

La lunga strada verso le terapie e i vaccini contro la Covid-19

Parte 2- Dal trattamento delle malattie cardiovascolari al vaccino

Barbara Illi

Istituto di Biologia e Patologia Molecolari, Consiglio Nazionale delle Ricerche (IBPM-CNR),
c/o Dipartimento di Biologia e Biotechnologie "Charles Darwin", Sapienza Università di
Roma.

Note: evidenziate in corsivo sono riportate informazioni per "non biologi".

Introduzione

Oltre al riposizionamento dei farmaci, si stanno esplorando altre terapie più specifiche per affrontare la Covid-19. Le malattie cardiovascolari sono la condizione maggiormente prevalente e fatale che i clinici si trovano ad affrontare in un paziente Covid-19. Perciò, terapie che supportino il sistema cardiovascolare rappresentano uno dei trattamenti di prima linea. L'immunoterapia è un'altra opzione, ma si scontra con la difficoltà di produrre in maniera massiccia anticorpi sintetici. Al contrario, il plasma convalescente è una valida alternativa, che merita studi approfonditi. Anche la terapia cellulare con cellule staminali è in corso di valutazione. Infine, si stanno testando un gran numero di vaccini. I primi risultati sono promettenti, suggerendo che siamo sulla buona strada per debellare l'infezione da SARS-CoV-2 (CoV-2).

Il trattamento delle malattie cardiovascolari

Le malattie cardiovascolari rappresentano un elemento prevalente di comorbidità - ossia *la compresenza di patologie, anche pre-esistenti* - della Covid-19. CoV-2 può anche indurre malattie cardiovascolari come conseguenza della tempesta di citochine o per infezione diretta (figura 1). Le manifestazioni cardiovascolari della Covid-19 vanno dalle coagulopatie all'infarto del miocardio (MI)^{1,2}. L'elemento chiave è il recettore Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2). Questo è espresso non solo nelle cellule epiteliali del tratto respiratorio e dei polmoni, ma anche nel cuore, dove contrasta l'azione dell' angiotensina II (Ang II), convertendola in angiotensina 1-7, nel caso di un'eccessiva attivazione del sistema renina angiotensina aldosterone (RAAS)³.

Figura 1

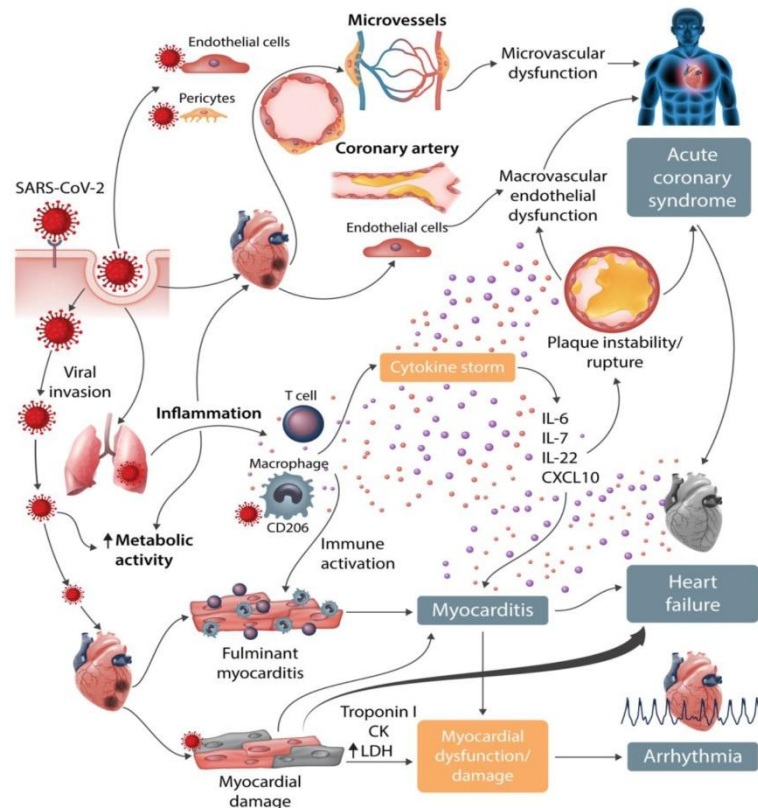


Figura 1. Meccanismo ipotetico del coinvolgimento cardiovascolare nella Covid-19. CoV-2 si attacca ad ACE2 per entrare nelle cellule ospiti, incluse le cellule endoteliali, periciti e cardiomiociti, portando ad infiammazione e cedimento multi organo. L'infezione delle cellule endoteliali e dei periciti potrebbe essere responsabile di disfunzione micro- e macrovascolare. Inoltre, insieme all'iper-reattività del sistema immunitario, potrebbe potenzialmente destabilizzare le placche aterosclerotiche e favorire l'insorgenza della sindrome coronarica acuta. La presenza della tempesta di citochine e l'iper-attivazione del sistema immunitario causa l'infiltrazione del miocardio da parte dei linfociti T attivati e dei macrofagi, causando miocardite e danno cardiaco grave. In modo simile, l'infezione virale diretta dei cardiomiociti potrebbe portare a disfunzione del miocardio, contribuendo all'insorgenza di aritmie. Abbreviazioni: IL=interleuchina; CXCL10=C-X-C motif chemokine ligand 10; CK=creatin chinasi; LDH=lattato deidrogenasi. (Da: Guzik et al., *Cardiovasc Res*, 2020)

- Anomalie della coagulazione

La Covid-19 potrebbe essere definita una patologia trombo-infiammatoria, caratterizzata da coagulopatia indotta da sepsi (sepsis-induced coagulopathy, SIC) e coagulazione intravasale disseminata (disseminated intravascular coagulopathy, DIC), specialmente nei casi gravi. Le anomalie della coagulazione sono definite come diminuzione dei livelli di piastrine e fibrinogeno e aumento dei prodotti di degradazione del fibrinogeno come i D-dimeri⁴. Eventi tromboembolitici venosi (venous thromboembolic events, VTE) sono stati riportati in un certo numero di pazienti Covid-19 e sebbene l'uso dell'eparina sia stato consigliato per trattare questo disordine specifico⁵, la VTE non sembra trarre vantaggio dalla somministrazione di eparine a basso peso molecolare⁶. Ang II potrebbe

essere responsabile della disfunzione endoteliale (endothelial dysfunction, ED) e dell'incremento della permeabilità vascolare⁷. Sebbene la patogenesi sia ancora poco compresa, recentemente è stato suggerito che uno sbilanciamento tra fattori pro- e anti-angiogenici possa contribuire alla coagulopatia dipendente da CoV-2. In particolare, nei pazienti Covid-19 è stato osservato un alto rapporto tra il recettore solubile Flt-1 (soluble fms-like tyrosine kinase 1, sFlt-1) e il fattore di crescita placentare (Placental Growth Factor, PlGF)⁸. CoV-2 reprime l'espressione di ACE2, aumentando i livelli di Ang II, che, a loro volta, promuovono l'aumento di sFlt-1. sFlt-1 agisce come esca per il PlGF e impedisce, inoltre, la produzione di ossido nitrico causando disfunzione endoteliale.

- Danno del miocardio

Il danno del miocardio nei pazienti Covid-19 sembra seguire 2 vie distinte (figura 2). La prima è, probabilmente, in relazione con la tempesta di citochine e presenta alti livelli della troponina cardiaca I ad alta sensibilità (high-sensitivity cardiac troponin I, hs-cTnI), che aumenta costantemente nei pazienti che non sopravvivono e segue l'andamento delle altre citochine e marcatori dell'infiammazione - interleuchina 6 (IL-6), D-dimero, lattato deidrogenasi, ferritina - e del peptide natriuretico amino-terminale pro-tipo B (N-terminal pro B-type natriuretic peptide, NT-proBNP). Tuttavia, alcuni pazienti

Figura 2

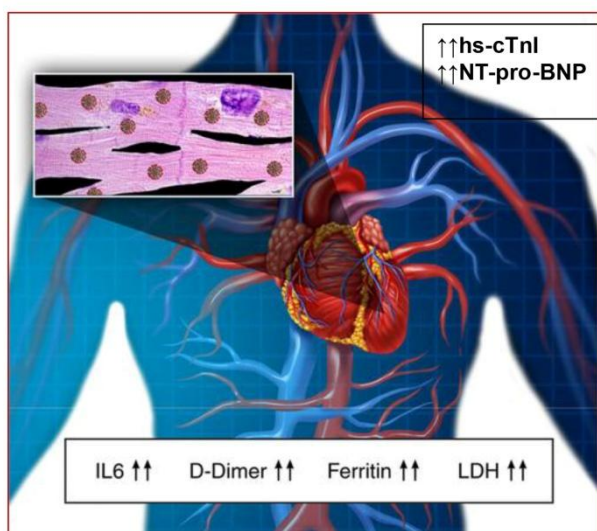


Figura 2. Il danno del miocardio, caratterizzato dall'incremento di hs-cTnI e NT-pro-BNP, può risultare dalla tempesta di citochine, quindi da livelli elevati di IL-6, ferritin, LDH, e D-dimero o dall'effetto diretto dell'infezione di CoV-2. Abbreviazioni: hs-cTnI=troponina cardiaca I ad alta sensibilità (high sensitivity-cardiac troponin I); NT-proBNP=peptide natriuretico amino terminale pro-tipo B (N-terminal pro B-type natriuretic peptide); IL-6=interleuchina-6; LDH=lattato deidrogenasi (lactate dehydrogenase). (Adattato da: Clerkin et al., *Circulation*. 2020)

presentano prevalentemente manifestazioni cardiache, con shock cardiogenico severo, suggerendo l'insorgenza di miocardite virale o cardiomiopatia da stress. Questa condizione predispone ad aritmia cardiaca, che comprende fibrillazione atrio-ventricolare e tachicardia ventricolare e che è la seconda complicazione più frequente nei pazienti

Covid-19 dopo la sindrome acuta da distress respiratorio (acute respiratory distress syndrome, ARDS)⁹. Il trattamento di questi pazienti prevede l'uso di steroidi, principalmente glucocorticoidi, somministrazione endovena di immunoglobuline fino all'ossigenazione extracorporea (extracorporeal membrane oxygenation, ECMO)^{10,11}. L'insorgenza tardiva del danno al miocardio (circa 15 giorni dopo i sintomi iniziali)² sostiene l'ipotesi di un danno cardiaco mediato dalla risposta dei linfociti T, come dimostrato dall'aumento dei linfociti T CCR6⁺Th17 CD4⁺, che mediano la miocardite¹², ma il meccanismo preciso del danno al miocardio dipendente da CoV-2 è ancora poco chiaro. L'infarto è un esito comune nei pazienti Covid-19. Circa il 52% dei non-sopravvissuti ha avuto un infarto, rispetto al 12% dei sopravvissuti².

- Ipertensione

Il ruolo di ACE2 nel sistema RAAS è il legame tra la Covid-19 e l'ipertensione. Gli ACE inibitori (ACEi) o i farmaci bloccanti i recettori per l'angiotensina (Angiotensin Receptor Blockers, ARBs) aumentano i livelli di ACE2 nei ratti¹³. Perciò, è stato ipotizzato che le terapie anti-ipertensive possano essere dannose per i pazienti Covid-19. Tuttavia, non ci sono evidenze che gli ACEi o gli ARBs aumentino i livelli di ACE2 nei tessuti umani¹⁴. Infatti, la Società Europea dell' Ipertensione, la Società Internazionale dell' Ipertensione e la Società Europea di Cardiologia hanno scoraggiato la sospensione delle terapie anti-ipertensive nei pazienti Covid-19¹⁵. Di rilievo il fatto che gli ARBs possano essere riposizionati come farmaci per la Covid-19. Il losartan impedisce l'internalizzazione e degradazione di ACE2, perciò potrebbe essere protettivo contro l'infezione da CoV-2¹⁵. L'irbesartan, un altro ARBs, è stato suggerito come adiuvante nel trattamento della Covid-19 per il suo ruolo nel metabolismo del potassio. Infatti, l'ipokaliemia – cioè bassi livelli di potassio nel sangue – è una caratteristica comune dei pazienti Covid-19. L'ipokaliemia è difficile da gestire, dipende dalla gravità della malattia e dall'attivazione del RAAS¹⁶. Perciò, si è ipotizzato che gli ACEi o gli ARBs possano essere vantaggiosi nei pazienti Covid-19. Un'altra relazione tra la Covid-19 e l'ipertensione è il sistema immunitario. Lo scarso controllo della pressione sanguigna porta ad una de-regolazione del sistema immunitario, in particolare ad una disfunzione delle cellule T CD8⁺, che non sono più in grado di rispondere in maniera efficiente alle infezioni virali¹⁷. Perciò, la terapia anti-ipertensiva potrebbe, almeno in parte, recuperare la de-regolazione del sistema immunitario.

Il trattamento delle malattie cardiovascolari nei pazienti Covid-19 include terapie per l'infarto, aritmia e terapie anti-coagulanti, laddove necessarie e appropriate. Di recente, è

iniziata un sperimentazione clinica con APN01, una forma ricombinante del recettore ACE2 (human recombinant ACE2, hrACE2; ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04335136). Infatti, è stato dimostrato che questa forma di ACE2 può prevenire l'infezione non solo delle cellule Vero-E6, ma anche di organoidi vascolari (figura 3) e di rene¹⁸. Tuttavia, l'attività neutralizzante di hrACE2 non è completa, suggerendo l'esistenza di altre vie di infezione di CoV-2¹⁸.

Figura 3

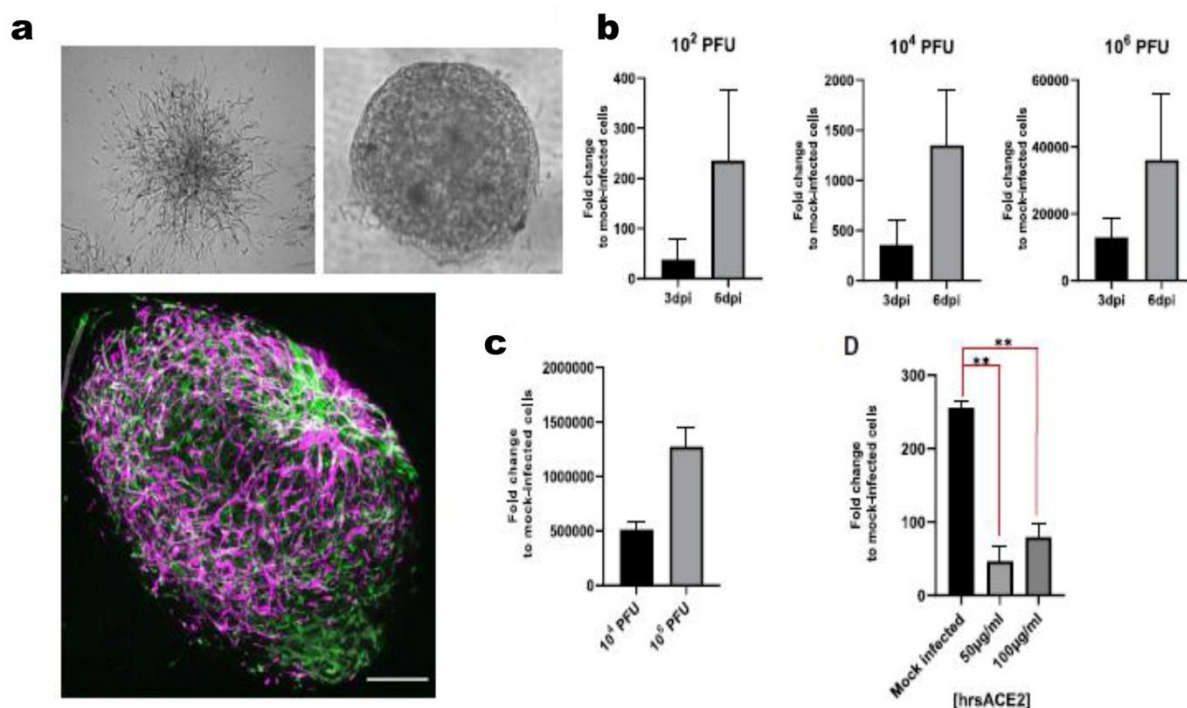


Figura 3. CoV-2 può infettare organoidi vascolari. a) Pannelli superiori. Immagini al microscopio ottico degli organoidi vascolari. Pannello inferiore. Immunofluorescenza di un organoide vascolare con un anticorpo anti-CD31 per rilevare le cellule endoteliali e anti-PDGFR β per rilevare i periciti. b) RNA virale estratto dagli organoidi vascolari a 3 e 6 giorni dopo l'infezione. c) Determinazione della progenie virale. I sovranatanti degli organoidi vascolari sono stati collezionati 6 giorni dopo l'infezione e utilizzati per infettare cellule Vero E6 a differenti concentrazioni (unità formanti placca, PFU). Dopo 48 ore, l'RNA virale è stato rilevato tramite Real time-PCR. I dati mostrano che gli organoidi infettati producono virioni di CoV-2, in dipendenza dai livelli iniziali di infezione. d) Gli organoidi vascolari sono stati esposti ad una miscela di 10⁶ particelle virali più hrsACE2 per 1 ora. 3 giorni dopo l'infezione, l'RNA virale è stato determinato per real time PCR. hrsACE2 diminuisce i livelli di CoV-2 negli organoidi vascolari. Abbreviazioni: hrsACE2=recettore solubile ricombinante ACE2 (human recombinant soluble ACE2) (From: Monteil et al., Cell, 2020)

Immunoterapia

La stimolazione del sistema immunitario è una delle strategie correnti per trattare la Covid-19. Le strade terapeutiche più promettenti sono gli anticorpi monoclonali neutralizzanti e il plasma convalescente.

- Anticorpi monoclonali

Sono stati isolati un certo numero di anticorpi neutralizzanti che impediscono il legame di CoV-2 con le cellule ospiti. In maniera significativa, alcuni di questi

Figura 4

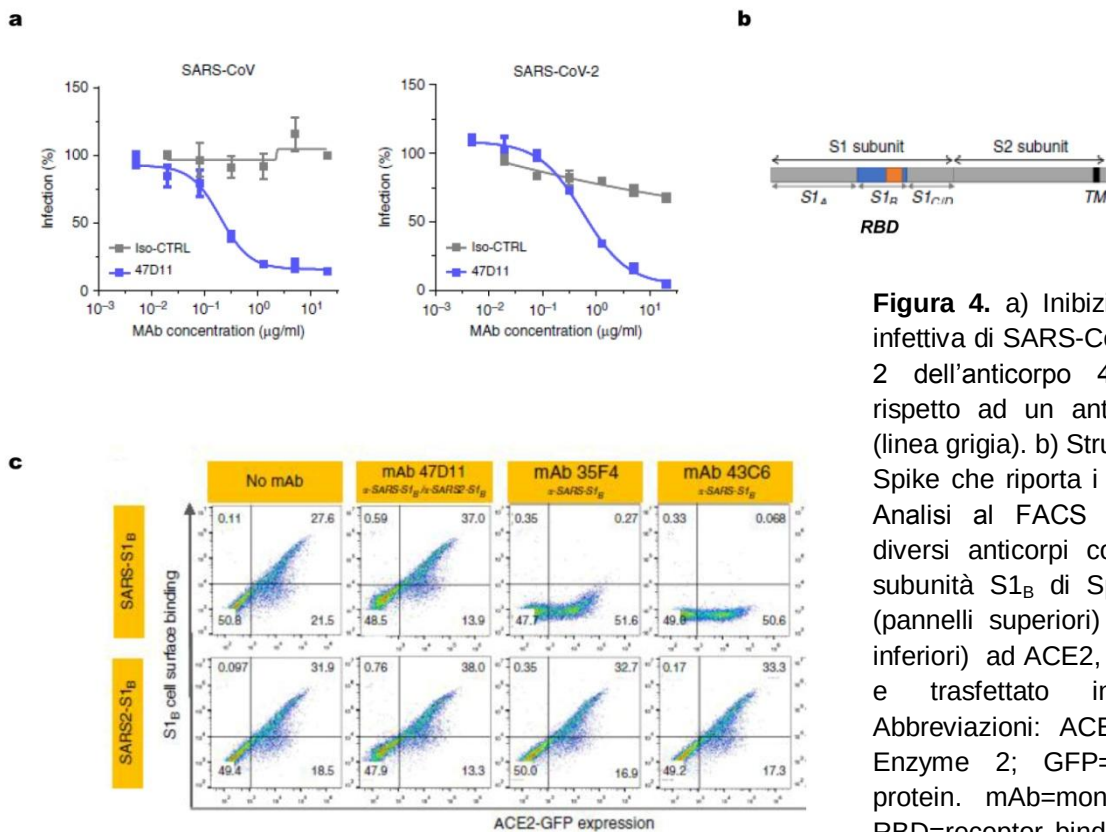


Figura 4. a) Inibizione della capacità infettiva di SARS-CoV (sinistra) e CoV-2 dell'anticorpo 47D11 (linea blu) rispetto ad un anticorpo di controllo (linea grigia). b) Struttura schematica di Spike che riporta i vari sub domini. c) Analisi al FACS dell'interferenza di diversi anticorpi con il legame della subunità S1_B di Spike di SARS-CoV (pannelli superiori) e CoV-2 (pannelli inferiori) ad ACE2, coniugato alla GFP e trasfettato in cellule Vero. Abbreviazioni: ACE2=Ace Converting Enzyme 2; GFP=green fluorescent protein. mAb=monoclonal antibody; RBD=receptor binding domain. (Tratto da: Wang et al., Nat Commun, 2020).

reagiscono in maniera crociata con SARS-CoV. L'anticorpo 47D11 blocca l'infezione sia di SARS-CoV che di CoV-2 *in vitro* (figura 4a) e la formazione di sincizi. Questo specifico anticorpo è stato isolato da sovrananti di ibridomi di topi immunizzati con la proteina Spike (S) di SARS-CoV. *Un ibridoma è una cellula ibrida costituita da una cellula B, secernente uno specifico anticorpo, e una cellula di mieloma multiplo, che conferisce alla cellula ibrida la capacità di propagarsi indefinitamente in coltura e, quindi, di produrre grandi quantità di anticorpi.* L'anticorpo 47D11 ha affinità per un epitopo conservato del sub dominio S1_B delle proteine S di SARS-CoV e CoV-2 (figura 4b), laddove non interferisce con il legame di S ad ACE2 (figura 4c)¹⁹. Un altro screening di anticorpi prodotti da linfociti B di un paziente infettato da SARS-CoV, ha identificato un anticorpo, detto S309, in grado di inibire, potenzialmente, sia l'infezione da SARS-CoV che CoV-2, impegnando il dominio di legame al recettore (receptor binding domain, RBD) di S e limitando il riconoscimento di ACE2 (figura 5a)²⁰. Le stesse evidenze sono state ottenute per altri anticorpi^{21,22}. Uno di questi, CB6, isolato dal siero di un paziente Covid-19, possiede attività profilattica e terapeutica nelle scimmie (figure 5b)²¹.

Figura 5

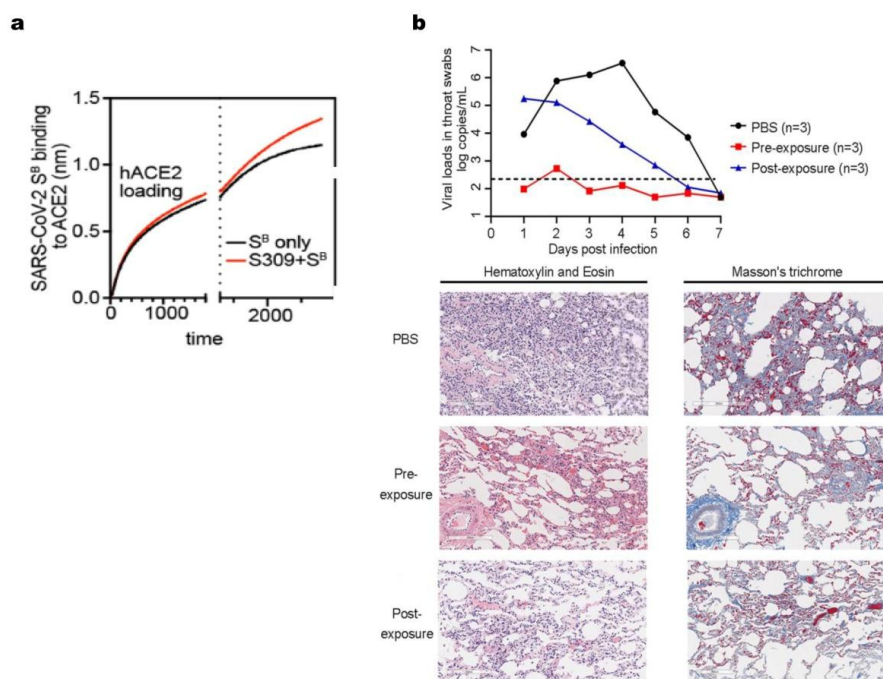


Figura 5. a) Competizione tra S309 con ACE2 nel legame al dominio S_B di S di CoV-2. La linea verticale interrotta indica l'inizio dell'associazione dell'anticorpo S309 complessato a S_B, o di S_B libero, ad ACE2. b) Pannello superiore. Effetto dell'anticorpo CB6 sulla carica virale, determinata per relative PCR, in 6 scimmie trattate prima (in rosso) o dopo (in blu) l'infezione. Altre 3 scimmie sono state trattate con tampone fosfato dopo l'infezione. Pannello inferiore. Analisi istopatologica e immunoistochimica dei polmoni derivati dalle scimmie di controllo (PBS), trattate prima (pre-exposure) o dopo (post-exposure) l'infezione. La colorazione con ematossilina/eosina mostra l'infiltrato infiammatorio. La colorazione tricromica di Masson mostra la fibrosi polmonare. In ambedue le colorazioni, il danno polmonare risulta molto più marcato nel tessuto di controllo rispetto ai tessuti derivati dalle scimmie trattate con l'anticorpo CB6. Scala = 200 µm. Abbreviazioni: PBS=phosphate buffered saline. hACE2=ACE2 umano (human ACE2). (Tratto da: Shi et al., Science, 2020).

- Plasma convalescente

La terapia passiva con anticorpi è una procedura ben consolidata e consiste nella somministrazione di anticorpi purificati – che, comunque, hanno più una funzione profilattica che terapeutica – immunoglobuline, che contengono gli anticorpi contro il patogeno specifico di interesse, e il plasma convalescente, che è impiegato in situazioni di emergenza e che, in assenza di terapie efficaci, rappresenta l'unica opzione terapeutica per nuove patologie, come la Covid-19. Più di 200 trial clinici sono in corso sull'uso del plasma convalescente per il trattamento della Covid-19. La figura 6 mostra il protocollo per la collezione di plasma dai pazienti²³. I risultati su numeri piccoli di pazienti, ricevuti anche terapie standard, hanno riportato un beneficio nell'uso del plasma convalescente²⁴, facendo crescere l'ottimismo riguardo questo tipo di immunoterapia passiva. Tuttavia, molto recentemente, i risultati del primo trial clinico randomizzato su

Figura 6

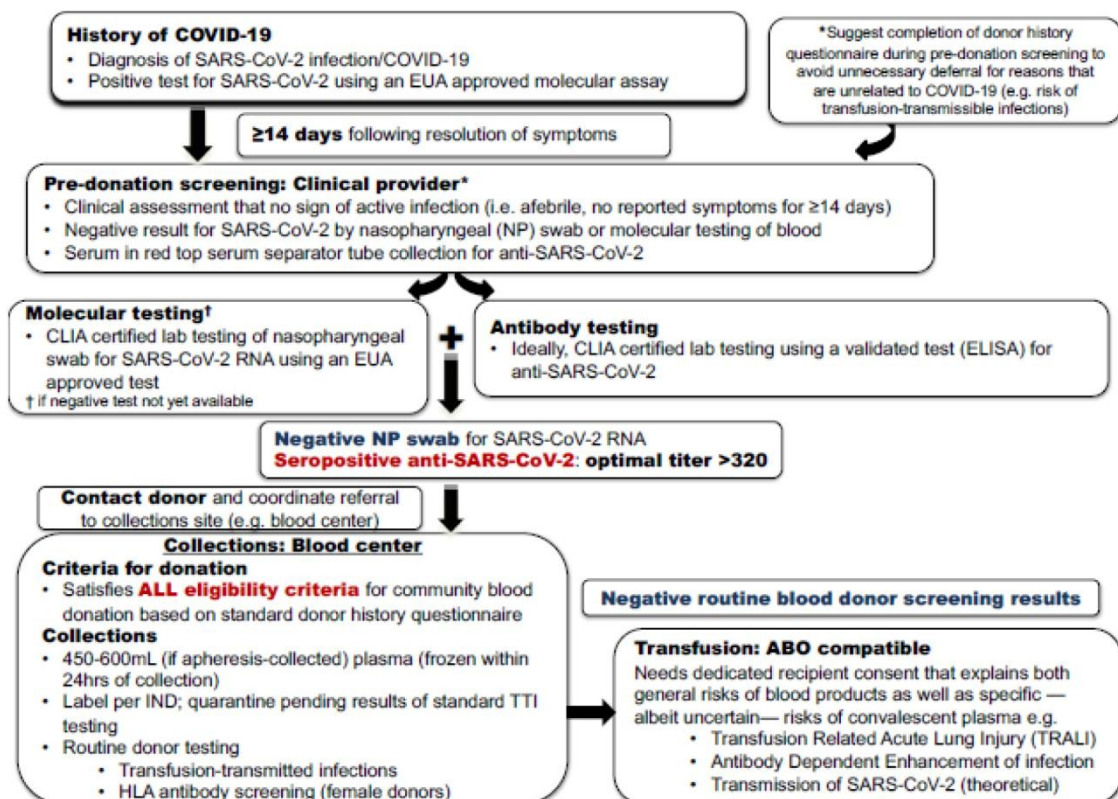


Figura 6. Protocollo per la collezione del plasma come definito in *Bloch et al., JCI, 2020*¹³⁵.

103 pazienti Covid-19 gravi, che ha impiegato plasma convalescente più terapia standard, rispetto a terapia standard da sola, non hanno riportato, globalmente, miglioramenti statisticamente significativi (figura 7)²⁵. Nonostante ciò, i pazienti trattati con plasma convalescente si sono negativizzati all'RNA virale dopo 24, 48 e 72 ore dalla trasfusione. Inoltre, questo studio presenta molte limitazioni, incluse la randomizzazione tardiva (a 30 giorni dall'insorgenza dei sintomi), la presenza di terapie concomitanti e il fatto che fosse

Figura 7

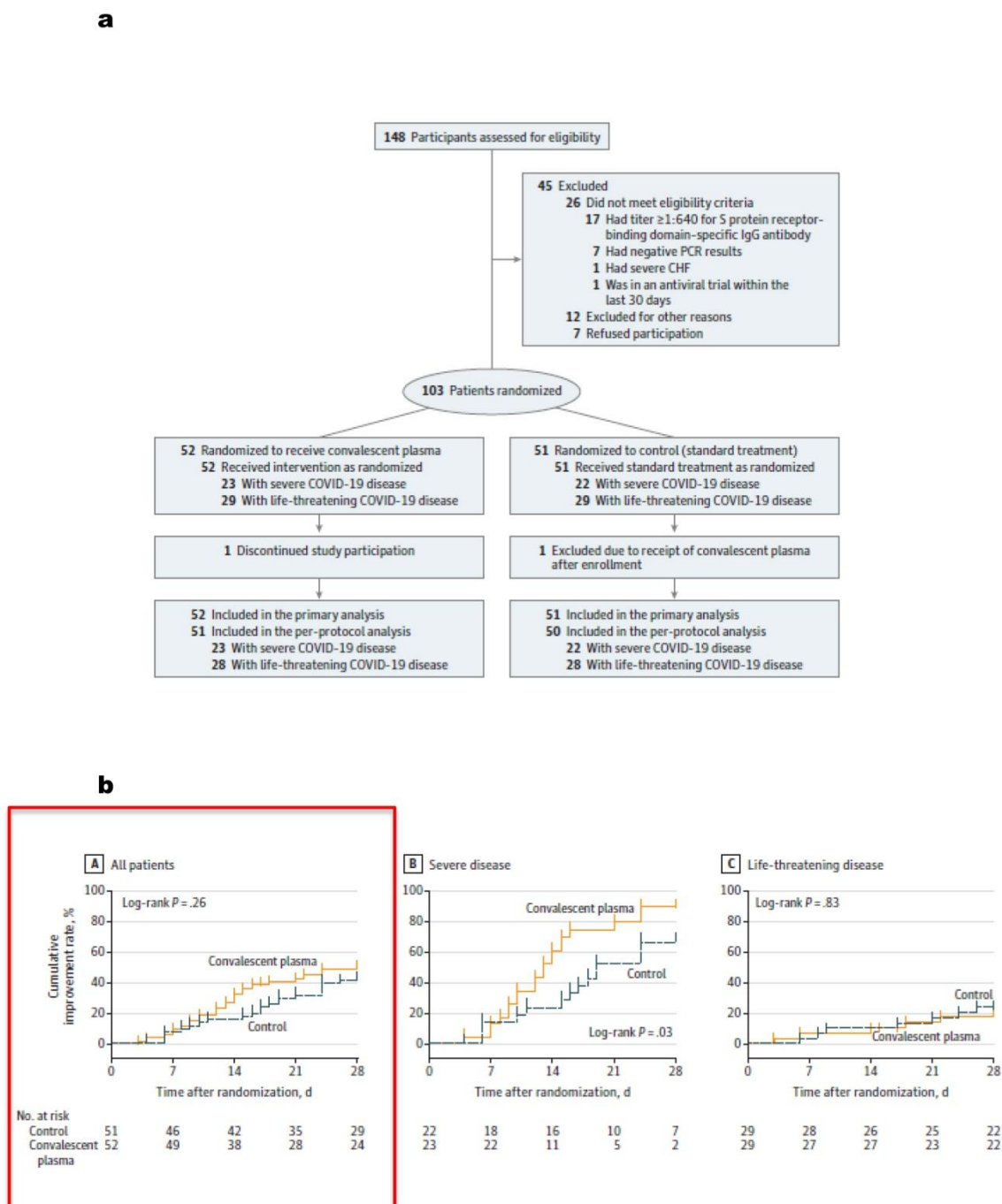


Figura 7. a) Rappresentazione grafica dei criteri di inclusione/esclusione dei pazienti e la successiva randomizzazione nei gruppi sperimentale (trattato con plasma convalescente) e controllo. b) Miglioramento, cumulativo, inteso come percentuale di pazienti dimessi o che hanno mostrato una riduzione di 2 punti in una scala di severità da 1 a 6, come definito in Wang et al., Lancet, 2020. Considerando i pazienti nel loro complesso (riquadro rosso), il plasma convalescente non ha significativamente modificato le condizioni cliniche. (Tratto da Li et al., Lancet, 2020).

“open label”, quindi ha risentito di alcune decisioni prese dai medici durante il decorso della malattia²⁶. Per queste ragioni, nonostante questi risultati scoraggianti, il plasma convalescente merita ulteriori, rigorose indagini. Un lavoro pubblicato di recente ha riportato la presenza di basse quantità di anticorpi neutralizzanti nel plasma convalescente di 149 individui infettati da CoV-2. Tuttavia, alcuni cloni di cellule B producono in maniera ricorrente anticorpi anti-RBD di S, con attività neutralizzante potente, suggerendo come molto promettenti i vaccini che inducono questo tipo particolare di anticorpi²⁷.

Terapia cellulare

L'interesse per un approccio terapeutico per la Covid-19 basato sull'uso di cellule è dimostrato dal numero di trial clinici in corso. Possono essere utilizzate diversi tipi di cellule staminali: cellule mesenchimali derivate da midollo osseo, tessuto adiposo,

Figura 8

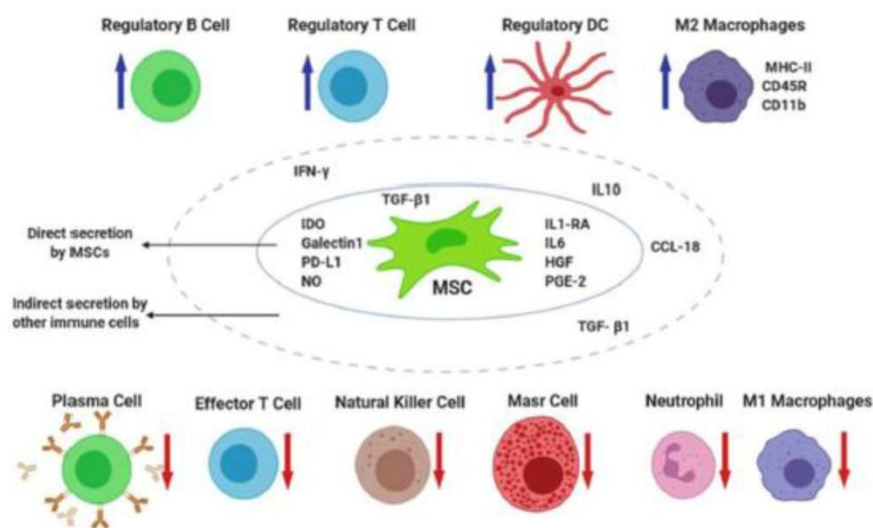


Figura 8. Le cellule mesenchimali e la loro attività immunomodulatoria sulle cellule del sistema immunitario. Abbreviazioni: MSCs=Cellule staminali mesenchimali (mesenchymal stem cells); IL=interleuchina; IL-R= recettore dell'interleuchina (IL-Receptor); TGF-β1=fattore di crescita trasformante -β1 (transforming growth factor-β1); PD-L1= ligando della morte programmata 1 (Programmed Death-Ligand 1); IDO=indole amina 2,3-diossigenasi; NO=ossido nitrico (nitric oxide); CCL-18=chemochina 18; HGF=fattore di crescita degli epatociti (Hepatocyte Growth Factor); PGE-2=prostaglandina 2; MHC= complesso maggiore di istocompatibilità (Major Histocompatibility Complex). (Tratto da: *Golchin et al., Stem Cell Rev, 2020*).

polpa dentaria, sangue cordonale e cellule derivate da cardiosfere da tessuto cardiaco. Le cellule mesenchimali (mesenchymal stem cells, MSCs) rivestono un' importanza particolare, in quanto sono molto poco immunogeniche, si espandono rapidamente in coltura, sono facilmente accessibili e, soprattutto, sono sicure^{28,29}. L'attività

immunomodulatoria delle MSCs è alla base dei protocolli terapeutici utilizzati per trattare la Covid-19. Infatti, le MSCs producono molte citochine e possono regolare il numero e l'attività delle cellule del sistema immunitario (figura 8)³⁰. Inoltre, sono multipotenti e differenziano facilmente in cellule tessuto-specifiche, riparando i tessuti danneggiati. Curiosamente, quello che è normalmente un problema relativo all'infusione delle MSCs, ossia la loro cattura all'interno dei polmoni, diventa un vantaggio nel caso della Covid-19. Infatti, le MSCs possono, in questa sede, recuperare le funzioni polmonari e riparare l'epitelio alveolare. I risultati degli studi che hanno utilizzato le MSCs soffrono, anch'essi, del piccolo numero di pazienti trattati. Comunque, alcuni studi riportano un miglioramento delle condizioni cliniche di pazienti affetti dopo il trapianto delle MSCs³¹. Uno studio relativo all'uso compassionevole delle cellule derivate da cardiosfere ha mostrato l'efficacia e la sicurezza del trattamento. Anche in questo caso, però, solo 6 pazienti sono stati trasfusi ed erano trattati anche con altri farmaci³².

Vaccini

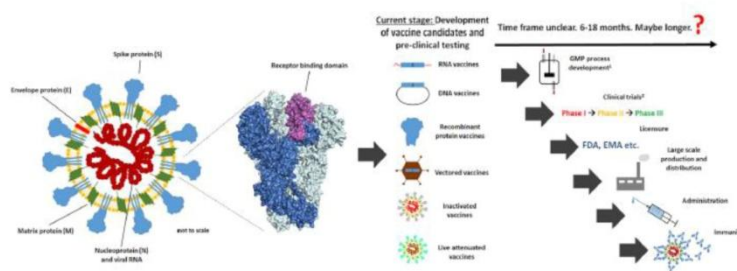
La figura 9a mostra le strategie vigenti per ottenere i vaccini. 130 trial clinici sono in corso, per testare la sicurezza e l'efficacia dei vaccini contro CoV-2, basati su differenti piattaforme (figura 9b)³³.

- Piattaforme
 - a. I vaccini a DNA ed RNA sono basati sull'espressione dell'mRNA codificante l'antigene "in vivo", dopo l'iniezione di nanoparticelle contenenti l'mRNA (per i vaccini ad RNA) o plasmidi (per i vaccini a DNA). Questi vaccini stimolano le risposte immunitarie umorali e cellulari.
 - b. I vaccini basati su proteine ricombinanti hanno il vantaggio di evitare la manipolazione del virus. Richiedono, solitamente, l'aggiunta di adiuvanti per generare una risposta umorale robusta.
 - c. I vaccini basati su vettori adenovirali, sfruttano la capacità di adenovirus geneticamente modificati, *ossia deprivati dei geni "pericolosi"*, di indurre una risposta immunitaria innata insieme ad una specifica contro l'antigene codificato e incluso nel vettore. Comunque, gli adenovirus circolano a frequenza elevata nella popolazione, creando un ambiente immune pre-esistente, riducendo l'efficacia dei vaccini basati su vettori adenovirali.
 - d. I vaccini attenuati e quelli inattivati sono prodotti dopo diversi passaggi in coltura (vaccini attenuati), che rendono il virus non più in grado di replicarsi, o dopo

inattivazione tramite agenti chimici o calore (vaccini inattivati). I primi sono molto immunogenici e stimolano una risposta immunitaria simile a quella del virus vivo, mentre i secondi sono meno immunogenici e richiedono somministrazioni multiple. E' evidente che questi tipi di vaccini, che richiedono anche speciali misure di sicurezza per essere prodotti, non sono facilmente proponibili per la pratica clinica nel caso di virus altamente patogeni.

Figura 9

a



b

Platform	Target	Existing, Licensed Human Vaccines Using the Same Platform	Advantages	Disadvantages
RNA vaccines	Spike	No	No infectious virus needs to be handled. Vaccines are typically immunogenic. Rapid production possible.	Safety issues with reactogenicity have been reported.
DNA vaccines	Spike	No	No infectious virus needs to be handled. Easy scale up, low production costs, high heat stability. Tested in humans for SARS-CoV-1, rapid production possible.	Vaccine needs specific delivery devices to reach good immunogenicity.
Recombinant protein vaccines	Spike	Yes for baculovirus (influenza, HPV) and yeast expression (HBV, HPV)	No infectious virus needs to be handled, adjuvants can be used to increase immunogenicity.	Global production capacity might be limited. Antigen and/or epitope integrity needs to be confirmed. Yields need to be high enough.
Viral vector-based vaccines	Spike	Yes for VSV (Ervebo), but not for other viral vectored vaccines	No infectious virus needs to be handled. Excellent preclinical and clinical data for many emerging viruses.	Vector immunity might negatively affect vaccine effectiveness.
LAV	Whole Virion	Yes	Straightforward process used for several licensed human vaccines, existing infrastructure can be used.	Creating infectious clones for attenuated coronavirus vaccine seeds takes time because of large genome size. Safety testing will need to be extensive.
Inactivated vaccines	Whole Virion	Yes	Straightforward process used for several licensed human vaccines, existing infrastructure can be used, has been tested in humans for SARS-CoV-1, adjuvants can be used to increase immunogenicity.	Large amounts of infectious virus need to be handled. Antigen and/or epitope integrity needs to be confirmed.

Figura 9. a) Strategie utilizzate per la realizzazione dei vaccini contro CoV-2. b) La tabella indica le piattaforme utilizzate, con vantaggi e svantaggi per ciascuna. (Tratto da: Amanat & Krammer, *Cell*, 2020).

- Vaccini in sviluppo contro CoV-2

Di seguito, una lista dei vaccini più promettenti in sperimentazione.

- BNT162 (BioNTech, Pfizer, e Fosun Pharma): vaccino ad mRNA disegnato per indurre immunità.
- Vaccino ricombinate basato sul vettore adenovirale tipo 5 (Ad5-nCoV) (CanSino Biologicals). Recentemente, i risultati di un trial clinico "open label", non randomizzato (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04313127) hanno mostrato che tutti i 108 volontari selezionati e ricevuti questo vaccino non hanno avuto effetti collaterali importanti, che sono stati lievi/moderati, e risposte immunitarie sia umorali che cellulo-mediate, con un picco a 28 giorni per la risposta umorale e 14 per quella cellulo-mediata (figura 10)³⁴.
- INO-4800 (Inovio Pharmaceuticals e Beijing Advaccine Biotechnology). Questo è un vaccino a DNA che prevede l'utilizzo di un elettroporatore (CELLECTRA) per il rilascio intradermico (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04336410).
- mRNA-1273 (Moderna). Vaccino ad mRNA, incapsulato in una nanoparticella lipidica, codificante S stabilizzata nella sua forma di pre-fusione. Recentemente, Moderna ha annunciato che dopo 2 dosi testate (25 µg e 100 µg) tutti i partecipanti hanno mostrato sieroconversione dopo 15 giorni dalla prima dose.

Figura 10

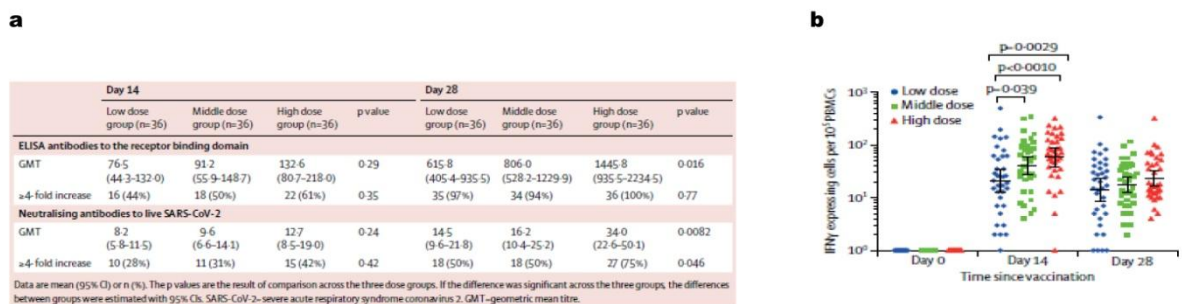


Figura 10. a) Produzione di anticorpi diretti contro il dominio di legame al recettore di S e neutralizzanti, a 14 e 28 giorni, nei tre diversi gruppi di volontari che hanno ricevuto dosi basse, medie o alte di vaccino Ad5-nCoV. b) Pannello superiore. Numero di cellule secernenti interferone γ a 14 e 28 giorni dall'inoculo del vaccino a basse, medie e alte dosi. Pannello inferiore. Percentuale di individui che hanno presentato risposta al vaccino, a 14 e 28 giorni dall'inoculo (Tratto da: *Zhu et al., Lancet, 2020*)

I dati sul titolo degli anticorpi neutralizzanti sono al momento disponibili solo per 4 partecipanti, appartenenti ai gruppi da 25 µg e 100 µg. mRNA-1273 ha stimolato la produzione di anticorpi neutralizzanti in tutti gli 8 partecipanti iniziali, raggiungendo

titoli di anticorpi simili o superiori a quelli osservati nei sieri convalescenti. Inoltre, mRNA-1273 è stato generalmente sicuro e ben tollerato (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04283461 and NCT04405076).

- e. Vaccino di Pittsburgh (PittCoVacc, Università di Pittsburgh). Vaccino contenuto in un cerotto provvisto di 400 microaghi, basato su una sub unità di S ricombinante. I microaghi sono costituiti di proteine e zuccheri, in modo da dissolversi nella pelle. Questo vaccino origina da un vaccino simile prodotto contro MERS-CoV e stimola una risposta umorale antigene-specifica in 2 settimane nei topi³⁵.
- f. ChAdOx1 nCoV-19 (Università di Oxford, Advent e partners). Vaccino basato su un vettore adenovirale di scimpanzé che codifica per la proteina S. ChAdOx1 è derivato dall'isolato adenovirale Y25 ed è stato testato in molti trial clinici e pre-clinici. E' sicuro e induce una risposta umorale e cellulo-mediata robusta. Al momento, un trial clinico è in corso (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04324606) su 900 volontari. La sicurezza e l'efficacia del vaccino sono obiettivi primari di questo studio. La risposta immunitaria verrà valutata come obiettivo secondario³⁶.
- g. Covid-eVax (Takis Biotech e Rottapharm). Questo è un vaccino a DNA, codificante una porzione di S, che richiede l'elettroporazione per la somministrazione intramuscolo. Non ci sono, ancora, risultati pubblicati sulla sperimentazione. Tuttavia, Takis Biotech ha annunciato risultati promettenti in modelli murini in termini di immunogenicità e sicurezza e il passaggio ai test sull'uomo in autunno.
- h. Tre trial clinici che fanno uso di vaccini inattivati sono in corso (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04383574; NCT04352608; NCT04412538). Risultati recenti nelle scimmie, dopo 3 immunizzazioni a 2 dosi del vaccino inattivato (piCoVacc), hanno mostrato protezione contro l'infezione da SARS-CoV-2 e la produzione di anticorpi neutralizzanti anche in modelli murini e di ratto³⁷.

Conclusioni

Probabilmente, assisteremo all'eliminazione di CoV-2 solo con la produzione di un vaccino efficace e sicuro, prodotto in larga scala. Tuttavia, il miglioramento delle terapie e, soprattutto, l'adozione di misure di contenimento, hanno fatto diminuire il numero dei contagi e delle morti, almeno in alcuni Paesi. Inoltre, bisogna di nuovo sottolineare che, senza lo sforzo straordinario e la cooperazione tra ricercatori, medici e industrie gli attuali avanzamenti in termini di terapie e vaccini disponibili non sarebbero stati possibili.

Sebbene siamo ancora lontani dal risolvere definitivamente il problema, ora abbiamo più strumenti per affrontare la Covid-19 e sconfiggere CoV-2.

Referenze

- 1 Panigada, M. *et al.* Hypercoagulability of COVID-19 patients in intensive care unit: A report of thromboelastography findings and other parameters of hemostasis. *J Thromb Haemost* **18**, 1738-1742, doi:10.1111/jth.14850 (2020).
- 2 Zhou, F. *et al.* Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet* **395**, 1054-1062, doi:10.1016/S0140-6736(20)30566-3 (2020).
- 3 Tikellis, C. & Thomas, M. C. Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) Is a Key Modulator of the Renin Angiotensin System in Health and Disease. *Int J Pept* **2012**, 256294, doi:10.1155/2012/256294 (2012).
- 4 Taylor, F. B., Jr. *et al.* Towards definition, clinical and laboratory criteria, and a scoring system for disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost* **86**, 1327-1330 (2001).
- 5 Tang, N. *et al.* Anticoagulant treatment is associated with decreased mortality in severe coronavirus disease 2019 patients with coagulopathy. *J Thromb Haemost* **18**, 1094-1099, doi:10.1111/jth.14817 (2020).
- 6 Klok, F. A. *et al.* Incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19. *Thromb Res* **191**, 145-147, doi:10.1016/j.thromres.2020.04.013 (2020).
- 7 Watanabe, T., Barker, T. A. & Berk, B. C. Angiotensin II and the endothelium: diverse signals and effects. *Hypertension* **45**, 163-169, doi:10.1161/01.HYP.0000153321.13792.b9 (2005).
- 8 Giardini, V. *et al.* Increased sFLT-1/PIGF ratio in COVID-19: A novel link to angiotensin II-mediated endothelial dysfunction. *Am J Hematol* **95**, E188-E191, doi:10.1002/ajh.25882 (2020).
- 9 Wang, D. *et al.* Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA*, doi:10.1001/jama.2020.1585 (2020).

- 10 Hu, H., Ma, F., Wei, X. & Fang, Y. Coronavirus fulminant myocarditis saved with glucocorticoid and human immunoglobulin. *Eur Heart J*, doi:10.1093/eurheartj/ehaa190 (2020).
- 11 Zeng, J. H. *et al.* First case of COVID-19 complicated with fulminant myocarditis: a case report and insights. *Infection*, doi:10.1007/s15010-020-01424-5 (2020).
- 12 Myers, J. M. *et al.* Cardiac myosin-Th17 responses promote heart failure in human myocarditis. *JCI Insight* **1**, doi:10.1172/jci.insight.85851 (2016).
- 13 Ferrario, C. M. *et al.* Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II receptor blockers on cardiac angiotensin-converting enzyme 2. *Circulation* **111**, 2605-2610, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.510461 (2005).
- 14 Danser, A. H. J., Epstein, M. & Batlle, D. Renin-Angiotensin System Blockers and the COVID-19 Pandemic: At Present There Is No Evidence to Abandon Renin-Angiotensin System Blockers. *Hypertension* **75**, 1382-1385, doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.15082 (2020).
- 15 Kreutz, R. *et al.* Hypertension, the renin-angiotensin system, and the risk of lower respiratory tract infections and lung injury: implications for COVID-19. *Cardiovasc Res*, doi:10.1093/cvr/cvaa097 (2020).
- 16 Chen, D. *et al.* Assessment of Hypokalemia and Clinical Characteristics in Patients With Coronavirus Disease 2019 in Wenzhou, China. *JAMA Netw Open* **3**, e2011122, doi:10.1001/jamanetworkopen.2020.11122 (2020).
- 17 Youn, J. C. *et al.* Immunosenescent CD8⁺ T cells and C-X-C chemokine receptor type 3 chemokines are increased in human hypertension. *Hypertension* **62**, 126-133, doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.00689 (2013).
- 18 Monteil, V. *et al.* Inhibition of SARS-CoV-2 Infections in Engineered Human Tissues Using Clinical-Grade Soluble Human ACE2. *Cell* **181**, 905-913 e907, doi:10.1016/j.cell.2020.04.004 (2020).
- 19 Wang, C. *et al.* A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection. *Nat Commun* **11**, 2251, doi:10.1038/s41467-020-16256-y (2020).
- 20 Pinto, D. *et al.* Cross-neutralization of SARS-CoV-2 by a human monoclonal SARS-CoV antibody. *Nature*, doi:10.1038/s41586-020-2349-y (2020).
- 21 Shi, R. *et al.* A human neutralizing antibody targets the receptor binding site of SARS-CoV-2. *Nature*, doi:10.1038/s41586-020-2381-y (2020).
- 22 Ju, B. *et al.* Human neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection. *Nature*, doi:10.1038/s41586-020-2380-z (2020).

- 23 Bloch, E. M. *et al.* Deployment of convalescent plasma for the prevention and treatment of COVID-19. *J Clin Invest* **130**, 2757-2765, doi:10.1172/JCI138745 (2020).
- 24 Shen, C. *et al.* Treatment of 5 Critically Ill Patients With COVID-19 With Convalescent Plasma. *JAMA*, doi:10.1001/jama.2020.4783 (2020).
- 25 Duan, K. *et al.* Effectiveness of convalescent plasma therapy in severe COVID-19 patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* **117**, 9490-9496, doi:10.1073/pnas.2004168117 (2020).
- 26 Li, L. *et al.* Effect of Convalescent Plasma Therapy on Time to Clinical Improvement in Patients With Severe and Life-threatening COVID-19: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*, doi:10.1001/jama.2020.10044 (2020).
- 27 Robbiani, D. F. *et al.* Convergent antibody responses to SARS-CoV-2 in convalescent individuals. *Nature*, doi:10.1038/s41586-020-2456-9 (2020).
- 28 Golchin, A., Seyedjafari, E. & Ardeshtyrlajimi, A. Mesenchymal Stem Cell Therapy for COVID-19: Present or Future. *Stem Cell Rev Rep* **16**, 427-433, doi:10.1007/s12015-020-09973-w (2020).
- 29 Golchin, A., Farahany, T. Z., Khojasteh, A., Soleimanifar, F. & Ardeshtyrlajimi, A. The Clinical Trials of Mesenchymal Stem Cell Therapy in Skin Diseases: An Update and Concise Review. *Curr Stem Cell Res Ther* **14**, 22-33, doi:10.2174/1574888X13666180913123424 (2019).
- 30 Weiss, A. R. R. & Dahlke, M. H. Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells (MSCs): Mechanisms of Action of Living, Apoptotic, and Dead MSCs. *Front Immunol* **10**, 1191, doi:10.3389/fimmu.2019.01191 (2019).
- 31 Leng, Z. *et al.* Transplantation of ACE2(-) Mesenchymal Stem Cells Improves the Outcome of Patients with COVID-19 Pneumonia. *Aging Dis* **11**, 216-228, doi:10.14336/AD.2020.0228 (2020).
- 32 Singh, S. *et al.* Allogeneic cardiosphere-derived cells (CAP-1002) in critically ill COVID-19 patients: compassionate-use case series. *Basic Res Cardiol* **115**, 36, doi:10.1007/s00395-020-0795-1 (2020).
- 33 Amanat, F. & Krammer, F. SARS-CoV-2 Vaccines: Status Report. *Immunity* **52**, 583-589, doi:10.1016/j.immuni.2020.03.007 (2020).
- 34 Zhu, F. C. *et al.* Safety, tolerability, and immunogenicity of a recombinant adenovirus type-5 vectored COVID-19 vaccine: a dose-escalation, open-label, non-

randomised, first-in-human trial. *Lancet* **395**, 1845-1854, doi:10.1016/S0140-6736(20)31208-3 (2020).

- 35 Kim, E. *et al.* Microneedle array delivered recombinant coronavirus vaccines: Immunogenicity and rapid translational development. *EBioMedicine* **55**, 102743, doi:10.1016/j.ebiom.2020.102743 (2020).
- 36 Sharpe, H. R. *et al.* The early landscape of COVID-19 vaccine development in the UK and rest of the world. *Immunology*, doi:10.1111/imm.13222 (2020).
- 37 Gao, Q. *et al.* Rapid development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2. *Science*, doi:10.1126/science.abc1932 (2020).