

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN FARMACIA

TESI DI LAUREA

UTILIZZO DEGLI ANTICORPI MONOCLONALI NEL TRATTAMENTO DELLE
PATOLOGIE INFETTIVE

RELATORE
Prof.ssa Adriana Chilin

LAUREANDA
Linda Storti
Matr. 1128263

ANNO ACCADEMICO
2021/2022

Sommario

Riassunto e finalità tesi	5
1. Introduzione	6
1.1 Caratteristiche strutturali degli anticorpi monoclonali	6
1.2 Evoluzione del processo produttivo degli anticorpi monoclonali	8
1.3 Classificazione anticorpi monoclonali	10
1.4 Nascita e sviluppo degli anticorpi monoclonali	12
1.4.1 Ricerca	12
1.4.2 Sperimentazione clinica	13
1.4.3 Monitoraggio post-marketing (fase IV)	15
1.5 Utilizzo in ambito terapeutico degli anticorpi monoclonali	17
1.5.1 Anticorpi monoclonali ad attività antinfiammatoria	17
1.5.2 Anticorpi monoclonali ad attività antitumorale	17
1.5.3 Anticorpi monoclonali dotati di altre attività	19
1.6 Differenze tra anticorpi monoclonali e farmaci tradizionali	20
1.7 Considerazioni concernenti la sicurezza degli anticorpi monoclonali	22
2. HIV e sindrome da immunodeficienza acquisita	23
2.1 Introduzione	23
2.1.1 Epidemiologia mondiale	23
2.1.2 Caratteristiche strutturali dell'HIV	24
2.1.3 Ciclo di replicazione del virus dell'immunodeficienza umana	25
2.1.4 Modalità di trasmissione dell'HIV	27
2.1.5 Patogenesi dell'infezione sostenuta da HIV	29
2.2 Trattamento dell'infezione da HIV con ibalizumab	32
2.2.1 Proprietà farmacodinamiche di ibalizumab	32
2.2.2 Proprietà farmacocinetiche di ibalizumab	33
2.2.3 Test clinici	34
3. Ebolavirus	41
3.1 Introduzione	41

3.1.1	Epidemiologia	41
3.1.2	Morfologia strutturale di EBOV	42
3.1.3	Replicazione del virus dell'ebola	43
3.1.4	Modalità di trasmissione di EBOV	45
3.1.5	Patogenesi e manifestazioni cliniche dell'infezione da ebola virus	45
3.2	Proprietà farmacologiche di Inmazeb™	49
3.2.1	Proprietà farmacodinamiche di Inmazeb™	49
3.2.2	Proprietà farmacocinetiche di Inmazeb™	49
3.3	Caratteristiche farmacologiche di Ebanga™	51
3.3.1	Proprietà farmacodinamiche di Ebanga™	51
3.3.2	Proprietà farmacocinetiche di Ebanga™	51
3.4	Studio PALM: confronto tra Inmazeb™ ed Ebanga™	53
3.4.1	Conclusioni	54
4.	<i>Bacillus anthracis</i>	55
4.1	Introduzione	55
4.1.1	Epidemiologia	55
4.1.2	Proprietà generali e meccanismi di patogenicità del batterio dell'antrace	56
4.1.3	Manifestazioni cliniche dell'antrace	58
4.1.4	Gestione terapeutica della patologia	60
4.2	Trattamento dell'infezione da <i>B. anthracis</i> con raxibacumab	62
4.2.1	Proprietà farmacodinamiche di raxibacumab	62
4.2.2	Proprietà farmacocinetiche di raxibacumab	63
4.2.3	Sperimentazione clinica	63
4.3	Utilizzo di obiltoxaximab nel trattamento dell'infezione da antrace	69
4.3.1	Proprietà farmacodinamiche di obiltoxaximab	69
4.3.2	Proprietà farmacocinetiche di obiltoxaximab	69
4.3.3	Sperimentazione clinica	70
5.	<i>Clostridium difficile</i>	74
5.1	Introduzione	74
5.1.1	Epidemiologia <i>Clostridium difficile</i>	74
5.1.2	Meccanismi patogenetici delle tossine prodotte da <i>C. difficile</i>	75

5.1.3 Strategie terapeutiche	78
5.2 Utilizzo di bezlotoxumab nella prevenzione delle recidive da CDI	79
5.2.1 Proprietà farmacodinamiche di bezlotoxumab	79
5.2.2 Proprietà farmacocinetiche di bezlotoxumab	79
5.2.3 Studi clinici di fase 3 relativi a bezlotoxumab	80
6. Infezione da SARS-CoV-2	83
6.1 Introduzione	83
6.1.1 Epidemiologia	83
6.1.2 Organizzazione strutturale e meccanismi patogenetici del SARS-CoV-2	84
6.1.3 Manifestazioni cliniche del COVID-19	86
6.1.4 Potenziali strategie di trattamento del COVID-19	87
6.2 Ronapreve™ nella terapia dei pazienti con COVID-19	89
6.2.1 Proprietà farmacodinamiche di Ronapreve™	89
6.2.2 Proprietà farmacocinetiche di Ronapreve™	89
6.2.3 Sperimentazione clinica di Ronapreve™	90
6.3 Regkirona™ nel trattamento della patologia da COVID-19	93
6.3.1 Proprietà farmacodinamiche di Regkirona™	93
6.3.2 Proprietà farmacocinetiche di Regkirona™	93
6.3.3 Dati di sperimentazione clinica	94
6.4 Xevudy® nel trattamento di COVID-19	96
6.4.1 Proprietà farmacodinamiche di Xevudy®	96
6.4.2 Proprietà farmacocinetiche di Xevudy®	96
6.4.3 Sperimentazione terapeutica di Xevudy®	97
6.5 Bamlanivimab-etesevimab nel trattamento di COVID-19	99
6.5.1 Proprietà farmacodinamiche dell'associazione bamlanivimab-etesevimab	99
6.5.2 Dati clinici sulla combinazione bamlanivimab-etesevimab	99
6.6 L'impiego di Evusheld® nella profilassi di COVID-19	101
6.6.1 Proprietà farmacodinamiche di Evusheld®	101
6.6.2 Proprietà farmacocinetiche di Evusheld®	101
6.6.3 Prove di efficacia clinica di Evusheld®	102

6.7 Conclusioni circa l'utilizzo degli anticorpi monoclonali nel trattamento e prevenzione della patologia da COVID-19	104
7. Conclusioni finali	106
8. Bibliografia e sitografia	108

Riassunto e finalità tesi

La scoperta e la produzione degli anticorpi monoclonali negli ultimi 30 anni ha profondamente cambiato il panorama terapeutico, infatti, ad oggi sono diventati mezzi essenziali per la terapia di numerose patologie invalidanti, tra cui neoplasie, artrite reumatoide, morbo di Chron, psoriasi e patologie infettive.

Sono medicinali biotecnologici, ottenuti con innovative tecnologie del DNA ricombinante, progettati a partire da strutture già presenti all'interno del nostro organismo, che, opportunamente modificate, possono agire su uno specifico bersaglio determinante la condizione morbosa.

Gli anticorpi monoclonali rappresentano una quota consistente dei medicinali presenti sul mercato e in via di sperimentazione, per questo motivo ritengo che la loro trattazione nell'elaborato, con una particolare attenzione rivolta al trattamento delle patologie di natura infettiva, sia stimolante dal punto di vista scientifico e molto attuale dato il contesto pandemico che stiamo vivendo e affrontando da oltre due anni.

Il contenuto della tesi è articolato in diversi capitoli: in primis l'introduzione, in cui si analizzano le principali peculiarità dei farmaci oggetto di tesi, la loro scoperta e produzione con un breve excursus sull'utilizzo terapeutico degli anticorpi monoclonali nella terapia dei tumori e delle patologie a carattere infiammatorio, differenze tra anticorpi monoclonali e farmaci tradizionali e, infine, si esamina la sicurezza relativa a tali medicinali. Nei capitoli successivi si sviscerano più approfonditamente e specificamente le patologie infettive, tra cui AIDS, ebola, antrace, patologia da *Clostridium Difficile* e Covid-19 trattabili con gli anticorpi monoclonali.

L'obiettivo dell'elaborato è quello di fornire informazioni accurate sul trattamento delle patologie infettive precedentemente citate con gli anticorpi monoclonali, evidenziandone luci ed ombre.

1. Introduzione

1.1 Caratteristiche strutturali degli anticorpi monoclonali

Gli anticorpi monoclonali (mAb) sono una particolare varietà di anticorpi realizzata con tecniche di DNA ricombinante. Sono progettati per riconoscere, in maniera specifica, un solo e determinato antigene con cui interagiscono, neutralizzandolo.

Sotto il profilo strutturale gli anticorpi monoclonali sono assimilabili agli anticorpi endogeni. Gli anticorpi, noti anche come immunoglobuline, dal punto di vista biochimico, sono macromolecole di natura glicoproteica, secreti dai linfociti B, in grado di riconoscere e legare specifiche molecole in seguito ad uno stimolo antigenico derivante dalla presenza di un elemento estraneo all'organismo.¹

Strutturalmente hanno una forma a Y (figura 1) e si articolano in 4 catene polipeptidiche: 2 pesanti (ad alto peso molecolare) e 2 leggere (a basso peso molecolare); ciascuna di queste catene contiene diverse regioni: regioni cosiddette “costanti” (fig. 1 C) e regioni dette “variabili” (fig. 1 V).

L'anticorpo è in grado di legare in modo specifico un determinato antigene a livello della regione variabile (V), localizzata agli estremi delle catene leggere e pesanti, mentre nella porzione inferiore è collocata la regione costante (C), responsabile della funzione effettrice attraverso il legame con il suo recettore posizionato sulle cellule effettrici; ciò determina l'interazione della risposta umorale, determinata dagli anticorpi, con la risposta cellulare. Una caratteristica peculiare degli anticorpi è la specificità: è proprio grazie alla presenza delle regioni variabili, diverse da anticorpo ad anticorpo, che questi ultimi possono legarsi in modo specifico ai diversi antigeni; quindi, è proprio grazie alla loro conformazione strutturale che le immunoglobuline svolgono la loro azione.²

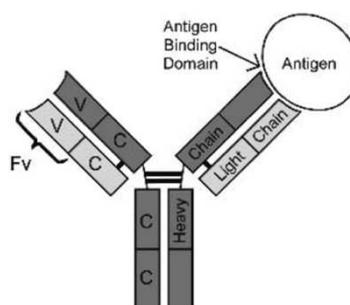


Figura 1. Struttura anticorpo endogeno.³

Gli anticorpi svolgono la loro azione con effetti di tipo diretto e indiretto. L'effetto diretto è mediato dal legame delle regioni variabili dell'anticorpo con l'antigene; solo attraverso il legame dell'anticorpo al bersaglio è possibile modulare le cellule cosiddette effettrici.

Oltre all'attività biologica diretta, alcuni anticorpi presentano un meccanismo d'azione mediato indirettamente attraverso la regione costante dell'anticorpo. Gli effetti indiretti si instaurano quando gli anticorpi si legano all'antigene bersaglio e stimolano il reclutamento delle cellule effettrici, come le cellule Natural Killer (cellule effettrici con capacità di citotossicità cellulare anticorpo-dipendente) o i macrofagi (elemento cellulare dotato di abilità di fagocitosi).

Un secondo metodo indiretto mediante il quale gli anticorpi possono promuovere la loro attività è la citotossicità complemento-dipendente, in cui il legame dell'anticorpo al bersaglio determina l'attivazione della cascata del complemento.

Gli effetti anticorpali indiretti possono anche essere ottenuti attraverso la coniugazione di mAb alle seguenti tipologie di molecole: farmaci, tossine, radioisotopi o citochine, processo denominato immunoconiugazione (ACDs, Antibody-Drug Conjugates). Questo metodo consente la somministrazione specializzata di agenti terapeutici o diagnostici.

I mAb terapeutici vengono somministrati per via parenterale in particolare costituiscono canale preferenziale la via endovenosa, sottocutanea o intramuscolare. La via endovenosa rappresenta la via d'elezione per la somministrazione di mAb perché presenta diversi vantaggi, tra cui la velocità di somministrazione sistemica, la completa biodisponibilità e la capacità di erogare volumi elevati. Tuttavia, mostra dei limiti legati alla convenienza, al costo e alla possibilità di innescare reazioni di infusione. Queste problematiche hanno alimentato l'interesse per la somministrazione per via sottocutanea e intramuscolare. Queste metodologie di somministrazione hanno una biodisponibilità inferiore, ma offrono i vantaggi dell'autosomministrazione in ambito domiciliare e minor rischio di eventi avversi relativi all'infusione di medicinali.⁴

1.2 Evoluzione del processo produttivo degli anticorpi monoclonali

Nel 1975 i ricercatori Georges Köhler e Cesar Milstein sintetizzarono il primo ibridoma fondendo cellule di tipo B, estratte dalla milza di un roditore, con cellule di mieloma (cellule tumorali del midollo osseo), le quali presentano la peculiarità di essere immortali. Le cellule “ibride” così ottenute, dette ibridomi, mostrano la capacità di produrre anticorpi in grado di riconoscere uno specifico antigene, caratteristica tipica dei linfociti di tipo B, e, inoltre, possiedono l’abilità di replicarsi indefinitamente, qualità propria delle cellule di tumori. Il singolo ibridoma, replicato in vitro, permette di ottenere una popolazione cellulare geneticamente identica (perché deriva un’unica cellula madre) che produce lo stesso anticorpo, detto monoclonale, in grado di identificare un solo antigene.⁵

Per ottenere un anticorpo monoclonale, specifico per un determinato antigene, si inocula in un roditore tale antigene al fine di stimolare la produzione di anticorpi; successivamente si isolano i linfociti B dalla milza del roditore che verranno utilizzati in seguito per la fusione con le cellule tumorali per ottenere i cosiddetti ibridomi.

Le migliori linee cellulari deputate alla formazione di ibridomi sono quelle di mieloma, poiché danno origine ad ibridi stabili con maggiore efficienza rispetto ad altre cellule immortalizzate; quindi, generalmente vengono fuse cellule di tipo B con linee cellulari mielomatose, mediante l’utilizzo di polietilenglicole.

Gli ibridi generati vengono selezionati mediante terreni di coltura selettivi (HAT), si tratta di terreni addizionati di ipoxantina, aminopterina e timidina in cui le cellule di melanoma muoiono, perché non sono in grado di utilizzare la via alternativa di sintesi nucleotidica, mentre le cellule di tipo B non sopravvivono, per loro natura, oltre 1-2 settimane; risulta chiaro che, in questo particolare terreno di coltura, possono proliferare solo le cellule ibride. Queste ultime vengono coltivate in “diluizione limite”, cioè vengono diluite in modo che in ogni singolo pozzetto sia presente una sola cellula, che darà successivamente origine al clone. Gli ibridomi di ciascun pozzetto vengono saggiati per la presenza di anticorpi in grado di reagire con l’antigene impiegato per l’immunizzazione.

Una volta identificati i pozzetti positivi, ovvero quelli contenenti ibridomi in grado di produrre l’anticorpo dotato della specificità desiderata, le cellule vengono clonate in agar semisolido e i cloni produttori l’anticorpo specifico vengono selezionati mediante un secondo processo di screening. In questo modo si ottengono cloni di ibridoma in grado di generare l’anticorpo monoclonale dotato della specificità auspicata.

Quindi, l’avvento della tecnologia dell’ibridoma ha consentito, per la prima volta, agli scienziati di produrre quantità illimitate di un tipo specifico di anticorpo contro un

particolare antigene, rendendo immortali i linfociti B (produttori di anticorpi) derivati dalla milza di topi immunizzati.

Nel 1986 venne approvato dalla FDA (Food and Drug Administration) il muromomab, primo anticorpo monoclonale murino, utilizzato a scopo terapeutico per la prevenzione del rigetto dei trapianti. Tuttavia, l'efficacia di questo tipo di anticorpo monoclonale si è rivelata essere piuttosto limitata per una serie di fattori fisiologici, tra cui l'inefficiente funzione di riconoscimento reciproco tra anticorpo murino e corrispondente recettore umano, ridotta emivita, e, soprattutto, innesco della risposta immunitaria anticorpale.

La somministrazione di anticorpi monoclonali murini (ottenuti da ibridoma di roditore) presenta un problema sostanziale: questa tipologia di anticorpi viene riconosciuta dal sistema immunitario come "non-self", di conseguenza si ha l'attivazione dell'immunità umorale con formazione di anticorpi anti-murini; questo meccanismo è indice di potenziale tossicità per il soggetto trattato. Per arginare la questione i ricercatori svilupparono innovative tecniche di DNA ricombinante per ridurre l'immunogenicità degli anticorpi monoclonali al fine di ottenere immunoglobuline più umanizzate.

Il primo tipo di anticorpo monoclonale ottenuto in seguito a modificazione del processo produttivo è quello chimerico caratterizzato da una combinazione di regioni umane e regioni murine; successivamente vennero sviluppati gli anticorpi monoclonali cosiddetti umanizzati in cui si le sequenze di roditore vengono sostituite con sequenze umane ad eccezione di quelle presenti nelle regioni determinanti la complementarità legante l'antigene.

La generazione di mAb terapeutici completamente umani è stata resa possibile grazie all'utilizzo di fagi e, più recentemente, allo sviluppo di tecnologie che prevedono l'impiego di topi transgenici.

Per produrre grandi quantità di mAb è possibile adottare due diverse strategie: il primo metodo consiste nel coltivare i cloni di ibridoma su larga scala e successivamente purificare gli anticorpi dotati della specificità voluta; in seconda istanza, i cloni di ibridoma possono essere inoculati in roditori transgenici in modo da stimolare la produzione di anticorpi diretti contro l'antigene specifico.⁶

1.3 Classificazione anticorpi monoclonali

Gli anticorpi monoclonali, utilizzati a scopo terapeutico, vengono suddivisi in quattro diverse tipologie in base al tipo di cellula da cui derivano.

Di seguito si elencano le quattro varietà di anticorpo monoclonale:

- 1) Anticorpi monoclonali murini – derivano interamente da cellule di roditore. La loro denominazione termina con il suffisso -omab. Rappresentano il tipo di anticorpo monoclonale che mostra il maggior carattere immunogenico; per questo motivo inducono frequentemente una reazione allergica nel soggetto trattato.
- 2) Anticorpi monoclonali chimerici – questa tipologia di anticorpo monoclonale viene ottenuta mediante tecnologie di biologia molecolare innovative che consentono di sostituire le regioni costanti con una sequenza amminoacidica di tipo umana, conservando la regione variabile di origine murina. Il loro nome termina con il suffisso -ximab. Anche in questo caso, essendo ancora in parte costituiti da proteine di origine murina, presentano una certa immunogenicità che può determinare una risposta immunitaria nel soggetto trattato.
- 3) Anticorpi monoclonali umanizzati – sono costituiti prevalentemente da catene polipeptidiche di origine umana, l'unica porzione in cui vengono mantenute proteine di tipo murino è rappresentata dal sito deputato all'interazione con lo specifico antigene. Sono riconoscibili mediante la presenza, all'interno del loro appellativo, del suffisso -zumab.
- 4) Anticorpi monoclonali umani – si tratta di anticorpi monoclonali di derivazione esclusivamente umana, ottenuti tramite tecniche ingegneristiche di DNA ricombinante che utilizzano topi transgenici in grado di produrre solo anticorpi di tipo umano. Dal punto di vista produttivo, questa tecnica è particolarmente vantaggiosa perché permette di identificare e selezionare anticorpi dotati di specificità, affinità e attività desiderate. Il loro nome è caratterizzato dalla presenza del suffisso -umab. Essendo macromolecole di origine totalmente umana presentano minore immunogenicità rispetto le precedenti tipologie di anticorpi monoclonali e, di conseguenza, ridotto rischio di indurre una risposta immunitaria nel soggetto, per cui risultano più sicuri nella somministrazione.⁶

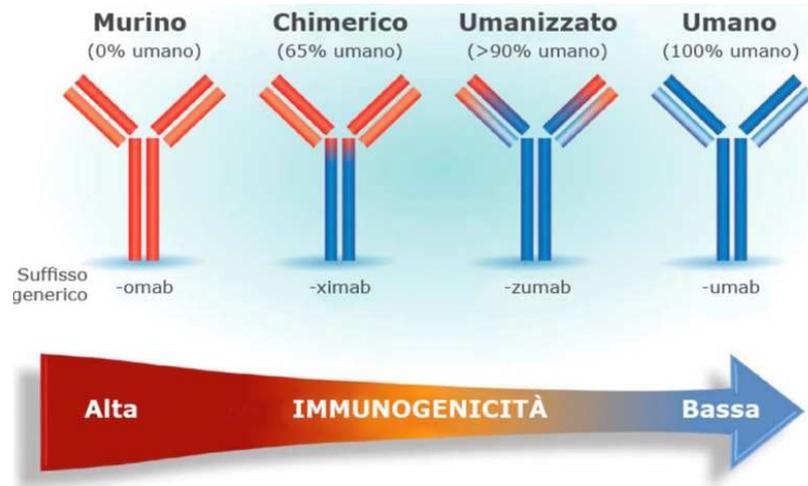


Figura 2. Classificazione anticorpi monoclonali e relativa immunogenicità.⁵

1.4 Nascita e sviluppo degli anticorpi monoclonali

Il processo di sviluppo degli anticorpi monoclonali si articola in tre macro-fasi: ricerca, sperimentazione clinica e monitoraggio post-marketing.

1.4.1 Ricerca

La ricerca rappresenta il primo gradino del processo di sviluppo di un farmaco e ha l'obiettivo di selezionare e caratterizzare la molecola oggetto di ricerca. La fase di ricerca si suddivide in quattro livelli:

- 1) Identificazione del target – si seleziona il bersaglio terapeutico in base alla sua correlazione con la patologia da trattare e al potenziale terapeutico dell'anticorpo. In seguito, viene delineata la strategia d'azione dell'anticorpo sul target identificato precedentemente.
- 2) Selezione dei primi mAb – si eseguono dei test valutativi per stabilire la capacità dell'anticorpo di interagire con il target specifico.
- 3) Produzione dei primi mAb – mediante lo sfruttamento di ibridomi o fagi.
- 4) Ottimizzazione e caratterizzazione – le macromolecole anteriormente identificate, spesso, vengono modificate, mediante tecnologie di ingegneria molecolare, al fine di migliorare le caratteristiche della molecola stessa. Una delle modificazioni più importanti è quella che riguarda l'umanizzazione dell'anticorpo monoclonale finalizzata alla riduzione dell'immunogenicità dell'anticorpo stesso.

Una molecola di farmaco, per poter proseguire il suo percorso di sviluppo, deve soddisfare i seguenti requisiti:

- 1) Dimostrazione di efficacia in modelli biologici cellulari e/o animali;
- 2) Valutazione del rapporto dose-risposta in animali al fine di orientare il dosaggio nelle prime fasi di sperimentazione clinica;
- 3) Studi preclinici di farmacologia e farmacocinetica;
- 4) Valutazione della sicurezza con indicazione del rischio stimato;
- 5) Dimostrazione delle proprietà biochimiche e biofisiche richieste;
- 6) Valutazione del rendimento della molecola e predisposizione del processo finalizzato alla realizzazione di elevate quantità di prodotto necessarie nella fase di sviluppo clinico.⁷

1.4.2 Sperimentazione clinica

Sperimentazione preclinica

La sperimentazione clinica è preceduta dalla cosiddetta fase di sperimentazione preclinica. Quest'ultima è una fase cruciale nella definizione di tossicità, via di somministrazione e proprietà farmacocinetiche che caratterizzano la molecola in studio.

Inizialmente si eseguono degli studi in vitro finalizzati a comprendere le peculiarità della molecola da cui si intende ricavare un farmaco. Questa sostanza viene coltivata e successivamente testata, in laboratori altamente specializzati, per valutarne la reale efficacia terapeutica; nel momento in cui si dimostra che la molecola in studio possiede effettivamente un'attività terapeutica è possibile procedere con la sperimentazione in vivo.

Gli studi in vivo hanno lo scopo di:

- 1) Valutare l'efficacia della sostanza attiva (dimostrata precedentemente in vitro) in modelli animali;
- 2) Fornire dati preliminari sul comportamento farmacocinetico della molecola (in termini di assorbimento, distribuzione, metabolismo ed eliminazione);
- 3) Dimostrare la sicurezza della molecola mediante studi di tossicologia, prima di iniziare con la sperimentazione clinica.

Sperimentazione clinica

Dopo aver verificato, nella sperimentazione preclinica, che il composto in esame presenta un accettabile grado di tollerabilità e l'attività ricercata sul target farmacologico, è necessario verificare l'effettiva sicurezza ed efficacia sull'uomo. Dunque, con la sperimentazione clinica ha inizio lo studio del principio attivo sull'uomo, che è organizzata in tre fasi trattate di seguito.

Fase I

Gli studi di fase I hanno lo scopo di fornire una preliminare valutazione sulla sicurezza del medicinale e sulla tolleranza dell'organismo.

Per la conduzione degli studi di fase I viene arruolato un numero limitato di volontari sani (circa 60-80 persone), per i quali è stata attestata l'assenza di patologie. I volontari vengono suddivisi in più gruppi; ad ogni gruppo viene somministrato, sotto il controllo medico, una diversa dose di farmaco, comunque inferiore alla dose tossica documentata dai precedenti studi preclinici in vivo.

L'obiettivo di questi studi, oltre alla valutazione della sicurezza e tollerabilità del medicinale in studio, è rilevare, in prima istanza, la presenza di eventuali effetti collaterali e determinare i parametri farmacocinetici della sostanza.

Nel caso in cui il farmaco in esame presenti un rapporto beneficio/rischio favorevole è possibile procedere con le successive fasi di sperimentazione clinica.

Nell'ipotesi di medicinali in sperimentazione per il trattamento di patologie gravi (quali neoplasie o AIDS), gli studi di fase I vengono effettuati direttamente su pazienti affetti dalla patologia per cui è previsto il trattamento con il farmaco in studio.

Fase II

Questa fase di studi, di durata di circa due anni, ha lo scopo di dimostrare l'effettiva attività terapeutica del principio attivo in esame, attraverso la valutazione degli end-points (parametri clinici prestabiliti), e la sua non tossicità. Gli end-points variano in funzione della complessità della molecola sperimentale; nel caso di farmaci biotecnologici, in particolare degli anticorpi monoclonali, si analizzano: rischio relativo, sopravvivenza libera da progressione (o PFS), sopravvivenza globale (o OS) e tollerabilità.

In questa fase, a differenza della fase I, vengono arruolati volontari affetti dalla patologia per cui il medicinale è stato progettato. I soggetti vengono suddivisi in due gruppi: al primo gruppo, detto gruppo trattato, si somministra il farmaco in sperimentazione, mentre al secondo gruppo, detto gruppo di controllo, viene somministrato il cosiddetto "gold-standard" (ovvero il farmaco di riferimento efficacemente utilizzato per il trattamento della patologia), oppure, se opportuno dal punto di vista etico, il placebo (sostanza priva di azione farmacologica).

Per evitare di incorrere in errori di valutazione dei risultati dello studio, questi possono essere condotti in due modalità diverse:

- 1) In cieco singolo – in cui il soggetto trattato non è a conoscenza del tipo di trattamento che gli è stato somministrato;
- 2) In doppio cieco – in cui né soggetto trattato, né medico sperimentatore conoscono il tipo di terapia che è stata assegnata al paziente.

La fase II di sperimentazione clinica è utile per comprendere l'azione farmacologica della sostanza in studio, intesa come capacità di ripristinare, correggere o modificare funzioni fisiologiche e per ottimizzare lo schema posologico da adottare negli studi successivi.

Fase III

Gli studi di fase III sono utili per determinare la reale efficacia del farmaco, attraverso la descrizione del rapporto rischio/beneficio, per migliorare la definizione dei dosaggi terapeutici, e, inoltre, pongono particolare attenzione sulla frequenza di insorgenza e la gravità degli effetti collaterali. Questo studio ha una durata variabile che oscilla tra i 3 e i 5 anni e, come nel caso precedente, vengono arruolati pazienti, quindi soggetti affetti dalla patologia che si considera di trattare con il farmaco sperimentale. La mole di individui arruolata viene estesa fino all'ordine delle migliaia, con l'obiettivo di superare i problemi legati alla variabilità individuale.

Lo studio è di tipo clinico controllato randomizzato, questo significa che il trattamento con il gold-standard (o placebo) o con il farmaco sperimentale viene assegnato a ciascun paziente casualmente, in modo che i due gruppi siano il più omogenei possibile sotto ogni aspetto. Solo operando attraverso questa modalità è possibile attribuire ogni differenza, in termini di miglioramento o peggioramento della patologia, al trattamento ricevuto.

Terminata con successo la fase di sperimentazione è possibile procedere alla richiesta di autorizzazione all'immissione in commercio della specialità medicinale sperimentata e successivamente si provvederà alla sua commercializzazione.⁸

Per quanto riguarda gli anticorpi monoclonali, essendo medicinali derivati da procedimenti biotecnologici, la normativa europea prevede che l'autorizzazione all'immissione in commercio (AIC) avvenga con procedura centralizzata (ai sensi del Regolamento (CE) 726/2004). La richiesta di AIC viene sottoposta alla valutazione da parte del Comitato scientifico per i Medicinali per Uso Umano (Committee for Human Medicinal Products, CHMP) preposto dell'EMA (European Medicines Agency) e l'autorizzazione così ottenuta ha validità in tutti paesi membri dell'UE. Qualora la valutazione della richiesta dia esito favorevole, viene rilasciata, con decisione finale, l'autorizzazione all'immissione in commercio, e così il medicinale potrà essere commercializzato in tutti gli Stati membri.⁹

1.4.3 Monitoraggio post-marketing (fase IV)

La fase IV (o sorveglianza post-marketing) consiste in studi condotti successivamente l'approvazione e la commercializzazione del farmaco, quindi estesi alla popolazione generale, composta da un gran numero di persone caratterizzate da un'ampia varietà di condizioni fisiopatologiche, e sono rivolti ad approfondire le conoscenze connesse all'efficacia, ma soprattutto alla valutazione sicurezza del medicinale.

Il problema più rilevante connesso alla sicurezza dei mAb risiede nel loro potere immunogenico: anche minime differenze possono impattare sull'immunogenicità della molecola, la quale può indurre una risposta immunitaria nel soggetto trattato con conseguente perdita di efficacia, insorgenza di effetti indesiderati e resistenza verso terapie basate sull'utilizzo di anticorpi monoclonali.

In questa fase di monitoraggio post-marketing, grazie all'ampiezza del campione di soggetti, possono emergere reazioni avverse rare non osservabili negli studi clinici con un limitato numero di individui selezionati.⁸

1.5 Utilizzo in ambito terapeutico degli anticorpi monoclonali

I mAb sono diventati strumenti essenziali per rivelare il ruolo di molti geni e dei loro prodotti proteici nella patogenesi di diverse condizioni morbose, per la scoperta di antigeni di superficie cellulare nuovi e sovraespressi e nella diagnosi e terapia di molte patologie, inclusi i tumori umani.

In ambito terapeutico, attualmente ci sono diversi prodotti a base di mAb approvati dalla FDA statunitense e/o dalle autorità sanitarie dell'UE per il trattamento di un'ampia gamma di malattie, tra cui patologie autoimmuni, rigetto di trapianti d'organo, infiammazione, infezioni, neoplasie umane.¹⁰

1.5.1 Anticorpi monoclonali ad attività antinfiammatoria

Il TNF- α (Fattore di Necrosi del Tumore) è una citochina pro-infiammatoria, coinvolta nella regolazione di processi flogistici in diverse patologie infiammatorie immuno-mediate come artrite reumatoide, spondilite anchilosante, morbo di Crohn, colite ulcerosa, psoriasi e artrite psoriasica. L'inattivazione del TNF- α rappresenta un approccio plausibile nel trattamento di queste condizioni: la strategia impiegata consiste nell'utilizzare anticorpi monoclonali che interagiscano e leghino il TNF- α inattivandolo, prevenendo l'infiammazione mediata da tale fattore.

I farmaci anti-TNF attualmente approvati dalla FDA per il trattamento delle condizioni infiammatorie sopra citate includono adalimumab, certolizumab pegol, golimumab, ed infliximab. Questi mAb legano il TNF- α ancorato alla membrana e, di conseguenza, gli impediscono di interagire con i suoi recettori posti sulle cellule infiammatorie. Il processo di legame di questi farmaci al TNF è anche noto come neutralizzazione del TNF. La neutralizzazione del TNF provoca la soppressione delle citochine infiammatorie a valle come IL-1 (interleuchina-1) e IL-6 (interleuchina-6); dunque, la neutralizzazione dei mediatori infiammatori previene, a valle, la stimolazione del processo infiammatorio.¹¹

1.5.2 Anticorpi monoclonali ad attività antitumorale

Gli anticorpi monoclonali rappresentano una componente importante nella terapia del cancro. Il meccanismo d'azione di gran parte dei mAb antitumorali ad oggi approvati è incentrato sulla stimolazione dei processi immunitari innati, che sembrano essere i principali responsabili dell'efficacia della maggioranza delle terapie contro le neoplasie. L'idea di utilizzare gli anticorpi come terapie antitumorali ha una lunga storia che risale a oltre

cinquant'anni fa, quando le tecniche sierologiche hanno consentito di valutare cellule tumorali e preannunciato il possibile uso degli anticorpi come terapeutici per il cancro. Da allora, c'è stata una rivoluzione nello sviluppo di anticorpi monoclonali (mAb), che ora costituiscono un importante mercato terapeutico farmaceutico.

Il primo mAb utilizzato per il trattamento del cancro è il rituximab, approvato da FDA nel 1997; questo anticorpo rappresenta tuttora una terapia standard di cura per la leucemia non-Hodgkin a cellule B.

Gli anticorpi antitumorali terapeutici prendono di mira selettivamente gli antigeni localizzati sulla superficie delle cellule cancerose; questi antigeni sono rappresentati da proteine sovraesprese, o espresse selettivamente nel tumore, o modificate in modo diverso nelle cellule tumorali rispetto alle cellule endogene. L'effetto funzionale dei mAb ad azione antitumorale consiste nell'attivare i recettori posti sulle cellule immunitarie innate, oppure innescare l'attivazione del complemento, o bloccare la segnalazione oncogenica mediata dal recettore. I risultati terapeutici di questi mAb dipendono non solo dalla natura specifica dell'anticorpo (vale a dire dal sito di legame specifico, avidità del legame con il bersaglio e conformazione strutturale), ma sono influenzati anche dalla natura dell'antigene target. È importante considerare anche la distribuzione dell'espressione dell'antigene nei tessuti endogeni (non maligni) al fine di prevedere possibili implicazioni in termini di tossicità al di fuori del bersaglio.

Uno degli utilizzi che si sta maggiormente consolidando nell'ambito dei mAb destinati alla terapia antitumorale è la loro coniugazione a diversi farmaci ad azione citotossica, definiti coniugati anticorpo-farmaco (ADCs), in cui un medicinale citotossico viene coniugato, mediante legami chimici, alle catene polipeptidiche che formano l'anticorpo.

Come mezzo di terapia del cancro, i mAb promettono un grado potenzialmente elevato di specificità ed efficacia con un minimo rischio di tossicità. Tuttavia, solo un piccolo numero di tumori ha riscontrato successo mediante trattamento con anticorpi monoclonali, molti dei quali sono neoplasie ematologiche. Ad oggi sono oltre 40 i mAb che hanno ricevuto l'approvazione da FDA per il trattamento del cancro.

Lo sviluppo di mAb antitumorali ha fondamentalemente modificato lo scenario della terapia mirata in oncologia, diventando uno standard di terapia utilizzato per molti tumori ematologici e alcuni tumori solidi. In combinazione con la chemioterapia, questi mAb mostrano discreto successo anche per la terapia di tumori in stadio avanzato; ciò è dovuto all'induzione di meccanismi d'azione multipli.¹²

1.5.3 Anticorpi monoclonali dotati di altre attività

Esistono anticorpi monoclonali dotati di attività diverse da quella antinfiammatoria e antitumorale, un esempio è costituito dai mAb ad azione immunosoppressiva. L'obiettivo di questi ultimi è la soppressione delle difese immunitarie dell'organismo, quindi, il loro bersaglio sono le cellule deputate alla difesa quali linfociti B, linfociti T e proteine come IL-2. Gli anticorpi monoclonali appartenenti a questa categoria sono rituximab e basiliximab, impiegati principalmente per il trattamento di patologie autoimmuni e nella prevenzione del rigetto degli organi trapiantati. Appartiene a questa categoria di mAb l'omalizumab, anticorpo umanizzato diretto contro le immunoglobuline di tipo E (coinvolte nei meccanismi di risposta allergica), utilizzato nella terapia dell'asma allergica.

Nel 1994 l'FDA ha approvato l'abciximab, anticorpo monoclonale utilizzato nella prevenzione della formazione di coaguli ematici nell'angioplastica. L'antigene è la glicoproteina IIb/IIIa presente nelle piastrine, implicata nei processi di aggregazione piastrinica.¹

Negli ultimi anni sono stati progettati diversi anticorpi monoclonali diretti contro un determinato agente patogeno utilizzati per il trattamento di patologie infettive quali ebola, AIDS, antrace, patologia da Clostridium difficile e Covid-19. La trattazione di questi anticorpi monoclonali rappresenta il fulcro dell'elaborato, e, per questo motivo, verranno affrontati approfonditamente nei capitoli a seguire.

1.6 Differenze tra anticorpi monoclonali e farmaci tradizionali

In questo paragrafo saranno discusse le principali diversità che caratterizzano rispettivamente gli anticorpi monoclonali e i medicinali cosiddetti tradizionali.

Gli anticorpi monoclonali sono farmaci biologici, ossia molecole complesse, prodotte in laboratorio, costituite da uno o più principi attivi estratti o prodotti all'interno di un sistema biologico vivente. Più precisamente, gli anticorpi monoclonali appartengono alla categoria dei medicinali biotecnologici in quanto vengono prodotti mediante tecnologie ingegneristiche del DNA ricombinante, che consistono nella controllata espressione di geni codificanti per proteine biologicamente attive sulle strutture di interesse. Invece, i medicinali di sintesi, denominati "small chemical entities" (SCE), vengono prodotti secondo metodologie di chimica farmaceutica tradizionale seguendo un processo di sintesi definito, standardizzato e riproducibile.

Una delle principali differenze che contraddistingue i medicinali biologici dai medicinali tradizionali è proprio il processo produttivo: mentre le SCE sono ottenute per sintesi chimica, basata su reazioni chimiche uniformate e riproducibili, i medicinali biologici, vengono realizzati mediante l'utilizzo di organismi viventi; appare chiaro che le tecniche produttive per la creazione di farmaci biologici risultano essere molto più elaborate rispetto quelle utilizzate per la sintesi di medicinali cosiddetti tradizionali. La progettazione e lo sviluppo di farmaci biologici sono determinanti nella definizione delle caratteristiche di complessità, efficacia e sicurezza del farmaco stesso. Quindi, a differenza dei farmaci tradizionali ottenuti per sintesi chimica, la struttura molecolare dei farmaci biologici è strettamente dipendente dal processo di produzione. Quest'ultimo è talmente caratterizzante da poter dichiarare che "il prodotto è il processo di produzione".¹³

In ragione della loro peculiare complessità i farmaci biologici sono molto difficili da caratterizzare e replicare; infatti, la stessa molecola, prodotta da case farmaceutiche diverse, può presentare modificazioni strutturali significative e quindi differenti caratteristiche.

Dal punto di vista strutturale sussiste un enorme divario tra farmaco tradizionale e farmaco biologico: le SCE presentano un basso peso molecolare compreso tra 50 e 1000 Da (per esempio, PM aspirina 180 Da, figura 3) ed una organizzazione strutturale ben definita, mentre i medicinali biologici sono caratterizzati da un alto peso molecolare che si estende da 5.000 fino a 200.000 Da (PM anticorpo monoclonale circa 150.000 Dalton, figura 3) e

mostra una conformazione complessa ed eterogenea, fortemente dipendente al processo produttivo.

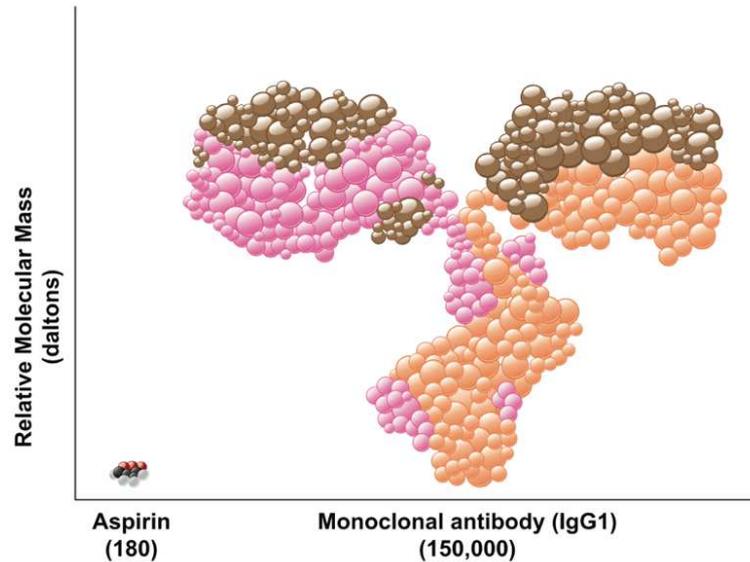


Figura 3. Differenza dimensionale farmaco tradizionale (aspirina) e medicinale biologico (anticorpo monoclonale).¹⁴

I medicinali biologici, a differenza dei medicinali tradizionali, sono immunogenici, cioè sono capaci di stimolare una reazione immunitaria nel soggetto che riceve il trattamento. L'immunogenicità può portare, non solo alla non efficacia del trattamento eseguito, ma può procurare conseguenze anche gravi. Il carattere immunogenico di un farmaco biologico dipende da diversi fattori, elencati di seguito:

- 1) Qualità del farmaco (impurità, presenza di contaminanti);
- 2) Caratteristiche del processo produttivo;
- 3) Durata del trattamento;
- 4) Sede di somministrazione del farmaco;
- 5) Caratteristiche fisiologiche del soggetto trattato.¹⁴

1.7 Considerazioni concernenti la sicurezza degli anticorpi monoclonali

Come la maggior parte dei medicinali, anche gli anticorpi monoclonali comportano rischio di reazioni immunitarie ed eventi avversi. La tossicità associata a terapia con mAb si divide in due classi: tossicità correlata al bersaglio e tossicità relativa alla modalità di somministrazione.

La tossicità correlata al bersaglio è collegata al meccanismo risultante dal legame che si instaura tra antigene-anticorpo, è molto specifica e varia da anticorpo ad anticorpo. Per esempio, gli anticorpi monoclonali antinfiammatori (inibitori TNF- α) utilizzati per trattare patologie a carattere infiammatorio, possono indurre immunosoppressione e, di conseguenza, sviluppo di infezioni. La tossicità relativa al bersaglio può derivare anche dall'interazione tra mAb e antigene target su tessuti diversi da quello previsto come bersaglio. Ad esempio, il cetuximab, inibitore dell'EGFR (Epitelial Growth Factor Receptor), utilizzato nella terapia antitumorale poiché impedisce, a monte, la proliferazione delle cellule tumorali inducendone apoptosi, può dare luogo a tossicità dermatologiche come eruzioni cutanee, prurito ed eritema, dovute all'inibizione dell'EGFR localizzato sulle cellule epiteliali del derma.

La tossicità relativa alla modalità di somministrazione può manifestarsi al momento dell'iniezione (in acuto), oppure possono svilupparsi a seguito del trattamento prolungato con l'anticorpo. Questo tipo di tossicità comprende vari tipi di eventi, tra cui risposte più comuni come reazioni all'infusione o al sito di iniezione, che si manifestano con febbre, nausea, vomito, brividi e ipotensione e reazioni immunitarie acute rare tra cui sindrome da rilascio di citochine e reazioni di ipersensibilità, dovuta all'immunogenicità del mAb. L'immunogenicità dei mAb rappresenta un limite per questo tipo di trattamento, perché stimola lo sviluppo di anticorpi HAMA (Human Anti-Mouse Antibody) diretti contro gli stessi mAb. Lo sviluppo di una risposta immunitaria contro una terapia può influire sulla sua sicurezza ed efficacia. La graduale sostituzione del contenuto della sequenza proteica murina nei mAb con il contenuto della sequenza umana ha portato a una minore propensione allo sviluppo di anticorpi HAMA; tuttavia, sussiste sempre il rischio di sviluppare risposte anticorpali, anche con mAb completamente umani.¹⁵

2. HIV e sindrome da immunodeficienza acquisita

2.1 Introduzione

2.1.1 Epidemiologia mondiale

Il virus dell'immunodeficienza umana (HIV, Human Immunodeficiency Virus) è stato identificato per la prima volta nel 1979 e, successivamente nel 1981, riconosciuto come agente eziologico responsabile della sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS); da allora l'AIDS è diventata una malattia epidemica mondiale in continua diffusione.

Secondo i dati dell'UNAIDS (programma congiunto delle nazioni unite) nel 2020 si stimano circa 37,7 milioni di persone affette da AIDS, di cui 36 milioni sono adulti e 1,7 milioni bambini di età inferiore di 15 anni. Nel 2021 dei 37,7 milioni di soggetti infetti da HIV, circa 28,2 milioni di persone (circa il 75%) hanno avuto accesso alle terapie per il trattamento della patologia. Il numero di nuove diagnosi registrate nel 2020 è di circa 1,5 milioni. Il numero di decessi osservati nel 2020 è 680.000, dato in continua decrescita anno dopo anno, grazie all'effetto delle terapie antiretrovirali combinate.¹⁷

L'incidenza della morbosità a livello mondiale varia da regione a regione e la più alta riscontrata è a livello dell'Africa sub-sahariana, dove l'infezione è spesso accompagnata da altre malattie neglette responsabili dell'elevato numero di decessi.

“I progressi della ricerca scientifica e l'uso della terapia antiretrovirale hanno reso possibile alle persone con HIV di avere una buona qualità di vita, grazie anche al minor impatto sull'organismo e ai minori effetti collaterali. Le evidenze scientifiche dicono che le prospettive di vita per chi oggi scopre di avere l'HIV ed entra subito in terapia sono simili a chi non ha l'HIV”.¹⁸ Nonostante siano stati sperimentati e approvati numerosi farmaci per il trattamento dell'AIDS, ad oggi nessuna terapia si è rivelata essere efficace e risolutiva nei confronti della patologia; questo fatto dipende dalla capacità del virus di mutare dando luogo rapidamente a farmacoresistenza.¹⁹

È di fondamentale importanza una comprensione dettagliata di struttura, replicazione del virus, virologia e meccanismi patogenetici alla base dell'infezione da HIV al fine di identificare nuove possibili terapie efficaci, ma anche per elaborare strategie per la diagnosi da laboratorio.

2.1.2 Caratteristiche strutturali dell'HIV

Attualmente si riconoscono due tipi di virus dell'immunodeficienza umana: HIV-tipo 1 (HIV-1), principale agente eziologico della patologia AIDS a livello mondiale, e HIV-tipo 2 (HIV-2), circoscritto ad alcune regioni dell'Africa centro-occidentale. Le due tipologie di virus differiscono tra loro per la diversa organizzazione del genoma, inoltre, l'HIV-2 appare meno virulento e richiede un maggior intervallo di tempo per la comparsa della patologia rispetto all'HIV-1. Nonostante entrambi i virus causino potenzialmente l'AIDS, l'HIV-2 provoca più frequentemente malattie del sistema nervoso centrale (SNC).

Il virus dell'HIV appartiene alla famiglia dei Retroviridae ed è correlato al genere Lentivirus. Sotto il profilo strutturale HIV-1 e HIV-2 sono paragonabili; il loro genoma è composto da due molecole identiche di RNA a singolo filamento ed è caratterizzato dalla presenza di tre geni strutturali (*gag*, *pol* ed *env*), più una complessa combinazione di altri geni accessori. Il gene *gag* codifica per le proteine strutturali del nucleo (p24, p7 e p6) e della matrice (p17), il gene *env* codifica per le glicoproteine dell'involucro virale gp120 e gp41, deputate al riconoscimento dei recettori posti sulla superficie cellulare, e, infine, il gene *pol* codifica per gli enzimi indispensabili per la replicazione virale, tra cui trascrittasi inversa (converte l'RNA virale in DNA), integrasi (integra il DNA virale nel DNA dell'ospite) e proteasi (scinde i precursori delle proteine *gag* e *pol* nei loro componenti).

Le particelle virali hanno dimensioni di 100 nm e sono circondate da una membrana ricca in lipoproteine; sulla membrana sono ancorati complessi eterodimerici costituiti dalle glicoproteine codificate dal gene *env*: gp41, glicoproteina transmembrana e gp120 glicoproteina trimerica legata, mediante legame non covalente, a gp41 ed è localizzata sulla superficie esterna della membrana. La glicoproteina gp120, non essendo legata covalentemente, può essere rilasciata e rilevata nel siero dell'ospite infettato da HIV.

All'interno della membrana è inclusa la proteina matrice p17, dove interiormente è racchiuso il capsido costituito da proteine strutturali del nucleo (p24). Il capsido contiene due copie del singolo filamento dell'RNA associato agli enzimi trascrittasi inversa, integrasi e proteasi.

I virus HIV sono caratterizzati da una serie di proteine accessorie che svolgono un ruolo chiave nella modulazione della replicazione del virus. Tra queste troviamo:

- 1) Proteina Tat – la quale promuove l'espressione dei geni dell'HIV;
- 2) Proteina Rev – garantisce la migrazione dell'RNA messaggero e dell'RNA genomico elaborati dal nucleo al citoplasma;
- 3) Proteina Vpr – la quale si ritiene sia coinvolta nell'arresto del ciclo cellulare;
- 4) Proteina Vpu – necessaria per il corretto rilascio della particella virale;

- 5) Proteina Vif – aumenta l’infettività delle particelle virali della progenie;
- 6) Proteina Nef – ricopre molteplici funzioni, tra cui la trasduzione del segnale cellulare e la regolazione del recettore CD4 sulla superficie cellulare per consentire il germogliamento del virus nelle ultime fasi del ciclo di replicazione.¹⁹

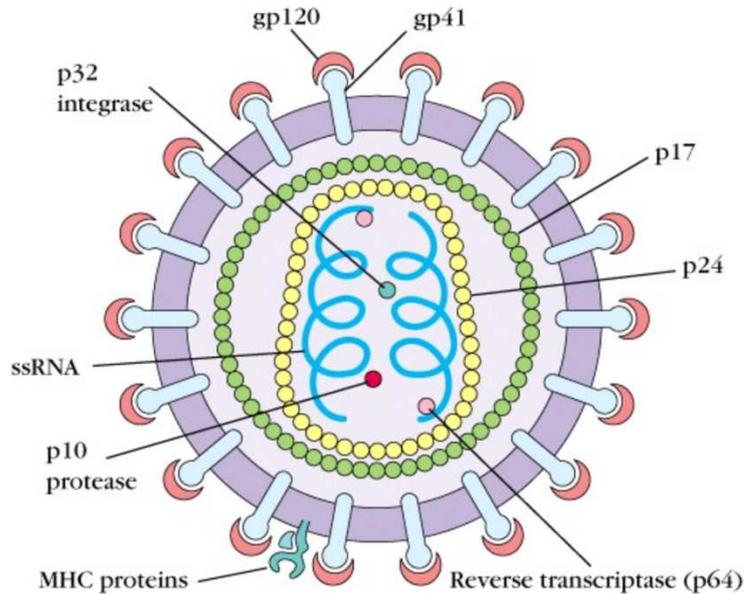


Figura 4. Struttura particella virale HIV.²⁰

2.1.3 Ciclo di replicazione del virus dell’immunodeficienza umana

Il complesso eterodimerico composto dalle glicoproteine gp120 e gp41 è essenziale per il riconoscimento del virus e il suo ingresso nelle cellule bersaglio. Il ciclo replicativo di HIV si avvia nel momento in cui la proteina gp120, localizzata sulla membrana esterna del virus, riconosce e aderisce al recettore omologo posizionato sulla superficie delle cellule bersaglio denominato CD4, espresso sulla superficie della maggior parte dei linfociti T circolanti, sui precursori dei linfociti T, sui macrofagi, sulle cellule dendritiche e, infine, sulle cellule microgliali del SNC. La formazione del legame gp120 e recettore CD4 comporta una modificazione a livello della conformazione strutturale del complesso gp120-CD4, che provoca l’esposizione di un dominio specifico della gp120 al legame con i recettori delle chemochine (quelli più comunemente utilizzati dall’HIV sono il CCR5 e CXCR4) presenti sulla membrana cellulare.

Il doppio legame che si forma tra gp120, recettore CD4 e recettore delle chemochine, consente al peptide gp41 di formare un collegamento più stabile, che permette al virus di penetrare nella membrana cellulare, provocando la fusione del rivestimento virale con la membrana cellulare. Dopo la fusione dell’involucro virale con la membrana cellulare, il

nucleocapside del virus viene rilasciato nel citoplasma della cellula bersaglio e successivamente si ha la liberazione dell'RNA virale in un processo denominato uncoating. L'RNA virale funge da substrato per l'enzima trascrittasi inversa (RT), il quale promuove la sua conversione in DNA provirale a doppio filamento. La RT catalizza la trascrizione inversa dell'RNA virale in una doppia elica ibrida RNA-DNA, a partire da un frammento di RNA virale detto primer. Successivamente, attraverso il sito attivo della ribonucleasi H, la trascrittasi inversa scompone e degrada il filamento di RNA genomico dall'elica ibrida appena formata; mentre il sito attivo della polimerasi della RT, sintetizza il filamento di DNA complementare per costituire la doppia elica di DNA. Mediante l'azione dell'enzima integrasi (IN) il doppio filamento di DNA virale viene trasferito all'intero del nucleo cellulare e successivamente integrato nel genoma ospite. A questo punto del processo di replicazione l'HIV viene definito provirus.

La cellula infettata per esprimere il provirus e promuovere la sua replicazione deve trovarsi in uno stato attivato. Elementi cellulari come macrofagi, cellule T CD4+ e cellule microgliali infettati, ma quiescenti, rappresentano importanti serbatoi di HIV e garantiscono la sopravvivenza del nell'ospite per un tempo indeterminato.

Le cellule infette, una volta attivate, promuovono la trascrizione del DNA provirale in RNA messaggero (mRNA); quest'ultimo migra nel citoplasma dove si verifica la sintesi delle proteine strutturali per la formazione di nuovi virioni. I geni *pol* e *gag* (che codificano per proteine che costituiscono il nucleo della particella virale in maturazione) e il gene *env* (che codifica per le glicoproteine esposte sulla superficie esterna dell'involucro virale), inizialmente, codificano per molecole di grosse dimensioni che necessitano di essere tagliate dall'enzima proteasi per dare origine alle vere e proprie proteine virali.

Completato il clivaggio, la formazione di nuove particelle virali procede gradualmente: due filamenti di RNA virale si associano agli enzimi di replicazione, mentre le proteine del nucleo si assemblano fra loro formando il capsido del virus. Queste particelle immature migrano verso la superficie cellulare, dove viene completato il clivaggio, dando luogo a nuove particelle virali che per gemmazione vengono rilasciate nello spazio extracellulare.²¹

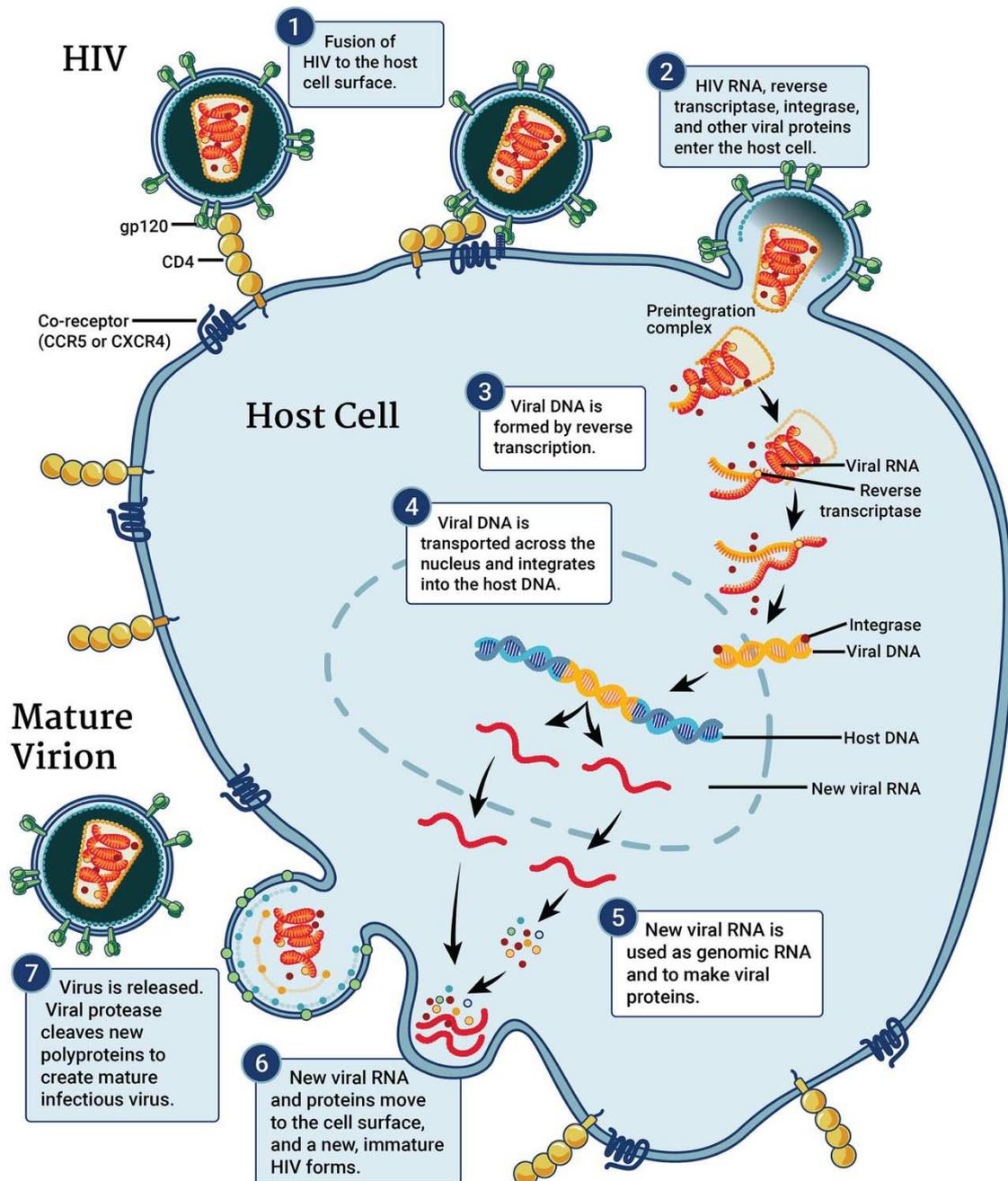


Figura 5. Schema ciclo replicativo HIV.²²

2.1.4 Modalità di trasmissione dell'HIV

Il virus dell'HIV non presenta elevata resistenza, infatti, viene facilmente inattivato a seguito dell'esposizione a comuni detergenti e/o disinfettanti e, inoltre, non può sopravvivere a lungo al di fuori del circolo ematico o del tessuto linfatico. Pertanto, risulta chiaro che la trasmissione del virus dell'HIV può avvenire solo in seguito all'esposizione diretta al sangue infetto (per esempio lo scambio di aghi) o altri liquidi biologici contaminati in presenza di danni alla mucosa (per esempio ulcerazioni della mucosa durante i rapporti sessuali). La

trasmissione del virus dipende da diversi fattori, riportati di seguito: proprietà biologiche del virus, concentrazione nel fluido biologico infetto e suscettibilità dell'ospite.

Il virus dell'immunodeficienza acquisita può essere trasmesso, da un individuo all'altro, mediante tre modalità:

- 1) Trasmissione ematica – questo tipo di trasmissione può avvenire tramite trasfusioni di sangue o emoderivati infetti da HIV, o tramite l'utilizzo di siringhe contaminate. La trasmissione ematica rappresenta la principale modalità di diffusione dell'infezione nei soggetti dediti all'uso voluttuario di sostanze stupefacenti per via endovenosa: la propagazione dell'infezione avviene attraverso la pratica, molto diffusa tra i consumatori di tali sostanze, di scambiarsi siringhe o altri strumenti per effettuare l'iniezione. Questi strumenti, se utilizzati da individui sieropositivi si contaminano e, in questo modo, il virus può essere trasmesso ad altri soggetti.

Oggi il rischio di contagio dovuto a questo tipo di trasmissione è stato fortemente ridotto, grazie alle pratiche di screening effettuate sulle unità di sangue e al trattamento con calore degli emoderivati. “Nel nostro Paese il rischio di contrarre l'HIV attraverso le trasfusioni è praticamente azzerato. Il sistema trasfusionale nazionale presenta alti livelli di qualità e sicurezza. [...] La trasmissione attraverso il sangue è ancora possibile nella popolazione dedita all'uso di sostanze a causa dello scambio di siringhe o la condivisione di strumenti per l'uso di sostanze psicoattive”.²³

- 2) Trasmissione materno-fetale (o trasmissione verticale) – il virus dell'HIV può essere trasmesso dalla madre infetta al figlio in tre situazioni cruciali: durante la gravidanza, durante il parto o durante l'allattamento. La probabilità per una donna infetta di trasmissione verticale è pari a circa il 20%. Attualmente tale rischio è stato ridotto al di sotto del 2%, grazie al trattamento con terapia antiretrovirale della madre durante la gravidanza e al figlio nelle prime 6 settimane di vita.
- 3) Trasmissione sessuale – la via sessuale rappresenta la modalità d'elezione per la diffusione del virus dell'HIV. Tutti i rapporti non protetti da un efficace metodo di prevenzione (sia omosessuali che eterosessuali) possono essere causa di trasmissione del virus. La trasmissione avviene per mezzo del contatto tra i liquidi biologici infetti (quali secrezioni vaginali, sperma, sangue) e mucose lesionate.²⁴

2.1.5 Patogenesi dell'infezione sostenuta da HIV

La prima fase che caratterizza il decorso dell'infezione virale viene definita infezione primaria o acuta da HIV. Nel caso in cui l'infezione venga trasmessa mediante rapporto eterosessuale (da uomo infetto a donna sana), che attualmente rappresenta la più comune via di trasmissione del virus a livello mondiale, il primo tessuto ad essere infettato è la mucosa della cervice. Le cellule dendritiche e i linfociti T CD4+, ordinariamente presenti a livello della mucosa, possono essere infettati dal virus, grazie alla capacità di quest'ultimo di penetrare all'interno delle cellule mediante i complessi peptidici presenti a livello dell'involucro esterno, e consentono la diffusione dell'HIV ai linfonodi regionali e successivamente al circolo sanguigno. A livello dei linfonodi regionali e del tessuto linfatico, che drena le mucose infette, la replicazione virale risulta essere accresciuta già dai primi stadi dell'infezione. Le cellule infette possono subire due destini diversi: andare incontro a lisi o fungere da serbatoi di infezione virale permanenti; questo rappresenta un grande ostacolo alla completa eradicazione dell'infezione, poiché consente al virus di persistere nell'organismo anche in presenza di efficaci regimi di trattamento antiretrovirale.

La presenza del virus dell'immunodeficienza è rilevabile nel circolo ematico, mediante la tecnica della PCR (Polymerase Chain Reaction), dopo una decina di giorni dalla contrazione dell'infezione. La comparsa della carica virale nel sangue scandisce un punto critico nella storia naturale dell'infezione da HIV, perché, in primis, indica che il soggetto contagiato ha acquisito potenzialmente la capacità di trasmettere l'infezione ad altri individui, e, inoltre, rappresenta il primo momento utile per diagnosticare l'infezione.

In questa fase dell'infezione i livelli di viremia aumentano rapidamente, fino ad arrivare ad un picco di 100 milioni di particelle virali per millilitro di sangue, numero elevatissimo destinato a scendere grazie allo sviluppo della risposta immunitaria dell'ospite che permette di controllare parzialmente la replicazione virale. Nelle settimane successive la viremia tende a decrescere progressivamente fino al raggiungimento di un livello inferiore costante, detto setpoint virale, o addirittura al di sotto del livello di rilevamento del virus. Inizialmente, il controllo e il contenimento della replicazione virale si ritiene essere collegati alla risposta immunitaria cellulo-mediata, innescata a seguito dell'interazione con l'agente virale.

La fase della sierconversione, ovvero della comparsa dei primi anticorpi specifici, avviene tra le 3 e le 5 settimane a partire dal primo giorno di esposizione al virus (mediamente trascorrono 22 giorni). L'intervallo di tempo che si estende tra il periodo in cui l'infezione è presente e la comparsa degli anticorpi viene denominato "periodo finestra" sierologico.

Durante i primi giorni/settimane dall'esposizione all'agente patogeno, la maggior parte dei soggetti contagiati presenta sintomatologia eterogenea ed aspecifica caratterizzata da sintomi simil-influenzali o simil-mononucleosi, con febbre, mialgia, sonnolenza, cefalea, rash cutaneo maculopapulare, linfadenopatia (ovvero ingrandimento delle stazioni linfonodali), faringite, malessere, perdita di peso e ulcerazioni a livello della mucosa orale o genitale. È stato riportato che gli individui contagiati che, nel corso della fase acuta, presentano sintomi più gravi e duraturi tendono a progredire più rapidamente verso la manifestazione dell'AIDS. La fase sintomatica dell'infezione acuta da HIV dura mediamente da 7 ai 10 giorni, fino ad un massimo di 14.

Successivamente l'insorgenza della fase acuta, poche settimane dopo il primo contatto con l'agente infettivo, si manifesta il cosiddetto periodo di latenza clinica, in cui la maggioranza degli individui contagiati entra in una fase clinicamente asintomatica, associata ad un calo dei livelli di viremia e caratterizzata dall'assenza di sintomi. Questa apparente neutralizzazione dell'infettività riflette l'azione antivirale esercitata dalla risposta immunitaria; tuttavia, l'HIV, grazie alla sua variabilità, persistenza e costante replicazione, è in grado di contrastare efficacemente l'azione antivirale messa in atto dall'organismo ospite, inducendo uno stato di infiammazione cronica a livello sistemico. Il periodo di latenza clinica è caratterizzato da un deterioramento del sistema immunitario e da una lenta, ma costante distruzione dell'architettura del sistema linfatico, conseguenza della replicazione virale e dell'attivazione cronica della risposta immunitaria. La progressione della malattia dipende dalla capacità dell'ospite di contenere la replicazione del virus e di ricostruire la struttura organizzativa del tessuto linfoide.

In assenza di meccanismi deputati alla contenimento del virus la patologia progredisce portando alla distruzione del sistema linfoide e alla compromissione del sistema immunitario, che determinano il rischio di insorgenza di patologie infettive opportunistiche sostenute da batteri, virus e parassiti; così si entra nella fase sintomatica della patologia detta AIDS. Le più comuni infezioni opportunistiche, che definiscono lo stadio dell'AIDS, sono causate da: *Microcystis carinii*, *Candida albicans*, Cytomegalovirus, Herpes zoster o parassiti enteropatici (specie *Criptosporidium* e *Giardia*, *Isospora belli*). Come conseguenza dello stato di immunodeficienza, è possibile che si presentino anche malattie di natura neoplastica, come il sarcoma di Kaposi, il carcinoma invasivo della cervice uterina e i linfomi Non-Hodgkin, i quali danneggiano gravemente l'organismo determinando un peggioramento nel decorso clinico della patologia.

In generale, gli individui affetti da AIDS in questa fase sintomatica presentano alcuni segni riconoscibili, tra cui edema linfonodale diffuso, forte riduzione del peso corporeo, febbre, sintomi respiratori e gastrointestinali.

Naturalmente, il decorso della malattia è estremamente variabile e dipende sia dalle proprietà biologiche del virus che dalla risposta antivirale messa in atto dall'ospite.²¹

Le attuali linee guida terapeutiche mondiali prevedono il trattamento di tutti i pazienti affetti da AIDS con una terapia altamente efficace, detta HAART (Highly Active Anti-Retroviral Therapy), a prescindere da sintomi, co-morbidità, viremia o conta delle cellule CD4+. L'odierno regime di HAART di prima linea prevede l'associazione di tre farmaci antiretrovirali, tra cui due inibitori nucleosidici della trascrittasi inversa (NRTI) più un inibitore non nucleosidico della trascrittasi inversa (NNRTI), un inibitore della proteasi (PI) o un inibitore del trasferimento del filamento dell'integrasi (INSTI).

Oggigiorni l'infezione da virus dell'immunodeficienza, grazie ai progressi nella terapia HAART, è considerata condizione gestibile, seppur cronica. L'attuale regime HAART ha consentito ai soggetti affetti da HIV di convivere con la patologia raggiungendo e mantenendo una soppressione virale duratura; gli individui che manifestano infezione da HIV-1 multiresistente non sempre sono in grado di raggiungere e mantenere una soppressione virale adeguata mediante trattamento con gli attuali antiretrovirali.

Nonostante i benefici raggiunti con la terapia HAART, è oggetto di preoccupazione la tendenza allo sviluppo di resistenza alle terapie attualmente disponibili.

I pazienti con infezione da HIV-1 multiresistente presentano un maggior rischio di fallimento del trattamento, e questo è correlato ad un rischio più elevato di andare incontro a morte; per cui risulta essenziale lo sviluppo di nuovi agenti antiretrovirali con un'elevata barriera genetica alla resistenza per sopperire all'eventuale presenza di multiresistenza, come gli anticorpi monoclonali.²⁵

2.2 Trattamento dell'infezione da HIV con ibalizumab

Nel 2018 è stato approvato dalla FDA l'ibalizumab (Trogarzo®), primo anticorpo monoclonale umanizzato per il trattamento dell'infezione da HIV-1, approvato successivamente, nel 2019, anche dalle autorità sanitarie dell'UE. Ibalizumab, in associazione ad uno più farmaci antiretrovirali, è indicato per il trattamento di soggetti adulti contagiati da HIV-1 multiresistente che hanno sperimentato con la terapia HAART un fallimento virologico, definito come incapacità di mantenere una carica virale di HIV inferiore a 200 copie/mL di sangue.

L'ibalizumab, nuovo anticorpo monoclonale, presenta un meccanismo d'azione singolare rispetto ai classici farmaci antiretrovirali, che consente di sopprimere efficacemente e durevolmente la replicazione virale, inoltre, permette di ripristinare e mantenere la funzione immunitaria nella popolazione di pazienti affetti da HIV-1 multiresistente. Trogarzo® rappresenta una plausibile opzione terapeutica per i soggetti con viremia rilevabile in corso. Ibalizumab viene somministrato sotto forma di infusione endovenosa. La prima infusione, nota come dose di carico, è di 2.000 mg e la sua durata non deve essere inferiore a 30 minuti; nel caso in cui non si verificano reazioni avverse associate all'infusione, la durata delle successive somministrazioni può essere ridotta fino a 15 minuti e la dose cosiddetta di mantenimento è di 800 mg con cadenza bisettimanale.²⁶

2.2.1 Proprietà farmacodinamiche di ibalizumab

L'ibalizumab agisce come inibitore del post-attaccamento impedendo al virus dell'HIV di infettare le cellule T CD4.

Ibalizumab impedisce l'ingresso del virus dell'immunodeficienza nelle cellule CD4, prevenendo le modificazioni conformazionali del complesso gp120-CD4, responsabili del legame con i co-recettori delle chemochine, e la successiva fusione della particella virale con la membrana della cellula ospite. Studi clinici hanno dimostrato che Trogarzo® si lega ad un epitopo localizzato nel dominio 2 della porzione extracellulare del recettore CD4; questo dominio è posizionato oppositamente al gp120 e al sito di legame del complesso maggiore di istocompatibilità di classe II (MHC-II), per cui non interferisce con l'immunità mediata da MHC-II. Ibalizumab forma una sorta di ostacolo sterico, che impedisce la modificazione conformazionale, quindi, impedisce all'HIV di entrare nella cellula CD4.

Ibalizumab previene anche la fusione tra cellule CD4 infette e non infette, indotta dal virus dell'immunodeficienza.²⁷

2.2.2 Proprietà farmacocinetiche di ibalizumab

A seguito della somministrazione di ibalizumab, secondo regime posologico raccomandato, la concentrazione sierica massima (C_{max}) aumenta proporzionalmente alla dose somministrata, mentre l'area sottesa la curva concentrazione-tempo aumenta in modo più che proporzionale.

Successivamente la somministrazione di una singola dose di carico di 2.000 mg e di una dose di mantenimento pari a 800 mg, ibalizumab raggiunge un livello di concentrazione plasmatica stazionario non inferiore a 30 $\mu\text{g/mL}$. Il tempo necessario per raggiungere la massima concentrazione plasmatica (T_{max}) è dose-dipendente ed è pari ad 1 ora, per la dose di carico, e a 10 minuti, per la dose di mantenimento.²⁷

La biodisponibilità, intesa come frazione di farmaco che raggiunge il circolo ematico immodificato, è per definizione pari al 100%, poiché trattasi di un medicinale somministrato per via endovenosa.

Il volume di distribuzione di ibalizumab è di circa 4,8 L, valore paragonabile al volume sierico, indice del fatto che probabilmente ibalizumab non si ripartisce nello spazio extravascolare.²⁸

Non sono stati condotti studi circa il metabolismo dell'ibalizumab, in quanto, trattandosi di una proteina, si ritiene che venga degradata in peptidi e amminoacidi.²⁶

Dopo la somministrazione di singole dosi di 10 e 25 mg/kg corporeo di ibalizumab, la clearance, definita come capacità dell'organismo di eliminare irreversibilmente un farmaco dalla circolazione sistemica, è rispettivamente di 0,5 e 0,36 mL/h/kg e l'emivita, ovvero il tempo necessario a ridurre del 50% la concentrazione plasmatica di un farmaco, è relativamente di 37,8 e 64,1 ore. Quando somministrato con dosaggio di mantenimento abituale, l'emivita oscilla tra le 72 e le 84 ore, quindi, si deduce che l'eliminazione è dose dipendente e non lineare.²⁸ La lunga emivita consente un intervallo di somministrazione prolungato.²⁷

Ibalizumab mostra effetti non lineari nella clearance, comuni alla classe farmacologia degli anticorpi monoclonali il cui target è rappresentato da molecole di superficie, come i recettori cellulari CD4. Questo tipo di molecole sono per definizione saturabili, cioè presentano una limitata capacità nella formazione dei legami farmaco-recettore che influenza l'eliminazione del medicinale, in questo caso del Trogarzo®.²⁶

La concentrazione di ibalizumab è inversamente proporzionale al peso corporeo; tuttavia, non si ritengono necessari aggiustamenti del dosaggio sulla base del peso poiché si ritiene non essere clinicamente significativo.

Non sono stati condotti studi formali sulle possibili interazioni di natura farmacologica, perché, in base al meccanismo d'azione di ibalizumab, non ci si attendono interazioni di questo tipo. Non è stato riscontrato alcun effetto antagonista tra ibalizumab e farmaci antiretrovirali, inoltre, non è stata registrata resistenza crociata tra le due tipologie di farmaco precedentemente citate. Studi clinici hanno dimostrato attività sinergica in vitro somministrando ibalizumab in associazione con enfuvirtide.²⁸

2.2.3 Test clinici

Sono stati condotti diversi studi clinici al fine di determinare lo schema posologico e per valutare efficacia e sicurezza di ibalizumab nella riduzione della viremia in pazienti infetti da HIV-1 multiresistente.²⁸

Studi clinici di fase II

Il potenziale di ibalizumab per il trattamento dell'infezione da virus dell'immunodeficienza multiresistente è stato inizialmente dimostrato in due studi randomizzati, in doppio cieco di fase II: TNX-355.03 e TMB-202.²⁷

Lo studio TNX-355.03 ha analizzato un campione di 82 adulti (età > 18 anni), costituito da 71 maschi e 11 femmine, con infezione da HIV-1 multiresistente per 48 settimane. In questo studio sono stati inclusi pazienti per cui si è mostrato fallimentare il trattamento con almeno 3 classi di antiretrovirali, con una carica virale non inferiore a 10.000 copie/mL e con una conta dei CD4 di almeno 50 cellule/mm³ (o μ L) di sangue. L'end-point primario fissato era la riduzione media della carica virale dal basale dopo la ventiquattresima settimana.

I partecipanti sono stati randomizzati e suddivisi in due gruppi; ciascun gruppo è stato trattato con un regime posologico differente: un gruppo riceve ibalizumab ad un dosaggio pari a 10 mg/kg corporeo settimanalmente per 8 settimane e successivamente con cadenza bisettimanale, mentre l'altro gruppo viene trattato con ibalizumab in concentrazione pari a 15 mg/kg corporeo ogni 2 settimane o placebo. Tutti i partecipanti hanno ricevuto un OBR, ovvero una terapia di base ottimizzata, costituito da almeno 1 farmaco che abbia dimostrato suscettibilità all'HIV.²⁸

Alla settimana numero 24, entrambi i gruppi trattati con l'anticorpo monoclonale hanno registrato riduzioni significative dei livelli di carica virale rispetto al basale pari a 1,16 log₁₀ copie/mL con il regime di ibalizumab 10 mg/kg, 0,95 log₁₀ copie/mL con ibalizumab 15 mg/kg ogni 15 giorni contro 0,20 log₁₀ copie/mL con placebo.²⁷

Inoltre, con il regime posologico di 10 mg/kg settimanale per 8 settimane, seguito da 10 mg/kg ogni 15 giorni si è osservato un aumento della conta assoluta dei CD4 da 299

cellule/mm³ a 347 cellule/mm³ trascorse le 48 settimane, mentre per il sistema di somministrazione di 15 mg/kg ogni 2 settimane si è registrato un aumento nella conta dei CD4 da 223 cellule/mm³ a 274 cellule/mm³ a 48 settimane.²⁸

I risultati si sono dimostrati essere costanti per 48 settimane.²⁷

Nello studio TMB-202 sono stati arruolati 113 adulti (101 maschi e 12 femmine) con infezione da HIV-1 multiresistente che presentavano le seguenti caratteristiche: livello di HIV-1 RNA (carica virale) uguale o superiore a 1.000 copie/mL e resistenza documentata a più di un antiretrovirale tra NRTI, NNRTI o PI.

Anche in questo studio i partecipanti sono stati randomizzati e suddivisi in due gruppi: il primo gruppo è stato trattato con ibalizumab 800 mg con cadenza bisettimanale, mentre il secondo gruppo riceve 2.000 mg di ibalizumab ogni 4 settimane. Come nel caso precedente anche in questo trial tutti i partecipanti ricevono un OBR.

La carica virale media registrata al basale è di 124.859,8 copie/mL e la conta media di CD4 è di 109 cellule/mm³.

La riduzione della carica virale ad un valore inferiore a 50 copie/mL (end-point primario) è stato raggiunto in 26 partecipanti appartenenti al primo gruppo (44%), trattato con ibalizumab in dosaggio pari a 800 mg ogni 2 settimane, e in 15 membri del secondo gruppo (28%), che hanno ricevuto 2.000 mg di ibalizumab ogni 4 settimane trascorse 24 settimane. La riduzione media dell'RNA HIV-1 alla ventiquattresima settimana rispetto al basale nei due gruppi è stata di rispettivamente 1,6 log₁₀ copie/mL nei pazienti afferenti al primo gruppo e di 1,5 log₁₀ copie/mL per i pazienti appartenenti al secondo gruppo.

Gli aumenti della conta dei CD4 registrati in ciascun gruppo sono rispettivamente di 37 e 40 cellule/mm³.²⁸

Sulla base degli esiti dello studio TMB-202 è stata stabilito l'attuale schema posologico che prevede una singola dose di carico pari a 2.000 mg, che permette di raggiungere un'esposizione al farmaco più rapida, e dose di mantenimento di 800 mg ogni 2 settimane, la quale fornisce un'esposizione al farmaco più stabile.²⁷

Studi clinici di fase III

L'efficacia terapeutica di ibalizumab in pazienti con virus dell'HIV-1 multiresistente è stata valutata da uno studio di fase III (TMB-301), condotto in aperto. Per questo studio sono stati arruolati 40 pazienti adulti (34 maschi e 6 femmine) con infezione da HIV-1 multiresistente che avevano già sperimentato terapia HAART per almeno 6 mesi, con resistenza documentata ad almeno un farmaco antiretrovirale di almeno 3 classi terapeutiche di antiretrovirali e presentanti carica virale non inferiore a 1.000 copie/mL.²⁷ L'età mediana

dei partecipanti è di 53 anni, la carica virale media è di $4,5 \log_{10}$ copie/mL e la conta media dei CD4 è di 150 cellule/mm^3 .²⁸

Lo studio viene suddiviso in diversi periodi:

- 1) Periodo di controllo (giorni 0 – 6) – durante questo intervallo di tempo i pazienti vengono monitorati mentre ricevono il proprio regime HAART;
- 2) Periodo di monoterapia funzionale (giorno 7 – 13) – il giorno 7 i partecipanti ricevono una dose di carico di 2.000 mg di ibalizumab per via endovenosa in aggiunta alla HAART;
- 3) Periodo di mantenimento (giorno 14 – settimana 25) a partire dal giorno 14 i pazienti ricevono un regime di base ottimizzato (OBR) e successivamente dal ventunesimo giorno i pazienti ricevono ibalizumab 800 mg per via endovenosa con cadenza bisettimanale.²⁸

L'end-point primario consiste nella misurazione della proporzione di pazienti che registrano una diminuzione della carica virale di almeno $0,5 \log_{10}$ copie/mL trascorsi 14 giorni (quindi una settimana dopo la somministrazione della dose di carico). La percentuale di partecipanti in cui è stata osservata una diminuzione del livello di RNA HIV-1 di almeno $0,5 \log_{10}$ copie/mL durante il periodo di monoterapia funzionale rispetto al periodo di controllo è dell'83%, quindi clinicamente significativa.

Gli end-point secondari comprendono le variazioni medie della carica virale durante i diversi periodi di studio e le variazioni medie della conta dei CD4. Alla settimana 25 la diminuzione media della carica virale è stata di $0,0 \pm 0,2 \log_{10}$ copie/mL durante il periodo di controllo, $1,1 \pm 0,6 \log_{10}$ copie/mL durante il periodo di monoterapia funzionale e di $1,6 \pm 1,5 \log_{10}$ copie/mL; mentre l'aumento medio della conta dei CD4 è di 62 cellule/mm^3 .

Grazie a questo studio è stato possibile dimostrare che l'anticorpo monoclonale ibalizumab è dotato di una potente attività antivirale nei pazienti adulti con infezione da virus dell'immunodeficienza multiresistente, in quanto ha determinato una diminuzione clinicamente significativa della carica virale e un aumento della conta dei CD4 rispetto al livello basale.

Questo trial presenta alcuni limiti, tra cui la modesta dimensione del campione, la scarsa rappresentazione del genere femminile, la mancanza di un gruppo di controllo e la breve durata del follow-up.²⁸

Nella conduzione dello studio TMB-311 sono state arruolate due coorti di pazienti: la coorte 1 includeva i soggetti con infezione da HIV-1 multiresistente che avevano già ricevuto precedentemente ibalizumab negli studi TMB-202 e TMB-301; mentre per la coorte 2 sono stati selezionati individui adulti con infezione da virus dell'immunodeficienza

multiresistente, naïve al trattamento con ibalizumab, con un livello di carica virale superiore a 1.000 copie/mL (durante il trattamento con terapia HAART), resistente ad almeno un antiretrovirale da 3 classi terapeutiche diverse e suscettibile ad almeno un farmaco antiretrovirale.

I 12 partecipanti inclusi nella coorte 1, provenienti dallo studio TMB-202, hanno proseguito il trattamento con ibalizumab con una dose di mantenimento di 800 mg ogni 2 settimane o 2.000 mg ogni 4 settimane, e per tutti e 12 gli individui, al momento dell'ultima visita di TMB-311, è stata registrato un livello di carica virale inferiore a 50 copie/mL; i 27 soggetti selezionati dal trial clinico TMB-301 hanno continuato a ricevere una dose di mantenimento di ibalizumab di 800 mg ogni 2 settimane, in associazione con un OBR (anche sperimentale). Di questi 27 individui, 16 (59%) mostravano un livello di RNA HIV-1 inferiore a 50 copie/mL alla settimana 24 e 48 e 15 (56%) manifestavano un livello di viremia inferiore a 50 copie/mL alla settimana 96. Alle settimane 24 e 48 la riduzione mediana della carica virale, rispetto al basale, è stata di 2,5 log₁₀ copie/mL, mentre alla settimana 96 la riduzione registrata è stata di 2,8 log₁₀ copie/mL. L'aumento mediano della conta delle cellule CD4+, alla settimana 25, è stato di 42 cellule/mm³ e di 45 cellule/mm³ alla settimana 96.

I partecipanti inclusi nella coorte 2 (n=38), agli esordi dello studio clinico, presentavano una carica virale mediana di 4,7 log₁₀ copie/mL e una conta cellulare mediana di CD4 di 26 cellule/mm³. Questo gruppo è stato trattato inizialmente con una dose di carico di Ibalizumab 2.000 mg, somministrata per via endovenosa, e, successivamente, con una dose di mantenimento di 800 mg ogni 2 settimane, in associazione ad un OBR dall'inizio della terapia. Nel 76% dei pazienti appartenenti alla coorte 2 si è verificata una riduzione superiore a 0,5 log₁₀ copie/mL della carica virale, al giorno 7. Alle settimane 24 e 48 si è registrata una riduzione mediana della viremia pari a 2,6 log₁₀ copie/mL. 11 (46%) dei 24 pazienti che hanno completato le 24 settimane di trattamento presentava una carica virale inferiore a 50 copie/mL alla ventiquattresima settimana. Dei 17 partecipanti che hanno concluso il trattamento di 48 settimane, 8 (47%) mostravano una carica virale inferiore a 50 copie/mL alla fine di tale percorso.

Quindi, complessivamente 39 (51%) dei 77 individui arruolati nello studio TMB-311, presentavano, alla 24esima settimana, un livello di viremia inferiore a 50 copie/mL. Da questo studio si evince che l'ibalizumab, in associazione con un OBR, è in grado di ridurre la carica virale e aumentare la conta dei CD4 in pazienti con infezione da HIV-1 multiresistente; tuttavia, presenta dei limiti, tra cui la scarsa dimensione del campione, l'assenza di un gruppo di controllo, l'uso di altri agenti sperimentali e l'elevato numero di ritiri prima della conclusione dello studio.²⁸

Studi di efficacia nel mondo reale

L'efficacia antivirale di ibalizumab è stata confermata anche dai dati preliminari provenienti da uno studio osservazionale retrospettivo condotto nel mondo reale, in cui sono stati inclusi 9 pazienti provenienti da 7 centri medici di infusione negli Stati Uniti. I partecipanti erano caratterizzati da infezione da HIV-1 multiresistente, avevano un'età media di 48 anni ed erano stati trattati con la dose di carico di 2.000 mg di ibalizumab, seguita dalla dose di mantenimento di 800 mg con cadenza bisettimanale per 4-43 settimane (mediana = 33 settimane). Inoltre, presentavano un livello di carica virale media di 4,9 log₁₀ copie/mL e una conta media dei CD4 pari a 49 cellule/mm³. La riduzione mediana dell'RNA HIV-1 è stata rispettivamente di 2,7 log₁₀ copie/mL a 4-10 settimane dall'inizio dello studio, 1,6 log₁₀ copie/mL a 14-22 settimane, 0,07 log₁₀ copie/mL a 24-37 settimane e 1,6 log₁₀ copie/mL a 40-58 settimane. Il 75% dei pazienti ha riportato una diminuzione della carica virale di oltre 0,5 log₁₀ copie/mL a 4-10 settimane dall'inizio del trattamento, con una riduzione media di 2,1 ± 1,8 log₁₀ copie/mL. La conta media dei CD4 tra le settimane 4-10, 14-22 e 24-38 sono rispettivamente di 65 ± 57 cellule/mm³, 96 ± 61 cellule/mm³, 88 ± 82 cellule/mm³.²⁸

Sicurezza e tollerabilità

Ibalizumab è stato generalmente ben tollerato nei pazienti con infezione da HIV-1 multiresistente.

La somministrazione di ibalizumab può comportare lo sviluppo di reazioni di ipersensibilità che possono manifestarsi con sintomi come dispnea, angioedema, respiro sibilante, dolore toracico, costrizione toracica, vampate di calore, nausea e vomito. Nel caso in cui comparisse la sintomatologia appena descritta è necessario interrompere la terapia, per dare spazio ad un trattamento adeguato. L'ibalizumab, come altri antiretrovirali, può dare luogo alla sindrome infiammatoria da immunoricostruzione e, inoltre, essendo un farmaco di derivazione biotecnologica, è potenzialmente immunogenico.

I dati, rilevati dagli studi clinici precedentemente citati, indicano che ibalizumab è sicuro e ben tollerato. Le reazioni avverse più comuni registrate negli studi clinici sono state diarrea, vertigini, nausea ed eruzioni cutanee.

Le anomalie da laboratorio più frequentemente registrate sono state l'aumento della creatinina sierica, iperbilirubinemia, elevati livelli di lipasi, leucopenia e neutropenia.

Nello studio di fase II TMB-202 sono stati segnalati tra gli eventi avversi più comuni: eruzioni cutanee, diarrea, mal di testa, infezioni delle vie respiratorie superiori, nausea e affaticamento. Tra i pazienti trattati con ibalizumab nello studio di fase II TMB-202, un partecipante ha sviluppato anticorpi anti-ibalizumab, dovuto al carattere immunogenico

dell'anticorpo monoclonale; l'emergere di anticorpi anti-ibalizumab non ha compromesso l'efficacia del trattamento terapeutico con ibalizumab nel soggetto.

Nel caso dello studio TMB-301, l'80% dei pazienti arruolati ha mostrato l'insorgenza di eventi avversi, di cui la maggior parte di entità lieve o moderata. In 9 partecipanti (23%) si sono verificati eventi avversi gravi, tra cui sarcoma di Kaposi, ipertensione polmonare, shock settico, infezione del tratto urinario, stato mentale alterato, massa epatica, emorragia rettale, insufficienza epatica, linfoma, diplopia, ipertensione polmonare, leucoencefalopatia multifocale progressiva, carcinoma al retto, astenia e viremia da citomegalovirus; mentre gli eventi avversi più comuni sono stati diarrea, vertigini, affaticamento, nausea, ipertensione, eruzione cutanea, vomito, linfadenopatia e nasofaringite.

La sindrome infiammatoria da immunoricostruzione è stata rilevata in soli 2 dei 153 partecipanti arruolati negli studi TMB-202 e TMB-301, che si è manifestata come un'acutizzazione dell'infezione cutanea da criptococco e della leucoencefalopatia multifocale progressiva.

Nella coorte 2 dello studio di fase III TMB-311 gli eventi avversi segnalati più frequentemente sono stati diarrea, mal di testa, tosse affaticamento, nausea ed eruzione cutanea. Un solo partecipante ha sviluppato sindrome infiammatoria da immunoricostruzione correlata alla somministrazione di ibalizumab.

In entrambi gli studi di fase III (TMB-301 e TMB-311) non sono state riportate segnalazioni di reazioni al sito di infusione o sviluppo di anticorpi anti-ibalizumab da parte del sistema immunitario endogeno.

Nello studio condotto nel mondo reale si sono verificati eventi avversi in 8 partecipanti su 9, tra i più comuni sono stati segnalati eruzione cutanea, diarrea e dolore addominale.²⁸

Conclusioni

Ibalizumab rappresenta un'alternativa efficace, sicura e relativamente ben tollerata in combinazione con un OBR, per i pazienti affetti da HIV-1 multiresistente, rispetto all'attuale regime HAART. La combinazione di ibalizumab con un OBR si è mostrata particolarmente valida per i pazienti con HIV-1 multiresistente che non sono in grado di ottenere e mantenere la soppressione virale con la sola HAART orale, e che sono in grado di aderire alla terapia infusione ogni due settimane. In tali soggetti, la sopravvivenza a 5 anni è aumentata dal 38% con solo OBR al 47% con ibalizumab in combinazione a OBR.

Sebbene la somministrazione di ibalizumab abbia mostrato diversi vantaggi, sono emerse diverse preoccupazioni circa il suo utilizzo, in quanto l'approvazione di questo mAb si è basata su studi di fase III caratterizzati da campioni a numerosità ridotta, con una limitata

rappresentanza di soggetti di sesso femminile e senza il confronto con un gruppo di controllo per la valutazione della risposta virologica a lungo termine. Inoltre, la mancata aderenza alla terapia da parte del paziente rappresenta un ostacolo al raggiungimento della soppressione virale, in aggiunta può rivelarsi pericoloso perché le mancate iniezioni possono potenzialmente provocare la comparsa di nuovi ceppi di HIV più resistenti.

Tuttavia, l'FDA prima e successivamente l'EMA, hanno deciso di approvare tale medicinale, poiché la popolazione di pazienti affetti da HIV-1 multiresistente non ha alternative terapeutiche e presenta un alto rischio di mortalità. Sono necessari i dati post-marketing per definire il profilo di sicurezza di ibalizumab.

Uno dei problemi cruciali delle terapie a base di anticorpi monoclonali per il trattamento delle malattie rare è il costo elevato: il costo medio all'ingrosso per una fornitura di 28 giorni di ibalizumab di mantenimento è di 8.929,84 \$, a fronte di un costo medio per una fornitura di 28 giorni di un regime antiretrovirale orale completo è di 3.626,84 \$. Quindi il costo può rappresentare un ostacolo per molti pazienti affetti da tale patologia.²⁸

In conclusione, nonostante gli attuali studi suggeriscano ibalizumab come opzione preziosa per il trattamento dell'infezione da HIV-1 multiresistente, per la quale le alternative terapeutiche sono molto limitate, sono necessari ulteriori dati e approfondimenti post-marketing per confermarne con certezza efficacia e sicurezza.²⁷

3. Ebolavirus

3.1 Introduzione

3.1.1 Epidemiologia

La scoperta dell'ebolavirus risale al 1976, quando venne descritta, per la prima volta, la patologia da ebola virus nei pressi del fiume Ebola situato nell'attuale Repubblica Democratica del Congo.²⁹

La famiglia Filoviridae, dell'ordine Mononegavirales, comprende tre generi di virus, tra cui il genere Ebolavirus, il quale è articolato in cinque specie: Taï Forest ebolavirus (TAFV), Reston ebolavirus (RESTV), Sudan ebolavirus (SUDV), Bundibugyo ebolavirus (BDBV) e Zaire ebolavirus (EBOV).³⁰

Il tasso di mortalità complessivo, ovvero la percentuale dei decessi registrati rispetto al totale dei soggetti ammalati, degli Ebolavirus precedentemente elencati fluttua tra il 40 e il 50%; dai dati statistici non è possibile rilevare se un Ebolavirus sia più pericoloso (in termini di mortalità) di un altro.

La maggior parte dei focolai da ebolavirus, fino al 2013, provenivano dall'Africa centrale, in particolare dalla Repubblica Democratica del Congo, Repubblica del Congo e Gabon. EBOV è responsabile del più grande focolaio di ebolavirus mai registrato ad oggi e si è esteso alla Guinea e ad altri paesi dell'Africa occidentale con casi descritti anche in altri Paesi come Italia, Spagna, Regno Unito, USA, provocando 28.652 infezioni e circa 11.325 decessi, tra la fine del 2013 e l'inizio del 2016.

Inizialmente l'epidemia da ebolavirus era stata sottovalutata dalle organizzazioni locali, nazionali ed internazionali, poiché EBOV era considerato un agente patogeno esotico, quindi, non potenzialmente pericoloso per la salute pubblica globale; solo successivamente alla dichiarazione, da parte dell'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità), dell'epidemia da ebolavirus come emergenza sanitaria pubblica di interesse internazionale, le azioni globali e locali si sono incrementate al fine di arginare l'epidemia. Nonostante ciò, l'epidemia da ebolavirus ha devastato individui, intere famiglie, comunità, sistemi sanitari ed economici.

Dal 1976 sono stati identificati almeno 17 focoli di EBOV che hanno avuto origine in Gabon, Guinea, Repubblica del Congo e Zaire (o Repubblica Democratica del Congo). Ad oggi sono state registrate complessivamente 33.604 infezioni da EBOV nell'uomo con circa 14.742 decessi.

Tuttavia, il rischio dello sviluppo di epidemie da ebolavirus nei paesi sviluppati è relativamente basso, grazie alle misure di prevenzione e controllo delle infezioni e al tracciamento dei contatti.³¹

3.1.2 Morfologia strutturale di EBOV

Il virus ebola è un virus a RNA a un singolo filamento negativo, caratterizzato da 7 geni codificanti, separati da regioni intergeniche, di lunghezza variabile, non codificanti.

Le particelle di EBOV hanno un diametro di circa 80 nm e lunghezza variabile (fino a 14.000 nm), inoltre, presentano una morfologia filamentosa peculiare a forma circolare, di “U” o a numero 6.

Il genoma del virus dell’ebola codifica per 7 proteine strutturali, la cui combinazione da origine al nucleocapside:

- 1) Quattro proteine del nucleocapside (VP24, VP30, VP35 e VP40) – VP30 contribuisce all’assemblaggio, liberazione del virione e trascrizione del genoma, mentre le altre 3 (VP24, VP35 e VP40) rivestono un ruolo cruciale nella strategia virale di evasione dalla risposta immunitaria.
- 2) Nucleoproteina NP – implicata nei processi di replicazione e trascrizione del genoma;
- 3) Glicoproteina GP – svolge un ruolo essenziale nelle fasi adsorbimento e penetrazione del virus nelle cellule bersaglio;
- 4) RNA polimerasi-RNA dipendente (proteina L) – appartiene al complesso enzimatico della polimerasi.³²

Le proteine NP, VP30, VP35 e proteina L formano il complesso ribonucleoproteico virale (RNP) e sono essenziali nelle fasi di trascrizione e replicazione del genoma. In particolare, NP protegge l’RNA dalla degradazione e rappresenta un componente importante del complesso ribonucleoproteico virale, VP35 è un cofattore essenziale per il corretto funzionamento della polimerasi, VP30 svolge l’azione di attivatore trascrizionale, contribuisce alla trascrizione e interviene per correggere eventuali errori genici rinvenuti all’interno del genoma e la RNA polimerasi-RNA dipendente trasporta i domini funzionali enzimatici per la trascrizione e replicazione del genoma.

Le altre proteine strutturali, tra cui la VP40, VP24 e glicoproteina GP svolgono delle funzioni accessorie: VP40 è la proteina della matrice associata alla membrana, responsabile della struttura filamentosa del virus e del collegamento che si instaura tra il nucleocapside virale e la membrana lipidica della cellula ospite, inoltre, media la gemmazione delle particelle virali dalle cellule infette; VP24 svolge un ruolo centrale nell’assemblaggio di

RNP; infine, la GP, inserita nel nucleocapside come glicoproteina transmembrana, media l'ingresso del virus nella cellula bersaglio attraverso il legame con i recettori dell'ospite e la successiva fusione all'interno dell'endosoma.³⁰

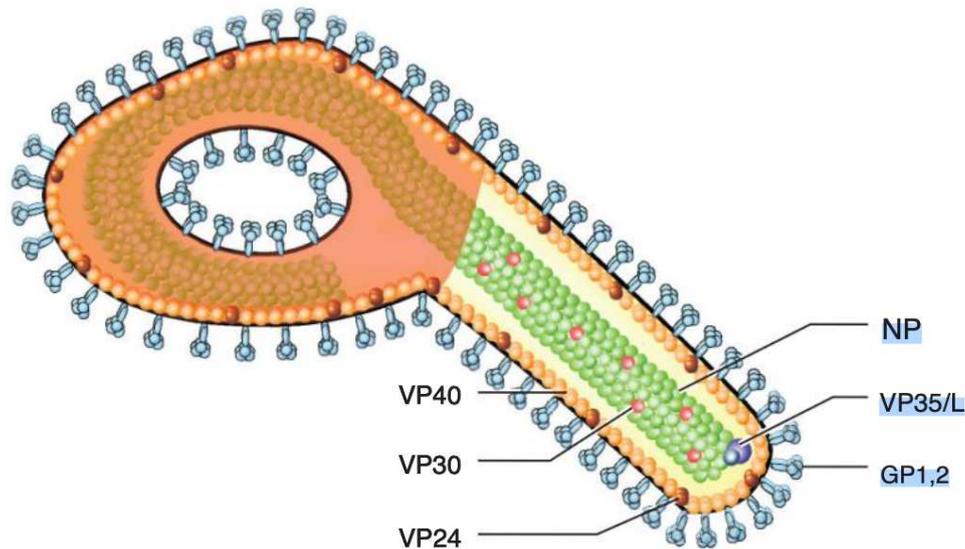


Figura 6. Rappresentazione struttura ebola virus.³⁰

3.1.3 Replicazione del virus dell'ebola

Il primo passo del ciclo replicativo di EBOV è l'attaccamento alla membrana della cellula ospite e la successiva penetrazione. Questo meccanismo è ancora parzialmente sconosciuto, ma si ritiene che GP sia coinvolta nell'ingresso delle particelle virali nella cellula ospite mediante meccanismi diversi, tra cui macropinocitosi, endocitosi mediata da clatrina o legame al recettore facilitato dalla glicoproteina.

La GP viene scissa in due subunità GP1 e GP2, che assolvono diverse funzioni: GP1 è implicata nell'attacco della particella virale alla membrana cellulare, mentre GP2 interviene nella fusione virale con la membrana ospite.³³ Per merito di questa elaborazione proteolitica le particelle virali sono in grado di interagire con la proteina Niemann-Pick C1 (NPC1), trasportatore intracellulare del colesterolo (noto anche come recettore della proteina C1), il quale induce la fusione della membrana endosomiale dell'ospite consentendo il rilascio prima del nucleocapside e successivamente dell'RNP nel citoplasma, dove viene avviata la trascrizione primaria.³⁰

L'RNA genomico viene utilizzato come modello per la trascrizione e la sintesi di mRNA, il quale viene successivamente tradotto, dal processo di traduzione cellulare, nelle proteine

virali. La proteina VP30 sembra essere coinvolta nell'avvio della trascrizione, per questo motivo rappresenta un potenziale candidato come target di terapia antivirale.³³

Successivamente viene avviato il processo di replicazione del genoma virale, il quale si verifica nei cosiddetti corpi di inclusione; il nuovo filamento di RNA viene trasportato, sotto forma di nucleocapsidi, a livello della superficie cellulare, dove viene confezionato in virioni con le proteine virali e poi rilasciato per gemmazione.³¹

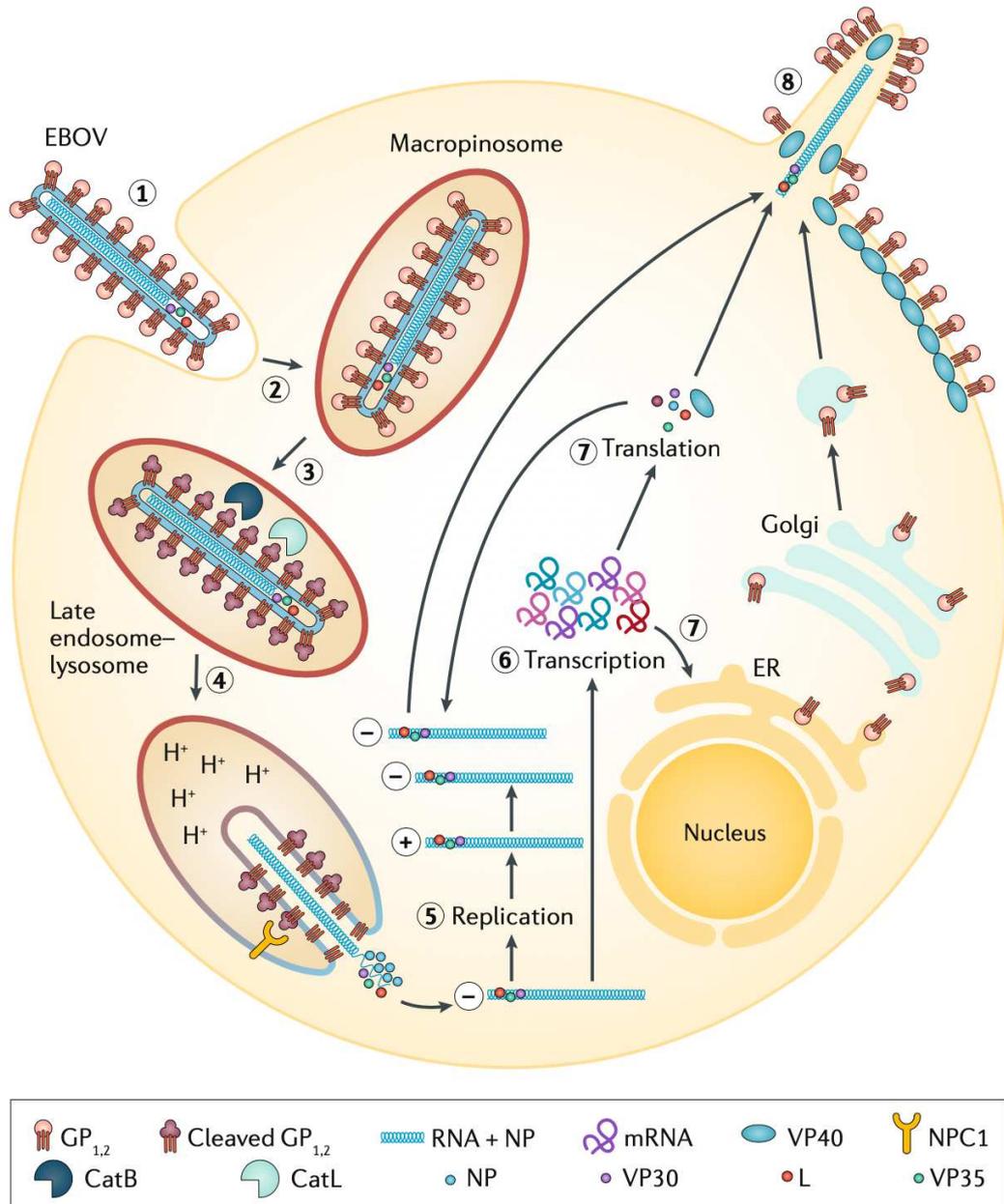


Figura 7. Rappresentazione schematica del ciclo replicativo del virus EBOV.³¹

3.1.4 Modalità di trasmissione di EBOV

La patologia causata dal virus dell'ebola è una zoonosi, infatti, ogni focolaio verificatosi nella popolazione umana è dovuto all'introduzione del virus da un serbatoio animale attraverso il contatto diretto con sangue, secrezioni o altri fluidi corporei di animali infetti. Nel continente africano l'infezione è stata rilevata in alcuni animali, tra cui scimpanzé, gorilla, pipistrelli della frutta, scimmie, antilopi di foresta e isticri; tuttavia, la modalità di trasmissione dal serbatoio primario (ignoto) alla specie umana rimane sconosciuta.

Il virus EBOV si diffonde nella comunità tramite l'esposizione di lesioni cutanee o mucose a fluidi o tessuti corporei infetti oppure per contatto indiretto con ambienti contaminati, in quanto le particelle virali di EBOV sopravvivono su superfici inanimate per giorni o settimane. Nonostante ciò, il contatto diretto con materiale infettivo è associato ad un maggior rischio di contrarre l'infezione.

Il virus dell'ebola è stato rilevato, oltre che nel sangue e nei componenti emoderivati, nel latte materno, nella saliva, nelle urine, nel liquido seminale, nel liquido cerebrospinale, nell'umor acqueo e nelle lacrime. L'EBOV risulta essere infettivo anche per via transplacentare, quindi può essere trasmesso dalla madre gravida infetta al feto, e ciò è associato ad un'elevata letalità in utero o neonatale.³⁴

Assistere un soggetto con infezione da EBOV, senza adottare le necessarie misure di precauzione e contenimento per il controllo delle infezioni, o eseguire le cerimonie funebri tradizionali, che prevedono il contatto con il corpo del defunto, aumenta significativamente la probabilità di contrarre l'infezione.

Sebbene rara, la trasmissione sessuale di EBOV è stata fortemente sospettata durante l'epidemia da ebolavirus nell'Africa occidentale, al punto che l'OMS raccomanda ai soggetti di sesso maschile convalescenti da patologia da EBOV, di mantenere elevati livelli di igiene personale e consumare rapporti sessuali protetti nei 12 mesi successivi la comparsa dei sintomi.³¹

3.1.5 Patogenesi e manifestazioni cliniche dell'infezione da ebola virus

Dopo l'ingresso delle particelle virali nell'organismo ospite, attraverso abrasioni delle mucose o della cute, EBOV colpisce principalmente le cellule dendritiche e altre cellule della linea monocitica/macrofagica. Queste cellule infettate vengono trasportate, attraverso i vasi linfatici, ai linfonodi, dove avviene la replicazione e la successiva diffusione del virus.³⁰ Oltre le cellule precedentemente citate, il virus dell'ebola è in grado di infettare e uccidere un'ampia gamma di cellule, tra cui epatociti, fibroblasti, cellule endoteliali, cellule

epiteliali, cellule della milza e cellule della ghiandola surrenale.³³ Nei 3 giorni successivi la comparsa dei sintomi la carica virale, dosata mediante PCR della trascrittasi inversa, aumenta in modo esponenziale nel sangue da livelli non rilevabili fino a superare il valore di 10^5 particelle virali/mL.

La replicazione e la distribuzione sistemica dei virioni si basano sull'efficace evasione della risposta immunitaria ospite, obiettivo raggiunto tramite la messa in atto di diversi meccanismi, tra cui l'antagonismo alla risposta dell'interferone di tipo 1 (molecola in grado di regolare le funzionalità del sistema immunitario) mediata dalla proteina strutturale VP35, l'aumento dell'espressione delle proteine virali mediata dalla proteina VP24, l'antagonismo di un fattore di restrizione antivirale cellulare mediata dalla GP e infine la capacità di distruggere o uccidere le cellule immunitarie dell'ospite mediata da VP40.

Quindi, i meccanismi in grado di provocare danno agli individui con infezione da EBOV sono molteplici, tra questi ritroviamo effetti citopatici diretti mediati dalla GP virale, danno d'organo indiretto mediato da risposte infiammatorie dell'ospite, disfunzione endoteliale e coagulazione disordinata.³⁰

In vitro, i macrofagi infetti, a seguito l'interazione con la GP 1,2 posta sull'envelope di EBOV, vengono stimolati a secernere citochine pro-infiammatorie, tra cui IL-1 β , IL-6 e IL-8 e TNF (Tumor Necrosis Factor). La secrezione di questi fattori incentiva il reclutamento di ulteriori macrofagi nel sito di infezione e provoca la rottura delle barriere endoteliali; questa lacerazione determina l'eccessiva fuoriuscita di fluido intravascolare negli spazi interstiziali causando edema e shock ipovolemico.³¹

Le cellule dendritiche contrastano l'infezione da EBOV con diversi meccanismi: soppressione parziale delle risposte del complesso maggiore di istocompatibilità di classe II, aumento della produzione di chemochine e soppressione della secrezione di citochine pro-infiammatorie.³⁰

Le infezioni da ebolavirus sono caratterizzate da una sintomatologia paragonabile, ma gravità, decorso clinico e tasso di mortalità sono influenzati dalla specie virale responsabile dell'infezione.

I sintomi dell'infezione si manifestano dopo un periodo di incubazione di 4-10 giorni, con un'insorgenza improvvisa di sintomi simil-influenzali (febbre, mialgia e brividi), vomito e diarrea. In genere, le condizioni del paziente evolvono con decorso clinico rapido e la fase successiva della malattia è caratterizzata da complicanze emorragiche, ipotensione, disturbi della coagulazione e insufficienza multiorgano.³³

I soggetti infetti possono presentare diversi disturbi, tra cui sintomi gastrointestinali (con nausea, mal di stomaco, vomito e diarrea), sintomi neurologici (mal di testa, debolezza

profonda e coma), sintomi respiratori (tosse, dispnea e rinorrea) e sintomi generalizzati correlati a insufficienza del sistema cardiovascolare con conseguente shock e edema.

Le alterazioni ematologiche più frequenti sono leucopenia e linfopenia, con diminuzione della conta dei neutrofili e aumento degli enzimi epatici; i pazienti infetti da ebolavirus, con la progressione della malattia, sviluppano trombocitopenia e allungamento del tempo di protrombina.

I segni più comunemente riportati in letteratura sono febbre associata ad anoressia, astenia e rash maculopapulare che si manifestano tra il quinto e il settimo giorno dall'esordio della malattia.³⁵

I pazienti che presentano una sintomatologia conclamata generalmente soccombono tra il sesto e il sedicesimo giorno dall'insorgenza dei sintomi, a causa di shock, emorragia e insufficienza multiorgano. Nei casi di guarigione, il miglioramento clinico si verifica in concomitanza allo sviluppo e alla produzione della risposta anticorpale da parte dell'organismo. Nonostante la convalescenza rappresenti una possibile eventualità, possono persistere sul lungo periodo delle condizioni come epatite ricorrente, lesione del midollo spinale, uveite, psicosi o caduta dei capelli.³³

Ad oggi non è ancora stata validata alcuna terapia specifica per il trattamento della malattia da ebola virus. In genere, per migliorare le probabilità di sopravvivenza dei soggetti con infezione da EBOV, si procede con la somministrazione di una terapia di supporto, che prevede la reidratazione con fluidi per via orale o endovenosa, e con il trattamento dei sintomi come l'ipotensione, il vomito, la diarrea ed eventuali infezioni concomitanti. Recentemente sono stati avviati degli studi per la valutazione di potenziali trattamenti della patologia da EBOV con emoderivati, terapie immunitarie e terapie farmacologiche. La maggior parte di queste terapie sperimentali mira a ridurre la replicazione virale al fine di contenere la cascata infiammatoria, agevolando lo sviluppo delle risposte immunitarie innate e adattive necessarie per l'eradicazione dell'infezione. Le terapie farmacologiche in fase di studio si compongono di medicinali antivirali analoghi nucleosidici e nucleotidici, farmaci a base di acido nucleico e immunoterapici.³⁰

Nel 2020 viene approvato dalla FDA il primo vaccino (Ervebo®) per la prevenzione dell'infezione da ebola virus in soggetti di età pari o superiore a 18 anni (escluse donne in gravidanza e allattamento).

Nell'agosto 2018 è scoppiato il secondo focolaio di EBOV più esteso della storia, durante il quale è stato condotto lo studio PALM per valutare l'efficacia di 4 promettenti terapie contro EBOV, tra cui gli anticorpi monoclonali Inmazeb™ e Ebanga™. I 2 mAb si sono dimostrati

essere efficaci contro il virus dell'ebola, poiché in grado di ridurre significativamente il tasso di mortalità della patologia causata da EBOV.³⁶

3.2 Proprietà farmacologiche di Inmazeb™

Inmazeb™ (o REGN-EB3) è una combinazione di 3 anticorpi monoclonali completamente umani atoltivimab, maftivimab e odesivimab, in rapporto 1:1:1 diretti contro la glicoproteina di EBOV. Sviluppato dalla Regeneron Pharmaceuticals, Inmazeb™ è il primo anticorpo monoclonale ad aver ricevuto approvazione da parte dell'FDA (14 ottobre 2020) per il trattamento dell'infezione da ebola virus in pazienti adulti e pediatrici.

REGN-EB3 deriva dalla selezione di anticorpi prodotti da roditori successivamente l'immunizzazione con DNA che esprime la glicoproteina GP propria dell'involucro virale. La dose raccomandata di Inmazeb™ è 50 mg di atoltivimab, 50 mg di maftivimab e 50 mg di odesivimab per kg corporeo, diluiti e somministrati in singola infusione endovenosa.³⁷

3.2.1 Proprietà farmacodinamiche di Inmazeb™

Atoltivimab (REGN3470), maftivimab (REGN3479) e odesivimab (REGN3471) legano contemporaneamente la glicoproteina dell'involucro di EBOV, la quale media l'attaccamento e la fusione delle particelle virali con la membrana delle cellule ospiti. La GP viene espressa sulla superficie delle cellule ospiti infettate dal virus dell'ebola, e rappresenta un potenziale bersaglio per gli anticorpi, i quali mediano l'uccisione di queste cellule con meccanismo di citotossicità cellulare anticorpo-dipendente (ADCC, Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity) o altre funzioni effettrici.³⁸

In particolare, maftivimab presenta attività neutralizzante e impedisce l'ingresso del virus nella cellula ospite; odesivimab, dopo essersi legato al suo specifico epitopo, attiva il recettore FcγRIIIa coinvolto nella stimolazione della citotossicità anticorpo-dipendente (ADCC) e infine, atoltivimab, coniuga le attività di neutralizzazione e ADCC.³⁹

I tre anticorpi monoclonali che formano REGN-EB3 si legano ad epitopi non sovrapposti sul GP, aumentando potenzialmente l'efficacia, riducendo la probabilità di generare mutazioni e di conseguenza diminuendo il rischio di sviluppo di resistenza alla terapia.⁴⁰

3.2.2 Proprietà farmacocinetiche di Inmazeb™

Non si dispone di dati relativi alle proprietà farmacocinetiche di REGN-EB3 in pazienti con infezione da EBOV, per cui i valori riportati nella tabella che segue si riferiscono alla misurazione dei parametri in 18 soggetti sani di età compresa tra i 21 e i 60 anni, a seguito di una singola infusione endovenosa di 50 mg di atoltivimab, 50 mg di maftivimab e 50 mg di odesivimab per kg corporeo.³⁹

	Atoltivimab 50 mg/kg	Maftivimab 50 mg/kg	odesivimab 50 mg/kg
Esposizione sistemica (n=6)			
Media (DS) Cmax, mg/L	1.220 (101)	1.280 (68,0)	1.260 (81,2)
Media (DS) AUCinf, mg giorno/L	17.100 (4.480)	18.700 (4.100)	25.600 (5.040)
Distribuzione			
Volume medio (DS) di distribuzione a Stato stazionario, ml/kg	58.2 (2.66)	57,6 (3,89)	56,0 (3,16)
Eliminazione			
Emivita media (DS) di eliminazione (giorni)	21.2 (3.36)	22.3 (3.09)	25.3 (3.86)
Media (DS) Clearance (mL/giorno/kg)	3.08 (0.719)	2.78 (0.558)	2.02 (0.374)

Tabella 1. Parametri farmacocinetici registrati in 18 soggetti sani a seguito della somministrazione di una singola dose di Inmazeb™.³⁹

3.3 Caratteristiche farmacologiche di Ebanga™

Il 21 dicembre 2020 ansuvimab (Ebanga™), anticorpo monoclonale di tipo umano sviluppato dalla Ridgeback Biotherapeutics, ha ricevuto la sua prima approvazione dalla FDA per il trattamento dell'infezione procurata dal virus dell'ebola dello Zaire in pazienti adulti e pediatrici, inclusi i neonati venuti al mondo da madre positiva al virus.

Ansuvimab deriva dalla selezione di una immunoglobulina umana isolata dalle cellule B di memoria da un sopravvissuto all'epidemia del '95 che ha avuto luogo nella Repubblica Democratica del Congo. Questa immunoglobulina è stata selezionata per la sua capacità di legarsi alla glicoproteina ancorata all'involucro di EBOV e neutralizzare il virus in vitro.⁴¹

3.3.1 Proprietà farmacodinamiche di Ebanga™

Ansuvimab si lega alla subunità GP1 di EBOV, in particolare all'epitopo LEIKKPDGS situato nel dominio di legame del recettore di EBOV, impedendo l'interazione con il recettore NPC1. Il legame GP-NPC1 rappresenta un passaggio di fondamentale importanza per l'ingresso del virus all'interno del citoplasma della cellula ospite, poiché stimola la fusione della membrana endosomiale.⁴¹

Studi in vitro hanno dimostrato la capacità di ansuvimab di neutralizzare particelle virali appartenenti al genere lentivirus che esprimono GP e, inoltre, è stata documentata una forte citotossicità cellulare mediata da anticorpi (ADCC).

Pertanto, ansuvimab agisce bloccando l'evasione di EBOV dall'endosoma e la successiva soppressione delle cellule ospite infettate da EBOV mediante ADCC.⁴²

3.3.2 Proprietà farmacocinetiche di Ebanga™

Le concentrazioni sieriche massime raggiunte, in seguito alla somministrazione endovenosa in soggetti volontari sani di ansuvimab 5 mg/kg, ansuvimab 25 mg/kg, ansuvimab 50 mg/kg, sono state rispettivamente di 198,5 µg/mL, 829,4 µg/mL e 1961,2 µg/mL. I T_{max} concernenti i dosaggi precedentemente citati sono stati 3,2 ore, 3 ore e 2,8 ore e le AUC al 28° giorno sono stati rispettivamente di 1480 µg*giorno/mL, 8586 µg*giorno/mL e 18588 µg*giorno/mL.⁴¹

Il volume di distribuzione in soggetti volontari sani, alle dosi di 5 mg/kg, 25 mg/kg e 50 mg/kg è stato rispettivamente di 5,08 L, 3,93 L e 4,16 L.

L'emivita registrata successivamente la somministrazione di una singola dose di ansumimab in concentrazione di 5 mg/kg, 25 mg/kg e 50 mg/kg è stata di 20,1 giorni, 26,7 giorni e 23,6 giorni e la clearance è stata di 199 mL/giorno, 108 mL/giorno e 15 mL/giorno.

Come accade per gli altri anticorpi monoclonali, il metabolismo di ansumimab sembra essere sostenuto da diversi processi proteolitici e catabolici messi in atto dall'organismo umano.⁴²

Il dosaggio di ansumimab raccomandato è di 3 dosi da 50 mg/kg mediante infusione endovenosa, da somministrare in 1 ora.⁴¹

3.4 Studio PALM: confronto tra Inmazeb™ ed Ebanga™

All'esordio del focolaio di ebolavirus scoppiato nell'agosto 2018 nelle province del Nord Kivu e dell'Ituri, ai confini dell'Uganda, sono stati sperimentati, per il trattamento della patologia scatenata da EBOV, quattro nuovi prodotti, tra cui un inibitore della polimerasi (Remdesivir), due combinazioni di anticorpi monoclonali (REGN-EB3 e ZMapp) e un singolo mAb (ansuvimab). Nel novembre 2018 è stato avviato un trial clinico randomizzato (RCT), lo studio PALM, al fine di valutare efficacia, sicurezza e tollerabilità di questi preparati sperimentali. Per la conduzione dello studio sono stati arruolati 681 soggetti con infezione da ebolavirus, e 673 di questi hanno ricevuto trattamenti specifici.

L'end-point primario fissato era la mortalità al giorno 28. Il tasso di mortalità globale (CFR, Case Fatality Rate), registrato durante questo focolaio, è del 67% circa. La mortalità globale rilevata a 28 giorni dei gruppi di pazienti trattati con ZMapp, Remdesivir, Inmazeb™ ed Ebanga™ era rispettivamente del 50%, 53%, 34% e 35%. Il CFR dei pazienti con elevata carica virale che avevano ricevuto ZMapp e Remdesivir era dell'85%, mentre quello dei pazienti in terapia con REGN-EB3 e ansuvimab era rispettivamente del 64% e 70%.

Nei pazienti caratterizzati da bassa carica virale, la mortalità globale è diminuita in tutti i bracci terapeutici, ed era del 25%, 29%, 10% e 11% rispettivamente per ZMapp, Remdesivir, REGN-EB3 e ansuvimab.

A seguito di una revisione, dallo studio PALM sono stati eliminati i bracci terapeutici in trattamento con Remdesivir e ZMapp, a causa della segnalazione di eventi avversi gravi in tre pazienti, tra cui peggioramento della sindrome gastro-intestinale, ipotensione e ipossia.

Quindi l'RCT è proseguito solo attraverso i due bracci Inmazeb™ ed Ebanga™, i quali hanno dimostrato una discreta efficacia per il trattamento della patologia da ebolavirus in pazienti adulti e pediatrici.⁴³

Gli eventi avversi comuni, che si sono verificati nel corso dello studio PALM, sono stati i seguenti: ipertensione, tachicardia, diarrea, vomito, ipotensione, tachipnea (aumento della frequenza degli atti respiratori), brividi e ipossia.³⁹

Nonostante gli straordinari progressi raggiunti con i mAb nel trattamento dell'infezione da EBOV abbiano trasformato radicalmente la prognosi della patologia da morte certa a malattia potenzialmente curabile, è di fondamentale importanza eseguire una profilassi post-esposizione in caso di contatti con soggetti infetti.

La FDA suggerisce una terapia combinata di mAb con molecole antivirali per favorire la completa eradicazione del virus dall'organismo.⁴³

3.4.1 Conclusioni

Esistono differenze significative tra Inmazeb™ ed Ebanga™ in termini di come vengono prodotti e di come funzionano. Era opinione diffusa che per ottenere una migliore efficacia e per prevenire la rapida mutazione virale fosse preferibile utilizzare una combinazione di due o più mAb rispetto ad un singolo mAb, ma i risultati ottenuti nello studio PALM con il trattamento a base di ansumimab ha cambiato questa considerazione in campo terapeutico. Tuttavia, un recente report ha riportato un caso di ricaduta di patologia da EBOV acuta in un sopravvissuto all'epidemia di ebola virus del 2018, trattato precedentemente con Ebanga™. Questa osservazione ha sollevato delle questioni sulla mutazione della GP del virus dovuta alla pressione terapeutica esercitata dal singolo mAb, con conseguente resistenza al trattamento. Recenti studi in vitro hanno escluso l'ipotesi di pressioni selettive esercitate da ansumimab come potenziale causa della variazione della glicoproteina virale. L'impiego di una combinazione di mAb, come Inmazeb™, che mira a epitopi diversi, non sovrapposti, sembra ridurre il rischio di insorgenza di resistenza alla terapia, ma la produzione di 3 anticorpi monoclonali combinati richiede grandi volumi di produzione e l'investimento di notevoli risorse finanziarie.⁴³

Sebbene Ebanga™ e REGN-EB3 differiscano per alcune caratteristiche generali, entrambi hanno dimostrato notevole efficacia nel ridurre significativamente la mortalità da EBOV; tuttavia, è necessario valutare il rapporto costo-efficacia, il numero di dosi che possono essere prodotte e le possibili popolazioni target per l'uso. A prescindere da ciò il miglioramento di entrambi i prodotti dovrebbe essere una priorità per un uso futuro.

4. *Bacillus anthracis*

4.1 Introduzione

4.1.1 Epidemiologia

L'antrace (o carbonchio) è un'infezione zoonotica causata dal *Bacillus anthracis* e generalmente si manifesta come malattia endemica negli animali erbivori selvatici o domestici (bovini, pecore, cavalli e capre), i quali vengono infettati mediante l'ingestione di materiale contaminato (vegetazione, parti di suolo e acqua); tale patologia può presentarsi anche nell'uomo in seguito al contatto diretto con animali infetti, o successivamente l'inalazione o l'ingestione di spore del batterio.⁴⁴

Gli animali infetti possono contaminare suolo e corsi d'acqua mediante il sanguinamento da naso, bocca e intestino, provocato dalla malattia zoonotica; una volta disperso nell'ambiente il batterio dell'antrace può dare origine a delle spore in grado di persistere e proliferare.⁴⁵

Il *B. anthracis* infetta solo occasionalmente l'essere umano e da luogo ad un'infezione tipica delle regioni agricole dell'America centro-meridionale, dell'Africa subsahariana, dell'Asia centrale e sud-occidentale e del sud-est dell'Europa. Nonostante si siano verificati, nel corso degli anni, dei focolai di antrace nel bestiame negli USA ed in Europa occidentale, in queste aree ormai un'infezione rara.⁴⁴ Dunque, l'infezione dell'antrace ha una distribuzione globale, ma è più comune nei paesi sottosviluppati o in via di sviluppo e nei paesi che non possiedono un programma di sanità veterinaria.⁴⁶

La maggior parte dei casi umani di antrace è dovuta all'esposizione agricola o industriale a prodotti di animali infetti, tra cui pelle, pelo di capra, lana e ossa.⁴⁵

La malattia da carbonchio si presenta in quattro forme cliniche:⁴⁷

1) Antrace cutaneo – rappresenta oltre il 95% dei casi segnalati,⁴⁸ e si acquisisce mediante il contatto con animali o prodotti di origine animale contaminati da spore di *B. anthracis*. Le abrasioni o ferite cutanee aumentano la predisposizione all'infezione, tuttavia l'infezione si può verificare anche con cute integra. In genere l'infezione cutanea non è contagiosa, ma in letteratura scientifica sono stati riportati (raramente) casi di trasmissione dell'antrace cutaneo attraverso il contatto diretto.⁴⁹

Si stimano circa 2.000 casi di antrace cutaneo l'anno in tutto il mondo.⁴⁸

2) Antrace inalatorio – causata dall'inalazione di spore di carbonchio. La maggior parte delle infezioni polmonari da antrace sono dovute all'esposizione professionale a prodotti di origine animale contaminati ed è spesso fatale.⁴⁹

3) Antrace gastro-intestinale – dovuta all’ingestione di carni infettate. Il battere ingerito può provocare lesioni che si estendono dal cavo orale fino all’intestino cieco. La tossina rilasciata dal *B. anthracis* ulcere necrotico-emorragiche, che possono determinare emorragia intestinale, ostruzione e perforazione.⁴⁹

4) Antrace da iniezione – infezione dei tessuti molli risultante da iniezione sottocutanea.⁴⁸

In Italia l’antrace è considerata una zoonosi professionale, dato che la via di trasmissione principale è dovuta al contatto diretto con animali infetti. Dal 1958 al 1986 è stata stimata una riduzione dell’80% dei focolai di mucche, capre e pecore, mentre il numero di casi registrati è diminuito del 98% nei bovini e del 95% in capre e pecore.

Il miglioramento delle condizioni igieniche, i nuovi metodi di produzione di alimenti, le misure di controllo attivo, il divieto di seppellire le carcasse animali e i rifiuti della macellazione e i piani di vaccinazione animale estensiva hanno contribuito alla riduzione dell’incidenza dell’infezione da antrace in campo umano; infatti, i casi segnalati, tra il 1958 e il 1986, sono diminuiti del 95% e la maggior parte di questi presentavano infezione di tipo cutanea.⁴⁶

4.1.2 Proprietà generali e meccanismi di patogenicità del batterio dell’antrace

Il *B. anthracis*, agente eziologico dell’antrace, è un batterio gram-positivo a forma di bastoncino che presenta la peculiare capacità di intervallare una fase vegetativa ad una fase spora.⁴⁷ Il bacillo dell’antrace è in grado di sopravvivere nell’ambiente per decenni, in uno stato metabolicamente inerte, sotto forma di spore. Quest’ultime, dopo l’introduzione nell’organismo ospite, si sviluppano nella forma vegetativa, in grado di dare luogo al processo di replicazione. I principali fattori, determinanti la virulenza dello stadio vegetativo del batterio dell’antrace, sono tre: la presenza di una capsula, resistente alla fagocitosi e debolmente immunogenica, rende l’agente infettivo invulnerabile, la capacità del batterio di raggiungere elevate concentrazioni negli ospiti infetti e, infine, la produzione di due tossine, tossina letale (LT) e tossina edematogena (ET). Entrambe le tossine sono formate da due proteine: un fattore, rispettivamente, fattore letale (LF) per LT, e fattore edematogeno (EF) per ET e un antigene protettivo (PA), responsabile del legame cellulare e dell’assorbimento dei due fattori tossigeni LF e EF.

Le tossine LT ed ET, per esercitare il loro effetto sulle cellule infettate, devono entrare all’interno del citoplasma cellulare.⁴⁸

Nel corso dell’infezione, per consentire l’ingresso delle tossine letale ed edematosa, l’antigene protettivo (PA) circolante deve interagire con almeno uno dei recettori localizzati

sulla superficie cellulare dei tessuti molli tra il recettore TAM8 (o ATR), codificato dal gene del marker endoteliale tumorale 8, e il recettore CMG2, codificato dal gene della morfogenesi capillare 2.

Una volta che il PA si è legato ai recettori precedentemente citati, subisce una scissione proteolitica da parte di una proteasi simile alla furina endogena, al fine di ottenere una forma di antigene protettivo più corta, in grado di formare degli eptameri a cui possono legarsi, in modo competitivo, LF ed EF circolanti.

La formazione del complesso eptamerico induce il fenomeno di endocitosi mediata da dinamina-clatrina, che permette il rilascio dei fattori tossici LF ed EF a livello cellulare. Dopo l'internalizzazione del complesso PA-LF e PA-EF, la PA subisce, a causa dell'ambiente endosomico acido, una modificazione conformazionale, che consente il traslocamento delle subunità proteiche EF ed LF nel citoplasma, dove esercitano la loro attività tossica.

Il fattore letale (LF) è una metalloproteasi zinco-dipendente, in grado di inattivare, mediante scissione proteolitica, le proteinchinasi appartenenti alla famiglia delle MAPKK con conseguente rilascio di citochine, apoptosi fino a necrosi e ipossia.

Il fattore di edema (EF), è un adenilciclastasi calmodulina-dipendente altamente efficiente nell'aumentare i livelli intracellulari di cAMP. Elevate concentrazioni intracellulari di cAMP provocano una deplezione di ioni cloruro e, di conseguenza, un forte aumento dell'efflusso di acqua dalle cellule colpite. Questo porta alla formazione di edema, tipico dell'infezione da antrace cutanea.

Agli esordi dell'infezione LF ed EF colpiscono principalmente macrofagi e neutrofili, compromettendo il corretto funzionamento del sistema immunitario ospite e consentendo all'infezione di progredire in uno stato acuto che si manifesta con febbre, mal di gola, diarrea e vomito.⁴⁷

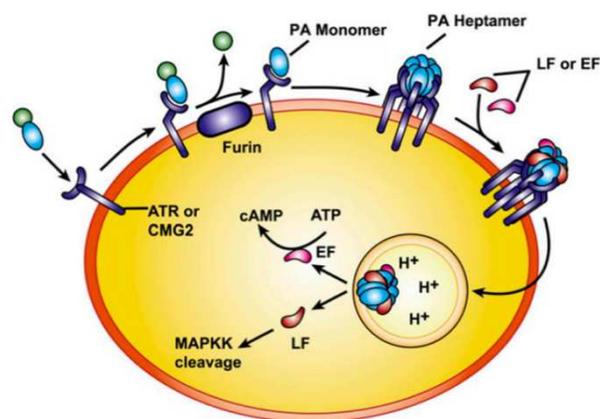


Figura 8. Meccanismi di ingresso e di rilascio delle tossine prodotte da *B. anthracis*.⁴⁸

4.1.3 Manifestazioni cliniche dell'antrace

Antrace cutaneo

La forma clinica cutanea rappresenta circa il 95% dei casi di antrace segnalati. La maggior parte di questi si verificano in paesi in cui il programma di vaccinazione di animali e lavoratori non è particolarmente esteso, e riguarda soprattutto Africa, Asia ed Europa orientale.

Il tasso di mortalità stimato della forma cutanea del carbonchio negli individui infetti non trattati oscilla tra il 5 e il 20%, mentre con adeguato trattamento antibiotico il tasso di mortalità si riduce al di sotto dell'1%.

L'antrace cutaneo si manifesta nel momento in cui le spore di *B. anthracis* infettano zone cutanee lese e germinano all'interno dei macrofagi o a livello dei linfonodi regionali; successivamente il battere viene rilasciato nel circolo ematico in forma vegetativa.⁴⁸

Il primo segno clinico evidente della patologia è la formazione di una papula indolore o pruriginosa, associata ad eccessivo edema, che progredisce ad una vescicola di dimensioni di circa 1-2 cm. La forma vescicolare va incontro a rottura e da luogo in primis ad un'ulcera e in seguito di un'escara nera, che svanisce nel giro di 2-3 settimane circa.⁴⁵

I sintomi clinici che accompagnano l'antrace cutaneo, oltre alle formazioni cutanee, sono febbre e linfadenopatia locale e compaiono dopo un periodo di incubazione che si estende da 1 a 12 giorni.⁴⁸

Antrace gastro-intestinale

Generalmente, l'antrace gastro-intestinale è correlato all'ingestione di carne contaminata da spore di *B. anthracis*. È una forma clinica piuttosto rara, infatti, la sua incidenza potrebbe essere sottostimata a causa della sintomatologia clinica aspecifica che contraddistingue questo tipo di infezione.

L'infezione da antrace gastro-intestinale presenta un tasso di mortalità stimato che si estende dal 25 e al 60%, ed è spesso accompagnata da shock che complica la prognosi della patologia infettiva.

L'antrace gastro-intestinale sussiste in due tipologie, che si distinguono per la diversa localizzazione delle spore batterica: antrace orofaringeo e antrace intestinale.

Nella prima tipologia, ovvero l'antrace orofaringeo, le spore di *B. anthracis* si depositano a livello dell'area orofaringea, dove da luogo a lesioni ulcerative associate a congestione, seguite da necrosi centrale scolorimento biancastro e infine ricoperte da una pseudomembrana. Il più vasto focolaio di antrace orofaringeo segnalato ha riguardato 24 soggetti thailandesi, che avevano consumato carne bovina contaminate da spore di

carbonchio. Il periodo medio di incubazione registrato è stato di 42 ore e la maggior parte degli individui infetti presentavano sintomi comuni, tra cui febbre e gonfiore del collo.

Nell'antrace di tipo intestinale le spore batteriche si depositano a livello intestinale, procurando ulcere lungo tutta la superficie enterica che si estende dal digiuno al cieco. Le lesioni ulcerative sono spesso accompagnate da linfadenopatia mesenterica, ascite e possono causare ostruzione intestinale, sanguinamento e perforazione della parete intestinale. La sintomatologia clinica che accompagna l'infezione da antrace intestinale è piuttosto aspecifica e si configura in nausea, vomito, dolore addominale e diarrea. I casi più gravi presentano febbre, ascite, con aumento della circonferenza addominale e shock.⁴⁸

Antrace inalatorio

L'infezione polmonare dell'antrace è provocata dall'inalazione e dalla deposizione a livello alveolare di spore batteriche, le quali vengono fagocitate dai macrofagi e trasportate ai linfonodi mediastinici locali, dove germinano nella forma vegetativa e replicano provocando mediastinite emorragica. Se non efficacemente trattata l'infezione evolve in meningite, problemi gastrointestinali e shock refrattario.

La forma di antrace inalatoria segue un decorso clinico bifasico: dopo un periodo di incubazione di circa 4 giorni, i pazienti sviluppano sintomi simil-influenzali con febbre, tosse e mialgia che durano approssimativamente 4 giorni. Senza un adeguato e tempestivo trattamento, segue una seconda fase fulminante caratterizzata da ipotensione e dispnea. Questa seconda fase può progredire verso la morte nel giro di 24 ore dall'insorgenza dei sintomi.

Diversamente dall'antrace cutaneo, l'antrace per inalazione presenta un elevato rischio di mortalità per shock (nonostante il trattamento farmacologico), pari a circa il 34% dei casi.

Oggigiorno raramente si verificano epidemie di antrace polmonare di origine industriale grazie alla vaccinazione animale, ai moderni processi di disinfezione e al miglioramento del sistema di ventilazione delle fabbriche; i casi di carbonchio inalatorio sono sporadici e sono stati rilevati soprattutto tra gli artigiani che lavorano prodotti di derivazione animale in aree endemica.

La questione riguardante il carbonchio di tipo inalatorio che desta maggior preoccupazione è il potenziale utilizzo nel bioterrorismo, come evidenziato dal rilascio accidentale di antrace come arma biologica a Sverdlovsk (Russia, 1979) e negli USA (2001).⁴⁸

Antrace da iniezione

L'antrace da iniezione è stato rinvenuto nel 2001 quando un consumatore di eroina norvegese ha sviluppato un'infezione dei tessuti molli sostenuta dal batterio dell'antrace, risultante da un'iniezione di droga sottocutanea. La patologia è sfociata in shock settico, meningite e morte nonostante il trattamento con idonea terapia. Questa infezione, che appare differente dalla patologia cutanea, viene definita "antrace da iniezione". Successivamente, nel 2009 è stato segnalato un focolaio di antrace da iniezione in UK che ha riguardato principalmente i consumatori di eroina; due casi sono stati notificati anche in Germania.

Si ritiene che l'infezione da antrace per iniezione derivi da una contaminazione batterica dell'eroina, dalla successiva germinazione delle spore di *B. anthracis* nel sito di inoculazione e dalla propagazione del batterio nei tessuti molli.

Il principale sintomo che caratterizza l'antrace da iniezione è un importante edema a livello del sito di iniezione, e, diversamente da quanto accade per l'antrace cutaneo, non si osservano problemi cutanei come papule, vescicole o escare. Le lesioni procurate dall'antrace per iniezione coinvolgono i tessuti molli più profondi e sono caratterizzata da trombosi microvascolare e fluido torbido. Nei casi più gravi la prognosi evolve in trombocitopenia e coagulopatia. Nonostante la stabilizzazione dei fluidi ematici, un elevato numero di pazienti ha sviluppato recidive di shock resistenti alla terapia.⁴⁸

4.1.4 Gestione terapeutica della patologia

L'approccio terapeutico, in caso di sospetta infezione da *B. anthracis*, consiste nella somministrazione di un antibiotico, in attesa di conferma della diagnosi, associato al vaccino.

Il batterio dell'antrace è sensibile ad un'ampia varietà di agenti antibiotici, tra cui penicillina, cloramfenicolo, tetraciline, eritromicina, streptomina, fluorochinoloni e cefalosporine di prima generazione. La terapia antibiotica, di fondamentale importanza nella gestione della patologia, viene coadiuvata da numerosi agenti attivi contro il batterio dell'antrace: agenti sviluppati per inibire la tossina letale, la toracentesi per rimuovere un potenziale reservoir di tossina e glucocorticoidi. Quest'ultima classe farmaceutica viene utilizzata come terapia aggiuntiva per i pazienti con antrace cutaneo che presentano edema esteso a capo e collo.

Il drenaggio di liquidi extravascolari può rivelarsi fondamentale nella cura dell'infezione, infatti, nel trattamento dell'antrace inalatorio è indispensabile effettuare un drenaggio del liquido pleurico per migliorare la funzionalità respiratoria e per eradicare eventuali serbatoi di tossine.

L'attuare contromisura terapeutica messa in atto per il trattamento dell'infezione da antrace, costituita da antibiotico e vaccino presenta dei limiti: l'agente antimicrobico è in grado di controllare la carica batterica, ma non contrasta le tossine rilasciate dal batterio e, inoltre, potrebbe rivelarsi inefficace in caso di resistenza; mentre il vaccino può risultare più efficace sul lungo termine, ma inizialmente necessitano di tempo per instaurare un effetto e richiedono una dose booster per il mantenimento dell'immunità.⁵⁰

Negli USA sono state sviluppate due preparazioni a base di anticorpi monoclonali per la prevenzione e il trattamento dell'infezione sostenuta da *B. anthracis*: raxibacumab e obiltoximab,⁴⁹ discussi nei capitoli a venire.

4.2 Trattamento dell'infezione da *B. anthracis* con raxibacumab

Raxibacumab (ABthrax®) è stato il primo anticorpo monoclonale di tipo umano, sviluppato dalla Human Genome Sciences (HGS), a ricevere l'approvazione da parte di FDA (14 dicembre 2012),⁵⁰ per il trattamento di pazienti adulti e pediatrici che manifestano l'infezione da antrace inalatorio, in combinazione con altri agenti antimicrobici adeguati. Raxibacumab è indicato anche per il trattamento profilattico dell'antrace inalatorio, qualora non fossero disponibili o risultino inappropriate altre forme di terapia.⁵¹

Raxibacumab è stato sviluppato in seguito all'attacco bioterroristico avvenuto nel 2001 negli USA; dato che queste offensive non sono prevedibili o facilmente individuabili, il governo statunitense nel 2002 ha definito la normativa cosiddetta "Animal Efficacy Rule" per incoraggiare lo sviluppo di contromisure di sicurezza e di prevenzione in caso di attacchi futuri. Questo regolamento consente alla FDA di approvare medicinali sulla base dei risultati di efficacia ottenuti in studi controllati condotti su modelli animali, qualora non sia realizzabile o eticamente corretto condurre studi su soggetti umani e a condizione che il farmaco abbia un ragionevole beneficio per la salute dell'uomo e sia sicuro per l'uso umano.⁵²

Dunque, l'approvazione di raxibacumab si basa su studi di efficacia condotti su modelli animali infetti da antrace inalatorio, poiché non è eticamente accettabile condurre studi clinici controllati esponendo intenzionalmente soggetti umano al batterio dell'antrace; mentre sicurezza e farmacocinetica di raxibacumab sono state valutate in trial condotti su volontari adulti sani. Gli studi di farmacocinetica su soggetti sani sono di fondamentale importanza per la definizione dello schema posologico di somministrazione del mAb in questione.⁵⁰

4.2.1 Proprietà farmacodinamiche di raxibacumab

L'anticorpo monoclonale raxibacumab è diretto contro l'antigene protettivo (PA) di *B. anthracis*; in particolare impedisce la formazione del legame tra PA circolante e il suo recettore cellulare, prevenendo l'ingresso nella cellula dei fattori letale (LF) ed edematogeno (EF), componenti delle rispettive tossine letale (LT) e edematogena (ET), responsabili degli effetti patogenetici procurati dall'antrace e della progressione della patologia.⁵¹

Raxibacumab non presenta alcuna attività antibatterica diretta, pertanto, si consiglia l'utilizzo di antibiotici efficaci nel debellare il batterio dell'antrace in combinazione con l'anticorpo monoclonale.⁵²

4.2.2 Proprietà farmacocinetiche di raxibacumab

In seguito alla somministrazione per via endovenosa di una singola dose di raxibacumab 40 mg/kg corporeo in soggetti adulti sani la C_{max} media e l'AUC registrate sono state rispettivamente di $1.020,3 \pm 140,6 \mu\text{g/mL}$ e di $15.845,8 \pm 4.333,5 \mu\text{g*giorno/mL}$.⁵¹

Raxibacumab può essere somministrato per via endovenosa (EV) o per via intramuscolare (IM), a livello del vasto laterale o del grande gluteo. La somministrazione intramuscolare è percepita come più semplice e meno rischiosa, rispetto alla via endovenosa; tuttavia, è necessario considerare la differenza in termini di biodisponibilità del medicinale in base alla via di somministrazione.⁵²

La biodisponibilità dipende, oltre che dalla via di somministrazione, dal sito di iniezione di raxibacumab: quando somministrato a livello del vasto laterale, la biodisponibilità oscilla tra il 71 e l'85%, mentre quando somministrato a livello del grande gluteo la biodisponibilità si aggira intorno al 50-54%.⁵⁰

Il valore di clearance era molto inferiore rispetto al tasso di filtrazione glomerulare, questo suggerisce che virtualmente non c'è clearance renale di raxibacumab.⁵¹

L'emivita di raxibacumab calcolata è stata la seguente: 15-19 giorni per la singola somministrazione IM e 16-19 giorni per la singola dose somministrata per via EV.⁵³

4.2.3 Sperimentazione clinica

Studi preclinici negli animali

Per valutare l'efficacia di raxibacumab nella profilassi e nel trattamento dell'infezione da antrace polmonare sono stati diversi condotti studi preclinici su numerosi modelli animali, tra cui ratti, conigli e macachi *Cynomolgus*. Gli studi pre-esposizione sono cruciali per valutare l'efficacia nella profilassi della patologia nelle categorie a rischio di esposizione a *B. anthracis*; mentre gli studi post-esposizione sono di fondamentale importanza nel determinare l'intervallo terapeutico in cui la terapia può essere somministrata efficacemente.⁵⁰

Studi preclinici nei roditori

I tre studi preclinici effettuati sui roditori si concentrano sulla capacità di raxibacumab di aumentare la sopravvivenza in seguito all'esposizione alla tossina prodotta da *B. anthracis*; in particolare, i primi due sono studi di trattamento post-esposizione all'agente batterico, mentre il terzo ha come obiettivo la valutazione dell'efficacia di raxibacumab nella profilassi della patologia da antrace inalatorio.

Nel primo studio ai roditori sono stati inoculati, mediante bolo intravenoso, fattore letale e PA. Il tempo medio di morte registrato è stato di 1 ora e mezza. Il trattamento terapeutico post-esposizione con raxibacumab ha migliorato la sopravvivenza solo se somministrato entro 30 min dall'esposizione alla tossina, ma non se somministrato successivamente.

In un secondo studio preclinico ai ratti sono stati infusi, in 24 ore, fattore letale e PA in dosaggio pari a rispettivamente 150 µg/kg e 300 µg/kg. Lo studio è stato articolato nella seguente modalità: un gruppo di animali ha ricevuto un singolo bolo di raxibacumab in concentrazione pari a 10 volte la quantità molare di PA a 3, 6, 9 o 12 ore dalla somministrazione della tossina; un secondo gruppo di ratti è stato trattato con raxibacumab a diverse concentrazioni pari a rispettivamente 10, 1, 0,5, 0,1 o 0,05 volte la quantità molare di PA dopo circa 6 ore dall'infusione con la tossina; infine, un terzo gruppo che ha ricevuto un trattamento con anticorpi non specifici ha rivestito il ruolo di gruppo di controllo.

Nel primo gruppo sono stati osservati aumenti significativi dei tassi di sopravvivenza rispetto ai controlli, soprattutto nei roditori trattati dopo 3 o 6 ore dall'esposizione alla tossina. Nel secondo gruppo solo gli animali trattati con la concentrazione più bassa di raxibacumab (0,05 volte quantità molare di PA) non hanno sperimentato un aumento della sopravvivenza rispetto al gruppo di controllo.

Il terzo studio effettuato sui roditori mira a valutare l'efficacia di raxibacumab nella profilassi pre-esposizione alla tossina batterica. I ratti sono stati suddivisi in 6 gruppi, ciascuno formato da 5 elementi: 3 gruppi sono stati trattati con raxibacumab in concentrazione pari a 1,5 mg/kg corporeo rispettivamente per via sottocutanea (SC), IM o EV 24 ore prima dell'infusione della tossina; mentre i restanti 3 gruppi (controllo) hanno ricevuto IgG di controllo per via SC, IM o EV 24 ore prima dell'inoculazione della tossina. Dalle osservazioni effettuate è emerso che raxibacumab ha fornito una sopravvivenza del 100% dei ratti, infatti, tutti i ratti che sono stati trattati con mAb sono sopravvissuti fino al termine del periodo di osservazione (24 ore); mentre i roditori appartenenti ai gruppi di controllo, indipendentemente dalla via di somministrazione, sono andati incontro a morte entro 90 minuti dall'infusione della tossina.⁵⁰

Studi preclinici sui conigli

In uno studio preclinico, costituito da 6 coorti di conigli bianchi della Nuova Zelanda, è stato fissato come end-point primario di efficacia la sopravvivenza degli animali al giorno 14.

I 6 gruppi sono stati trattati rispettivamente con: una singola dose di raxibacumab in concentrazione di 1, 5, 10 o 20 mg/kg corporeo 48 ore prima dell'esposizione alla tossina, una singola dose di raxibacumab in dosaggio pari a 40 mg/kg subito dopo l'esposizione e

una singola dose SC di placebo 48 ore antecedente l'esposizione alle spore di *B. anthracis* (controllo).

I conigli appartenenti ai gruppi trattati con raxibacumab in concentrazione pari a 10, 20 e 40 mg/kg hanno registrato un aumento significativo della sopravvivenza in maniera dose dipendente, che si estende dall'83 al 100%, al giorno 14. Nel gruppo di controllo non è stato osservato un miglioramento nella sopravvivenza; infatti, tutti gli elementi della coorte sono andati incontro a morte.

Da questo studio è stato dedotto il potenziale di raxibacumab nel fornire una protezione dalla tossina dell'antrace come misura profilattica, quindi quando somministrato precedentemente l'esposizione alla tossina batterica. I successivi studi effettuati sui conigli mirano a valutare il potenziale terapeutico dell'anticorpo monoclonale in questione in seguito all'esposizione al batterio dell'antrace.

In un primo esperimento i conigli bianchi della Nuova Zelanda vengono esposti alle spore di *B. anthracis* e, successivamente, suddivisi in 5 gruppi, ciascuno formato da 12 elementi. Quattro gruppi vengono trattati con raxibacumab 40 mg/kg, per via EV, rispettivamente dopo 0, 12, 24 o 36 ore dal contatto con l'agente patogeno; mentre, il gruppo di controllo riceve un placebo al tempo 0.

L'end-point primario dello studio è la sopravvivenza al quattordicesimo giorno. Dallo studio è risultato che la somministrazione di raxibacumab entro 0 e 12 ore ha migliorato significativamente la sopravvivenza dei conigli, infatti, al giorno 14 il 100% degli animali è sopravvissuto; mentre nelle coorti di conigli che hanno ricevuto raxibacumab dopo 24 e 36 ore la sopravvivenza registrata è stata pari rispettivamente al 50 e 41,7% dopo 14 giorni. Nel gruppo di controllo solo 1 (8,3%) coniglio su 12 è sopravvissuto.

In uno studio dose-risposta è stata valutata l'efficacia di raxibacumab nell'aumentare la sopravvivenza in seguito al trattamento successivo all'esposizione alla tossina batterica. Per questo studio 4 coorti di 12 conigli bianchi della Nuova Zelanda ciascuna sono state esposte alla tossina dell'antrace e successivamente trattate dopo 24 ore con raxibacumab, per via EV, a dosaggio diverso, pari a rispettivamente 5, 10, 20 e 40 mg/kg corporeo; un gruppo ha ricevuto il placebo, quindi ha rivestito il ruolo di gruppo di controllo e, infine, una 6° coorte è stata trattata con raxibacumab, per via EV, in concentrazione pari a 20 mg/kg 36 ore dopo l'esposizione alle spore batteriche.

La sopravvivenza dei 4 gruppi trattati con raxibacumab 5, 10, 20 e 40 mg/kg 24 ore post-esposizione è aumentata ed è stata rispettivamente del 25, 33,3, 41,7 e 33,3%. Nel gruppo di controllo e nel gruppo trattato con raxibacumab dopo 36 ore dall'esposizione non ci sono animali sopravvissuti al giorno 14.

È stato condotto un ulteriore studio per valutare l'efficacia di raxibacumab nel trattamento della patologia da antrace inalatorio in seguito all'esposizione alle spore batteriche. Per questo studio sono stati utilizzati 54 conigli suddivisi in 3 gruppi; ciascun gruppo è stato esposto alle spore di *B. anthracis* al giorno 0. Gli animali sono stati monitorati e, nel caso di innalzamento della temperatura corporea di 2° F o di rilevamento nel flusso sanguigno di antigene protettivo viene somministrata una singola dose di raxibacumab, per via EV, 20 o 40 mg/kg o placebo. Dai risultati forniti dallo studio in esame il tasso di sopravvivenza è aumentato significativamente nei conigli trattati con raxibacumab 20 o 40 mg/kg, ed era rispettivamente pari al 28 e 44%; mentre il tasso di sopravvivenza dei conigli trattati con placebo è pari a 0%.

Quindi quest'ultimo studio analizzato ha suggerito che l'anticorpo monoclonale raxibacumab migliora il tasso di sopravvivenza anche nel caso in cui venga somministrato in seguito all'esposizione alle spore di antrace.⁵⁰

Studi preclinici nei macachi *Cynomolgus*

Gli studi preclinici effettuati sui macachi *Cynomolgus* sono due: il primo mira a valutare l'efficacia di raxibacumab nella profilassi pre-esposizione, mentre il secondo riguarda il trattamento terapeutico con l'anticorpo monoclonale in seguito all'esposizione alla tossina del *B. anthracis*.

Nel primo studio sono stati studiati 40 macachi, suddivisi in 4 gruppi che hanno ricevuto: una singola dose SC di raxibacumab in dosaggio pari a rispettivamente 10, 20 o 40 mg/kg, o placebo, 48 ore prima dell'esposizione alle spore batteriche. Gli end-point primari dello studio in questione sono la sopravvivenza al ventottesimo giorno e il livello di batteriemia a 7, 14, 21 e 28 giorni.

Tutti i macachi appartenenti al gruppo trattato con placebo sono morti prima del giorno 7; mentre, il tasso di sopravvivenza dei primati trattati con raxibacumab SC ad una concentrazione pari a 10, 20 o 40 mg/kg 48 ore pre-esposizione è stato rispettivamente del 60, 70 e 90%. Inoltre, nessuno degli animali trattati con l'anticorpo monoclonale ha sviluppato batteriemia ai giorni 7, 14, 21 e 28.

Come accennato precedentemente, anche nei macachi viene valutata l'efficacia post-esposizione di raxibacumab. In questo studio sono stati coinvolti 40 animali, suddivisi in 3 coorti, le quali hanno ricevuto tre trattamenti differenti in seguito alla rilevazione di PA nel siero animale: al primo gruppo, formato da 14 scimmie, è stato somministrato un dosaggio pari a 20 mg/kg di raxibacumab in forma di bolo EV, alla seconda coorte, costituita da 14 scimmie, è stato somministrato un unico bolo EV contenente raxibacumab in

concentrazione pari a 40 mg/kg, e, infine, il terzo gruppo di 12 macachi è stato trattato con placebo.

I risultati registrati in questo studio indicano un aumento del tasso di sopravvivenza degli animali trattati con raxibacumab; in particolare, le scimmie che hanno ricevuto 20 o 40 mg/kg presentano un tasso di sopravvivenza pari al 50 e 64%. Il tasso di sopravvivenza del gruppo di controllo trattato con placebo è dello 0% e la loro sopravvivenza mediana è stata di 3,3 giorni.⁵⁰

Studi clinici di sicurezza nel genere umano

La HGS ha condotto quattro diversi studi su soggetti umani al fine di valutare sicurezza, tollerabilità e farmacocinetica di raxibacumab.

Il primo studio realizzato è stato uno studio di fase I, randomizzato, in singolo cieco, controllato (con placebo), con incremento di dosaggio. Per questo studio sono stati arruolati 105 soggetti volontari sani, i quali hanno ricevuto una singola iniezione IM o EV di raxibacumab (80) o placebo (25). Dopo aver analizzati i risultati relativi a farmacocinetica, emivita e tollerabilità è emerso che raxibacumab è sicuro e ben tollerato, inoltre, è stato osservato che la biodisponibilità varia in base alla via di somministrazione (maggiore biodisponibilità nell'iniezione IM a livello del vasto laterale rispetto al grande gluteo).

Il secondo studio di fase I, condotto in aperto, mirava a valutare la sicurezza e le caratteristiche farmacocinetiche di raxibacumab somministrato per via endovenosa in dosaggio di 40 mg/kg in associazione con ciprofloxacina. Da questo studio non è stata evidenziata alcuna alterazione nella farmacocinetica di raxibacumab o di ciprofloxacina; quindi, è sicuro e ragionevole somministrare l'anticorpo monoclonale in combinazione con l'antibiotico.

Nel terzo studio, randomizzato e controllato, è stato confrontata la somministrazione di una singola dose rispetto a due dosi di raxibacumab. I risultati di questo studio hanno suggerito che non ci sono differenze significative nell'insorgenza di reazioni avverse rispetto a placebo.

Il quarto e ultimo studio, condotto in aperto, consisteva in una valutazione della persistenza dell'immunogenicità e della sicurezza a fronte della somministrazione di una dose di richiamo di raxibacumab 4 mesi successivamente la prima iniezione. I risultati dello studio ad oggi non sono ancora stati pubblicati.⁵⁰

Le reazioni avverse più frequentemente osservate (<1,5%) successivamente la somministrazione di raxibacumab, rispetto alle coorti trattate con placebo, sono state le seguenti: linfadenopatia, palpitazioni, vertigini, affaticamento, dolore al sito di infusione,

edema periferico, mal di schiena, spasmi muscolari, insonnia, vampate di calore e ipertensione. Altre tra cui cefalea, infezioni del tratto respiratorio superiore, nausea, dolore al braccio o alla gamba e tosse.

Le reazioni avverse più comuni riportate durante l'infusione comprendevano rash, orticaria e prurito.⁵³

Conclusioni

L'efficacia di raxibacumab nella profilassi e nel trattamento dell'antrace è stata studiata solo su modelli animali, in quanto non è etico esporre intenzionalmente soggetti umani alle spore di *B. anthracis* e, quindi, potenzialmente all'infezione da antrace. Tuttavia, bisogna considerare che gli animali non riflettono esattamente la manifestazione clinica della malattia umana, per cui è necessario studiare l'efficacia e la sopravvivenza in diverse specie (almeno 2 secondo le attuali norme USA) al fine di estrapolarla al genere umano nel modo più preciso possibile. Per valutare correttamente l'efficacia di raxibacumab sarebbero necessari studi post-marketing, i quali coinvolgono soggetti umani.

Comunque, dagli studi analizzati in precedenza, raxibacumab sembra rappresentare una preziosa terapia per contrastare gli effetti deleteri della tossina dell'antrace, anche in combinazione con gli antibiotici attualmente raccomandati per il trattamento della patologia.⁵³

4.3 Utilizzo di obiltoxaximab nel trattamento dell'infezione da antrace

Nel marzo 2016 viene approvato da FDA obiltoxaximab (Anthem®), anticorpo monoclonale progettato per neutralizzare l'antigene protettivo (PA) circolante prodotto dall'esposizione alle spore di *B. anthracis*.⁵⁴ Obiltoxaximab è indicato per la profilassi e il trattamento, in combinazione con adeguata terapia antibiotica, di pazienti adulti e pediatrici con infezione da antrace inalatorio.⁵⁵

Come per raxibacumab, obiltoxaximab ha ricevuto l'approvazione da parte di FDA sulla base della normativa "Animal Efficacy Rule"; quindi, l'autorizzazione all'immissione in commercio di Anthem si basa su studi di efficacia condotti in modelli animali e studi di sicurezza effettuati in soggetti volontari sani.⁵⁴

Nel corso del 2020 obiltoxaximab viene approvato anche da EMA con procedura centralizzata.¹⁶

La via d'elezione per la somministrazione di obiltoxaximab è quella endovenosa mediante infusione di 90 minuti. Tuttavia, esiste anche una formulazione destinata alla somministrazione intramuscolare.

La dose raccomandata dalle autorità sanitarie dipende dal peso corporeo del soggetto trattato: 16 mg/kg in pazienti con peso corporeo superiore a 40 kg, 24 mg/kg per pazienti con peso corporeo compreso tra 15 e 40 kg, 32 mg/kg per pazienti con peso inferiore o pari a 15 kg.⁵⁴

4.3.1 Proprietà farmacodinamiche di obiltoxaximab

Obiltoxaximab forma un legame con l'antigene protettivo (PA) circolante rilasciato dal *B. anthracis*; di conseguenza, inibisce il legame di PA con i recettori posti sulla superficie cellulare ospite, impedendo, in ultima analisi, l'ingresso all'interno della cellula dei fattori letale (LF) e edematogeno (EF), componenti dell'esotossina che esplicano gli effetti patogeni dell'infezione da antrace.

Negli animali trattati con obiltoxaximab sono stati rilevati anticorpi endogeni diretti contro il PA; questo indica che l'anticorpo monoclonale in questione consente lo sviluppo di un'immunità adattativa, la quale fornisce protezione all'animale contro l'eventuale riesposizione alle spore di antrace.⁵⁴

4.3.2 Proprietà farmacocinetiche di obiltoxaximab

Dopo la somministrazione EV o IM di una singola dose di obiltoxaximab di 16 mg/kg in soggetti adulti sani la C_{max} e l'AUC erano direttamente proporzionali alla dose ricevuta e i

valori medi registrati erano pari a rispettivamente $400 \pm 91,2 \mu\text{g/mL}$ e $5.170 \pm 1.360 \mu\text{g*giorno/mL}$.⁵⁵

La biodisponibilità di una singola dose IM è del 64%.⁵⁴

Il volume di distribuzione medio allo stato stazionario è superiore rispetto al volume plasmatico ($79,7 \pm 19,2 \text{ mL/kg}$), indicando che obiltoxaximab subisce una certa distribuzione tissutale.

Non sono stati condotti studi riguardo la biotrasformazione di obiltoxaximab; tuttavia, essendo un anticorpo monoclonale si prevede un catabolismo analogo alla classe terapeutica a cui appartiene, che consiste nella metabolizzazione in peptidi e amminoacidi, per azione di diverse proteasi, che andranno a costituire parte del pool endogeno o verranno escreti.

Il valore medio della clearance di obiltoxaximab rilevato ($3,35 \pm 0,932 \text{ mL/giorno/kg}$) era molto inferiore rispetto alla velocità di filtrazione glomerulare, suggerendo che l'escrezione renale è solo minimamente coinvolta nell'eliminazione di obiltoxaximab.

L'emivita media calcolata di obiltoxaximab era di circa 20 giorni.⁵⁵

4.3.3 Sperimentazione clinica

Non è possibile condurre studi clinici controllati sull'uomo per testare l'efficacia di obiltoxaximab, poiché non è etico esporre intenzionalmente soggetti umani alle spore di *B. anthracis*. Di conseguenza l'efficacia nella prevenzione e nel trattamento dell'infezione da antrace inalatorio viene saggiata mediante studi preclinici condotti su diversi modelli animali (conigli bianchi della Nuova Zelanda e macachi cynomolgus).

Obiltoxaximab è stato valutato per quanto concerne la sicurezza in studi di fase I, condotti in soggetti adulti volontari sani.⁵⁴

Studi preclinici di efficacia riguardanti la formulazione endovenosa di obiltoxaximab

In un primo studio preclinico controllato un gruppo conigli bianchi della Nuova Zelanda ha ricevuto una singola dose EV di obiltoxaximab 10 mg (circa 4 mg/kg corporeo) 30-45 minuti prima dell'esposizione ad una dose considerata letale di spore di antrace, mentre al gruppo di controllo è stato somministrato un placebo (soluzione salina). Nel gruppo di conigli trattati con il farmaco sperimentale il tasso di sopravvivenza è pari al 100% al ventottesimo giorno di sperimentazione, rispetto allo 0% registrato nella coorte di conigli trattati con placebo, i quali morivano entro il quinto giorno. Successivamente, è stata valutata l'efficacia post-esposizione di obiltoxaximab nel trattamento dell'infezione da antrace. La sopravvivenza era rispettivamente dell'80%, per il gruppo di animali trattato con obiltoxaximab 10 mg entro

24 ore dall'esposizione alla tossina e del 50%, per gli elementi trattati 36 ore post-esposizione.

Nel secondo studio preclinico controllato, condotto su conigli bianchi della Nuova Zelanda esposti alle spore del *B. anthracis*, è stata stimata la sopravvivenza degli animali in seguito alla somministrazione di una singola dose EV di obiltoxaximab in concomitanza al primo segno clinico di innalzamento termico o aumento del PA circolante. Il tasso di sopravvivenza aumenta in modo lineare con l'aumentare della dose di farmaco (dal 17 al 69%). Tutti i conigli del gruppo di controllo, quindi non trattati sono deceduti a causa dell'infezione da antrace entro il quinto giorno.

In un terzo studio preclinico controllato, i conigli bianchi della Nuova Zelanda sono stati suddivisi in tre gruppi: un gruppo di controllo, in cui gli animali non ricevevano alcun trattamento farmacologico; un gruppo sperimentale, in cui obiltoxaximab viene somministrato agli animali sotto forma di singola dose EV, in dosaggio crescente, all'inizio della malattia da antrace inalatorio, in seguito all'esposizione alle spore di antrace e, infine, un braccio di controllo positivo, in cui i conigli bianchi venivano trattati con levofloxacina dopo l'esposizione alle spore batteriche.

Anche in questo caso, negli animali di controllo il tasso di sopravvivenza registrato è pari allo 0% al ventottesimo giorno; mentre, quello rilevato nella coorte trattata con farmaco sperimentale è dose-dipendente e arriva fino al 94% nei conigli trattati con obiltoxaximab 16 mg/kg corporeo a 28 giorni dall'esposizione. Il tasso di sopravvivenza osservato nel gruppo di animali trattato con levofloxacina è del 98% al giorno 28.

Da questi primi studi è stato possibile notare la potenziale efficacia di obiltoxaximab EV nella profilassi e nel trattamento dell'infezione da antrace.

Da 6 ulteriori studi preclinici, condotti su conigli bianchi della Nuova Zelanda e macachi cynomolgus, in cui è stato valutato il beneficio attribuito dalla somministrazione di obiltoxaximab EV in aggiunta a farmaci antibatterici (tra cui levofloxacina, doxiciclina e ciprofloxacina) è emerso che la combinazione di antimicrobico e anticorpo monoclonale Anthim® fornisce tassi di sopravvivenza più elevati rispetto alla sola terapia antibiotica.⁵⁴

Studi preclinici di efficacia sulla formulazione intramuscolare di obiltoxaximab

In un primo studio controllato condotto sui conigli bianchi della Nuova Zelanda è stata valutata la sopravvivenza al ventottesimo giorno post-esposizione alle spore di antrace, in seguito alla somministrazione di una singola dose IM di obiltoxaximab pari a 20 mg 30-45 minuti precedentemente l'esposizione alle spore batteriche. Il tasso di sopravvivenza al

giorno 28 era pari al 100% nel gruppo di animali trattati, mentre tutti i conigli del gruppo di controllo sono deceduti entro il quarto giorno di sperimentazione.

In un secondo studio preclinico i conigli vengono esposti alle spore di *B. anthracis* e successivamente divisi in due gruppi: la prima coorte viene trattata con obiltoxaximab in aggiunta a levofloxacin orale in dosaggio pari a 50 mg/kg/die per 5 giorni; il secondo braccio di controllo positivo riceve solo con levofloxacin orale e, infine, ad un terzo gruppo di animali viene somministrata singola dose di obiltoxaximab IM (6-12 ore post-esposizione). Tutti i conigli trattati con obiltoxaximab, da solo o in associazione, sono sopravvissuti (tasso di sopravvivenza pari al 100%), mentre la somministrazione della sola terapia antibiotica a base di levofloxacin ha fornito una sopravvivenza pari al 33%.

Un ulteriore studio preclinico condotto sui conigli della Nuova Zelanda, ha suggerito un aumento del tasso di sopravvivenza degli animali anche in seguito alla somministrazione di obiltoxaximab, in formulazione IM, 18/24 ore post-esposizione alle spore batteriche rispetto alla somministrazione di placebo.⁵⁴

Anche nei macachi *cynomolgus* la somministrazione di una singola dose di obiltoxaximab IM, in concentrazione pari a 16 mg/kg, erogata 24, 48 o 72 ore pre-esposizione alle spore di *B. anthracis* ha fornito una sopravvivenza pari al 100% al cinquantaseiesimo giorno di sperimentazione, rispetto al gruppo di primati trattato con placebo.

In un altro studio condotto sulla stessa specie di primati viene valutata la sopravvivenza fornita dalla somministrazione di obiltoxaximab IM a 24, 36 o 48 ore post-esposizione. Il tasso di sopravvivenza registrato era rispettivamente del 92,8, 42,8 e 28,5% (rispetto al 10% rilevato nel gruppo di controllo).

In un terzo studio sulle scimmie, la somministrazione di una singola dose di obiltoxaximab IM 16 mg/kg ha fornito tassi di sopravvivenza rispettivamente del 100%, quando somministrato 18 ore dopo l'esposizione alle spore batteriche, e dell'83%, quando somministrato 24 ore post-esposizione (rispetto 0 e 10% registrato negli animali afferenti al gruppo di controllo trattato con placebo). La somministrazione di obiltoxaximab IM 16 mg/kg a 36 e 48 ore successivamente l'esposizione all'antrace ha determinato tassi di sopravvivenza compresi tra il 30 e il 50%.⁵⁴

Quindi, gli studi preclinici condotti su conigli bianchi della Nuova Zelanda e macachi *cynomolgus* suggeriscono una potenziale attività protettiva e terapeutica svolta dall'anticorpo monoclonale sperimentale in entrambe le formulazioni (EV e IM).

Studi di fase I per la valutazione della sicurezza di obiltoxaximab

Tre sono gli studi di fase I condotti su soggetti adulti volontari sani per la valutazione di sicurezza e tollerabilità di obiltoxaximab. Nel complesso, la somministrazione di una singola dose (EV o IM) di obiltoxaximab è stata ben tollerata tra i pazienti.

In questi tre studi, la maggior parte degli eventi avversi correlati ad obiltoxaximab erano di gravità lieve e moderata. Gli eventi avversi più comuni, registrati in seguito alla somministrazione di una singola dose EV di Anthim® erano mal di testa, prurito e infezione delle vie respiratorie superiori, oltre a reazioni di ipersensibilità all'infusione, che comprendono prurito, rash e orticaria. In ragione del potenziale sviluppo di reazioni di ipersensibilità è fortemente raccomandata la somministrazione di difenidramina prima di procedere con l'infusione a base di obiltoxaximab.⁵⁴

Conclusioni

Come evidenziato dagli studi preclinici e dagli studi di fase I, l'anticorpo monoclonale obiltoxaximab rappresenta un'ottima risorsa per la profilassi e il trattamento dell'antrace inalatorio, patologia caratterizzata da prognosi sfavorevole se non trattata. Anthim ha dimostrato efficacia sia da solo che in associazione ad una terapia antibiotica adeguata, qualora non siano disponibili o si rivelino inappropriate terapie alternative.

È importante valutare, in sede di somministrazione, l'eventuale premedicazione con difenidramina al fine di mitigare il rischio di reazione di ipersensibilità.

Quindi, ad oggi, obiltoxaximab è una potenziale opzione per il trattamento dell'antrace per inalazione sia in caso di pre-esposizione che post-esposizione.⁵⁶

5. *Clostridium difficile*

5.1 Introduzione

Il *Clostridium difficile* è un batterio Gram-positivo, sporigeno, anaerobio che generalmente infesta il tratto intestinale di animali e uomo, causando diarrea infettiva.

Nel 1935 venne isolato per la prima volta dalle feci di alcuni neonati e venne denominato *Bacillus difficilis* per riflettere la difficoltà nel coltivarlo. Risulta essere letale per alcune specie a causa della produzione di un'esotossina. L'infezione da *C. difficile* (CDI – *Clostridium difficile* infection) è una patologia mediata da tossine ed è caratterizzata da diversi sintomi, tra cui diarrea (da lieve e grave), colite pseudomembranosa⁵⁷(grave malattia infiammatoria del colon caratterizzata dalla formazione di pseudomembrane costituite da cellule epiteliali necrotiche, fibrina, muco e leucociti⁵⁸), megacolon tossico fino ad arrivare a sepsi e morte in determinati casi. La malattia da *C. difficile* non è da sottovalutare, in quanto può rivelarsi fatale; tuttavia, la maggior parte degli individui infetti rimane asintomatica.⁵⁷

I principali fattori di rischio per lo sviluppo dell'infezione da *C. difficile* sono l'assunzione di antibiotici, i quali alterano la flora batterica intestinale favorendo la crescita del batterio in analisi, la terapia concomitante con inibitori di pompa protonica e l'età avanzata.⁵⁹

La trasmissione del *C. difficile* avviene per via oro-fecale e la CDI si contra principalmente mediante l'ingestione accidentale di spore batteriche. Le spore germinano a livello dell'intestino tenue nella forma di cellula vegetativa, metabolicamente attiva, in grado di colonizzare e infettare il colon in seguito ad alterazione del microbiota intestinale indotta dalla somministrazione di antibiotici.⁵⁸

5.1.1 Epidemiologia *Clostridium difficile*

Negli ultimi decenni è stato registrato un drammatico cambiamento nell'epidemiologia dell'infezione da *C. difficile*, caratterizzato da un marcato aumento dell'incidenza e della gravità della patologia, rendendo la CDI una grave minaccia per la salute pubblica.

In passato la CDI era considerata una malattia nosocomiale, associata all'esposizione ad antibiotici, mentre oggi si manifesta anche in categorie di popolazione considerate a basso rischio, come donne sane peripartum, bambini, pazienti naïve agli antibiotici e soggetti con esposizione sanitaria recente minima o addirittura nulla. Infatti, i dati provenienti da Europa ed USA suggeriscono che l'incidenza di CDI ha subito un incremento costante nel

XXI secolo e che sta raggiungendo un plateau. Parallelamente all'aumentata incidenza, è stata rilevata un'aumentata morbilità e mortalità, in concomitanza con la diffusione di un ceppo di *C. difficile* raro, noto come ribotipo 027. Inoltre, hanno coinciso una crescente refrattarietà alla tradizionale terapia e un maggiore rischio di recidiva.

La CDI è considerata la principale causa di diarrea associata ad antibiotici e rappresenta circa il 15-25% di tutti i casi. L'infezione da *C. difficile* colpisce soprattutto soggetti anziani con età superiore a 65 anni; infatti, nel 2009 negli USA il 92% dei ricoveri per CDI riguardava pazienti over 65.⁶⁰

Il *C. difficile* rappresenta un grave problema sanitario negli USA con circa mezzo milione di infezioni e 29.000 decessi ogni anno.⁵⁸

Dal 2000 al 2003 negli USA l'incidenza di CDI è quasi raddoppiata, passando da 30/40 casi ogni 100.000 abitanti a 60 casi per 100.000 abitanti. Insieme all'incidenza della malattia sono aumentate anche la percentuale di complicazioni (come sviluppo di megacolon, colectomia e shock) dal 7,1 al 18,2% e la mortalità a 30 giorni, dal 4,7 al 13,8%.

Dal 2000 al 2008 il numero di ricoveri ospedalieri per CDI negli USA è aumentato di circa 2,5 volte (da 139.000 a 349.000). Tuttavia, dopo un costante aumento registrato nel primo decennio del ventunesimo secolo, il numero di ricoveri sembra essersi stabilizzato tra il 2008 e il 2010.

In Europa sono state osservate le stesse tendenze e recenti dati suggeriscono che l'incidenza da CDI ha subito un lieve calo in alcune zone, dovuto al successo delle misure di controllo e prevenzione e al cambiamento di prevalenza di ceppi epidemici.

Circa il 12-24% dei pazienti con storia di CDI, presenta una recidiva, e il rischio di ulteriori recidive aumenta del 50-65% se nei pazienti si sono verificati precedentemente più di due episodi. Non sono ancora chiari i meccanismi alla base delle recidive; tuttavia, si esclude l'insorgenza di una forma di *C. difficile* resistente alle attuali terapie che prevedono la somministrazione di metronidazolo o vancomicina.⁶⁰

5.1.2 Meccanismi patogenetici delle tossine prodotte da *C. difficile*

I sintomi che caratterizzano l'infezione da *C. difficile* sono correlati alla produzione di due esotossine: la tossina A (TcdA) e la tossina B (TcdB), appartenenti alla famiglia delle grandi tossine clostridiali (LCT). Alcuni ceppi di *C. difficile*, tra cui il ribotipo 027, producono una terza tossina denominata tossina *C. difficile* transferasi (CDT), responsabile dell'aumento di virulenza del battere e della gravità della malattia.

Inizialmente, sulla base di studi eseguiti su animali, si riteneva che la tossina A fosse il fattore responsabile degli effetti patogeni del *C. difficile*. L'aggiunta di TcdA a livello intestinale nei conigli ha riprodotto i peculiari sintomi della CDI, tra cui, infiammazione, aumento della permeabilità della mucosa, secrezione di liquidi e danno tissutale. TcdB, invece, era in grado di provocare il decesso di criceti con pregressi danni intestinali. Questi risultati hanno suggerito una potenziale azione sinergica di TcdA e TcdB: TcdA agisce destabilizzando l'integrità epiteliale, in modo da consentire a TcdB di entrare ed esplicare gli effetti tossici nell'ospite bersaglio.

L'importanza della tossina A nel determinare gli effetti patogeni è stata messa in dubbio in seguito al rilevamento di ceppi di *C. difficile* che producevano solamente la tossina B (A-B+). Questi ceppi riproducono lo stesso quadro clinico tipico dei ceppi A+B+, con sintomi che si estendono dalla lieve diarrea fino ad esiti più gravi come colite pseudomembranosa fino a morte, indice che la TcdB è sufficiente a provocare la patologia nell'uomo. La tossina B, dunque, si è mostrata capace di interrompere l'integrità epiteliale, aumentare la permeabilità delle mucose, stimolare la produzione di citochine e il reclutamento di neutrofili causando danno tissutale. Questi studi suggeriscono che TcdB svolge un ruolo importante nella patogenesi del *C. difficile* nell'uomo.

In conclusione, gli studi sui meccanismi patogenetici alla base dell'infezione da *C. difficile* indicano un potenziale ruolo di entrambe le tossine TcdA e TcdB nel determinare l'infezione, ma la tossina B sembra essere implicata nell'aspetto di gravità della malattia.

Il ruolo della tossina CDT nella patogenesi della CDI è rimasto inesplorato fino a quando è aumentata notevolmente la prevalenza di ceppi di *C. difficile* esprimenti CDT in ambito ospedaliero. Diversi studi hanno riportato che CDT è associata a malattie gravi, mortalità più elevata e rischio di recidiva nell'uomo, suggerendo una potenziale attività enterotossica. Le tossine A e B sono organizzate in quattro domini funzionali che contribuiscono all'ingresso della tossina nel citosol della cellula ospite e all'esplicazione degli effetti tossici. TcdA e TcdB, grazie al legame che formano con diverse proteine e zuccheri posti sulla superficie delle cellule epiteliali che rivestono la mucosa del colon, vengono interiorizzate mediante endocitosi. Le tossine vengono incluse all'interno degli endosomi e il pH acido (tipico dell'ambiente endosomiale) induce una modificazione conformazionale, con conseguente formazione di pori e traslocazione del dominio della glucosiltransferasi (GTD) nel citosol.

Il dominio glucosiltransferasi inattiva la GTPasi della famiglia Rho, mediante il trasferimento di un'unità di glucosio dall'UDP-glucosio (uridina difosfato-glucosio)

all'enzima in questione (GTPasi). Le GTPasi Rho sono una famiglia di piccole proteine G che rivestono un ruolo fondamentale nella segnalazione intracellulare.

La glucosilazione della GTPasi interrompe la segnalazione cellulare, inducendo l'apoptosi cellulare.⁵⁸

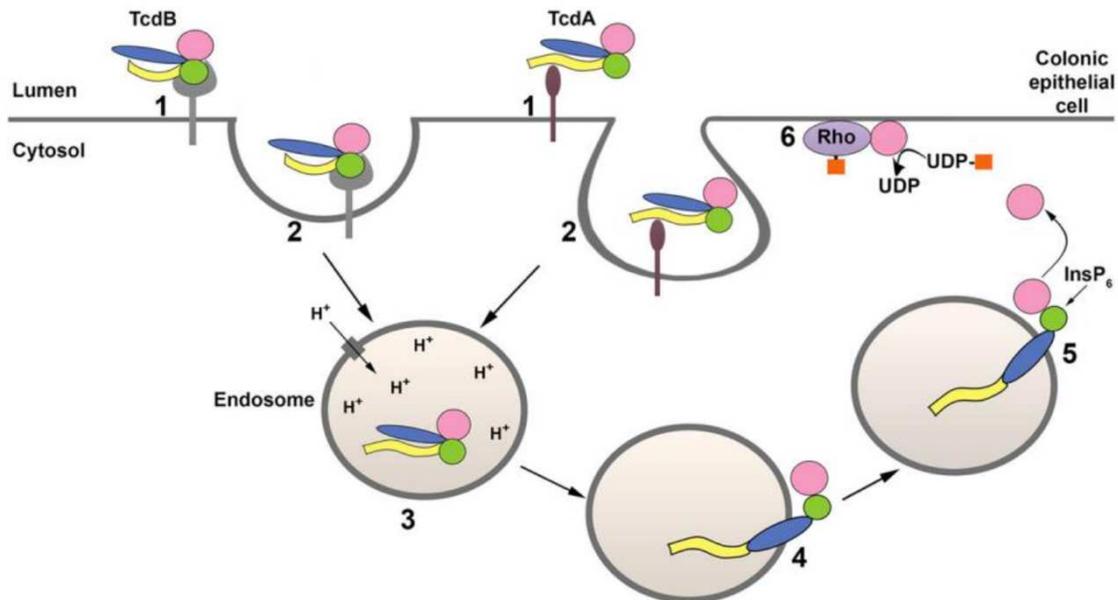


Figura 9. Rappresentazione schematica del meccanismo d'azione delle tossine A e B secrete da *Clostridium difficile*.⁵⁸

In ultima analisi, le tossine A e B interrompono le giunzioni epiteliali cosiddette “tight”, inducono apoptosi delle cellule epiteliali del colon, causando un danno tissutale diretto e, inoltre, inducono queste ultime a rilasciare citochine pro-infiammatorie e neutrofili chemiotattici, con sviluppo di risposta infiammatoria innata acuta con reclutamento di neutrofili, scenario clinico tipico dell'infezione da *C. difficile*.

La compromissione della barriera epiteliale associata alla prolungata e deregolata risposta infiammatoria con infiltrazione di neutrofili può amplificare il danno tissutale, contribuendo alla formazione di pseudomembrana, caratteristica clinica chiave della colite pseudomembranosa.

La tossina CDT agisce in sinergia con TcdA e TcdB, aumentando la produzione di citochine pro-infiammatorie da parte delle cellule immunitarie innate; inoltre, contribuisce alla virulenza del batterio, inducendo la formazione di protrusioni cellulare (a base di microtubuli) al fine di migliorare l'adesione batterica alle cellule ospiti.⁵⁸

5.1.3 Strategie terapeutiche

La strategia terapeutica consiste, inizialmente, nell'interruzione dell'assunzione dell'antibiotico responsabile della colite da *C. difficile* e successivamente si procede con la somministrazione di una terapia antibiotica orale efficace contro il batterio in questione, come la vancomicina.⁶⁰ Nel corso dell'ultimo decennio è stato approvato un nuovo antibiotico per il trattamento delle infezioni da *C. difficile*, la fidaxomicina. Quest'ultima esercita un'attività battericida nei confronti del batterio in esame, ma, a differenza della vancomicina, presenta una spiccata selettività per i Clostridi che si riflette in una minore interferenza con la flora batterica intestinale endogena; inoltre, consente di ridurre il tasso di recidive.⁶¹

Un altro trattamento terapeutico, utilizzato in pazienti che presentano recidive gravi e piuttosto frequenti, consiste nel trapianto di feci: nel colon del paziente vengono inserite circa 200-300 mL di feci provenienti da un donatore sano, mediante clistere, sondino gastrico o mediante colonscopio. Questo procedimento consente il ristabilimento di un equilibrio della flora batterica intestinale del paziente affetto da colite indotta da *C. difficile*. Sono attualmente in fase di studio dei vaccini a base di tossine ricombinanti inattivate, i quali stimolano lo sviluppo di anticorpi antitossina, utili nella prevenzione di forme gravi o ricorrenti di CDI.⁶⁰

Nel 2016 è stato approvato dalla FDA (successivamente nel 2017 da EMA) il primo anticorpo monoclonale, bezlotoxumab, per la prevenzione delle recidive di CDI.¹⁶

5.2 Utilizzo di bezlotoxumab nella prevenzione delle recidive da CDI

In seguito al riconoscimento del ruolo critico delle tossine A e B nella patogenesi dell'infezione da *C. difficile* è stato sviluppato l'anticorpo monoclonale antitossina B bezlotoxumab (ZINPLAVA)⁶², come trattamento aggiuntivo alla terapia antibiotica standard per la prevenzione delle recidive da CDI negli adulti che presentano un elevato rischio di recidiva di CDI.⁶³ Bezlotoxumab non è indicato per il trattamento dell'infezione da *C. difficile* in corso, infatti, non sortisce alcun effetto su questa; svolge un ruolo centrale nella prevenzione delle recidive da CDI.

L'anticorpo monoclonale in questione è stato ottenuto con tecniche del DNA ricombinante, mediante l'immunizzazione di topi transgenici con tossoidi interi (tossina B inattivata), dalla MassBiologics, in collaborazione con Medarex.⁶²

“Bezlotoxumab è un anticorpo monoclonale umano antitossina che si lega con elevata affinità alla tossina B di *C. difficile* e ne neutralizza l'attività. Bezlotoxumab previene la recidiva di CDI fornendo un'immunità passiva contro la tossina prodotta a seguito dello sviluppo di spore di *C. difficile* persistenti o di nuova acquisizione”.⁶³

Bezlotoxumab è il primo farmaco ad aver ricevuto approvazione per questo tipo di indicazione prima dalla FDA (2016) e successivamente anche da EMA (gennaio 2017).¹⁶

Bezlotoxumab viene somministrato durante il ciclo di terapia antibiotica standard per CDI mediante singola infusione endovenosa di 10 mg/kg corporeo.⁶³

5.2.1 Proprietà farmacodinamiche di bezlotoxumab

Studi in vitro hanno dimostrato un duplice meccanismo d'azione di bezlotoxumab. L'anticorpo monoclonale è in grado di legarsi a due siti separati all'interno del dominio di oligopeptidi ripetitivi combinati (CROP) della tossina B, inoltre, ha capacità di occludere parzialmente alcuni siti di legame per la tossina.

Il legame di bezlotoxumab con la tossina B ostacola l'interazione di quest'ultima con il recettore CSPG4 della cellula bersaglio impedendo la manifestazione dell'intossicazione dell'ospite.⁶²

5.2.2 Proprietà farmacocinetiche di bezlotoxumab

Bezlotoxumab viene somministrato mediante infusione endovenosa, pertanto risulta immediatamente e completamente biodisponibile.

La farmacocinetica di bezlotoxumab è stata valutata in oltre 1.500 pazienti coinvolti in 2 studi multicentrici di fase III. Da questi studi è emerso che, in seguito alla somministrazione di una singola dose EV di ZINPLAVA 10 mg/kg, i valori medici di AUC e C_{max} erano rispettivamente 53.000 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ e 185 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Bezlotoxumab ha mostrato una distribuzione extravascolare limitata, e il volume medio di distribuzione registrato è stato di 7,33 L.

ZINPLAVA, come avviene per gli altri anticorpi monoclonali, viene degradato mediante processi di catabolismo proteico.

La clearance media rilevata è stata di 0,137 L/giorno e l'emivita media è pari a circa 19 giorni. La clearance di bezlotoxumab aumenta in modo significativo all'aumentare del peso corporeo, per questo motivo la dose di somministrazione viene calcolata sulla base del peso corporeo. Non è richiesto aggiustamento del dosaggio sulla base di età, sesso, razza, etnia, compromissione renale, compromissione epatica e presenza di comorbidità, poiché, dagli studi effettuati, è risultato che questi fattori non influiscono sull'esposizione a bezlotoxumab.

Non sono stati condotti studi di interazione con altri medicinali, perché bezlotoxumab ha come bersaglio una tossina esogena (tossina B prodotta dal batterio *C. difficile*), pertanto difficilmente può dare luogo ad interazione farmacologica significativa.⁶³

5.2.3 Studi clinici di fase 3 relativi a bezlotoxumab

L'efficacia, la sicurezza, la tollerabilità e le proprietà farmacocinetiche di bezlotoxumab sono state valutate in due studi clinici multicentrici di fase 3. Si tratta di studi clinici randomizzati, controllati con placebo, in doppio cieco denominati MODIFY I e MODIFY II. In questi studi sono stati arruolati 1.613 pazienti; di questi 810 sono stati selezionati per ricevere bezlotoxumab e 803 sono stati trattati con placebo. L'età mediana era di 65 anni, l'85% dei pazienti era di razza bianca e il 57% della coorte era rappresentato da donne.

A tutti i pazienti è stata somministrata in concomitanza una terapia antibiotica standard orale, a scelta dello sperimentatore, che prevedeva metronidazolo, vancomicina o fidaxomicina.

I partecipanti arruolati negli studi hanno ricevuto, prima del completamento della terapia antibiotica, ZINPLAVA o placebo mediante una singola infusione EV e sono stati monitorati per le 12 settimane consecutive.

Il tasso di recidiva di CDI nelle 12 settimane successive all'infusione di bezlotoxumab era rispettivamente pari a 16,5% per i pazienti trattati con ZINPLAVA in aggiunta alla terapia

antibiotica standard e 26,6% nei pazienti che hanno ricevuto placebo in combinazione con la terapia antibatterica standard.

Suddividendo i partecipanti in sottogruppi, sulla base di caratteristiche comuni, è stato dimostrato che bezlotoxumab riduce significativamente il tasso di recidive da CDI nei pazienti con età superiore a 65 anni (15,4% bezlotoxumab vs. 31,4% placebo), nei pazienti che hanno manifestato uno o più episodi di CDI negli ultimi 6 mesi (25,0% vs. 41,1%), nei pazienti immunocompromessi (14,6% vs. 27,5%), nei pazienti affetti da CDI severa (10,7% vs. 22,4%), pazienti con CDI da ceppo ipervirulento, ribotipo 027, 078 e 244 (21,6% vs. 32,2%).⁶³

Non sono state registrate differenze nel tasso di guarigione iniziale tra il gruppo di pazienti trattato con ZINPLAVA e la coorte che ha ricevuto placebo. Questo suggerisce che bezlotoxumab è efficace nel ridurre le recidive da CDI, ma non è efficace nel contrastare un'infezione da *C. difficile* in corso.

Un'analisi ad hoc condotta successivamente per identificare la tipologia di pazienti con maggiore probabilità di beneficiare del trattamento con bezlotoxumab in aggiunta alla terapia antibiotica standard ha suggerito che ZINPLAVA riduce efficacemente il rischio di recidive da CDI in pazienti con 3 o più fattori di rischio, tra cui età superiore a 65 anni, storia di uno o più episodi di CDI negli ultimi 6 mesi, immunocompromissione, CDI severa, CDI da ceppo ipervirulento; mentre, i pazienti senza fattori di rischio non hanno mostrato alcun beneficio nel trattamento con bezlotoxumab.⁶²

Eventi avversi

Le reazioni avverse più comuni registrate in seguito del trattamento con ZINPLAVA sono state nausea, diarrea, piressia e cefalea.⁶³

Il tasso di eventi avversi del gruppo trattato con bezlotoxumab e della coorte che ha ricevuto placebo è confrontabile: il 10% dei soggetti nel gruppo di trattamento con l'anticorpo monoclonale ha sperimentato una o più reazioni avverse riconducibili all'infusione, contro l'8% dei soggetti trattato con placebo.

Negli studi di fase III è stato segnalato come potenziale evento avverso l'insufficienza cardiaca; nel 12,7% dei pazienti trattati con bezlotoxumab con precedente storia di insufficienza cardiaca congestizia si è verificato un grave evento avverso relativo ad insufficienza cardiaca, rispetto al 4,8% dei soggetti che hanno ricevuto placebo.

L'insorgenza di insufficienza cardiaca non era correlata all'infusione, ma si verificava nel periodo di follow-up di 12 settimane.

L'FDA raccomanda l'utilizzo di bezlotoxumab in pazienti con anamnesi di insufficienza cardiaca solo nel caso in cui il beneficio superi il rischio. Tale raccomandazione non è invece stata riportata dall'EMA, in quanto sostiene che non ci siano dati sufficienti per correlare l'aumento di rischio di reazioni avverse alla somministrazione di bezlotoxumab in pazienti con precedente storia di insufficienza cardiaca.

Gli attuali dati disponibili sulla sicurezza del medicinale suggeriscono che non sussiste alcuna evidenza di associazione tra bezlotoxumab ed effetto negativo sulla funzionalità cardiaca.⁶²

Conclusioni

La somministrazione di bezlotoxumab mediante singola infusione endovenosa, in combinazione con terapia antibiotica standard, si è mostrata efficace nel ridurre il rischio di recidiva di CDI nell'arco di 12 settimane in pazienti che presentano 3 o più fattori di rischio, tra cui età (> 65 anni), pregressa storia di CDI negli ultimi 6 mesi, immunocompromissione, CDI severa, CDI da ceppo ipervirulento. I pazienti esenti da fattori dai fattori di rischio precedentemente elencati non hanno, sorprendentemente, beneficiato della somministrazione aggiuntiva dell'anticorpo monoclonale.

ZINPLAVA rappresenta sicuramente un'importante risorsa nella prevenzione delle recidive da CDI, tuttavia devono essere valutati attentamente il rapporto rischio-beneficio e il rapporto costo-efficacia.⁶²

6. Infezione da SARS-CoV-2

6.1 Introduzione

Negli ultimi due anni la patologia da SARS-CoV-2 (COVID-19, coronavirus disease of 2019), oltre ad aver colpito il sistema sanitario e gli equilibri socioeconomici globali, ha profondamente modificato le nostre vite e le nostre abitudini.

Dopo la sua comparsa nel dicembre 2019, il COVID-19 è stato rapidamente designato dall'OMS come una pandemia globale.

La sintomatologia tipica di un soggetto infettato da COVID-19 consiste in febbre, tosse secca, dispnea, mialgia e affaticamento.⁶⁴

6.1.1 Epidemiologia

Ad oggi, a livello globale sono stati confermati oltre 530 milioni di casi di SARS-CoV-2 e sono state registrate oltre 6 milioni di decessi. Nel nostro paese, da inizio 2020 ad oggi, sono state rilevate quasi 17 milioni di infezioni da coronavirus e più di 165.000 persone sono decedute a causa di questo virus.⁶⁵

L'epidemia da COVID-19 non ha risparmiato nessun paese, nessuna etnia e ha coinvolto persone di qualsiasi età.⁶⁴

La malattia da SARS-CoV-2 è stata osservata per la prima volta nel dicembre 2019 in diversi pazienti a Wuhan (Repubblica Popolare Cinese) e si è manifestata come una polmonite seguita da insufficienza respiratoria. Il virus si è diffuso prima in Cina e successivamente in diversi paesi asiatici, fino a raggiungere l'Italia, dove ha causato una grave epidemia. Nonostante le misure di contenimento adottate fin dagli esordi dell'epidemia, il COVID-19 si è rapidamente diffuso inizialmente in Europa e in Nord America e successivamente in ogni angolo del mondo.⁶⁶

Il problema principale del SARS-CoV-2, oltre all'evidente mortalità, è l'elevatissima contagiosità, attribuita alle caratteristiche virologiche peculiari del virus⁶⁷; viene trasmesso per contatto diretto con individuo infetto o per contatto con secrezioni nasali, orali e oculari di soggetti infetti. Questo virus è particolarmente resistente, infatti, può depositarsi e sopravvivere per diversi giorni anche su superfici inanimate.⁶⁴ Secondo quanto confermato da recenti studi ambienti ristretti e affollati hanno funto da catalizzatori di focolai di SARS-CoV-2, tra cui ospedali e altri centri sanitari, strutture di assistenza a lungo termine, strutture

ludiche, luoghi di lavoro e istruzione, raduni di massa, eventi sportivi, incontri religiosi, prigionie ecc.⁶⁶

La diagnosi precoce è fondamentale per controllare la diffusione del virus. Attualmente il gold standard per la diagnosi dell'infezione da SARS-CoV-2 è rappresentato dal rilevamento dell'acido nucleico in campioni nasofaringei e orofaringei basato su meccanismo di reazione a catena della polimerasi inversa (RT-PCR, tampone molecolare). I problemi legati a questo metodo di rilevamento sono il dispendio in termini di tempo e la richiesta di tecnici di laboratorio dotati di determinate competenze nell'estrazione del campione biologico. In seguito all'insorgenza di questa problematica di natura temporale sono stati introdotti i tamponi cosiddetti "antigenici" che sono in grado di rilevare la presenza di antigeni virali (proteina S e proteina N) nelle mucose orale e nasale in tempi ristretti.

Il periodo di incubazione del virus SARS-CoV-2 varia da 3 a 14 giorni ed è influenzato dalle condizioni immunologiche del paziente.⁶⁴

6.1.2 Organizzazione strutturale e meccanismi patogenetici del SARS-CoV-2

Le particelle virali di SARS-CoV-2 hanno una forma pressoché sferica e presentano un diametro compreso tra 60 e 140 nm.

Il SARS-CoV-2 è un virus a RNA, appartenente al genere betacoronavirus, famiglia di virus con cui condivide l'organizzazione genomica. Il genoma di questo virus si compone principalmente di 4 geni strutturali che codificano rispettivamente per le seguenti proteine: glicoproteina spike (S), proteina dell'envelope (E), proteina di membrana (M) e proteina del nucleocapside (N); inoltre, codifica per ulteriori 7 proteine definite accessorie. Le proteine strutturali precedentemente elencate rivestono un ruolo fondamentale nella persistenza e nella replicazione virale:

- 1) La proteina M è la più abbondante glicoproteina strutturale e si occupa del trasporto di nutrienti attraverso la membrana cellulare, inoltre, conferisce alle particelle virali la loro caratteristica conformazione.
- 2) La proteina S, o spike, è una glicoproteina di membrana che costituisce i peplomeri virali; si tratta di una prominenza che determina la specificità del virus per le cellule epiteliali delle vie respiratorie.
- 3) L'RNA è associata alla proteina N che conferisce stabilità al genoma.
- 4) La proteina E gioca un ruolo fondamentale nel rilascio delle particelle virali una volta che sono state assemblate durante il processo patogenetico.⁶⁴

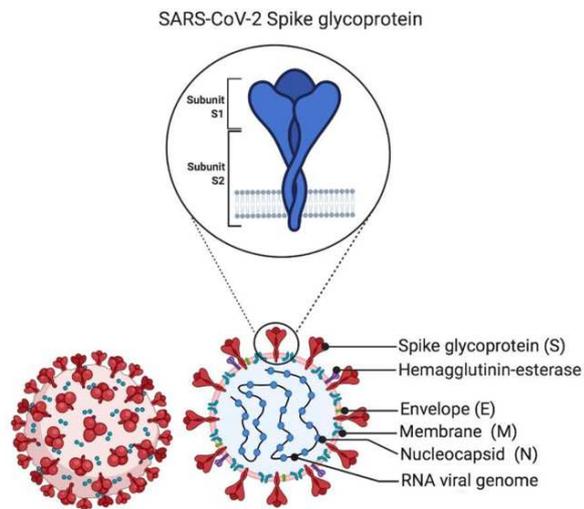


Figura 10. Rappresentazione strutturale del SARS-CoV-2.⁶⁴

La proteina spike, localizzata sulla superficie delle particelle virale è indispensabile nella fase di infezione e nell'espletare i meccanismi patogenetici. L'ingresso del SARS-CoV-2 nella cellula ospite è mediato dalle proteine S, che formano delle punte sulla superficie delle particelle virali, che conferiscono al virus un aspetto simile ad una corona. La proteina S è costituita da tre subunità: ectodominio, un'ancora transmembrana a singolo passaggio e un dominio intracellulare. L'ectodominio è ulteriormente suddiviso in due subunità: la subunità S1 che media il legame con il recettore cellulare e la subunità S2 che favorisce la fusione della particella virale con la membrana ospite, facilitando l'ingresso del genoma virale nelle cellule ospiti. Il virus SARS-CoV-2 entra nella cellula bersaglio attraverso l'interazione della subunità S1 con il recettore ACE2 (enzima di conversione dell'angiotensina 2) posto sulla superficie cellulare. I recettori ACE2 sono espressi in quasi tutti i tessuti dell'organismo umano, ma abbondano in alcuni sistemi, tra cui polmoni, reni, tronco encefalico, tessuto adiposo, cuore, sistema vascolare, stomaco, fegato e mucose nasale e orale.

Una volta che il virus si è introdotto nelle cellule ospite, si avviano i processi di trascrizione e traduzione, responsabili della sintesi delle proteine strutturali e accessorie. La sintesi del nuovo genoma virale è sostenuta dall'enzima RNA polimerasi RNA-dipendente, che utilizza come stampo il filamento negativo.

In seguito alla replicazione del genoma virale, avviene la traduzione delle proteine virali strutturali S, E, N ed M che si assemblano con il nucleocapside dando luogo alla formazione di un virione maturo, che viene rilasciato per escitosi.⁶⁴

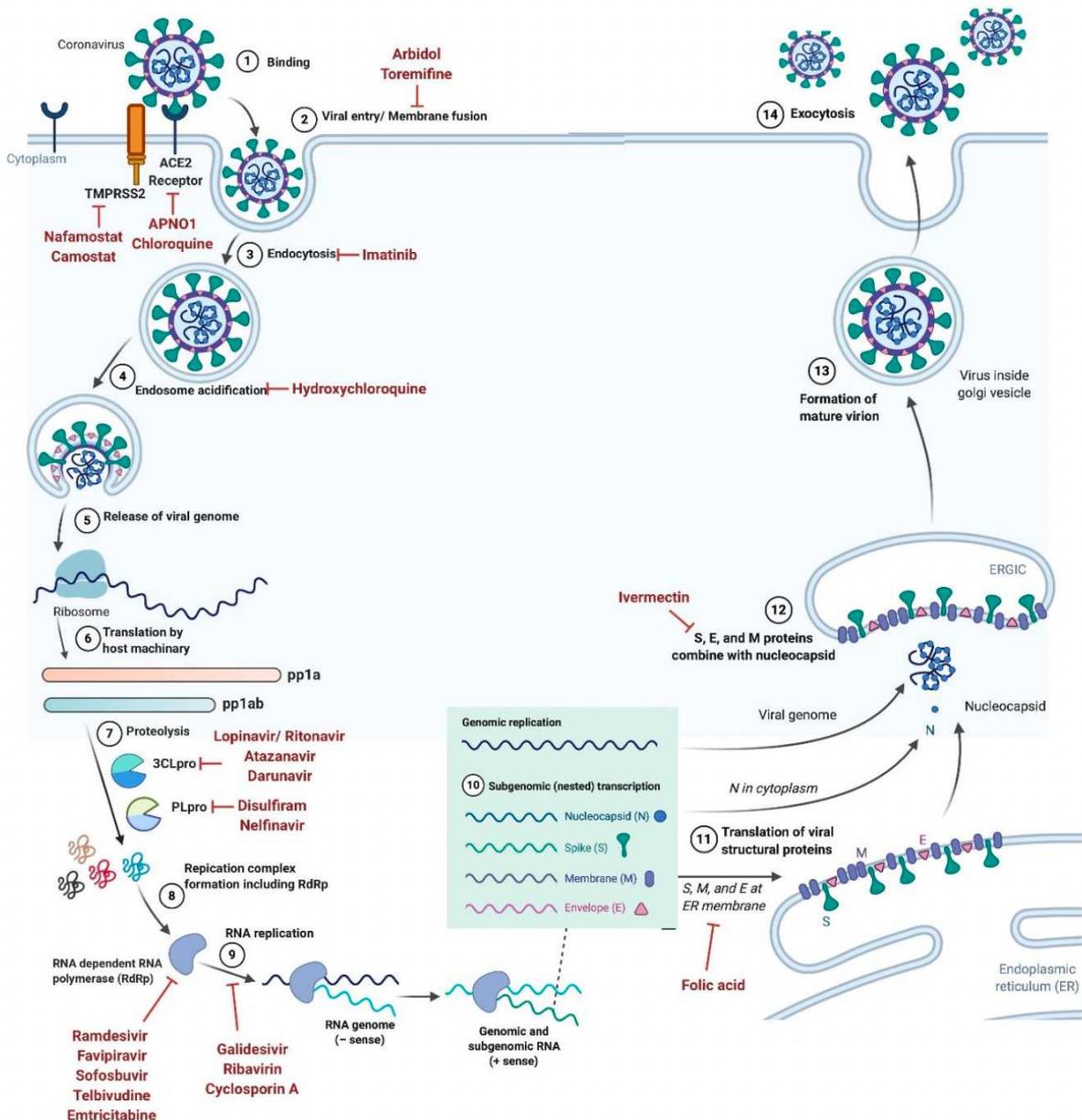


Figura 11. Rappresentazione schematica del ciclo di replicazione del virus SARS-CoV-2, con riferimento ai diversi target terapeutici.⁶⁴

6.1.3 Manifestazioni cliniche del COVID-19

La patologia determinata dal virus SARS-CoV-2 può manifestarsi con lievi sintomi respiratori, fino a grave insufficienza respiratoria. Una volta che il virus è penetrato a livello delle cellule epiteliali delle vie aeree superiori, inizia a replicarsi rapidamente, migrando verso l'epitelio che costituisce alveoli e polmoni. In seguito all'infezione l'organismo umano sviluppa una forte risposta immunitaria che determina sindrome da distress respiratorio acuto e insufficienza respiratoria; quest'ultima è considerata la causa principale di decesso nei pazienti malati di COVID-19. Tuttavia, in alcuni casi è stata segnalata anche una insufficienza multiorgano.

I principali danni evidenziati dalle analisi istopatologiche, condotte su tessuti di pazienti malati di COVID-19, sono i seguenti: danno alveolare diffuso, formazione di membrana ialina, desquamazione di pneumociti, depositi di fibrina nei polmoni, e, in alcuni casi, infiammazione essudativa.

L'infezione da SARS-CoV-2 sembra riguardare tutte le fasce d'età della popolazione e l'età mediana dell'infezione è circa 50 anni. Nonostante ciò, le manifestazioni cliniche differiscono in base all'età del soggetto. I pazienti di età avanzata (> 60 anni) e con comorbidità presentano un rischio maggiore di sviluppare malattie respiratorie gravi che richiedono l'ospedalizzazione, e, di conseguenza, hanno maggiore probabilità di andare incontro a morte; mentre, la maggior parte degli individui giovani e dei bambini presenta sintomi lievi o, addirittura, è asintomatica.

I sintomi che generalmente si manifestano con il COVID-19 sono febbre, affaticamento, tosse secca, produzione di espettorato, mal di testa, emottisi, diarrea, mal di gola, brividi e nausea. Uno dei segni distintivi dell'infezione da SARS-CoV-2 è il disturbo sensoriale, in particolare di gusto e olfatto.⁶⁷

6.1.4 Potenziali strategie di trattamento del COVID-19

Il primo medicinale approvato in Italia nel luglio 2020 “per il trattamento da coronavirus 2019 (COVID-19), in pazienti adulti ed adolescenti (di età pari o superiore a 12 anni e peso pari ad almeno 40 kg) con polmonite che richiede ossigenoterapia supplementare”⁶⁸ è un antivirale ad uso endovenoso: Veklury (remdesivir). Successivamente, nel dicembre 2021 è stata esteso il campo di applicazione di Veklury al “trattamento di COVID-19 negli adulti non ospedalizzati per COVID-19 e non in ossigenoterapia con insorgenza di sintomi da non oltre 7 giorni e in presenza di condizioni cliniche predisponenti che rappresentino dei fattori di rischio per lo sviluppo di COVID-19 grave”.⁶⁸

Remdesivir inibisce la replicazione delle particelle virali, impedendo la sua moltiplicazione nell'organismo infetto. Alcuni studi hanno riportato che l'antivirale, grazie al suo meccanismo d'azione, facilita il recupero nei pazienti adulti ospedalizzati per infezione da SARS-CoV-2, ma non riduce la mortalità in modo statisticamente significativo rispetto al placebo.⁶⁷

L'AIFA precisa che “Veklury è stato autorizzato in Europa con procedura “subordinata a condizioni”, ciò significa che devono essere forniti ulteriori dati su questo medicinale. L'EMA esaminerà almeno annualmente i nuovi dati aggiornando, se necessario, il riassunto delle caratteristiche del prodotto (RCP)”.⁶⁹

Successivamente sono stati autorizzati due antivirali orali “per il trattamento della malattia da coronavirus 2019 (COVID-19) negli adulti che non necessitano di ossigenoterapia supplementare e che presentano un elevato rischio di sviluppare una forma severa di COVID-19”⁶⁸ e sono rispettivamente Lagevrio (molnupiravir) e Paxlovid (ritonavir). Lagevrio non è ancora stato approvato dall’EMA, ma in Italia è stata autorizzata la distribuzione a partire dal 26 novembre 2021. Dunque, molnupiravir può essere impiegato solo in situazioni di emergenza, come, per esempio, l’aumento dei tassi di infezioni e decessi dovuti a COVID-19 in tutta l’UE.⁶⁸ Lagevrio deve essere somministrato il più precocemente possibile in seguito alla diagnosi di infezione da SARS-CoV-2 ed entro 5 giorni dall’insorgenza dei sintomi.⁷⁰

Paxlovid è stato approvato con procedura centralizzata dall’EMA e l’Italia ha recepito l’autorizzazione europea il 31 gennaio 2021 con la determina n.15.⁶⁸

Ritonavir è un inibitore della replicazione virale, attualmente in uso per il trattamento dell’infezione da HIV, che agisce inattivando le proteasi 3CLpro e PL2pro. Attualmente le prove di efficacia suggeriscono che la somministrazione di ritonavir non è correlata ad un beneficio clinico rispetto alla terapia ordinaria; tuttavia, sono in corso numerosi studi che coinvolgono ritonavir (da solo o in associazione) di cui si attendono i risultati nei mesi a venire.⁷¹

Ad oggi la strategia più efficace per prevenire e controllare l’infezione da SARS-CoV-2 è la vaccinazione.⁶⁷

Nel corso della pandemia da COVID-19 sono stati sviluppati diversi anticorpi monoclonali per il trattamento delle infezioni da SARS-CoV-2, tra cui Ronapreve™ (casirivimab-imdevimab), Regkirona™ (regdanvimab), Xevudy® (sotrovimab), bamlanivimab-etesevimab e, infine, Evusheld® (tixagevimab-cilgavimab). Questi anticorpi monoclonali non sono stati autorizzati secondo le procedure standard, ma sono state autorizzate in via temporanea; infatti, la distribuzione di tali medicinali viene effettuata dal Commissario straordinario per l’attuazione e il coordinamento delle misure di contenimento e contrasto dell’emergenza epidemiologica COVID-19.

Per ottenere i dati relativi alla sicurezza di tali medicinali, questi ultimi sono sottoposti a monitoraggio addizionale.⁷²

6.2 Ronapreve™ nella terapia dei pazienti con COVID-19

Ronapreve™ è una combinazione di due anticorpi monoclonali umani casirivimab e imdevimab, diretti contro la proteina spike dell'agente eziologico della patologia COVID-19. Inizialmente, nel novembre 2020, è stato autorizzato negli Stati Uniti all'uso in caso di emergenza per il trattamento dell'infezione da SARS-CoV-2; in seguito, nel febbraio 2021 casirivimab-imdevimab ha ottenuto un parere favorevole da parte dell'EMA per il trattamento del COVID-19 in pazienti che non necessitano di ossigenoterapia, ma che presentano un elevato rischio di progressione grave della patologia. L'associazione di questi due anticorpi monoclonali è stata sviluppata dall'azienda Refeneron Pharmaceuticals.

Ronapreve™ viene somministrato mediante un'unica infusione endovenosa, o, in alternativa, mediante iniezione sottocutanea.

La dose raccomandata dalle autorità sanitarie per il trattamento del COVID-19 è di rispettivamente 600 mg di casirivimab e 600 mg di imdevimab; invece, per la profilassi pre-esposizione si raccomanda una dose iniziale (di carico) di 600 mg (EV o SC) per ciascuno dei due anticorpi monoclonali, seguito da una somministrazione (EV o SC) mensile di casirivimab e imdevimab in concentrazione pari a 300 mg ciascuno.⁷³

6.2.1 Proprietà farmacodinamiche di Ronapreve™

Gli anticorpi casirivimab e imdevimab si legano a due diversi epitopi del dominio di legame recettore ACE2 umano, impedendo così l'interazione della proteina spike virale con suddetto recettore. In questo modo viene bloccato l'ingresso delle particelle virali nelle cellule e vengono inibiti i processi di replicazione virale nell'organismo ospite.

Studi preclinici, condotti su animali di diversa specie, hanno evidenziato che l'associazione dei due anticorpi rappresenta un potenziale trattamento nella prevenzione e cura terapeutica dell'infezione da SARS-CoV-2, contenendo la carica virale delle vie aeree e la patologia polmonare indotta da COVID-19.⁷³

6.2.2 Proprietà farmacocinetiche di Ronapreve™

Il profilo farmacocinetico degli anticorpi che costituiscono Ronapreve™, in seguito ad una singola somministrazione EV, ha un andamento lineare ed è proporzionale alla dose somministrata. Le concentrazioni sieriche massime (C_{max}) di casirivimab e imdevimab registrate dopo una singola dose EV sono rispettivamente di 182,7 e 181,7 mg/L; mentre, successivamente la somministrazione di una dose sottocutanea i valori medi di C_{max} relativi

a casirivimab e imdevimab sono rispettivamente di 52,2 e 49,2 mg/L.⁷³ Il tempo stimato per il raggiungimento della concentrazione sierica massima (T_{max}), dopo la somministrazione di una singola dose SC, è di 6,7 giorni per casirivimab e di 6,6 giorni per imdevimab. La biodisponibilità stimata, in seguito alla somministrazione di una singola dose di Ronapreve™ SC, è di 71,8% per casirivimab e 71,7% per imdevimab.⁷⁴

Il volume di distribuzione stimato per la combinazione di anticorpi è pari a 7,16 L per casirivimab e 7,43 L per imdevimab.⁷³

Trattandosi di anticorpi monoclonali, si presume che perseguano le vie cataboliche tipiche delle immunoglobuline endogene, per cui si prevede che subiscano degradazione proteolitica in piccoli peptidi e amminoacidi.⁷⁴

Il valore di emivita medio di casirivimab ed imdevimab somministrati mediante singola dose EV è rispettivamente di 31,2 e 27,3 giorni; mentre, dopo la somministrazione di una dose per via SC dei due anticorpi monoclonali l'emivita media osservata è di 31,3 giorni per casirivimab e 26,8 giorni per imdevimab.

Non si attendono interazioni di natura farmacologica, in quanto non interagiscono con la CYP450.⁷³

6.2.3 Sperimentazione clinica di Ronapreve™

Trattamento della patologia COVID-19 in pazienti non ospedalizzati

In uno studio clinico di fase 3 randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo, sono stati inclusi pazienti adulti (> 18 anni) presentanti uno o più fattori di rischio per sviluppare COVID-19 in forma severa, risultati positivi all'infezione da SARS-CoV-2. Questi sono stati randomizzati a ricevere una singola dose di Ronapreve™ in diverse concentrazioni: 1.200 mg, 2.400 mg, 8.000 mg o placebo.

È risultato che la percentuale di pazienti che ha avuto almeno un ricovero correlato a COVID-19 o è deceduta per qualsiasi causa fino al giorno 29 (end-point primario) era rispettivamente pari all'1% per i soggetti che avevano precedentemente ricevuto casirivimab-imdevimab e del 3% per gli individui trattati con placebo; quindi, è stata osservata una riduzione del rischio relativo del 70%. Inoltre, non è emersa una differenza significativa dei risultati in relazione al dosaggio di Ronapreve™, ovvero il numero di pazienti deceduti che avevano ricevuto casirivimab-imdevimab in dosaggio pari a rispettivamente 1.200 mg o 2.400 mg non differiva in modo clinicamente significativo.

Oltre alla diminuzione del tasso di mortalità, Ronapreve™ si è mostrato efficace nella riduzione del tempo mediano di risoluzione dei sintomi (10 giorni trattato vs 14 giorni

placebo) e nel decremento della carica virale media dal basale al giorno 7 rispetto al placebo.⁷³

Trattamento della patologia COVID-19 in pazienti ospedalizzati

Uno studio multicentrico, randomizzato di fase 3 ha evidenziato che la somministrazione di casirivimab-imdevimab in pazienti ospedalizzati per COVID-19 in aggiunta alle cure tradizionali (es. corticosteroidi e remdesivir) ha ridotto la mortalità del 20%, rispetto alle sole cure abituali. In aggiunta la combinazione dei due anticorpi monoclonali ha ridotto il rischio relativo di progredire verso la ventilazione meccanica invasiva o la morte del 17%, ha ridotto la durata mediana della degenza ospedaliera (13 giorni gruppo trattato vs 17 giorni gruppo controllo) e ha aumentato in modo significativo il numero di pazienti dimessi vivi entro il giorno 28 (64% trattato vs 58% controllo).⁷³

Studi di efficacia nella prevenzione del COVID-19

È stato condotto uno studio di fase 3, randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo per valutare l'efficacia di Ronapreve™ (per via SC) nella profilassi dell'infezione da SARS-CoV-2 in contatti familiari non infetti di individui infetti e nella prevenzione del COVID-19 sintomatico nei contatti familiari infettati asintomatici. Per questo studio sono stati arruolati soggetti di età superiore a 12 anni, che convivono con un paziente infetto da SARS-CoV-2. Gli individui arruolati sono stati randomizzati a ricevere, mediante iniezione sottocutanea, una singola dose di casirivimab-imdevimab 1.200 mg o placebo entro 96 ore dalla positività del paziente infetto. I soggetti inclusi nello studio sono stati suddivisi in due coorti: coorte A soggetti risultati negativi al test antigenico e coorte B individui risultati positivi al test antigenico.

La percentuale di soggetti inclusi nel gruppo A che ha sviluppato infezione virale sintomatica era rispettivamente dell'1,5% per gli individui trattati con casirivimab-imdevimab e del 7,8% per gli individui che hanno ricevuto placebo; quindi, il trattamento con Ronapreve™ ha ridotto il rischio relativo di sviluppo dell'infezione da SARS-CoV-2 sintomatica dell'81,4%. Inoltre, la combinazione di mAb si è mostrata efficace nel ridurre la durata media dell'infezione (1,2 settimane gruppo trattato vs 3,2 settimane gruppo controllo).

La coorte B comprendeva soggetti asintomatici risultati positivi al test antigenico per la rilevazione dell'infezione da SARS-CoV-2. Il trattamento con casirivimab-imdevimab si è mostrato efficace nel prevenire la progressione dell'infezione asintomatica da SARS-CoV-2 a patologia da COVID-19 sintomatica (31,5%) rispetto al placebo. Inoltre, la terapia a base

di anticorpi monoclonali ha diminuito la durata media dei sintomi nei pazienti sintomatici (21,7 giorni trattato vs 27,3 giorni placebo). Ronapreve™ sembrava anche diminuire più rapidamente la carica virale rispetto al placebo. È importante sottolineare che nessun individuo ricevente casirivimab-imdevimab è stato ospedalizzato per cause correlate a COVID-19, rispetto a 6 pazienti riceventi placebo.⁷³

Sicurezza e tollerabilità di Ronapreve™

In generale Ronapreve™ è stato ben tollerato dai pazienti; tuttavia, sono state riportate reazioni di ipersensibilità che includono reazioni correlate all'infusione, i cui principali sintomi sono nausea, brividi, capogiro o sincope, eruzione cutanea, orticaria e rossore.⁷⁴

In seguito alla somministrazione sottocutanea di casirivimab-imdevimab sono state segnalate linfadenopatia, capogiro, prurito, edema, orticaria e reazione in sede di iniezione. In generale, le reazioni di lieve/moderata entità si sono manifestate entro 24 ore dall'infusione e sono state risolte con cure abituali o senza alcun particolare intervento.⁷³

Ronapreve™ allo stato attuale

Casirivimab-imdevimab ha ricevuto la sua prima approvazione per il trattamento del COVID-19 lieve o moderato il 19 luglio 2021 in Giappone. Successivamente ha ricevuto, il 20 agosto 2021, approvazione condizionata nel Regno Unito per la profilassi e il trattamento dell'infezione da COVID-19.⁷³

L'autorizzazione mediante procedura centralizzata di Ronapreve™ è stata recepita dall'Italia sottoforma di Determina (n.155 del 25 novembre 2021) e prevede l'utilizzo di casirivimab-imdevimab per "il trattamento di COVID-19 negli adulti e negli adolescenti di età pari o superiore a dodici anni e con peso corporeo di almeno 40 kg, che non necessitano di ossigenoterapia supplementare e che sono a maggiore rischio di progressione verso forme severe di COVID-19; la profilassi della malattia COVID-19 in pazienti adulti e in adolescenti di età pari o superiore a dodici anni e con peso corporeo di almeno 40 kg".⁷⁵

Con la Determina n.1414 del 25 novembre 2021, Ronapreve™ è stato inserito nell'elenco dei medicinali erogabili a carico del Servizio Sanitario Nazionale.⁷²

6.3 Regkirona™ nel trattamento della patologia da COVID-19

Regdanvimab (Regkirona™) è un anticorpo monoclonale umano, sviluppato da Celltrion Inc., utilizzato nel trattamento della sindrome respiratoria acuta grave da COVID-19. La prima autorizzazione completa è avvenuta il 17 settembre 2021 in Corea del Sud, con indicazione per il trattamento di COVID-19 in pazienti di età superiore a 50 anni con almeno una condizione clinica di base, tra cui obesità, malattie cardiovascolari, malattie polmonari croniche, diabete, malattie renali ed epatiche croniche, presentanti sintomi lievi e per il trattamento di pazienti adulti con sintomi moderati da COVID-19.

A ottobre 2021 l'EMA ha ricevuto domanda di autorizzazione all'immissione in commercio di Regkirona™ per il trattamento di pazienti adulti con COVID-19 che non richiedono ossigenoterapia supplementare e che presentano un elevato rischio di progressione della patologia, e, il medicinale sperimentale, è stato successivamente approvato per l'indicazione citata.⁷⁶ Il nostro paese ha recepito l'autorizzazione europea sottoforma di Determina (Determina n. 156 del 25 novembre 2021). A differenza di Ronapreve™, Regkirona™ è classificato come medicinale di classe C, quindi la spesa farmaceutica è totalmente a carico del cittadino.⁷²

La dose raccomandata dalle autorità sanitarie è di 40 mg/kg corporeo, somministrata mediante singola infusione endovenosa in circa 60 minuti.⁷⁷

6.3.1 Proprietà farmacodinamiche di Regkirona™

Regdanvimab neutralizza il coronavirus SARS-CoV-2 legandosi al dominio recettore umano della proteina spike virale. Grazie al meccanismo messo in atto da Regkirona™, le particelle virali non sono in grado di interagire con l'enzima ACE2, non penetrano all'interno delle cellule umane e, in ultima analisi, viene inibita la replicazione virale.⁷⁷

Regdanvimab si è mostrato efficace nel ridurre la carica virale nelle vie respiratorie superiori e inferiori in diversi modelli animali infettati da SARS-CoV-2. Inoltre, ha mostrato attività antivirale anche contro le diverse varianti di virus, riducendo il tasso di mortalità e la carica virale nelle vie respiratorie superiori e inferiori.⁷⁶

6.3.2 Proprietà farmacocinetiche di Regkirona™

Il profilo farmacocinetico di regdanvimab è lineare, ed è proporzionale alla dose somministrata.

In seguito alla somministrazione di una singola dose in pazienti con infezione da SARS-CoV-2, la concentrazione sierica massima (C_{max}) media registrata era pari a 1.017 $\mu\text{g/mL}$.

Non sono stati condotti studi circa il metabolismo di Regkirona™, ma è previsto una degradazione in piccoli peptidi e amminoacidi, mediante processi catabolici abituali degli anticorpi endogeni.⁷⁷ Come per tutti gli anticorpi monoclonali, il potenziale di interazione farmacologia è minimo o addirittura nullo.⁷⁶

Dopo la somministrazione di un'unica dose pari a 40 mg/kg corporeo, il valore medio di clearance è di 0,20 mL/h/kg e il valore medio dell'emivita media è 17 giorni.⁷⁷

6.3.3 Dati di sperimentazione clinica

In uno studio di fase I randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo, regdanvimab è risultato essere più efficace nel ridurre la carica virale e nel diminuire i tempi di recupero clinico rispetto al placebo.

Successivamente, Regkirona™ è stato testato in uno studio di fase II/III randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo nel trattamento di pazienti con infezione da SARS-CoV-2 (da lieve a moderata) che non richiedevano ossigenoterapia supplementare e che manifestavano sintomi quali febbre, tosse, respiro corto, mal di gola, dolore muscolare, nausea, affaticamento, mal di testa, brividi, congestione nasale, perdita di gusto o olfatto o diarrea, entro 7 giorni dalla somministrazione del medicinale sperimentale. In questo studio i pazienti sono stati randomizzati a ricevere regdanvimab o placebo in un'unica somministrazione mediante infusione endovenosa. Nel gruppo di soggetti trattato, Regkirona™ si è mostrato efficace nel ridurre la carica virale e nel migliorare i tempi di recupero clinico (più breve per regdanvimab rispetto a placebo). Inoltre, la percentuale di pazienti trattati con regdanvimab 40 mg/kg che necessitavano di ricovero o ossigenoterapia fino al giorno 28 era del 4,0% rispetto all'8,7% nel gruppo che ha ricevuto placebo; quindi, si è mostrato efficace anche nel ridurre il rischio di ospedalizzazione.

Una sperimentazione clinica di fase III randomizzata, in doppio cieco, controllata con placebo, ha valutato regdanvimab nel trattamento di pazienti adulti con COVID-19 (da lieve a moderata), non ospedalizzati e senza necessità di ossigenoterapia supplementare. Regkirona™ ha ridotto in modo clinicamente significativo il rischio di ospedalizzazione o di morte nei pazienti con infezione da SARS-CoV-2 ad alto rischio di progressione a COVID-19 grave (3,1 % per regdanvimab vs 11,1% per placebo).⁷⁶

Possibili eventi avversi

L'incidenza di eventi avversi è pari a rispettivamente 29,5% per regdanvimab 40 mg/kg e 30,9% per placebo. L'evento avverso più comune è l'ipertrigliceridemia.⁷⁶

“Sono state osservate reazioni correlate a infusione immediate nello 0,6% dei pazienti trattati con regdanvimab e nell'1,2% dei pazienti trattati con placebo. Gli eventi riportati di febbre, prurito, ipertensione e dispnea sono stati lievi, mentre due casi di febbre sono stati di gravità moderata e un caso di ipertensione di grado severo; palpitazioni, presincope e orticaria sono state moderate nei pazienti trattati con regdanvimab. Tutti i pazienti nel gruppo di trattamento con regdanvimab si sono ristabiliti”⁷⁷.

Regkirona™ allo stato attuale

Regkirona™ ha ricevuto la prima approvazione il 17 settembre 2021 in Corea del Sud.⁷⁶

Regdanvimab è stato autorizzato dall'EMA con procedura centralizzata per il trattamento di COVID-19, e, successivamente l'Italia ha recepito l'autorizzazione europea con la Determina n. 156 del 25 novembre 2021.⁷²

6.4 Xevudy® nel trattamento di COVID-19

Xevudy® è costituito da un unico anticorpo monoclonale umano sotrovimab, utilizzato nel trattamento del COVID-19. È stato sviluppato dalla Vir Biotechnology in collaborazione con GlaxoSmithKline ed ha ricevuto la prima autorizzazione nel maggio 2021 negli Stati Uniti all'uso di emergenza per il trattamento di pazienti con COVID-19 ad alto rischio di progressione a COVID-19 grave. Nel dicembre 2021, sotrovimab ha ricevuto la prima approvazione completa dall'EMA per l'uso negli adolescenti, di età superiore a 12 anni e di peso non inferiore a 40 kg, e negli adulti con malattia da coronavirus 2019, i quali non necessitano di ossigenoterapia supplementare e presentano un elevato rischio di progressione di COVID-19 nella forma severa.⁷⁸

La dose di sotrovimab raccomandata è di 500 mg mediante singola infusione endovenosa di 30 minuti, da somministrare entro 5 giorni dall'insorgenza dei sintomi.⁷⁹

6.4.1 Proprietà farmacodinamiche di Xevudy®

Sotrovimab si lega ad un epitopo altamente conservato della proteina spike del virus SARS-CoV-2, bloccando l'interazione con il recettore di ACE2 e impedendo, a valle, l'internalizzazione del virus.

Studi preclinici suggeriscono che Xevudy® riduce la carica virale totale e i livelli di viremia nel polmone e, inoltre, mantiene l'attività antivirale contro le nuove varianti di SARS-CoV-2, le quali presentano maggiore trasmissibilità e invasione immunitaria.⁷⁸

6.4.2 Proprietà farmacocinetiche di Xevudy®

La concentrazione sierica massima (C_{max}) e il tempo mediano per raggiungere la C_{max} , in seguito alla somministrazione di una singola dose di sotrovimab, erano rispettivamente pari a 117,6 µg/mL e 0,042 giorni.

Il volume di distribuzione medio allo stato stazionario era pari a 8,1 L e la clearance media misurata era pari a 125 mL/die.

Dopo un'infusione di 500 mg di sotrovimab l'emivita media registrata era pari a 49 giorni. Xevudy® subisce degradazione proteolitica per mezzo di enzimi proteolitici in piccoli peptidi e amminoacidi.

Dato che sotrovimab non viene metabolizzato dall'enzima CYP450 si ritengono improbabili interazioni farmacologiche.⁷⁸

6.4.3 Sperimentazione terapeutica di Xevudy®

È stato condotto uno studio di fase II/III randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo per valutare l'efficacia sotrovimab nel trattamento di pazienti adulti con COVID-19 non ospedalizzati, non vaccinati, che non richiedevano integrazione di ossigenoterapia al momento di ingresso nello studio e che presentavano almeno uno dei seguenti fattori di rischio: diabete, obesità, malattia renale cronica, insufficienza cardiaca congestizia, malattia polmonare ostruttiva cronica, asma (da moderata a severa) o con età pari o superiore a 55 anni.

I pazienti sono stati randomizzati a ricevere una singola infusione endovenosa di sotrovimab o placebo. La percentuale di pazienti che hanno sviluppato una progressione di COVID-19, definita come ospedalizzazione per un intervallo di tempo superiore a 24 ore o morte per qualsiasi causa, era rispettivamente dell'1%, per il gruppo trattato con sotrovimab e del 6% per il gruppo che ha ricevuto placebo. Inoltre, entro il giorno 29 non sono stati registrati decessi nel gruppo a cui è stato somministrato il farmaco sperimentale, mentre nel gruppo placebo sono stati rivelati 2 decessi.

Quindi, da questo studio emerge che Xevudy® è stato efficace nel ridurre il rischio relativo di progressione della patologia del 79%.

Sotrovimab ha fornito vantaggi significativi rispetto al placebo anche per diversi end-point secondari, tra cui visite al pronto soccorso, ricoveri o decessi, variazione della carica virale, progressione della patologia in forma grave/critica che richiede ossigeno supplementare.⁷⁸

Eventi avversi

Il profilo di sicurezza di sotrovimab in singola dose di 500 mg è stato valutato in uno studio controllato con placebo condotto su 1.049 pazienti non ospedalizzati con COVID-19.

L'incidenza complessiva di eventi avversi nei gruppi sotrovimab e placebo è stata rispettivamente del 22% e 23%; le reazioni avverse più comuni sono state le reazioni di ipersensibilità (2%) e le reazioni correlate all'infusione (1%).⁷⁸ Queste ultime comprendono “febbre, respirazione difficoltosa, ridotta saturazione di ossigeno, brividi, nausea, tachicardia, bradicardia, dolore o fastidio al torace, debolezza, stato mentale alterato, cefalea, broncospasmo, ipotensione, ipertensione, angioedema, irritazione alla gola, eruzione cutanea compresa orticaria, prurito, mialgia, vertigini, stanchezza e diaforesi”⁷⁹.

Xevudy® allo stato attuale

Attualmente sono in corso diversi studi di fase II e III per valutare sicurezza, farmacodinamica e farmacocinetica di molteplici trattamenti, tra cui sotrovimab. Xevudy® ha ricevuto la sua prima approvazione completa il 17 dicembre 2021 dall'EMA; tuttavia, è un medicinale sottoposto a monitoraggio aggiuntivo.⁷⁸

6.5 Bamlanivimab-etesevimab nel trattamento di COVID-19

La combinazione di anticorpi monoclonali bamlanivimab-etesevimab, prodotto dall'azienda farmaceutica Eli Lilly, per il trattamento della malattia COVID-19 non ha ancora ricevuto autorizzazione da parte dell'EMA.⁷² La revisione dei dati relativi al medicinale sperimentale da parte del Comitato per i medicinali per uso umano dell'EMA, intrapresa nel marzo 2021, è stata interrotta dopo che l'azienda Eli Lilly ha comunicato il ritiro dell'associazione di anticorpi monoclonali dall'iter di approvazione.⁸⁰ Nel nostro paese è stata approvata in via temporanea con il Decreto del Ministro della Salute del 6 febbraio 2021 e con Decreto del Ministero della Salute del 12 luglio 2021; le modalità e le condizioni d'uso dell'associazione bamlanivimab-etesevimab sono state definite con la Determina n. 318 del 17 marzo 2021.⁷² L'associazione bamlanivimab-etesevimab è indicata per il trattamento del COVID-19 lieve o moderato in pazienti adulti o adolescenti (di età pari o superiore a 12 anni) che non necessitano di ossigenoterapia supplementare e che presentano un elevato rischio di progressione a COVID-19 severo. I fattori di rischio che espongono il paziente ad una potenziale progressione della patologia sono i seguenti: obesità, diabete, età superiore a 65 anni, età superiore o uguale a 55 anni e malattia cardio-cerebrovascolare o malattia respiratoria cronica, età compresa tra i 12 e 17 anni e obesità o anemia falciforme o malattie cardiache o malattia del neurosviluppo o patologie respiratorie croniche.

La dose raccomandata è di 700 mg di bamlanivimab e 1.400 mg di etesevimab somministrata mediante singola infusione il più precocemente possibile dall'esito positivo al test per la rilevazione di SARS-CoV-2 e comunque entro 10 giorni dall'insorgenza dei sintomi.⁸¹

6.5.1 Proprietà farmacodinamiche dell'associazione bamlanivimab-etesevimab

Bamlanivimab ed etesevimab legano due epitopi differenti nel dominio legante il recettore della proteina spike del virus SARS-CoV-2. Quindi, viene bloccata la formazione del legame tra la proteina spike virale e il recettore umano ACE2, di conseguenza si impedisce l'internalizzazione del virus all'interno delle cellule ospite.

È inoltre previsto che l'associazione dei due anticorpi monoclonali riduca il rischio di resistenza virale.⁸¹

6.5.2 Dati clinici sulla combinazione bamlanivimab-etesevimab

Lo studio clinico BLAZE-1 di fase II/III randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo ha coinvolto pazienti non ospedalizzati che presentavano uno o più sintomi lievi di

COVID-19. Nella fase II dello studio i soggetti sono stati randomizzati in 3 gruppi a ricevere una singola infusione endovenosa costituita da 2.800 mg di bamlanivimab e 2.800 mg di bamlanivimab, bamlanivimab in monoterapia a dosaggio crescente (700 mg, 2.800 mg o 7.000 mg), o placebo. L'end-point primario stabilito dallo studio era la carica virale al giorno 29. L'associazione bamlanivimab-etesevimab si è mostrata efficace nel ridurre la carica virale, inoltre, ha ridotto l'ospedalizzazione e l'accesso al pronto soccorso per cause correlate a COVID-19 rispetto ai soggetti trattati con placebo (0,9% vs. 5,8%).

Bamlanivimab-etesevimab hanno ridotto il tempo mediano di miglioramento dei sintomi, tra cui tosse, respiro affannoso, stanchezza, sensazione di febbre, indolenzimento e dolori muscolari, mal di gola, brividi e cefalea rispetto al placebo (6 giorni rispetto ad 8 giorni).

Nella porzione di Fase III dello studio BLAZE-1 i soggetti sono stati suddivisi in due gruppi e hanno ricevuto una singola infusione di rispettivamente bamlanivimab 2.800 mg e etesevimab 2.800 mg o placebo. Anche questa fase di studio ha suggerito che l'associazione dei due anticorpi monoclonali riduce la carica virale, riduce la percentuale di soggetti con ospedalizzazione correlata a COVID-19 o morte, con una riduzione del rischio relativo pari al 70%. È importante notare che nel gruppo di soggetti che ha ricevuto il trattamento sperimentale non sono stati registrati decessi, mentre nel gruppo di soggetti trattati con placebo si sono verificati 10 decessi.⁸¹

Profilo di sicurezza di bamlanivimab-etesevimab

I dati provenienti dalla fase II dello studio BLAZE-1 rivelano che gli eventi avversi si sono verificati nel 18% dei soggetti trattati con l'associazione di anticorpi monoclonali e nel 28% dei soggetti che hanno ricevuto placebo. Gli eventi avversi più frequentemente segnalati sono nausea, prurito e febbre.

Nella porzione di fase III del suddetto studio l'1% dei soggetti trattati con la combinazione bamlanivimab-etesevimab ha riportato eventi di ipersensibilità che comprendevano reazioni correlate all'infusione, eruzione cutanea e prurito.⁸¹

6.6 L'impiego di Evusheld® nella profilassi di COVID-19

Evusheld®, costituito dall'associazione di due anticorpi monoclonali tixagevimab e cilgavimab, ha ricevuto dall'EMA l'autorizzazione all'immissione in commercio in tutta l'Europa il 25 marzo 2022, con indicazione per la profilassi pre-esposizione dell'infezione da SARS-CoV-2.⁷² “Il Comitato per i medicinali per uso umano (CHMP) dell'EMA ha raccomandato il rilascio dell'autorizzazione all'immissione in commercio per Evushel®, medicinale sviluppato da AstraZeneca AB, per prevenire COVID-19 negli adulti e negli adolescenti a partire dai 12 anni di età e con un peso minimo di 40 kg, prima di una potenziale esposizione al virus SARS-CoV-2”⁸².

In Italia, è stato autorizzato in via temporanea con il Decreto del Ministro della Salute del 20 gennaio 2022 e successivamente ne sono state definite modalità e condizioni di utilizzo con la Determina AIFA n. 87 del 15 febbraio 2022.⁷²

La dose raccomandata negli adulti e adolescenti è di 150 mg di tixagevimab e 150 mg di cilgavimab, somministrati mediante due iniezioni intramuscolari sequenziali separate.⁸³

6.6.1 Proprietà farmacodinamiche di Evusheld®

I due anticorpi monoclonali che costituiscono Evusheld® presentano delle sostituzioni amminoacidiche nelle regioni costanti che consentono di prolungarne l'emivita e ridurre il rischio di potenziamento della malattia anticorpo-dipendente, ovvero quel fenomeno secondo cui il legame tra virus e anticorpo favorisce l'ingresso del virus nelle cellule ospiti e talvolta anche la sua replicazione. Tixagevimab e cilgavimab impediscono la formazione del legame tra virus SARS-Cov-2 e recettore ACE2 umano, interagendo simultaneamente con regioni non sovrapposte del dominio di legame del recettore della proteina spike virale. In questo modo viene impedito l'ingresso delle particelle virali nelle cellule bersaglio.⁸³

6.6.2 Proprietà farmacocinetiche di Evusheld®

Il profilo farmacocinetico di Evusheld®, in seguito ad una singola somministrazione IM, è lineare e dose-dipendente. La concentrazione massima (C_{max}) media è stata raggiunta dopo un tempo mediano (T_{max}) pari a 14 giorni, ed è rispettivamente di 16,5 µg/mL per tixagevimab e 15,3 µg/mL per cilgavimab.

Dopo una singola dose di 150 mg somministrata per via IM, la biodisponibilità stimata è di 68,5% per tixagevimab e 65,8% per cilgavimab; mentre il volume di distribuzione rilevato era di 2,64 L per tixagevimab e 2,57 L per cilgavimab.

Come tutti gli altri anticorpi monoclonali, anche tixagevimab e cilgavimab subiscono degradazione proteica in piccoli peptidi e amminoacidi mediante le vie cataboliche abituali degli anticorpi endogeni.

La clearance dei due anticorpi monoclonali è pari a 0,04 L/die per entrambi gli anticorpi che costituiscono Evusheld®. L'emivita misurata è rispettivamente di 89 giorni per tixagevimab e 84 giorni per cilgavimab.

Non sono previste interazioni di natura farmacocinetica in quanto gli anticorpi monoclonali non vengono metabolizzati dagli enzimi citocromo P450, per cui le interazioni con altri medicinali substrato di tali enzimi sono piuttosto improbabili.⁸³

6.6.3 Prove di efficacia clinica di Evusheld®

È stato condotto uno studio clinico di fase III, denominato PROVENT (randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo) per valutare la validità di Evusheld® nella profilassi pre-esposizione di COVID-19 in soggetti adulti considerati ad elevato rischio di risposta inadeguata all'immunizzazione attiva per diversi motivi (età superiore a 60 anni, presenza di comorbidità o patologie croniche, immunocompromessi e non idoneità alla vaccinazione) o con elevato rischio di sviluppare l'infezione sostenuta da SARS-CoV-2 (per esempio operatori sanitari, persone che vivono in ambienti densamente popolati, militari nelle caserme). I soggetti arruolati nello studio sono stati randomizzati a ricevere rispettivamente una combinazione di 150 mg di tixagevimab e 150 mg di cilgavimab oppure placebo, mediante due iniezioni intramuscolari separate.

Il 78% dei 5.197 individui coinvolti nello studio presentava prerogative che esponevano ad un aumentato rischio di contrarre l'infezione da SARS-CoV-2 in forma severa, come per esempio diabete, obesità, cancro, malattia polmonare ostruttiva cronica, malattia renale cronica, malattia epatica cronica, malattia immunosoppressiva e assunzione di farmaci immunosoppressori.

Un'analisi primaria comprendeva 5.172 soggetti, risultati negativi al test RT-PCR per la rilevazione di SARS-CoV-2, suddivisi in due gruppi: il primo gruppo costituito da 3.441 partecipanti ha ricevuto Evusheld®, mentre al secondo gruppo, formato da 1.731 individui, è stato somministrato placebo. Dei 3.441 partecipanti appartenenti al gruppo sperimentale solo lo 0,2% ha manifestato malattia sintomatica positiva al tampone molecolare rispetto

all'1% rilevato con placebo. Quindi, è possibile dedurre che Evusheld® ha ridotto del 77% il rischio relativo di sviluppare malattia sintomatica COVID-19.

Inoltre, tra i partecipanti che hanno ricevuto Evusheld® e che hanno sviluppato la patologia COVID-19 non c'è stata una progressione alla forma severa, rispetto ad un evento (0,1%) di COVID-19 severo registrato tra i soggetti che hanno ricevuto placebo.

Nello studio PROVENT è stato dimostrato che Evusheld® offre una protezione dal virus pari ad almeno 6 mesi, nei soggetti che non hanno mai contratto l'infezione da SARS-CoV-2 e che non avevano ricevuto alcuna vaccinazione.⁸³

Eventi avversi

Le reazioni avverse più comunemente registrate sono state reazioni in sede di iniezione, con dolore, prurito, reazione e indurimento al sito di inoculazione e reazioni di ipersensibilità, che includevano eruzione cutanea e orticaria.

Sono stati riportati anche eventi correlati all'iniezione tra cui cefalea, brividi, arrossamento, fastidio e dolore in prossimità del sito di iniezione.⁸³

A fronte di questo studio il CHMP ha concluso che i benefici apportati dal medicinale sperimentale superano i rischi, per cui raccomanda gli Stati membri dell'UE di rilasciare l'autorizzazione all'immissione in commercio per Evusheld®.⁸²

6.7 Conclusioni circa l'utilizzo degli anticorpi monoclonali nel trattamento e prevenzione della patologia da COVID-19

La pandemia scoppiata a cavallo tra la fine del 2019 e l'inizio del 2020 ha stravolto i sistemi sanitari ed economici dell'intero pianeta. Ad oggi, data la scarsa disponibilità di evidenze scientifiche, non esistono farmaci con indicazione terapeutica specifica per il trattamento del COVID-19; tuttavia è previsto l'utilizzo di una serie di farmaci, già precedentemente commercializzati, in condizioni di emergenza, tra cui corticosteroidi, remdesivir, idrossiclorochina, lopinavir/ritonavir, darunavir/cobicistat e azitromicina.⁸⁴

In questo panorama si sono inseriti gli anticorpi monoclonali, che mirano a diversi epitopi localizzati sulla proteina spike del virus SARS-CoV-2, al fine di modulare la replicazione virale. Per merito del loro meccanismo d'azione, la somministrazione precoce di anticorpi monoclonali nel trattamento della malattia da COVID-19 previene o riduce la progressione della malattia a forma severa in persone ad alto rischio di contrarre l'infezione. Questo è di essenziale importanza soprattutto in pazienti che presentano un elevato rischio di sviluppare malattie gravi in relazione alla loro età anagrafica o alla condizione clinica preesistente.

Nel corso dell'anno 2021 l'Agenzia Europea dei Medicinali ha approvato 3 anticorpi monoclonali per il trattamento della patologia da COVID-19 (Ronapreve™, Regkirona™ e Xevudy®), e, più recentemente nel 2022, ha raccomandato il rilascio dell'autorizzazione all'immissione in commercio di Evusheld® per la profilassi pre-esposizione al virus. L'Italia ha recepito le autorizzazioni di Ronapreve™, Regkirona™ e Xevudy® mediante l'emanazione di 3 diverse Determine. Oltre gli anticorpi precedentemente citati, in Italia è stata autorizzata, in via temporanea, l'associazione degli anticorpi monoclonali bamlanivimab-etesevimab per il trattamento dell'infezione sostenuta da SARS-CoV-2, ma tale combinazione non ha ancora ricevuto approvazione da parte della Commissione europea. Per quanta riguarda Evusheld®, nonostante l'EMA abbia esortato il rilascio dell'autorizzazione all'immissione in commercio, in Italia è stato approvato per la profilassi pre-esposizione dell'infezione da SARS-CoV-2 in via temporanea.

Tutti questi anticorpi monoclonali sono soggetti a monitoraggio addizionale, ovvero sono sottoposte una stretta e specifica osservazione da parte delle agenzie regolatorie; questo perché, trattandosi di medicinali autorizzati di recente, le informazioni scientifiche circa sicurezza, efficacia e tollerabilità del medicinale sono piuttosto limitate, quindi è fondamentale mantenere sotto controllo i dati provenienti dalla reale pratica clinica al fine di valutare il reale beneficio di tali medicinali.⁷²

Come si evince dalle sperimentazioni precedentemente trattate, gli anticorpi monoclonali per il trattamento e/o la prevenzione dell'infezione da COVID-19 hanno acquisito notevole importanza per ridurre il rischio di progressione della patologia infettiva, mantenendo un profilo di sicurezza e tollerabilità accettabile.

7. Conclusioni finali

Gli anticorpi monoclonali sono utilizzati nella terapia in campo oncologico e reumatologico da oltre 30 anni; l'impiego di queste molecole nel trattamento delle patologie infettive come strumento alternativo o complementare alle terapie convenzionali, ha visto la luce solamente 10 anni fa, con l'approvazione e l'immissione in commercio di raxibacumab nella terapia dell'infezione da *B. anthracis*. La necessità di introdurre nuove terapie efficaci nel contrastare le patologie infettive nasce dalla combinazione di diversi eventi, tra cui la diffusione dell'antibiotico-resistenza, l'aumento di soggetti immunocompromessi in cui la terapia antimicrobica risulta inefficace, l'emergere di nuovi microrganismi patogeni per i quali non esiste una terapia specifica e la ricomparsa di agenti patogeni noti, i quali, spesso, hanno sviluppato farmacoresistenza.

Grazie al progresso tecnologico avvenuto nel campo del DNA ricombinante, oggi è possibile progettare e sviluppare degli anticorpi monoclonali con caratteristiche umane diretti contro uno specifico bersaglio, quindi dotati di un'elevata selettività nei confronti dell'agente eziologico che determina l'insorgenza della patologia infettiva.

Al 2020 erano stati approvati 6 anticorpi monoclonali per la gestione degli stati morbosi infettivi, tra cui ibalizumab (Trogarzo®) utilizzato in caso di infezione da HIV-1 multiresistente, l'associazione atoltivimab, maftivimab ed odesivimab (Inmazeb™) ed ansuvimab (Ebanga™) autorizzati per il trattamento dell'infezione da ebolavirus, raxibacumab (ABthrax®) e obiltoxaximab (Anthim®) indicati per il trattamento e la profilassi dell'antrace inalatorio sostenuto da *B. anthracis* in combinazione con agenti microbici adeguati e, infine, bezlotoxumab (Zinplava®) impiegato per ridurre le recidive dell'infezione da *C. difficile*.

Nel corso degli ultimi due anni, in cui è esplosa un'epidemia globale dovuta all'infezione da SARS-CoV-2, in Europa sono stati approvati in via temporanea per l'uso in condizioni di emergenza nel trattamento e/o profilassi della patologia COVID-19 diversi anticorpi monoclonali, tra cui Ronapreve™, Regkirona™, Xevudy® ed Evusheld®, che si sono rivelati fondamentali nell'arginare la situazione di emergenza sanitaria in mancanza di vaccini profilattici. Ad oggi questi anticorpi hanno ricevuto approvazione completa da parte della Commissione europea; tuttavia, tali medicinali sono sottoposti a monitoraggio aggiuntivo al fine di valutare benefici e rischi nelle reali condizioni di pratica clinica quotidiana.

Dall'analisi dell'elaborato è possibile dedurre che, in generale, gli anticorpi monoclonali esaminati sono efficaci nel trattamento e/o prevenzione delle patologie infettive e/o delle recidive, inoltre, in virtù della loro bassa tossicità sono sicuri e ben tollerati.

Quindi gli anticorpi monoclonali rappresentano sicuramente una preziosa risorsa per il trattamento di questo tipo di patologie, anche in combinazione con le terapie standard, soprattutto per i soggetti che presentano diversi fattori di rischio che possono compromettere la progressione delle diverse malattie.

Attualmente il principale ostacolo alla diffusione dell'utilizzo degli anticorpi monoclonali nella pratica clinica è di natura economica, dato dall'elevato costo di produzione di tali medicinali a fronte di un potenziale mercato relativamente piccolo. In aggiunta, i mAb sono macromolecole fragili, deperibili e richiedono refrigerazione; queste caratteristiche contribuiscono ad aumentare il già oneroso costo di produzione. Un altro aspetto che complica il successo degli anticorpi monoclonali in terapia è la somministrazione sistemica, poiché la maggior parte di questi preparati vengono somministrati in strutture cliniche all'avanguardia e richiedono un monitoraggio da parte degli operatori sanitari; inoltre, generalmente, vengono impiegati solo in seguito ad una specifica diagnosi, che può richiedere anche un tempo piuttosto prolungato.

La vastissima disponibilità di medicinali indicati per il trattamento di patologie infettive combinata con la complessità dell'introduzione degli anticorpi monoclonali nella pratica clinica ha limitato i potenziali progressi terapeutici conseguibili con l'utilizzo di preparazioni immunoglobuliniche.

In conclusione, è improbabile che gli anticorpi monoclonali competano con successo con gli antimicrobici tradizionali; tuttavia, rappresentano un'alternativa interessante da soli o in associazione all'abituale terapia antimicrobica, soprattutto per persone con una compromissione a livello del sistema immunitario. La prospettiva a lungo termine è quello di costruire modelli economici adeguati allo sviluppo delle terapie a base di anticorpi monoclonali diretti contro i crescenti target microbici.

8. Bibliografia e sitografia

- 1) <https://www.issalute.it/index.php/la-salute-dalla-a-alla-z-menu/a/anticorpi-monoclonali-mab>
- 2) <https://www.infomedics.it/servizi/biotecnologie/come-agisce.html>
- 3) Lipman NS, Jackson LR, Trudel LJ, Weis-Garcia F. Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications and information resources, ILAR Journal; vol. 46; 2005; pag. 258-268.
- 4) Modjtahedi H, Ali S, Essapen S. Therapeutic application of monoclonal antibodies in cancer: advances and challenges. British Medical Bulletin; vol. 104; December 2012; pag. 41-59.
- 5) <https://www.infomedics.it/servizi/biotecnologie/la-storia.html>
- 6) Abul K. Abbas AHL, Jordan S. Pober, Immunologia cellulare e molecolare (2002)
- 7) <https://www.infomedics.it/servizi/biotecnologie/nascita-e-sviluppo.html>
- 8) <https://www.aifa.gov.it/sperimentazione-clinica-dei-farmaci>
- 9) <https://www.aifa.gov.it/procedura-di-autorizzazione-centralizzata>
- 10) https://www.utifar.it/uploads/model_5/gli_anticorpi_monoclonali_in_terapia.pdf
- 11) Jinesh S. Pharmaceutical aspects of anti-inflammatory TNF-blocking drugs. Inflammopharmacol; 23; 71–77 (2015).
- 12) Tsao LC, Force J, Hartman ZC. Mechanisms of Therapeutic Antitumor Monoclonal Antibodies. Cancer Res. 2021; vol. 81(18):4641-4651.
- 13) Karson KL, Nature Biotechnology, 2005
- 14) Mellstedt H. Clinical considerations for biosimilar antibodies. EJC Suppl. 2013 Dec;11(3):1-11
- 15) Foltz IN, Karow M, Wasserman SM. Evolution and emergence of therapeutic monoclonal antibodies: what cardiologists need to know. Circulation. 2013 Jun 4;127(22):2222-30.
- 16) <https://www.antibodysociety.org/resources/approved-antibodies/>
- 17) <https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>
- 18) <https://www.salute.gov.it/portale/hiv/dettaglioContenutiHIV.jsp?lingua=italiano&id=5206&area=aids&menu=conoscere>
- 19) Lemke TL, Williams DA, Roche VF, William Zito S. Foye's – Principi di Chimica Farmaceutica, sesta edizione italiana, Piccin (2014).
- 20) <https://biosci.mcdb.ucsb.edu/immunology/Immunodeficiencies/HIV-structure.htm>

- 21) Fanales-Belasio E, Raimondo M, Suligo B, Buttò S. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Ann Ist Super Sanità*. 2010; vol. 46(1):5-14.
- 22) <https://www.niaid.nih.gov/diseases-conditions/hiv-replication-cycle>
- 23) <https://www.salute.gov.it/portale/hiv/dettaglioContenutiHIV.jsp?lingua=italiano&id=5210&area=aids&menu=conoscere>
- 24) <https://www.epicentro.iss.it/aids/trasmissione>
- 25) Gulick RM, Flexner C. Long-Acting HIV Drugs for Treatment and Prevention. *Annual Review Med*. 2019 Jan 27; vol. 70:137-150.
- 26) https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/trogarzo-epar-product-information_it.pdf
- 27) Blair HA. Ibalizumab: A Review in Multidrug-Resistant HIV-1 Infection. *Drugs* 80, 189–196 (2020).
- 28) Chahine EB, Durham SH. Ibalizumab: The First Monoclonal Antibody for the Treatment of HIV-1 Infection. *Ann Pharmacother*. 2021 Feb;55(2):230-239.
- 29) <https://www.epicentro.iss.it/ebola/epidemiologia-mondo>
- 30) Baseler L, Chertow DS, Johnson KM, Feldmann H, Morens DM. The Pathogenesis of Ebola Virus Disease. *Annual Review of Pathology*. 2017 Jan 24; vol. 12:387-418.
<https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-pathol-052016-100506>
- 31) Jacob ST, Crozier I, Fischer WA 2nd, Hewlett A, Kraft CS, Vega MA, Soka MJ, Wahl V, Griffiths A, Bollinger L, Kuhn JH. Ebola virus disease. *Nat Rev Dis Primers* 6; 13 (2020).
doi: 10.1038/s41572-020-0147-3. PMID: 32080199; PMCID: PMC7223853.
<https://www.nature.com/articles/s41572-020-0147-3#citeas>
- 32) <https://www.microbiologiaitalia.it/virologia/virus-ebola-ebov/>
- 33) Zawilińska B, Kosz-Vnenchak M. General introduction into the Ebola virus biology and disease. *Folia Med Cracov*. 2014; 54 (3):57-65.
http://www.fmc.cm-uj.krakow.pl/pdf/54_3_57.pdf
- 34) https://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pagineAree_3943_listaFile_itemName_0_file.pdf
- 35) Malvy D, McElroy AK, de Clerck H, Günther S, van Griensven J. Ebola virus disease. *Lancet*. 2019 Mar 2;393(10174):936-948. Epub 2019 Feb 15. Erratum in: *Lancet*. 2019 May 18;393(10185):2038.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673618331325?via%3Dihub#cesec60>
- 36) https://www.who.int/health-topics/ebola/#tab=tab_3

- 37) Markham A. REGN-EB3: First Approval. *Drugs*. 2021 Jan;81(1):175-178.
- 38) Atoltivimab, Maftivimab, and Odesivimab-ebgn. *Am J Health Syst Pharm*. 2021 Feb 8;78(4):279-281.
- 39) https://www.regeneron.com/downloads/inmaze_b_fpi.pdf
- 40) <https://go.drugbank.com/drugs/DB15899>
- 41) Lee A. Ansuvimab: First Approval. *Drugs*. 2021 Apr; 81(5):595-598.
- 42) <https://go.drugbank.com/drugs/DB16385>
- 43) Tshiani Mbaya O, Mukumbayi P, Mulangu S. Review: Insights on Current FDA-Approved Monoclonal Antibodies Against Ebola Virus Infection. *Front Immunol*. 2021 Aug 30; 12: 721328.
- 44) <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2020/travel-related-infectious-diseases/anthrax#:~:text=Anthrax%20is%20most%20common%20in,these%20areas%20is%20now%20rare>
- 45) Shafazand S, Doyle R, Ruoss S, Weinacker A, Raffin TA. Inhalational anthrax: epidemiology, diagnosis, and management. *Chest*. 1999 Nov;116(5):1369-76.
- 46) <https://www.epicentro.iss.it/antrace/epidemiologia>
- 47) Pilo P, Frey J. Pathogenicity, population genetics and dissemination of *Bacillus anthracis*. *Infect Genet Evol*. 2018 Oct; 64:115-125.
- 48) Sweeney DA, Hicks CW, Cui X, Li Y, Eichacker PQ. Anthrax infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Dec 15;184 (12):1333-41.
- 49) <https://www.msmanuals.com/it-it/professionale/malattie-infettive/bacilli-gram-positivi/antrace#:~:text=Le%20principali%20forme%20cliniche%20di,trasmessi%20da%20persona%20a%20persona>.
- 50) Mazumdar S. Raxibacumab. *MAbs*. 2009 Nov-Dec;1(6):531-8.
- 51) https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2012/125349s000lbl.pdf
- 52) <https://go.drugbank.com/drugs/DB08902>
- 53) Kummerfeldt CE. Raxibacumab: potential role in the treatment of inhalational anthrax. *Infect Drug Resist*. 2014 Apr 29; 7:101-9.
- 54) Greig SL. Obiltoxaximab: First Global Approval. *Drugs*. 2016 May;76(7):823-30.
- 55) https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/obiltoxaximab-sfl-epar-product-information_it.pdf
- 56) Hou AW, Morrill AM. Obiltoxaximab: Adding to the Treatment Arsenal for *Bacillus anthracis* Infection. *Ann Pharmacother*. 2017 Oct;51(10):908-913.
- 57) Elliott B, Androga GO, Knight DR, Riley TV. *Clostridium difficile* infection: Evolution, phylogeny and molecular epidemiology. *Infect Genet Evol*. 2017 Apr; 49:1-11.

- 58) Chandrasekaran R, Lacy DB. The role of toxins in Clostridium difficile infection. *FEMS Microbiol Rev.* 2017 Nov 1;41(6):723-750.
- 59) Depestel DD, Aronoff DM. Epidemiology of Clostridium difficile infection. *J Pharm Pract.* 2013;26(5):464-475.
- 60) <https://www.msmanuals.com/it-it/casa/infezioni/infezioni-batteriche-batteri-anaerobi/colite-indotta-da-clostridioides-gi%C3%A0-clostridium-difficile>
- 61) <https://www.informazionisuifarmaci.it/fitaxomicina>
- 62) Johnson S, Gerding DN. Bezlotoxumab. *Clin Infect Dis.* 2019 Feb 1;68(4):699-704.
- 63) https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/zinplava-epar-product-information_it.pdf
- 64) Chilamakuri R, Agarwal S. COVID-19: Characteristics and Therapeutics. *Cells.* 2021 Jan 21;10(2):206.
- 65) <https://covid19.who.int>
- 66) https://covidreference.com/epidemiology_it
- 67) Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol.* 2021 Mar;19(3):141-154.
- 68) [https://www.aifa.gov.it/uso-degli-antivirali-orali-per-covid-19#:~:text=Veklury%20\(remdesivir\)%20%C3%A8%20il%20primo,pari%20ad%20almeno%2040%20kg](https://www.aifa.gov.it/uso-degli-antivirali-orali-per-covid-19#:~:text=Veklury%20(remdesivir)%20%C3%A8%20il%20primo,pari%20ad%20almeno%2040%20kg)
- 69) https://www.aifa.gov.it/documents/20142/1123276/Remdesivir_update02_12.01.2022.pdf
- 70) https://www.aifa.gov.it/documents/20142/961234/Determina_DG-1644-2021_Lagevrio-molnupiravir.pdf
- 71) https://www.aifa.gov.it/documents/20142/1123276/lopinavir_ritonavir_17.07.2020.pdf
- 72) <https://www.aifa.gov.it/uso-degli-anticorpi-monoclonali>
- 73) Deeks ED. Casirivimab/Imdevimab: First Approval. *Drugs.* 2021 Nov;81(17):2047-2055.
- 74) https://farmaci.agenziafarmaco.gov.it/aifa/servlet/PdfDownloadServlet?pdfFileName=footer_004768_049766_RCP.pdf&retry=0&sys=m0b113
- 75) https://www.aifa.gov.it/documents/20142/961234/Determina_155-2021_Ronapreve.pdf
- 76) Syed YY. Regdanvimab: First Approval. *Drugs.* 2021 Dec;81(18):2133-2137.
- 77) https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2021/20211112154000/anx_154000_it.pdf
- 78) Heo YA. Sotrovimab: First Approval. *Drugs.* 2022 Mar;82(4):477-484.

- 79) https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/xevudy-epar-product-information_it.pdf
- 80) <https://www.aifa.gov.it/-/interrotta-rolling-review-anticorpi-bamlanivimab-etesevimab-per-covid-19>
- 81) https://www.aifa.gov.it/documents/20142/961234/Determina_DG-318-2021_anticorpo_monoclonale_bamlanivimab-etesevimab.pdf
- 82) <https://www.aifa.gov.it/-/ema-raccomanda-l-autorizzazione-di-evusheld-medicinale-anti-covid-19#:~:text=Il%20Comitato%20per%20i%20medicinali,40%20kg%2C%20prima%20di%20una>
- 83) https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2022/20220325155479/anx_155479_it.pdf
- 84) <https://www.aifa.gov.it/aggiornamento-sui-farmaci-utilizzabili-per-il-trattamento-della-malattia-covid19>