiano il **CVL218-S-32-C**, un inibitore selettivo del recettore poli-ADP-ribosio polimerasi 1, con attività inibitoria contro la replicazione del virus e attività antiinfiammatoria (fonte: *Biorxiv.org*, in stampa). Studi per l'epidemia di SARS del 2002-2004 hanno suggerito il ruolo potenziale dell'**Ossido nitrico inalato** nelle complicanze polmonari (fonte: *Clin. Infect. Dis.*, vol. 39, n° 10, November 2004: 1531-5) pertanto è in corso uno studio di fase 2 che prevede una collaborazione tra *Xijing Hospital*, *Massachusetts General Hospital* e *Fondazione IRCCS Ca'Granda, Ospedale Maggiore Policlinico*, su 104 pazienti con ARDS grave con l'obiettivo di prevenire la progressione della malattia. L'antimalarico **Cloroquina**, già testata per la SARS (fonte: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 323, n° 1, 8 ottobre 2004: 264-8), a febbraio è risultata efficace in vitro (fonte: *English.news.cn*, *www.xinhuanet.com*; *Bioscience Trends*, vol. 14, February 2020: 72-73; *Cell Research*, vol. 30, n° 3, 2020-03: 269–271) e il *Dipartimento Provinciale di Scienza e Tecnologia* e la *Commissione Provinciale per la Salute* di Guangdong ne hanno raccomandato l'uso (fonte: *Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases*, vol. 43, n° 0, 20/2/2020: 19) mentre in vitro l'**Idrossicloroquina** è risultata tre volte più efficace e con minori effetti indesiderati (fonte: *Infectious Diseases Society of America*, 09/03/2020: 99). Poiché è insorto il problema della scarsità di quest'ultima in India, ha rivisto i divieti della sua esportazione. È stato ipotizzato che Cloroquina e Idrossicloroquina agirebbero entrando nella “bolla” che si forma intorno al virus, in seguito alla fusione con la cellula ospite, e di modificarne il pH, impedendo così che l'infezione prosegua. All'Ospedale di Wenzhou si sta pensando a una sperimentazione-pilota sulla **Bromexina**, farmaco anti-tosse.

Linee guida per il trattamento della polmonite da coronavirus nella Repubblica Popolare di Cina (terapia per max 10 giorni) (fonte: *Drug Discov Ther*, vol. 14, n° 1, 2020: 58–60)

- IFN- α : 5 milioni U o dose equivalente x 2 /die per aereosol
- Lopinavir/ritonavir (Kaletra^o) cps 200 mg/50 mg: 2 cps x 2/die
- Ribavirina endovena: 500 mg x 2-3/die in combinazione con IFN- α o lopinavir/ ritonavir
- Clorochina fosfato cpr: 500 mg (300 mg per clorochina) x 2/die
 - -Umifenovir cpr, cps, sc. (Arbidol^o, non autorizzato in Italia e USA): 200 mg x 3 volte/die.

Studiosi dell'Ospedale Tongji, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology di Wuhan, hanno descritto tre familiari trattati con beneficio con l'uso combinato di farmaci della medicina occidentale e *Shuang-huang-lian orale liquido* (SHL), prodotto della medicina tradizionale cinese (fonte: Comitato di farmacopea statale, farmacopea cinese. Stampa dell'industria chimica, Pechino, Cina, 2015), da approfondire (fonte: *Front Med*, March 2020). L'SHL è una combinazione antimicrobica con *Lonicerae Japonicae Flos*, *Scutellariae Radix* e *Fructus Forsythiae* (fonte: *Phytomedicine*, vol. 21 n° 4, March 2014:461-9) che attenua l'iperresponsività delle vie aeree principalmente attraverso l'inibizione dell'attivazione dei mastociti e dell'immunità Th2 mediata (fonte: *Front Med*, March 2020), inoltre, secondo studiosi dell'*Institute of Medical Plant Plant, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College* di Pechino, abbassa anche i livelli di citochine infiammatorie (fonte: *Hindawi.com*). L'osservazione della struttura molecolare del virus ha permesso a ricercatori dell'*Accademia Cinese delle Scienze*, di progettare i due **inibitori della proteasi 11a e 11b** in grado di bloccarlo in coltura cellulare. La sperimentazione della prima, dopo i topi, prosegue a livello preclinico, per valutarne la tossicità, prima di passare alla sperimentazione sull'uomo (fonte: *Science*, 2020). Ricercatori della Corea del Sud, in uno studio in corso di pubblicazione, hanno testato, su cellule in coltura infette, 49 farmaci approvati dalla *Food and Drug Administration* (FDA) identificandone 24 con efficacia antivirale .

Altre terapie farmacologiche

a) Antagonisti del recettore per l'angiotensina II (sartani)

Poichè il virus utilizza il recettore ACE-2 per entrare nelle cellule da infettare sono stati proposti nella prevenzione della polmonite ma in atto senza conclusioni definitive (*fonte: Medscape.com, 25/03/2020*).

b) Antiacidi

In un'indagine condotta in Cina è stata osservata una mortalità inferiore tra i pazienti che assumevano **Famotidina** per il mal di stomaco, rispetto a quelli che usavano prodotti a base di Omeprazolo. Un vasto studio negli USA, che doveva rimanere “riservato”, coinvolge 1200 arruolati in 23 Ospedali dove viene somministrata endovena a dosaggi 9 volte più alti di quelli abituali e il farmaco è diventato introvabile. Si ritiene che abbia la proprietà di legarsi ad un enzima presente nel COVID-19 ma in atto non è possibile concludere se funziona, in quanto i dati erano troppo preliminari.

c) Antibiotici

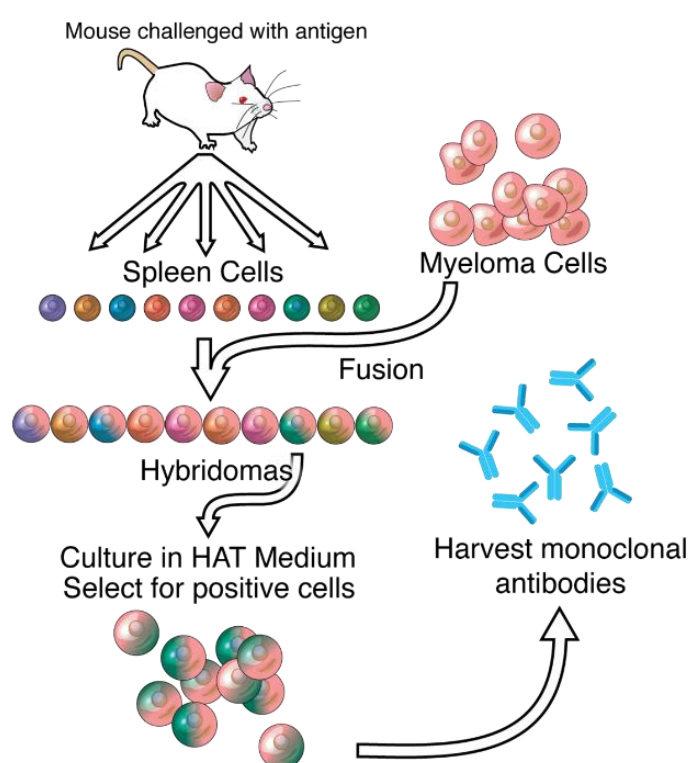
È notorio che gli antibiotici non hanno azione antivirale ma, econdo studiosi dell'*University of British Columbia* di Vancouver, le **Tetraciline**, potrebbero essere valutate come profilassi o trattamento in quanto hanno dimostrato attività antivirale contro altri virus, potenti effetti antiinfiammatori, buon assorbimento polmonare e sono molto più sicure dell'Idrossiclorochina. L'idea sta incontrando il consenso di molti clinici e ricercatori in tutto il mondo (*Pharmacotherapy online, 08/04/2020*).

d) Antinfiammatori

Baricitinib (Olumiant[®]), inibitore di JAK1/2, usato nell'artrite reumatoide (*fonte: Lancet, vol. 395, n° 10223, February 2020*) e **Ciclesonide**, un glucocorticoide.

e) Anticorpi monoclonali e immunosoppressori

La prima molecola mirata per aggredire il coronavirus Sars-CoV2 è stato un **Anticorpo monoclonale**, specializzato nel riconoscere e attaccare la proteina *Spike*, proposto dall'*Università olandese di Utrecht* (fonte: *BioRxiv, on line, marzo 2020*). Proposti anche **Alcannina o Shikonin** che ha attività antimicrobiche, antinfiammatorie, antitumorali e cicatrizzanti (fonte: *Artif Cells Nanomed Biotechnol, vol. 48, n° 1, December 2020: 716*); **Anakinra e Emapalumab** (fonte: *Bresciaoggi.it, 27/03/2020*); **Brilacidina** (fonte: *Emedicine.medscape.com, 2020*). **Camostat mesilato** (Foipan°), approvato solo in Giappone, in grado di inibire la fibrosi di fegato e reni, l'esofagite da reflusso post-operatorio e la pancreatite, è un inibitore della serin proteasi



simile alla tripsina, che inibisce la funzione del canale epiteliale del sodio nelle vie aeree che, secondo ricercatori tedeschi, bloccherebbe l'ingresso del virus nelle cellule polmonari (fonte: *Pharmaceutical-technology.com, 2020*). Ancora poichè l'innescò iniziale della proteina *Spike* di COVID-19, da parte della proteasi transmembrana serina 2, è essenziale per l'ingresso di SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2, attraverso l'interazione di questa proteina con il recettore ACE-2 (fonte: *J. Virol., vol. 93, n° 6, March 2019*), potrebbe costituire (fonte: *Cell, March 2020*)

un'efficace trattamento off-label [al di fuori delle condizioni autorizzate dagli enti predisposti]. Uno studio clinico è partito in Danimarca, che dovrebbe dare dei risultati entro l'anno. Ancora **Ciclosporina A** (fonte: *Drug Discov Ther, vol. 14, n° 1, 2020: 58–60*); **Ifenprodil** (NP-120) (fonte: *Emedicine.medscape.com, 2020*); **LEAPS** epitopo [o determinante antigenico, cioè la piccola parte di antigene che lega l'anticorpo specifico] (fonte: *Emedicine.medscape.com, 2020*; **Novimmune** e **Tzls-501** (fonte: *The Lancet, volume 395: 497-506, online January 24, 2020*); **Tdzd-8** o **Tideglusib** un inibitore della glicogeno sintasi kinasi-3. Oggetto di studio anche l'anticorpo **Sarilumab** (Kevzara°) anch'esso, come **Tocilizumab**, inibitore dell'interleuchina 6 (fonte: *Emedicine.medscape.com*). A marzo sono partiti studi negli USA e da aprile è stato lanciato un trial che coinvolge diversi Paesi in UE, tra cui l'Italia, ma anche Canada e Russia. Un'altra opzione

terapeutica attuata, tra l'altro, per Ebola, SARS e MERS, viene dalla **plasmaferesi**, il trasferimento di plasma (la parte liquida del sangue) dei guariti in quanto se ci sono abbastanza anticorpi, questi possono essere forniti ai pazienti permettendo loro di sviluppare la cosiddetta *immunità passiva* che consiste nel fornire all'organismo degli anticorpi già pronti, che possono agire immediatamente contro il virus. Studi in Cina, su quindici pazienti, hanno mostrato un miglioramento ma occorrono studi su casistiche più ampie (fonte: *News.abplive.com*, 07/03/ 2020; *Geneonline.news*, 2020). L'FDA ha approvato uno studio in un centinaio di Ospedali USA con un protocollo in cui col prelievo di 400 mL da ogni donatore si trattano due pazienti; anche in Italia diversi Ospedali, sono pronti a partire con le sperimentazioni. Una 28enne incinta ricoverata all'*Ospedale di Mantova* è guarita, evitando la ventilazione assistita per proteggere il feto, forse il primo caso al mondo (fonte: *ANSA*, 2020). Sempre a Mantova, nell'ambito del protocollo siglato col *Policlinico San Matteo (PV)*, sono stati trattati 24 malati con risultati incoraggianti ma in atto mancano evidenze univoche.

B) La sperimentazione farmacologica in Italia

A metà aprile, in poco meno di un mese, l'AIFA ha valutato, grazie a un iter rapido per l'emergenza, ottanta domande di autorizzazione per l'avvio di sperimentazioni/studi clinici su farmaci anti-Covid-19 e dieci, su sedici con parere favorevole, sono già partiti. L'anticorpo monoclonale **Tocilizumab**, il farmaco anti-artrite reumatoide, -lupus e -psoriasi, che agirebbe sul virus e sul tipo di citochina responsabile della fortissima infiammazione che lo sostiene, inibendone il recettore specifico, è stato incluso nelle linee guida per il trattamento di COVID-19 dalla *Commissione Nazionale di Sanità*



Cinese (fonte: *Reuters*, 04/03/2020; *ChinaXiv.org*, 2020); alcuni Ospedali italiani hanno avviato dei protocolli terapeutici (come il Tocilizumab 2020-001154-22, l'RCT-TCZ-COVID-19 dell'*AUSL-IRCSS di Reggio Emilia* e TOCIVID-19 dell'*Istituto Nazionale Tumori, IRCSS, Fondazione G. Pascale di Napoli*; (fonte: *Lastampa.it*,

15/03/2020) mentre l'*Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA)* ha iniziato uno studio di fase 2 su 330 pazienti intubati da non oltre 24^h, per valutarne efficacia e sicurezza (fonte: *Aifa.gov.it*, 17/03/2020). I ricercatori dell'*Università di Brescia* hanno comunicato che nel 77% dei primi 100 trattati presso gli *Spedali Civili* (tra il 9 e il 20 marzo) le condizioni respiratorie sono migliorate o stabilizzate. Si tratta, in atto, della più ampia casistica mondiale, che fa seguito ai risultati incoraggianti ottenuti in 20 pazienti in Cina e nei primi due pazienti italiani trattati all'*Ospedale Cotugno di Napoli* (fonte: *Autoimmunity Reviews*, in stampa). Ancora lo studio Hydro-Stop, ASUR-AV5 Ascoli Piceno,

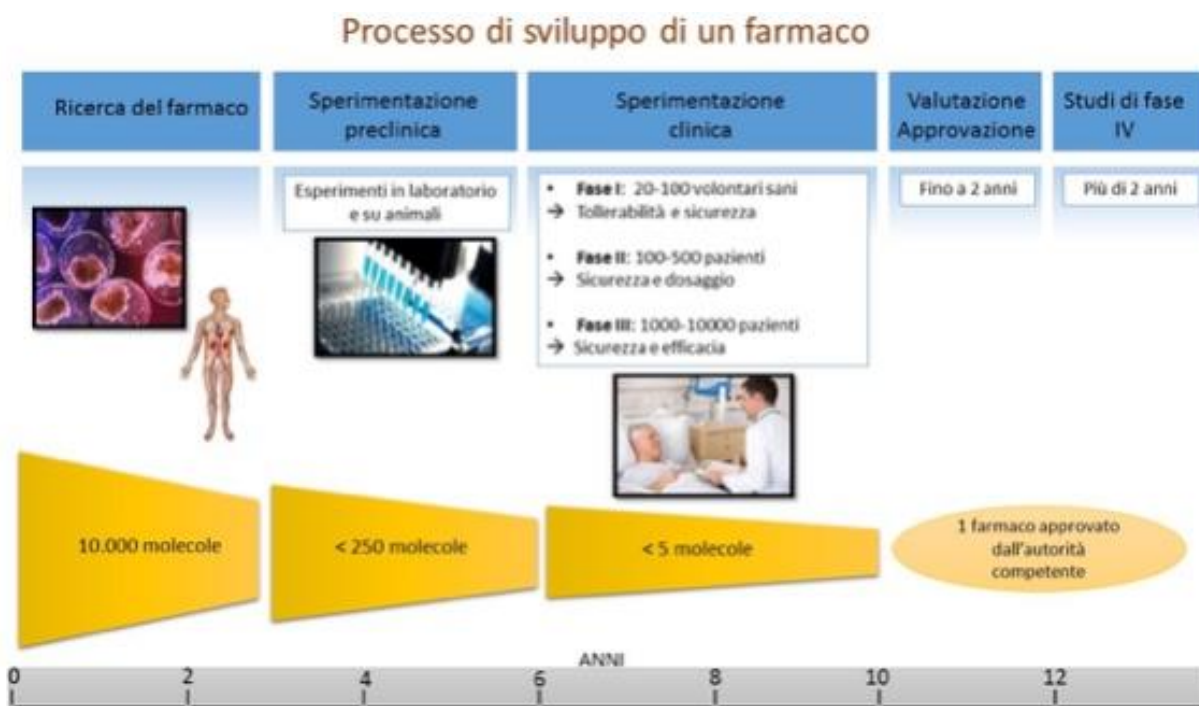
esamina la somministrazione precoce di **Idrossiclorochina** (Plaquenil[°]), un altro il Sarilumab COVID-19 valuterà il **Sarilumab**, un anticorpo monoclonale anti-interleuchina-6; un altro ancora, il Sobi.Immuno-101, l'associazione di **Emapalumab** (Gamifant[°]), anticorpo monoclonale anti-interferone gamma (IFN γ) usato nella Sindrome emofagocitica, con **Anakinra** (Kineret[°]), un antagonista del recettore per la interleuchina-1. Sono anche in studio le combinazioni dei farmaci anti-AIDS **Lopinavir/ritonavir** (Kaletra[°]), **Danuravir/cobicistat** (Rezolsta[°]), **Darunavir** (Prezista[°]), **Ritonavir** (Norvir[°]) e degli **Antimalarici**, utilizzati già in Cina. L'AIFA ha annunciato l'avvio di uno studio clinico in Lombardia sul **Favipiravir** (Avigan[°]), un antivirale attivo contro diversi virus a RNA, non autorizzato in UE e USA, utilizzato in Giappone e Cina nelle pandemie influenzali, in via sperimentale che però presenta, come possibili effetti collaterali, teratogenicità



(malformazioni fetali), comparsa di tumori maligni e mutazione del virus in un ceppo molto più aggressivo. Secondo uno studio pilota, in Cina, con un trattamento di 14 giorni, il farmaco, inibendo l'enzima che permette la riproduzione del virus nella cellula infetta e ne blocca la crescita, riduce i sintomi. In Giappone è partita una sperimentazione clinica direttamente di fase III su pazienti già colpiti dal virus

e controllata direttamente dal governo. Il **Remdesivir** (GS-5734), un antivirale analogo nucleotidico per il trattamento del virus Ebola e Marburg, che somiglia all'adeonosina, una delle basi azotate che compongono l'RNA, ha dimostrato attività antivirale contro altri virus a RNA a singolo filamento, come il virus respiratorio sinciziale umano, virus Junin, virus della febbre da virus Lassa, virus Nipah, virus Hendra e i coronavirus, compresi quelli di SARS e MERS (*fonte: Sciencemediacentre.org, 2020; The Feed, 2020; www.moh.gov.sg, 2020*). Agisce attaccando l'enzima polimerasi nsp12, il motore molecolare che permette al COVID-19 di moltiplicare il suo RNA e di moltiplicarsi. Da uno studio dell'*Università di Chicago* (USA) su 113 pazienti gravi ne sarebbero morti soltanto due, mentre per gli altri si sono registrati miglioramenti in pochi giorni (*fonte: Stat, 2020*). La ricerca è iniziata a febbraio, all'apice dell'epidemia in Cina, in atto sono in corso studi su 2400 pazienti gravi in 152 differenti Centri in tutto il mondo e su 1600 con sintomi lievi in 169 Paesi. In Italia in 12 Centri sono partiti gli studi GS-US-540-5773 e GS-US-540-5774 dove viene sperimentato confrontando due protocolli di diversa durata di trattamento per valutarne l'efficacia nelle polmoniti con compromissione della funzionalità respiratoria e non. Se i dati preliminari saranno confermati, potrebbe diventare il primo trattamento approvato contro la malattia e rendere inutile l'eventuale vaccino. L'FDA ha già annunciato che gli darebbe via libera in tempi record. A fine aprile,

però, i risultati sui suoi effetti sono contrastanti in quanto la Casa produttrice annuncia “risultati incoraggianti” mentre *The Lancet* parla di "benefici non significativi". Già oggi, in alcuni Ospedali italiani dove si tratta il Covid-19, la **Clorochina** cpr (Aralen°) viene assunta da medici e infermieri nella speranza che abbia efficacia di profilassi ma il suo uso va sconsigliato ai “fai-da te” in quanto non va assunta nella carenza di glucosio-6-fosfato deidrogenasi (favismo) in cui può scatenare crisi emolitiche potenzialmente letali oltre al problema della sua cardiotoxicità (in terapia anti-malarica bisogna eseguire un ECG al giorno !). **Ruxolitinib** (Jahavi°) chemioterapico della famiglia degli inibitori delle JAK, sperimentato su 4 ricoverati in Toscana, per il quale l'AIFA ha approvato un protocollo (*fonte: Firenzetoday.it, 29/03/2020*) per uso compassionevole [farmaco non ancora approvato dalle autorità sanitarie, impiegato al di fuori degli studi clinici] che agirebbe riducendo la grave reazione infiammatoria (*Sindrome da rilascio di citochine*) da utilizzare nelle insufficienze respiratorie che non necessitano di ventilazione assistita invasiva. Anche in Israele è da poco partito un suo programma di uso compassionevole. AIFA sta anche valutando l'**Opaganib**, un composto con proprietà antinfiammatorie e antivirali. La *Fondazione per la Ricerca biomedica avanzata* di Padova, in collaborazione con l'*Università*, ha ipotizzato un legame tra virus e tumore alla prostata, in quanto



l'enzima TMPRSS2 è un marcatore tipico della neoplasia e, poiché gli inibitori specifici sono in grado di fermarne lo sviluppo, potrebbe rivelarsi efficace anche sul virus. Comunque prima di avviare una ricerca bisogna capire se l'inibitore usato per la prostata è in grado di bloccare TMPRSS2 anche nelle cellule del polmone umano, come avviene nei topi. In Veneto l'*Istituto Veneto di Medicina Molecolare*, in collaborazione con la Regione Veneto e l'*Università di Padova* sta verificando la percentuale di malati di tumore alla prostata tra i Covid-19 i cui risultati verranno pubblicati a breve.

Autorizzato anche uno studio multicentrico sull'uso di **Colchicina**, utilizzato nella gotta e nei disturbi su base auto-infiammatoria, coordinato dall'*Azienda Ospedaliera di Perugia* è uno randomizzato [studio nel quale gli arruolati sono assegnati in modo casuale] coordinato dall'*Università di Parma*, in pazienti con Covid-19 e polmonite in condizioni stabili. Dopo due studi clinici con Colchicina, AIFA ha anche autorizzato uno studio randomizzato di fase 2, coordinato dall'*Università di Pisa*, che valuterà, in pazienti con polmonite, efficacia, sicurezza e tollerabilità dell'inibitore della AAK1 **Baricitinib**, altro anti-artrite reumatoide, che agisce anche da anti-infiammatorio in quanto inibitore delle Janus chinasi (JAK), enzimi intracellulari coinvolti nella modulazione dei segnali di un gran numero di citochine, coinvolte nella progressione della flogosi. Poiché la sua concentrazione inibente è sufficiente già a dosaggio terapeutico (2 mg o 4 mg per os/die), sono stati proposti studi clinici, nell'ipotesi che possa ridurre sia l'ingresso del virus che l'infiammazione. Le alterazioni della coagulazione e le complicazioni trombotiche nei pazienti rappresentano una delle più importanti variabili associate a mortalità pertanto, già a gennaio, l'OMS (*fonte: WHO, 28/01/2020: 8*) ha raccomandato la somministrazione sottocute di eparina, preferibilmente a basso peso molecolare anche se si è visto, in alcuni casi, l'inefficacia della dose standard di 4.000 U.I. Essa ha una struttura molto simile all'eparan solfato, molecola presente sulla superficie cellulare dell'organismo e usata dal virus per aderire alla cellula, prima di entrarvi e liberare all'interno le sostanze tossiche citochine. L'anticoagulante attrae il virus che vi si attacca risparmiando le cellule sane. A seguito dei risultati in Cina in vitro e sui malati, la sua efficacia sarebbe associata alla capacità di interferire anche con la "tempesta citochinica" che caratterizza la fase iper-infiammatoria dell'infezione, che è quella più pericolosa per il paziente. Uno studio dell'*Università di Cagliari* ha mostrato che il virus può causare trombosi polmonare, aggravando pesantemente il quadro clinico forse evocando una risposta immune attraverso cellule come linfociti e monociti che, stimolati localmente, liberano grandi quantità di mediatori dell'infiammazione, che attivano la coagulazione del sangue (*fonte ANSA, 2020*). Dopo i primi risultati, a Piacenza, che hanno mostrato elevata azione antitrombotica sui sintomi circolatori, l'AIFA ha autorizzato lo studio multicentrico INHIXA-COVID19, coordinato dall'*Università di Bologna*, che prevede l'impiego di Inhixa®, anticoagulante biosimilare di enoxaparina sodica, eparina a basso peso molecolare, per valutarne sicurezza ed efficacia nel trattamento di pazienti con quadro clinico moderato o severo. Nei 14 centri ai 300 arruolati verrà somministrata a diversi dosaggi, per via sottocutanea in mono-somministrazione/die, a 100 pazienti 4.000 U.I. e a 200 con dosi intermedie 6.000, 8.000 o 10.000 U.I., in base alla massa corporea. A differenza di altri farmaci utilizzati in off-label, enoxaparina presenta un rapporto rischio/beneficio favorevole poiché la sua efficacia contro i fenomeni tromboembolici in questi pazienti è superiore agli eventuali effetti avversi, infine l'uso è fortemente consigliato in pazienti Covid-19 che assumono

antiretrovirali, per l'elevato rischio emorragico derivante dalla loro interazione con farmaci anticoagulanti orali.

C).La sperimentazione farmacologica in U.E.

A metà aprile 2020 l'EMA (*Agenzia Europea del Farmaco*) sta valutando 40 medicinali e 12 vaccini e, ripetiamo, gli studi registrati sull'*EU Clinical trial register*, sono 114. I farmaci comprendono la combinazione di antivirali **Lopinavir/ritonavir** (usato contro l'AIDS); gli **Interferoni** e **Beta-interferoni** (usati per la sclerosi multipla), piccole molecole rilasciate dalle cellule del sistema immunitario che sembrano inibire la replicazione virale; diversi **Anticorpi monoclonali**, che agiscono su alcune componenti del sistema immunitario; l'**Idrossiclorochina** e la **Clorochina**. L'*Università di Oxford*, per stabilire se quest'ultima abbia un effetto di profilassi, ha avviato un maxi-studio con 40.000 arruolati in U.E., Africa e Asia tra medici e infermieri che si trovano a stretto contatto con i malati contagiosi. La stessa Università ha promosso lo studio *Randomised Evaluation of COVid-19 thERapY* (RECOVERY) per valutare, inizialmente, **Lopinavir-ritonavir**, **Desametasone**, uno steroide anti-infiammatorio, l'**Idrossiclorochina** e l'antibiotico **Azitromicina**. A marzo 2020 un team internazionale guidato dall'*Università di Lubecca* ha proposto la **Molecola 13b**, che si lega all'enzima proteasi e lo blocca, da sperimentare in clinica (*fonte: Science, 2020*).

D) Lo studio dell'*Organizzazione Mondiale della Sanità* (OMS)

L'OMS ha cominciato l'arruolamento di migliaia di pazienti per il grande studio “Solidarity” che prevede sperimentazioni su 4 farmaci anti Covid-19: Clorochina e Idrossiclorochina, Remdesivir (sperimentato in 12 centri italiani), Ritonavir/lopinavir, da solo e associato a Interferone beta (*fonte: pharmastar.it, 28/03/2020*). L'AIFA ha aderito il 09/04/2020.

2) Altri test in provetta (in vitro)



Mentre i trial clinici si moltiplicano, proseguono anche gli studi in vitro, oltre quelli già citati, per selezionare altri farmaci da testare sui pazienti anche se c'è da sottolineare che in genere i risultati ottenuti in vitro sono diversi rispetto a quelli osservati nel corpo umano vista la sua maggiore complessità. Fra gli ultimi il farmaco **EIDD-2801** è in grado di inibire la replicazione del virus nelle cellule

polmonari umane coltivate in laboratorio mentre in uno studio australiano l'antiparassitario **Ivermectin** ha ridotto in 48^h la carica virale.

3) Le prospettive vaccinali

Poiché molti aspetti dell'infezione da COVID-19 non sono ancora noti, prima di parlare di un vaccino sarebbe importante sapere se la protezione immunitaria dipenderebbe dagli anticorpi anti-virus o dalla reazione dei linfociti T killer, quanto durerebbe e se i guariti sono protetti da un secondo contatto con il virus. Teniamo presente che, secondo il *Centro per il controllo e la prevenzione delle malattie* della Corea del Sud, 163 ex pazienti guariti completamente (2,1%), si sarebbero riammalati e non tutti i 7.829 guariti sono stati ri-sottoposti al test; anche in Cina sono stati osservati casi simili (*fonte: ANSA,*



2020). Questi pazienti nuovamente positivi non sembrerebbero contagiosi anche se circa il 44% avrebbe lievi sintomi. Probabilmente i test di immunità rilevano residui del virus nell'organismo. Poiché la sequenza genetica del virus è diventata disponibile solo all'inizio di gennaio, è facile

prevedere che i tempi saranno incerti, lunghi e anche se la comunità scientifica internazionale sta facendo uno sforzo enorme per accelerare al massimo, certamente non inferiori a 1-2 anni, in quanto ci sono tempi tecnici da rispettare. Nella migliore delle ipotesi serviranno almeno diciotto mesi per portare a termine gli studi di fase 1, che consiste nelle verifiche su sicurezza e capacità di provocare una risposta immunitaria, poi si passa alla fase 2, in cui vengono stabilite dosi e schedule di somministrazione, quindi alla fase 3, cioè lo studio di efficacia su soggetti a rischio e infine quelli di analisi dei risultati da parte delle Agenzie regolatorie. Si possono stringere i tempi ma, poiché i passaggi sono obbligati, tutti i vaccini disponibili finora hanno richiesto un minimo di otto anni, tra ideazione e immissione sul mercato. Un motivo di scetticismo è che molti dei danni non derivano direttamente dal virus, ma dall'eccesso di infiammazione che si scatena nell'organismo, ancora non sappiamo se gli anticorpi indotti dal vaccino miglioreranno la situazione. È stato comunque già attuato, come vedremo, il ricorso a *studi challenge* che, sostituendo la fase 3, potrebbero consentire il risparmio di molti mesi (*fonte: J Infect Dis online, 31/03/2020*). Ricordiamo che, dopo circa venti anni, aspettiamo ancora il vaccino per l'AIDS "pronto subito" forse non tenendo presente che, data l'estrema variabilità del gene regolatore *Tat*, non sarà mai possibile trovarlo per tutti i tipi di HIV

anche se, in questo caso, il genoma sembrerebbe stabile ma, secondo ricercatori del *Campus Biomedico* e dell'*Area Science Park* di Trieste, dell'*Università del Maryland*, dopo aver analizzato 220 genomi, COVID-19 europeo-americano avrebbe perso le caratteristiche cinesi mutando il 9 febbraio in Gran Bretagna (con un drammatico incremento dei pazienti infettati), con delle varianti che lo renderebbero potenzialmente più instabile e più contagioso, frutto di una mutazione dell'enzima polimerasi RNA dipendente, essenziale per la sua replicazione (*fonte: Journal of Translational Medicine, 14/04/2020*). Sappiamo che il tasso di mutazione dei virus a RNA è fino a un milione di volte più alto di quello dei loro ospiti, pertanto circolando e replicandosi in un numero di individui così grande, le possibilità di mutazione aumentano ulteriormente. Se il Covid-19 continuasse a cambiare, anche di poco, c'è il rischio concreto che possa diventare irriconoscibile per la memoria del sistema immunitario nei guariti o vaccinati o diventi farmaco-resistente e sarebbe complicato avere un vaccino per entrambi, esattamente come avviene per quelli antinfluenzali, con il rischio di acquistare vaccini inutili. Ricordiamo che né per la SARS né per la MERS ne sono stati preparati, facendo invece ricorso agli anticorpi dei guariti. L'*Istituto Superiore di Sanità* ha invece smentito in conferenza stampa che in Italia circoli un ceppo di virus più aggressivo che invece sarebbe come il cinese di Wuhan. Il 24 marzo è stata pubblicata la relazione di un meeting virtuale tra OMS, International Coalition of Medicines Regulatory Authorities (ICMRA), EMA e FDA, con le regole per lo sviluppo di vaccini contro COVID-19, con i punti chiave dati preclinici e la necessità di affrontare il rischio teorico che possano esacerbare la malattia, prima di iniziare studi clinici sull'uomo. Il vaccino dovrebbe minimizzare l'induzione di una risposta immunitaria eccessiva che, in caso di infezione, anziché prevenire la malattia, la aggrava (immuno-potenziamento); essere idoneo per gli over-60 o con diabete o ipertensione, per gli operatori sanitari esposti ad alti carichi virali e per lo stoccaggio (potrebbe non essere disponibile in tempo per la pandemia in atto).

A) Vaccini in progettazione o in studio o in fase preclinica

Nel mondo sono allo studio vari vaccini, con potenzialità diverse, dei 90 candidati in fase di test almeno sei si stanno sperimentando sull'uomo. Sono otto le vie seguite per metterli a punto. Una delle più tradizionali, utilizzata da pochi gruppi di ricerca, si basa sul virus SarsCov2 in forma indebolita o inattivata; più numerosi, invece, quelli che utilizzano il materiale genetico del virus che in alcuni casi viene trasportato nelle cellule utilizzando come navetta altri virus resi inoffensivi oppure introdotto con altre tecniche. In Cina è stato sviluppato il **vaccino vettore adenovirus** ricombinante dall'*Istituto di Medicina Militare dell'Accademia delle Scienze Militari*, dal 16 marzo (*fonte: News, 14/04/2020*). La Sinovac, ricorrendo alla precedente esperienza del vaccino anti-SARS, in

collaborazione con istituzioni cinesi, ha prodotto un **vaccino inattivato** con buona reazione di neutralizzazione incrociata a diversi ceppi di COVID-19. Le aziende italiane Takis Biotech ed Evvivax insieme alla Applied DNA Sciences ne hanno progettato quattro, a **DNA**, basati su PCR di materiale biologico di malati cinesi, pronti per test su animali (*fonte: Adnas.com, 2020*). Ricercatori della Advent-Irbm, con sede a Pomezia (RM), che hanno messo a punto il vaccino italiano anti-Ebola, il cui brevetto è stato acquistato nel 2013 da una società britannica, hanno concluso ad aprile la fase dei test di laboratorio e dato inizio direttamente ai test clinici con l'invio di 550 dosi del vaccino allo *Jenner Institute* dell'*Università di Oxford* (Regno Unito) dove sarà testato su altrettanti volontari sani. Se i risultati saranno positivi le prime somministrazioni potranno avvenire a settembre, al personale sanitario e alle forze dell'ordine in "uso compassionevole" e poi, nei primi mesi del 2021, fornito ai S.S.N. Studiosi del *National Institutes of Health's Rocky Mountain Laboratory* (Montana, USA) a marzo hanno curato sei macachi con dosi singole di questo vaccino, esposti poi a grandi quantità del virus e dopo 28 giorni erano tutti sani. In U.S.A. la Johnson & Johnson (J&J) e l'*University of Pittsburgh School of Medicine* studiano il **vaccino-cerotto PittCoVacc**, sviluppato nel 2003 per la SARS ma non sperimentato a causa della sua scomparsa improvvisa con test sui topi risultati promettenti. Applicando il cerotto, di 1,5 cm, sul polpastrello, braccia o spalle si prova una sensazione di aver poggato un velo e un vago prurito in quanto comprende 400 micropunture che iniettano una dose di vaccino pari a un 1/5 della dose necessaria per un'iniezione rilasciando la proteina "spike", la chiave del virus per entrare nell'organismo. A questo punto il sistema immunitario, riconoscendolo come estraneo, inizia a produrre anticorpi contro di esso, quando poi il soggetto verrà contagiato, gli anticorpi già sviluppati bloccheranno l'infezione. Questo vaccino appare di relativa semplicità di creazione, di grande convenienza, poiché se ne deve produrre una quantità enorme, e facilità d'uso. Dopo l'autorizzazione dell'FDA, in massimo due mesi dovrebbe partire la sperimentazione clinica, per stabilire la dose adatta e, se dovessero proseguire i risultati positivi, la produzione comincerebbe entro cinque mesi (*fonte: EBioMedicine, The Lancet, 02/04/2020*). L'*Istituto Nazionale Americano per le Allergie e le Malattie Infettive* (NIAID) collabora con *Moderna Inc.* per il vaccino **mRNA-1273**, in fase I, e il 16 marzo è iniziato lo studio sull'uomo (*fonte: NPR, npr.org, 21/03/2020*): si inietta RNA che, entrato nelle cellule, viene tradotto nella proteina spike che dovrebbe indurre una risposta immunitaria protettiva. È una scommessa in quanto finora i vaccini composti da acidi nucleici si sono rivelati poco efficaci nell'uomo ma si è



iniziato con questo perché lo sviluppo è più semplice e veloce, pur lavorando anche al metodo classico, con proteine ricombinanti o virus inattivato. La J&J ha reclutato 108 partecipanti, con un follow-up di sei mesi, nel marzo 2020, per lo studio di fase I per l'**Ad5-nCoV**, vaccino ricombinante con Adenovirus tipo 5, come vettore (*fonte: Jnj.com, 2020*) i cui dati di sicurezza ed efficacia



dovrebbero essere disponibili entro la fine dell'anno e pronto per l'uso d'emergenza all'inizio del 2021. L'Azienda utilizza la tecnologia AdVac® e PER.C6®, la stessa utilizzata per produrre il vaccino Ebola e i suoi candidati al vaccino Zika, RSV e HIV che sono in fase II e III

(*fonte: ClinicalTrials.gov, 2020*). Sempre in USA, l'FDA ha autorizzato la sperimentazione del vaccino **Ino-4800** a base di DNA, in collaborazione con un'Azienda cinese, dopo i promettenti test sugli animali, con la somministrazione della prima dose a 40 volontari adulti sani, che sarà seguita da una seconda tra quattro settimane. Se la sperimentazione continuerà con successo, dopo i dati di sicurezza e immunogenicità, previsti entro la fine dell'estate, si procederà agli studi di efficacia. Sono previste un milione di dosi entro la fine del 2020 per ulteriori studi e usi di emergenza (*fonte: BBC News, bbc.com, 30/01/2020; Ir.inovio.com, March 12, 2020*). La bio-tech americana *Kentucky BioProcessing*, sta sottoponendo a test pre-clinici un vaccino che utilizza una tecnologia basata sulla rapida crescita delle piante di tabacco. Ha clonato una parte della sequenza genetica del virus (potenziale antigene), lo ha inserito nelle piante di tabacco per farlo riprodurre e poi l'ha purificato. Aspetti vantaggiosi sono la sicurezza e la velocità (le piante di tabacco non ospitano agenti patogeni per l'uomo e accumulano le proprietà del vaccino 6 settimane prima rispetto ai metodi tradizionali); la stabilità a temperatura ambiente e la potenziale risposta immunitaria anche con la somministrazione di una singola dose. **Covid-19 S-Trimer** è basato su una proteina ricombinante con l'adiuvante Matrix-M a base di saponina (*fonte: Gsk.com, 2020; Ir.novavax.com, 2020*). La Altimune Inc. sta studiando su animali un vaccino intranasale (*fonte: Ir.altimmune.com, 2020*). Si è constatato che alcuni vaccini sono efficaci anche su malattie diverse da quelle per le quali sono studiati infatti, ad.es., quando in URSS negli anni Settanta si effettuò una campagna di vaccinazioni anti-polio a tappeto, nella stagione invernale successiva non si verificarono quasi casi di influenza e la stessa osservazione è stata fatta a Singapore. Sono state pertanto proposte sperimentazioni con i vaccini anti-tubercolosi (tbc) e anti-poliomielite. Studiosi dell'*Università di Melbourne* (Australia) stanno somministrando, a migliaia tra anziani, medici, infermieri e operatori sanitari, gruppi ad alto rischio, per testarne

l'efficacia, il vaccino Bacille Calmette-Guerin o BCG, introdotto negli anni '20 per combattere la tbc, che contiene un ceppo vivo ma indebolito di suoi batteri, che provoca una risposta immunitaria adattativa, ancora utilizzato in molti Paesi in via di sviluppo dove è stato osservato come, oltre a prevenire la tbc, ridurrebbe l'incidenza di infezioni respiratorie. La maggior parte dei vaccini la crea a un singolo patogeno ma il BCG può anche rafforzare il sistema immunitario innato, cioè quelle difese di prima linea che impediscono ai patogeni di entrare nel corpo e di infettarlo. Poiché esistono molti vaccini BCG, contro vari ceppi di tbc, bisognerà individuare quali rafforzano maggiormente il sistema immunitario innato vs il virus (*fonte: Reuters Health News, 2020*). Sperimentazioni simili sono iniziate anche a Boston e U.E. (Olanda), sempre su operatori sanitari. Studiosi dell'*Institute of Human Virology* dell'*University of Maryland* partiranno tra un mese e mezzo con uno studio utilizzando il vaccino per la **Poliomielite**, somministrato con poche gocce sulla lingua, partendo dal presupposto che il genoma di Covid-19, polio e influenza è a RNA pertanto, ipotizzano, che il vaccino stimoli il sistema immunitario ad agire anche sugli altri virus.



Questo vaccino proteggerebbe per qualche mese ma potrebbe essere ripetuto tranquillamente. I risultati della sperimentazione si avranno in autunno, in tempo per un'eventuale seconda ondata della pandemia. Ricercatori dell'**Imperial College** di Londra hanno annunciato il 20 marzo che stanno sviluppando un vaccino **RNA auto-amplificante**, sviluppato dopo 14 giorni dalla ricezione delle sequenze genomiche dalla Cina (*fonte: imperial.ac.uk, 2020*).

Conclusioni

Nella lotta alla pandemia da SARS-Covid-19 la ricerca dunque procede ad una velocità inedita e a livelli diversi. E poiché la quantità genera qualità, gli studi clinici per testare i farmaci più promettenti si moltiplicano, uno sforzo globale senza precedenti, su tutti i fronti, per contrastare il virus. Non ci sono dubbi del fatto che un tale dispiegamento di energie e risorse darà i suoi frutti, anche se non è possibile in atto prevedere quando.