



COVitaminD Trial: prevenzione di complicanze da COVID-19
in pazienti oncologici in trattamento attivo

EudraCT number 2020-002119-23

Codice IEO: IEO1253

Promotore: Istituto Europeo di Oncologia, Via Ripamonti 435-20141 Milano

Principal Investigator

Dr Luca Mazzarella, Dipartimento di Oncologia Sperimentale, IEO, IRCCS

e-mail: luca.mazzarella@ieo.it

Responsabile Scientifico

Sara Gandini, PhD. Director of Molecular and Pharmaco-Epidemiology unit,

Dipartimento di Oncologia Sperimentale, IEO, IRCCS

e-mail: sara.gandini@ieo.it

Principal Investigator dei centri satellite

Paolo Bossi, ASST Spedali Civili di Brescia

Diego Luigi Cortinovis, ASST di Monza

Statistico:

Sara Raimondi, PhD

Investigator dei laboratori partecipanti

Susanna Chiocca, Dipartimento di Oncologia Sperimentale, IEO, IRCCS

Federica Facciotti, Dipartimento di Oncologia Sperimentale, IEO, IRCCS

Loris Bernard, Clinical genomics Lab, IEO, IRCCS

Ferdinando Chiaradonna, Dipartimento di Biotecnologie e Bioscienze dell'università di Milano
Bicocca, IO, IRCCS

Anatomia Patologica

Massimo Barberis, MD Unità Diagnostica Istopatologica e Molecolare, Divisione di Anatomia Patologia

Farmacia Ospedaliera e Farmacovigilanza

Emanuela Omodeo Salè, PharmD,MSc

Divisione SC di Farmacia Ospedaliera, IEO, IRCCS

Phone: +39 02 57489051

e-mail: emanuela.omodeo-sale@ieo.it

Costantino Jemos PharmD,MSc

Divisione SC di Farmacia Ospedaliera, IEO, IRCCS

Phone : +39 02 57489017

e-mail : farmacia.trials@ieo.it

Contatti di farmacovigilanza : info.farmacovigilanza@ieo.it

Stato dell'arte e razionale

I pazienti affetti da cancro con concomitante infezione da COVID-19 hanno un rischio più elevato di complicanze rispetto ai pazienti senza malattia tumorale. In particolare, i pazienti oncologici sottoposti a chemioterapia o intervento chirurgico nell'ultimo mese sono risultati essere a maggior rischio di esiti clinicamente gravi (ricovero in terapia intensiva o morte) rispetto a quelli che non hanno ricevuto chemioterapia o intervento chirurgico.

La carenza di vitamina D sta aumentando a livello mondiale ed è considerata un importante problema di salute pubblica. La vitamina D deriva principalmente dalla sintesi indotta dai raggi ultravioletti nella pelle, ma gli attuali stili di vita e i fattori ambientali spesso limitano l'esposizione alla luce solare, determinando un'alta prevalenza di carenza di vitamina D. Inoltre, le misure di isolamento domiciliare per contrastare gli effetti della pandemia da coronavirus hanno l'effetto di ridurre ulteriormente l'esposizione al sole aumentando così il rischio di ipovitaminosi D.

I pazienti oncologici hanno livelli di vitamina D più bassi rispetto alla popolazione normale e sono tra i soggetti a peggiore prognosi da COVID-19, in particolare coloro che hanno avuto un trattamento oncologico recente.

La collaborazione di Cochran nel 2014 ha riesaminato 18 studi clinici e ha dimostrato che la vitamina D3 (colecalfiferolo), somministrata singolarmente (senza calcio), è associata alla riduzione della mortalità per cancro e della mortalità per tutte le cause. Uno studio nazionale, randomizzato, controllato con placebo (VITAL), con vitamina D3 alla dose di 2000 UI al giorno, condotto su 25.871 partecipanti, quando i primi 1-2 anni di follow-up sono stati esclusi per tener conto dell'effetto di latenza, ha stimato un significativo 25% di riduzione del rischio di morte per cancro. Ancora più importante, nuove prove suggeriscono anche che svolge un ruolo importante nella regolazione del sistema immunitario, forse includendo le risposte immunitarie alle infezioni virali. Studi epidemiologici interventistici e osservazionali forniscono prove del fatto che la carenza di vitamina D può conferire un aumentato rischio di infezione da influenza e vie respiratorie.

La carenza di vitamina D è anche prevalente tra i pazienti con infezione da HIV. Esperimenti di colture cellulari supportano la tesi secondo cui la vitamina D ha effetti antivirali diretti, in particolare contro i virus avvolti.

Inoltre, uno studio randomizzato, in doppio cieco e controllato ha confrontato gli effetti della supplementazione di vitamina D (500 UI / giorno) o del placebo in 223 pazienti con malattia infiammatoria intestinale (IBD). Gli autori hanno dimostrato che l'incidenza dell'infezione delle vie respiratorie superiori

era significativamente più bassa nel gruppo vitamina D con un rischio ridotto del 40% e questo effetto è stato migliorato nel sottogruppo a basso 25-OHD con un significativo rischio ridotto del 64%.

Il ruolo immunomodulatore della vitamina D è noto da tempo e il suo effetto antagonista sulla replicazione virale nel tratto respiratorio, le infezioni enteriche, l'otite media, le infezioni da clostridio, la vaginosi, le infezioni del tratto urinario, la sepsi, l'influenza, la dengue e l'epatite sono da attribuire alla capacità di vitamina D per aumentare i peptidi antimicrobici (catelicidina e beta-defensine) con attività antivirale e immunomodulante. Una concentrazione di 25OHD superiore a 38 ng / ml è associata a dimezzare il rischio di infezioni del tratto respiratorio acuto e ad una marcata riduzione delle percentuali di giorni di malattia. Nel 2017 una metanalisi che includeva 25 studi randomizzati ha mostrato che l'integrazione di vitamina D aveva ridotto di due terzi l'incidenza di infezioni respiratorie acute in soggetti con livelli di 25 (OH) D inferiori a 16 ng.

Lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche partendo dalla fase preclinica per combattere la pandemia, per quanto auspicabile, è un processo lungo, quindi poco pratico per affrontare l'immediata sfida globale. Al contrario, la possibilità di impiegare farmaci già esistenti per altre indicazioni ma che hanno un forte razionale se applicati alla situazione emergente, appare una metodologia più rapida per confermare o meno l'ipotesi di base.

L'uso di farmaci esistenti per nuovi scopi riduce i tempi di sviluppo dei farmaci utilizzando ciò che è già noto su tali farmaci, tra cui la loro farmacocinetica, farmacodinamica, tossicità comuni e non comuni, programma di dosaggio e meccanismo d'azione. Da questo discende che la maggior parte delle fasi precliniche e precoci di sviluppo clinico possono essere ignorate. Pertanto, il reimpiego dei farmaci presenta un percorso significativamente più rapido negli studi di fase 2 rispetto alla scoperta e allo sviluppo di farmaci nuovi in cui non sono noti il profilo di sicurezza, dosaggio e tossicità. Infine, gli investimenti finanziari legati allo sviluppo sono notevolmente ridotti.

Tuttavia, per dimostrare l'efficacia e non ripercorrere i bias insiti negli studi osservazionali, vi è la necessità di applicare un disegno di studio clinico randomizzato. Abbiamo quindi disegnato uno studio randomizzato in doppio cieco di fase II controllato con placebo per indagare se l'integrazione di vitamina D può aiutare ad aumentare la risposta immunitaria all'infezione da COVID-19, in pazienti oncologici con sintomi assenti o minimi dovuti al virus e che non richiedono ricovero in ospedale al momento della diagnosi.

La nostra ipotesi è che la risposta al trattamento possa essere modulato anche dalla risposta immunitaria, dai livelli di espressione e di attività di ACE2 e dal profilo del microbiota. L'ACE2 è il recettore funzionale

SARS-CoV di ingresso espresso principalmente nelle cellule umane epiteliali alveolari di tipo II, nonché nel cuore, nei reni, nei vasi sanguigni e nell'intestino, e questo spiega la disfunzione multiorgano spesso osservata nei pazienti. In effetti, l'infezione da SARS-CoV2 può anche portare a sintomi addominali atipici, infiammazione virale del tratto gastrointestinale che causa un'alterazione della microflora batterica, che potrebbe quindi influenzare il decorso clinico dei pazienti. Il nostro progetto, con un approccio multidisciplinare, valuterà come il metabolismo della vitamina D interagisce con il microbioma dell'intestino attraverso molteplici percorsi che possono essere importanti nell'eziologia della malattia COVID-19 nei pazienti oncologici.

Vitamina D, il sistema renina-angiotensina (RAS) e l'associazione con ACE2

L'infezione virale SARS-CoV-2 provoca cluster di gravi malattie respiratorie come la sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS) simile a quella causata dal SARS-CoV (sindrome respiratoria acuta grave da coronavirus). Sia SARS-CoV-2 che SARS-CoV utilizzano lo stesso recettore, l'ACE2 (enzima di conversione dell'angiotensina-2), per infettare le cellule. L'ACE2 è uno degli enzimi centrali nel sistema renina-angiotensina (RAS) che regola la pressione arteriosa, i liquidi, l'equilibrio elettrolitico e le resistenze vascolari sistemiche. Nei polmoni, l'attivazione del RAS locale può influenzare la patogenesi del danno polmonare attraverso meccanismi multipli, come un aumento della permeabilità vascolare e alterazioni delle cellule epiteliali alveolari. L'attivazione del RAS polmonare coinvolge la renina, l'enzima iniziale della cascata di attivazione RAS; la renina scinde l'angiotensinogeno generando angiotensina I, inattivo. L'ACE converte l'Ang I ad angiotensina II, molto attivo, che esercita effetti vasoattivi legandosi ai suoi recettori, di tipo I (AT1) e tipo II (AT2). L'ACE2 è un omologo dell'ACE e svolge un ruolo chiave nel bilanciamento delle risposte provocate dall'ACE. L'ACE2 idrolizza l'Ang I generando Ang-(1-9) e l'Ang II generando Ang-(1-7), che ha il compito di antagonizzare molti degli effetti mediati dall'Ang II. Nei polmoni l'attività del RAS, l'ACE e l'Ang II sono intrinsecamente elevati, ma anche l'attività dell'ACE2 è molto elevata, in maniera da regolare l'equilibrio Ang II/Ang-(1-7), in quanto alti livelli di Ang II nel polmone possono portare ad aumenti della permeabilità vascolare e ad edema polmonare.

Dati ottenuti in topi infettati con SARS-CoV hanno dimostrato che sia la replicazione virale che la proteina S virale sono in grado di ridurre selettivamente l'espressione dell'ACE2, ma non dell'ACE. Inoltre, il SARS-CoV induce una rapida repressione anche dell'ACE2 presente sulla superficie cellulare con rilascio di ectodomini di ACE2 cataliticamente attivi. Tali risultati hanno suggerito che il fisiologico equilibrio tra ACE/ACE2 e Ang II/Ang-(1-7), sbilanciato dall'infezione virale SARS-CoV, potrebbe essere

una delle cause principali della grave insufficienza polmonare indotta dall'infezione di SARS-CoV, probabilmente mediata da alti livelli di AngII in seguito a inibizione dell'ACE2 da parte della proteina S virale. Dato che la proteina S del SARS-CoV-2 interagisce con l'ACE2 come quella del SARS-CoV, è possibile che il meccanismo patogenico possa essere condiviso tra i due virus. Sulla base di presupposto di questi dati, il bilanciamento delle funzioni ACE/ACE2 può essere un modo per alleviare le gravi lesioni polmonari indotte dal virus.

D'altro canto i pazienti con malattie cardiache, ipertensione o diabete, trattati con inibitori di ACE, con conseguente aumento dell'espressione dell'ACE2, sono a rischio più elevato per grave infezione da SARS-CoV-2 e, pertanto, ancora una volta, il bilanciamento tra le funzioni di ACE e ACE2 potrebbe migliorare la risposta terapeutica nei confronti dei pazienti con infezione SARS-CoV2.

A tale proposito è stato dimostrato che la vitamina D è in grado di inibire l'attività del RAS attraverso il suo recettore nucleare, VDR. Inoltre è stato dimostrato che agonisti della vitamina D, come il calcitriolo, mostrano effetti protettivi contro il danno polmonare acuto modulando l'espressione dei membri del sistema RAS quali ACE2 nel tessuto polmonare, e quindi supportando il ruolo della carenza di vitamina D come fattore patogenico nel COVID-19. Studi condotti in topi mancanti del VDR, hanno dimostrato un aumento di Ang II e dello stato infiammatorio, confermando un ruolo chiave della vitamina D nel controllo dell'infiammazione attraverso il RAS. Ricordiamo che i recettori della vitamina D sono ampiamente distribuiti nelle cellule epiteliali respiratorie e nelle cellule immunitarie (cellula B, cellula T, macrofagi e monociti). Inoltre bisogna sottolineare che la 25-idrossivitamina D (25OHD), la principale forma circolante di vitamina D, può essere convertita nella forma attiva (1,25-diidrossivitamina D) nell'epitelio bronchiale e nelle cellule immunitarie. L'enzima 1α -idrossilasi, richiesto per l'attivazione della vitamina D, è indotto da diversi stimoli, tra cui citochine anti-infiammatorie e altri ligandi tipici del tratto respiratorio. Tuttavia, sono necessari adeguati livelli sierici di 25OHD per aumentare i livelli di 1,25-diidrossivitamina D e di conseguenza migliorare la risposta immunitaria alle infezioni dei virus respiratori. I pneumociti di tipo II sono il bersaglio primario dei coronavirus e i recettori ACE2 sono altamente espressi su queste cellule. La funzionalità alterata dei pneumociti di tipo II riduce il livello di tensioattivi e aumenta la tensione superficiale in COVID-19. È stato riportato che i metaboliti della 1,25-diidrossivitamina D stimolano la sintesi di tensioattivi nelle cellule alveolari di tipo II. Inoltre dati ottenuti da colture in vitro di cellule di tipo II alveolari fetali e adulte umane con 1,25-diidrossivitamina D hanno mostrato un'aumentata espressione del VDR e della Surfactant Protein B (SP-B), una proteina fondamentale per un corretto funzionamento polmonare, indicando ancora una volta un potenziale ruolo della vitamina D nella riduzione della tensione superficiale in

seguito ad infezione con SARS-COV-2. Inoltre è stato anche osservato che il trattamento di pazienti infetti da SARS-COV con vitamina D, prevenendo l'accumulo di Ang II, riduce la sua attività pro-infiammatoria e, sopprimendo il rilascio di renina, riduce anche il loro rischio di sviluppare ARDS, miocarditi o altri danni cardiaci. Se questo stesso meccanismo è presente anche nelle infezioni da SARS-CoV-2, questo potrebbe essere la base dello sviluppo di ARDS, lesioni cardiache e miocardite fulminante e quindi supportare l'uso di vitamina D anche in pazienti SARS-CoV-2.

Razionale relativo al meccanismo di protezione della vitamina D nei confronti del danno multi-organo indotto da infezione da SARS_CoV-2:

1. La vitamina D riduce la produzione di cellule Th1 che regolano le risposte cellulo-mediate attraverso la produzione di interferone gamma (IFN- γ) e di IL-12. Pertanto, può sopprimere la progressione dell'infiammazione riducendo anche la generazione di citochine infiammatorie come IL-6, IL-8, e IL-17. La vitamina D riduce anche la produzione di TNF α e il fattore nucleare- κ B (NF κ B). Inoltre, 11,25-diidrossivitamina D, forma attiva di vitamina D, inibisce direttamente l'IFN- γ e IL-2. La vitamina D quindi può ridurre la cosiddetta "tempesta di citochine" nei pazienti con grave infezione da COVID-19 e quindi prevenire danni multipli agli organi.

2. È stato dimostrato che durante l'infezione virale, la forma inattiva di vitamina D può essere convertita in forma attiva dalle cellule epiteliali alveolari (come precedentemente descritto), con conseguente aumento dell'espressione dei messaggeri per le catelicidina e defensina. Entrambe le molecole hanno un effetto protettivo contro i danni ai polmoni dovuti all'iperossia e all'infezione di microorganismi. Quindi la vitamina D potrebbe ridurre il rischio di infezione da COVID-19 inducendo la produzione di catelicidina e defensina, che riducono la sopravvivenza e la replicazione dei virus.

3. Nell'uomo con malattia renali e nei topi con diabete, è stata dimostrata una maggiore espressione di ACE2. Il trattamento con vitamina D inibisce l'espressione di ACE2 nel rene. Inoltre la stessa vitamina D mostra un effetto reno-protettivo nei ratti nefropatici diabetici indotti da trattamento con streptozotocina, in quanto diminuisce il rapporto ACE1 e ACE1/ACE2. In altre parole, il trattamento con vitamina D può sopprimere l'espressione di ACE2 nelle cellule tubulari renali, impedendo così l'ingresso del virus nelle cellule dei pazienti diabetici e proteggendo il rene.

Razionale sostenuto da parte dell'istituto superiore di Sanità, studi osservazionali e trials randomizzati

In una pubblicazione dell'istituto superiore di Sanità si trova un documento che sostiene la ricerca sulla vitamina D nell'ambito del COVID-19 partendo dalle considerazioni di una lettera pubblicata sull'*American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism*, da parte di un gruppo di ricercatori di varie Istituzioni Italiane (IDI-IRCCS di Roma, ISA-CNR di Avellino e Ospedale S. Andrea di Roma) e di una Università Americana (Augusta University, Augusta, Georgia), coordinati da Francesco Facchiano del Dipartimento di Oncologia e Medicina Molecolare dell'ISS, e una lettera di Hrvoje Jakovac, dell'Università di Rijeka (Croazia) dal titolo “COVID-19 and vitamin D- Is there a link and an opportunity for intervention?”. Il razionale è che il mantenimento dei normali livelli plasmatici di vitamina D dovrebbe giocare un ruolo significativo nel ridurre i rischi di infezioni acute delle vie respiratorie e potrebbe essere importante per il trattamento di due sintomi tipici della malattia da COVID-19, quali l'anosmia e l'ageusia, ossia rispettivamente la perdita dell'olfatto e del gusto lamentati da più pazienti. Attualmente sono infatti in corso diversi trial clinici, ad esempio negli USA, che mirano a testare l'integrazione di vitamina D nei pazienti con COVID-19 in combinazione con altri farmaci e a confrontare l'effetto di dosi elevate rispetto alle dosi standard.

E' stata anche riscontrata un'associazione significativa tra lo stato della vitamina D e gli esiti clinici ($p < 0,001$). A Singapore, un piccolo studio osservazionale di coorte ha incluso 43 casi di un ospedale universitario terziario; è stato trovato che un minor numero di pazienti COVID-19 che avevano ricevuto dosi orali combinate di vitamina D (1000 UI), Mg (150 mg) e vitamina B12 (500 microgrammi) avevano richiesto una successiva ossigenoterapia rispetto ai controlli (3/17 vs. 16/26, $p = 0,006$). È stato inoltre osservato che i pazienti trattati con vitamina D, Mg e vitamina B12 combinati avevano mostrato effetti protettivi significativi contro il deterioramento clinico ($p = 0,041$) anche dopo aggiustamento per età, sesso e comorbidità. Bassi livelli di vitamina D sono stati riportati anche in pazienti con COVID-19 gravi e in pazienti con condizioni mediche preesistenti. In Belgio, uno studio osservazionale retrospettivo di 186 casi positivi e 2717 controlli negativi, ha riportato una media bassa significativa ($p = 0,0016$) di vitamina D nei pazienti COVID-19 rispetto ai soggetti di controllo.

In linea con l'obiettivo del nostro trial, cioè il miglioramento della quantità di vitamina D con conseguente effetto positivo sugli esiti dei pazienti con COVID-19, altri studi hanno dimostrato che il trattamento con alte dosi di vitamina D (250.000–500.000 UI) si dimostra essere sicuro nei pazienti con ventilazione meccanica e in condizioni critiche ed è stato associato a una riduzione del ricovero ospedaliero, miglioramento della capacità del sangue di trasportare ossigeno e aumento dei livelli di emoglobina.

Vitamina D ed altre infezioni virali respiratorie

Uno studio ha dimostrato che la vitamina D inibisce la replicazione del rinovirus nelle cellule bronchiali primarie di fibrosi cistica attraverso l'induzione della catelicidina. Inoltre, la vitamina D riduce anche la replicazione e il rilascio di rinovirus e aumenta l'espressione di geni e catelicidine stimolati dall'IFN nelle cellule endoteliali cerebrali primarie umane (HPBEC) infette da rinovirus 1B. In particolare, la catelicidina ha mostrato un'attività diretta anti-virale in esperimenti in vitro utilizzando cellule HPBEC infettate da rinovirus 1B. In linea con questo, il pretrattamento delle cellule epiteliali respiratorie A549 con 25OHD3 ha indotto una resistenza transitoria all'infezione da rinovirus. L'induzione di IkB α , un inibitore dell'NF- κ B, attraverso il trattamento con vitamina D ha attenuato l'espressione dei geni proinfiammatori indotti da NF- κ B nelle cellule epiteliali tracheobronchiali umane (hTBE) infettate con il ceppo 2V dell'RSV (Virus Respiratorio Sinciziale). Inoltre c'è una riduzione nella risposta infiammatoria all'infezione da rinovirus nell'epitelio delle vie aeree senza influire sulla clearance virale. Un altro gruppo di ricerca ha ulteriormente dimostrato che il trattamento con vitamina D inibisce l'attivazione trascrizionale mediata da NF κ B e da STAT1 in cellule A549 infette da RSV.

Studio clinico randomizzato di vitamina D e infezione acuta del tratto respiratorio

La meta-analisi di numerosi studi clinici di Martineau et al. ha anche mostrato il ridotto rischio di infezione acuta del tratto respiratorio in seguito ad integrazione di vitamina D. La meta-analisi che includeva 25 studi randomizzati (in totale 11 321 partecipanti, di età compresa tra 0 e 95 anni) ha mostrato che la supplementazione di vitamina D portava ad una riduzione significativa del 12% del rischio di infezione acuta del tratto respiratorio tra tutti i partecipanti (Odds Ratio (OR) aggiustato 0,88, 95% CI da 0,81 a 0,96). A sostegno di ciò, livelli più alti di vitamina D erano anche correlati con una maggiore immunogenicità, dimostrata dalla produzione più efficiente di anticorpi specifici del virus dell'influenza.

Inferenza causale con COVID-19 e precedenti pandemie di virus respiratori

Uno studio ha analizzato la relazione tra gravità di COVID-19 e latitudine impiegando un quadro di inferenza causale in grado di distinguere la correlazione dovuta ad un legame causale usando i dati osservativi, con un metodo di prova ipotetico-deduttivo. Sono stati costruiti due modelli sulla base dei grafici aciclici diretti (DAG), uno causale e uno a-causale rispetto alla gravità di COVID-19 con vitamina D ed è stato confermato che i dati osservati corrispondono fortemente alle previsioni fatte dal modello

causale e contraddicono quelle del modello a-causale. L'integrazione di vitamina D sembra avere prevenuto significativamente le pandemie passate di virus respiratori. Si sottolinea, inoltre, l'effetto diretto della vitamina D sul sistema renina-angiotensina (RAS), che in concerto con effetti aggiuntivi, può, come detto sopra, modificare le risposte dell'ospite prevenendo così una tempesta di citochine e cambiamenti patologici indotti dalla SARS-CoV-2. Gli autori sostengono che l'attuazione tempestiva di programmi di integrazione di vitamina D in tutto il mondo è fondamentale, perché può portare a ridurre i ricoveri ospedalieri, i costi sanitari, aumentando in modo significativo la qualità della vita.

Conclusioni

In conclusione, il ruolo della vitamina D in COVID-19 è dovuto al mantenimento delle giunzioni cellulari e delle giunzioni gap che riducono l'ingresso del virus, all'aumento dell'immunità cellulare con conseguente diminuzione della tempesta citochinica, all'influenza sull'IF γ e il TNF α che porta a una regolazione positiva dell'immunità adattativa mediante l'inibizione dell'effetto inibitorio delle T helper tipo 1, e quindi portando all'induzione delle cellule T. Tale effetto positivo sul numero di cellule T CD4+ è stato chiaramente osservato in seguito a supplementazione di vitamina D in caso di infezione da HIV. Molti studi supportano le caratteristiche immunomodulanti della vitamina D e il suo ruolo significativo nel mantenimento dell'omeostasi immunitaria. Tuttavia sono necessari studi randomizzati controllati per confermare il ruolo della vitamina D nelle risposte immunitarie protettive contro i microbi respiratori e nella prevenzione di vari tipi di infezioni acute del tratto respiratorio.

Razionale su vitamina D e marcatori infiammatori

La vitamina D svolge un ruolo importante nella regolazione delle citochine infiammatorie, sopprimendo e aumentando le citochine antinfiammatorie e la proteina di reazione C (CRP), che riducono sostanzialmente il rischio di infezioni.

Due meta-analisi sistematiche complete di tutti i dati disponibili di indicatori immuno-infiammatori hanno dimostrato che i pazienti gravi tendono a presentare un aumento del rapporto neutrofili-linfociti bianchi (NLR), CRP e Interleuchina-6 (IL-6) e un numero ridotto di sottotipi di linfociti e linfociti totali, come linfociti T CD4 + e linfociti T CD8 +, rispetto ai pazienti non gravi. Inoltre, hanno scoperto che la NLR, marcatore della risposta infiammatoria sistemica, può essere associato significativamente con la gravità clinica nei pazienti con COVID-19 (OR = 2,50, IC al 95%: 2,04–3,06). Nelle conclusioni gli autori sostengono che NLR, prendendo in considerazione sia i livelli di neutrofili che i linfociti, può essere

considerato uno dei più completi marker per identificare precocemente i pazienti con COVID-19 ad alto rischio. Il nostro gruppo ha pubblicato numerosi studi sul ruolo della NLR come marker prognostico nei pazienti oncologici sottoposti o meno a trattamenti medici.

In vitro, è stato inoltre dimostrato che la vitamina D promuove la differenziazione dei monociti dai macrofagi, impedendo loro di rilasciare citochine infiammatorie e riducendo la loro capacità di presentare antigeni ai linfociti inibendo l'espressione della superficie cellulare della molecola del complesso maggiore di istocompatibilità di classe 2 (MHC-II). La vitamina D sopprime anche la proliferazione e le capacità stimolatorie delle cellule T e dei monociti ed attenua le citochine proinfiammatorie, tra cui la CRP, il fattore di necrosi tumorale α (TNF α), l'interleuchina (IL) 6, IL-1 e IL-8, mentre sovraregolano le citochine antinfiammatorie come IL-10. I dati in vitro hanno anche mostrato associazioni tra assenza di VDR e aumento dell'attività del fattore nucleare κ B (NF κ B), un fattore di trascrizione con un ruolo chiave nell'immunomodulazione e nella fisiopatologia di diverse malattie infiammatorie e stati infiammatori cronici. È stato anche evidente il contrario, cioè è stato dimostrato che la vitamina D previene la traslocazione di NF κ B e indebolisce la sua attività. Inoltre, induce l'espressione di potenti peptidi antimicrobici (AMP), che sono presenti nelle cellule killer naturali, nei monociti, nei neutrofili e nelle cellule epiteliali che rivestono il tratto respiratorio. La vitamina D avvia lo sviluppo di cellule T regolatorie soppressive e inibisce sviluppo di cellule Th17 proinfiammatorie. Una meta-analisi che ha esaminato gli effetti della supplementazione di vitamina D sui marker infiammatori nei pazienti con insufficienza cardiaca ha mostrato che la vitamina D è stata trovata associata con concentrazioni più basse del fattore alfa necrosi tumorale (TNF- α) al follow-up rispetto ai controlli (n= 380 ; p = 0,04).

Obiettivo principale

Lo scopo dello studio è di indagare se l'integrazione di vitamina D può aiutare ad aumentare la risposta immunitaria all'infezione da Covid-19, in pazienti con patologia oncologica attiva, con sintomi dovuti al virus assenti o minimi e che non richiedono ricovero al momento della diagnosi.

Obiettivi secondari

* Studieremo i fattori prognostici dei malati di cancro con COVID-19 per identificare biomarcatori predittivi di peggior prognosi.

Per questo obiettivo saranno raccolte informazioni su:

- sede del tumore, stadio, età, sesso, fumo, comorbidità, farmaci utilizzati abitualmente (comprensivi, ad es. di ACE-inibitori, beta-bloccanti, statine ecc.).

- trattamento oncologico in corso o pianificato per prossima attivazione: chemioterapia, immunoterapia, terapie targeted, ormonoterapia, radioterapia e precedenti interventi chirurgici oncologici

- dati di laboratorio: rapporto neutrofili/linfociti (NLR), proteina C reattiva (PCR), procalcitonina (PCT).

- * Inoltre, sarà conservato anche il siero/plasma per studiare il ruolo delle citochine (tra le altre: IL-6, IL1beta, TNFalfa), l'espressione e l'attività dell'ACE2 e la composizione del microbiota. Studieremo come cambiano nel tempo e con l'integrazione e in associazione con la prognosi della malattia.

- * Indagheremo il tempo dell'eliminazione virale e della sieroconversione: selezioneremo (1) i pazienti alla fine del follow-up per la negativizzazione dell'RNA virale in due tamponi rinofaringei consecutivi e (2) i pazienti negativi per gli anticorpi contro la SARS- CoV2 al basale per la presenza nel sangue di anticorpi contro SARS-CoV2 (sia IgG che IgM) alla fine del follow-up.

Arruolamento

In primo luogo, esamineremo i malati di cancro in trattamento attivo (ovvero candidati all'attivazione o attualmente in trattamento con terapia sistemica o radioterapia o che hanno ricevuto un intervento chirurgico nell'ultimo mese) per la presenza dell'RNA virale in due tamponi rinofaringei consecutivi entro 24 ore e arruoleremo quelli positivi. Quindi li esamineremo anche per la presenza nel sangue di anticorpi contro SARS-CoV2 (sia IgG che IgM), per discriminare tra un'infezione in via di risoluzione e un'infezione in corso.

Durata dello studio

8 mesi di arruolamento e 1 mese di trattamento/placebo. In 9 mesi saremo in grado di avere concluso l'arruolamento di 80 pazienti trattati per 1 mese. Gli ultimi 3 mesi verranno utilizzati per l'estrazione e l'analisi dei dati.

Disegno dello studio

Trial in doppio cieco di fase II randomizzato controllato con placebo di supplementazione con vitamina D.

La randomizzazione sarà stratificata per centro, stadio della malattia (locoregionale vs recidivato/metastatico) e trattamento (in corso o da iniziare).

Endpoint principale

La proporzione di pazienti con peggioramento a 30 giorni. La definizione di peggioramento è basata sull'aumento di almeno 1 punto rispetto al basale nella scala del WHO R&D Blueprint expert group (WHO R&D Blueprint novel Coronavirus COVID-19 Therapeutic Trial Synopsis. World Health Organization 2020).

Endpoint secondari

Oltre al cambiamento del 25OHD, valuteremo anche il cambiamento di una serie di biomarcatori di infiammazione come il rapporto neutrofili/linfociti (NLR), la proteina C reattiva (PCR), procalcitonina (PCT), e altre citochine (quali IL-6, IL1beta, TNFalfa, GCSF) che sono correlati con la prognosi della malattia.

Inoltre valuteremo il tempo di sieroconversione; il tempo dell'eliminazione virale; il tempo trascorso in ospedale; tempo senza la necessità di ossigenoterapia. Studieremo inoltre i classici punteggi prognostici: punteggio SOFA (Sequential [Sepsis-Related] Organ Failure Assessment Score), CURB-65, linfocitopenia emofagocitica (HLH). Inoltre valuteremo l'insorgere di eventuali complicanze: polmonite, ARDS, sepsi, coagulopatia, AKI, infezioni secondarie, insufficienza cardiaca, accesso alle terapie intensive, morte.

Useremo inoltre un test ad alta sensibilità multiplex Luminex (ProcartaPlex 20 plex, Thermo Fisher) che consente la quantificazione simultanea di un vasto pannello di citochine legate all'infiammazione e alla risposta immunitaria con la tecnologia MAP secondo il protocollo del produttore.

Criteri di inclusione:

Patologia tumorale in trattamento attivo (ovvero candidati all'attivazione o attualmente in trattamento con terapia sistemica o radioterapia o che hanno ricevuto un intervento chirurgico nell'ultimo mese)

Criteri di esclusione:

Ospedalizzazione a causa di infezione virale; uso corrente di vitamina D; storia di calcoli renali ricorrenti; storia di sindrome da malassorbimento (ad es. insufficienza pancreatica, celiachia, morbo di Crohn, qualsiasi IBD cronica); malattia epatica cronica e / o malattia renale con alterate funzioni biochimiche o dialisi renale; \geq grado 2 basato su CTCAE (v 5.0); gravidanza o allattamento o sta

pianificando una gravidanza durante lo studio; ipersensibilità nota alla vitamina D; impossibilità di deglutire; alterazione non maligna dell'omeostasi del calcio.

Calcolo del campione

Una dimensione del campione di 80 pazienti (40 per braccio) raggiunge l'80% di potenza per rilevare una differenza del 23% tra i bracci del trial nelle proporzioni di pazienti con peggioramento. Dati i risultati trovati in studi precedenti, si vuole testare l'ipotesi che la percentuale di peggioramento nel braccio di trattamento sia del 30% con l'ipotesi nulla e del 7% con l'ipotesi alternativa. Si ipotizza che la percentuale nel braccio placebo sia del 30%. La statistica del test utilizzata è il test Z su due code con varianza aggregata. Il livello di significatività del test è del 5%.

Metodi statistici

Il confronto tra i percentuali di peggioramento nei due bracci sarà effettuato tramite il test chi-quadro dei rapporti Odds, Odds Ratio (OR), ottenuto da modelli logistici multivariati.

In generale l'analisi statistica verrà effettuata anche con modelli multivariati aggiustando per 25OHD al basale ed eventualmente considerando differenze tra sottogruppi stratificati per 25OHD. Effettueremo anche analisi secondarie per studiare le differenze al basale per età, sesso, indice di massa corporea, oltre che per 25(OH)D. Riporteremo i valori nominali dei P-values e metteremo in evidenza le associazioni che si mantengono significative anche dopo correzione per test multipli con il metodo del False Discovery Rate di Benjamini e Hochberg.

Randomizzazione

I soggetti stratificati saranno randomizzati in base allo stato recidivato/metastatico o locoregionale e a trattamento in corso oppure non ancora iniziato.

Modalità di randomizzazione e cecità

Verrà preparato un elenco di randomizzazione generato dal computer utilizzando blocchi permutati di quattro al fine di garantire il mantenimento del rapporto 1:1. I soggetti stratificati saranno randomizzati in base allo stato metastatico. Né i ricercatori coinvolti nello studio, né i pazienti sapranno quale tipo di preparazione viene somministrata. Un numero di identificazione progressivo verrà assegnato a ciascun soggetto e, a caso, verrà stabilito un collegamento tra il numero di identificazione del soggetto e il

contenitore composto. La randomizzazione sarà condotta presso il 'data center' dell'unità Farmaco-Epidemiologica, Dipartimento di Oncologia Sperimentale, dell'Istituto Europeo di Oncologia, Milano, per garantire la protezione dei dati ed impedire che lo stesso contenitore di farmaci venga assegnato due volte. Il codice verrà rivelato una volta completate l'assunzione, la raccolta dei dati e le analisi di laboratorio. La protezione della riservatezza sarà raggiunta mediante un accesso limitato alle banche dati. Il personale di laboratorio non avrà accesso ai dati personali, che saranno separati da altri database e protetti da password.

L'apertura del cieco sarà fornita una volta che l'ultimo soggetto avrà completato il periodo di trattamento. La protezione della riservatezza sarà raggiunta mediante un accesso limitato alle banche dati. Il personale di laboratorio non avrà accesso ai dati personali, che saranno separati da altri database e protetti da password. La Divisione di Farmacia Ospedaliera manterrà la chiave per violare il codice. L'etichetta attaccata a ciascun pacchetto di materiale di studio avrà un codice univoco collegato allo schema di randomizzazione.

Il codice del trattamento non deve essere infranto se non in caso di emergenze mediche o quando la gestione appropriata della materia richiede la conoscenza della randomizzazione del trattamento. Ogni interruzione di codice deve essere autorizzata dal ricercatore principale.

Procedure per trattenere il cieco: per tutto il personale direttamente coinvolto nella conduzione clinica del progetto (vale a dire, il personale medico e clinico, gli infermieri, il personale di laboratorio, ecc.) l'unico modo per identificare il paziente sarà un numero di identificazione.

Le circostanze per rompere il cieco saranno le seguenti: condizione medica che richiede specificamente la divulgazione dell'assegnazione del trattamento per ulteriori decisioni terapeutiche.

Descrizione del trattamento

La vitamina D o il Placebo vengono forniti in flacone di vetro ambrato dotato di contagocce con un contenuto sufficiente a garantire un mese di supplementazione. I preparati sono visivamente identici. Il trattamento sarà fornito dalla Divisione di Farmacia Ospedaliera dell'Istituto Europeo di Oncologia. Dato che questo trattamento è doppio cieco, né i ricercatori coinvolti nello studio né i pazienti partecipanti sapranno quale tipo di trattamento (vitamina D/placebo) viene somministrato. Il trattamento e il braccio pertinente a cui è stato assegnato un paziente saranno resi noti solo in caso di comprovata necessità (ad esempio un grave evento avverso) da parte della Divisione di Farmacia Ospedaliera dell'Istituto Europeo di Oncologia su formale richiesta scritta dello sperimentatore principale.

Operazioni di confezionamento e blinding in farmacia ospedaliera

Al fine di garantire la ciecità di sperimentatori e soggetti arruolati, il Laboratorio Galenico della Divisione di Farmacia Ospedaliera dell'Istituto Europeo di Oncologia effettuerà l'operazione di confezionamento primario e presentazione del farmaco a partire dalla specialità medicinale a base di vitamina D (20ml – 10000UI/ml), tale operazione sarà svolta in conformità all'articolo 8 del DLgs 200/07. Il placebo sarà ugualmente preparato a partire da Olio di Oliva raffinato.

Tutte le operazioni sono riconducibili a semplici travasi, confezionamenti ed etichettatura senza modifica alcuna del contenuto iniziale del farmaco in commercio.

Ogni confezione sarà dotata di un box identification number correlato univocamente ai codici definiti dalla lista di randomizzazione.

Distribuzione e disponibilità delle gocce

La vitamina D/Placebo sarà distribuita dalla Divisione di Farmacia Ospedaliera dell'Istituto Europeo di Oncologia.

Dosi e durata trattamento

I pazienti assumeranno vitamina D (o placebo) per 1 mese. La vitamina D 6000 UI/die o il placebo verranno assunti quotidianamente, oltre ad un boost iniziale di 15000 IU.

Al soggetto verrà fornito un pacchetto per una fornitura sufficiente fino alla fine del periodo di trattamento e verrà chiesto di restituire il pacchetto allo sperimentatore alla visita successiva.

Il razionale per la dose si basa su studi precedenti in pazienti con altre malattie infettive e al fine di aumentare rapidamente e in sicurezza i livelli sierici di 25OHD. Sono necessarie dosi di almeno 6000 UI/die per raggiungere concentrazioni sieriche di 25OHD superiori a 100nmol/L e l'assunzione di vitamina D fino a 15.000 UI/die è risultata sicura.

Sedi cliniche e integrazione con l'assistenza clinica

Arruoleremo pazienti all'Istituto Europeo di Oncologia di Milano, agli Spedali Civili di Brescia e ASST H S Gerardo Monza. Si trovano in aree in cui l'epidemia di COVID-19 è stata più pronunciata.

L'assistenza clinica nei primi contesti dell'infezione da COVID-19 nei pazienti oncologici non è standardizzata e richiede un esame accurato del paziente per rilevare i sintomi che meritano un trattamento

immediato. Al contrario, in assenza di sintomi, il paziente viene attentamente seguito a casa e non ricoverato in ospedale. Per questi pazienti, non ci sono trattamenti disponibili o suggeriti per aumentare la loro competenza immunitaria. Considerando ciò, riteniamo che il presente studio potrebbe colmare una lacuna, indagando se la somministrazione di un supporto di vitamina D, privo di effetti collaterali, potrebbe aumentare la difesa immunitaria del paziente, ridurre il rischio di complicanze correlate a COVID-19 e prevenire il ricovero in ospedale.

L'integrazione di vitamina D è una terapia convenzionale con sicurezza e benefici dimostrati in ambito oncologico e non pone alcun problema specifico di interazione con i farmaci usati in questo contesto. Le potenziali aree di preoccupazione sono per i pazienti con compromissione omeostasi calcio / fosforo preesistente o acquisita, ma questi pazienti saranno esplicitamente esclusi al momento dell'arruolamento.

Eventuale modifica della dose

Ai pazienti verrà chiesto di mantenere la dose completa per tutto il periodo di trattamento.

Le analisi della tossicità saranno valutate principalmente con una valutazione telefonica nei primi 14 giorni e successivamente con visita clinica alla negativizzazione del tampone, come da procedura clinica di prassi in questa fase emergenziale.

Se si verifica una tossicità di grado 1, il paziente verrà mantenuto alla dose piena.

In ogni caso, la tossicità verrà verificata utilizzando la versione più recente dei criteri terminologici comuni dell'NCI per gli eventi avversi (CTCAE versione 5.0), in base alla rilevanza clinica verrà valutata se interrompere temporaneamente il trattamento.

In caso di tossicità di grado 2, a seconda della rilevanza clinica, il farmaco in studio verrà temporaneamente sospeso. La tossicità verrà controllata dopo 1 mese e se la tossicità si risolve, l'intervento riprenderà a dosi complete.

Se la tossicità riprende, la dose sarà ridotta della metà e mantenuta per la durata della sperimentazione. Se la tossicità riprende e viene probabilmente o definitivamente attribuita all'agente di studio, la vitamina D verrà ritirata.

Se si verifica una tossicità di grado 3, la terapia verrà interrotta fino alla risoluzione della tossicità. I pazienti verranno controllati ogni 1-2 settimane a seconda della gravità clinica. Per la tossicità di grado 3 sicuramente o probabilmente correlata al farmaco, i partecipanti devono essere rimossi dallo studio. Per la tossicità di grado 3 eventualmente o improbabilmente correlata al farmaco, possiamo prendere in

considerazione la reintroduzione alla dose del 50% (e mantenere tale dose). In caso di grado 4 i pazienti verranno portati via dallo studio.

Metodi per monitorare l'aderenza

Per monitorare la conformità del paziente utilizzeremo solo il calendario di autodichiarazione del soggetto, poiché tra gli 'endpoint' secondari esiste la misurazione effettiva del livello sierico di vitamina D. Valuteremo anche l'auto-relazione del paziente, la fonte di informazione più diretta, che è la misura più ampiamente utilizzata dell'adesione di un paziente al proprio regime medico. Tuttavia, l'autodichiarazione del paziente è stata criticata come troppo soggettiva, con i pazienti che tendono a dichiarare eccessivamente la propria aderenza fino a due o quattro volte.

Ogni soggetto verrà istruito sull'uso dei farmaci e sui potenziali effetti collaterali. Ai soggetti verrà comunicato di informare il proprio medico o l'infermiere di studio se i flaconcini vengono persi o danneggiati per la sostituzione.

Terapie concomitanti

Sono ammessi come trattamenti concomitanti tutti quelli risultati efficaci o sperimentali per COVID-19, che conseguentemente verranno tutti registrati. Grazie alla randomizzazione non ci si attende che mediamente i trattamenti saranno diversi nei due bracci.

Attualmente, inoltre, non sono previsti trattamenti farmacologici anti SARS-COV2 ritenuti essenziali, anche se alcuni protocolli di studio (ad ex impiego di eparina bpm) vengono suggeriti e adottati nella pratica clinica.

Schedula degli eventi

Evaluation/ Procedure		Visita al basale di arruolamento Tempo 1	Telefonata (15 giorni)	Visita finale (1 mese)
Consenso informato	X			
Anamnesi, visita medica, studio/ registrazione su imaging radiologico, peso, altezza...		X		
Tampone		X		X
Raccolta feci		X		X
Raccolta sangue		X		X
Raccolta saliva		X		X
Concomitant Medications		X	X	X
Randomizzazione (se positivo al tampone)		X		
Consegna farmaco al familiare		X		
Ritiro confezione farmaco vs placebo				X
Valutazione compliance			X	X
Raccolta informazione eventi avversi			X	X
Raccolta informazioni su eventuale ricovero dovuto a infezione - esiti esami ematici e radiologici, esito tampone		X		X

Monitoraggio dello studio

I dati clinici per la baseline e ciascuna delle visite di follow-up saranno sottoposti a controlli incrociati su base regolare per coerenza, completezza e accuratezza. I passi più importanti che possono essere intrapresi per garantire uno studio di alta qualità sono lo sviluppo di un protocollo solido e gli sforzi intensi

per garantire un'adesione uniforme e rigorosa a quel protocollo. Produrremo anche rapporti sul controllo di qualità (probabilmente semestralmente).

Conservazione dei dati

Le registrazioni cliniche per tutti i partecipanti, compresi i CRF, tutta la documentazione di origine (contenente prove per studiare l'idoneità, la storia e i risultati fisici, i dati di laboratorio, i risultati delle consultazioni, ecc.), nonché le registrazioni CE e altra documentazione normativa saranno conservate dall'investigatore principale in una struttura di stoccaggio sicura per il periodo di tempo, dopo il completamento della ricerca, secondo le procedure normative italiane. I registri dovrebbero essere accessibili per l'ispezione da parte delle persone autorizzate delle autorità di regolamentazione.

Safety monitoring and reporting

a) Eventi avversi: Definizioni e segnalazioni

Un evento avverso è definito come un accadimento indesiderato, o sintomo o condizione medica che si verifica dopo che il consenso informato firmato del paziente è stato ottenuto (o il peggioramento di qualsiasi segno/i o sintomo o condizione medica preesistente). I valori di laboratorio anomali o i risultati dei test che si verificano dopo il consenso informato costituiscono eventi avversi solo se inducono segni o sintomi clinici, sono considerati clinicamente significativi, richiedono una terapia o richiedono cambiamenti nei farmaci di studio. Gli eventi avversi che iniziano o peggiorano dopo il consenso informato devono essere registrati nel modulo di segnalazione degli eventi avversi (qualsiasi decesso verrà raccolto anche attraverso il modulo AER). Le condizioni che erano già presenti al momento del consenso informato devono essere registrate nella storia medica del paziente. Il monitoraggio degli eventi avversi deve essere continuato per almeno 30 giorni (o 5 emivite, a seconda di quale tempo sia più lungo) dopo l'ultima dose di trattamento di studio. Gli eventi avversi (comprese le anomalie di laboratorio che costituiscono AEs) devono essere descritti utilizzando una diagnosi quando possibile, piuttosto che l'elenco di singoli segni e sintomi sottostanti.

Quando non è possibile identificare una diagnosi chiara, ogni segno o sintomo deve essere segnalato come un evento avverso separato. Gli eventi avversi saranno valutati e classificati in base ai Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) versione 5. Il sistema di grading da 1 a 5 sarà utilizzato per caratterizzare la gravità dell'evento avverso. Se la classificazione CTCAE non esiste per un evento

avverso, verrà utilizzata la gravità corrispondente grado 1 - lieve, grado 2- moderata, grado 3-grave, grado 4-pericolosa per la vita e grado 5- decesso.

L'insorgenza di eventi avversi dovrebbe essere rilevata durante il processo di screening, dopo la firma del consenso informato e ad ogni visita durante lo studio. Gli eventi avversi possono anche essere segnalati direttamente e volontariamente dal paziente (soggetto) durante il processo di screening o tra le visite, o attraverso l'esame fisico, attraverso test di laboratorio o altre valutazioni.

Per quanto possibile, ogni evento avverso deve essere valutato per determinare:

1. Il grado di gravità (CTCAE Grado 1-5)
2. La sua durata (date di inizio e di fine)
3. La sua relazione con il trattamento di studio (ragionevole possibilità che AE sia correlato)
4. Azione intrapresa per quanto riguarda lo studio o il trattamento sperimentale (nessuno, modifica di dose, temporaneamente sospesa, interrotta definitivamente, sconosciuta, non applicabile)
5. Se è stata somministrata una terapia concomitante
6. Esito (non risolto, risoluzione, risolto con sequela, fatale, sconosciuto).

Se l'evento peggiora, l'evento viene segnalato una seconda volta attraverso il form di segnalazione di eventi avversi riportando come data di inizio il momento del peggioramento, nel modulo deve essere scritto che si tratta di un follow-up di un precedente AER.

Solo per gli eventi avversi di grado 3 e 4, se viene determinato un miglioramento con passaggio a un grado inferiore di gravità, è necessario compilare un form di Follow-up riportando come data di inizio il momento in cui la gravità si è ridotta. Tutti gli eventi avversi devono essere trattati in modo appropriato. Se viene somministrato un farmaco concomitante o una terapia non farmacologica, questa azione deve essere registrata nel modulo di segnalazione eventi avversi. Una volta rilevato un evento avverso, deve essere seguito fino alla sua risoluzione o fino a quando non viene giudicato permanente, e la valutazione deve essere effettuata ad ogni visita (o più frequentemente, se necessario) riportando e registrando eventuali cambiamenti di gravità, cambiamenti nel grado di correlazione con il trattamento dello studio, eventuali interventi aggiuntivi resi necessari per trattare l'AE e l'esito.

La progressione di malattia da covid-19 non deve essere segnalata come un evento avverso grave, se l'oggetto del trial è la malattia stessa. Gli eventi avversi separati saranno segnalati secondo le normali linee guida utilizzate per tali eventi con una corretta attribuzione per quanto riguarda la correlazione al farmaco.

b) Anomalie nei test di laboratorio

Definizioni e reporting

Le anomalie di laboratorio che costituiscono un evento avverso di per sé (sono considerate clinicamente significative, inducono segni o sintomi clinici, richiedono una terapia concomitante o richiedono modifiche nel trattamento dello studio), devono essere registrate nel modulo di segnalazione degli eventi avversi. Quando possibile, dovrebbe essere fornita una diagnosi, piuttosto che un sintomo (ad esempio anemia invece di emoglobina bassa). Le anomalie di laboratorio che soddisfano i criteri per gli eventi avversi devono essere seguite fino a quando i parametri non sono tornati alla normalità o viene trovata una spiegazione adeguata dell'anomalia. Quando un laboratorio o un risultato del test anomalo corrisponde a un segno/sintomo di un evento avverso già segnalato, non è necessario registrare separatamente il risultato del laboratorio/test come evento aggiuntivo.

Le anomalie di laboratorio che non soddisfano la definizione di un evento avverso non devono essere segnalate come eventi avversi. Un evento di grado 3 o 4 (grave) in base al CTCAE non indica automaticamente una SAE a meno che non soddisfi la definizione di grave come definito di seguito e/o a discrezione dello sperimentatore.

c) Serious Adverse Events (SAE)

Definizione di SAE

Grave evento avverso (SAE) è definito come uno dei seguenti:

- È fatale o pericoloso per la vita
- Determina invalidità persistente o significativa
- Determina un difetto congenito/anomalia alla nascita
- È clinicamente significativo, vale a dire, definito come un evento che mette a repentaglio il paziente o può richiedere un intervento medico o chirurgico per prevenire uno dei risultati sopra elencati.
- Richiede ricovero in ospedale o il prolungamento dell'ospedalizzazione.

Si noti che il ricovero ospedaliero per i seguenti motivi non deve essere segnalato come evento avverso grave:

- trattamento di routine o monitoraggio dell'indicazione studiata, non associato ad alcun deterioramento delle condizioni (ad esempio per eseguire valutazioni relative allo studio)
- trattamento elettivo o pre-pianificato per una condizione preesistente che non è correlata all'indicazione in esame e non è peggiorata dopo la firma del consenso informato

- ricoveri per motivi sociali e/o assistenza in assenza di qualsiasi deterioramento della condizione generale del paziente

Si noti che un trattamento ambulatoriale di emergenza che non comporta il ricovero in ospedale e comporta un evento che non soddisfi nessuna delle definizioni di una SAE di cui sopra non è da considerarsi un evento avverso grave.

d) Reporting

Per garantire la sicurezza del paziente, ogni SAE, indipendentemente dalla sospetta causalità, che si verifica dopo che il paziente ha fornito il consenso informato e fino a quando il paziente ha interrotto il trattamento di studio deve essere segnalato alla Divisione di Farmacia Ospedaliero dello IEO entro 24 ore dall'apprendimento del suo verificarsi (contatto e-mail della farmacia IEO è: info.farmacovigilanza@ieo.it). Eventuali informazioni aggiuntive per il SAE, incluse le complicazioni, la progressione del SAE iniziale e gli episodi ricorrenti, devono essere segnalati come follow-up dell'episodio originale entro 24 ore dalla ricezione delle informazioni di follow-up da parte dello sperimentatore. Un SAE considerato completamente non correlato a uno segnalato in precedenza deve essere segnalato separatamente come un nuovo evento.

Eventuali SAE riscontrati dopo il periodo di follow-up definito per la valutazione della sicurezza (30 giorni) devono essere segnalate alla farmacia IEO solo se lo sperimentatore sospetta un nesso causale con il trattamento di studio. Le informazioni su tutte i SAE vengono raccolte e registrate nel modulo di segnalazione degli eventi avversi; tutte le sezioni applicabili del modulo devono essere compilate per fornire una relazione clinicamente approfondita. Lo sperimentatore deve valutare e registrare il rapporto di ciascuna SAE con ogni trattamento di studio (se c'è più di un trattamento di studio), compilare il modulo di rapporto AE in inglese e inviare il modulo compilato entro 24 ore alla farmacia IEO.

Le informazioni di follow-up vengono inviate nello stesso modo impiegato per la segnalazione del AE originale. Ogni ripetersi, complicazione o progressione dell'evento originale deve essere segnalato come follow-up di tale evento indipendentemente da quando si verifica. Le informazioni di follow-up dovrebbero descrivere se l'evento è stato risolto o continua, se e come è stato trattato, se il cieco è stato rotto o meno (se applicabile) e se il paziente ha continuato o si è ritirato dalla partecipazione allo studio.

Se il SAE non è documentato in precedenza nella brochure dello sperimentatore o nel RCP del farmaco (nuova occorrenza) e si ritiene che sia correlata al trattamento dello studio, il comitato per la sicurezza di

IEO potrebbe richiedere urgentemente ulteriori informazioni da parte dello sperimentatore per la segnalazione all'Autorità Competente. Sospettate reazioni avverse inattese (SUSAR) saranno raccolte e segnalate alle autorità competenti e ai comitati etici competenti in conformità della direttiva 2001/20/EC e secondo i requisiti normativi nazionali nei paesi partecipanti.

e) Gravidanze

Nei casi in cui si verifichi una gravidanza, per garantire la sicurezza del paziente, ogni evento deve essere segnalato alla farmacia IEO entro 24 ore dall'apprendimento del suo verificarsi. La gravidanza deve essere seguita per determinare l'esito, compresa l'interruzione spontanea o volontaria, i dettagli della nascita e la presenza o l'assenza di eventuali difetti alla nascita, anomalie congenite o complicazioni materne e/o neonatali. Il follow-up della gravidanza deve essere registrato con il medesimo form e dovrebbe includere una valutazione della possibile relazione con il trattamento dello studio di eventi indesiderati. Qualsiasi AE sperimentata durante la gravidanza deve essere riportata sul modulo di segnalazione di reazione avversa. Gli esiti della gravidanza devono essere raccolti anche in caso di esposizione al farmaco del padre. Il medico dello studio raccoglierà informazioni come l'andamento della gravidanza, l'esito della gravidanza e la salute del bambino. La raccolta di queste informazioni dovrebbe durare fino a 3 mesi dopo la nascita del bambino e, se richiesto dal Comitato di Sicurezza IEO, prolungarsi fino a quando ritenuto necessario. Il consenso a segnalare informazioni riguardanti gli esiti della gravidanza dovrebbe essere ottenuto dalla madre.

Comitato per la sicurezza dell'IEO

Il comitato di vigilanza garantirà una gestione trasparente delle informazioni sulla sicurezza attraverso le notifiche degli investigatori e raccomandando modifiche in base alle circostanze. Insieme al team della sperimentazione clinica, il comitato di vigilanza può essere coinvolto in valutazioni sul rapporto rischio / beneficio in base ai nuovi rischi evidenziati dagli SUSAR.

Considerazioni etiche e normative

Meccanismi di revisione

Prima di iniziare lo studio, il ricercatore principale deve ottenere l'approvazione scritta per condurre lo studio dal comitato etico (CE) appropriato. Eventuali successive modifiche al protocollo di studio saranno modificate e presentate alla CE dal ricercatore principale per l'approvazione CE prima di essere implementate.

Consenso informato

Prima di entrare nello studio, il paziente sarà informato degli scopi e delle procedure dello studio e delle possibili esperienze avverse. Dà il consenso volontario a partecipare allo studio. La dichiarazione di consenso verrà letta e firmata dal paziente e dall'investigatore

Tutti i candidati allo studio riceveranno una copia del consenso informato approvato dalla CE per la revisione. L'investigatore spiegherà tutti gli aspetti dello studio in linguaggio laico e risponderà a tutte le domande relative allo studio. Se il partecipante decide di partecipare allo studio, gli verrà chiesto di firmare il documento di consenso informato. I soggetti che rifiutano di partecipare o che si ritirano dallo studio saranno trattati senza pregiudizi.

Eventuali successive modifiche al consenso informato saranno reinviolate alla CE per l'approvazione prima dell'uso.

Il paziente deve essere consapevole che può ritirarsi dal trattamento in qualsiasi momento lo desidera e che, in ogni caso, lo sperimentatore fornirà loro la migliore terapia disponibile.

Aspetti normativi

Il trattamento sarà effettuato in conformità con la Dichiarazione di Helsinki / Tokyo. Lo studio sarà amministrato secondo il DL 211.

Registrazione del trial

La registrazione del processo nel database Eudract e le procedure normative fino alla conclusione del processo saranno indirizzate agli uffici regolatori del processo.

Riservatezza

Il nome del paziente verrà registrato una volta nella banca dati e sarà protetto da una password. Un numero identificativo verrà assegnato a ciascun paziente registrato al momento della randomizzazione e verrà utilizzato durante lo studio.

Responsabilità amministrativa

Il ricercatore principale sarà responsabile della revisione di tutti i CRF e della documentazione della loro revisione sui moduli di valutazione, discutendo il contenuto delle relazioni con il responsabile dei dati e lo

statistico. Saranno inoltre generalmente responsabili di rispondere a tutte le domande cliniche relative all'ammissibilità, al trattamento e alla valutazione dei pazienti.

Proprietà dei dati e politica di pubblicazione

L'Istituto europeo di oncologia ha la proprietà dei dati. I principali risultati della sperimentazione clinica saranno pubblicati in una rivista scientifica peer-reviewed

La pubblicazione finale dei risultati dello studio sarà scritta da PI, co-PI e altri collaboratori. I risultati della prova non verranno rilasciati prima che sia stata raggiunta la maturità dei dati per l'endpoint primario della prova e i risultati saranno pubblicati anche se gli endpoint primari non saranno raggiunti.

Analisi dei Biomarcatori in seguito a trattamento con Vitamina D

Analisi del processo infiammatorio

Biomarcatori sierici (Soggetti coinvolti IEO, Brescia e Monza)

Campioni di sangue intero trattato con EDTA e campioni di siero saranno raccolti due volte (al basale e alla fine dell'intervento) e conservati a -80 °C e conservati fino alla misurazione del biomarcatore. Useremo un test ad alta sensibilità multiplex Luminex (ProcartaPlex 20 plex, Thermo Fisher) che consente la quantificazione simultanea di un vasto pannello di citochine legate all'infiammazione e alla risposta immunitaria con la tecnologia MAP secondo il protocollo del produttore e come descritto in Coletta et al (JCC, 2020). I campioni verranno acquisiti su un Luminex 200SD e analizzati con il software Xponent 4.2. Le concentrazioni sieriche di 25-idrossi-vitamina D saranno analizzate mediante test immunologici a chemiluminescenza progettati per l'analizzatore di sistemi automatizzati multidisciplinare IDS-iSYS (Immunodiagnostic Systems Limited, Regno Unito).

L'emocromo completo (CBC), che viene eseguito di routine, verrà eseguito seguendo le linee guida standard. I conteggi assoluti di neutrofili e linfociti, che riflettono la risposta infiammatoria e lo stato immunitario generale dei pazienti, saranno utilizzati per ottenere la NLR.

1. collezione di tutti i campioni (entro il mese 9)
2. analisi multiplex (entro il mese 10)
3. analisi dei dati (entro il mese 11) e integrazione con gli altri dati di laboratorio e clinici

Analisi di espressione, dell'attività e delle PTM (modificazioni post-traduzionali) di ACE2 e correlazione con lo stato di virulenza dei pazienti oncologici.

Background sul recettore per SARS-CoV2

SARS-CoV2, così come altri corona virus, infetta le cellule ospiti attraverso una proteina virale chiamata S. Nel caso del virus SARS-CoV, responsabile dell'epidemia di MERS-SARS 2002-2003, la proteina S sulla superficie del virione media il riconoscimento del recettore e la seguente fusione di membrana. Durante la maturazione virale, la proteina S trimerica viene tagliata nelle subunità S1 e S2. S1 contiene il dominio RBD, che si lega direttamente ad ACE2, il recettore di entrata per il virus SARS-CoV2, mentre S2 è responsabile del processo di fusione del virus alle membrane della cellula ospite. Quando S1 si lega al recettore ACE2, viene attivato un altro sito di taglio proteolitico su S2, che è fondamentale per il successo dell'infezione virale. La proteina S di SARS-Cov2 si è dimostrato essere la stessa del virus SARS-CoV e quindi anche il virus SARS-Cov2 utilizza ACE2 per infettare l'ospite. È importante sottolineare che la vitamina D può regolare l'espressione dell'mRNA di ACE2. Nel corso degli anni è stato osservato che la proteina S, e in particolare la regione proteica coinvolta nell'interazione tra la proteina S e il recettore ACE2 sulla cellula ospite, è anche il principale bersaglio per lo sviluppo dell'immunità (acquisita o indotta dalla vaccinazione) e per lo sviluppo della resistenza alle terapie. A tale proposito è stato osservato che alcune mutazioni aminoacidiche associate allo sviluppo della resistenza, si verificano proprio in questa regione, quindi cambiando la struttura dell'epitopo e quindi la capacità di riconoscimento da parte degli anticorpi. Recentemente è stato dimostrato che questa regione è altamente glicosilata. Inoltre si è visto che gli eventi mutazionali possono cadere proprio sugli aminoacidi glicosilati, asparagine, generando un diverso stato di glicosilazione della proteina S e quindi partecipando all'evasione dalla risposta immunitaria, sia innata che adattativa. In effetti, le modifiche post-traduzionali spesso mascherano gli epitopi immunogenici della proteina S dal sistema immunitario. Questo fenomeno di evasione immunitaria mediato dallo stato di glicosilazione delle proteine virali è stato anche osservato e caratterizzato in altre glicoproteine virali, come Env dell'emoagglutina influenza (HA) e la glicoproteina del virus Lassa (LASV GPC). D'altro canto lo stesso recettore ACE2 è fortemente glicosilato, e il suo stato di glicosilazione sembra cambiare l'interazione con la proteina S. Infatti, riduzione dei suoi livelli di N-glicosilazione, come ottenuto in seguito al trattamento con cloroquina, riduce l'interazione tra ACE2-SARS-CoV inibendo l'ingresso del virus. Da notare che la vitamina D riduce significativamente l'espressione degli enzimi coinvolti nei processi di glicosilazione proteica quali OGT e GFAT, entrambi partecipanti alla via metabolica denominata via biosintetica delle esosammine, suggerendo che il trattamento con vitamina D può modificare sia il livello

di espressione di ACE2 sia il suo stato di glicosilazione e quindi ridurre l'efficienza di infezione di SARS-CoV2.

Descrizione attività

Precedenti osservazioni sperimentali hanno dimostrato una attività regolativa della vitamina D sull'espressione e l'attività del recettore ACE2. Per tale motivo, il siero, il plasma e l'espettorato dei pazienti oncologici verranno utilizzati per determinare l'espressione di ACE2 (mRNA e proteine) e la sua attività. L'espressione del messaggero di ACE2 (mRNA) verrà misurata mediante qPCR utilizzando cellule epiteliali bronchiali, provenienti dall'espettorato dei pazienti, in seguito a specifico arricchimento mediante Magnetic Activated Cell Sorting (MACS). Questa tecnica verrà applicata per escludere sia i macrofagi sia i neutrofili, presenti in maniera importante nell'espettorato. La raccolta dell'espettorato verrà eseguita come segue. Ai soggetti verrà chiesto di soffiarsi il naso, sciacquarsi la bocca e deglutire l'acqua per ridurre al minimo la contaminazione delle cellule squamose dell'apparato buccale e nasale. I campioni di espettorato verranno quindi emessi in un contenitore sterile ed elaborati entro 2 ore. I campioni saranno processati in ghiaccio in 4 volumi di 0,1% di ditiotreitolo seguiti da 4 volumi di soluzione salina tamponata con fosfato (PBS). La sospensione cellulare verrà filtrata attraverso filtri da 45 µm. Le cellule presenti nell'espettorato verranno contate e esaminati in termini di vitalità mediante conta con emocitometro e colorazione vitale con tripan blue. La contaminazione da cellule squamose orali e la percentuale di macrofagi alveolari nei campioni raccolti saranno valutate mediante vetrini ottenuti con l'uso citospin e colorazione Papanicolaou. La valutazione dei vetrini sarà effettuata dai patologi. Un campione sarà considerato adeguato se avrà più di 2×10^7 cellule, meno del 4% di cellule squamose orali e un valore $> 50\%$ di macrofagi alveolari. La strategia di selezione negativa MACS sarà applicata usando microsfele anti-CD14 (Miltenyi Biotec) per ridurre significativamente i macrofagi e microsfele anti-CD16 (Miltenyi Biotec) per rimuovere i neutrofili dai campioni di espettorato. La procedura verrà eseguita secondo le istruzioni del produttore. Il pellet cellulare, contenente cellule epiteliali bronchiali arricchite, verrà quindi risospeso in PBS e contato utilizzando un emocitometro con tripan blu. Una parte delle cellule verrà rapidamente elaborata per l'analisi dell'espressione di ACE2 (mRNA e proteina) e l'altra verrà espansa in un mezzo integrato con fattore di crescita specifici per cellule epiteliali bronchiali (BEGM, Lonza) per essere successivamente congelate.

Il siero, il plasma e le cellule epiteliali bronchiali saranno anche usati per determinare l'espressione della proteina ACE2 mediante saggio ELISA (AdipoGen o R&S Systems). Numerose evidenze sperimentali infatti indicano che la proteina ACE2 viene tagliata nel suo dominio extracellulare e quindi rilasciato come

forma solubile nei fluidi corporei, quale sangue e urina. È importante sottolineare che un taglio simile è stato osservato anche durante l'infezione da virus SARS-CoV. Infatti, la proteasi transmembranaria TMPRSS2, coinvolta nell'infezione da virus, taglia sia la proteina ACE2 sia la proteina virale chiamata S, aumentando l'efficienza dell'ingresso del virus. Un meccanismo simile è stato postulato anche per l'ingresso SARS-CoV2. Pertanto, determineremo il livello di proteina ACE2 circolante e non utilizzando il siero, il plasma dei pazienti e le cellule epiteliali bronchiali. Inoltre, utilizzando siero, plasma o cellule epiteliali bronchiali arricchite, misureremo l'attività ACE2 mediante saggio enzimatico, in quanto anche la forma solubile mantiene attività enzimatica (BioVision). Questo set di esperimenti permetterà di valutare l'effetto di Vitamina D sull'espressione e l'attivazione del recettore necessario all'ingresso del virus.

Per studiare le PTM di ACE2, utilizzeremo prima un approccio di western blot. In breve, il plasma dei pazienti, il siero o le cellule epiteliali bronchiali arricchite verranno usate per ottenere degli estratti proteici che saranno utilizzati per identificare la proteina ACE2. I campioni umani saranno anche analizzati dopo deglicosilazione usando la deglicosilasi PNGase F (New England Biolabs) e confrontati con campioni non trattati, in maniera da identificare la variazione di mobilità elettroforetica in seguito a deglicosilazione, come misura relativa dei livelli di glicosilazione presentati dalla proteina ACE2 nei diversi campioni prelevati dai pazienti. A seguito di questa analisi, verrà effettuata una determinazione più specifica delle PTM di ACE2 utilizzando sei lectine marcate con perossidasi di rafano (lectine-HRP) ottimizzate per il rilevamento di dodici diverse glicoproteine, mediante la rivelazione chemio-luminescente (Sigma-Aldrich). In breve, il siero, plasma o cellule epiteliali bronchiali arricchite provenienti dai pazienti saranno divisi in due metà, una per il test ELISA (valutazione della quantità di proteina) e l'altra per caratterizzare lo stato di N-glicosilazione del recettore ACE2. In particolare, l'analisi dello stato di glicosilazione del recettore ACE2 verrà eseguita utilizzando le stesse piastre usate per l'ELISA ma con alcune modifiche del protocollo. Infatti, il saggio per l'analisi dello stato di glicosilazione verrà eseguito utilizzando la piastra ELISA bloccate con un agente saturante specifico, alcool polivinilico. L'anticorpo anti-ACE2 immobilizzato sul test ELISA catturerà la proteina ACE2 che verrà successivamente sottoposta alle lectine-HRP, capaci di riconoscere diversi tipi di N-glicosilazioni. L'anticorpo anti-ACE2 sarà utilizzato sia nella forma glicosilata (come preparato dal produttore) sia nella forma de-glicosilata, in quanto la sua glicosilazione potrebbe interferire con l'analisi dello stato di glicosilazione del recettore ACE2. In alternativa utilizzeremo anche un anticorpo diverso capace di riconoscere la regione più carbossilica del dominio extracellulare della proteina ACE2 (Anticorpo ACE2, E-11, Santa Cruz, epitopo che va da un 631 a 805), in maniera da ridurre l'effetto mascherante dell'anticorpo verso le glicosilazioni. Come controllo, utilizzeremo cellule che

esprimono il recettore ACE2 (HaCaT, HepG2) trattate con inibitori del N-glicosilazioni (tunicamicina, swainsonina) o inibitori metabolici (cioè inibitori del metabolismo del glucosio e della glutammina), al fine di definire in modo prospettico se la glicosilazione di ACE2 possa dipendere dallo stato metabolico delle cellule ospiti e quindi dei pazienti. Questi esperimenti consentiranno la correlazione tra lo stato di glicosilazione di ACE2 e la virulenza dei pazienti.

Microbioma

I patogeni respiratori, la sindrome respiratoria acuta grave (SARS) e i suoi coronavirus fratelli, spesso causano sintomi enterici. Allo stesso modo, anche altri virus classicamente non enterici, come l'HIV e l'influenza, hanno effetti enterici che sono cruciali nella loro patogenesi. Questi effetti possono essere dovuti all'infezione diretta della mucosa intestinale, ma possono anche essere dovuti a una riduzione delle difese antibatteriche, all'aumento della permeabilità della mucosa, alla traslocazione batterica e alla perdita sistemica di endotossina.

Microbiota intestinale

Il microbiota commensale include i batteri necessari per lo sviluppo del sistema immunitario e per prevenire l'adesione e la colonizzazione di agenti patogeni e parassiti batterici. Ancora oggi le interazioni tra microbiota commensale e virus non sono chiare. A tale proposito è stato suggerito che il microbiota potrebbe conferire protezione contro l'infezione virale innescando la risposta immunitaria. Inoltre è stato osservato che alcune specie batteriche sono necessarie per aumentare la risposta antivirale. D'altra parte, il microbiota potrebbe anche promuovere l'evasione immunitaria di alcuni virus, mediante meccanismi diretti e indiretti, ad esempio agevolando l'espansione virale attraverso LPS e polisaccaridi di superficie ai virus, per innescare percorsi immunosoppressivi. L'integrità del microbiota commensale può essere disturbata dall'invasione dei virus, causando disbiosi nell'ospite e influenzando ulteriormente l'infettività del virus.

Un'indagine esplorativa preliminare ha fornito prove a sostegno della presenza di tracce genomiche di SARS-CoV-2 nel viroma fecale dei cinesi asintomatici, i cui campioni biologici sono stati raccolti prima di aprile 2019. Al contrario, nessun SARS-CoV-2 è stato rilevato nel viromi fecali da cittadini dell'UE, con campioni fecali datati 2013 e 2019. Questi risultati supportano l'ipotesi della presenza di un antenato comune più recente di SARS-CoV-2 nella popolazione umana prima dello scoppio dell'attuale pandemia, possibilmente in uno stato inattivo e in forma non virulenta, con importanti implicazioni per la diffusione e il trattamento del virus. L'infezione da SARS-CoV2 può anche portare a sintomi addominali atipici, come

l'infezione virale del tratto gastrointestinale che provoca un'alterazione della microflora batterica, che potrebbe anche essa influenzare il decorso clinico dei pazienti.

Descrizione attività

Per le analisi del microbiota raccoglieremo campioni fecali. Il materiale fecale verrà raccolto a casa nelle provette sterili di raccolta OMNIgene GUT OMR-200 (DNA Genotek) con codice a barre. Questi tubi di raccolta saranno distribuiti ai partecipanti allo studio e consentiranno una facile raccolta del materiale che sarà rapidamente omogeneizzato e stabilizzato nel punto di raccolta. Il DNA sarà stabile a temperatura ambiente per 60 giorni, consentendo la spedizione a temperatura ambiente. Il codice a barre garantirà la tracciabilità dei campioni. Il DNA sarà di alta qualità, consentendo la profilazione metagenomica di 16S e Shotgun.

Il DNA genomico microbico sarà estratto usando il kit DNeasy PowerSoil Pro (Qiagen) secondo le istruzioni del produttore. Le regioni ipervariabili selezionate del gene 16S rRNA, che costituiscono marcatori genetici di specie affidabili (codici a barre) nei batteri, saranno inizialmente sequenziate usando la piattaforma MiSeq (Illumina), applicando la strategia amplicon per la preparazione delle biblioteche e successivamente da WGS sulla piattaforma HiSeq.

Il sequenziamento verrà effettuato presso il campus IEO che ci fornirà i dati di sequenziamento (previsti almeno 8 GB di letture/analisi finali accoppiate) come descritto in Burrello et al (Cells, 2019). L'approccio metagenomico basato su ampliconi rappresenta in realtà una delle migliori strategie per ottenere una valutazione su larga scala del contenuto tassonomico di campioni complessi con elevate prestazioni nella risoluzione e identificazione delle specie. La gestione dell'enorme quantità delle sequenze metagenomiche prodotte dalla piattaforma Illumina e la successiva caratterizzazione tassonomica della comunità procariotica residente nei campioni analizzati saranno eseguite utilizzando una pipeline bioinformatica modulare BioMas (analisi bioinformatica degli ampliconi metagenomici). Verrà inoltre effettuata l'analisi Shotgun di frammenti casuali di DNA. Inoltre, verrà eseguita un'analisi statistica sui dati tassonomici al fine di identificare un microbioma centrale correlato al trattamento ospite selezionato e/o alla malattia specifica. Infine, verrà studiata una correlazione tra la variazione della popolazione di microbiota luminale e i cambiamenti della via metabolica dell'ospite.

Risultati attesi finali del progetto:

Definire il ruolo della integrazione di vitamina D nei pazienti oncologici con positività per COVID-19 e senza sintomi/segni dall'infezione che richiedano ricovero ospedaliero. Ci attendiamo nel gruppo

randomizzato a trattamento un incremento della competenza immunitaria che possa ridurre il rischio di complicanze. Studieremo la variabilità del fenomeno individuando i fattori prognostici e i biomarcatori che ci permettono di identificare i soggetti a prognosi peggiore, indipendentemente dai fattori di confondimento. Capiremo l'impatto dei trattamenti oncologici e dei trattamenti per malattie concomitanti sulla prognosi dei pazienti con tumore.

Questi obiettivi secondari sono fondamentali in un'ottica di medicina personalizzata.

Descrizione degli impatti sul SSR e della trasferibilità

Da una recente comunicazione pubblicata da medici che lavorano all'ospedale Giovanni XXIII di Bergamo, uno degli istituti maggiormente provati dalla diffusione di COVID-19, abbiamo imparato che gli ospedali e le cliniche private che accolgono pazienti anziani hanno una maggior probabilità di diventare a loro volta focolai di infezione, popolati da pazienti infetti che a loro volta infettano altri pazienti, lavoratori, familiari e visitatori. Diventa quindi cruciale da un lato la protezione e monitoraggio del personale sanitario che assiste i malati COVID-19, dall'altro anche l'allontanamento dall'ambiente ospedaliero del maggior numero di pazienti, meno gravi, che possono essere assistiti a domicilio, come puntualizzato dagli stessi autori della comunicazione.

L'obiettivo di questo trial è quello di ridurre il tasso di ospedalizzazione di pazienti meno gravi alla diagnosi, migliorando le loro capacità di risposta immunologica e riducendo quindi la percentuale di ricoveri a causa dell'infezione COVID-19. Questo potrà avere un impatto a livello di Sistema Sanitario Nazionale, perché limiterebbe la diffusione del virus in ambito ospedaliero e ridurrebbe inoltre il carico di lavoro di operatori sanitari. Sarebbe anche una soluzione utile per i piccoli centri che in fase acuta si avvicinano al "collasso" per assenza di posti letto e necessitano quindi di bloccare interventi e cure necessarie anche per altre patologie, esasperando le situazioni di disagio sociale.

Risponderebbe infine alla necessità di proteggere una categoria di pazienti fragili, i malati oncologici, che potrebbero beneficiare di un miglioramento della risposta immunitaria a COVID-19 con conseguenze meno gravi e tempi di guarigione ridotti.

Expertise del gruppo di ricerca e adeguatezza del partenariato

L'Istituto europeo di oncologia (IEO) è un centro oncologico comprensivo, che integra pienamente le diverse attività coinvolte nella lotta contro il cancro: prevenzione e diagnosi, educazione e formazione

sanitaria, ricerca e trattamento. Gli studi proposti sottolineano la continua collaborazione tra scienziati e clinici, facilitata anche dalla stretta connessione tra il nostro dipartimento di ricerca e l'ospedale IEO.

www.ieo.it

I membri dell'Unità di Epidemiologia molecolare e farmacologica del dipartimento di Oncologia Sperimentale (IEO) sono riconosciuti tra gli esperti nel settore. L'unità è composta da cinque ricercatori, con esperienza in biostatistica, bioinformatica, biologia computazionale ed epidemiologia. Siamo coinvolti in numerosi progetti caratterizzati da dati OMIC (microbioma, espressione genica e radiomica). Offriamo una consulenza costante in una vasta gamma di settori, tra cui la progettazione statistica di esperimenti e studi clinici, lo sviluppo di protocolli, l'analisi dei dati e l'interpretazione dei risultati. Sara Gandini è la capogruppo dell'unità ed è consulente di un comitato etico esterno (Multimedica), membro del comitato direttivo dell'EORTC e presidente del sottogruppo di Epidemiologia. È coautrice di oltre 200 pubblicazioni su riviste oncologiche di peer review, di cui oltre 70 pubblicazioni come primo o ultimo nome o come autore corrispondente. H-index 58 (google scholar), 49 (Web of Science).

<http://www.semm.it/content/sara-gandini>

https://www.researchgate.net/profile/Sara_Gandini

Il Campus IEO include esperti in studi sul microbiota in modelli clinici e preclinici, il nostro team include microbiologi, virologi e biologi molecolari. Collaboriamo anche con ricercatori con esperienza documentata in fenotipizzazione immunitaria, immunologia tumorale, esaurimento delle cellule T e immunoterapia in diversi tipi di cancro, compresi i modelli preclinici.

L'unità di Genomica è responsabile del sequenziamento del Dpt. di Experimental Oncology presso IEO ed è dotata di: un sistema automatizzato per la costruzione di biblioteche (Biomek FX Beckman Coulter); piattaforme di controllo qualità come TapeStation 4200 (Agilent Technologies, CA), Caliper GX (LifeSciences) e Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, CA); diversi sequencer Illumina come NovaSeq 6000, Illumina HiSeq 2000 e Miseq. Questa impostazione abilita i protocolli di sequenziamento che vanno dal Whole Genome Sequencing, al DNA mirato, al RNA Sequencing, alle applicazioni di regolazione (ChIP-Seq, Methylation Analysis) e Metagenomic (16S, 18S, sequenziamento del fucile). Inoltre, l'unità fornisce diversi profili a cella singola basati sul sistema 10X Genomics Chromium.

La piattaforma Luminex® xMAP™ è disponibile presso Dpt. di oncologia sperimentale, IEO. È in grado di analizzare e riportare fino a 100 reazioni diverse in un singolo pozzetto. Il rilevamento rapido, sensibile, economico, ad alto rendimento e simultaneo di fattori solubili offre l'opportunità di interrogare la complessità delle reti biologiche in un saggio di dimensioni standard.

Il Dipartimento di Biotecnologie e Bioscienze dell'università di Milano Bicocca è un Dipartimento multidisciplinare che ospita diversi gruppi dedicati alle "scienze molecolari". L'istituzione ospitante è ben attrezzata ed è adatta per raggiungere gli obiettivi e la corretta esecuzione di questa proposta, in quanto il dipartimento presenta diverse strumentazioni per un'analisi biochimica e cellulare, necessarie alla realizzazione del progetto. Inoltre, il vasto numero di altre attrezzature, di cui alcune elencate di seguito, permetteranno, in caso si rendessero necessari, ulteriori approcci per realizzare gli scopi del progetto. Quindi parte del progetto sarà realizzato nel dipartimento in cui sono disponibili le seguenti strutture: Orbitrap Fusion™ Tribrid™ accoppiato con EASY-nLC 1000 UHPLC o Nanospray Flex™ Ion Source per infusione diretta; TSQ Quantum™ Access MAX accoppiato a UltiMate 3000 UHPLC; 6550 iFunnel QTOF LCMS e HPLC 1290; NMR; Citofluorimetri a flusso; diversi microscopi a fluorescenza (confocale), Microscopio a scansione elettronico Zeiss Gemini 500; Microscopio elettronico a trasmissione Jeol 2100 Plus; microscopio confocale Nikon A1R, lettore multilabel a piastra (luminometro, fluorimetro); Operetta CLS; Sistema Biacore X-100. Il dipartimento è dotato di una stanza BSL2 per la manipolazione di campioni di pazienti come estratti di cellule. Altre manipolazioni verranno eseguite nella sala BSL3 di Campus IEO. Il Dipartimento partecipa a due infrastrutture di ricerca (spettrometria e microscopia) condivise con altri dipartimenti.

Per ulteriori informazioni: <https://www.btbs.unimib.it/it>

Ferdinando Chiaradonna (co-PI) è professore di Biochimica e di Biochimica dei Tumori, ha conoscenze biochimiche e oncologiche fondamentali per questo progetto multidisciplinare. Inoltre negli ultimi 5 anni ha sviluppato un forte interesse nei meccanismi regolatori dei processi di glicosilazione cellulare, sviluppando e applicando diverse tecniche per la loro visualizzazione, modificazione e inibizione. Inoltre ha ampia conoscenza delle vie metaboliche intracellulari coinvolte nella regolazione dei processi di glicosilazione. Ferdinando Chiaradonna ha lavorato in passato sui meccanismi attivati dalla vitamina D3 a livello intracellulare, quali trascrizione, differenziamento e motilità cellulare.

Paolo Bossi è Professore associato in oncologia medica e oncologo di Brescia. È coinvolto in tutte le attività di ricerca istituzionale sul cancro, dalla ricerca traslazionale (espressione genica, generazione successiva) sequenziamento) alla valutazione della qualità della vita e della medicina basata sul valore. È ricercatore principale e co-investigatore di numerosi protocolli italiani e internazionali. Ha ricevuto n. 5 borse di studio dopo l'applicazione a bandi europei e nazionali per svolgere ricerche cliniche e traslazionali. Al momento, è PI di 15 studi clinici. Autore di 18 capitoli di libri e n. 135 pubblicazioni indicizzate in Pubmed, H-Index Scopus= 28. Spedali Civili di Brescia è caratterizzato da membri del team

multidisciplinare: radiologi, chirurghi, patologi, oncologi medici, radioterapisti e infermieri specializzati in ricerca clinica, nonché delle facilities per la gestione di studi clinici multicentrici

A causa dell'elevato numero di pazienti COVID-19 nell'area, questo ospedale ha più unità speciali COVID-9 con tutte le attrezzature e le risorse necessarie.

<http://www.asst-spedalicivili.it/>

L'esperienza del Centro in quanto a sperimentazioni cliniche è testimoniata dal numero di studi clinici attivi (circa 120) in ambito oncologico, di cui il 20% come promotore. Aderisce a gruppi di ricerca su diverse patologie oncologiche ed è centro riconosciuto da ESMO come Supportive e Palliative care expert.

ASST H S Gerardo Monza SC Oncologia Medica presenta una forte tradizione improntata sulla ricerca clinica indipendente e sponsorizzata con all'attivo più di 80 studi clinici di differente Fase. Da circa 2 anni presenta anche una Unità di Fase 1 e collabora alla ricerca traslazionale con partnership dell'Università Milano Bicocca.

Sono presenti gruppi multidisciplinari per la patologia oncologica per i maggiori big killers e presenta tutte le strutture per poter svolgere studi clinici ad ogni livello.

Dopo Brescia e Bergamo ASST H S Gerardo Monza ha ricevuto il più alto numero di pazienti COVID-19 positivi ricoverati ed ha strutturato percorsi efficaci per questa tipologia di pazienti.

La presenza di tutte le figure mediche specifiche rendono questo ospedale idoneo a reclutare pazienti descritti nello studio clinico

<https://www.asst-monza.it/en/home>

Bibliografia

- Liang W, Guan W, Chen R, Wang W, Li J, Xu K, Li C, Ai Q, Lu W, Liang H, Li S, He J. Cancer patients in SARS-CoV-2 infection: a nationwide analysis in China. Lancet Oncol. 2020 Mar;21(3):335-337.
- Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, Zhang L, Fan G, Xu J, Gu X, Cheng Z, Yu T, Xia J, Wei Y, Wu W, Xie X, Yin W, Li H, Liu M, Xiao Y, Gao H, Guo L, Xie J, Wang G, Jiang R, Gao Z, Jin Q, Wang J, Cao B. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. Lancet. 2020 Feb 15;395(10223):497-506
- Mithal A, Wahl DA, Bonjour JP, et al. Global vitamin D status and determinants of hypovitaminosis D. Osteoporosis Int. 2009;20:1807-1820.

- Liang et al Cancer patients in SARS-CoV-2 infection: a nationwide analysis in China. *The Lancet oncology* 2020
- Ginde A, Liu MC, Camargo Jr CA. Demographic differences and trends of vitamin D insufficiency in the US population, 1988-2004. *Arch Intern Med.* 2009;169:626-32.
- Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med.* 2007;357:266-281.
- Manson JE, Cook NR, Lee IM, et al; VITAL Research Group. Vitamin D Supplements and Prevention of Cancer and Cardiovascular Disease. *N Engl J Med.* 2019 Jan 3;380(1):33-44.
- Akiba T, Morikawa T, Odaka M, et al. Vitamin D Supplementation and Survival of Patients with Non-small Cell Lung Cancer: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Clin Cancer Res.* 2018 Sep 1;24(17):4089-4097.)
- Keum N, Lee DH, Greenwood DC, et al. Vitamin D supplementation and total cancer incidence and mortality: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Ann Oncol.* 2019 May 1;30(5):733-743.
- Beard JA, Bearden A, Striker R. Vitamin D and the anti-viral state. *J Clin Virol.* 2011;50(3):194–200.
- Borella E, Nesher G, Israeli E, Shoenfeld Y. Vitamin D: a new anti-infective agent? *Ann N Y Acad Sci.* 2014 May;1317:76-83. doi: 10.1111/nyas.12321. Epub 2014 Mar 4. PubMed PMID: 24593793.
- Sabetta JR, DePetrillo P, Cipriani RJ, Smardin J, Burns LA, Landry ML. Serum 25-hydroxyvitamin d and the incidence of acute viral respiratory tract infections in healthy adults. *PLoS One.* 2010
- Martineau AR, Jolliffe DA, Hooper RL, Greenberg L, Aloia JF, Bergman P, Dubnov-Raz G, Esposito S, Ganmaa D, Ginde AA, Goodall EC, Grant CC, Griffiths CJ, Janssens W, Laaksi I, Manaseki-Holland S, Mauger D, Murdoch DR, Neale R, Rees JR, Simpson S Jr, Stelmach I, Kumar GT, Urashima M, Camargo CA Jr. Vitamin D supplementation to prevent acute respiratory tract infections: systematic review and meta-analysis of individual participant data. *BMJ.* 2017 Feb 15;356:i6583.
- Autier P, Gandini S. Vitamin D supplementation and total mortality: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Intern Med.* 2007 Sep 10;167(16):1730-7.
- Zittermann A, Iodice S, Pilz S, Grant WB, Bagnardi V, Gandini S. Vitamin D deficiency and mortality risk in the general population: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Am J Clin Nutr.* 2012 Jan;95(1):91-100.

- Guerrieri-Gonzaga A, Gandini S. Vitamin D and overall mortality. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2013 Jan;26(1):16-28.
- Pilz S, Kienreich K, Tomaschitz A, Ritz E, Lerchbaum E, Obermayer-Pietsch B, Matzi V, Lindenmann J, März W, Gandini S, Dekker JM. Vitamin D and cancer mortality: systematic review of prospective epidemiological studies. *Anticancer Agents Med Chem.* 2013 Jan;13(1):107-17.
- Lazzeroni M, Serrano D, Pilz S, Gandini S. Vitamin D supplementation and cancer: review of randomized controlled trials. *Anticancer Agents Med Chem.* 2013 Jan;13(1):118-25.
- Raimondi S, Johansson H, Gandini S. RE: Prognostic Value of 25-hydroxyvitamin D3 Levels at Diagnosis and During Follow-up in Melanoma Patients. *J Natl Cancer Inst.* 2016 Apr;
- Tagliabue E, Raimondi S, Gandini S. Meta-analysis of vitamin D-binding protein and cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2015 Nov;24(11):1758-65.
- Tagliabue E, Raimondi S, Gandini S. Vitamin D, Cancer Risk, and Mortality. *Adv Food Nutr Res.* 2015;75:1-52.
- Serrano D, Gnagnarella P, Raimondi S, Gandini S. Meta-analysis on vitamin D receptor and cancer risk: focus on the role of TaqI, ApaI, and Cdx2 polymorphisms. *Eur J Cancer Prev.* 2016 Jan;25(1):85-96.
- Gnagnarella P, Pasquali E, Serrano D, Raimondi S, Disalvatore D, Gandini S. Vitamin D receptor polymorphism FokI and cancer risk: a comprehensive meta-analysis. *Carcinogenesis.* 2014 Sep;35(9):1913-9.
- Pilz S, Kienreich K, Tomaschitz A, Ritz E, Lerchbaum E, Obermayer-Pietsch B, Matzi V, Lindenmann J, März W, Gandini S, Dekker JM. Vitamin D and cancer mortality: systematic review of prospective epidemiological studies. *Anticancer Agents Med Chem.* 2013 Jan;13(1):107-17.
- Autier P, Gandini S, Mullie P. A systematic review: influence of vitamin D supplementation on serum 25-hydroxyvitamin D concentration. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012 Aug;97(8):2606-13.
- Narang NK, Gupta RC, Jain MK, Aaronson K. Role of vitamin D in pulmonary tuberculosis. *J Assoc Physicians India* 1984;32:185–6.
- Openshaw PJ. Crossing barriers: infections of the lung and the gut. *Mucosal Immunol.* 2009 Mar;2(2):100-2.
- Domínguez-Díaz C, García-Orozco A, Riera-Leal A, Padilla-Arellano JR, Fafutis-Morris M. Microbiota and Its Role on Viral Evasion: Is It With Us or Against Us? *Front Cell Infect Microbiol.* 2019 Jul 18;9:256.

- Li N, Ma WT, Pang M, Fan QL, Hua JL. The Commensal Microbiota and Viral Infection: A Comprehensive Review. *Front Immunol.* 2019 Jul 4;10:1551.
- Rampelli, Simone and Biagi, Elena and Turrone, Silvia and Candela, Marco, Retrospective Search for SARS-CoV-2 in Human Faecal Metagenomes (March 19, 2020). Available at SSRN: <https://ssrn.com/abstract=3557962> or <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.3557962>
- Sabetta JR, DePetrillo P, Cipriani RJ, Smardin J, Burns LA, Landry ML. Serum 25-hydroxyvitamin d and the incidence of acute viral respiratory tract infections in healthy adults. *PLoS One.* 2010
- Thomas AM, Manghi P, Asnicar F, Pasolli E, Armanini F, Zolfo M, Beghini F, Manara S, Karcher N, Pozzi C, Gandini S, Serrano D, Tarallo S, Francavilla A, Gallo G, Trompetto M, Ferrero G, Mizutani S, Shiroma H, Shiba S, Shibata T, Yachida S, Yamada T, Wirbel J, Schrotz-King P, Ulrich CM, Brenner H, Arumugam M, Bork P, Zeller G, Cordero F, Dias-Neto E, Setubal JC, Tett A, Pardini B, Rescigno M, Waldron L, Naccarati A, Segata N. Metagenomic analysis of colorectal cancer datasets identifies cross-cohort microbial diagnostic signatures and a link with choline degradation. *Nat Med.* 2019 Apr;25(4):667-678.
- Wirbel J, Pyl PT, Kartal E, Zych K, Kashani A, Milanese A, Fleck JS, Voigt AY, Palleja A, Ponnudurai R, Sunagawa S, Coelho LP, Schrotz-King P, Vogtmann E, Habermann N, Niméus E, Thomas AM, Manghi P, Gandini S, Serrano D, Mizutani S, Shiroma H, Shiba S, Shibata T, Yachida S, Yamada T, Waldron L, Naccarati A, Segata N, Sinha R, Ulrich CM, Brenner H, Arumugam M, Bork P, Zeller G. Meta-analysis of fecal metagenomes reveals global microbial signatures that are specific for colorectal cancer. *Nat Med.* 2019 Apr;25(4):679-689.
- Coletta M, Paroni M, Alvisi MF, De Luca M, Rulli E, Mazza S, Facciotti F, Lattanzi G, Strati F, Abrignani S, Fantini MC, Vecchi M, Geginat J, Caprioli F. Immunological variables associated with clinical and endoscopic response to vedolizumab in patients with inflammatory bowel diseases. *J Crohns Colitis.* 2020 Feb 26.
- Burrello C, Giuffrè MR, Macandog AD, Diaz-Basabe A, Cribiù FM, Lopez G, Borgo F, Nezi L, Caprioli F, Vecchi M, Facciotti F. “Fecal Microbiota Transplantation Controls Murine Chronic Intestinal Inflammation by Modulating Immune Cell Functions and Gut Microbiota Composition”. *Cells.* 2019 May 28;8(6).
- The novel coronavirus 2019 (2019-nCoV) uses the SARS-coronavirus receptor ACE2 and the cellular protease TMPRSS2 for entry into target cells. Markus Hoffmann, Hannah Kleine-Weber,

Nadine Krüger, Marcel Müller, Christian Drosten, Stefan Pöhlmann. bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2020.01.31.929042>

- Deducing the N-and O-glycosylation profile of the spike protein of novel coronavirus SARS-CoV-2. Asif Shajahan, Nitin T. Supekar, Anne S.Gleinich, and Parastoo Azadi. bioRxiv preprint <https://doi.org/10.1101/2020.04.01.020966>
- Inhibition of SARS-CoV-2 infections in engineered human tissues using clinical-grade soluble human ACE2. Vanessa Monteil, Hyesoo Kwon, Patricia Prado, Astrid Hagelkruys, Reiner A. Wimmer, Martin Stahl, Alexandra Leopoldi, Elena Garreta, Carmen Hurtado del Pozo, Felipe Prosper, J.P. Romero, Gerald Wirnsberger, Haibo Zhang, Arthur S. Slutsky, Ryan Conder, Nuria Montserrat, Ali Mirazim, Josef M. Penninger. https://www.cell.com/pb-assets/products/coronavirus/CELL_CELL-D-20-00739.pdf
- Vitamin D supplementation alters the expression of genes associated with hypertension and did not induce DNA damage in rats. Carla Da Silva Machado, Alexandre Ferro Aissa, Diego Luis Ribeiro & Lusânia Maria Greggi Antunes. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 2019.
- The Modulatory Action of Vitamin D on the Renin–Angiotensin System and the Determination of Hepatic Insulin Resistance. Po Sing Leung. *Molecules*, 2019, 24(13), 2479.
- Vitamin D downregulates key genes of diabetes complications in cardiomyocyte. Derakhshanian H, Djazayery A, Javanbakht MH, Eshraghian MR, Mirshafiey A, Jahanabadi S, Ghadbeigi S, Zarei M, Alvandi E, Djalali M. *J Cell Physiol*. 2019 Nov;234(11):21352-21358. Magnetic Enrichment of Bronchial Epithelial Cells From Sputum for Lung Cancer Diagnosis. Qi Qiu , Nevins W Todd, Ruiyun Li, Hong Peng, Zhenqiu Liu, Harris G Yfantis, Ruth L Katz, Sanford A Stass, Feng Jiang. *Cancer*, 2008, 114 (4), 275-83.
- Weihua Yuan, Wei Pan, Juan Kong, Wei Zheng, Frances L Szeto, Kari E Wong, Ronald Cohen, Anna Klopot, Zhongyi Zhang, Yan Chun Li. (2007). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Suppresses Renin Gene Transcription by Blocking the Activity of the Cyclic AMP Response Element in the Renin Gene Promoter. *J. Biol. Chem.* 282. 29821-30.
- Ebadi M, Montano-Loza AJ. (2020). Perspective: improving vitamin D status in the management of COVID-19. *Eur J Clin Nutr.* 74(6):856-859. -Adams, D. J., Head, G. A., Markus, M. A., Lovicu, F. J., van der Weyden, L., Kontgen, F., Arends, M. J., Thiru, S., Mayorov, D. N., and Morris, B. J. (2006). Renin enhancer is critical for control of renin gene expression and cardiovascular function *J. Biol. Chem.* 281, 31753–31761.

- Alroy, I., Towers, T. L., and Freedman, L. P. (1995). Transcriptional repression of the interleukin-2 gene by vitamin D3: direct inhibition of NFATp/AP-1 complex formation by a nuclear hormone receptor. *Mol. Cell. Biol.* 15, 5789–5799.
- 1. Towers, T. L., and Freedman, L. P. (1998). Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor Gene Transcription Is Directly Repressed by the Vitamin D3 Receptor. IMPLICATIONS FOR ALLOSTERIC INFLUENCES ON NUCLEAR RECEPTOR STRUCTURE AND FUNCTION BY A DNA ELEMENT. *J. Biol. Chem.* 273, 10338–10348.
- Nishishita, T., Okazaki, T., Ishikawa, T., Igarashi, T., Hata, K., Ogata, E., and Fujita, T. (1998). A Negative Vitamin D Response DNA Element in the Human Parathyroid Hormone-related Peptide Gene Binds to Vitamin D Receptor Along with Ku Antigen to Mediate Negative Gene Regulation by Vitamin D. *J. Biol. Chem.* 273, 10901–10909
- T.C. Hanff, M.O. Harhay, T.S. Brown, J.B. Cohen, A.M. Mohareb. (2020). Is there an association between COVID-19 mortality and the renin-angiotensin system-a call for epidemiologic investigations. *Clinical Infectious Diseases*, Volume 71, Issue 15, 1 August 2020, Pages 870–874.
- -Aygun H. Vitamin D can prevent COVID-19 infection-induced multiple organ damage. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2020;393(7):1157-1160. doi:10.1007/s00210-020-01911-4
- -Nurshad Ali Role of vitamin D in preventing of COVID-19 infection, progression and severity. *Journal of Infection and Public Health.* 20 June 2020
- -Covid-19, carenza di vitamina D e perdita dell'olfatto e del gusto: https://www.iss.it/news/-/asset_publisher/gJ3hFqMQsykM/content/covid-19-carenza-di-vitamina-d-e-perdita-dell-olfatto-e-del-gusto
- -Reply to Jakovac: About COVID-19 and vitamin D. Angelo Facchiano, Antonio Facchiano, Manuela Bartoli, Alberto Ricci, and Francesco Facchiano. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2020 318:6, E838-E838
- Jakovac H. COVID-19 and vitamin D-Is there a link and an opportunity for intervention?. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2020;318(5):E589.
- -Ghavideldarestani, M.; Honardoost, M.; Khamseh, M.E. Role of Vitamin D in Pathogenesis and Severity of COVID-19 Infection. *Preprints* 2020.
- -Ebadi, Maryam & Montano-Loza, Aldo. (2020). Perspective: improving vitamin D status in the management of COVID-19. *European Journal of Clinical Nutrition.*

- -Han JE, Jones JL, Tangpricha V, et al. High Dose Vitamin D Administration in Ventilated Intensive Care Unit Patients: A Pilot Double Blind Randomized Controlled Trial. *J Clin Transl Endocrinol.* 2016;4:59-65. Smith, E.M., Jones, J.L., Han, J.E., Alvarez, J.A., Sloan, J.H., Konrad, R.J., Zughaier, S.M., Martin, G.S., Ziegler,
- -T.R. and Tangpricha, V. (2018), High-Dose Vitamin D3 Administration Is Associated With Increases in Hemoglobin Concentrations in Mechanically Ventilated Critically Ill Adults: A Pilot Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 42: 87-94.
- -Controversial Effects of vitamin D and related genes on viral infections, pathogenesis, and treatment outcomes. *Nutrients* 2020;12:962).
- -Lanham-New SA, Webb AR, Cashman KD, et al Vitamin D and SARS-CoV-2 virus/COVID-19 disease *BMJ Nutrition, Prevention & Health* 2020;3
- -Martineau, A.R.; Jolliffe, D.A.; Hooper, R.L.; Greenberg, L.; Aloia, J.F.; Bergman, P.; Dubnov-Raz, G.; Esposito, S.; Ganmaa, D.; Ginde, A.A.; et al. Vitamin D supplementation to prevent acute respiratory tract infections: Systematic review and meta-analysis of individual participant data. *BMJ* 2017;356, i6583.
- -Jones, B.G.; Oshansky, C.M.; Bajracharya, R.; Tang, L.; Sun, Y.; Wong, S.S.; Webby, R.; Thomas, P.G.; Hurwitz, J.L. Retinol binding protein and vitamin D associations with serum antibody isotypes, serum influenza virus-specific neutralizing activities and airway cytokine profiles. *Clin. Exp. Immunol.* 2016,183,239–247
- -Evidence Supports a Causal Role for Vitamin D Status in COVID-19 Outcomes. Gareth Davies, Attila R Garami, Joanna C Byers medRxiv 2020.05.01.2008796 WHO R&D Blueprint novel Coronavirus COVID-19 Therapeutic Trial Synopsis. World Health Organization 2020
- -S.A. Adegoke, O.S. Smith, A.D. Adekile, M.S. Figueiredo, Relationship between serum 25-hydroxyvitamin D and inflammatory cytokines in paediatric sickle cell disease, *Cytokine.* 96 (2017) 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.03.010>. M. Olszowiec-Chlebna, A. Koniarek--Maniecka, A. Brzozowska, A. Błaż, B. Rychlik, I. Stelmach, Vitamin D inhibits pro-inflammatory cytokines in the airways of cystic fibrosis patients infected by *Pseudomonas aeruginosa*- pilot study, *Ital. J. Pediatr.* 45 (2019) 41. <https://doi.org/10.1186/s13052-019-0634-x>

- -F. Azizieh, K.O. Alyahya, R. Raghupathy, Association between levels of vitamin D and inflammatory markers in healthy women, *J. Inflamm. Res.* 9 (2016) 51–57. <https://doi.org/10.2147/JIR.S103298>
- -Lagunas-Rangel, F.A. (2020), Neutrophil-to-lymphocyte ratio and lymphocyte-to-C-reactive protein ratio in patients with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19): A meta-analysis. *J Med Virol.*
- -Feng X, Li S, Sun Q, et al. Immune-Inflammatory Parameters in COVID-19 Cases: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Med (Lausanne)*. 2020;7:301. Published 2020 Jun 9.
- -Gandini, S., Ferrucci, P.F., Botteri, E., Tosti, G., Barberis, M., Pala, L., Battaglia, A., Clerici, A., Spadola, G., Cocorocchio, E. and Martinoli, C. (2016), Prognostic significance of hematological profiles in melanoma patients. *Int. J. Cancer*, 139: 1618-1625.
- -Guillot X, Semerano L, Saidenberg-Kermanac'h N, et al. Vitamin D and inflammation. *Joint Bone Spine* 2010;77:552–7.)
- -Gombart AF. The vitamin D-antimicrobial peptide pathway and its role in protection against infection. *Future Microbiol.* 2009;4(9):1151-1165. doi:10.2217/fmb.09.87 -Daneshkhah A, Agrawal V, Eshein A, et al. The Possible Role of Vitamin D in Suppressing Cytokine Storm and Associated Mortality in COVID-19 Patients. *medRxiv*; 2020.
- -Reinhold Vieth, Vitamin D supplementation, 25-hydroxyvitamin D concentrations, and safety, *The American Journal of Clinical Nutrition*, Volume 69, Issue 5, May 1999, Pages 842–8
- -Rhodes, JM, Subramanian, S, Laird, E, Griffin, G, Kenny, RA (Institute of Translational Medicine, University of Liverpool, Liverpool, UK; Trinity College Dublin, Dublin, Ireland; St George's, University of London, London, UK; Mercers Institute for Ageing, St James Hospital, Dublin 8, Ireland). Perspective: Vitamin D deficiency and COVID-19 severity – plausibly linked by latitude, ethnicity, impacts on cytokines, ACE2 and thrombosis. *J Intern Med*, 2020
- -Ebadi M, Montano-Loza AJ. Perspective: improving vitamin D status in the management of COVID-19. *Eur J Clin Nutr.* 2020;74(6):856-859.

- -Kimball SM, Mirhosseini N, Holick MF. Evaluation of vitamin D3 intakes up to 15,000 international units/day and serum 25-hydroxyvitamin D concentrations up to 300 nmol/L on calcium metabolism in a community setting. *Dermatoendocrinol.* 2017;9: e1300213
- Martineau AR, Nazer AM, Satkunam KR, Packer GE, Rainbow SJ, Maunsell ZJ, et al. Influence of a single oral dose of vitamin D(2) on serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in tuberculosis-patients. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2009;13:119–25
- Kimball SM, Mirhosseini N, Holick MF. Evaluation of vitamin D3 intakes up to 15,000 international units/day and serum 25-hydroxyvitamin D concentrations up to 300 nmol/L on calcium metabolism in a community setting. *Dermato endocrinol.* 2017