I NUOVI SCENARI PANDEMICI

Le varianti di preoccupazione di Sars-CoV-2 sfidano la strategia vaccinale, i test diagnostici, le terapie farmacologiche basate su monoclonali e i modelli epidemiologici

INTRODUZIONE

Come già rappresentato in uno dei primi approfondimenti su Covid 19/Sars-CoV-2 su questo sito, la circolazione intensa di più ceppi o "clades" di coronavirus all'interno della stessa classe ad esempio nel nostro caso beta-Coronavirus-Sarbecovirus può determinare episodi di co-infezione nello stesso ospite e generare varianti. Le mutazioni caratteristiche di queste varianti, difficilmente si spiegano solo con la naturale deriva genomica e antigenica di questo tipo di virus a singolo RNA che si replicano per DNA polimerasi RNA-dipendente, con un errore ogni 40.000 basi. In tale contesto, era stato portato l'esempio dell'agente della Laringotracheite infettiva nei polli e la ricombinazione tra virus di campo e virus vaccinale attenuato, osservato dall'Università di Padova negli allevamenti intensivi.

Non a caso, le ultime varianti di preoccupazione UK, Sud africana e Brasiliana sono "emerse" in contesti di forte circolazione virale, anche per una non tempestiva adozione di misure di contenimento stringenti non farmacologiche. All'orizzonte ci sono poi due nuove varianti, ancora da caratterizzare per contagiosità e patogenicità: una sud californiana e una ugandese/nigeriana. Da non sottovalutare poi una variante lombarda, limitata ad un cluster ospedaliero, ma dotata sicuramente di maggiore patogenicità, in un modo analogo alla peritonite infettiva felina da coronavirus.

Sulla base delle informazioni recenti disponibili, cerchiamo qui di fornire un quadro riassuntivo e "ad interim" sul significato delle mutazioni osservate nelle principali varianti di preoccupazione, nel contesto delle risorse vaccinali attualmente disponibili, della necessità/opportunità di riprogrammare alcuni vaccini, comprese le relative strategie vaccinali e delle sfide poste ai sistemi diagnostici "in vitro" e clinici.

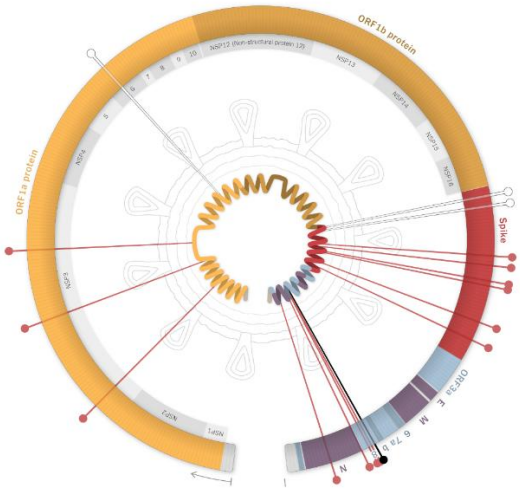
Per la sanità pubblica veterinaria, la plasticità dei coronavirus non è una novità. A ragione veduta, le "sorprese" che riserva l'attuale pandemia per l'opinione pubblica, sono per i veterinari fondamentalmente degli eventi attesi, in un contesto di evoluzione ecologica in corso di pandemia.

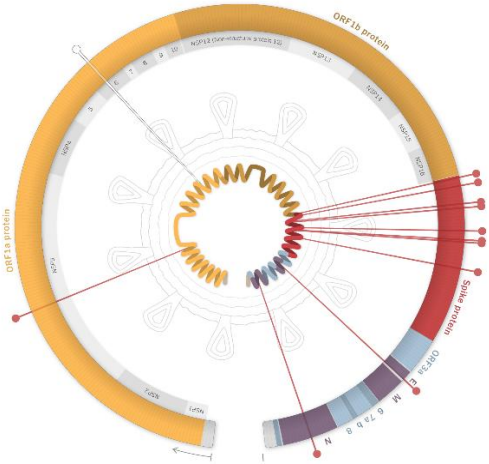
IL GENOMA DI SARS-COV-2 E LE VARIANTI DI PREOCCUPAZIONE

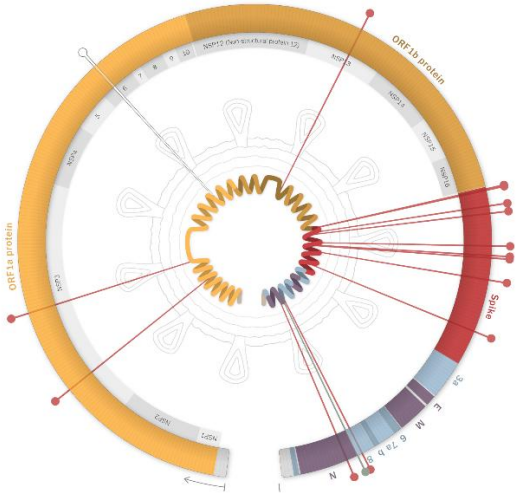
Il sito del New York Times *https://www.nytimes.com/interactive/2021/health/coronavirus-variant-tracker.html* fornisce le informazioni aggiornate sulle nuove varianti di preoccupazione *(in Inglese variants of concern – VOC)*, con l'indicazione puntuale delle mutazioni multiple osservate nel genoma virale, mutazioni multiple per sostituzione di aminoacidi o per delezione/troncatura di sequenze che portano appunto alla definizione di variante. Le mutazioni genomiche sulla sintesi della proteina S, sono indirizzate su due obiettivi: aumentare l'affinità della porzione RBD della proteina Spike virale sul recettore ACE2 cellulare umano e quindi conferire una maggiore infettività ed eludere la pressione di anticorpi siero-neutralizzanti che agiscono in modo diretto o allosterico sul legame RBD-ACE2.
Le mutazioni (al momento meno frequenti) che riguardano la sintesi del nucleocapside N, possono avere effetti sull'immunità (ricordiamo che la proteina N risulta il target principale di sieri immuni da pazienti Covid), soprattutto se le modifiche non riguardano la parte N terminale. Inoltre si possono avere effetti sulla sensibilità dei saggi antigenici, per lo più indirizzati a verificare la presenza di tale proteina nei tamponi. Ad esempio, recenti studi sudafricani, sebbene sotto forma di preprints, segnalano una perdita di sensibilità diagnostica dall'80% al 60% in individui asintomatici, di uno tra i migliori test antigenici rapidi commercializzati sulla variante Sud Africana. Da ultimo, una sequenza stop Codon sul gene ORF6, produce

una proteina ad elevata attività pro-infiammatoria che può aggravare il quadro clinico, in quanto sinergica con il meccanismo di tempesta citochimica.

Nelle tre figure, tratte dal sito del New York Times sopra citato, sono illustrate le principali mutazioni rilevate nel genoma dall'alto in baso, della variante UK, Sud-Africana, e Amazzonica-Brasiliana.







Altre varianti emergenti, con preliminari riscontri epidemiologici di maggiore incidenza, riguardano la California del Sud e l'Uganda. Le varianti Milanese e quella Nigeriana sono per lo più legate a singoli individui o a cluster assai limitati. Tutte queste ultime varianti devono essere ancora studiate per il loro impatto sull'infettività, sulla clinica e sulla diagnostica.

La particolarità di struttura della proteina S, risultato dell'assemblamento di tre unità simili, porta alla conseguenza che una mutazione non conservativa puntiforme si ripercuota in tre punti differenti della proteina assemblata, determinando cambi conformazionali più estesi.

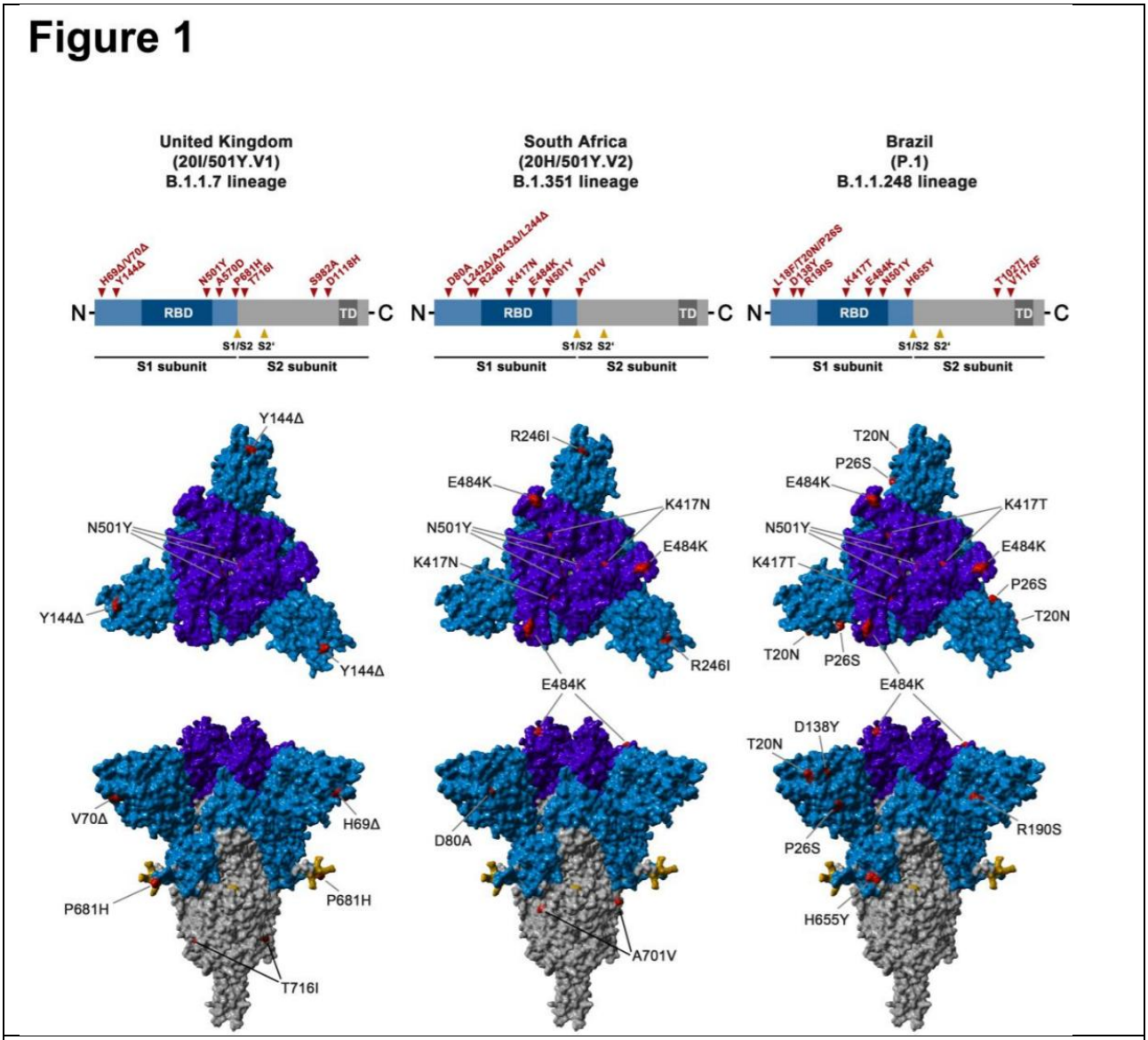


Figura 2. Schematizzazione della localizzazione delle mutazioni sulla proteina Spike (S) nelle principali varianti di preoccupazione (VOC). Nella parte superiore sono indicate le posizioni, nell'ambito della organizzazione del genoma, della regione S. RBD = receptor binding domain e TD = transmembrane domain. Nella parte inferiore, è indicata la localizzazione delle mutazioni nella struttura tridimesionale nella porzione della Spike protein a struttura trimerica, responsabile dell'aggancio con il recettore ACE2 cellulare e internalizzazione del virus. In azzurro la porzione S1, evidenziato in blu il Receptor Binding Domain, in grigio la porzione S2 e in giallo le porzioni dove le proteasi, attraverso il clivaggio delle porzioni S1/S2, attivano l'entrata del virus. In rosso sono evidenziati i residui aminoacidici mutati.

IMPATTO SUI TEST ANTIGENICI RAPIDI PIÙ PERFORMANTI

I test antigenici rapidi più performanti, con sensibilità superiori all'80% negli individui asintomatici e quindi compatibili con tassi di infezione nella popolazione superiori all'1%, non dovrebbero essere influenzati dalle mutazioni sulla porzione S, in quanto riconoscono nella proteina N il loro target diagnostico. L'efficienza del saggio antigenico rapido è stata verificata per la variante inglese, in quanto la mutazione osservata nella sequenza della proteina N del nucleo capside, non coinvolge il terminale carbossilico su cui gli anticorpi diagnostici sono indirizzati. Per la variante sudafricana, un preliminare pre-print descrive una sensibilità che passa dall'80 al 60% del test Abbott su soggetti asintomatici; similmente si ritiene che anche per la variante Sudamericana, non ci possa essere un crollo di sensibilità dei test antigenici. Piuttosto va riconsiderato se sia opportuno, per varianti a presumibile maggiore contagiosità (dal 25 al 50% rispetto al ceppo classico) e con mutazioni vicino al terminale carbossilico della proteina N, condurre tali saggi su individui asintomatici senza una storia di contatto stretto. Questo perché i casi falsi negativi potrebbero amplificare di molto il contagio. I test antigenici rapidi non danno alcuna informazione genomica. L***a recente circolare ministeriale*** sui test rapidi, indica chiaramente la necessità di valutare attentamente la loro esecuzione e interpretazione dei risultati, in relazione ai nuovi contesti epidemiologici determinati dalle varianti.

IMPATTO SUI VACCINI

I vaccini a mRNA o sub unitari, che contemplano la espressione o veicolo della porzione RSB della proteina Spike, sono i più soggetti ad essere influenzati dalle varianti. I dati Israeliani riferiti al vaccino PFIZER Biontech, dimostrano la capacità protettiva verso la variante UK. Studi *in vitro* condotti utilizzando pseudo virus, hanno dimostrato una perdita netta di capacità neutralizzante di alcuni anticorpi monoclonali. I sieri da soggetti immunizzati con Pfizer e Moderna, hanno dimostrato un calo di circa il 40-50% del titolo neutralizzante. La variante brasiliana ha spiazzato maggiormente la capacità neutralizzante di sieri e anticorpi da infezione e vaccinali. Tale dato di laboratorio trova conferma nel focolaio osservato presso l'ospedale di Perugia, con infezione/malattia in personale sanitario che aveva già ricevuto il primo trattamento vaccinale. Le autorità del Sud-Africa hanno di fatto sospeso la vaccinazione con Astra Zeneca, adducendo una scarsa protezione verso la variante Sudafricana.

Il NIH-USA ha emanato un comunicato stampa dove il vaccino Janssen della J&J, di prossima registrazione in Europa, che viene proposto in una unica somministrazione (vettore Adenovirus) è ritenuto efficace sulla variante Brasiliana, in quanto la fase 3 di sperimentazione è avvenuta in Brasile. Analoghi ragionamenti per inferenza, possono essere estesi al vaccino russo Sputnik (adenovirus come vettore) e a quello cinese Sinovac (virus completo inattivato).

L'OMS, dal canto suo, si sta attivando per un iter autorizzativo più snello per vaccini sub unitari, frutto di una riprogrammazione delle sequenze. Inoltre il comitato di esperti SAGE è incaricato di sviluppare dei criteri comuni a tutte le agenzie internazionale (es. EU-EMA, US-FDA), per verificare l'efficacia di vaccini e sieri da persone convalescenti sulle nuove varianti. In tale contesto si auspica la costituzione di bio-banche di tamponi e sieri, con una regolarità temporale. Inoltre si auspica l'utilizzo di modelli animali, per studiare soprattutto possibili differenti pattern clinici e di patogenicità ed avere inoltre una più adeguata valutazione delle cariche infettanti, dell'immunità di mucosa e dell'immunità cellulo-mediata; non da ultimo, per valutare degli schemi vaccinali. Le domande sono: somministrare una o due dosi e a che distanza? La vaccinazione intranasale con virus vettoriale è più efficace di quella intramuscolare?

Sta di fatto che i vaccini subunitari, basati su una stimolazione antigenica limitata, sembra possano essere ritenuti ad obsolescenza programmata, rispetto a quelli contenenti una maggiore varietà di epitopi immunogeni, sia di tipo B che di tipo T in grado di essere più resilienti, rispetto alle varianti di preoccupazione.

Recentemente è stato dimostrato che gli anticorpi diretti verso Nucleocapside e Matrice virale non solo sono presenti in quantità importante nei sieri di pazienti convalescenti, ma che hanno una importante azione di impedimento della replicazione virale, in quanto condizionano sfavorevolmente l'assemblaggio del virus e la corretta "esposizione" della proteina S.

La proteina S è un antigene estremamente complesso, nella sua progettazione ed espressione genomica al fine della sua corretta conformazione. Per la proteina S e il suo dominio in grado di legare il recettore Ace2 è necessario progettare una sequenza artificiale da inserire che "stabilizzi il complesso RDM in conformazione trimerica, pena la parziale perdita del potere immunogeno". La figura di Nature semplifica la complessità nella realizzazione di un vaccino subunitario, per inserzione dell'informazione della proteina Spike, ad esempio, in un vettore adenovirale. È possibile che, secondo quanto riportato dalle Autorità Sudafricane, sia questa la chiave dell'asserita minore efficacia del vaccino AstraZeneca sulla variante sudafricana, rispetto ad altri vaccini a parità di tecnologia vettoriale?

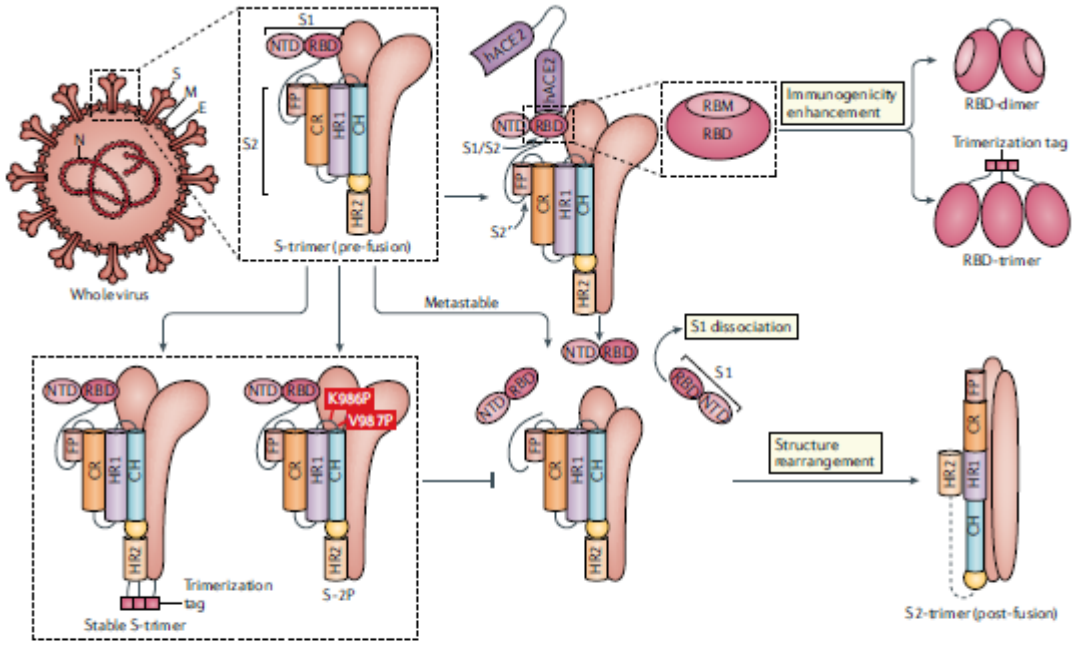


Fig. 1 | **Major targets used in COVID-19 vaccine candidates.** Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) contains four major structure proteins: spike (S), membrane (M) and envelope (E) proteins, which are embedded on the virion surface, and nucleocapsid (N) protein, which binds viral RNA inside the virion. The S protein trimer in its pre-fusion conformation is shown. The S protein comprises the S1 subunit (which includes the N-terminal domain (NTD) and the receptor-binding domain (RBD)) (the receptor-binding motif (RBM) within the RBD is also labelled) and the S2 subunit (which includes fusion peptide (FP), connecting region (CR), heptad repeat 1 (HR1), heptad repeat (HR 2) and central helix (CH)). The SARS-CoV-2 S protein binds to its host receptor, the dimeric human angiotensin-converting enzyme 2 (hACE2), via the RBD and dissociates the S1 subunits. Cleavage at both S1–S2 and S2′ sites allows structural rearrangement of the S2 subunit required for virus–host membrane fusion. The S2-trimer in its post-fusion arrangement is shown. The RBD is an attractive vaccine target. The generation of an RBD-dimer or RBD-trimer has been shown to enhance the immunogenicity of RBD-based vaccines. A stabilized S-trimer shown with a C-terminal trimer-tag is a vaccine target. The pre-fusion S protein is generally metastable during in vitro preparations and prone to transform into its post-fusion conformation. Mutation of two residues (K986 and V987) to proline stabilizes S protein (S-2P) and prevents the pre-fusion to post-fusion structural change.

Immagine che descrive la struttura della spike protein nella sua regione che determina la conformazione trimerica della porzione S1 con il Receptor Binding Domain e su cui si indirizzano i principali vaccini per garantire lo stimolo per una risposta immunitaria siero-neutralizzazionte. La progettazione dei costrutti genomici, sia nei vaccini a mRna, che dei vaccini vettoriali (Adenovirus) è alla base della efficacia del vaccino e della capacità di stimolare cross-reattività con altre varianti. Lianpan Dai and George F. Gao Viral targets for vaccines against COVID-19 Nature Reviews Immunology Volume 21 February 2021/75

I VACCINI E L'ESPERIENZA ISRAELIANA

Israele è la prima nazione ad avere completato la prima tornata di vaccinazioni, con una strategia differente ora adottata anche dal Regno Unito e di possibile/probabile adozione anche in Italia, sulla base delle evidenze. Utilizzando il vaccino Pfizer, si è preferito privilegiare la somministrazione di una prima dose a tutta la popolazione differendo il richiamo oltre le 3 settimane. Dopo una sola iniezione del vaccino Pfizer, si osserva a 21 giorni un'elevata efficacia del 66-85% nella riduzione dei casi positivi alla SARS-CoV-2 e di oltre il 90% nella riduzione dei ricoveri gravi.

L'esperienza israeliana inoltre indica sia consigliato effettuare una sola vaccinazione negli individui già casi Covid 19 positivi. Il richiamo (equivalente ad una terza esposizione antigenica) in tali soggetti peggiora il titolo anticorpale, probabilmente quale conseguenza di una sovra-stimolazione. Contemporaneamente, si osservano fenomeni infiammatori che, appunto, non sono associati ad una maggiore immunità (vedi discorso citokinico).

DA NON SOTTOVALUTARE ALCUNI ULTERIORI ASPETTI RILEVANTI PER LA CLINICA

Il primo è legato alla porzione di proteina/proteine scelta per l'immunizzazione; alcune possono avere caratteristiche pro-infiammatorie che si estrinsecano soprattutto alla seconda esposizione (richiamo), con febbre, dolori muscolari e articolari che possono richiedere una terapia anti-infiammatoria.

In tale contesto richiamiamo le mutazioni apparse sulla regione ORF6 genomica, dove l'espressione troncata della proteina costituisce un potente mediatore dell'infiammazione. Inoltre, le mutazioni sulla porzione Spike possono determinare un'affinità del virus per cellule che esprimono meglio recettori differenti da ACE2. Questo spiegherebbe il cambiamento della sintomatologia e della durata dei sintomi, in corso di infezione da nuove varianti.

Non ricorda questo uno scenario già noto nelle malattie infettive veterinarie, ad esempio nel suino, con comparsa di forme cliniche causate da infezioni concomitante con differenti coronavirus?

ULTIME CONSIDERAZIONI SUI QUESTIONI DIBATTUTE IN AMBITO SCIENTIFICO

Siamo di fronte a vaccini ad alta tecnologia realizzati in tempi impensabili fino a pochi mesi fa. Tuttavia alcuni di essi possono risultare ad obsolescenza programmata, specie se limitati ad una ristretta scelta di antigeni. La scelta di un pannello di "immunotopi" più ampio, contribuirebbe a diminuire comunque le cariche virali e la circolazione delle varianti.

La parziale perdita di efficacia nel prevenire il contagio di alcuni vaccini verso nuove varianti, può comunque essere di aiuto per prevenire un'evoluzione grave della malattia. Questo probabilmente è dovuto a stimolo dell'immunità cellulo-mediata e non di quella umorale. Tuttavia, questo scopo secondario non sembra essere stato valutato appieno dalle Autorità Regolatorie in base a parametri di numerosità e gravità dei sintomi e durata della fase clinica, guarigioni e decessi, come di solito avviene nel corso dei trials per trattamenti terapeutici.

Una progettazione di vaccini somministrabili per via intranasale in una unica somministrazione, sarebbe la modalità ideale anche in virtù del fatto che, in modelli animali, si è osservata la stimolazione di una immunità di mucosa in grado di abbattere le cariche e quindi lo shedding virale rilevante, sia per il quadro clinico che per il contagio.

L'attenzione mediatica allo sviluppo di nuovi vaccini, tuttavia va considerata attentamente. Gli investimenti e i pagamenti con soldi pubblici nella realizzazione di nuovi vaccini potrebbe andare a scapito nell'ambito di

recovery plan e next generation alla quota parte di finanziamento per il potenziamento strutturale della medicina di territorio e della qualificazione del personale medico-sanitario a supporto e dei servizi erogati alla comunità.

A queste ed altre sfide sarà chiamata a rispondere la neonata HERA, European Health Emergency Preparedness and Response Authority, che si dovrà interfacciare con EMA, ECDC, e Commissione Europea per risposte rapide e condivise all'evolversi della pandemia.

Whole virus							
Inactivated virus (PiCoVacc)	NA	Sinovac, with National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, China	Induction of S-specific, RBD-specific and N-specific IgG, and nAbs in mice, rats and NHPs; no induction of either T_H1 or T_H2 cell responses in NHPs; induction of RBD-specific IgG and nAbs in humans; no obvious vaccine-induced T cell responses in humans	Phase III	NCT04456595, 669/UN6.KEP/EC/2020, NCT04582344, NCT04617483	6 May 2020	5,145
Inactivated virus	NA	Wuhan Institute of Biological Products, Sinopharm, with Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, China	Induction of virus-specific IgG and nAbs in humans; no induction of either T_H1 or T_H2 cell responses in humans	Phase III	ChiCTR2000034780, ChiCTR2000039000, NCT04612972	13 Aug 2020	146
Inactivated virus (BBIBP-CorV)	NA	Beijing Institute of Biological Products, Sinopharm, with Institute of Viral Disease Control and Prevention, China	Induction of nAbs in rabbits, guinea pigs, rats, mice, NHPs and humans; no induction of either T_H1 or T_H2 cell responses in NHPs	Phase III	ChiCTR2000034780, NCT04560881	6 Jun 2020	6,150
Inactivated virus	NA	Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences, China	Induction of S-specific and N-specific IgG and nAbs in humans	Phase I/II	NCT04470609	9 Nov 2020	151
S protein							
Virus vector (Ad5)	Full-length S	CanSino Biological Inc. with Beijing Institute of Biotechnology, China	Induction of RBD-specific IgG and nAbs in humans; induction of T_H1 cell responses	Phase III	NCT04526990, NCT04540419	22 May 2020	76,77
Virus vector (ChAdOx1)	Full-length S	University of Oxford, with AstraZeneca, UK	Induction of S-specific IgG and nAbs in mice and NHPs; induction of high T_H1 cell responses but low T_H2 cell responses in mice; induction of S-specific IgG and nAbs in humans, with nAb titres similar to convalescent plasma	Phase III	ISRCTN89951424, NCT04516746, NCT04540393, CTRI/2020/08/027170	20 Jul 2020	78,79,152
Virus vector (Ad26 and Ad5)	Full-length S	Gamaleya Research Institute, Russia	Induction of RBD-specific IgG and nAbs in humans, with nAb titres similar to convalescent plasma; induction of IFNγ-associated T cell responses	Phase III	NCT04530396, NCT04564716, NCT04642339	4 Sep 2020	80
DNA	Full-length S	Inovio Pharmaceuticals, with International Vaccine Institute, South Korea	Induction of S-specific, S1-specific and RBD-specific IgG and nAbs in mice, S-specific IgG and nAbs in guinea pigs; induction of IFNγ-associated T cell responses	Phase II	NCT04642638, ChiCTR2000040146	20 May 2020	81
Protein subunit	Ectodomain of wild-type S in-frame fusion to trimer-tag	Clover Biopharmaceuticals, with GSK and Dynavax, China	Induction of S-trimer-binding antibodies and nAbs in mice and NHPs; induction of high T_H1 cell responses but low T_H2 cell responses in mice	Phase I	NCT04405908	21 Sep 2020	84
S-2P							
LNP-mRNA	Full-length S with two proline substitutions (K986P and V987P)	Moderna, with National Institute of Allergy and Infectious Diseases, USA	Induction of S-specific IgG and nAbs in mice, NHPs and humans, with nAb titres higher than convalescent plasma; induction of high T_H1 cell responses but low T_H2 cell responses in mice, NHPs and humans	Phase III	NCT04470427	14 Jul 2020	86–88,153

Strategy	Construct	Developer	B and T cell responses[a]	Clinical stage	Clinical trial identifier	First reported	Refs
S-2P (cont.)							
LNP-mRNA (cont.)	Full-length S with two proline substitutions (K986P and V987P)	BioNTech, with Fosun Pharma and Pfizer, Germany	Induction of S1-specific IgG and nAbs in humans, with nAb titres higher than convalescent plasma	Phase III	NCT04368728	20 Aug 2020	89,93
Protein subunit (CHO)	Full-length S with two proline substitutions (K986P and V987P) and three mutations at furin cleavage site (R682Q, R683Q and R685Q)	Novavax, USA	Induction of S-specific IgG and nAbs in mice, NHPs and humans, with nAb titres in humans higher than convalescent plasma; induction of high T_H1 cell responses but low T_H2 cell responses in mice, NHPs and humans	Phase III	2020-004123-16, NCT04611802	30 Jun 2020	90,91,154
Virus-vectored (Ad26)	Full-length S with two proline substitutions (K986P and V987P) and two mutations at furin cleavage site (R682S and R685G)	Janssen Pharmaceutical Companies, USA	Induction of RBD-specific IgG and nAbs in hamsters and NHPs; higher nAb titres induced by S-2P-based vaccine rather than by wild-type S in NHPs; induction of high T_H1 cell responses but low T_H2 cell responses in NHPs	Phase III	NCT04505722, ISRCTN14722499	30 Jul 2020	4,92,97
RBD							
Protein subunit (Baculovirus/Sf9)	RBD (residues 319–545)	West China Hospital, Sichuan University, China	Induction of RBD-specific IgG and nAbs in mice, rabbits and NHPs; induction of both T_H1 and T_H2 cell responses in mice	Phase II	ChiCTR2000039994	29 Jul 2020	107
LNP-mRNA	RBD (residues 319–541)	PLA Academy of Military Sciences, with Walvax Biotech and Suzhou Abogen Biosciences, China	Induction of RBD-specific IgG and nAbs in mice and NHPs; induction of high T_H1 cell responses in mice and NHPs but low T_H2 cell responses	Phase I	ChiCTR2000034112, ChiCTR2000039212	23 Jul 2020	108
Protein subunit (CHO)	RBD-dimer (residues 319–537 as tandem repeat)	Anhui Zhifei Longcom Biopharmaceutical, with Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, China	Induction of RBD-specific IgG and nAbs in mice; no induction of either T_H1 or T_H2 cell responses in mice	Phase III	ChiCTR2000040153	28 Jun 2020	120
LNP-mRNA	RBD-trimer (trimerized by addition of T4 fibritin foldon domain)	BioNTech, with Fosun Pharma and Pfizer, Germany	Induction of RBD-specific IgG and nAbs in humans, with nAb titres higher than convalescent plasma; induction of high T_H1 cell responses but low T_H2 cell responses in humans	Phase I/II	2020-001038-36, ChiCTR2000034825, NCT04537949	12 Aug 2020	93–95

Elenco dei vaccini autorizzati o in avanzata fase di autorizzazione per Sars-CoV-2, differenziati per tecnologia e bersaglio virale. Lianpan Dai and George F. Gao Viral targets for vaccines against COVID-19 Nature Reviews Immunology Volume 21 February 2021/75.