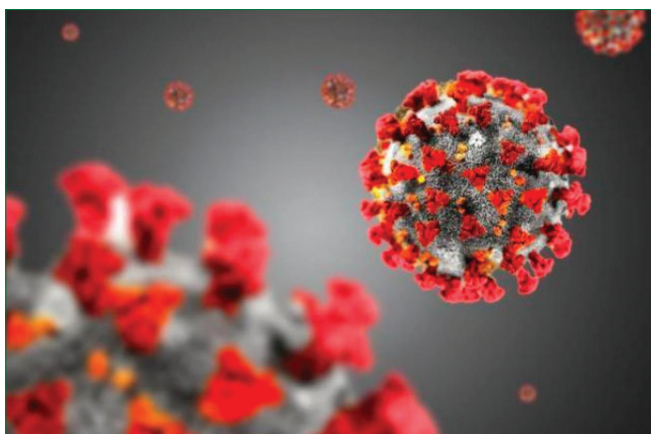




## PRESENTE E FUTURO DELLE TERAPIE ANTI COVID-19

*In questo articolo sono riassunti gli approcci terapeutici potenzialmente utili per la prevenzione e per la terapia eziologica del COVID-19. Sono brevemente descritti sia le modalità terapeutiche contro il virus SARS-COV-2 che sono già in fase di sviluppo pre-clinico o clinico e sia le direzioni future della ricerca per sviluppare farmaci efficaci non solo contro COVID-19 ma anche contro possibili zoonosi future causate da altri membri della famiglia dei coronavirus.*



### Introduzione

La pandemia causata dal virus SARS-COV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome-CORonavirus-2), agente che causa la malattia chiamata COVID-19 (Corona Virus Disease-19) è indubbiamente un'emergenza mondiale. A circa un anno dai primi casi segnalati nel novembre del 2019 nella provincia di Wuhan in Cina, la malattia si è diffusa in 219 nazioni: in data 6 novembre 2020 sono stati confermati nel mondo 48.534.779 casi e 1.231.017 morti [1]. Questi numeri sono in continuo aumento ed è quindi evidente che c'è l'assoluta necessità di individuare terapie farmacologiche efficaci contro questo virus.

I coronavirus (CoV) sono un'ampia famiglia di virus, comuni in molte specie animali (come i pipistrelli) che, in alcuni casi, possono evolversi e infettare l'uomo (fenomeno di "spillover") per poi diffondersi nella

popolazione. I coronavirus umani identificati fino ad oggi sono 7: tutti hanno avuto origine in animali e tutti causano malattie respiratorie, da lievi a molto gravi, come nel caso delle sindromi respiratorie epidemiche chiamate SARS, causata dal virus SARS-CoV e segnalata per la prima volta nel 2003, MERS, causata dal virus MERS-CoV ed emersa per la prima volta nel 2012, e come nel caso di COVID-19 [2].

In questo articolo non entrerà nei dettagli della biologia del virus, delle sue modalità di trasmissione, dei meccanismi patogenetici della malattia e non descriverò le varie forme di terapia farmacologica che sono utilizzate od in via di sperimentazione per il trattamento dei sintomi della malattia COVID-19. Mi concentrerò su quelle che sono le possibilità di sviluppare terapie dirette contro il virus stesso.

Prima però di parlare degli approcci terapeutici contro il COVID-19 è necessario ricordare molto brevemente come è fatto il virus. Il virus SARS-CoV-2 è un virus sferico il cui genoma è un RNA lineare di lunghezza pari a 29,9 Kbase circa. Possiede sedici proteine non strutturali (nsp1-16), molte con attività enzimatica, che svolgono attività fondamentali per la replicazione del virus stesso, e quattro proteine strutturali che sono importanti per l'assemblaggio del virus: queste sono la glicoproteina S (Spike), la proteina M, la proteina E e la proteina N [2].

La glicoproteina S è la proteina utilizzata dal virus per legare i recettori sulle cellule bersaglio ed infettarle introducendo il proprio genoma all'interno della

cellula stessa. Il nome *coronavirus* deriva proprio dal fatto che tante copie della proteina S sporgono dalla superficie del virus come una corona. Si può dire che sia la proteina S a determinare il fatto che il virus SARS-COV-2 induca prevalentemente una malattia respiratoria: infatti, la proteina S si lega al recettore angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) espresso nell'uomo sulla superficie delle cellule di diversi organi, quali il cuore, l'intestino e i reni ma, in particolare, sulla superficie delle cellule epiteliali alveolari di tipo II presenti nei polmoni. Dopo aver legato il recettore ACE-2, un dominio della proteina S subisce un cambiamento conformazionale che favorisce la fusione tra la membrana cellulare ed il virus, che in questo modo riesce a rilasciare il proprio genoma all'interno della cellula per poi replicarsi [2].

## Approcci terapeutici

Si possono identificare due classi maggiori di farmaci diretti contro proteine di SARS-COV-2: farmaci diretti contro le proteine strutturali e farmaci diretti contro le proteine non strutturali. Come indicato in Tab. 1, in linea di principio le proteine strutturali sono più facilmente aggredibili con farmaci di tipo biologico, mentre le attività delle proteine non strutturali possono essere più facilmente inibite mediante piccole molecole.

Tra le proteine strutturali, la proteina Spike è il bersaglio di elezione per sviluppare farmaci in grado di inibire l'interazione tra Spike ed ACE-2 e quindi impedire al virus di infettare le cellule umane. Oltre ad essere un bersaglio ottimale, è anche un bersaglio contro il quale è relativamente semplice generare agenti terapeutici di tipo biologico la cui efficacia possa essere poi valutata in adeguati modelli pre-clinici. Risultati ottenuti in passato in studi preclinici con

i virus SARS-CoV e MERS-CoV avevano confermato che anticorpi che legano Spike sono in grado di neutralizzare il virus impedendone l'interazione con le cellule ed un vaccino diretto contro Spike di MERS-CoV aveva raggiunto la fase 2 di sviluppo clinico. In conseguenza di tutto ciò, Spike è diventato sin dal primo momento il bersaglio dei principali approcci terapeutici contro il COVID-19 sviluppati nel corso del 2020: vaccini ed anticorpi monoclonali.

In data 6 novembre 2020, ci sono circa più di 150 candidati vaccini contro SARS-CoV-2 in fase di sviluppo clinico o pre-clinico (vedi anche Tab. 2), come si può constatare consultando il documento di lavoro messo a punto dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (World Health Organization) [3].

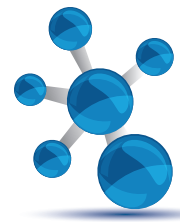
Le varie piattaforme tecnologiche si possono dividere in tre grandi categorie: piattaforme tradizionali (vaccini inattivati o attenuati), piattaforme più moderne che sono già state utilizzate per produrre vaccini che hanno raggiunto la commercializzazione (vettori virali, proteine ricombinanti) e piattaforme che fino ad ora non sono mai state utilizzate per produrre vaccini approvati e commercializzati (vaccini a DNA ed a RNA). Nella Tab. 2 sono indicati i vari tipi di piattaforme tecnologiche utilizzate per generare vaccini contro SARS-CoV-2.

All'interno di ogni tipo di piattaforma esistono diverse variazioni sul tema, tutte ampiamente descritte in letteratura [4]. Non è facile prevedere con esattezza la qualità e la durata della risposta immunitaria stimolata dai vari vaccini nell'uomo. Nonostante siano stati pubblicati i risultati delle sperimentazioni pre-cliniche e nonostante siano già stati riportati i risultati di vari studi di fase 1 non è ovvio confrontare tra di loro i risultati ottenuti e riportati con i differenti vaccini, in quanto sono stati ottenuti nei vari studi utilizzando

saggi, procedure e metodologie sperimentali diverse e a tempi diversi. Possiamo però dire che sebbene molto resti ancora da capire riguardo la risposta immunitaria al virus ed ai suoi vaccini, i dati disponibili suggeriscono che un vaccino anti-SARS-CoV-2

Classe di proteine		Modalità terapeutica e stadio di avanzamento			
		Vaccini	Anticorpi monoclonali	Peptidi	Piccole molecole
Proteine strutturali	Spike	Sperimentazione clinica	Sperimentazione clinica/approvazione	Studi preclinici	-
Proteine non strutturali	Proteasi: Mpro (3CLpro)	-	-	-	Studi preclinici
	Proteasi: PLpro	-	-	-	Studi preclinici
	Polimerasi: RdRp	-	-	-	Studi preclinici

Tab. 1 - Proteine di SARS-CoV-2 che sono promettenti bersagli per una terapia anti- COVID-19



Piattaforma	Categorie	Preclinica	Fase 1	Fase 2	Fase 3	Approvati
Piattaforme "Tradizionali"	Vaccini inattivati	9	1	3	3	-
	Vaccini vivi attenuati	3	1	-	-	-
Proteine Ricombinanti	Proteina Spike (intera, sub-domini)	42+6	1+1	-	1	-
	Particelle Virus-simili	13	1	1	-	-
Vettori Virali	Vettori incapaci di replicazione	16	4	-	4	2*
	Vettori capaci di replicazione	19	2	-	-	-
	Vettori inattivati	3	-	-	-	-
Acidi Nucleici	Vaccini a DNA	12	4	-	-	-
	Vaccini a RNA	17	4	1	2	-
Totale	-	140	18	5	10	2

\*Un vaccino approvato in Cina e destinato esclusivamente ai militari; un vaccino approvato in Russia prima della fase 3 di sviluppo clinico

Tab. 2 - Piattaforme tecnologiche utilizzate per sviluppare vaccini anti SARS-CoV2

per essere efficace debba essere in grado di indurre una robusta risposta anticorpale contro Spike (linfociti B), una risposta cellulare (Linfociti T) ed anche una memoria immunologica (sia B che T). È da notare che tutti i vaccini in fase avanzata di sviluppo vengono somministrati per via intramuscolare e stimolano una risposta anticorpale di tipo IgG a livello delle basse vie respiratore (polmoni), ma sono allo studio anche formulazioni per una somministrazione intra-nasale

allo scopo di stimolare una risposta anticorpale di tipo IgA anche a livello delle vie aeree superiori (laringe e trachea) [4].

Diversi vaccini sono nella fase 3 della sperimentazione clinica ed è possibile, in presenza di risultati positivi, che per alcuni di questi possa essere richiesta e ottenuta la registrazione da parte delle autorità regolatorie, la FDA in USA e l'EMA in Europa, almeno per un uso "in emergenza", entro la fine del 2020 o l'inizio del 2021, cioè a poco più di un anno dalla segnalazione dei primi casi di COVID-19 in Cina e a meno di un anno dalla decisione da parte dell'OMS di classificare la diffusione dei casi di COVID-19 come una pandemia [4].

Come indicato nella Fig. 1, è stato possibile procedere così velocemente grazie a diversi fattori: innanzi tutto i lavori pre-clinici fatti in precedenza con i virus SARS-CoV e MERS hanno permesso di ridurre al minimo sia la fase di ricerca iniziale volta al disegno

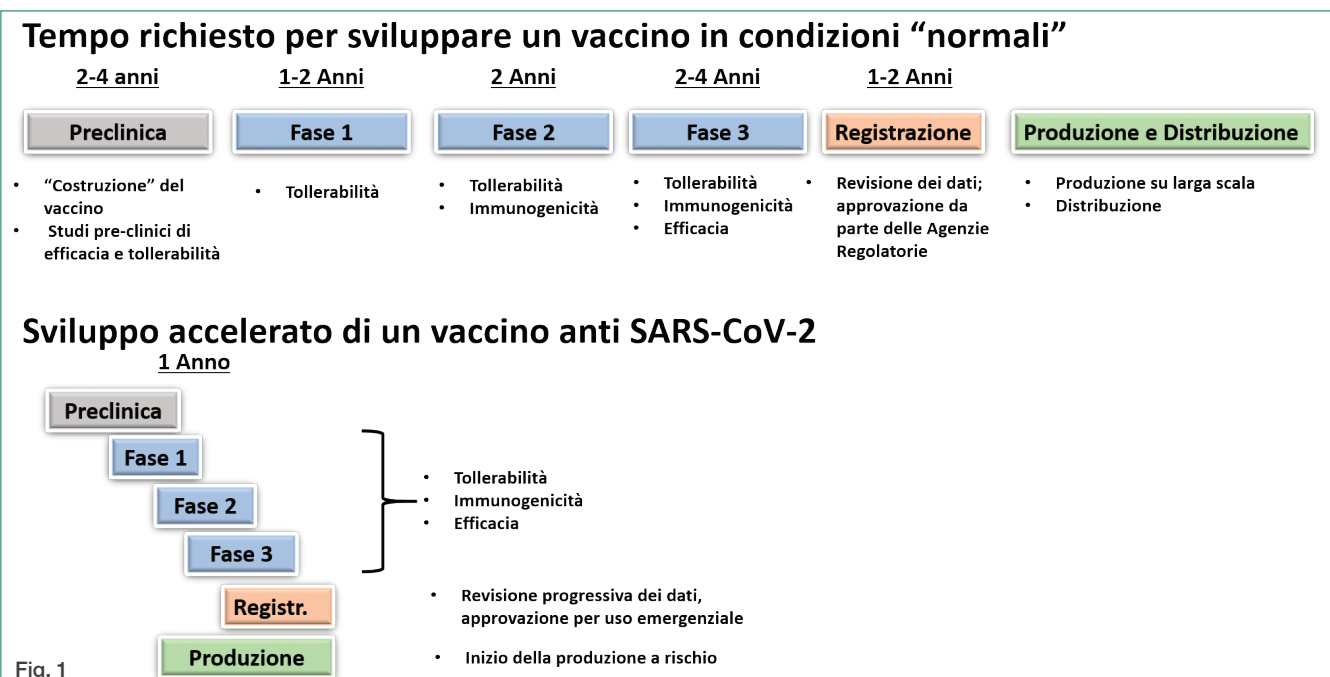


Fig. 1

ottimale dei vaccini sia, in molti casi, la fase dedicata allo studio della tossicologia in modelli pre-clinici. Inoltre, protocolli di sperimentazione clinica sono stati ottimizzati in maniera da avere una rapidissima progressione dalla fase 1 alla fase 2 e 3 che si sono in pratica sovrapposte l'una all'altra. Allo stesso tempo le agenzie regolatorie hanno accelerato i tempi normalmente necessari per analizzare le documentazioni richieste per iniziare e proseguire la sperimentazione clinica di un vaccino. Infine, per tutti i vaccini in fase avanzata di sperimentazione clinica le fasi iniziali per una possibile produzione commerciale sono già state messe in atto "a rischio" non solo in assenza della registrazione/approvazione del vaccino ma addirittura in assenza dei risultati di fase 3.

Ovviamente anche in caso di approvazione di uno o più vaccini resta da risolvere la sfida di produrre e distribuire in un tempo ragionevole un numero di dosi sufficienti per coprire la domanda a livello mondiale: è il caso di dire che tempi eccezionali hanno richiesto, richiedono e richiederanno risposte ancora più eccezionali.

Se i vaccini contro la proteina Spike rappresentano il caposaldo per il contenimento di una pandemia, l'utilizzo di anticorpi neutralizzanti contro il virus rappresenta un'interessante opportunità terapeutica da considerare complementare e non alternativa al vaccino. Non mi soffermo sull'analisi dei pro e dei contro sull'utilizzo terapeutico della trasfusione del plasma di pazienti che sono guariti da COVID-19, plasma quindi contenente anticorpi neutralizzanti contro SARS-CoV-2 (cosiddetto plasma iperimmune) in pazienti che sono stati infettati da poco o pazienti a rischio di infettarsi: rimando il lettore a quanto pubblicato sull'argomento [5].

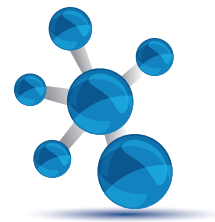
Va invece sottolineato come le moderne tecnologie permettano di isolare abbastanza facilmente i più potenti tra gli anticorpi neutralizzanti Spike presenti nel siero di pazienti convalescenti. Una volta isolati, questi anticorpi monoclonali possono essere prodotti in larga scala ed utilizzati in terapia sia singolarmente o in una formulazione "cocktail" che contenga più anticorpi, diretti contro porzioni diverse della proteina Spike, per aumentare l'attività neutralizzante.

La protezione indotta da anticorpi è per definizione di breve durata (qualche mese) ma un loro uso profilattico per proteggere le categorie più a rischio di infezione è un'interessante possibilità. Per quanto riguarda l'uso di anticorpi anti SARS-Cov-2 come

agenti terapeutici, alcuni sono in fase avanzata ed uno (bamlanivimab, LY-CoV555, Eli Lilly) è stato approvato dalla FDA per uso "in emergenza". È ancora troppo presto per trarre conclusioni precise su quello che sarà il ruolo degli anticorpi monoclonali nella terapia di COVID-19: i primi risultati sembrano suggerire che per essere efficaci gli anticorpi debbano essere somministrati nelle fasi iniziali della malattia [6]. Un'altra strada potenzialmente interessante è rappresentata dallo sviluppo di peptidi che possano legarsi ad alta affinità con la proteina Spike inibendo o la sua capacità di interagire con il recettore ACE-2 o la sua capacità di assumere quella particolare conformazione che, come descritto in precedenza, induce la fusione tra la membrana cellulare ed il virus. È stato infatti dimostrato che peptidi corrispondenti al dominio altamente conservato HR (Heptad Repeat) che si trova nella parte C-terminale della proteina Spike possono legarsi alla proteina stessa e prevenirne il cambiamento conformazionale, inibendo la fusione e quindi l'infezione stessa. Peptidi di questo tipo agirebbero come inibitori dell'infezione e potrebbero essere somministrati per via nasale a scopo profilattico o, se somministrati nelle primissime fasi dell'infezione, anche con finalità terapeutiche [7].

Considerando gli enormi progressi che sono stati fatti nel campo di sintesi chimica, ottimizzazione, stabilizzazione e formulazione dei peptidi si può anche immaginare che peptidi anti-COVID-19 possano essere somministrati per via sistemica (iniezione intramuscolare o sottocutanea).

Terapie farmacologiche con piccole molecole contro il COVID-19 non sono ancora state sviluppate. Sebbene sia concepibile generare piccole molecole o contro le proteine strutturali (ad esempio inibitori dell'oligomerizzazione delle proteine E o M), o contro le proteine cellulari che favoriscono il ciclo vitale del virus all'interno della cellula (quali inibitori del processo di endocitosi o del processo di rilascio del virus dalla cellula infettata), anni di esperienza precedente con altre malattie virali (HIV, HCV ed altre) ci dimostrano che i bersagli più attraenti per piccole molecole sono le proteine non strutturali provviste di attività enzimatica. Ottimi bersagli sono certamente la proteasi maggiore simil-chimotripsina (MPro, 3CL-pro), la proteasi papaina-simile (PLpro) e la polimerasi RNA-dipendente Nsp12. In particolare, inibitori di MPro impedirebbero il processamento della Replicasi1ab che è un enzima essenziale per la replicazione



virale. Non sorprendentemente, inibitori più o meno selettivi sono già stati riportati in letteratura, anche se si tratta di programmi allo stadio iniziale di sviluppo pre-clinico. La struttura della polimerasi NSp12 è stata recentemente risolta mediante microscopia crioelettronica: sebbene questo non sia una garanzia di successo, si può dire che rappresenta certamente un primo passo importante verso la scoperta di inibitori selettivi di NSp12 [8].

### Conclusioni

Il COVID-19 rappresenta una sfida per tutta la comunità scientifica, vista la necessità di individuare in poco tempo soluzioni terapeutiche soddisfacenti per il breve ma anche per il lungo termine. Come IRBM abbiamo affrontato a questa sfida lavorando su diversi fronti.

Prima di tutto ci siamo concentrati sullo sviluppo di un vaccino: come conseguenza della nostra decennale collaborazione con lo Jenner Institute dell'Università di Oxford (Regno Unito) siamo impegnati sin dall'inizio nella caratterizzazione e produzione del vaccino chiamato adesso AZD1222 (ChAdOx1n-Cov-19). Questo vaccino si basa sulla tecnologia dei vettori virali incapaci di replicazione e attualmente è in una fase 3 molto avanzata di sviluppo clinico sotto la guida dell'AstraZeneca. Lo sviluppo di uno o, possibilmente, più vaccini contro SARS-CoV-2 rappresenta l'elemento imprescindibile per tenere sotto controllo la pandemia attuale ed è quindi senza esitazione e anche con un certo orgoglio che abbiamo dato il nostro contributo a questo sforzo, letteralmente immane, guidato da AstraZeneca.

Abbiamo però anche deciso di investire in altre forme di terapie, quali peptidi e piccole molecole, con un occhio rivolto al presente ed un altro al futuro. Ad esempio, lavoriamo in collaborazione con una multinazionale farmaceutica per sviluppare peptidi anti-COVID-19 non solo perché riteniamo di essere all'avanguardia nel campo dello sviluppo di peptidi terapeutici ma perché siamo convinti che ci sia moltissimo da imparare lavorando in quest'area e che quello che si può apprendere adesso potrebbe tornare utile nel caso di zoonosi causate da coronavirus in futuro. Si ritiene, infatti, probabile che negli anni futuri altre epidemie, se non pandemie, potrebbero essere causate dal salto di specie di un coronavirus dagli animali all'uomo. Se è vero che il vaccino sarebbe in ogni caso la terapia di elezione per ogni nuovo tipo di coronavi-

rus, sarebbe importante avere a disposizione terapie efficaci contro qualunque tipo di nuovo coronavirus: terapie che possano essere utilizzate già all'inizio di un eventuale epidemia sia per curare i pazienti e sia per contenere l'epidemia stessa, in attesa di un eventuale vaccino specifico per il nuovo coronavirus. È ragionevole pensare che, grazie ad uno studio accurato della biologia e del ciclo vitale dei coronavirus, delle sequenze dei coronavirus umani e non, della struttura delle loro proteine e in seguito ad un'accurata e ben ponderata selezione dei target molecolari, sia possibile sviluppare farmaci ad ampio spettro, dei veri e propri inibitori pan-coronavirus, diretti non solo verso tutti i più rilevanti coronavirus umani fin qui conosciuti ma anche verso quelli "predicibili". Certamente non si tratta di un compito facile ma altrettanto certamente non è impossibile.

### BIBLIOGRAFIA

- [1] <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>
- [2] P. V'Koski *et al.*, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2020, **28**, 1.
- [3] <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>
- [4] M. Jeyanathan *et al.*, *Nat. Rev. Immunol.*, 2020, **20**, 615.
- [5] J. Casadevall, L.-A. Pirofski, *J. Clin. Investig.*, 2020, **130**, 1545.
- [6] <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/coronavirus-covid-19-update-fda-authorizes-monoclonal-antibody-treatment-covid-19>
- [7] S. VanPatten *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2020, **12**, 1647.
- [8] V. Tiwari *et al.*, *Drug. Discov. Today*, 2020, **25**, 1359.

### Present and Future of Covid-19 Therapies

This article summarizes the potentially useful therapeutic approaches for the prevention and etiological therapy of COVID-19. The therapeutic modalities against the SARS-COV-2 virus that are already in the pre-clinical or clinical development phase are presented. The future directions of research to develop drugs effective not only against COVID-19 but also against possible future zoonoses caused by other members of the coronavirus family are briefly described.