



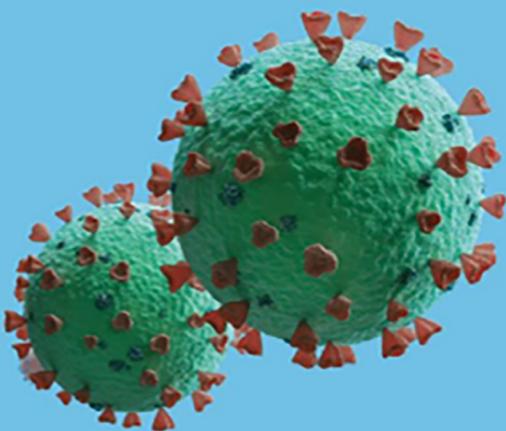
FEDERAZIONE
RINASCIMENTO
ITALIA

rinascimentoitalia.it

VACCINO COVID-19: LE PIATTAFORME VACCINALI TRADIZIONALI - PARTE 1

DR.SSA LORETTA BOLGAN

Dottore in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche
Dottorato in Scienze Farmaceutiche
Consulente Scientifico



IL VACCINO COVID-19

Il lavoro che si presenterà di seguito è l'aggiornamento e l'approfondimento tecnico delle piattaforme vaccinali sviluppate per la prevenzione della COVID-19, ad integrazione del primo ebook "COVID-19: il vaccino che verrà" divulgato nel mese di maggio 2019.

Nonostante siano state acquisite molte conoscenze sul meccanismo del danno causato dal SARS-Cov-2, sulle patologie multiorgano della COVID-19 e sulle terapie efficaci, molti sono ancora gli interrogativi senza risposta, e i dubbi e le criticità sollevate con preoccupazione dalla comunità scientifica riguardo l'impiego su larga scala di vaccini e farmaci sperimentali in tempi troppo rapidi, rimangono sostanzialmente irrisolti.

Lo scopo di questo lavoro è quello di fornire una panoramica delle piattaforme vaccinali, il più completa possibile (senza avere però la pretesa di essere esauriente) a fini divulgativi, suddivisa in tre aree:

- **Parte Prima:** le piattaforme tradizionali (vaccini a virus attenuati, inattivati, a proteine ricombinanti e a nanoparticelle) e gli adiuvanti vaccinali, con approfondimenti sulla genetica dei virus, la risposta del sistema immunitario ai vaccini e la nanotossicologia
- **Parte Seconda:** le piattaforme innovative (vaccini OGM a vettori virali e a DNA/RNA) con l'approfondimento dei risultati sperimentali dei due vaccini attualmente in commercio con tecnologia a mRNA (vaccino "Pfizer" e "Moderna") in particolare riguardo le criticità sulla qualità, l'efficacia, e la sicurezza di questa nuova tipologia di vaccini, nonché l'aggiornamento sul vaccino a vettore adenovirale, già revisionato nel primo ebook
- **Parte Terza:** l'iter di registrazione accelerata, condizionale, e d'emergenza, le linee guida sui farmaci OGM e sulle nanotecnologie applicate ai vaccini COVID-19, con un approfondimento sulle linee guida per la loro produzione industriale (coltura, isolamento, purificazione del virus vaccinale, e controlli qualità richiesti dalle autorità competenti dove disponibili)

VACCINO COVID-19: LE PIATTAFORME VACCINALI TRADIZIONALI

SOMMARIO

INTRODUZIONE.....	3
APPROFONDIMENTO: I VIRUS.....	4
definizione e origine dei virus	6
Classificazione dei virus.....	13
Ricombinazione e riassortimento	16
Ciclo litico e ciclo lisogeno.....	18
LA PRODUZIONE DEI VACCINI	24
linee cellulari utilizzate per la crescita dei virus vaccinali	24
le piattaforme dei vaccini covid-19.....	41
il ciclo vitale del sars-cov-2	41
tipi di antigeni vaccinali.....	44
VACCINI A VIRUS ATTENUATI	52
APPROFONDIMENTO: LA GENETICA INVERSA	53
APPROFONDIMENTO: LA REVERSIONE GENETICA	59
Integrazione degli RNA non retrovirali nel DNA genomico.....	63
Interazione dei virus a RNA con il microbiota intestinale	65
Comportamento simile ai batteriofagi di SARS-COV-2	67
VACCINI A VIRUS INATTIVATI	73
VACCINI A SUBUNITÀ PROTEICHE	83
APPROFONDIMENTO: L'INTERAZIONE ANTIGENE-ANTICORPO.....	84
immunodominanza.....	84
Immunogenicità e immunotolleranza: il paradigma dell'idrofobicità	87
Immunotolleranza, autoimmunità e l'olobionte	99
Veicoli per il trasporto degli antigeni vaccinali.....	109
VACCINI A PARTICELLE SIMIL-VIRALI (VLP).....	113
VACCINI A NANOPARTICELLE	128
APPROFONDIMENTO: NANOTOSSICOLOGIA	133
Nanoparticelle e cellule	145
La nanotossicologia dell'alluminio adiuvante	149
Il significato ambientale delle nanoparticelle naturali	160
ADIUVANTI VACCINALI.....	168
La risposta immunitaria al vaccino	168
Idrossido di alluminio (allume)	174
adiuvanti basati su emulsioni olio in acqua	177
Adiuvanti a base di agonisti TLR	181
Aspetti regolatori per l'autorizzazione di nuovi adiuvanti	188
Tossicologia degli adiuvanti.....	188

INTRODUZIONE

Lo sviluppo dei vaccini contro il SARS-Cov-2 è giunto alla conclusione di un obiettivo importante per l'industria farmaceutica con l'autorizzazione all'immissione in commercio nel mese di dicembre 2020, del farmaco BNT162b2, coniato con il nome commerciale COMIRNATY, prodotto dalla ditta Pfizer-BioNTech.

Si tratta infatti del primo farmaco con tecnologia OGM, ed in particolare a mRNA ad uso preventivo contro l'agente che causa la COVID-19, ad essere autorizzato dalle agenzie regolatorie FDA ed EMA.

L'importanza è dovuta al fatto che la tecnologia a mRNA è molto versatile, ed insieme a quella dei vettori adenovirali, già approfonditi nell'ebook precedente, apre la strada all'applicazione preventiva e terapeutica dei farmaci OGM, considerati dai ricercatori industriali tra gli strumenti più innovativi della medicina di precisione.¹

La pandemia da coronavirus è stata oggetto di uno studio senza precedenti da parte dei ricercatori scientifici accademici e industriali per comprendere i meccanismi del danno causato dal SARS-Cov-2, l'agente causale della COVID-19, e ha visto la corsa alla sperimentazione di nuovi farmaci e nuovi vaccini da parte di numerose aziende del mondo biotech.

Al 30 dicembre 2020, sono ben **289** i vaccini candidati di cui **66** in fase clinica².

Al 28 dicembre 2020 l'iniziativa "Covid-19 - living NMA" ha raccolto 2358 studi di trattamenti dall'ICTRP (International Clinical Trials Registry Platform), di cui 1317 stanno reclutando pazienti.³

L'FDA sta attualmente revisionando con procedura accelerata oltre 390 studi clinici per trattamenti terapeutici contro la COVID-19, 8 trattamenti sono stati autorizzati per uso d'emergenza e 1 ha ricevuto l'autorizzazione all'immissione in commercio (remdesivir).⁴ L'EMA ha in corso di valutazione 47 farmaci sperimentali e 23 vaccini.⁵

Se da un lato il mondo della ricerca industriale ha salutato con grande entusiasmo l'obiettivo raggiunto in maniera molto efficiente e rapida della commercializzazione del nuovo prototipo di vaccino OGM⁶, dall'altro

¹ Ball P.

The lightning-fast quest for COVID vaccines - and what it means for other diseases.
Nature. 2021 Jan;589(7840):16-18. doi: 10.1038/d41586-020-03626-1. PMID: 33340018.
<https://www.nature.com/articles/d41586-020-03626-1>

² https://vac-lshtm.shinyapps.io/ncov_vaccine_landscape/ (30.12.2020)

<https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>

³ COVID-NMA è un'iniziativa di ricerca internazionale supportata dall'OMS e dal Cochrane.

<https://www.who.int/publications/i/item/covid-19-landscape-of-experimental-treatments>
<https://www.covid-nma.com/dataviz/>

Boutron I, Chaimani A, Meerpohl JJ, et al.
The COVID-NMA Project: Building an Evidence Ecosystem for the COVID-19 Pandemic.
Ann Intern Med. 2020;173(12):1015-1017. doi:10.7326/M20-5261
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7518109/>

⁴ <https://www.fda.gov/drugs/coronavirus-covid-19-drugs/coronavirus-treatment-acceleration-program-ctap#dashboard>

⁵ <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/public-health-threats/coronavirus-disease-covid-19/treatments-vaccines-covid-19#medicines-undergoing-evaluation-section>

⁶ <https://www.pfizer.com/news/press-release/press-release-detail/pfizer-and-biontech-announce-vaccine-candidate-against>

<https://www.livescience.com/mrna-vaccines-future-vaccine-development.html>
<https://news.un.org/en/story/2020/12/1079322>

si è assistito ad una crescente diffidenza ed esitazione vaccinale ⁷ che si sta opponendo alla vaccinazione di massa e alle molteplici strategie di imposizione illegittime, che violano palesemente tutte le dichiarazioni internazionali di diritto alla libera scelta e i diritti sanciti dalla costituzione, ⁸ senza dall'altra parte essere in grado di garantire il raggiungimento dell'obiettivo della strategia di contenimento e di vaccinazione, cioè di bloccare la trasmissione del contagio.⁹

APPROFONDIMENTO: I VIRUS

È stato stimato che ci siano 10^{31} - 10^{32} virus nell'atmosfera terrestre, un ordine di grandezza superiore al numero delle cellule del nostro corpo. Di conseguenza, ogni organismo del pianeta e probabilmente ogni cellula vivente interagisce costantemente con i virus, responsabili della massima pressione selettiva per l'evoluzione di tutte le specie viventi.

Nonostante le loro piccole dimensioni, i virus svolgono un ruolo importante come parassiti intracellulari obbligati, modulando l'attività delle loro cellule ospiti con lo scopo di replicarsi e inducendo effetti negativi sia per le cellule infettate che per l'intero organismo.

L'enfasi principale della virologia è focalizzata sull'identificazione e il controllo dei virus patogeni che invadono gli esseri umani, gli animali domestici e le piante, tuttavia l'origine, e l'organizzazione dei virus, e la loro evoluzione sono questioni profonde e fondamentali per la virologia molecolare.

Inoltre, il sequenziamento dei genomi eucariotici ha rivelato che il 5-10% del loro DNA è costituito da geni codificanti e si ritiene che una grande frazione del resto sia composta da elementi mobili simili a retrovirus (retro-trasposoni), che potrebbero aver svolto un ruolo considerevole nella formazione di questi genomi complessi.

Elementi trasponibili in procarioti ed eucarioti
Complessità genomica e variabilità genetica - Il ruolo dei trasposoni
Struttura cromosomi ed elementi trasponibili

Retrovirus e retrotrasposoni

⁷ Lazarus JV, Ratzan SC, Palayew A, et al.

A global survey of potential acceptance of a COVID-19 vaccine [published online ahead of print, 2020 Oct 20]. Nat Med. 2020;1-4. doi:10.1038/s41591-020-1124-9 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7573523/>

<https://www.socialscienceinaction.org/resources/rapid-review-vaccine-hesitancy-and-building-confidence-in-covid-19-vaccination/>
https://opendocs.ids.ac.uk/opendocs/bitstream/handle/20.500.12413/15794/SSHAP%20Rapid%20Review_Vaccine%20Hesitancy%20and%20Building%20Confidence%20in%20COVID-19%20Vaccination%20.pdf?sequence=4&isAllowed=y

<https://www.euronews.com/2020/10/16/coronavirus-only-around-1-3-of-french-respondents-would-take-covid-19-vaccine-euronews-pol>

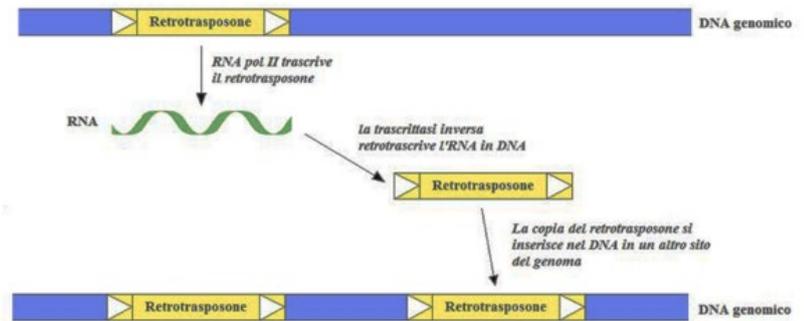
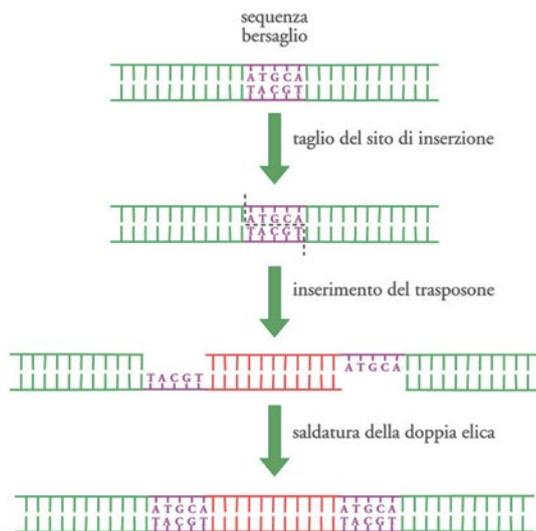
⁸ Acosta, Juana I.,

Vaccines, Informed Consent, Effective Remedy and Integral Reparation: an International Human Rights Perspective, 131 Vniversitas , 19-64 (2015). <http://dx.doi.org/10.11144/Javeriana.vj131.vier>
<http://www.scielo.org.co/pdf/vniv/n131/n131a02.pdf>

<http://www.assembly.coe.int/LifeRay/JUR/Pdf/TextesProvisoires/2020/20200702-CovidImpact-EN.pdf>

⁹ Bleier BS, Ramanathan M Jr, Lane AP.

COVID-19 Vaccines May Not Prevent Nasal SARS-CoV-2 Infection and Asymptomatic Transmission. Otolaryngol Head Neck Surg. 2020 Dec 15:194599820982633. doi: 10.1177/0194599820982633. Epub ahead of print. PMID: 33320052. <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/0194599820982633>



<https://www.chimica-online.it/biologia/trasposoni.htm>
trasposizione dei trasposoni taglia e cuci

Meccanismo di trasposizione dei retrotrasposoni

I genomi batterici non hanno questo materiale genetico extra, ma i genomi di alcuni batteriofagi hanno una stretta somiglianza con i plasmidi batterici nella loro struttura e nel modo in cui si replicano, rivelando che la relazione tra virus e altri organismi viventi è forse più complessa di quanto si pensava in precedenza.¹⁰

Infine, è importante osservare che lo studio della metagenomica mediante le nuove tecniche di sequenziamento¹¹ sta permettendo di approfondire le conoscenze sul virobiota e la sua funzione fondamentale per la capacità adattativa e l'evoluzione dei batteri e degli organismi superiori.¹²

Il concetto di evoluzione dell'ologenoma postula che l'olobionte (ospite + simbiotici) con il suo ologenoma (genoma ospite + microbioma) sia un livello di selezione in evoluzione. Gli organismi multicellulari non possono più essere considerati individui secondo la definizione classica del termine, ma ogni animale e pianta naturale è un olobionte costituito dall'ospite e da diversi microbi e virus simbiotici.

Un gran numero di studi ha dimostrato che questi simbiotici contribuiscono all'anatomia, alla fisiologia, allo sviluppo, all'immunità innata e adattativa, al comportamento e infine anche alla variazione genetica, all'origine e all'evoluzione delle specie.¹³

¹⁰ Chaitanya KV. Structure and Organization of Virus Genomes. Genome and Genomics. 2019;1-30. Published 2019 Nov 18. doi:10.1007/978-981-15-0702-1_1 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7119911/pdf/978-981-15-0702-1_Chapter_1.pdf

¹¹ Khan Mirzaei M, Xue J, Costa R, Ru J, Schulz S, Taranu ZE, Deng L. Challenges of Studying the Human Virome - Relevant Emerging Technologies. Trends Microbiol. 2020 Jul 1:S0966-842X(20)30162-1. doi: 10.1016/j.tim.2020.05.021. <https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0966-842X%2820%2930162-1>

¹² Maurício Teixeira Lima, et al. Virus and microbiota relationships in humans and other mammals: An evolutionary view, Human Microbiome Journal, Volume 11, 2019, 100050, <https://doi.org/10.1016/j.humic.2018.11.001>. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2452231718300356>

Pradeu T. Mutualistic viruses and the heteronomy of life. Stud Hist Philos Biol Biomed Sci. 2016;59:80-88. doi:10.1016/j.shpsc.2016.02.007 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7108282/>

¹³ Rosenberg E, Zilber-Rosenberg I. Microbes Drive Evolution of Animals and Plants: the Hologenome Concept. mBio. 2016;7(2):e01395. Published 2016 Mar 31. doi:10.1128/mBio.01395-15 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4817260/>

Le relazioni simbiotiche comprendono diversi stili di vita, tra cui quello **antagonista** (o patogeno, lo stile di vita più ben studiato per i virus), **commensale** (probabilmente lo stile di vita più comune) e **mutualistico** (importanti partner benefici).

Sebbene si pensi che le relazioni antagonistiche portino alla coevoluzione, questo non è sempre chiaro nelle interazioni virus-ospite e gli impatti sull'evoluzione possono essere complessi. Il commensalismo implica un ruolo di autostop solo per il viaggio per gli elementi egoisti dei virus. Le relazioni mutualistiche invece sono state descritte in dettaglio nell'ultimo decennio e rivelano quanto siano importanti i virus quando si considera l'ecologia dell'ospite.

In definitiva, la simbiosi può portare alla **simbiogenesi**, o speciazione attraverso la fusione, e la presenza di grandi quantità di sequenze virali nei genomi di qualsiasi cellula vivente, dai batteri all'uomo, compresi alcuni importanti geni funzionali¹⁴, illustra il significato della simbiogenesi virale nell'evoluzione di tutta la vita sulla terra.¹⁵

DEFINIZIONE E ORIGINE DEI VIRUS

La definizione dei virus è sorprendentemente controversa.¹⁶

Ciò è in gran parte dovuto alla natura del ciclo di riproduzione del virus apparentemente divisa in due fasi distinte:

- una fase intracellulare durante la quale il virus riprogramma la cellula infetta per produrre particelle virali o virioni (particella virale che può essere purificata e visualizzata. Il nucleo di un virione comprende l'acido nucleico del virus (DNA o RNA) racchiuso all'interno di un guscio proteico chiamato capsid),
- una fase extracellulare: fase durante la quale i virioni sfuggono alle cellule infette e persistono nell'ambiente esterno (simile ai semi delle piante)

Entrambi gli stadi, se considerati separatamente, forniscono visioni notevolmente contrastanti sulla natura e sui ruoli dei virus.

García-López R, Pérez-Brocá V, Moya A.
Beyond cells - The virome in the human holobiont.
Microb Cell. 2019;6(9):373-396. Published 2019 Jul 1. doi:10.15698/mic2019.09.689
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6717880/>

¹⁴ <https://www.sciencefocus.com/the-human-body/virus-human-evolution/>

¹⁵ Roossinck MJ, Bazán ER.
Symbiosis: Viruses as Intimate Partners.
Annu Rev Virol. 2017 Sep 29;4(1):123-139. doi: 10.1146/annurev-virology-110615-042323. Epub 2017 Aug 8.
https://www.researchgate.net/publication/318999587_Symbiosis_Viruses_as_Intimate_Partners

Moelling K, Broecker F.
Viruses and Evolution - Viruses First? A Personal Perspective.
Front Microbiol. 2019;10:523. Published 2019 Mar 19. doi:10.3389/fmicb.2019.00523
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6433886/>

¹⁶ Nasir A, Romero-Severson E, Claverie JM.
Investigating the Concept and Origin of Viruses.
Trends Microbiol. 2020;28(12):959-967. doi:10.1016/j.tim.2020.08.003
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7609044/>

Forterre P.
Defining life: the virus viewpoint.
Orig Life Evol Biosph. 2010;40(2):151-160. doi:10.1007/s11084-010-9194-1
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2837877/>

Kanduc D.
The comparative biochemistry of viruses and humans: an evolutionary path towards autoimmunity.
Biol Chem. 2019 Apr 24;400(5):629-638. doi: 10.1515/hsz-2018-0271. PMID: 30504522.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30504522/>

Ad esempio, i virioni sono particelle infettive metabolicamente inerti che non soddisfano nessuno dei criteri che possiamo utilizzare per definire la "vita" o gli organismi viventi.¹⁷

Dal punto di vista biologico sono state date queste recenti definizioni:

Un **organismo vivente** può essere definito come: "un insieme di organi integrati (apparati/strutture molecolari) che producono individui che evolvono attraverso la selezione naturale"¹⁸

La **vita** può essere definita come un sistema di auto-mantenimento chimico lontano dall'equilibrio in grado di elaborare, trasformare e accumulare informazioni acquisite dall'ambiente.¹⁹

Tuttavia, poiché i virioni possono essere purificati, contati e visualizzati al microscopio, le loro proprietà fisiche e biochimiche (p. es., dimensioni, forma, capacità metaboliche, capside) insieme alla specificità dell'ospite/del tessuto, sono diventate popolari nella descrizione, illustrazione e denominazione di virus (ad esempio, virus dell'immunodeficienza umana o del SARS-Cov-2). Questi, a loro volta, hanno modellato le nostre percezioni sui virus come oggetti biologici inanimati non viventi che sono, paradossalmente, contagiosi.

Trattare i virioni come virus è un errore concettuale che trascura i drammatici cambiamenti che i virus introducono all'interno delle cellule infette.²⁰

Una cellula infettata da virus può essere efficacemente trasformata in un "punto caldo" per la produzione di virioni e può praticamente perdere la sua identità (cioè, ora produce virioni piuttosto che due cellule figlie)²¹.

In alcune infezioni virali, sono chiaramente visibili grandi "fabbriche di virioni" simili a cellule (viro-cellule). Questa notevole trasformazione è dovuta alla manipolazione mediata dal virus e all'alterazione del metabolismo e delle difese dell'ospite²².

La fase intracellulare implica quindi una sostanziale attività virale ed è spesso l'obiettivo di farmaci antivirali per combattere l'infezione (ad esempio, antivirali che prendono di mira le polimerasi del virus).

¹⁷ Forterre P.

Defining life: the virus viewpoint.
Orig Life Evol Biosph. 2010;40(2):151-160. doi:10.1007/s11084-010-9194-1
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2837877/>

¹⁸ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2837877/>

¹⁹ Vitas M, Dobovišek A.

Towards a General Definition of Life.
Orig Life Evol Biosph. 2019 Jun;49(1-2):77-88. doi: 10.1007/s11084-019-09578-5. Epub 2019 Jun 20.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31222432/>

²⁰ Forterre P.

To be or not to be alive: How recent discoveries challenge the traditional definitions of viruses and life.
Stud Hist Philos Biol Biomed Sci. 2016 Oct;59:100-8. doi: 10.1016/j.shpsc.2016.02.013. Epub 2016 Mar 18. PMID: 26996409.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26996409/>

²¹ Sakaguchi DS.

Genetic Manipulation and Selection of Mouse Mesenchymal Stem Cells for Delivery of Therapeutic Factors In Vivo.
Methods Mol Biol. 2019;1940:143-155. doi: 10.1007/978-1-4939-9086-3_10. PMID: 30788823.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7609044/>

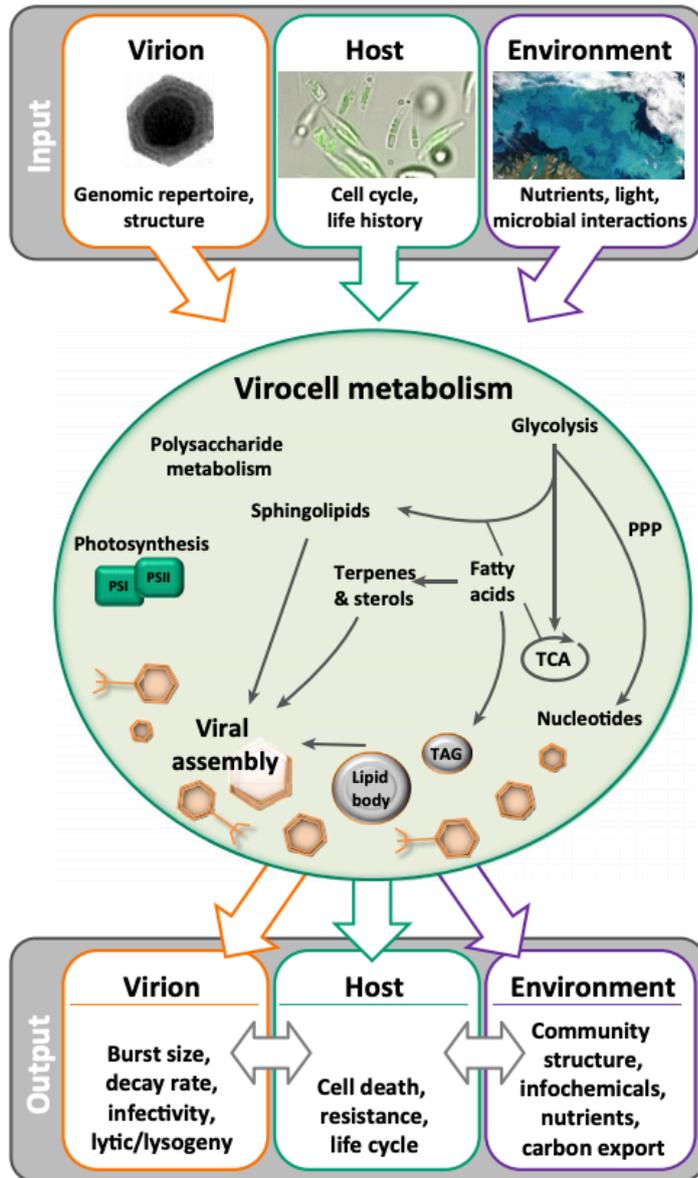
²² Moniruzzaman M, Martinez-Gutierrez CA, Weinheimer AR, Aylward FO.

Dynamic genome evolution and complex virocell metabolism of globally-distributed giant viruses.
Nat Commun. 2020;11(1):1710. Published 2020 Apr 6. doi:10.1038/s41467-020-15507-2
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7136201/>

Rosenwasser S, Ziv C, Creveld SGV, Vardi A.

Virocell Metabolism: Metabolic Innovations During Host-Virus Interactions in the Ocean. Trends Microbiol. 2016 Oct;24(10):821-832. doi: 10.1016/j.tim.2016.06.006. Epub 2016 Jul 6.
[https://www.cell.com/trends/microbiology/comments/S0966-842X\(16\)30069-5](https://www.cell.com/trends/microbiology/comments/S0966-842X(16)30069-5)

Nonostante il suo immenso ruolo nello stabilire l'infezione da virus e l'esistenza all'interno delle cellule infette, la fabbrica di virioni è stata purtroppo definita come fase di "eclissi" o "vegetativa" per indicare la mancanza di segni distintivi di infezione da virus (ad es, placche di lisi e rottura delle cellule) e ignorata nelle definizioni e descrizioni dei virus.



[https://www.cell.com/trends/microbiology/comments/S0966-842X\(16\)30069-5](https://www.cell.com/trends/microbiology/comments/S0966-842X(16)30069-5)

Il metabolismo della viro-cellula è uno stato metabolico unico indotto dall'infezione virale.

L'infezione virale induce un notevole spostamento metabolico in varie vie metaboliche dell'ospite come la fotosintesi, la glicolisi, il metabolismo degli acidi grassi e la biosintesi dei nucleotidi.

Il metabolismo della viro-cellula è determinato dalla rete metabolica dell'ospite, dal repertorio di geni virali e da fattori ambientali dinamici.

Il metabolismo della viro-cellula può influenzare in modo sostanziale le caratteristiche virali come la dimensione del burst e l'infettività, il ciclo di vita dell'ospite e il destino delle cellule.

Inoltre, il metabolismo della viro-cellula determina la composizione chimica e microbica dell'ambiente circostante.

Come suggerito da Jean-Michel Claverie, la fabbrica di virioni rappresenta meglio il "sé del virus" e i virioni sono semplicemente mezzi per diffondere informazioni genetiche in modo molto simile ai gameti umani e ai semi delle piante ²³.

In altre parole, dovremmo discostarci dall'uso consolidato della parola "virus" come sinonimo di "virione". Il termine "virus" dovrebbe riferirsi al processo che comprende tutte le fasi del ciclo di infezione da virus ²⁴.

In questo contesto, mettere in discussione l'origine dei "virus" assume un significato completamente diverso e molto più ampio rispetto al semplice interrogarsi sull'origine delle particelle virali. ²⁵

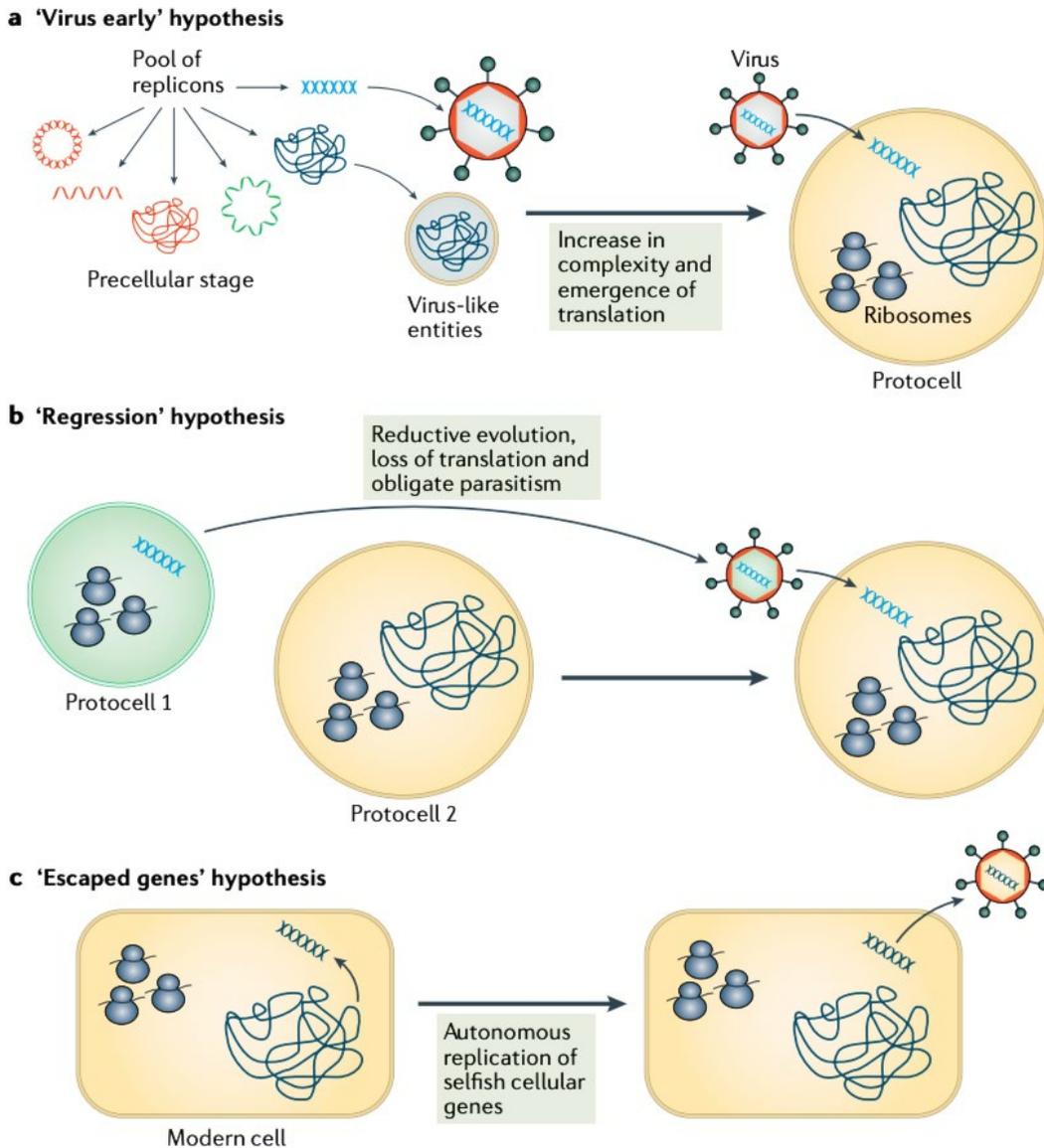
²³ Claverie JM. Viruses take center stage in cellular evolution. *Genome Biol.* 2006;7(6):110. doi:10.1186/gb-2006-7-6-110 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1779534/>

²⁴ Dupré J, Guttinger S. Viruses as living processes. *Stud Hist Philos Biol Biomed Sci.* 2016 Oct;59:109-16. doi: 10.1016/j.shpsc.2016.02.010. Epub 2016 Mar 16. PMID: 26994935. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26994935/>

²⁵ Forterre P.

Teorie dell'origine dei virus e delle cellule eucariote

Tradizionalmente, sono stati considerati tre scenari per l'origine dei virus: discendenza da elementi genetici primordiali pre-cellulari, evoluzione riduttiva da antenati cellulari e fuga di geni da ospiti cellulari, i quali cercano di spiegare il raggiungimento di parziale autonomia replicativa e di elementi genetici parassiti.



<https://www.nature.com/articles/s41579-019-0205-6>

I tre scenari principali per l'origine dei virus.

a | L'ipotesi del "virus precoce" presume che i virus si siano evoluti dai primi elementi replicativi che hanno preceduto le prime forme di vita cellulare.

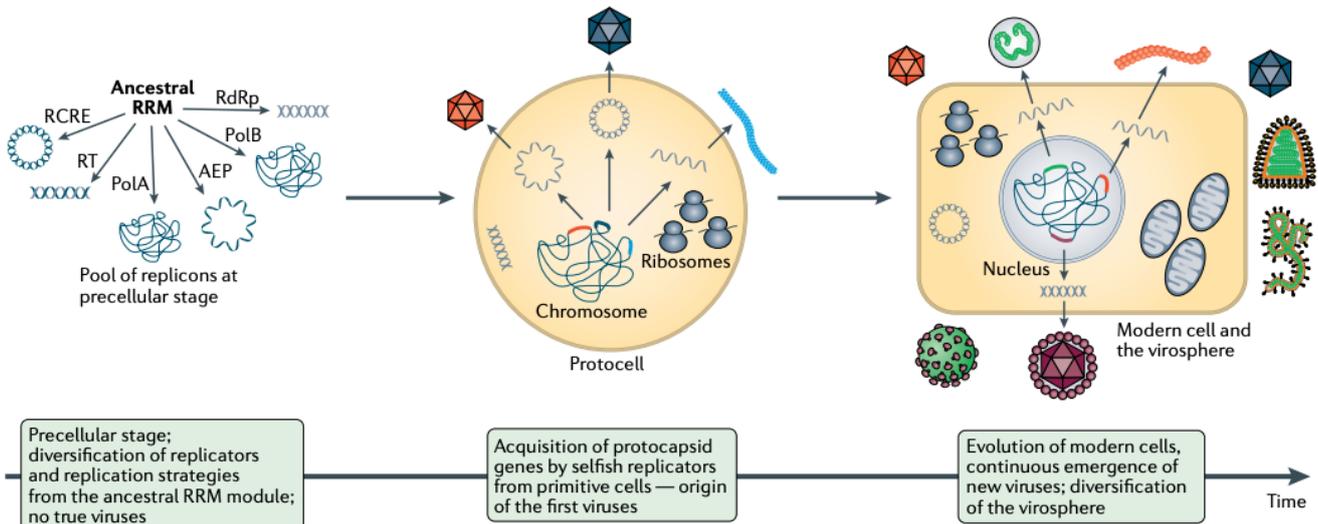
b | L'ipotesi di "regressione" suggerisce che i virus siano emersi attraverso la degenerazione di cellule che poi hanno assunto uno stile di vita parassitario.

c | Infine, l'ipotesi dei "geni sfuggiti" propone che i geni cellulari abbiano acquisito la capacità di replicazione e diffusione "egoistica"

The two ages of the RNA world, and the transition to the DNA world: a story of viruses and cells. Biochimie. 2005 Sep-Oct;87(9-10):793-803. doi: 10.1016/j.biochi.2005.03.015. Epub 2005 Apr 12. PMID: 16164990. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16164990/>

Questi scenari classici danno linee temporali differenti per l'origine dei virus e non spiegano la provenienza dei due moduli funzionali chiave che sono responsabili, rispettivamente, della replicazione del genoma virale e della morfogenesi del virione.

Recentemente è stata proposta dal gruppo di Krupovic et al un nuovo modello "chimerico" dell'origine dei virus che implica un processo a due fasi in cui emergono replicatori egoisti prima della comparsa delle prime forme di vita cellulare e successivamente la cattura di geni della proteina del capsido dagli organismi cellulari, che consente loro di formare i virioni. L'evoluzione continua e l'adozione di geni cellulari contribuisce a un'ulteriore diversificazione della virosfera.²⁶



<https://www.nature.com/articles/s41579-019-0205-6>

Lo scenario chimerico per l'origine dei virus

AEP, primasi archeo-eucariotica; PolB, DNA polimerasi della famiglia B; RCRE, endonucleasi di replicazione a cerchio rotante; RdRp, RNA polimerasi RNA dipendente; RRM, motivo di riconoscimento dell'RNA; RT, trascrittasi inversa.

I virus che infettano le cellule dei tre domini della vita, Archaea, Bacteria ed Eukarya, condividono caratteristiche omologhe, suggerendo che i virus sono comparsi molto presto nell'evoluzione della vita. La maggior parte degli evoluzionisti concorda nel considerare che il nostro attuale mondo RNA/DNA/proteine ha avuto origine da un mondo più semplice in cui l'RNA ha svolto sia il ruolo di catalizzatore che di materiale genetico.

Recenti scoperte di studi strutturali e genomica comparativa consentono ora di ottenere un quadro più chiaro di questa transizione e suggeriscono che l'evoluzione sia avvenuta in diversi passaggi, dapprima da un RNA a un mondo di RNA/proteine (che definisce due età del mondo di RNA) e infine al mondo attuale basato sul DNA.

Il mondo stesso del DNA probabilmente ha avuto origine in due fasi, prima il mondo U-DNA, in seguito alla comparsa della ribonucleotide reduttasi, e successivamente il mondo T-DNA, con la comparsa indipendente di almeno due timidilato sintasi.

Recentemente, diversi autori hanno suggerito che l'evoluzione dal mondo dell'RNA fino al Last Universal Cellular Ancestor (LUCA) potrebbe essersi verificata prima della comparsa delle cellule.²⁷

Le analisi della condivisione dei peptidi tra cinque virus umani comuni (virus della malattia di Borna, virus dell'influenza A, virus del morbillo, virus della parotite e virus della rosolia) e il proteoma umano

²⁶ Krupovic, M., Dolja, V.V. & Koonin, E.V.

Origin of viruses: primordial replicators recruiting capsids from hosts.

Nat Rev Microbiol 17, 449–458 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0205-6>

<https://www.nature.com/articles/s41579-019-0205-6>

²⁷ Forterre P.

The origin of viruses and their possible roles in major evolutionary transitions.

Virus Res. 2006 Apr;117(1):5-16. doi: 10.1016/j.virusres.2006.01.010. Epub 2006 Feb 14.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16476498/>

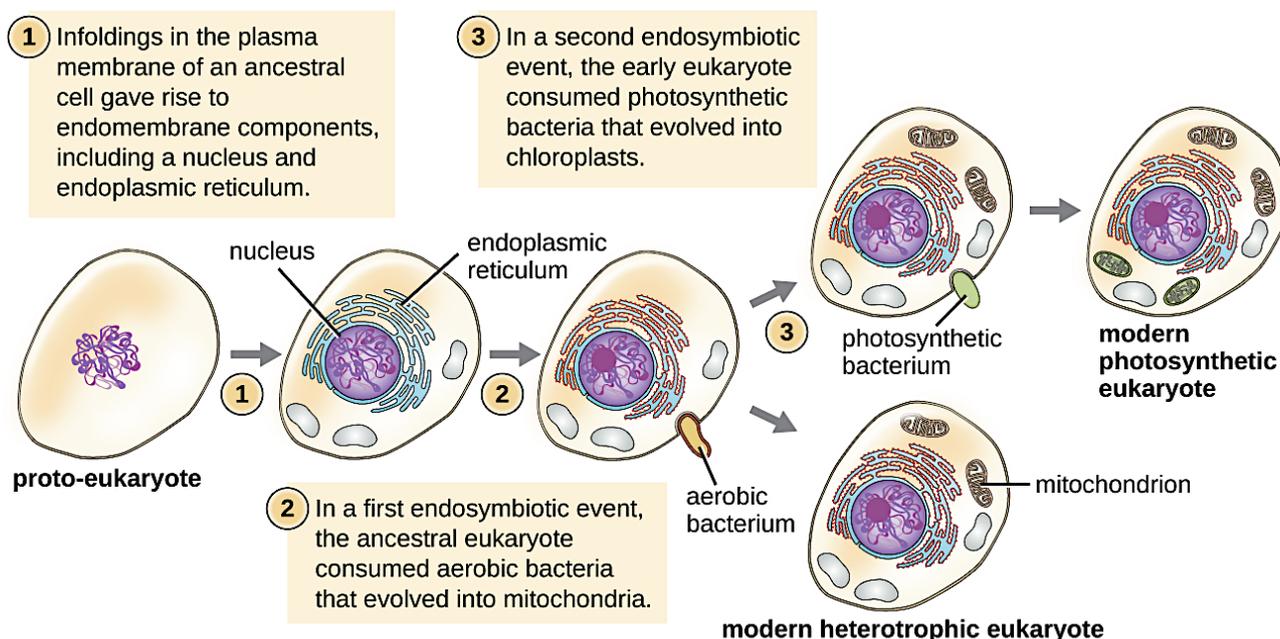
evidenziano una massiccia sovrapposizione tra peptidi virali e umani che è matematicamente inaspettata. Dal punto di vista evolutivo, i dati sottolineano una stretta relazione tra i virus e l'origine delle cellule eucariotiche.

Infatti, secondo l'ipotesi dell'eucariogenesi virale ²⁸ e alla luce della teoria endosimbiotica, la prima cellula eucariotica (la nostra stirpe) ha avuto origine come un consorzio costituito da un antenato archaeal del citoplasma eucariotico, un antenato batterico dei mitocondri e un antenato virale del nucleo. ²⁹

Da un punto di vista patologico, come si approfondirà successivamente, la somiglianza della sequenza peptidica tra virus e esseri umani può fornire una piattaforma molecolare per reazioni crociate autoimmuni durante le risposte immunitarie a seguito di infezioni/immunizzazioni virali. ³⁰

Di seguito sono riportate le figure relative alle varie teorie sull'origine della cellula eucariota e del suo nucleo. ³¹

La teoria endo-simbiotica



https://commons.wikimedia.org/wiki/File:OSC_Microbio_03_02_Endosymbio.jpg

²⁸ Speijer D. Debating Eukaryogenesis-Part 1: Does Eukaryogenesis Presuppose Symbiosis Before Uptake? Bioessays. 2020 Apr;42(4):e1900157. doi: 10.1002/bies.201900157. Epub 2020 Feb 20. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/bies.201900157>

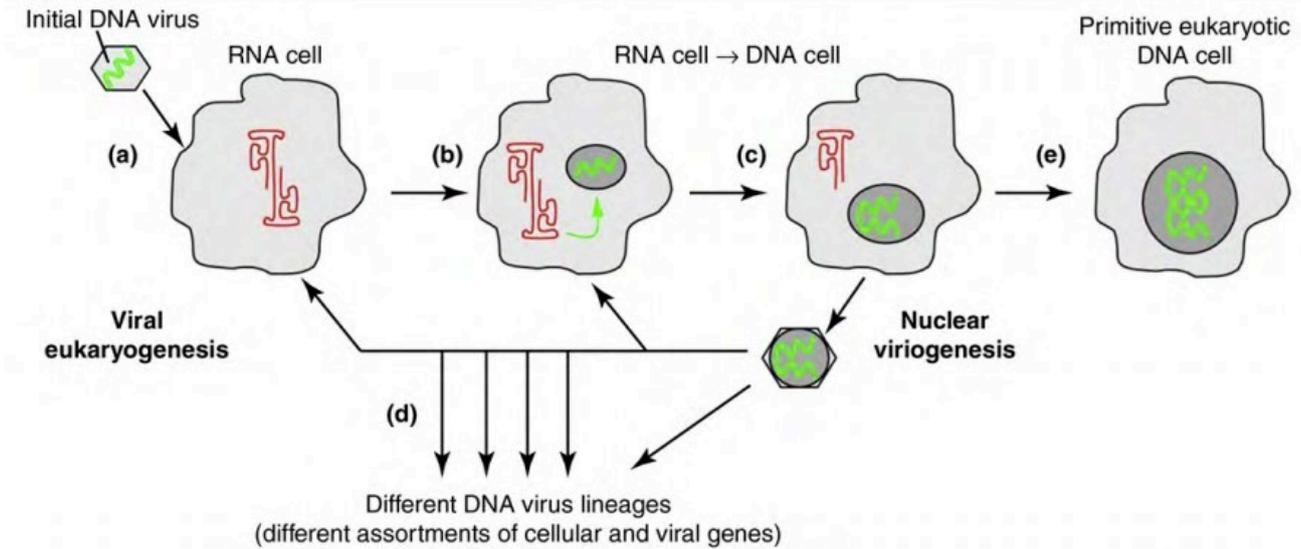
Dacks JB, Field MC, Buick R, Eme L, Gribaldo S, Roger AJ, Brochier-Armanet C, Devos DP. The changing view of eukaryogenesis - fossils, cells, lineages and how they all come together. J Cell Sci. 2016 Oct 15;129(20):3695-3703. doi: 10.1242/jcs.178566. Epub 2016 Sep 26. <https://jcs.biologists.org/content/129/20/3695.long>

²⁹ Philip Bell (September 11th 2013). Meiosis: Its Origin According to the Viral Eukaryogenesis Theory, Meiosis, Carol Bernstein and Harris Bernstein, IntechOpen, DOI: 10.5772/56876. <https://www.intechopen.com/books/meiosis/meiosis-its-origin-according-to-the-viral-eukaryogenesis-theory>

³⁰ Kanduc D. The comparative biochemistry of viruses and humans: an evolutionary path towards autoimmunity. Biol Chem. 2019 Apr 24;400(5):629-638. doi: 10.1515/hsz-2018-0271. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30504522/>

³¹ Claverie JM. Viruses take center stage in cellular evolution. Genome Biol. 2006;7(6):110. doi:10.1186/gb-2006-7-6-110 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1779534/>

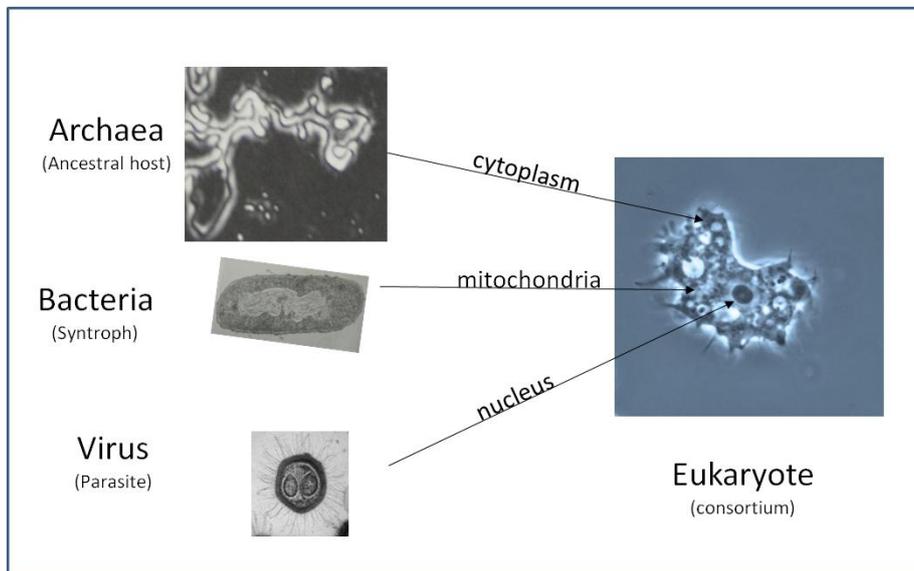
Teoria sull'origine del nucleo della cellula eucariota



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1779534/>

Un modello iterativo per l'origine del nucleo eucariota e l'emergenza simultanea di varie famiglie di NCLDV. (a) Un virus a DNA primitivo (un antenato del batteriofago) rimane intrappolato all'interno di una cellula di RNA dando inizio a un proto-nucleo. (b) I geni cellulari vengono reclutati progressivamente nel proto-nucleo, spinti dai vantaggi selettivi dei genomi del DNA. (c) Questa situazione rimane instabile per un po' con alcuni dei proto-nuclei che ritornano a uno stato virale (generalizzando l'uso della struttura originale del capsido come veicolo del genoma). (d) Questi virus hanno infettato altre cellule in vari stadi della loro rapida evoluzione in corso. (e) L'emergere di cellule nucleate con genomi di DNA biochimicamente più stabili potrebbe aver coinciso con la fine dell'era pre-darwiniana in cui una modalità di evoluzione collettiva (caratterizzata da organismi protocellulari instabili sopraffatti da trasferimenti genici orizzontali troppo frequenti) è passata a una modalità di evoluzione cellulare (con il predominio del gene ereditato dalla discesa verticale, sia nel mondo cellulare che virale). Questo schema ipotetico fornisce un meccanismo per l'emergere di vari lignaggi virali sovrapposti, tutti utilizzando la struttura del capsido ereditata dal batteriofago, che precede l'emergenza degli eucarioti ed esibisce vari riassortimenti di geni cellulari virali e ancestrali

Teoria dell'eucariogenesi virale



<https://www.intechopen.com/books/meiosis/meiosis-its-origin-according-to-the-viral-eukaryogenesis-theory>

La cellula eucariotica si evolve da una comunità / consorzio mondiale procariota. Nella teoria dell'eucariogenesi virale, la cellula eucariotica discende da un consorzio di tre organismi del mondo procariotico originariamente indipendenti. Il citoplasma eucariotico discende da una cellula archaeal che non possedeva una parete cellulare ed era soggetta a infezione da una varietà di agenti tra cui una serie di batteri e virus. Il mitocondrio eucariotico discende da un alfa-proteobatterio che era originariamente in una relazione simbiotica con l'ospite archaeal, e alla fine ha invaso il citoplasma dell'ospite e ha stabilito una presenza endosimbiotica permanente nella cellula ospite. Il nucleo eucariotico discende da un virus NCLDV che originariamente era in una relazione parassitaria con l'ospite archaeal e alla fine ha stabilito una presenza lisogena permanente all'interno del citoplasma dell'ospite. I tre organismi del consorzio hanno infine condiviso una traiettoria evolutiva comune e alla fine si sono evoluti nella cellula eucariotica. Nel processo di stabilire in modo permanente la "cellula eucariotica", l'antenato virale del nucleo ha assunto il ruolo di replicazione e trascrizione del DNA mediante le sue proteine leganti capping / cap che hanno diretto la traduzione preferenziale dei trascritti virali in proteine. Di conseguenza, il virus è diventato il centro di elaborazione delle informazioni genetiche della cellula e ha acquisito gradualmente i geni dagli altri organismi. L'antenato alfa proteobatterico dei mitocondri ha trasferito la maggior parte dei suoi geni al virus / nucleo nel processo di evoluzione nei mitocondri e, nel caso degli idrogenosomi, tutti i suoi geni. Il citoplasma archeologico ospite ha mantenuto il suo ruolo nella traduzione dei trascritti di mRNA e alla fine ha trasferito tutti i suoi geni "eucariotici" al nucleo

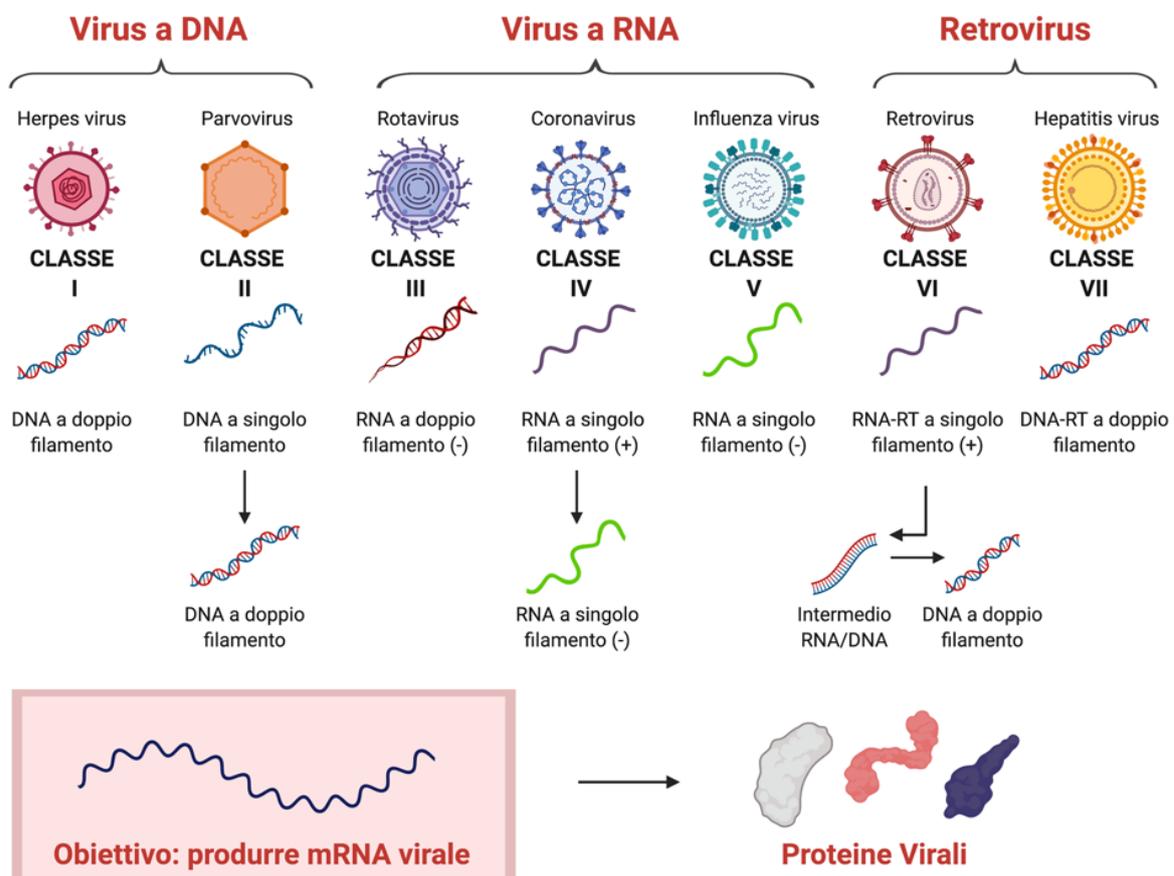
CLASSIFICAZIONE DEI VIRUS

I **virus a DNA** integrano il loro genoma all'interno di quello della cellula ospite e sfruttano i normali meccanismi cellulari per la propria replicazione.

I **virus a RNA**, invece utilizzano meccanismi differenti a seconda dei casi:

- se si parte da un **RNA a senso positivo** questo può già essere utilizzato per la traduzione in proteine;
- se si parte da un **RNA a senso negativo** sarà necessario l'intervento di una RNA-polimerasi RNA dipendente virale per la sintesi di un filamento di RNA a senso positivo traducibile.
- i **retrovirus** utilizzano un enzima specifico, la trascrittasi inversa, che consente loro di sintetizzare DNA partendo dall'RNA.³²

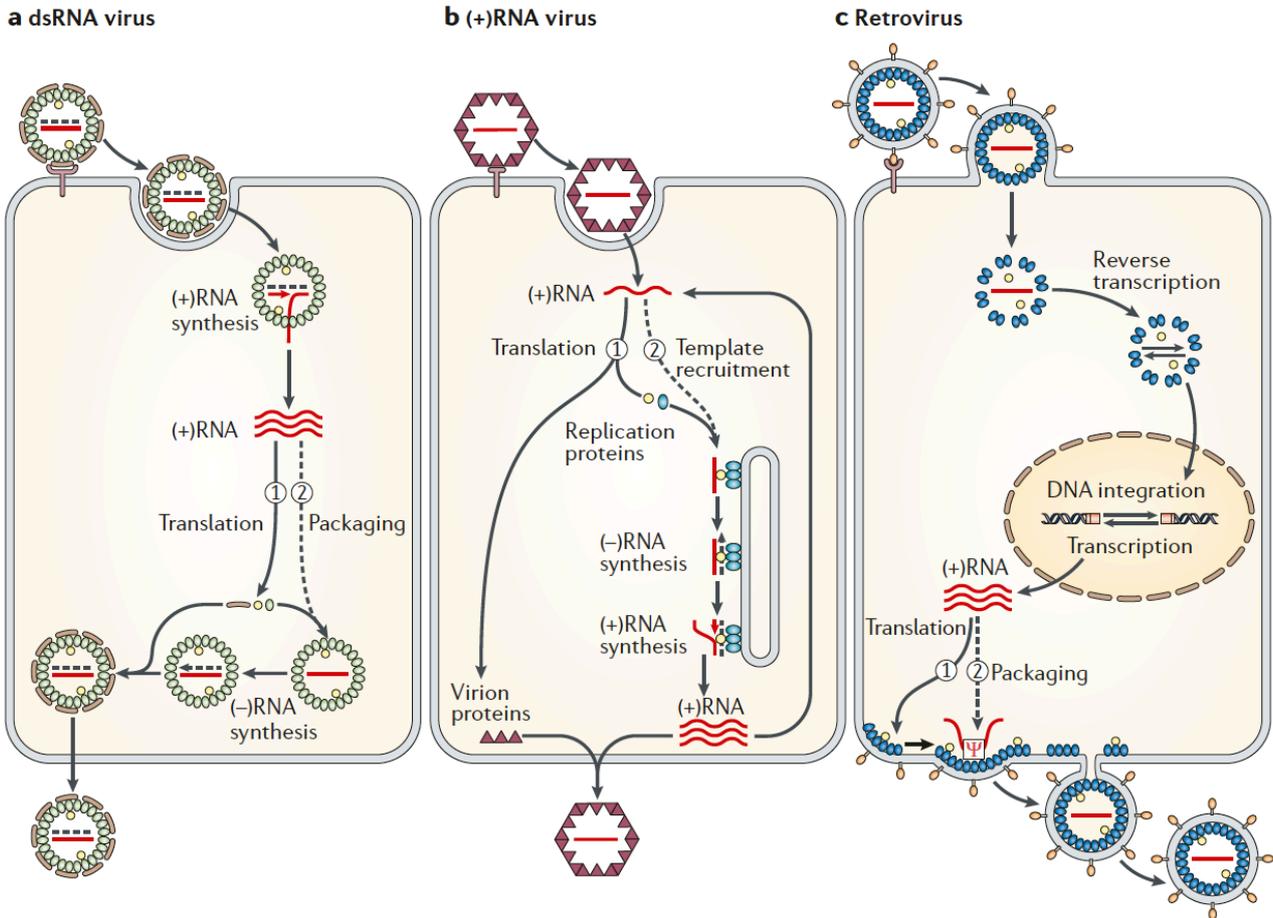
Il **SARS-CoV-2** è un esempio dei virus appartenenti alla classe IV: una volta infettata la cellula, il suo RNA a senso positivo può essere subito tradotto in proteine e viene utilizzato per la sintesi di filamenti complementari di RNA a senso negativo che, a loro volta, saranno usati per la produzione di nuove copie del RNA a senso positivo da incorporare nei virioni in produzione.



<https://www.facebook.com/sciencenow.fb/>
Classificazione dei virus di Baltimore

³² Ramasamy, Pathmanaban. (2015). Reconstruction of Phylogenetic Relationships between Nucleic Acid Polymerases of Viruses with RNA Genome. 10.13140/RG.2.1.1380.6162. https://www.researchgate.net/publication/288827106_Reconstruction_of_Phylogenetic_Relationships_between_Nucleic_Acid_Polymerases_of_Viruses_with_RNA_Genome

Ahliquist, P. Parallels among positive-strand RNA viruses, reverse-transcribing viruses and double-stranded RNA viruses. Nat Rev Microbiol 4, 371–382 (2006). <https://doi.org/10.1038/nrmicro1389> <https://www.nature.com/articles/nrmicro1389>



<https://www.nature.com/articles/nrmicro1389>

Cicli di vita distinti di virus dsRNA, virus RNA (+) e retrovirus. Tutte e tre le classi di virus si replicano attraverso intermedi di RNA ((RNA) (+) a filamento positivo (fili rossi nella figura) che sono modelli sia per la traduzione che per la replicazione del genoma. Per ogni classe, la figura mostra un ciclo di vita semplificato e rappresentativo.

Virus a RNA a doppio filamento (ds): Come mostrato nella parte a della figura, l'attacco del virus e l'endocitosi forniscono un nucleo virionico che contiene dsRNA genomico virale e RNA polimerasi virale (giallo) nel citoplasma. Il nucleo trascrive ed estrude (+) mRNA che vengono prima tradotti (1) e poi impacchettati (2) dalle proteine virali risultanti in nuovi nuclei virionici. I nuclei maturano sintetizzando RNA a filamento negativo (-) (filamento punteggiato) e aggiungendo proteine esterne. Escono per lisi o secrezione cellulare.

Virus a RNA (+): Come mostrato nella parte b della figura, i virioni endocitati rilasciano RNA genomico messaggero di senso nel citoplasma per la traduzione. Le proteine di replicazione dell'RNA virale recentemente tradotte reclutano questo RNA genomico in un complesso di replicazione dell'RNA intracellulare associato alla membrana. Piccole quantità di RNA (-) vengono prodotte e utilizzate come modelli per amplificare notevolmente l'RNA(+) virale che viene incapsulato in virioni di nuova progenie.

Retrovirus: Come mostrato nella parte c della figura, l'attaccamento del virione e la fusione dell'involucro rilasciano un complesso subvirale che contiene RNA genomico virale (+) e trascrittasi inversa (giallo). Dopo la sintesi del cDNA mediante trascrizione inversa, il cDNA provirale viene integrato nel cromosoma ospite e trascritto per produrre RNA (+) che viene tradotto (1) e quindi confezionato (2) in nuovi virioni che vengono rilasciati per gemmazione.

Virologia Generale
Classificazione dei Virus
La Natura dei Virus
I Virus

RNA: la molecola che ha plasmato il fenomeno della vita

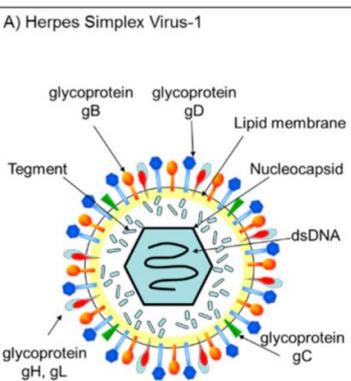
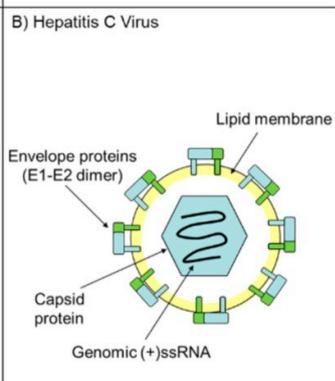
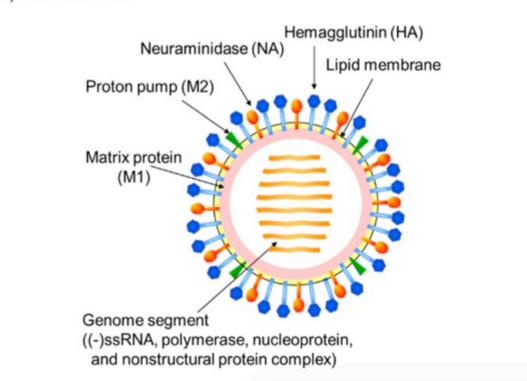
Esempi di genomi ³³

I virus Herpes simplex di tipo 1 (HSV-1) e di tipo 2 (HSV-2) appartengono alla famiglia degli Herpesviridae, hanno una struttura complessa, comprendente un capsidico icosaedrico contenente DNA a doppio filamento, situato all'interno del virione e circondato da un involucro di membrana eterogeneo costellato di spike morfologicamente distinte formate da 12 specie diverse di glicoproteine. La trascrizione e la replicazione del genoma virale, così come l'assemblaggio dei capsidi della progenie, avvengono all'interno del nucleo. L'mRNA virale è sintetizzato dalla RNA-polimerasi II della cellula ospite con la partecipazione di fattori virali in tutte le fasi dell'infezione. Il capsidico viene trasportato dal nucleo al citoplasma, dove si verificano la maturazione del virione e la formazione del guscio esterno. Il rilascio del virione dalla cellula mediante escitosi porta alla formazione dell'involucro.

HCV (epatite C), ZIKV (Zika virus), WNV (West Nile virus) e DENV (Dengue virus) fanno tutti parte della famiglia Flaviviridae e possiedono involucri con geometrie icosaedriche e sferiche. L'HCV, del genere Hepacivirus, è una delle principali cause di malattie del fegato, mentre ZIKV, WNV e DENV, del genere Flavivirus, causano una serie di malattie virali trasmesse prevalentemente da artropodi. HCV e DENV sono virus con involucro con un diametro di circa 40-65 nm e hanno un genoma di RNA a senso positivo, non segmentato, a filamento singolo, da 9,6 a 11 kb. Una volta all'interno delle cellule, il genoma viene tradotto in proteine, quindi processato proteoliticamente da proteasi virali e cellulari per produrre tre proteine strutturali e non strutturali (NS). Le proteine NS reclutano il genoma virale in un complesso di replicazione dell'RNA e la replicazione dell'RNA avviene tramite la RNA polimerasi RNA-dipendente virale. Dopo che l'RNA a filamento negativo è stato sintetizzato, funge da modello per produrre nuovi genomi virali a filamento positivo. I genomi nascenti possono quindi essere tradotti, ulteriormente replicati o impacchettati all'interno di nuove particelle virali e rilasciati sulla superficie cellulare.

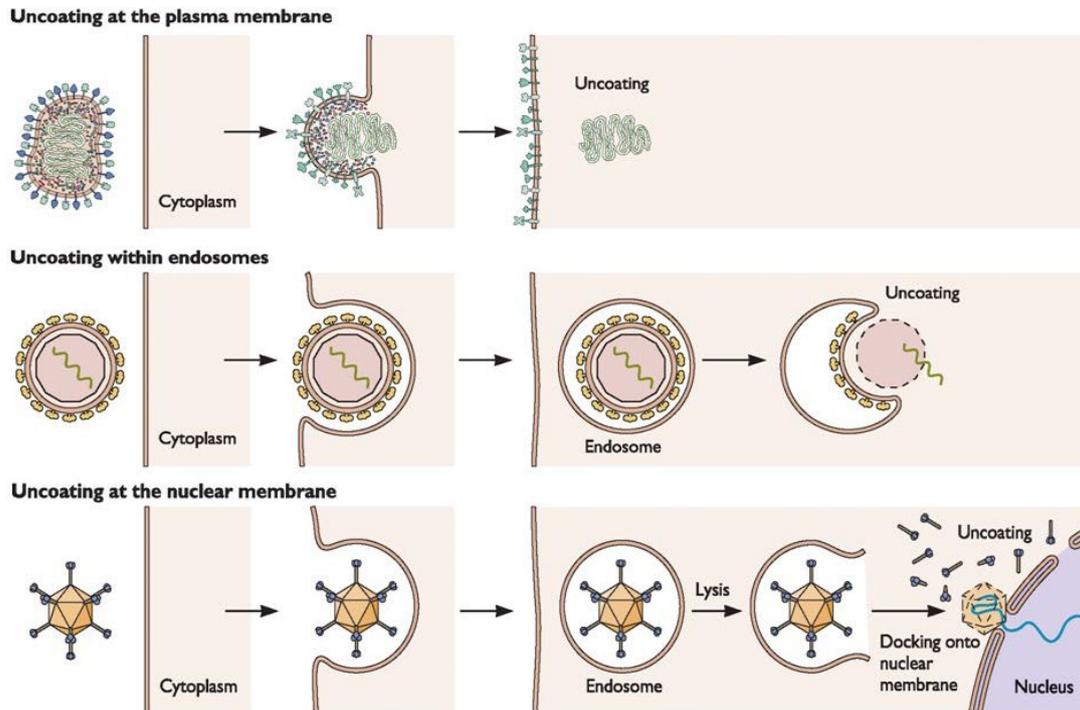
Il virus dell'influenza A (IAV) fa parte della famiglia degli Orthomyxoviridae, un virus con involucro, approssimativamente sferico con un diametro di circa 50-120 nm e otto distinti segmenti del genoma di RNA a filamento singolo a senso negativo (o antisense). Il virus dell'influenza ha tre proteine di membrana: emoagglutinina (HA), pompa protonica (M2) e neuraminidasi (NA). La membrana interna del virione è sostenuta dalla proteina della matrice (M1) e l'interno del virione contiene otto diversi segmenti del genoma. Ogni segmento del genoma è un complesso ribonucleoproteico (RNP) costituito da un genoma di RNA a filamento negativo insieme a un complesso di RNA polimerasi (PA, PB1, PB), nucleoproteina (NP) e proteine non strutturali (NS).

Lo IAV si lega alle glicoproteine o ai glicolipidi delle cellule ospiti tramite la proteina HA ed entra nelle cellule attraverso l'endocitosi mediata dal recettore. Al basso pH dell'endosoma tardivo, l'HA induce la fusione delle membrane virali ed endosomiali. Dopo la replicazione e la trascrizione degli RNA genomici nel nucleo da parte del complesso della polimerasi, le proteine virali entrano nel reticolo endoplasmatico. Il trasporto della proteina virale alla membrana plasmatica probabilmente richiede fattori dell'ospite.

Baltimore Classification	Group I (dsDNA virus)	Group IV ((+)ssRNA virus)	Group V ((-)ssRNA virus)
Virus	<i>Herpesviridae</i>	<i>Flaviviridae</i>	<i>Orthomyxoviridae</i>
Structure	<p>A) Herpes Simplex Virus-1</p> 	<p>B) Hepatitis C Virus</p> 	<p>D) Influenza A Virus</p> 

³³ Kaihatsu K, Yamabe M, Ebara Y. Antiviral Mechanism of Action of Epigallocatechin-3-O-gallate and Its Fatty Acid Esters. *Molecules*. 2018;23(10):2475. Published 2018 Sep 27. doi:10.3390/molecules23102475 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6222519/>

https://www.mdpi.com/molecules/molecules-23-02475/article_deploy/html/images/molecules-23-02475-g002.png



<https://docplayer.it/1256495-Replicazione-e-genetica-virale.html>
Tre differenti strategie per lo svestimento (uncoating) dei virioni

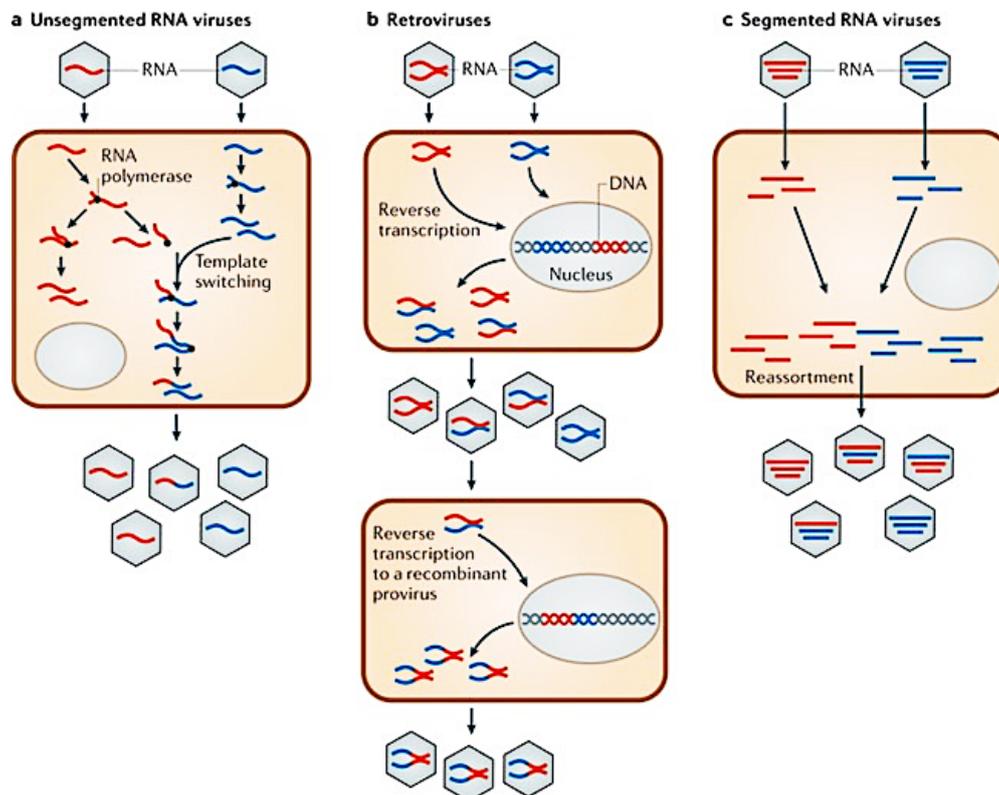
RICOMBINAZIONE E RIASSORTIMENTO

Il processo di ricombinazione che avviene nei virus a RNA corrisponde alla formazione di molecole chimeriche da genomi parentali di origine mista. Questo processo può avvenire all'interno di un singolo segmento genomico (nel qual caso viene spesso definito **ricombinazione** dell'RNA) o, per quei virus che possiedono genomi segmentati, come scambio di interi segmenti genomici tra virus. In questo caso lo scambio viene solitamente definito **riassortimento**.

Sebbene la ricombinazione e il riassortimento dell'RNA siano meccanicamente molto diversi, entrambi richiedono che due o più virus infettino la stessa cellula ospite. ³⁴

³⁴ Simon-Loriere, E., Holmes, E.
Why do RNA viruses recombine?
Nat Rev Microbiol 9, 617–626 (2011). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2614>
<https://www.nature.com/articles/nrmicro2614>

Modrow S., Falke D., Truyen U., Schätzl H. (2013)
Viruses with Single-Stranded, Segmented, Negative-Sense RNA Genomes.
Molecular Virology. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-20718-1_16
https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007%2F978-3-642-20718-1_16



Nature Reviews | Microbiology

<https://www.nature.com/articles/nrmicro2614>

a) La coinfezione di una cellula da ceppi virali geneticamente distinti può portare alla generazione di virus ricombinanti. Questo processo può verificarsi sia nei virus non segmentati (come mostrato qui) che all'interno di un segmento di un virus segmentato. b) La coinfezione di una cellula da ceppi geneticamente distinti di un retrovirus può portare alla generazione di particelle virali "eterozigoti", dopodiché un evento di cambio modello può portare a un provirus ricombinante. c) La coinfezione di una cellula da ceppi geneticamente distinti di un virus segmentato può generare diverse combinazioni di progenie riassortimento.

I virus dell'influenza tendono a riassortire molto frequentemente in vivo,³⁵ fenomeno sfruttato anche per selezionare gli antigeni vaccinali utilizzati nei vaccini antinfluenzali a virus attenuati, come esemplificato nella seguente figura.³⁶

³⁵ Urbaniak K, Markowska-Daniel I.

In vivo reassortment of influenza viruses. *Acta Biochim Pol.* 2014;61(3):427-31. Epub 2014 Sep 3. http://www.actabp.pl/pdf/3_2014/427.pdf

<https://nieman.harvard.edu/wp-content/uploads/pod-assets/microsites/NiemanGuideToCoveringPandemicFlu/TheScience/HowFluVirusesChange.aspx.html#reassortment>

Squires, Richard. (2008).

An influenza virus molecular infection model and discrete event, stochastic simulation.

https://www.researchgate.net/publication/238732853_AN_INFLUENZA_VIRUS_MOLECULAR_INFECTIION_MODEL_AND_DISCRETE_EVENT_STOCHASTIC_SIMULATION

³⁶ McDonald SM, Nelson MI, Turner PE, Patton JT.

Reassortment in segmented RNA viruses: mechanisms and outcomes. *Nat Rev Microbiol.* 2016;14(7):448-460. doi:10.1038/nrmicro.2016.46 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5119462/>

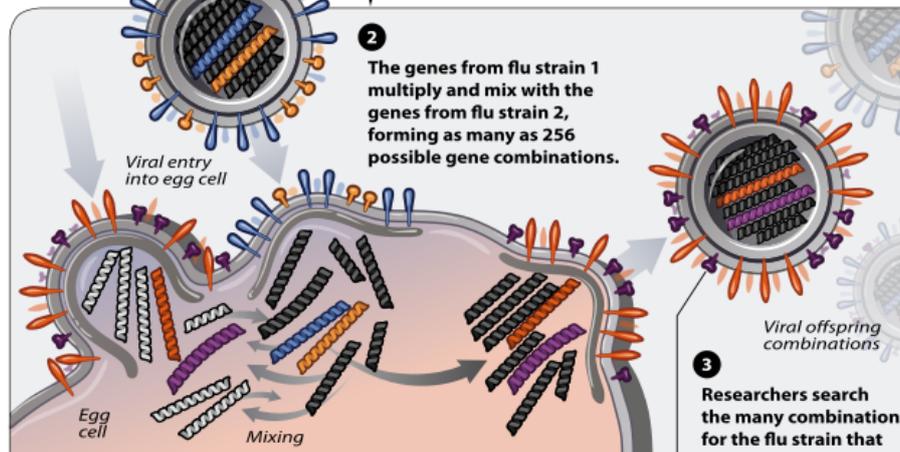
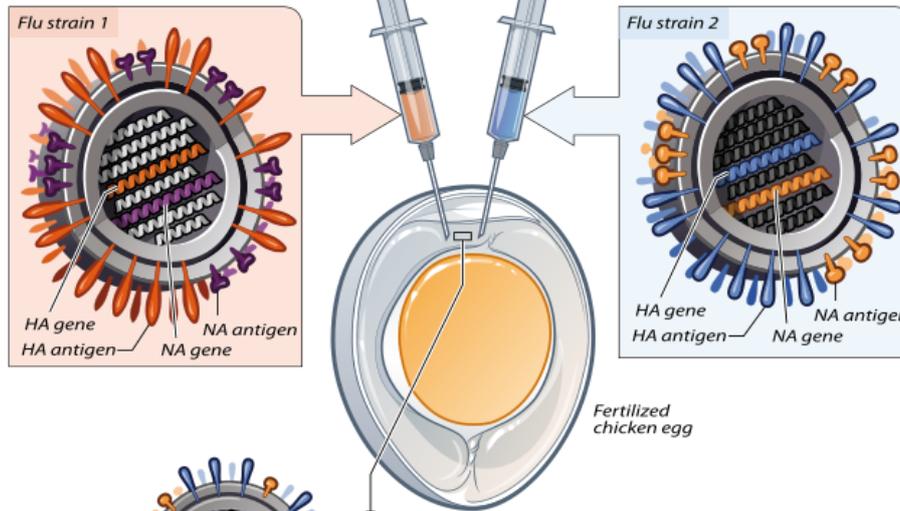
Blanco-Lobo P, Nogales A, Rodríguez L, Martínez-Sobrido L. Novel Approaches for The Development of Live Attenuated Influenza Vaccines. *Viruses.* 2019;11(2):190. Published 2019 Feb 22. doi:10.3390/v11020190 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6409754/>

Nogales A, Martínez-Sobrido L. Reverse Genetics Approaches for the Development of Influenza Vaccines. *Int J Mol Sci.* 2016;18(1):20. Published 2016 Dec 22. doi:10.3390/ijms18010020 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5297655/>

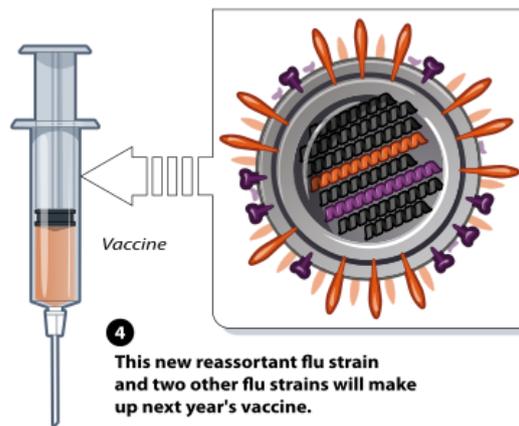
Schultz-Cherry S, Jones JC. Influenza vaccines: the good, the bad, and the eggs. *Adv Virus Res.* 2010;77:63-84. doi: 10.1016/B978-0-12-385034-8.00003-X. PMID: 20951870.

A flu virus contains eight gene segments. The goal is to combine the desired HA and NA genes from flu strain 1 with genes from flu strain 2, which grows well in eggs and is harmless in humans.

1 Flu strains 1 and 2 are injected into a fertilized chicken egg.



3 Researchers search the many combinations for the flu strain that contains the HA and NA genes from flu strain 1 and genes from flu strain 2 that ensure that it is able to grow efficiently in eggs.

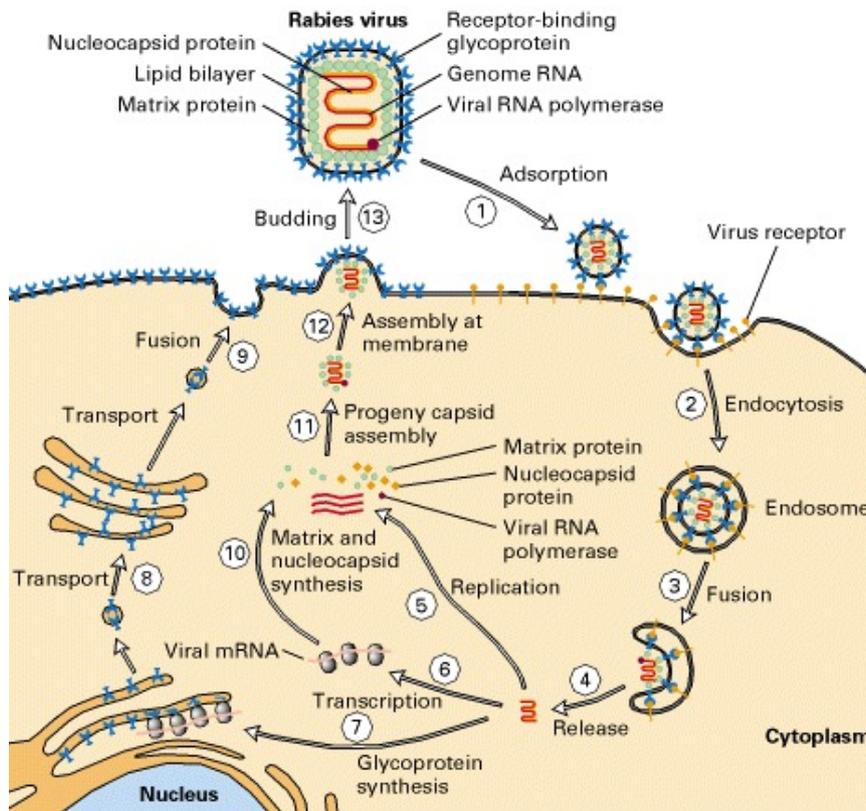


<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/d/d7/Reassortment.svg/632px-Reassortment.svg.png>

CICLO LITICO E CICLO LISOGENO

Dopo che la sintesi di nuovi virioni, da centinaia a migliaia, è stata completata, la maggior parte delle cellule batteriche e alcune cellule vegetali e animali infette si rompono, o si lisano, rilasciando tutti i virioni contemporaneamente. In molte infezioni virali di piante e animali, tuttavia, non si verifica alcun evento litico discreto; piuttosto, la cellula ospite morta rilascia i virioni mentre si disintegra gradualmente.

Questi eventi - *adsorbimento, penetrazione, replicazione e rilascio* - descrivono il **ciclo litico** della replicazione virale. Il risultato è la produzione di un nuovo ciclo di particelle virali e la morte della cellula. L'adsorbimento e il rilascio di **virus animali con involucro** sono processi un po' più complicati, in quanto i virioni "germogliano" dalla cellula ospite, acquisendo così il loro involucro fosfolipidico esterno, che contiene principalmente glicoproteine virali.³⁷



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21523/>

Le fasi del ciclo di replicazione litica di un virus con involucro sono illustrate per il virus della rabbia, che ha un genoma di RNA (-) a filamento singolo. Dopo che un virione si adsorbe a una specifica proteina della membrana ospite (*passaggio 1*), la cellula lo ingloba in un endosoma (*passaggio 2*). Una proteina nella membrana dell'endosoma pompa i protoni dal citosol all'interno dell'endosoma, con la conseguente diminuzione del pH endosomiale che induce un cambiamento conformazionale nella glicoproteina virale, portando alla fusione dell'involucro virale con la membrana a doppio strato lipidico endosomiale e al rilascio del nucleocapside nel citosol (*passaggi 3 e 4*).

L'RNA polimerasi virale utilizza ribonucleosidi trifosfati nel citosol per replicare il genoma dell'RNA virale (*passaggio 5*) e sintetizzare mRNA virali (*passaggio 6*). Uno degli mRNA virali codifica per la glicoproteina di membrana virale (*blu*), che viene inserita nel lume del reticolo endoplasmatico (ER) mentre viene sintetizzata sui ribosomi legati ad ER (*passaggio 7*). Il carboidrato viene aggiunto al grande dominio piegato all'interno del lume ER e viene modificato quando la membrana e la glicoproteina associata passano attraverso l'apparato di Golgi (*passaggio 8*). Le vescicole con la glicoproteina matura si fondono con la membrana plasmatica, depositando la glicoproteina virale sulla superficie cellulare con il grande dominio ripiegato all'esterno della cellula, l'elica α transmembrana che attraversa la membrana plasmatica e il piccolo dominio citoplasmatico all'interno della cellula (*passaggio 9*). Nel frattempo, altri mRNA virali vengono tradotti sui ribosomi delle cellule ospiti in proteina nucleocapsidica, proteina di matrice ed RNA polimerasi virale (*passaggio 10*). Queste proteine vengono assemblate con RNA genomico virale replicato (*rosso scuro*) in nucleocapsidi della progenie (*passaggio 11*), che quindi si associano alla glicoproteina di membrana virale nella membrana plasmatica (*passaggio 12*). Poiché copie aggiuntive della proteina della matrice su un singolo nucleocapside si associano al dominio citoplasmatico di copie aggiuntive della glicoproteina di membrana virale, la membrana plasmatica viene ripiegata attorno al nucleocapside, formando un "germoglio" che alla fine viene rilasciato (*passaggio 13*).

Il ciclo litico del **Batteriofago T4** di *E. coli*, che ha un genoma di DNA a doppia elica, inizia con l'adsorbimento (*fase 1*), durante il quale le proteine del rivestimento virale (sulla punta della coda in T4) interagiscono con specifiche proteine recetttrici all'esterno della cellula ospite. Il genoma virale viene quindi iniettato nell'ospite.

Successivamente, gli enzimi della cellula ospite trascrivono i geni virali "precoci" in mRNA e successivamente li traducono in proteine virali "precoci" (*fase 2*), che replicano il DNA virale e inducono l'espressione di proteine virali "tardive" da parte degli enzimi della cellula ospite (*fase 3*). Le proteine virali tardive includono il capside e le proteine di assemblaggio e gli enzimi che degradano il DNA della cellula ospite, fornendo nucleotidi per la sintesi del DNA virale. I virioni progenici vengono assemblati nella cellula (*fase 4*) e rilasciati.

³⁷ Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. Molecular Cell Biology. 4th edition. New York: W. H. Freeman; 2000. Section 6.3, Viruses: Structure, Function, and Uses. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21523/>

(fase 5) quando la cellula viene lisata dalle proteine virali. I virus appena liberati avviano un altro ciclo di infezione in altre cellule ospiti.

In alcuni casi, dopo che una molecola di DNA di un batteriofago entra in una cellula batterica, viene integrata nel cromosoma della cellula ospite, dove rimane quiescente e viene replicata come parte del DNA della cellula da una generazione all'altra. Questa associazione è chiamata **lisogenia** e il DNA fagico integrato è indicato come profago. In determinate condizioni, il DNA del profago viene attivato, portando alla sua escissione dal cromosoma della cellula ospite e all'ingresso nel ciclo litico. I virus batterici di questo tipo sono chiamati **fagi temperati**.³⁸

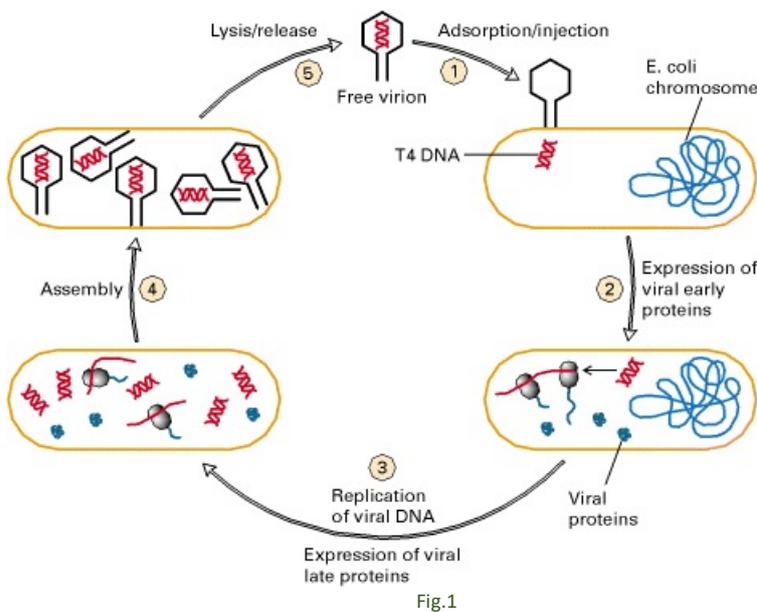


Fig.1

Fig.1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21523/>
Il batteriofago λ subisce replicazione litica a seguito dell'infezione di E. coli

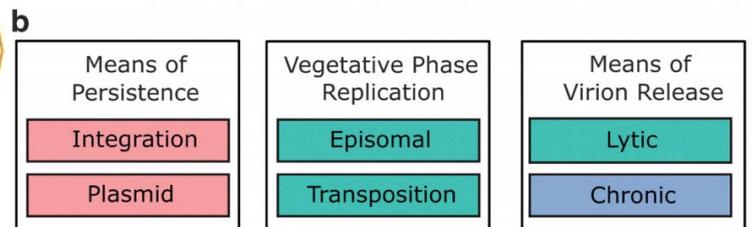
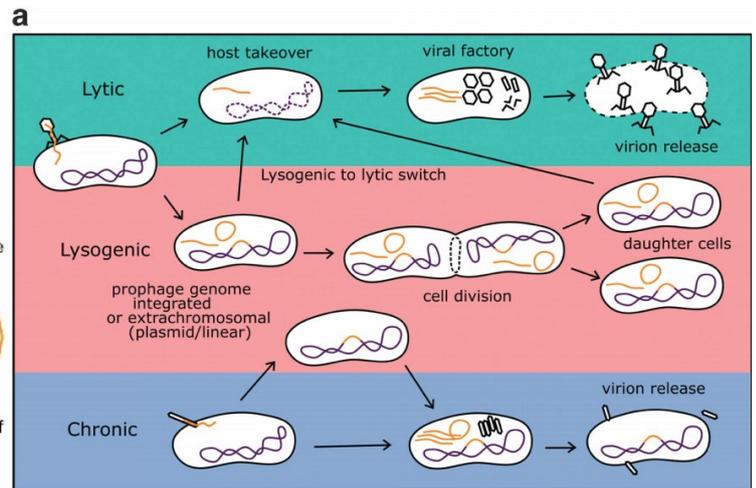


Fig.2

Fig.2 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5520141/>
Modalità di infezione del fago temperato, dalla cellula alla comunità. (a) Un fago temperato può infettare una cellula attraverso cicli virionici o lisogenici, dove dirotta il metabolismo del suo ospite per produrre nuova progenie virionica o invece replica il suo genoma insieme all'ospite senza produrre nuovi virioni, rispettivamente. La produzione di particelle virioniche può avvenire sia in seguito ad adsorbimento fagico (ciclo produttivo) sia in seguito ad un passaggio da un ciclo lisogenico ad un ciclo produttivo (cicli di infezione litici o cronici dipendenti dal fago temperato). Sebbene queste siano dinamiche generalizzate dell'infezione, i dettagli possono variare con tipi specifici di fago-ospite, che vanno dalle infezioni efficienti a quelle inefficienti, dove la dinamica e l'esito dell'infezione possono variare. (b) Riepilogo delle strategie di infezione fagica per stadio. La persistenza descrive lo stadio del profago durante il ciclo lisogenico, la replicazione descrive lo stato fago-genoma durante i cicli produttivi e il rilascio si riferisce non solo ai mezzi con cui i virioni dei fagi della progenie transitano dallo stato intracellulare a quello extracellulare, ma anche all'impatto dei cicli produttivi sul fago-batterio infetto (cioè, litico ma non cronico provoca la morte fisiologica del batterio ospite).

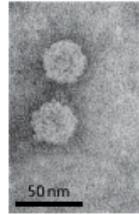
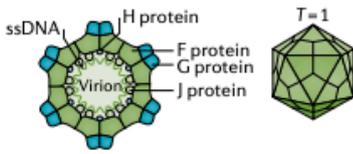
Di seguito sono riportate le varie tipologie di fagi batterici.³⁹

³⁸ Howard-Varona C, Hargreaves KR, Abedon ST, Sullivan MB. Lisogeny in nature: mechanisms, impact and ecology of temperate phages. ISME J. 2017;11(7):1511-1520. doi:10.1038/ismej.2017.16 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5520141/>

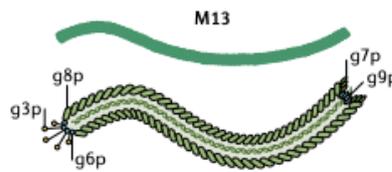
³⁹ Dion MB, Oechslin F, Moineau S. Phage diversity, genomics and phylogeny. Nat Rev Microbiol. 2020 Mar;18(3):125-138. doi: 10.1038/s41579-019-0311-5. Epub 2020 Feb 3. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32015529/>

a ssDNA

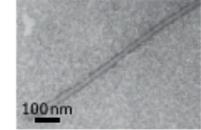
Microviridae (phiX174)



Inoviridae



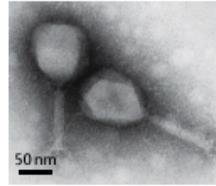
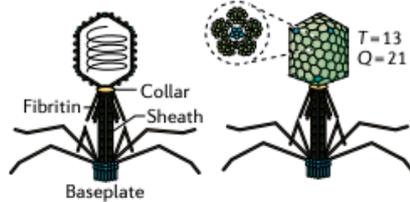
I2-2



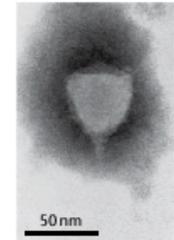
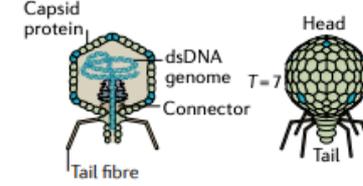
b dsDNA

Tailed

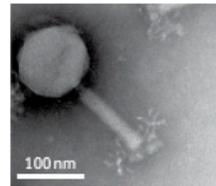
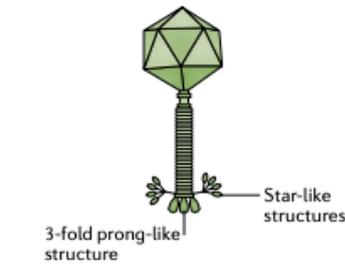
Myoviridae (T4) and Herelleviridae



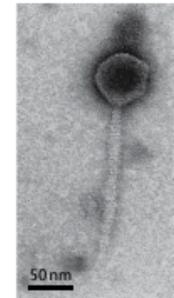
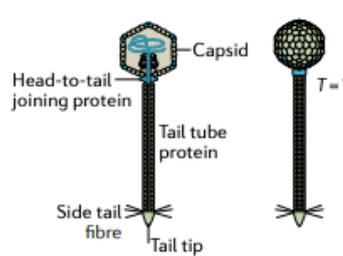
Podoviridae (T7)



Ackermannviridae (AG3)

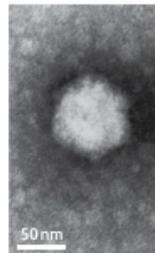
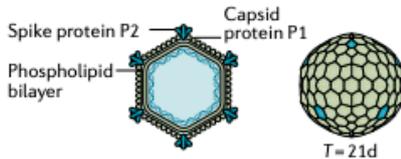


Siphoviridae (lambda)

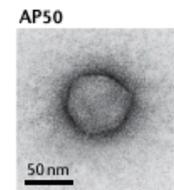
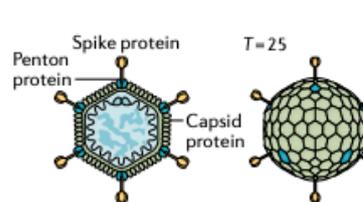


Non-tailed

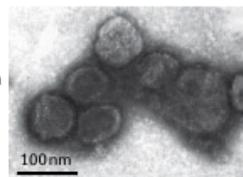
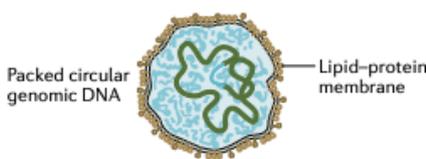
Corticoviridae (PM2)



Tectiviridae (PRD1)

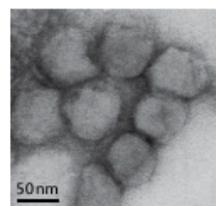
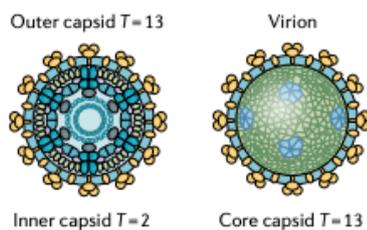


Plasmaviridae (MVL2)



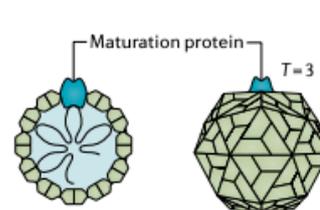
c dsRNA

Cystoviridae (phi6)

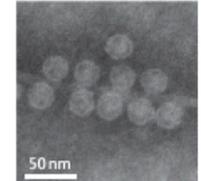


d ssRNA

Leviviridae (MS2)



R17

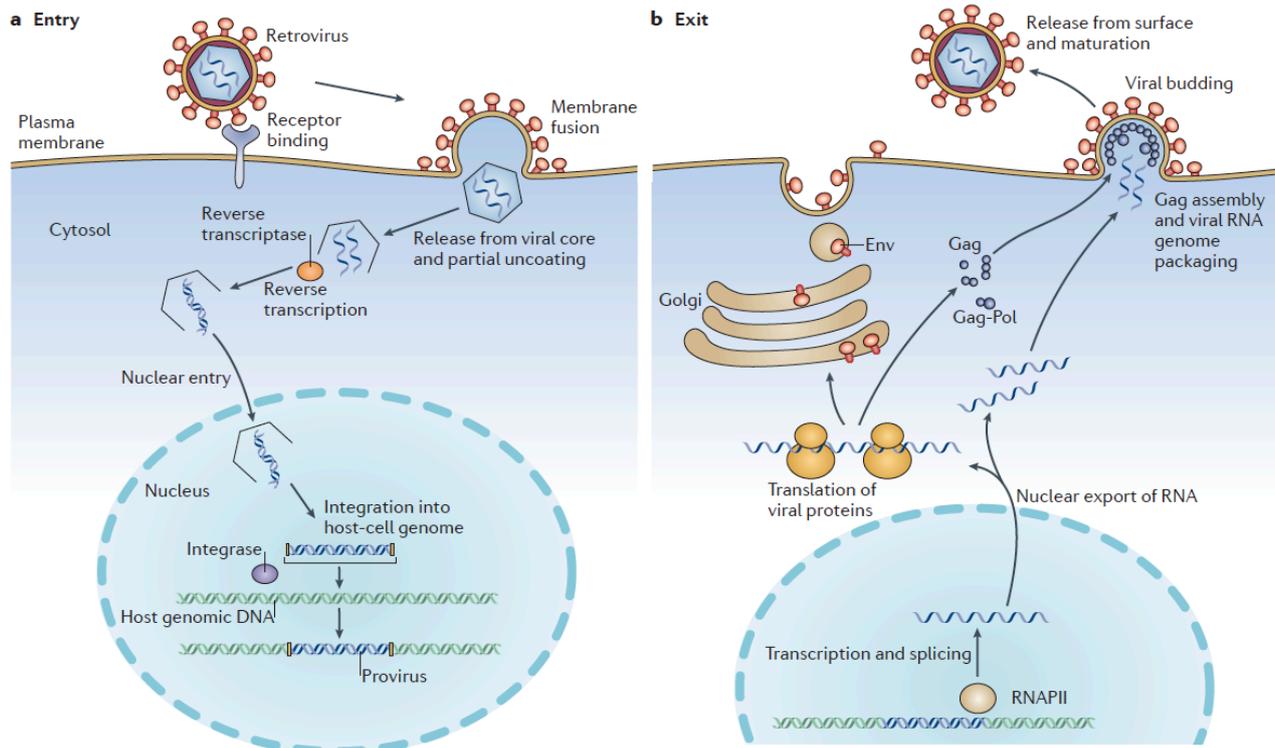


<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32015529/>

Phage classification based on morphology and genome type. A schematic representation (SR) and a transmission electron micrograph (TEM) are shown for each morphology

Anche i genomi di numerosi virus animali possono integrarsi nel genoma della cellula ospite tra quali i più importanti sono i **retrovirus**.

Il ciclo di replicazione dei retrovirus è meglio conosciuto per il coinvolgimento di due enzimi unici, codificati dal virus, la trascrittasi inversa e l'integrasi che consentono la conversione dell'RNA in DNA, seguita dall'integrazione del DNA virale nel genoma dell'ospite, formando un provirus a DNA.



<https://www.nature.com/articles/nrmicro2783>

Vengono illustrati diversi eventi nel ciclo di vita dei retrovirus. **a** | L'ingresso virale nelle cellule comporta i seguenti passaggi: legame a un recettore specifico sulla superficie cellulare; fusione della membrana o sulla membrana plasmatica o dagli endosomi (non mostrati); rilascio del nucleo virale e uncoating parziale; trascrizione inversa; transito attraverso il citoplasma e ingresso nucleare e l'integrazione nel DNA cellulare per dare un provirus. **b** | L'uscita virale prevede le seguenti fasi: trascrizione da parte della RNA polimerasi II (RNAPII); splicing ed esportazione nucleare di RNA virale; traduzione di proteine virali, assemblaggio di Gag e confezionamento dell'RNA; germogliamento attraverso la membrana cellulare e rilascio dalla superficie cellulare e maturazione del virus.

Dopo l'infezione cellulare, l'RNA virale viene retro-trascritto in DNA a doppio filamento e vengono create le ripetizioni terminali lunghe (LTR). Il DNA virale viene successivamente integrato nel DNA genomico della cellula ospite per formare un provirus che viene successivamente trascritto dalla RNA polimerasi II della cellula ospite (RNAPII), come già visto per gli herpes virus.

Il tipico retrovirus semplice ha tre geni: *gag*, *pol* ed *env*. Il gene *gag* codifica per le proteine strutturali che costituiscono il nucleo virale, la matrice (MA), il capsid (CA) e il nucleocapsid (NC), e queste sono inizialmente sintetizzate come una singola poliproteina. Il gene *pol* codifica per gli enzimi virali proteasi (PR), trascrittasi inversa (RT) e integrasi (IN). La traduzione iniziale è come una proteina di fusione Gag-Pol dall'RNA della lunghezza del genoma. Il gene *env* codifica per le proteine di superficie (SU) e transmembrana (TM) responsabili del legame del recettore e della fusione di membrana.

Poiché i retrovirus di solito non lisano la loro cellula bersaglio, l'integrazione consente un'associazione a lungo termine tra cellula e virus. Se la cellula infettata è una cellula germinale, è possibile la colonizzazione della linea germinale da parte del virus.

Numerosi studi indicano che tali eventi si sono verificati più volte nel corso dell'evoluzione.

Tali provirus ereditati sono chiamati **retrovirus endogeni (ERV)** e forniscono una "documentazione fossile" di infezioni retrovirali passate risalenti a molti milioni di anni fa.⁴⁰

⁴⁰ Buzdin AA, Prassolov V, Garazha AV.

Friends-Enemies: Endogenous Retroviruses Are Major Transcriptional Regulators of Human DNA.

Front Chem. 2017;5:35. Published 2017 Jun 8. doi:10.3389/fchem.2017.00035

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5462908/>

Stoye JP.

Studies of endogenous retroviruses reveal a continuing evolutionary saga.

Nat Rev Microbiol. 2012 May 8;10(6):395-406. doi: 10.1038/nrmicro2783.

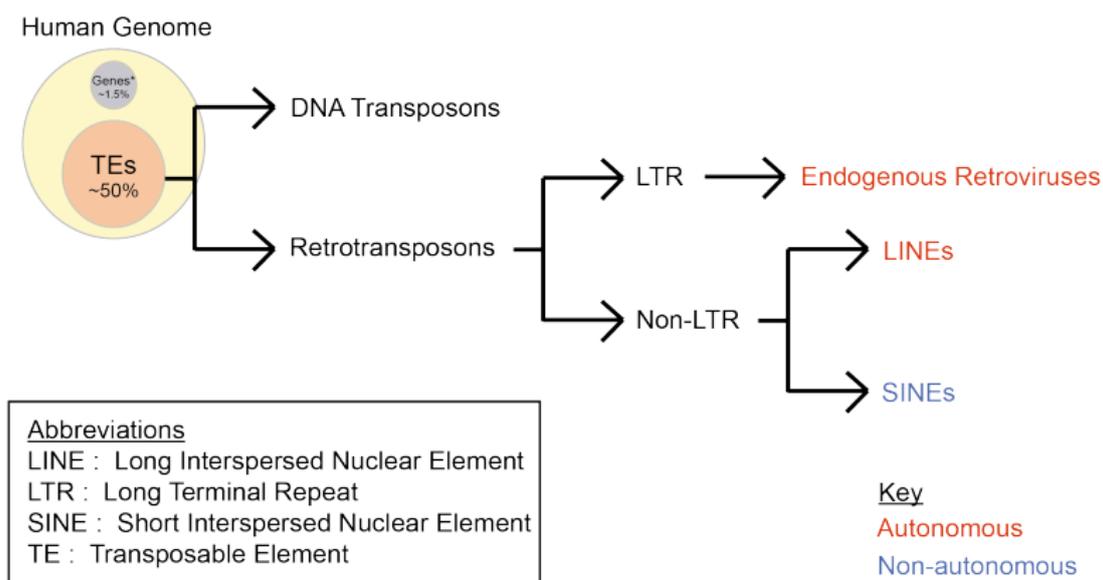
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22565131/>

<https://www.onb.it/2018/12/13/i-retrovirus-endogeni-nellevoluzione-umana/>

L'analisi filogenetica ha rivelato che il **genoma umano** contiene almeno 31 gruppi distinti di ERVs, con un numero di copie compreso tra uno e molte migliaia.

Le analisi delle sequenze genomiche completate hanno rivelato che il **4-10% del DNA dei vertebrati è costituito da residui retrovirali**.

Questa quantità è parecchie volte superiore a quella corrispondente alle sequenze che codificano i geni, ma è sostanzialmente inferiore a quella derivata da retro-trasposoni non contenenti LTR (a differenza degli HERVs che appartengono agli LTR-retrotrasposoni), come ad esempio gli elementi nucleari intervallati lunghi (**LINE**) ed elementi nucleari intervallati brevi (**SINE**).⁴¹



<https://discovery.ucl.ac.uk/id/eprint/10038410/1/Christopher%20Tie%20.pdf>

Tipi di elementi trasponibili (TE) nel genoma umano.

La maggior parte delle ripetizioni derivate da trasposoni nel genoma umano sono retrotrasposoni, che rappresentano il 50% del nostro genoma. I TE possono essere classificati in base alla presenza di LTR e alla possibilità o meno di replicarsi autonomamente. ERV e LINE sono famiglie autonome mentre SINE non sono autonome

Insieme, questi prodotti della trascrizione inversa costituiscono quasi la metà del genoma dei vertebrati e rappresentano quindi una sfida significativa per lo sviluppo di assemblaggi di sequenze dell'intero genoma utilizzando le attuali tecniche di sequenziamento a lettura corta.

Va anche notato che è stato segnalato un piccolo numero di eventi di integrazione che coinvolgono virus a RNA diversi dai retrovirus. Questi includono bornavirus e filovirus. Tali virus normalmente non subiscono la trascrizione inversa; sembra probabile che tali integrazioni siano avvenute a seguito della trascrizione inversa mediata da elementi LINE o dopo ricombinazione illegittima con un ERV.

⁴¹ Tie, Christopher. (2017). Epigenetic control of endogenous retroviruses and their immune recognition in differentiated human cells. <https://discovery.ucl.ac.uk/id/eprint/10038410/1/Christopher%20Tie%20.pdf>

LA PRODUZIONE DEI VACCINI

LINEE CELLULARI UTILIZZATE PER LA CRESCITA DEI VIRUS VACCINALI

Le **colture cellulari**⁴² sono il modello *in vitro* per eccellenza, rappresentato da un gruppo di cellule eucariotiche capaci di crescere e proliferare *in vitro* in particolari condizioni. Grazie a questo modello semplificato è possibile eseguire studi su processi fisiologici e/o patologici, testare sostanze come farmaci, fitoterapici, sostanze tossiche o agenti biologici come virus o batteri.

Le colture cellulari rappresentano un substrato semplificato e facilmente riproducibile. Si tratta di un sistema plastico e le condizioni ambientali (temperatura, ossigeno, anidride carbonica, umidità) sono facilmente controllabili grazie all'utilizzo di strumenti come l'incubatore.

Come tutti i metodi *in vitro* ha il vantaggio di ridurre l'utilizzo di cavie animali per la sperimentazione. Tuttavia è bene sottolineare che negli studi farmacologici il sistema *in vitro* mostra un problema di dosaggio: la dose di un farmaco, ad esempio, che mostra effetti benefici nel sistema *in vitro*, potrebbe non dare effetti in un sistema *in vivo*, per cui dopo un primo screening *in vitro* è necessario comunque effettuare test *in vivo*.

Se da un lato la "semplicità" del sistema è un vantaggio, dall'altro l'isolamento delle cellule dal tessuto d'origine può provocare perdita di funzioni specifiche del tessuto o dell'organo da cui sono state prelevate. Se quindi da un lato le variabili ambientali più critiche (O₂, CO₂, umidità ecc.) sono controllabili, il microambiente non è ancora riproducibile, per cui il sistema non è completamente fedele al vivo e i risultati sperimentali potrebbero essere limitati al modello cellulare. Restano pertanto da tenere in considerazione queste limitazioni all'atto dell'allestimento di un qualsiasi esperimento.

Colture cellulari: colture primarie e linee continue⁴³

Esistono due tipologie principali di colture cellulari: le colture cellulari **primarie** e le **linee cellulari** a crescita continua.

Le **colture primarie** sono composte da cellule che derivano da un espunto di tessuto od organo. Queste cellule sono in grado di duplicarsi solo per un numero limitato di passaggi, poi vanno incontro a senescenza, e questo tipo di coltura viene detto "a vita finita".

Le **linee cellulari** sono composte da cellule in grado di replicarsi per un numero illimitato di passaggi. La linea cellulare si ottiene da una coltura primaria stabilizzata che ha subito il processo di **immortalizzazione**, mediante trasformazione spontanea (cellule Vero, BHK-21, CHO, MDCK, Hi5) o agenti chimici o virali (PER.C6). La linea cellulare può anche derivare da un tessuto tumorale per "natura" già immortalizzato, di cui un esempio sono le cellule HeLa.

⁴² <https://www.biopills.net/colture-cellulari/>

Fisiologia cellulare e Laboratorio di Colture cellulari
Role of Cell Culture Technology in new Vaccine Development
Vaccine manual - FAO

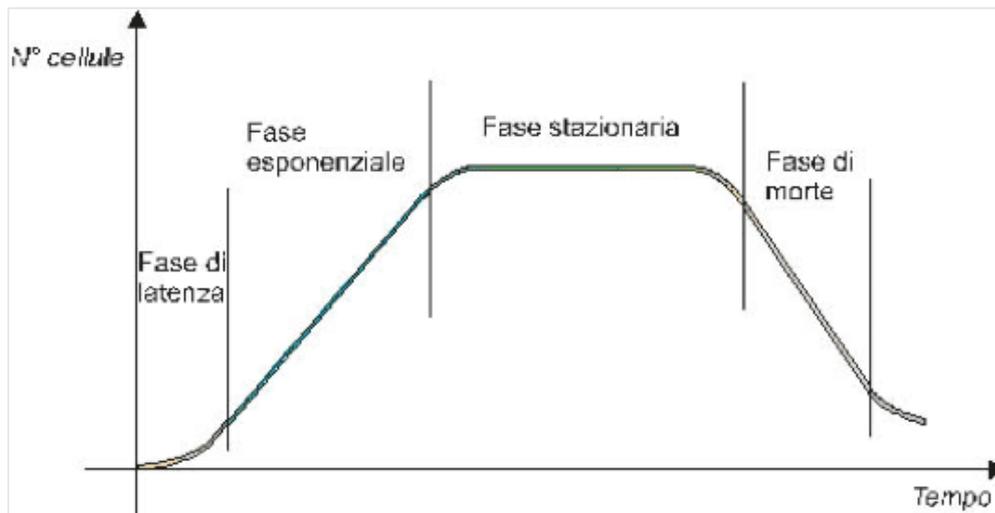
Zahoor, Muhammad Asif & Khurshid, Mohsin & Qureshi, Rabia & Naz, Aneeqa & Shahid, Muhammad
Cell culture-based viral vaccines: Current status and future prospects.
Future Virology. (2016). 11. 10.2217/fvl-2016-0006.
<https://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/fvl-2016-0006>

Genzel Y.
Designing cell lines for viral vaccine production: Where do we stand?
Biotechnol J. 2015 May;10(5):728-40. doi: 10.1002/biot.201400388. Epub 2015 Apr 22.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25903999/>

⁴³ Jordan I, Sandig V.
Matrix and backstage: cellular substrates for viral vaccines.
Viruses. 2014;6(4):1672-1700. Published 2014 Apr 11. doi:10.3390/v6041672
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4014716/>

Aubrit F, Perugi F, Léon A, Guéhenneux F, Champion-Arnaud P, Lahmar M, Schwamborn K.
Cell substrates for the production of viral vaccines.
Vaccine. 2015 Nov 4;33(44):5905-12. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.06.110. Epub 2015 Jul 15.
<https://www.semanticscholar.org/paper/Cell-substrates-for-the-production-of-viral-Aubrit-Perugi/45023a52e5f48615f0dfd3fa215943f81761122d>

La crescita e la vita di una coltura cellulare è rappresentata dalla **curva di crescita**, che sarà diversa a seconda del tipo di coltura.



<https://www.biopills.net/culture-cellulari/>
Curva di crescita di una coltura cellulare primaria

La tipica curva di crescita di una coltura primaria può essere suddivisa in quattro fasi:

- Durante la **prima fase** le cellule si adattano alle condizioni *in vitro*. Questa è la fase più critica, è caratterizzata da una crescita lenta ed è detta **fase di latenza**.
- Durante la **seconda fase** le cellule crescono in maniera regolare, si sono adattate alle condizioni *in vitro* per cui crescono con velocità costante seguendo un caratteristico tempo di duplicazione a seconda del tipo cellulare. Questa **fase** viene detta **esponenziale**.
- Durante la **terza fase** inizia il processo di senescenza, si ha un arresto della moltiplicazione cellulare e questa **fase** viene detta **stazionaria**.
- La **quarta fase** è quella di **morte**, si ha un esaurimento della coltura cellulare – in cui la coltura cellulare termina la sua vita.

Le linee cellulari stabilizzate non mostrano né la fase stazionaria, né la fase di morte. Nel caso di queste colture, la crescita resta esponenziale poiché le cellule hanno subito il processo di immortalizzazione. L'**immortalizzazione** può avvenire in maniera spontanea, ad esempio a causa di alterazioni del ciclo cellulare, oppure attraverso l'uso di agenti chimici (carcinogeni), fisici (irradiamento a raggi UV) o biologici (introduzione di geni virali).

Le linee cellulari possono anche derivare da tumori, come nel caso delle cellule HeLa: le cellule tumorali proliferano in maniera incontrollata, per varie modificazioni riescono ad eludere i sistemi che regolano la proliferazione cellulare eccessiva, quindi l'immortalizzazione è intrinseca.

Le colture primarie solitamente si coltivano in laboratorio, mentre per le linee cellulari si può attingere dalle **Biobanche**.

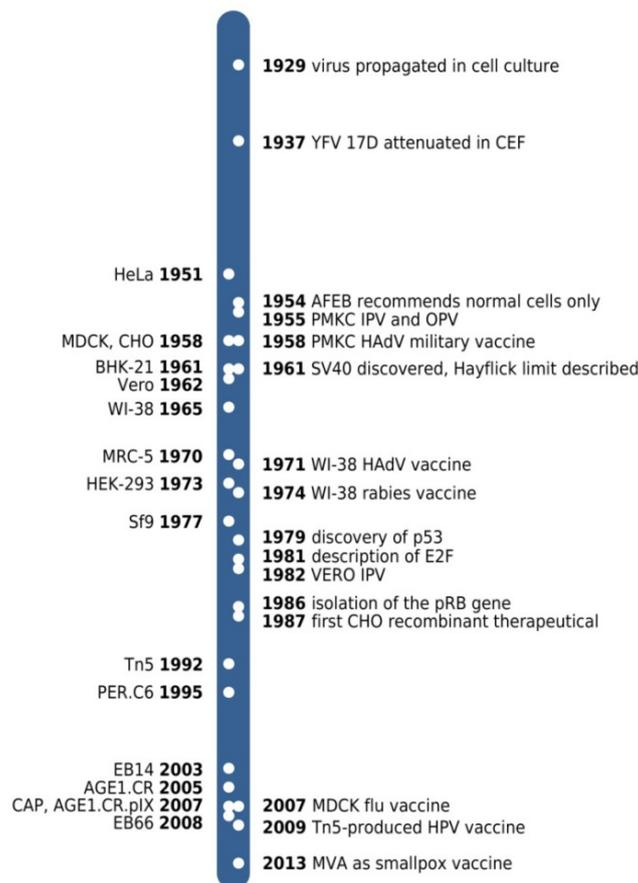
La Biobanca è un servizio che si occupa di raccogliere, conservare e distribuire il materiale biologico utile alla ricerca. Custodisce inoltre insieme al campione tutti i dati e le informazioni ad esso associati.

Le linee cellulari, solitamente, perdono alcune caratteristiche tipiche della tipologia cellulare di partenza (ad esempio caratteristiche morfologiche o recettoriali) e spesso il processo di immortalizzazione è la causa di queste modifiche.

Per questo motivo le colture primarie sono il modello più vicino al *vivo*, ma sono anche più delicate per le condizioni di crescita che richiedono.

Esistono anche altri tipi di colture cellulari:

- **Linea cellulare clonale:** deriva da una singola cellula (clone) che produce una popolazione omogenea per mitosi
- **Linea cellulare diploide (DCL):** una linea cellulare con una durata di vita *in vitro* finita in cui i cromosomi sono accoppiati (o euploidi, cioè con un numero normale di cromosomi) e sono strutturalmente identici a quelli della specie da cui sono stati derivati. (es. WI-38, MRC-5)
- **Colture d'organo o istotipiche:** si tratta di piccole porzioni di organo o di tessuto coltivate *in vitro*. In questo caso si mantiene inalterato il rapporto tra le diverse componenti cellulari, ma queste colture hanno vita breve poiché i nutrienti contenuti nel terreno e l'ossigeno non riescono a raggiungere in maniera efficace le porzioni più interne dell'organo o del tessuto. Possiamo inserire in questa categoria anche colture istotipiche ottenute prima isolando le cellule e poi riaggregandole utilizzando **scaffold** artificiali, in modo da ricreare una struttura simile al tessuto;
- **Co-coltura:** in uno stesso sistema sono presenti due tipi cellulari diversi (ad esempio endoteliali ed epiteliali) in modo da aumentare la complessità del modello *in vitro*.



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4014716/>

Linea temporale delle derivazioni della linea cellulare (a sinistra della barra temporale) e sviluppi chiave (lato destro) a cui si fa riferimento nel testo. YFV 17D, ceppo del virus della febbre gialla 17D; CEF, fibroblasti di embrioni di pollo; AFEB, American Forces Epidemiological Board; PMKC, cellula renale primaria di scimmia; IPV e OPV, rispettivamente vaccino antipolio inattivato e orale; HAdV, adenovirus umano; MVA, virus del vaccino modificato Ankara.

Di seguito si riportano la tipologia e le caratteristiche delle linee cellulari utilizzate per la produzione di vaccini per uso umano.

Most common cell substrates currently used for the production of human viral vaccines.

Cell line	Cell type and origin	Viral susceptibility (not exhaustive list)	Examples of vaccine candidate in development	Marketed vaccines for human use
Primary cells				
CEF	Chicken embryo fibroblast	Yellow fever; rabies; TBE; measles; mumps	MVA-based vaccines; HIV; Q fever	Rabies (Rabipur®); TBE (FSME-Immun®, Encepur®); measles (Attenuvax®); mumps (Mumpsvax®)
Diploid cell lines				
MRC5	Human embryonic lung	Varicella zoster virus; polioviruses; rabies; hepatitis A	Rabies	Varicella zoster virus (Varilrix®; Biopox®; ProQuad®); polioviruses (Poliovax®); rabies (Imovax®); hepatitis A (VAQTA®)
WI-38	Human embryonic lung	Rubella; adenoviruses	–	Rubella (Meruvax® II); adenoviruses (Adenovirus Type 4 and Type 7 Vaccine, Live, Oral®)
Continuous cell lines				
MDCK ^a	Canine kidney	Influenza virus type A and B; Human coxsackievirus B3, B4 and B5; reovirus type 2; AAV 4 and 5; vaccinia virus; VSV; Human poliovirus 2	Seasonal & pandemic flu; enterovirus	Seasonal flu (Optaflu®, Flucelvax®)
Vero	African green monkey kidney	Influenza virus type A and B; Measles virus; vaccinia virus; rubella virus; mumps virus; NDV; polioviruses; arbovirus (including dengue); rabies; RSV; parainfluenza viruses; reoviruses	Enterovirus; RSV; HFMD; influenza virus, rabies	Pandemic (Celvapan®) & seasonal flu (Preflucel®); smallpox (ACAM2000®); JEV (Ixiaro®, IMOJEV®); polioviruses (OPV®, IMOVAX Polio®, Poliorix®, Adacel®); rabies (VERORAB®, Abhayrab®), rotaviruses (RotaRix®, RotaTeq®)
PER.C6®	Human embryonic retina	Adenovirus; influenza virus; lentivirus; polioviruses; Ebola	Influenza virus; West Nile virus	–
AGE1.CR®	Duck retina	Smallpox; fowlpox; influenza virus; alphaviruses	MVA-based vaccines; influenza virus	–
EB66®	Duck embryos	Influenza virus; measles virus; mumps virus; HSV; poxviruses; NDV; Sindbis virus; Sendai virus; VEEV; yellow fever; VSV	Pandemic & seasonal flu; NDV; MVA recombinant vaccines	Pandemic flu (no commercial name yet)

Note: CEF, chicken embryo fibroblast; MRC, Medical Research Council; WI, Wistar Institute; MDCK, Madin Darby canine kidney; AAV, adeno-associated virus; VSV, vesicular stomatitis virus; NDV, Newcastle disease virus; RSV, respiratory syncytial virus; HSV, herpes simplex virus; MVA, modified vaccinia virus Ankara; JEV, Japanese encephalitis virus; HIV, human immunodeficiency virus; TBE, tick-borne encephalitis; HFMD, hand, foot and mouth disease; VEEV, Venezuelan equine encephalitis virus.

Cell substrates for the production of viral vaccines.

<https://www.semanticscholar.org/paper/Cell-substrates-for-the-production-of-viral-Aubrit-Perugi/45023a52e5f48615f0dfd3fa215943f81761122d>

Main characteristics of most common cell substrates currently used for the production of human viral vaccines—Biological characteristics.

Cell line	Process of derivation	Karyotype	Genetic stability	Tumorigenicity/ Oncogenicity	RT activity from retroviral origin	Adventitious agents
Primary cells CEF [87]	Derived from embryonated eggs	2n – 76	–	NT/NT	Yes	Risk of endogenous retrovirus particles
Diploid cell lines MRC5 (ATCC CCL-171) [37] WI-38 (ATCC CCL-75) [37]	Derived from a normal embryonic lung Derived from a normal embryonic lung	46 (XY), polyploidy rate of 3.6% 46 (XY)	Yes Yes	No/NT No/NT	No No	No Micrococcus at P8 (cleared with neomycin)
Continuous cell lines MDCK [88–90] Vero [91] PER.C6® [92]	Derived from canine kidney Derived from African green monkey kidney Embryonic retinal cells transformed by the insertion of Ad5 E1 genes Duck retinal cells immortalized with the Ad5 E1 genes Derived from Duck embryonic stem cell	Undisclosed (hyperdiploid) Hypodiploid (2n – 58) 46 (XX)	Yes Yes –	Yes ^a /No No/No ^b Yes ^c /No	No No No	No No No
AGE1.CR® [93] EB66®	– Derived from Duck embryonic stem cell	– Diploid (2n – 78)	Yes Yes	No/NT Yes ^d /No	No No	No No

Note: RT, reverse transcriptase; NT, not tested; CEF, chicken embryo fibroblast; MRC, Medical Research Council; NT, not tested; WI, Wistar Institute; MDCK, Madin Darby canine kidney; ATCC, American Type Culture Collection; CCL, certified cell line; P, passage; Ad5, adenovirus 5.

^a Both high [88,89] and low [90] tumorigenicity have been reported depending on the tested subclone.

^b If passage level below p150.

^c Weakly tumorigenic: only after injection of 10⁷ cells.

^d Weakly tumorigenic: only after injection of 10⁷ cells (unpublished data).

Cell substrates for the production of viral vaccines.

Per un approfondimento sulle varie linee cellulari si suggerisce la lettura dell'articolo
[Matrix and Backstage: Cellular Substrates for Viral Vaccines](#)

Criticità nel controllo qualità

Fin dalla prima generazione di vaccini prodotti impiegando tessuti animali, le principali preoccupazioni delle agenzie regolatorie (AR), i produttori e le autorità sanitarie pubbliche sono la possibile presenza di agenti o componenti cellulari avventizi (materiale genetico residuale proveniente dalla coltura cellulare e virus avventizi), o la trasformazione delle proteine nei prodotti vaccinali (es. reversione dei tossoidi vaccinali ⁴⁴).

In effetti, durante l'ultimo secolo sono stati evidenziati diversi casi significativi di contaminazione ⁴⁵, come la scoperta dell'SV40 in cellule renali di scimmia (RMK) utilizzate per produrre vaccini antipolio negli anni '60 ⁴⁶, virus batterici identificati in diversi vaccini virali vivi attenuati prodotti con sieri bovini contenenti batteriofagi all'inizio degli anni '70 ⁴⁷ e più recentemente, la rilevazione di sequenze di circovirus suino nei vaccini contro il rotavirus (Rotarix® e RotaTaq®) ⁴⁸.

Il progresso della scienza e della tecnologia e l'uso di metodi analitici più potenti, come il sequenziamento di ultima generazione (HTS, NGS) ⁴⁹ l'elettroforesi capillare e la spettrometria di massa applicate allo studio

⁴⁴ Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of diphtheria vaccines (adsorbed) Annex 4
https://www.who.int/biologicals/vaccines/Diphtheria_Recommendations_TRS_980_Annex_4.pdf?ua=1

⁴⁵ Petricciani J, Sheets R, Griffiths E, Knezevic I.
Adventitious agents in viral vaccines: lessons learned from 4 case studies.
Biologicals. 2014 Sep;42(5):223-36. doi: 10.1016/j.biologicals.2014.07.003. Epub 2014 Aug 16.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1045105614000748?via%3Dihub>

Klug B, Robertson JS, Condit RC, et al.
Adventitious agents and live viral vectored vaccines: Considerations for archiving samples of biological materials for retrospective analysis.
Vaccine. 2016;34(51):6617-6625. doi:10.1016/j.vaccine.2016.02.015
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5130882/>

⁴⁶ Sweet Bh, Hilleman Mr.
The vacuolating virus, S.V. 40.
Proc Soc Exp Biol Med. 1960 Nov;105:420-7. doi: 10.3181/00379727-105-26128.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13774265/>

Martini F, Corallini A, Balatti V, Sabbioni S, Pancaldi C, Tognon M.
Simian virus 40 in humans.
Infect Agent Cancer. 2007;2:13. Published 2007 Jul 9. doi:10.1186/1750-9378-2-13
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1941725/>

Rotondo JC, Mazzoni E, Bononi I, Tognon M, Martini F.
Association Between Simian Virus 40 and Human Tumors.
Front Oncol. 2019;9:670. Published 2019 Jul 25. doi:10.3389/fonc.2019.00670
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6669359/>

⁴⁷ Milch H, Fornosi F.
Bacteriophage contamination in live poliovirus vaccine.
J Biol Stand. 1975;3(3):307-10. doi: 10.1016/0092-1157(75)90034-7.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1158904/>

Moody EE, Trousdale MD, Jorgensen JH, Shelokov A.
Bacteriophages and endotoxin in licensed live-virus vaccines.
J Infect Dis. 1975 May;131(5):588-91. doi: 10.1093/infdis/131.5.588.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/805187/>

⁴⁸ Victoria JG, Wang C, Jones MS, et al.
Viral nucleic acids in live-attenuated vaccines: detection of minority variants and an adventitious virus.
J Virol. 2010;84(12):6033-6040. doi:10.1128/JVI.02690-09
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2876658/>

⁴⁹ McClenahan SD, Krause PR.
Towards dynamic monitoring of cell cultures using high throughput sequencing.
Vaccine. 2019 Feb 8;37(7):1001-1005. doi: 10.1016/j.vaccine.2018.12.019. Epub 2019 Jan 11.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30642729/>

delle matrici complesse⁵⁰, in grado di evidenziare contaminanti non rilevabili o precedentemente sconosciuti ha portato le AR a implementare nuove procedure di produzione e controllo nelle linee guida.

Il principio di base delle linee guida è che qualità, sicurezza, potenza, purezza ed efficacia del vaccino si basano su un approccio globale della valutazione del rischio che influisce sulla selezione e caratterizzazione delle materie prime, sul controllo del prodotto intermedio e finale ma anche sulla progettazione e la convalida del processo di produzione.⁵¹ Tuttavia, le analisi di alcuni vaccini in commercio svolte con il

Cheval J, Muth E, Gonzalez G, et al.
Adventitious Virus Detection in Cells by High-Throughput Sequencing of Newly Synthesized RNAs: Unambiguous Differentiation of Cell Infection from Carryover of Viral Nucleic Acids.
mSphere. 2019;4(3):e00298-19. Published 2019 Jun 5. doi:10.1128/mSphere.00298-19
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6553555/>

Khan AS, Blümel J, Deforce D, et al.
Report of the second international conference on next generation sequencing for adventitious virus detection in biologics for humans and animals.
Biologicals. 2020;67:94-111. doi:10.1016/j.biologicals.2020.06.002
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7351673/>

Cleveland MH, et al
Report of the 2019 NIST-FDA workshop on standards for next generation sequencing detection of viral adventitious agents in biologics and biomanufacturing.
Biologicals. 2020 Mar;64:76-82. doi: 10.1016/j.biologicals.2020.02.003. Epub 2020 Feb 22.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1045105620300245?via%3Dihub>

Luciani F, Bull RA, Lloyd AR.
Next generation deep sequencing and vaccine design: today and tomorrow.
Trends Biotechnol. 2012;30(9):443-452. doi:10.1016/j.tibtech.2012.05.005
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7127335/>

⁵⁰ Mao HH, Chao S.
Advances in Vaccines.
Adv Biochem Eng Biotechnol. 2020;171:155-188. doi:10.1007/10_2019_107
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7120466/>

Advances and Challenges in Vaccine Development and Manufacture

Viviani L, et al
Global harmonization of vaccine testing requirements: Making elimination of the ATT and TABST a concrete global achievement.
Biologicals. 2020 Jan;63:101-105. doi: 10.1016/j.biologicals.2019.10.007. Epub 2019 Nov 4.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1045105619301137>

⁵¹ Lebron JA, Wolf JJ, Kaplanski CV, Ledwith BJ.
Ensuring the quality, potency and safety of vaccines during preclinical development.
Expert Rev Vaccines. 2005 Dec;4(6):855-66. doi: 10.1586/14760584.4.6.855.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16372881/>

McClenahan SD, Krause PR.
Towards dynamic monitoring of cell cultures using high throughput sequencing.
Vaccine. 2019 Feb 8;37(7):1001-1005. doi: 10.1016/j.vaccine.2018.12.019. Epub 2019 Jan 11.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30642729/>

Knezevic I, Stacey G, Petricciani J,
WHO Study Group on cell substrates. WHO Study Group on cell substrates for production of biologics, Geneva, Switzerland, 11-12 June 2007.
Biologicals, 2008;36:203-11.
https://www.who.int/biologicals/publications/meetings/areas/vaccines/cells/Cells.FINAL.MtgRep.IK.26_Sep_07.pdf?ua=1

Investigating Viruses in Cells Used to Make Vaccines; and Evaluating the Potential Threat Posed by Transmission of Viruses to Humans
<https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/biologics-research-projects/investigating-viruses-cells-used-make-vaccines-and-evaluating-potential-threat-posed-transmission>

Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks
https://www.who.int/biologicals/Cell_Substrates_clean_version_18_April.pdf?ua=1

Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks Replacement of Annex 1 of WHO Technical Report Series, No. 878
http://158.232.12.119/biologicals/vaccines/TRS_978_Annex_3.pdf

Guideline on quality, non-clinical and clinical aspects of live recombinant viral vectored vaccines
https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-quality-non-clinical-clinical-aspects-live-recombinant-viral-vectored-vaccines_en.pdf

supporto dell'associazione COVELVA hanno fatto emergere numerose criticità relativamente alla qualità di tali vaccini.

Per un approfondimento sui contaminanti presenti nei vaccini in commercio si rimanda alla sezione [VACCINEGATE \(CORVELVA\)](#) oppure [DOSSIER ANALISI CORVELVA \(studiesalute.it\)](#)

Tumorigenicità e oncogenicità dei contaminanti⁵²

ONCOGENICITÀ: la capacità di un agente acellulare - come un agente chimico, un virus, un acido nucleico virale, un gene virale o elementi subcellulari - di indurre la formazione di tumori nelle cellule normali di un animale.

TUMORIGENICITÀ: la capacità di una popolazione cellulare inoculata in un modello animale di produrre un tumore mediante proliferazione nel sito di inoculazione e/o in un sito distante mediante metastasi.

I tumori che si presentano in un test di tumorigenicità contengono cellule derivate dalle cellule inoculate, mentre i tumori che si presentano in un test di oncogenicità sono derivati dall'ospite. L'attività oncogenica dei substrati cellulari potrebbe essere dovuta al DNA del substrato cellulare (e forse ad altri componenti cellulari) o ad un agente virale oncogenico presente nelle cellule.

La tumorigenicità descrive la capacità delle cellule inoculate di proliferare in un ricevente. Non sembrano esserci marcatori molecolari per questa proprietà.

Sebbene le aberrazioni cromosomiche siano la caratteristica peculiare di molti tumori, sono state osservate anche nella linea cellulare MRC-5, considerata non cancerogena dalle agenzie regolatorie⁵³ e quindi si ritiene

ICH Topic Q 5 D Quality of Biotechnological Products: Derivation and Characterisation of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products
https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-5-d-derivation-characterisation-cell-substrates-used-production-biotechnological/biological-products-step-5_en.pdf

ICH Topic Q 5 A (R1) Quality of Biotechnological Products: Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin
https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-5-r1-viral-safety-evaluation-biotechnology-products-derived-cell-lines-human-animal-origin_en.pdf

ICH Topic Q 6 B Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products
https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-6-b-test-procedures-acceptance-criteria-biotechnological/biological-products-step-5_en.pdf

Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Materials Used in the Production of Viral Vaccines for Infectious Disease Indications
<https://www.fda.gov/media/78428/download>

European Pharmacopoeia 5.0. 5.2.3. Cell substrates for the production of vaccines for human use. January 2005.

⁵² Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Materials Used in the Production of Viral Vaccines for Infectious Disease Indications (FDA)

⁵³ Jacobs JP, Jones CM, Baille JP.
Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5.
Nature. 1970 Jul 11;227(5254):168-70. doi: 10.1038/227168a0.
<https://www.nature.com/articles/227168a0>

Jacobs JP.
Updated results on the karyology of the WI-38, MRC-5 and MRC-9 cell strains.
Dev Biol Stand. 1976 Dec 13-15;37:155-6. PMID: 1031681.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1031681/>

von Seefried A, Walton MJ, MacMorine HG.

che la stabilità del cariotipo di una linea cellulare non sia predittiva⁵⁴ e che la tumorigenicità vada perciò determinata sperimentalmente.

L'uso di linee cellulari immortalizzate e cancerogene per la produzione di vaccini virali è oggetto di discussione dagli anni '90⁵⁵. Le principali preoccupazioni associate alla tumorigenicità dei substrati cellulari sono l'induzione di alloinnesti tumorali, il trasferimento di virus noti o sconosciuti e il trasferimento di agenti oncogeni o componenti cellulari che potrebbero innescare tumori. Pertanto, le agenzie regolatorie hanno emanato delle linee guida per lo studio dell'attività tumorigenica per tutte le linee cellulari diploidi (ad eccezione delle MRC-5 e WI-38) e continue, poiché le cellule potrebbero acquisire attività tumorigenica man mano che vengono espansate in coltura⁵⁶.

Le linee cellulari sono classificate come cancerogene quando possiedono la capacità di formare un tumore dopo l'iniezione di cellule intatte in animali geneticamente immunocompromessi (ad es. topi nudi, con immunodeficienza combinata grave (SCID) o animali immunocompromessi ottenuti inattivando le funzioni dei linfociti T con globulina anti-timocitaria, sieri antitimociti o anti-linfociti).

È possibile definire il fenotipo tumorigenico del substrato cellulare valutando la cinetica della formazione del tumore alla dose di 10^7 , 10^5 , 10^3 e 10 cellule / animale, per almeno 4 mesi di osservazione. La determinazione della dose che induce il tumore nel 50% degli animali (TPD₅₀), il tempo necessario per lo sviluppo del tumore e la capacità di formare metastasi sono parametri che devono essere valutati per un dato substrato cellulare. L'attuale comprensione è che un TPD₅₀ basso (capacità di formare tumori a 10^1 - 10^4 cellule/animale; come ad es. le cellule di HeLa) è correlato a un rischio più elevato di indurre lo sviluppo neoplastico. Non esiste una regola generale per il substrato cellulare e/o l'accettabilità del prodotto finito a questo riguardo, ma piuttosto è necessaria una discussione con le AR caso per caso.

L'uso di cellule tumorigeniche e di derivazione tumorale per la produzione di vaccini richiede uno studio di oncogenicità che deve essere eseguito utilizzando DNA cellulare (≥ 100 g) e lisato cellulare (ottenuto da 10^7 cellule) iniettati nei topi nudi neonati (ad esempio <3 giorni di età), criceti e ratti appena nati. Gli animali vengono esaminati per verificare la formazione di noduli per un periodo di almeno 4 mesi. Alla fine del periodo di osservazione, gli animali vengono sacrificati ed esaminati per la prova della formazione del tumore nel sito di iniezione, nonché per la prova di lesioni metastatiche.⁵⁷

Il componente più importante potenzialmente associato all'attività di trasformazione è il DNA derivato dalla linea cellulare.

Il DNA residuo potrebbe rappresentare un rischio per il prodotto finale a causa del potenziale oncogenico e/o infettivo. Esistono diversi meccanismi potenziali mediante i quali il DNA residuo potrebbe essere oncogenico, inclusa l'integrazione e l'espressione di oncogeni codificati o la mutagenesi inserzionale a seguito dell'integrazione del DNA. Il DNA residuo potrebbe anche essere in grado di trasmettere infezioni virali se sono presenti provirus retrovirali, copie integrate di virus a DNA o genomi extracromosomici.

Karyology: vaccine manufacturers' views.
Dev Biol Stand. 1976 Dec 13-15;37:169-75. PMID: 801470.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/801470/>

⁵⁴ Annex 3 Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks Replacement of Annex 1 of WHO Technical Report Series, No. 878
https://www.who.int/biologicals/vaccines/TRS_978_Annex_3.pdf

⁵⁵ Lewis AM Jr, Krause P, Peden K.
A defined-risks approach to the regulatory assessment of the use of neoplastic cells as substrates for viral vaccine manufacture.
Dev Biol (Basel). 2001;106:513-35.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11761266/>

⁵⁶ Manohar M, Orrison B, Peden K, Lewis AM Jr.
Assessing the tumorigenic phenotype of VERO cells in adult and newborn nude mice.
Biologicals. 2008 Jan;36(1):65-72. doi: 10.1016/j.biologicals.2007.06.002. Epub 2007 Oct 22.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17933552/>

⁵⁷ WHO Expert Committee on Biological Standardization. Sixty-first report. WHO 579 Technical Report Series, No. 978, 2013 Annex 3.
Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks
https://www.who.int/biologicals/expert_committee/TRS_978_61st_report.pdf?ua=1

I rischi di oncogenicità e infettività del DNA proveniente dal substrato cellulare possono essere ridotti diminuendo la sua attività biologica. Ciò può essere ottenuto diminuendo la quantità di DNA residuo e riducendo la dimensione del DNA (ad esempio, mediante trattamento con DNAsi o altri metodi) al di sotto della dimensione di un gene funzionale (sulla base delle prove attuali, circa 200 coppie di basi). L'inattivazione chimica può ridurre sia le dimensioni che l'attività biologica del DNA.⁵⁸

Le AR, pur richiedendo la validazione dei metodi di inattivazione/eliminazione del DNA residuo e degli agenti avventizi supportano comunque l'ipotesi che i complessi ribonucleoproteici e altre entità che si trovano comunemente nei lisati cellulari non possano persistere abbastanza a lungo da supportare la trasformazione maligna che si ipotizza proceda in più fasi⁵⁹.

Non è stata definita una quantità massima ammissibile di DNA derivato dalla linea cellulare nei vaccini orali e intranasali, e le formulazioni finali dovrebbero essere discusse con le autorità⁶⁰.

Non sono inoltre definiti livelli per i vaccini prodotti su substrato cellulare diploide o primario.

Tuttavia, un vaccino parenterale prodotto su una linea cellulare continua può contenere non più di 10 ng di DNA residuale per dose⁶¹. Questo valore è il risultato di considerazioni che stimano la probabilità che un oncogene venga codificato e trasferito con successo con un dato segmento di DNA co-purificato. La frammentazione enzimatica o il trattamento con β -propiolattone può ridurre ulteriormente qualsiasi rischio associato alla contaminazione del DNA⁶², ma alcune fasi di elaborazione non possono essere eseguite senza perdere la potenza dei vaccini vivi.

Sebbene l'uso della linea cellulare diploide di origine fetale polmonare MRC-5 sia ben consolidato (è utilizzata per la produzione di vaccini dagli anni '60), lo studio del cariotipo si è interrotto con l'ultimo studio "Chromosomal characterization of MRC-5 cell banks utilizing G-banding technique"⁶³ in cui si sostiene che la traslocazione t(7; 12) rilevata in questa linea non comporta alcun rischio di tumorigenicità nei topi e che quindi tali linee cellulari sono substrati biologici sicuri e non dovrebbero richiedere alcuna analisi cromosomica prima di essere utilizzate come substrato cellulare per la produzione di vaccini con virus vivi.

Tale considerazione è ribadita nella linea guida dell'FDA:

[Guidance for Industry \(FDA\) Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Materials Used in the Production of Viral Vaccines for Infectious Disease Indications:](#)

⁵⁸ Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Materials Used in the Production of Viral Vaccines for Infectious Disease Indications (FDA)

⁵⁹ Hahn WC, Weinberg RA. Modelling the molecular circuitry of cancer. Nat Rev Cancer. 2002 May;2(5):331-41. doi: 10.1038/nrc795. <https://doi.org/10.1038/nrc795>

⁶⁰ World Health Organization; Geneva, Switzerland: 2013. Recommendations for the Evaluation of Animal Cell Cultures as Substrates for the Manufacture of Biological Medicinal Products and for the Characterization of Cell Banks. (WHO Technical Report Series). TRS 978, Annex 3.

⁶¹ Grachev V, Magrath D, Griffiths E. WHO requirements for the use of animal cells as in vitro substrates for the production of biologicals (Requirements for biological substances no. 50). Biologicals. 1998 Sep;26(3):175-93. doi: 10.1006/biol.1998.0153. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20226252/>

⁶² Yang H, Zhang L, Galinski M. A probabilistic model for risk assessment of residual host cell DNA in biological products. Vaccine. 2010 Apr 26;28(19):3308-11. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.02.099. Epub 2010 Mar 10.

⁶³ Rosolowsky M, McKee R, Nichols W, Garfinkle B. Chromosomal characterization of MRC-5 cell banks utilizing G-banding technique. Dev Biol Stand. 1998;93:109-17. PMID: 9737385 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9737385/>

Prockop DJ, Keating A. Relearning the lessons of genomic stability of human cells during expansion in culture: implications for clinical research. Stem Cells. 2012 Jun;30(6):1051-2. doi: 10.1002/stem.1103. <https://stemcellsjournalsonline.wiley.com/doi/full/10.1002/stem.1103>

- un ceppo di cellule diploidi dovrebbe rimanere diploide sempre. Se tali caratteristiche non sono stabili, è necessario dimostrare che l'instabilità non influisce negativamente sulla produzione o sulla conformità del prodotto.
- per i ceppi di cellule diploidi umane ampiamente utilizzati, come le cellule MRC-5 e WI-38, la misurazione del DNA residuo potrebbe non essere necessaria perché non consideriamo il DNA residuo di queste cellule diploidi umane un problema di sicurezza
- dovrebbe essere limitato il DNA residuo per le cellule continue non tumorigeniche, come le cellule VERO a basso numero di passaggi, a meno di 10 ng/dose per l'inoculazione parenterale come raccomandato dall'OMS. (pag 37)
- Si consiglia di monitorare la stabilità genetica del ceppo di cellule diploidi durante la produzione (pag. 11)

Priorix Tetra contiene ceppi virali prodotti separatamente in cellule di embrioni di pollo (parotite e morbillo) e in cellule diploidi umane MRC-5 (rosolia e varicella). Le linee cellulari utilizzate per Priorix Tetra includono linee di cellule diploidi umane che non possono dividersi continuamente. Si noti che, secondo la Farmacopea Europea, **le linee di cellule diploidi MRC-5 non sono tumorigeniche, come dimostrato da decenni di uso e controllo, e pertanto non si applica un limite massimo per il DNA di cellule MRC-5.** (EMA request reference ASK-43967 3 August 2018)

Approfondimento: [discussione-NGS-EMA](#)

Da tale data quindi non sono noti altri studi pubblicati di caratterizzazione della stabilità genetica delle linee cellulari diploidi utilizzate per la produzione dei vaccini.

Nel corso dell'indagine sulla qualità del vaccino Priorix Tetra, è stato sequenziato il genoma intero del DNA fetale rilevato in quantità consistenti (fino a 300 volte superiore al limite di 10 ng/dose) in tutti i campioni analizzati. I risultati indicano la presenza di un genoma altamente modificato anche in oncogeni e quindi con potenziale tumorigenico.

Come si vedrà più sotto, gli studi in vitro della dr.ssa Deisher confermano la capacità trasformante del DNA fetale contenuto nei vaccini pediatrici a virus attenuati.

SEQUENZIAMENTO DELL'INTERO GENOMA DEL DNA FETALE PRESENTE NEL VACCINO PRIORIX TETRA

METODICA: sequenziamento con tecnologia NGS (next generation sequencing) dell'intero genoma del DNA residuale derivante dalla linea cellulare MRC-5 allo scopo di mappare mutazioni di singolo nucleotide (SNP), inserzioni e delezioni di sequenze più o meno lunghe avvenute in determinate posizioni del genoma e variazioni nel numero di copie di porzioni di genoma/geni (CNV, copy number variants).

Il genoma umano di riferimento (linea cellulare MRC-5) è risultato essere coperto da reads originate dal DNA vaccinale per il 99.76%, quindi per quasi tutta la sua interezza. **Il DNA umano fetale rappresentato in questo vaccino è quindi un genoma individuale completo ovvero è presente nel vaccino DNA genomico di tutti i cromosomi di un individuo di sesso maschile corrispondente a quello della linea MRC-5**

- le varianti di singole basi del DNA (SNP) sono polimorfismi, cioè variazioni del materiale genetico a carico di un unico nucleotide. Le 'InDels' sono invece piccole inserzioni e delezioni di meno di 50pb di lunghezza e costituiscono un'altra classe di varianti genomiche nel genoma umano.

Sono stati identificati nel genoma umano vaccinale un totale di circa 3.6 milioni di SNP (di cui il 98.31% già riportati nel database pubblico DBSNP e **61.805 nuovi** ovvero originali di questo DNA).

La quantità di SNP è in linea con quanto riportato in letteratura in un 'genoma umano tipico'

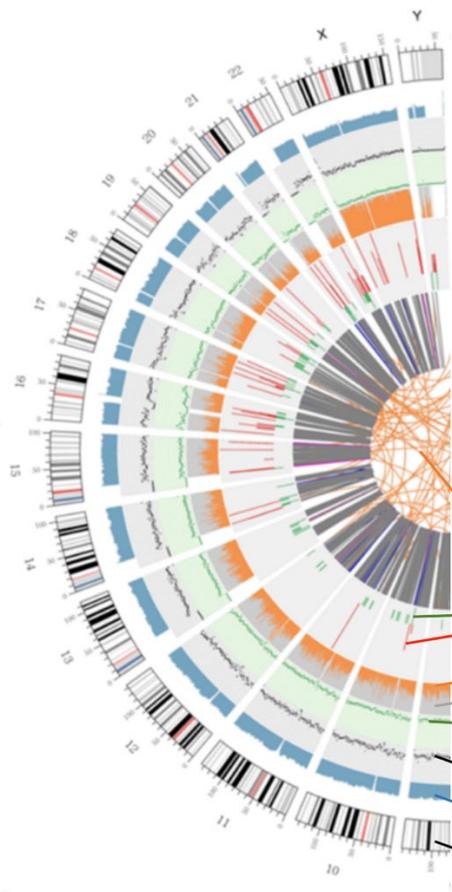
Le InDels risultano in quantità superiore rispetto a quanto riportato dal 'The 1000 Genomes Project Consortium' in 'A global reference for human genetic variation' (Nature, vol. 526, 10 ott. 2015) ovvero **800 mila rispetto a 600 mila**. Sono state identificate 804 mila InDels (di cui l'89.42% già riportate in DBSNP e **85.106 nuove**)

- le varianti in numero di copie (CNV) sono varianti genomiche dovute a variazioni nel numero di copie di frammenti relativamente grandi (più lunghi di 50 bp) tra genomi individuali. Esistono due tipi di CNV: tipo

‘gain’ (guadagno di copie) e tipo ‘loss’ (perdita di copie). Sono state rilevate nel genoma umano vaccinale **218 CNVS di cui 82 di tipo ‘gain’** (che coprono una porzione di genoma complessivamente pari a circa 6.9 milioni di paia di basi) e **136 CNVS di tipo ‘loss’** (che coprono una porzione di genoma di circa 70 milioni di basi).

- analisi di varianti in geni del cancro

l’analisi di varianti SNP, INDELS, CNV, SV, ristretta a 560 geni coinvolti in diverse forme di cancro umano ha evidenziato la **presenza di numerose varianti ‘originali’** ovvero non presenti in database pubblici, quindi non note in letteratura.



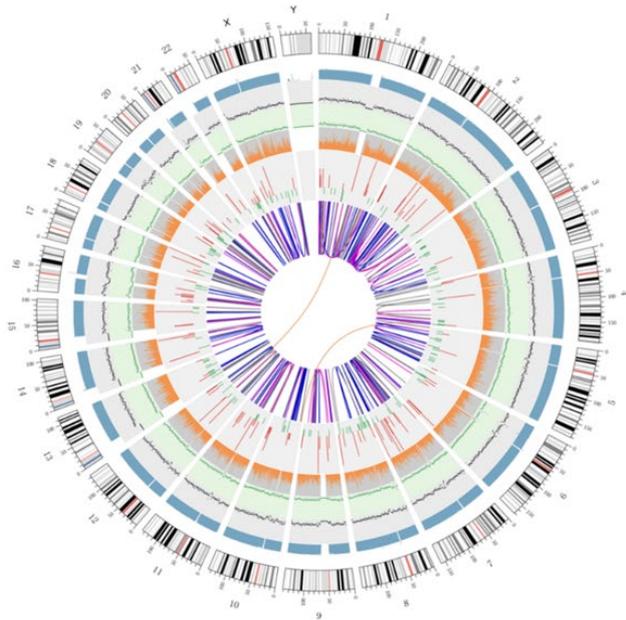
SIGNIFICATO DEI CERCHI CONCENTRICI

- 7) L’anello più centrale rappresenta l’inferenza di SV (Varianti Strutturali) nelle regioni esoniche e di splicing. TRA (arancione, traslocazioni), INS (verde, inserzioni), DEL (delezioni, grigio), DUP (duplicazioni, rosa) e INV (inversioni, blu).
- 6) Il sesto anello rappresenta l’inferenza di CNV (Varianti in numero di copie). Il rosso significa guadagno di pezzi di DNA e il verde significa perdita.
- 5) Il quinto anello rappresenta la proporzione di SNP in omozigosi (arancione) e in eterozigosi (grigio) in stile istogramma.
- 4) Il quarto anello (verde) rappresenta la densità snp in stile “grafico di dispersione”.
- 3) Il terzo anello (nero) rappresenta la densità delle INDELS in stile “grafico di dispersione”.
- 2) Il secondo anello (azzurro) rappresenta la copertura di reads in stile istogramma.
- 1) Il cerchio esterno (il primo cerchio) è il numero del cromosoma.

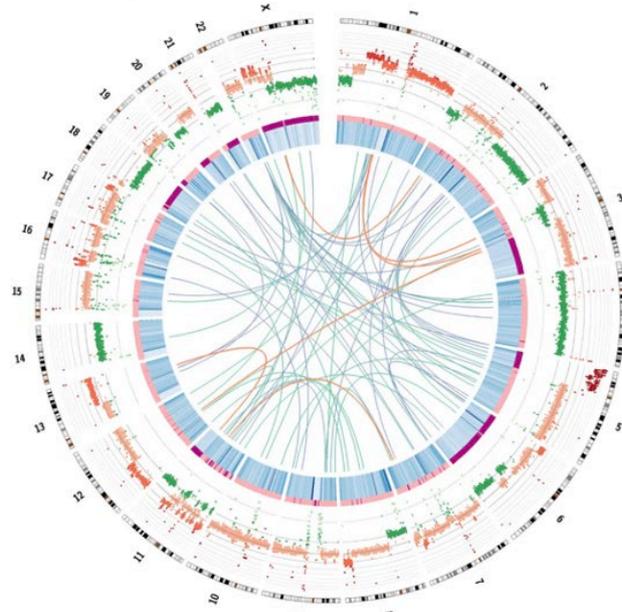
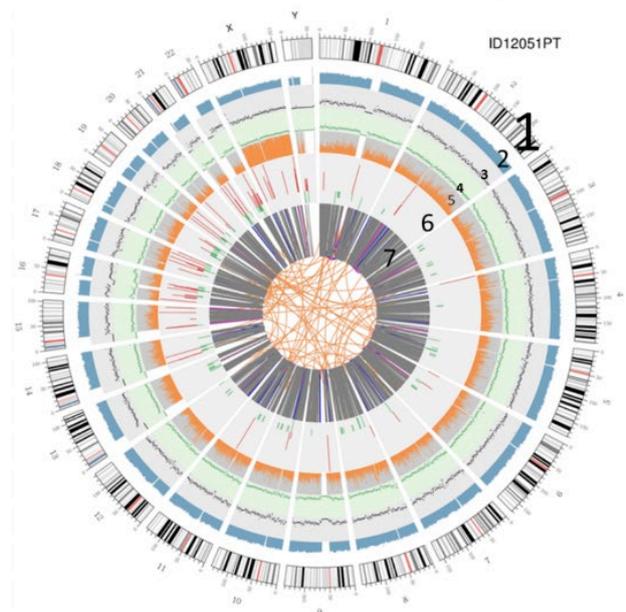
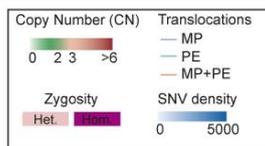
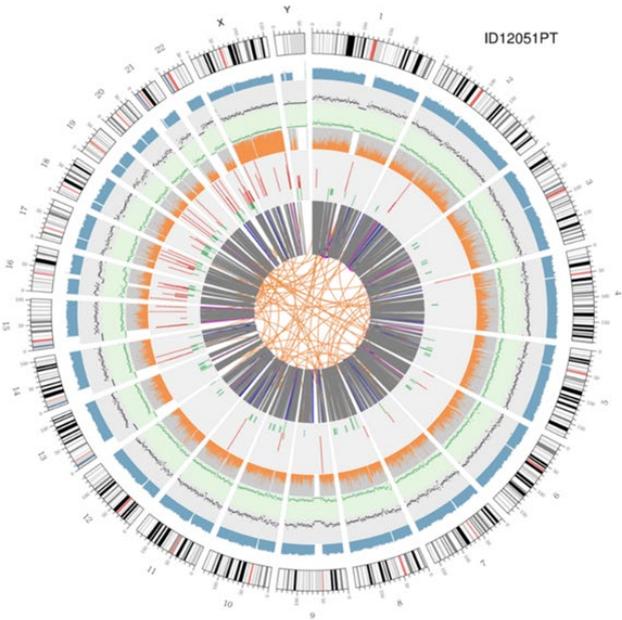
CIRCOS PLOT

Una rappresentazione grafica del genoma vaccinale chiamata “circos plot” (che si utilizza comunemente per rappresentare un genoma ri-sequenziato), è riportata di seguito, a fianco di un’altra che rappresenta un genoma ri-sequenziato a partire da DNA estratto da sangue di un individuo sano - genoma “normale”

ESEMPIO DI GENOMA 'NORMALE'
 (da sangue umano)



Priorix Tetra lot. A71CB256A, genoma
 umano MRC-5



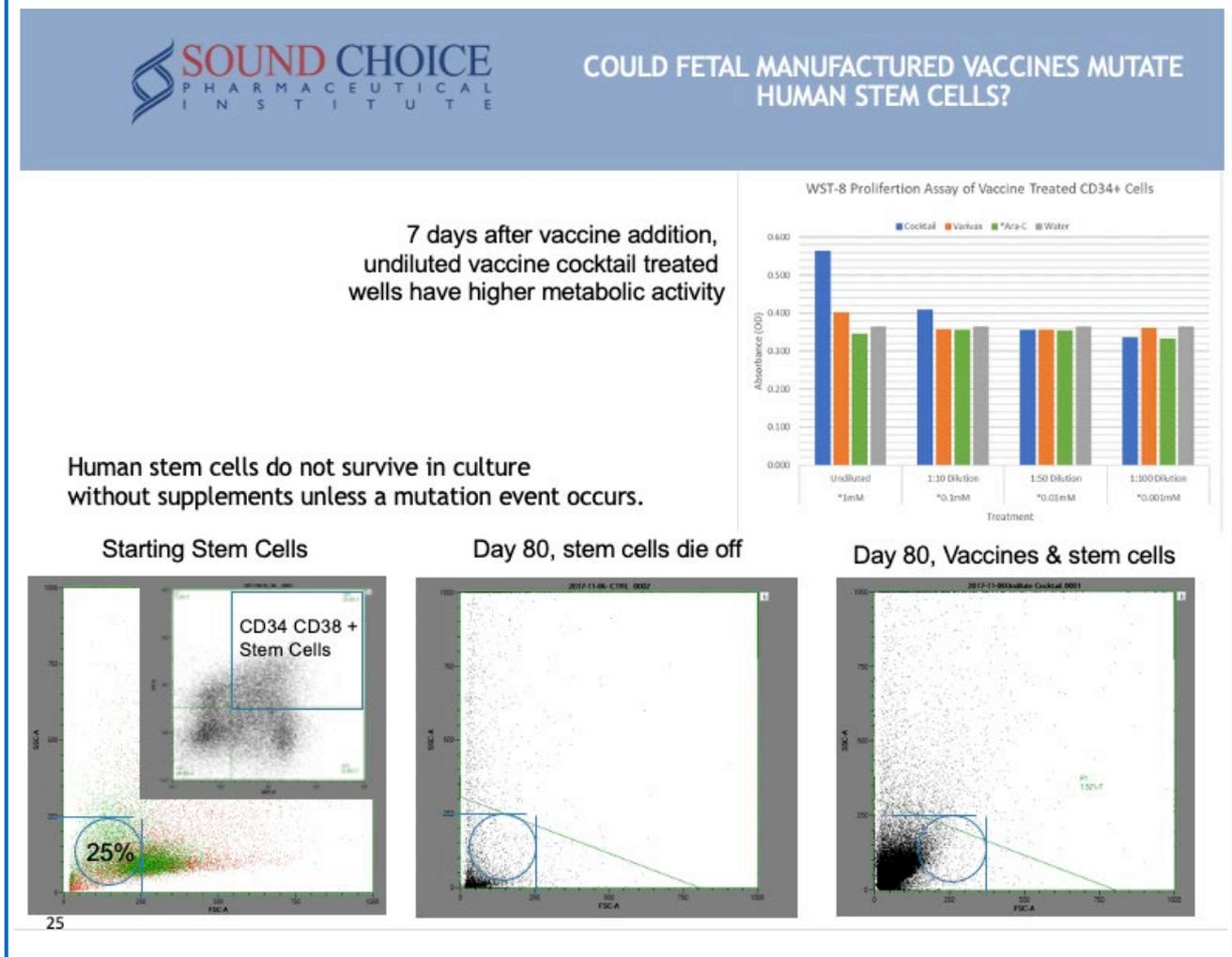
Comparazione approssimativa tra il **DNA fetale** (a sinistra) e il DNA delle cellule **HeLa** (a destra), la linea cellulare immortalizzata utilizzata anche nella produzione del vaccino contro la poliomielite.

➤ Le traslocazioni delle cellule HeLa rappresentate nel circo plot dalle linee del nucleo, sono riferite all'intero genoma (quindi parte codificante e non codificante), mentre nel caso delle cellule fetali vaccinali sono riferite solo ai geni codificanti

Sequenziamento del genoma completo di MRC-5 contenuto in Priorix Tetra
Comparazione tra genoma umano contenuto in Priorix Tetra e nella linea cellulare MRC-5

Gli studi della dr.ssa T. DEISHER ⁶⁴ supportano l'ipotesi che l'inoculazione di contaminazioni di DNA fetale umano proveniente dalle cellule diploidi, considerate ad oggi non tumorigeniche dalle agenzie regolatorie, comporta il rischio di causare due patologie consolidate:

- **mutagenesi inserzionale:** il DNA fetale umano, essendo ipometilato, si incorpora in maniera efficiente nel DNA del bambino causando mutazioni. La terapia genica che utilizza la ricombinazione omologa di piccoli frammenti ha dimostrato che quantità tanto piccole quanto 1,9 ng/mL di frammenti di DNA risultano nell'inserzione nel genoma di cellule staminali nel 100% dei topi iniettati. I livelli di frammenti di DNA fetale umano nei bambini dopo la vaccinazione con vaccini MMR, VARIVAX (varicella) o epatite A raggiungono livelli superiori a 1,9 ng / ml.
- **malattia autoimmune:** il DNA umano fetale stimola la reazione del sistema immunitario ad attaccare il corpo del vaccinato.



Secondo la definizione dell'OMS ⁶⁵, gli **agenti avventizi** sono microrganismi contaminanti della coltura cellulare o delle materie prime/grezze, inclusi batteri, funghi, mollicuti (micoplasmi o spiroplasm),

⁶⁴ <https://soundchoice.org/our-research/open-letter-to-legislators/>
(lettera ai governanti – 8 aprile 2019)
<https://soundchoice.org/our-research/>

⁶⁵ Annex 2 Scientific principles for regulatory risk evaluation on finding an adventitious agent in a marketed vaccine
https://www.who.int/biologicals/vaccines/Annex2_Adventitious_Agent_in_marketed_vaccine_eng.pdf?ua=1

Xu L, Lee SB, Fuchs C, Hyams KC, Brorson K, Swann P.
Role of risk assessments in viral safety: an FDA perspective.
PDA J Pharm Sci Technol. 2014 Jan-Feb;68(1):6-10. doi: 10.5731/pdajpst.2014.00959.
https://www.researchgate.net/publication/260120702_Role_of_Risk_Assessments_in_Viral_Safety_An_FDA_Perspective

micobatteri, rickettsia, protozoi, parassiti, agenti che causano TSE e virus che sono stati introdotti involontariamente nel processo di fabbricazione di un prodotto biologico.

La fonte del contaminante possono essere la linea cellulare, le materie prime utilizzate nel terreno di coltura per propagare le cellule (come il siero umano contaminato dal virus dell'epatite B utilizzato nella formulazione del vaccino 17D ⁶⁶), l'ambiente, il personale, le attrezzature ect. Sono una delle principali preoccupazioni nei processi ottenuti a partire da linee cellulari primarie ⁶⁷ e continue, sia di origine invertebrata ⁶⁸ che vertebrata ⁶⁹.

Nella linea guida dell'FDA *Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks*, è riportato che "poiché un genoma virale, una volta introdotto, potrebbe amplificare e produrre molte particelle infettive, è probabile che il rischio di infettività sia maggiore del rischio oncogenico."

Il genoma del poliovirus è infettivo nei topi a circa 50 pg, e un recente rapporto ha dimostrato che 1 pg di una copia provirale di un retrovirus è infettivo in vitro. Poiché livelli così bassi di DNA possono essere biologicamente attivi, le quantità di DNA residuale (rcDNA) dovrebbero essere prese in considerazione nelle valutazioni di sicurezza quando vengono utilizzati substrati cellulari tumorigenici, specialmente per i vaccini virali attenuati.

Studi recenti condotti dall'FDA supportano l'impiego di nuove tecnologie di sequenziamento (NGS) per lo screening dei vaccini per dimostrare l'assenza di contaminazione da parte di agenti virali.⁷⁰

Nell'indagine sulla qualità dei vaccini in commercio è emerso dalle conferme interlaboratorio delle analisi metagenomiche con NGS che erano presenti i seguenti agenti avventizi e residuali:

ICH Topic Q 5 A (R1) Quality of Biotechnological Products: Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin

⁶⁶ Frierson JG.
The yellow fever vaccine: a history.
Yale J Biol Med. 2010 Jun;83(2):77-85. PMID: 20589188; PMCID: PMC2892770
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2892770/>

⁶⁷ Enserink M.
Influenza. Crisis underscores fragility of vaccine production system.
Science. 2004 Oct 15;306(5695):385. doi: 10.1126/science.306.5695.385.
<https://science.sciencemag.org/content/306/5695/385/tab-pdf>

⁶⁸ Li TC, Scotti PD, Miyamura T, Takeda N.
Latent infection of a new alphanodavirus in an insect cell line.
J Virol. 2007;81(20):10890-10896. doi:10.1128/JVI.00807-07
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2045576/>

⁶⁹ Oehmig A, Büttner M, Weiland F, Werz W, Bergemann K, Pfaff E.
Identification of a calicivirus isolate of unknown origin.
J Gen Virol. 2003 Oct;84(Pt 10):2837-2845. doi: 10.1099/vir.0.19042-0.
<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.19042-0>

⁷⁰ <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/science-research-biologics/results-fda-study-support-development-high-throughput-sequencing-viral-safety-evaluation-biologic>

Computational Pipeline Engine in FDA HIVE: Adventitious Agent Detection from NGS Data
<https://www.fda.gov/media/141991/download>

Cleveland MH, et al
Report of the 2019 NIST-FDA workshop on standards for next generation sequencing detection of viral adventitious agents in biologics and biomanufacturing.
Biologicals. 2020 Mar;64:76-82. doi: 10.1016/j.biologicals.2020.02.003. Epub 2020 Feb 22.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32094072/>

Analisi vaccino Hexyon

Metagenomico

La presenza del materiale genetico contaminante è stata confermata con l'analisi interlaboratorio presso un service provider certificato europeo.

Il DNA presente è pari a 6,88 ng totali per dose (tale quantità è riferita al report divulgato. Il dato dell'analisi interlaboratorio è oggetto di peer review e quindi non divulgabile ma conferma l'ordine di grandezza), di cui lo 0,1% proveniente potenzialmente dalle cellule Vero (Cercopithecidae), cioè 688 pg/dose. Abbiamo identificato il Clostridium phage phiCT453A e SV40 assieme ad altri vettori per il clonaggio.

Presenza dei Poliovirus 1 e 2. In questo caso la risposta dell'EMA all'assenza del Poliovirus 3 è stata molto generica, l'assenza non è per loro una non conformità poiché danno per assodato la presenza dell'antigene D, capace di creare immunizzazione. Ovviamente abbiamo cercato questa proteina ma non siamo stati in grado di trovarla, sarebbe un ottimo approfondimento da sviluppare perché attualmente lasciamo su questo punto una risposta incerta.

DNA e RNA dei batteri utilizzati per la produzione degli antigeni di *Corynebacterium diphtheriae* (Diphtheria), *Clostridium tetani* (Tetanus), *Bordetella pertussis* (Pertussis) ed *Haemophilus influenzae*.

NOTA: il materiale genetico avventizio presente nel vaccino può essere legato all'alluminio adiuvante con possibile potenziamento degli effetti tossici (capacità infiammatoria, autoimmune e tumorale). Ribadiamo che, dai dati confermati interlaboratorio, rimane dubbia anche la sicurezza e l'efficacia di questo vaccino, risultando un prodotto del tutto non conforme per quanto riguarda la qualità.

Analisi vaccino Gardasil 9

Metagenomico

La presenza del materiale genetico è stata confermata con l'analisi interlaboratorio presso un service provider certificato europeo e possiamo ripetere i precedenti dati, sono presenti:

- DNA umano e di topo (sotto i limiti di rilevabilità dello strumento)
- Virus avventizi:
 - Frammento L1 del virus HPV di DNA a doppia catena;
 - Fagi;
 - Molluscum contagiosum virus;
- Retrovirus:
 - Virus della leucemia murina;
 - Retrovirus endogeno umano K.
 - Saccharomyces

NOTA: il materiale genetico avventizio presente nel vaccino può essere legato all'alluminio adiuvante con possibile potenziamento degli effetti tossici (capacità infiammatoria, autoimmune e tumorale)

Analisi vaccino Priorix Tetra

Metagenomico

Quasi-specie virali: nel genoma della varicella vaccinale sono state individuate 245 varianti rispetto al genoma di riferimento utilizzato per l'analisi (genoma selvatico del ceppo Dumas). Di queste varianti, 154 sono varianti maggiori mentre le restanti 91 sono varianti quasi-specie. Dal confronto tra le varianti trovate nei due lotti non emerge alcuna differenza. Nel genoma vaccinale della parotite sono state individuate 40 varianti quasi-specie rispetto al genoma di riferimento utilizzato per l'analisi (genoma vaccinale Jeryl-Lynn). Dal confronto tra le varianti trovate nei due lotti emergono 4 differenze. L'EMA non è stata in grado di fornirci le sequenze dei virus vaccinali utilizzati dal produttore per questo vaccino, in quanto coperte da segreto industriale, motivo per cui non sappiamo quanto siano mutati i virus vaccinali rispetto a quanto dichiarato dal produttore

A causa delle coperture basse non è stato possibile rilevare varianti quasi-specie per i genomi di morbillo e rosolia.

Virus avventizi - Abbiamo confermato la presenza di questi virus avventizi:

- Human endogenous retrovirus K;
- Avian leukosis virus;
- HERV-H/env62.

La presenza del materiale genetico è stata confermata con l'analisi interlaboratorio presso un service provider certificato europeo

Le quantità sono riferite ai report divulgati. I dati dell'analisi interlaboratorio sono oggetto di peer review e quindi non divulgabili ma confermano l'ordine di grandezza

DNA - La quantità di DNA totale presente in questo vaccino oscilla da: 1.7 – 3.7 $\mu\text{g}/\text{dose}$ ed è a tutti gli effetti il componente principale del vaccino. Il DNA è di tipo umano circa all'80% (74-88%) e di pollo (0-4%).

Il genoma umano è completo, cioè con geni e sequenze non codificanti, ad alto peso molecolare, di sesso maschile, qualificato come appartenente alla linea fetale MRC-5 cioè la linea cellulare continua derivata da tessuto polmonare di feto abortivo maschile degli anni '60. Il sequenziamento di questa linea cellulare ha dato prova di come fosse **altamente modificato dal punto di vista genetico e potenzialmente cancerogeno**. Le analisi di sequenziamento del genoma intero del DNA fetale è stata effettuata presso un service provider (laboratorio) americano.

RNA - Umano 68-87%. Pollo 0-0.2%

Virus attenuati - Sono stati confermati i seguenti virus attenuati lot. A71CB256A:

- Varicella (DNA) 11%;
- Parotite (RNA) 0.008%;
- Morbillo (RNA) 0.004%;
- Rosolia 0.00004%. (114 su 260 milioni di sequenze)

È stata confermata interlaboratorio una presenza irrilevante di rosolia nel vaccino (inferiore ai virus avventizi indicati qui sotto). Ciò mette in serio dubbio l'efficacia del vaccino.

Sommario delle conferme dei dati tramite analisi interlaboratorio

LE PIATTAFORME DEI VACCINI COVID-19

IL CICLO VITALE DEL SARS-COV-2 ⁷¹

In maniera simile a SARS-CoV e MERS-CoV ⁷², il genoma del SARS-CoV-2 è un filamento a singola catena di senso positivo che codifica per proteine non strutturali (NSP, come la proteasi simile alla 3-chimotripsina, proteasi simile alla papaina, elicasi e RNA polimerasi dipendente dall'RNA), proteine strutturali e proteine accessorie.

SARS-CoV-2 ha quattro proteine strutturali: la **proteina spike (S)**, la **proteina dell'involucro (E)**, la **proteina di membrana (M)** e la **proteina del nucleocapside (N)**.

Tra queste proteine, la proteina S trimerica è indispensabile per le interazioni virus-recettore cellulare durante l'ingresso virale.

La proteina S comprende una subunità S1 N-terminale responsabile del legame del recettore virus e una subunità S2 C-terminale responsabile della fusione della membrana cellulare-virus.

S1 è ulteriormente suddiviso in un dominio N-terminale (NTD) e un dominio di legame del recettore (RBD). ⁷³

Khan AS, Blümel J, Deforce D, et al.

Report of the second international conference on next generation sequencing for adventitious virus detection in biologics for humans and animals. *Biologicals*. 2020;67:94-111. doi:10.1016/j.biologicals.2020.06.002
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7351673/>

Petricciani J, Sheets R, Griffiths E, Knezevic I.

Adventitious agents in viral vaccines: lessons learned from 4 case studies. *Biologicals*. 2014 Sep;42(5):223-36. doi: 10.1016/j.biologicals.2014.07.003. Epub 2014 Aug 16.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1045105614000748?via%3Dihub>

⁷¹ Liu X, Liu C, Liu G, Luo W, Xia N.

COVID-19: Progress in diagnostics, therapy and vaccination. *Theranostics* 2020; 10(17):7821-7835. doi:10.7150/thno.47987.
<https://www.thno.org/v10p7821.htm>

⁷² Du L, He Y, Zhou Y, Liu S, Zheng BJ, Jiang S.

The spike protein of SARS-CoV--a target for vaccine and therapeutic development. *Nat Rev Microbiol*. 2009 Mar;7(3):226-36. doi: 10.1038/nrmicro2090. Epub 2009 Feb 9.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2750777/>

Du L, Yang Y, Zhou Y, Lu L, Li F, Jiang S.

MERS-CoV spike protein: a key target for antivirals. *Expert Opin Ther Targets*. 2017;21(2):131-143. doi:10.1080/14728222.2017.1271415
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5457961/>

⁷³ Lu R, Zhao X, Li J, et al.

Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*. 2020;395(10224):565-574. doi:10.1016/S0140-6736(20)30251-8
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7159086/>

Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veesler D.

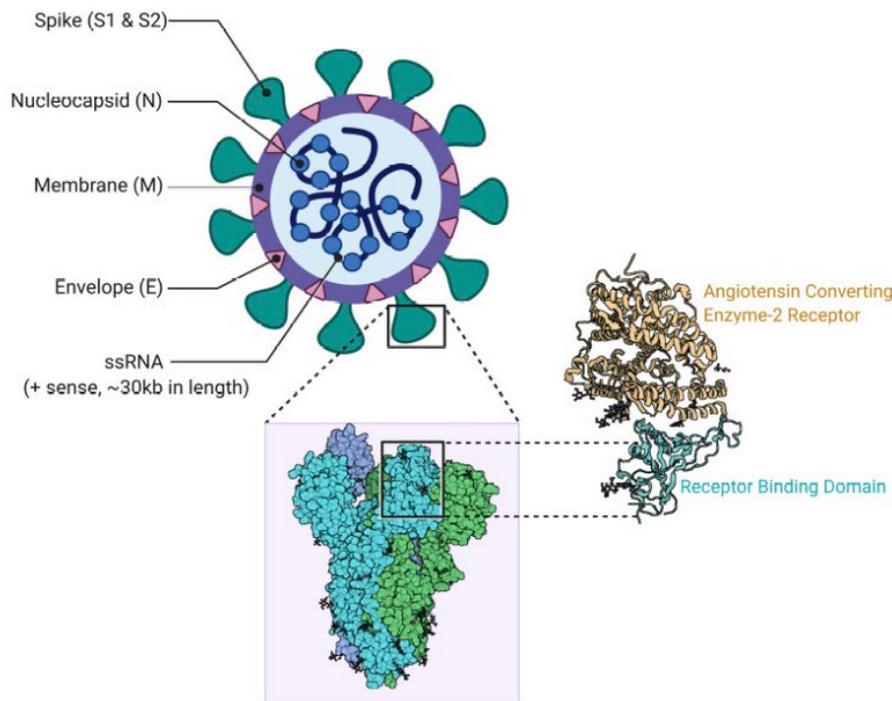
Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein [published correction appears in *Cell*. 2020 Dec 10;183(6):1735]. *Cell*. 2020;181(2):281-292.e6. doi:10.1016/j.cell.2020.02.058
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7102599/>

Ge J, Zhang S, Zhang L, Wang X.

Structural basis of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection. *Curr Opin HIV AIDS*. 2021 Jan;16(1):74-81. doi: 10.1097/COH.0000000000000658.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33186231/>

Mahmood Z, Alrefai H, Hetta HF, A Kader H, Munawar N, Abdul Rahman S, Elshaer S, Batiha GE, Muhammad K.

Investigating Virological, Immunological, and Pathological Avenues to Identify Potential Targets for Developing COVID-19 Treatment and Prevention Strategies. *Vaccines (Basel)*. 2020 Aug 6;8(3):443. doi: 10.3390/vaccines8030443.
<https://www.mdpi.com/2076-393X/8/3/443/htm>



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776/>

Organizzazione genomica della sindrome respiratoria acuta grave coronavirus 2 (SARS-CoV-2), inclusi i frame di lettura aperti (ORF1a e ORF1b), spike (S), involucro (E), membrana (M) e proteine del nucleocapside (N). Sono illustrate strutture proteiche tridimensionali della 3CL-proteasi, endoribonucleasi e proteine spike legate al recettore dell'enzima di conversione dell'angiotensina 2 (ACE2) umano. PDB: database delle proteine

SARS-CoV-2 entra nelle cellule attraverso la proteina S, che si lega al recettore dell'**enzima di conversione dell'angiotensina 2 (ACE2)** umano e impiega la serina proteasi cellulare TMPRSS2 per l'attivazione della proteina S ⁷⁴.

Tale legame innesca una cascata di eventi che portano alla fusione tra le membrane cellulari e virali per l'ingresso del virus nelle cellule. Il genoma dell'RNA virale viene rilasciato nel citoplasma dopo la fusione delle membrane.

Le poliproteine vengono successivamente sintetizzate per codificare il complesso replicasi-trascrittasi virale. L'RNA virale viene quindi sintetizzato dalla RNA polimerasi RNA-dipendente.

La sintesi delle proteine strutturali è seguita dall'assemblaggio e dal rilascio di particelle virali ⁷⁵.

⁷⁴ Datta PK, Liu F, Fischer T, Rappaport J, Qin X.

SARS-CoV-2 pandemic and research gaps: Understanding SARS-CoV-2 interaction with the ACE2 receptor and implications for therapy. *Theranostics*. 2020;10(16):7448-7464. Published 2020 Jun 12. doi:10.7150/thno.48076
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7330865/>

Ou X et al

Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat Commun*. 2020 Mar 27;11(1):1620. doi: 10.1038/s41467-020-15562-9.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7100515/>

Tai W, He L, Zhang X, Pu J, Voronin D, Jiang S, Zhou Y, Du L.

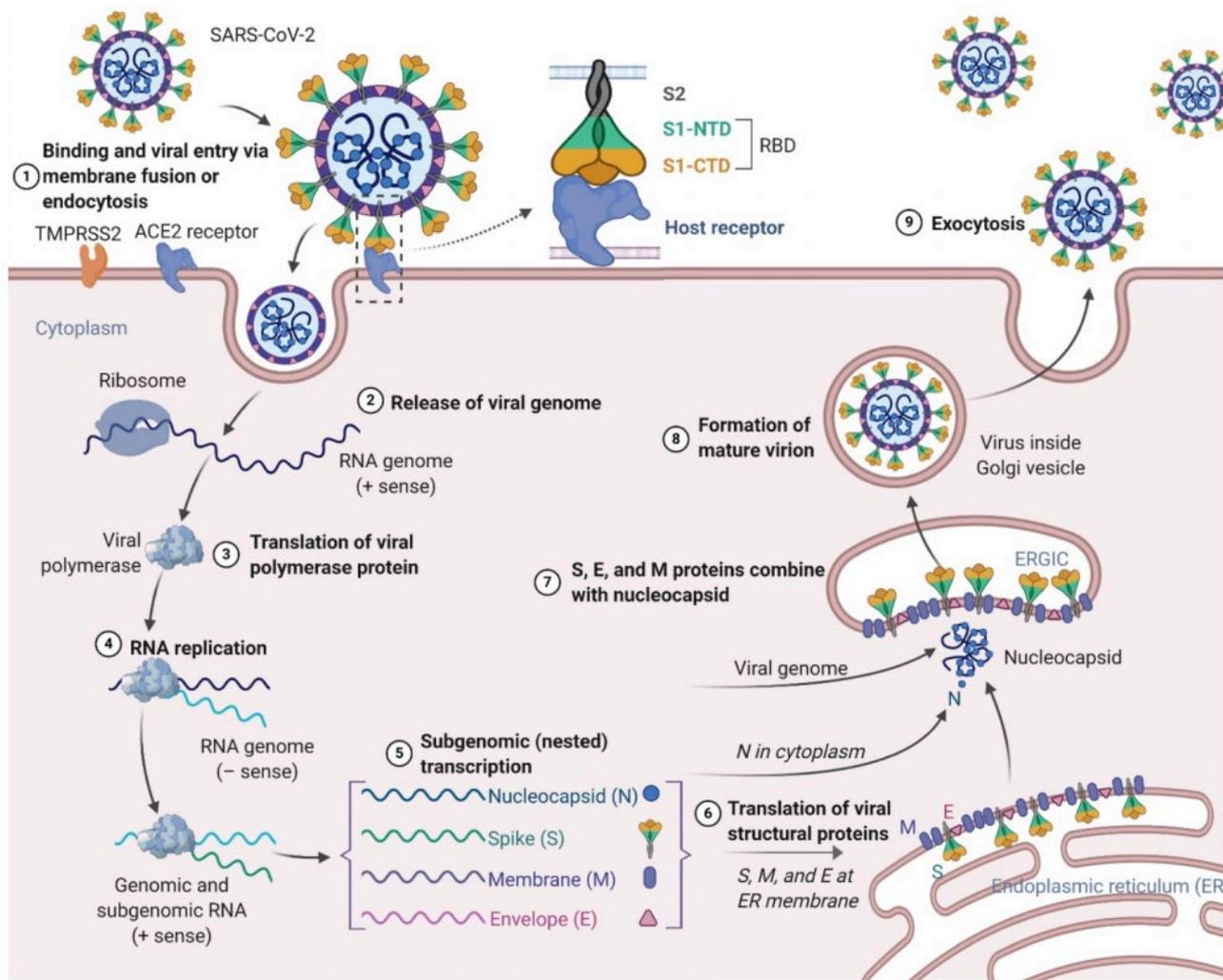
Characterization of the receptor-binding domain (RBD) of 2019 novel coronavirus: implication for development of RBD protein as a viral attachment inhibitor and vaccine. *Cell Mol Immunol*. 2020 Jun;17(6):613-620. doi: 10.1038/s41423-020-0400-4. Epub 2020 Mar 19.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7091888/>

Letko M, Marzi A, Munster V.

Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nat Microbiol*. 2020;5(4):562-569. doi:10.1038/s41564-020-0688-y
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7095430/>

⁷⁵ Chen Y, Liu Q, Guo D.

Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis [published correction appears in *J Med Virol*. 2020 Oct;92(10):2249]. *J Med Virol*. 2020;92(4):418-423. doi:10.1002/jmv.25681
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7167049/>



<https://www.thno.org/v10p7821.pdf>

Presentazione schematica del ciclo di vita virale SARS-CoV-2. SARS-CoV-2 entra nelle cellule ospiti legandosi prima all'enzima 2 di conversione dell'angiotensina (ACE2) attraverso la proteina spike di superficie (S). Dopo l'ingresso del virus nella cellula ospite, l'RNA genomico virale viene rilasciato e tradotto in proteine della polimerasi virale. In questo processo, gli RNA subgenomici (-) vengono sintetizzati e utilizzati come stampo per formare RNA messaggeri (mRNA) subgenomici (+). La proteina strutturale nucleocapside (N) e l'RNA virale vengono replicati, trascritti e sintetizzati nel citoplasma, mentre altre proteine strutturali virali, tra cui la proteina S, la proteina di membrana (M) e la proteina dell'involucro (E), vengono trascritte e quindi tradotte nel reticolo endoplasmatico (ER). Le proteine strutturali risultanti vengono ulteriormente assemblate nel nucleocapside e nell'involucro virale nel compartimento intermedio ER-Golgi (ERGIC) per formare un virione maturo, seguito dal rilascio del virione nascente dalla cellula ospite.

Queste fasi del ciclo di vita virale forniscono i potenziali bersagli per vaccini e terapie per prevenire e trattare l'infezione da SARS-CoV-2.⁷⁶

Per chiarire i meccanismi specifici dell'infezione da SARS-CoV-2, è stata recentemente determinata la struttura cristallina della spike dell'RBD del SARS-CoV-2 legato al recettore cellulare ACE2 con una risoluzione di 2,45 Å. Esperimenti di legame in vitro mostrano che l'RBD del SARS-CoV-2 ha affinità per l'ACE2 nell'ordine nM, indicando che l'RBD è il componente funzionale chiave della subunità S1 responsabile del legame dell'ACE2 al SARS-CoV-2.⁷⁷

⁷⁶ Uddin M, Mustafa F, Rizvi TA, et al. SARS-CoV-2/COVID-19: Viral Genomics, Epidemiology, Vaccines, and Therapeutic Interventions. *Viruses*. 2020;12(5):526. Published 2020 May 10. doi:10.3390/v12050526 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7290442/>

⁷⁷ Lan J, Ge J, Yu J, Shan S, Zhou H, Fan S, Zhang Q, Shi X, Wang Q, Zhang L, Wang X. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*. 2020 May;581(7807):215-220. doi: 10.1038/s41586-020-2180-5. Epub 2020 Mar 30. <https://www.nature.com/articles/s41586-020-2180-5>

TIPI DI ANTIGENI VACCINALI

Esistono quattro categorie principali di vaccini utilizzati negli studi clinici: a virus intero (attenuato o inattivato, con o senza adiuvante), a subunità proteiche, a vettore virale e ad acido nucleico (RNA e DNA).⁷⁸

⁷⁸ <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>
Aggiornato al 29.12.2020

Lotta al SARS-CoV-2: prevenzione e vaccini

Luglio2020 Science Output

Antonia Mazzeo – Senior Consultant and Cecilia Parra – Project Manager

<https://www.pqgroup.com/blog/2020/08/fight-against-sars-cov-2-prevention-and-vaccines/>

Ura T, Yamashita A, Mizuki N, Okuda K, Shimada M.

New vaccine production platforms used in developing SARS-CoV-2 vaccine candidates.

Vaccine. 2021;39(2):197-201. doi:10.1016/j.vaccine.2020.11.054

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7685034/>

Accademia Nazionale dei Lincei

Vaccini COVID-19: Rapporto Autunno 2020 Documento della Commissione Covid-19

https://www.lincei.it/sites/default/files/documenti/Commissioni/ANL_Comm_Covid-19_Vaccini_30novembre2020.pdf

Funk CD, Laferrière C, Ardakani A.

A Snapshot of the Global Race for Vaccines Targeting SARS-CoV-2 and the COVID-19 Pandemic.

Front Pharmacol. 2020 Jun 19;11:937. doi: 10.3389/fphar.2020.00937.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7317023/>

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2020.00937/full>

Vashishtha VM, Kumar P.

Development of SARS-CoV-2 vaccines: challenges, risks, and the way forward

[published online ahead of print, 2020 Dec 3]. Hum Vaccin Immunother. 2020;1-15. doi:10.1080/21645515.2020.1845524

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7754925/>

Mathew S, Faheem M, Hassain NA, Benslimane FM, Thani AAA, Zaraket H, Yassine HM.

Platforms Exploited for SARS-CoV-2 Vaccine Development.

Vaccines (Basel). 2020 Dec 25;9(1):E11. doi: 10.3390/vaccines9010011. PMID: 33375677.

<https://www.mdpi.com/2076-393X/9/1/11/htm>

Brise M, Vrba SM, Kirk N, Liang Y, Ly H.

Emerging Concepts and Technologies in Vaccine Development.

Front Immunol. 2020;11:583077. Published 2020 Sep 30. doi:10.3389/fimmu.2020.583077

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7554600/>

Dong, Y., Dai, T., Wei, Y. et al.

A systematic review of SARS-CoV-2 vaccine candidates.

Sig Transduct Target Ther 5, 237 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00352-y>

<https://www.nature.com/articles/s41392-020-00352-y>

Huang L, Rong Y, Pan Q, et al.

SARS-CoV-2 vaccine research and development: conventional vaccines and biomimetic nanotechnology strategies

[published online ahead of print, 2020 Sep 1]. Asian J Pharm Sci. 2020;10.1016/j.ajps.2020.08.001. doi:10.1016/j.ajps.2020.08.001

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7462629/>

Yizhi Peng, Sheng Yin, Min Wang.

Extracellular vesicles of bacteria as potential targets for immune interventions.

Human Vaccines & Immunotherapeutics (2020) 0:0, pages 1-7.

<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07853890.2017.1407035?src=recsys>

Xiaoxia Dai, Yongmin Xiong, Na Li and Can Jian (March 5th 2019).

Vaccine Types, Vaccines - the History and Future, Vijay Kumar,

IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.84626. A

<https://www.intechopen.com/books/vaccines-the-history-and-future/vaccine-types>

Krammer, F.

SARS-CoV-2 vaccines in development.

Nature 586, 516–527 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2798-3>

<https://www.nature.com/articles/s41586-020-2798-3>

Liu Y, Wang K, Massoud TF, Paulmurugan R.

SARS-CoV-2 Vaccine Development: An Overview and Perspectives.

ACS Pharmacol Transl Sci. 2020 Sep 18;3(5):844-858. doi: 10.1021/acspsci.0c00109.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7526333/>

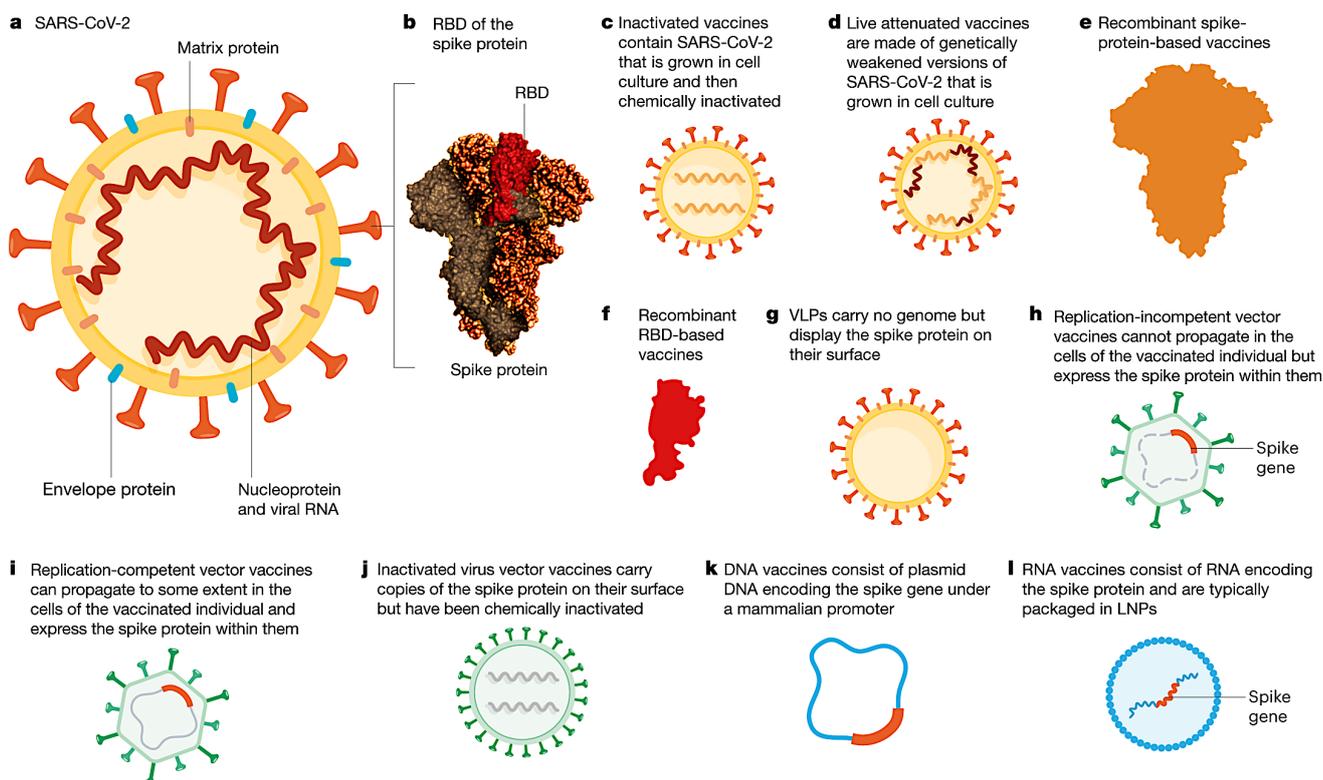
Dagotto G, Yu J, Barouch DH.

In termini generali, i vaccini per poter agire richiedono due componenti: gli antigeni del patogeno bersaglio che sono forniti o generati dal ricevente del vaccino e un segnale di infezione (come un modello molecolare associato a patogeni - PAMPS - o un modello molecolare associato al danno – DAMPS) che allerta e attiva il sistema immunitario dell'ospite.

I vaccini vivi attenuati possono fornire naturalmente entrambi questi componenti, mentre le piattaforme vaccinali non virali possono fornire gli antigeni ma spesso richiedono sostanze adiuvanti per creare una fonte artificiale di segnali necessari per allertare il sistema immunitario.

In genere, queste piattaforme di vaccini non virali richiedono più vaccinazioni per indurre un'immunità protettiva, mentre i vaccini a base di virus attenuati dovrebbero essere in grado di fornire l'immunità "one-shot" (a dose unica).

Analogamente alle piattaforme non virali, i vaccini con virus inattivato a volte richiedono l'inclusione di un adiuvante e la somministrazione ripetuta per aumentare l'efficacia.



<https://www.nature.com/articles/s41586-020-2798-3>

a, Uno schema delle proteine strutturali del virione SARS-CoV-2, inclusa la membrana lipidica, l'RNA genomico coperto dalla nucleoproteina all'interno, le proteine dell'involucro e della matrice all'interno della membrana e la proteina spike sulla superficie del virus. b, la struttura della proteina spike; un monomero è evidenziato in marrone scuro e l'RBD è mostrato in rosso. c – l, gli attuali candidati al vaccino SARS-CoV-2 includono vaccini con virus inattivati (c), vaccini vivi attenuati (d), vaccini proteici ricombinanti basati sulla proteina spike (e), RBD (f) o particelle simili al virus (g), vaccini vettoriali non replicanti (h), vaccini vettoriali replicanti (i), vaccini a vettore virale inattivati che presentano la proteina spike sulla loro superficie (j), vaccini a DNA (k) e vaccini a RNA (l).

Oltre all'attenta selezione degli antigeni e della piattaforma del vaccino, la via di somministrazione è una considerazione fondamentale delle strategie vaccinali.

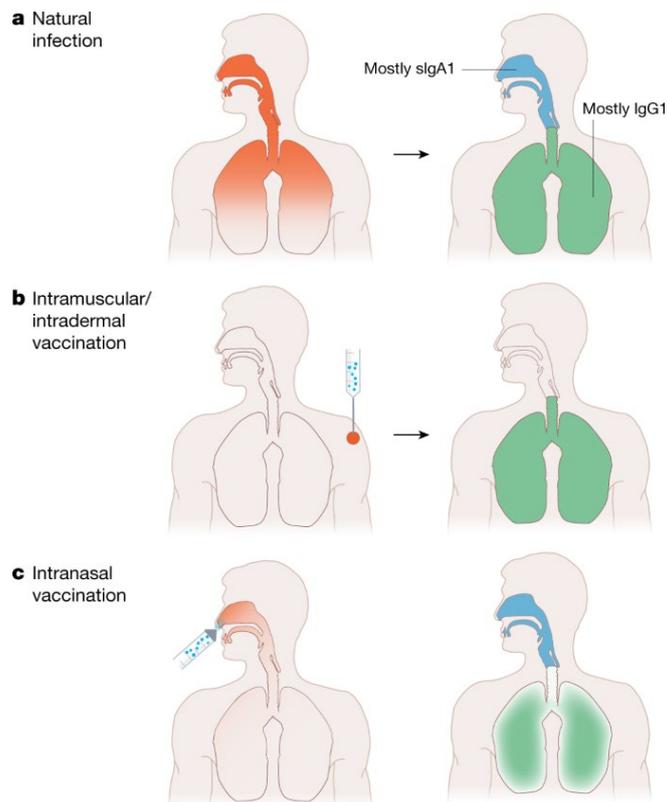
Approaches and Challenges in SARS-CoV-2 Vaccine Development.
Cell Host Microbe. 2020;28(3):364-370. doi:10.1016/j.chom.2020.08.002
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7416703/>

Haque A, Pant AB.
Efforts at COVID-19 Vaccine Development: Challenges and Successes.
Vaccines (Basel). 2020;8(4):739. Published 2020 Dec 6. doi:10.3390/vaccines8040739
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7762169/>

Karch CP, Burkhard P.
Vaccine technologies: From whole organisms to rationally designed protein assemblies.
Biochem Pharmacol. 2016 Nov 15;120:1-14. doi: 10.1016/j.bcp.2016.05.001. Epub 2016 May 6. PMID: 27157411;
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5079805/>

Ciò è particolarmente importante per i patogeni della mucosa come SARS-CoV-2 e quei patogeni contro i quali una protezione ottimale richiede non solo anticorpi neutralizzanti ma anche un'immunità cellulare innata e adattativa.⁷⁹ La migliore finestra di opportunità per il controllo e l'eliminazione del SARS-CoV-2 è il periodo asintomatico o pre-sintomatico della COVID-19 (2-12 giorni), che probabilmente richiederà che tutti gli elementi di protezione immunitaria siano presenti nella mucosa respiratoria prima dell'ingresso virale⁸⁰.

La via di somministrazione della vaccinazione ha un ruolo cruciale nel determinarlo. Gli anticorpi IgG vaccinali indotti dalla vaccinazione parenterale compaiono prontamente sulla mucosa respiratoria, tuttavia, questa via di vaccinazione non è in grado di indurre efficacemente gli anticorpi IgA della mucosa o le cellule TRM (Tissue-resident memory cell) nei polmoni.⁸¹



<https://www.nature.com/articles/s41586-020-2798-3>

Si ritiene che il tratto respiratorio umano inferiore sia per lo più protetto dalle IgG (IgG1 è la più diffusa), il principale tipo di anticorpo nel siero, che viene trasportato nel polmone. Si ritiene che il tratto respiratorio superiore sia per lo più protetto da IgA1 secretorie (sIgA1). **a**, L'infezione naturale da virus respiratori induce sia una risposta immunitaria sistemica, dominata da IgG1, sia una risposta immunitaria della mucosa nel tratto respiratorio superiore dominata da sIgA1. Questo processo può portare all'immunità sterilizzante per molti virus respiratori. **b**, La vaccinazione intramuscolare o intradermica porta in molti casi a una forte induzione di IgG sieriche ma non a un'induzione di IgA mucose. Sebbene alcune IgG possano essere trovate anche sulle superfici mucose del tratto respiratorio superiore, la mancanza di sIgA spesso lascia un individuo vulnerabile alle infezioni del tratto respiratorio superiore. **c**, la vaccinazione intranasale può indurre efficacemente risposte anticorpali della mucosa, fornendo così potenzialmente un'immunità sterilizzante nel tratto respiratorio superiore. Tuttavia, le risposte immunitarie sistemiche sono spesso inferiori dopo questo tipo di vaccinazione. Attualmente, tutti i vaccini candidati alla SARS-CoV-2 in fase di sviluppo clinico vengono somministrati per via intramuscolare e pochissimi degli oltre 180 vaccini in fase di sviluppo sono progettati per indurre l'immunità della mucosa. Sebbene l'immunità della mucosa potrebbe non essere richiesta per proteggere da malattie gravi o anche sintomatiche, potrebbe essere necessaria per ottenere una protezione ottimale dall'infezione e dalla trasmissione successiva di SARS-CoV-2.

⁷⁹ Sariol A, Perlman S.

Lessons for COVID-19 Immunity from Other Coronavirus Infections. *Immunity*. 2020;53(2):248-263. doi:10.1016/j.immuni.2020.07.005 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7359787/>

⁸⁰ Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LFP.

The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(6):363-374. doi:10.1038/s41577-020-0311-8 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7187672/>

⁸¹ Belyakov IM, Ahlers JD.

What role does the route of immunization play in the generation of protective immunity against mucosal pathogens? *J Immunol*. 2009 Dec 1;183(11):6883-92. doi: 10.4049/jimmunol.0901466. PMID: 19923474. <https://www.jimmunol.org/content/183/11/6883.long>

Nelle seguenti tabelle sono riportate le proprietà immunologiche delle principali piattaforme vaccinali candidate COVID-19 e dei componenti non antigenici dei vaccini.

Vaccine platform	SARS-CoV-2 antigens	Neutralizing antibody response	T cell response		Pre-existing antivector immunity	Route of vaccination	Overall immunogenicity	Other attributes	
			CD4 ⁺ T _H cells	CD8 ⁺ T cells					Lung T _{RM} cells
Viral-vectored vaccines									
Ad5 (non-replicating)	S protein	Quality and durability affected by pre-existing antivector immunity	T _H 1 cell	Potent response; negative effects from pre-existing antivector immunity	Induced by RM but not IM route	High, age-dependent, prevalence in blood; low prevalence in respiratory tract	Parenteral (IM) in clinical trials	Strong with single delivery but hindered by pre-existing antivector immunity	Ample human safety data; RM delivery helps bypass antivector immunity; can be delivered by inhaled aerosol
Ad26 (non-replicating)	S protein	Quality and durability affected by pre-existing antivector immunity	T _H 1 cell	Moderate response; negative effects from pre-existing antivector immunity	Induced by RM but not IM route	Medium prevalence	Parenteral (IM) in planned clinical trials	Weak; requires repeated or heterologous boost vaccination	Established human safety from HIV and Ebola vaccine trials; RM delivery helps bypass antivector immunity
ChAd (non-replicating)	S protein	Unimpeded owing to lack of pre-existing antivector immunity	T _H 1 cell	Potent response	Induced by RM but not IM route	Very low prevalence	Parenteral (IM) in clinical trials	Strong with single delivery	Well-established human safety data; amenable to RM delivery; can be used as a stand-alone vaccine or in prime-boost regimens
VSV (replicating)	S protein	Unimpeded owing to lack of pre-existing antivector immunity	T _H 1 cell	Response not as strong as for Ad5 or ChAd when used as a stand-alone vaccine; strong T cell booster	Not induced by IM route	None	Parenteral (IM) in previous successful Ebola vaccine trials	Good with single delivery	Successfully licensed platform for Ebola; not known whether it protects against RM viral pathogens
Measles and influenza viruses (replicating)	S protein?	Quality and durability depend on whether there is pre-existing antivector immunity and vaccination route	T _H 1 cell	Good response when delivered via RM route	Not induced by parenteral route	High prevalence owing to vaccination and natural infection	Parenteral or RM	Weak relative to adenovirus vectors	Not extensively tested in humans; potential recombination of live attenuated influenza vectors in the lung delivered via RM route

Vaccine platform	SARS-CoV-2 antigens	Neutralizing antibody response	T cell response		Pre-existing antivector immunity	Route of vaccination	Overall immunogenicity	Other attributes
			CD4 ⁺ T _H cells	CD8 ⁺ T cells				
Other vaccines								
mRNA-based vaccine	S protein or RBD encapsulated in lipid nanoparticle	Unimpeded owing to lack of pre-existing antivector immunity	T _H 1 cell or T _H 2 cell depending on adjuvant	Depends on choice of adjuvant and formulation	Not induced by parenteral route	Parenteral (IM) in clinical trials	Requires repeated delivery	Adjuvant required; unclear whether it is amenable to RM vaccination
DNA-based vaccine	S protein	Unimpeded owing to lack of pre-existing antivector immunity	T _H 1 cell	Response not as strong as for some of the viral vectors	Not induced	Parenteral (IM) in clinical trials	Weaker than mRNA-based vaccine; requires repeated delivery	Adjuvant required; not amenable to RM vaccination
Live attenuated virus	Multiple viral antigens	Strong induction	T _H 1 cell	Strong response	Induced by RM but not IM route	Parenteral (SC)	Requires only a single delivery	Extensive safety testing required for potential recombination with wild-type virus
Inactivated virus	Multiple viral antigens	Strong induction	T _H 1 cell or T _H 2 cell depending on adjuvant	Weak response	Not induced	Parenteral (IM)	Weak; requires repeated vaccination	Adjuvant required; alum often used, which enhances T _H 2 cell responses possibly involved in ADE
Protein subunit vaccine	S protein or RBD	Strong induction	T _H 1 cell or T _H 2 cell depending on adjuvant	Weak response	Not induced	Parenteral (IM) in clinical trials	Weak; requires repeated vaccination	Adjuvant required; mostly unsuitable for RM vaccination
Virus-like particle	Multiple viral antigens	Strong induction	T _H 1 cell or T _H 2 cell depending on adjuvant	Weak response	Not induced	Parenteral (IM) or RM	Weak, but greater than for protein subunits; requires repeated vaccination	Well-established platform for several commercial human vaccines (hepatitis B and HPV vaccines); adjuvant required

<https://www.nature.com/articles/s41577-020-00434-6>

Proprietà immunologiche delle principali piattaforme vaccinali candidate COVID-19

Ad5, human serotype 5 adenovirus; Ad26, human serotype 26 adenovirus; ADE, antibody-dependent enhancement; ChAd, chimpanzee adenovirus; COVID-19, coronavirus disease 2019; HPV, human papillomavirus; IM, intramuscular; RBD, receptor-binding domain; RM, respiratory mucosal; SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; S protein, spike protein; SC, subcutaneous; TH cell, T helper cell; TRM cell, resident memory T cell; VSV, vesicular stomatitis virus.

Component	Clinical Vaccine Candidates Containing Adjuvant/Component (Antigen Type)	Description	Effect/Skew	Mechanism
Advax-SM	Vaxine Pty/Medytox (Recombinant Protein)	Delta-inulin (water-insoluble polysaccharide) microparticles mixed with CpG 1018	Adjuvant, Th1 skew (No skew without CpG) [67]	Unknown, antigen-presenting cell-dependent [68]
Alum	Sinovac (Inactivated Virus), Sinopharm (Inactivated Virus), Bharat Biotech (Inactivated Virus), Clover (With CpG 1018, Recombinant Protein), FBRI SRC VB VECTOR (Peptide Subunit), West China Hospital/-Sichuan University (Recombinant Protein) Clover (Recombinant Protein), Medicago (VLP), Sanofi/GSK (Recombinant Protein)	Aluminum salts (aluminum hydroxide or aluminum phosphate)	Adjuvant, Th2 Skew	Multifaceted [69] [70]
AS03	Squalene and DL- α -tocopherol oil-in-water emulsion stabilized by polysorbate 80	Squalene and DL- α -tocopherol oil-in-water emulsion stabilized by polysorbate 80	Adjuvant, Th2 skew	Unknown, potentially innate immune recruitment and activation [71]
CpG 1018	Vaxine Pty/Medytox (Included in Advax-SM, Recombinant Protein), Medicago (VLP), Clover (With Alum, Recombinant Protein), Medigen/NIAID/Dynavax (Recombinant Protein)	Unmethylated oligodeoxynucleotide (ODN)	Adjuvant, Th1 skew	TLR9 stimulation [72]
Ionizable Lipid (various proprietary versions)	Moderna/NIAID (mRNA), Pfizer (mRNA and replicon RNA), Arcturus (replicon RNA), PLA Academy of Military Sciences/Walvax Biotech	Lipid molecules containing amino groups which become cationic at acidic pH.	Complexes anionic macromolecules (e.g. RNA) and promotes cytosolic delivery.	Unknown, potentially TLR2/TLR4 stimulation [74]
Matrix M	Novavax (Recombinant Protein)	Lipid nanoparticles containing cholesterol and immunostimulatory Quilaja triterpenoid saponins Matrix-A and Matrix-C in an 85:15 ratio [75]	Adjuvant, Balanced Th1/Th2 skew other adjuvants [73]	Unknown, potentially innate immune recruitment and activation [76] [77]
MF59	Anhui Longcom (Recombinant Protein), Queensland/Seqirus/CSL (Recombinant Protein)	Squalene oil-in-water emulsion stabilized by polysorbate 80 and sorbitan trioleate	Adjuvant, Th2 skew	Unknown, potentially innate immune recruitment and activation [78] [79]
Polysorbate 80	Novavax (Recombinant protein)	Nonionic surfactant, a.k.a. Tween 80	Inhibits aggregation of emulsions and hydrophobic proteins	Stabilizes interfaces in emulsions, prevents protein adsorption to potentially denaturing interfaces, multimerizes transmembrane proteins [80,81].
RNA	Moderna/NIAID (mRNA), Pfizer/BioNTech (mRNA and replicon RNA), Curevac (mRNA), Arcturus (replicon RNA)	genetic material which encodes antigenic constructs and stimulates immune responses	Th1 skew	TLRs 3, 7, 8, 9, and 13 stimulation [82]

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7733686/pdf/main.pdf>
Riepilogo dei componenti non antigenici per i vaccini SARS-CoV-2

Diverse piattaforme di vaccini: vantaggi e svantaggi

Vaccine Platform	Advantages	Disadvantages
Viral vector-based	<ul style="list-style-type: none"> Exhibit highly specific gene delivery into the host cell with rigorous immune response. No infectious virus needs to be handled, shows significant preclinical and clinical data for many emerging viruses, including MERS-CoV. 	<ul style="list-style-type: none"> Host's immunity against the vector might negatively affect the effectiveness of the vaccine (depends on the vector chosen). The integration of the viral genome into the host genome may cause cancer.
Live attenuated	<ul style="list-style-type: none"> Develops long-lasting immunity High potency and pre-existing infrastructure used for several licensed human vaccines. Low-cost manufacturing. 	<ul style="list-style-type: none"> Possible regression to virulence strain. Limited use in immunocompromised patients. Making infectious clones for attenuated coronavirus vaccine seed may be time consuming because of its large genome size. Extensive safety testing required.
Inactivated	<ul style="list-style-type: none"> Stable and safe compared to live attenuated virus platform. Pre-existing technology and infrastructure required for development are available. Can be used in immunocompromised patients. Has already been tested in humans for various diseases such as SARS-CoV-1 and adjuvants can be used to increase immunogenicity. 	<ul style="list-style-type: none"> Requires booster doses to maintain immunity. Large amount of virus needs to be handled and antigen integrity needs to be confirmed. Low production titer.
RNA	<ul style="list-style-type: none"> Handling of infectious viral particle is not required. Low-cost and ease of manufacturing. Translation of mRNA occurs in the cytosol of the host cell thus reducing the risk of integration into the host genome. 	<ul style="list-style-type: none"> May have low immunogenicity due to instability. Safety issue with reactogenicity have been reported for various RNA based vaccines. Multiple doses may be required.
DNA	<ul style="list-style-type: none"> Handling of infectious viral particle is not required. Ease of manufacturing. The synthetic DNA is temperature stable and cold-chain free 	<ul style="list-style-type: none"> The titer remains low, even though it elicits both cytotoxic and humoral immunity. Potential integration to human genome causes abnormalities.
Protein subunit	<ul style="list-style-type: none"> Can be used in immunocompromised patients. Does not involve any live component of the viral particle 	<ul style="list-style-type: none"> Low immunogenicity. Conjugation leads to batch-wise variation.

<https://www.mdpi.com/2076-393X/9/1/11/htm>

MERS-CoV, Middle East respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV, severe acute respiratory syndrome-corona virus.

VIDEO

[There are four types of COVID-19 vaccines: here's how they work](#)

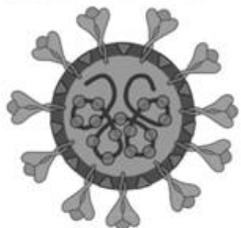
[I vaccini contro la Covid-19: quali sono e come funzionano](#)

Di seguito sono riportate le tipologie di vaccini in fase di sperimentazione clinica citati nel sito dell'OMS ⁸²

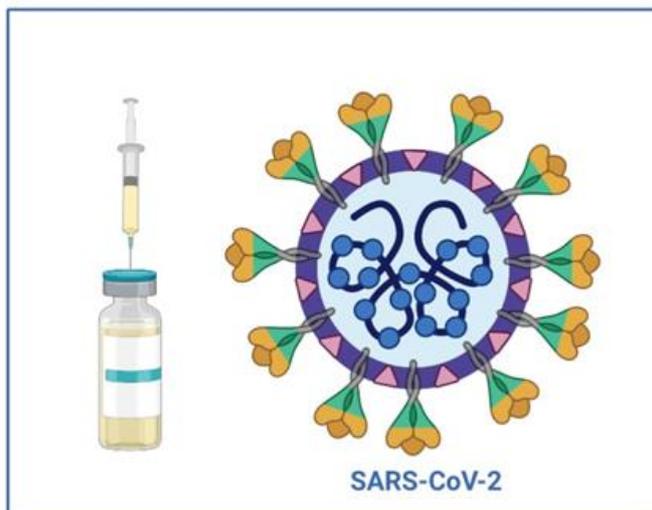
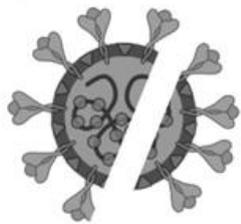
A. Live attenuated



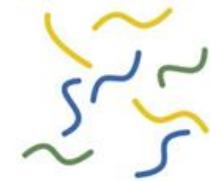
B. Whole inactivated



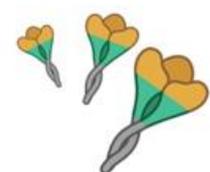
C. Split inactivated



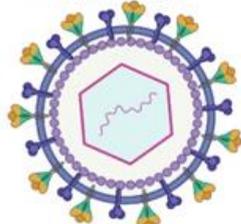
I. Synthetic peptides



H. Recombinant subunits



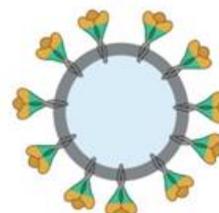
D. Recombinant viral vectors



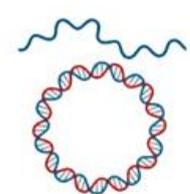
E. Recombinant bacterial vectors



F. Virus-like particles



G. DNA or RNA



<https://www.thno.org/v10p7821.pdf>

⁸² https://vac-lshtm.shinyapps.io/ncov_vaccine_landscape/
<https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>
<https://www.vfa.de/de/englische-inhalte/vaccines-to-protect-against-covid-19>

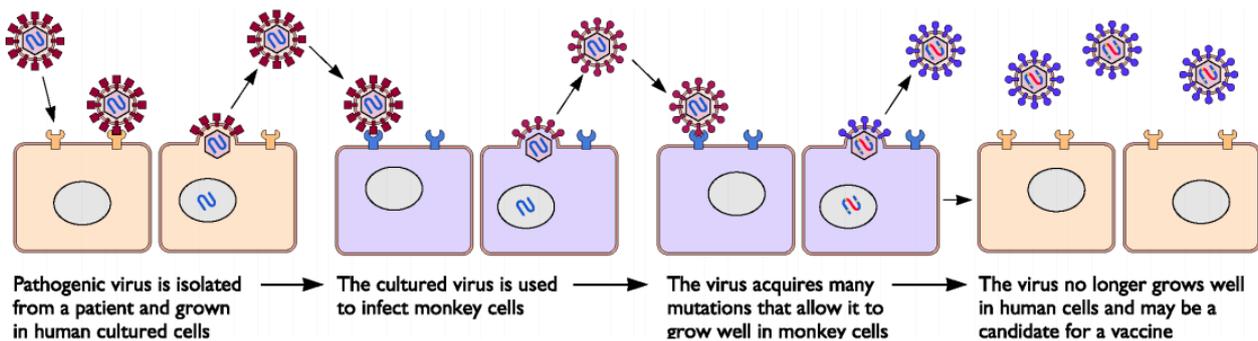
Jeyanathan M, Afkhami S, Smaill F, Miller MS, Lichy BD, Xing Z.
Immunological considerations for COVID-19 vaccine strategies.
Nat Rev Immunol. 2020;20(10):615-632. doi:10.1038/s41577-020-00434-6
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7472682/>

VACCINI A VIRUS ATTENUATI

COVI-VAC: Serum Institute of India, (India)/Codagenix (New York)

Lo sviluppo classico di vaccini vivi attenuati richiede che l'organismo venga modificato attraverso più passaggi in coltura in condizioni uniche in laboratorio, fino a quando non perde la patogenicità in modo da non causare malattie, ma conserva la sua capacità di replicarsi per un breve periodo nel ricevente del vaccino e di stimolare una risposta immunitaria robusta sia adattativa che innata.

Questi vaccini tendono ad essere altamente immunogenici e non richiedono un adiuvante. Tuttavia, sono controindicati nelle persone immunocompromesse o in gravidanza.



https://www.dbcf.unisi.it/sites/st13/files/allegatiparagrafo/28-04-2016/08_vaccini.pdf

L'adattamento ad un nuovo substrato cellulare seleziona mutazioni che comportano minore capacità di moltiplicarsi e/o minore capacità di raggiungere gli organi bersaglio nell'ospite originario

È difficile sviluppare rapidamente un vaccino vivo attenuato SARS-CoV-2 a causa del tempo e delle conoscenze necessarie per garantire che sia adeguatamente attenuato e siano rimossi tutti i fattori di virulenza. Anche il mantenimento a lungo termine di scorte consistenti di vaccini attenuati è problematico. Poiché questo approccio si basa sull'utilizzo di un singolo ceppo virale, il vaccino potrebbe non proteggere in modo crociato da altri ceppi, in particolare perché il virus continua a diffondersi in tutto il mondo e muta con l'aumentare della pressione di selezione una volta che l'immunità diventa più diffusa.⁸³

⁸³ Stern PL.

Key steps in vaccine development.

Ann Allergy Asthma Immunol. 2020 Jul;125(1):17-27. doi: 10.1016/j.anai.2020.01.025. Epub 2020 Feb 7.

[https://www.annallergy.org/article/S1081-1206\(20\)30071-5/fulltext](https://www.annallergy.org/article/S1081-1206(20)30071-5/fulltext)

Risk of evolutionary escape from neutralizing antibodies targeting SARS-CoV-2 spike protein

Debra Van Egeren, Alexander Novokhodko, et al medRxiv 2020.11.17.20233726; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.11.17.20233726>

<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.11.17.20233726v1.full>

Kennedy DA, Read AF.

Monitor for COVID-19 vaccine resistance evolution during clinical trials.

PLoS Biol. 2020;18(11):e3001000. Published 2020 Nov 9. doi:10.1371/journal.pbio.3001000

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7676675/>

Nyayanit DA, Yadav PD, Kharde R, Shete-Aich A.

Quasispecies analysis of the SARS-CoV-2 from representative clinical samples: A preliminary analysis.

Indian J Med Res. 2020 Jul & Aug;152(1 & 2):105-107. doi: 10.4103/ijmr.IJMR_2251_20. PMID: 32773417.

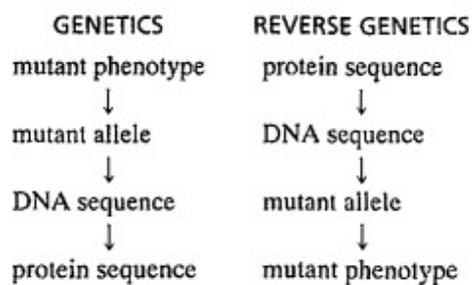
https://www.ijmr.org.in/temp/IndianJMedRes1521105-8570386_234823.pdf

La [genetica inversa](#) è stata ampiamente impiegata sia per comprendere la biologia del SARS-Cov-2⁸⁴ che per la progettazione razionale del virus vaccinale attenuato ideale,⁸⁵ ad esempio determinando i fattori di virulenza chiave, come è stato fatto per altri coronavirus⁸⁶.

APPROFONDIMENTO: LA GENETICA INVERSA

La genetica inversa è una tecnica potente per la generazione di un virus infettivo dal cDNA a lunghezza intera di DNA clonato/sintetizzato di un dato virus. La manipolazione del DNA mediante metodi consolidati di biologia molecolare consente la modificazione della sequenza prima della produzione del virus, se lo si desidera. Consente l'identificazione inequivocabile dei marcatori molecolari per un dato virus, comprese le caratteristiche del genoma, la virulenza, la tipologia dell'ospite, ecc. di un dato virus, e come tale è una componente chiave nello studio dei coronavirus.

La genetica classica inizia con lo studio di un fenotipo mutante, procede a dimostrare l'esistenza del gene rilevante mediante l'analisi della progenie, e infine clona e sequenzia il gene per determinarne la sequenza di DNA e della proteina. La genetica inversa invece, un nuovo approccio reso possibile dalla tecnologia del DNA ricombinante, funziona nella direzione opposta. La genetica inversa parte da una proteina o DNA per il quale non ci sono informazioni genetiche e poi lavora a ritroso per creare un gene mutante, finendo con un fenotipo mutante.



La "Genetica inversa" descrive l'approccio "dal gene al fenotipo", con il quale è possibile indagare le funzioni di un gene di interesse interrompendo l'espressione fisiologica di questo gene.

La "Genetica in avanti" è un approccio "dal fenotipo al gene" cerca di trovare le basi genetiche di un fenotipo o di un tratto senza la necessità di una conoscenza preliminare.

⁸⁴ Thi Nhu Thao T, et al
Rapid reconstruction of SARS-CoV-2 using a synthetic genomics platform.
Nature. 2020 Jun;582(7813):561-565. doi: 10.1038/s41586-020-2294-9. Epub 2020 May 4.
<https://www.nature.com/articles/s41586-020-2294-9>

Hou YJ, Okuda K, Edwards CE, et al.
SARS-CoV-2 Reverse Genetics Reveals a Variable Infection Gradient in the Respiratory Tract.
Cell. 2020;182(2):429-446.e14. doi:10.1016/j.cell.2020.05.042
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7250779/>

⁸⁵ Todorov G, Uversky VN.
A Possible Path towards Rapid Development of Live-Attenuated SARS-CoV-2 Vaccines: Plunging into the Natural Pool.
Biomolecules. 2020;10(10):1438. Published 2020 Oct 14. doi:10.3390/biom10101438
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7602031/>

Ma Z, Li Z, Dong L, Yang T, Xiao S.
Reverse genetic systems: Rational design of coronavirus live attenuated vaccines with immune sequelae.
Adv Virus Res. 2020;107:383-416. doi:10.1016/bs.aivir.2020.06.003
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7326460/>

⁸⁶ Cockrell AS, Beall A, Yount B, Baric R.
Efficient Reverse Genetic Systems for Rapid Genetic Manipulation of Emergent and Preemergent Infectious Coronaviruses.
Methods Mol Biol. 2017;1602:59-81. doi:10.1007/978-1-4939-6964-7_5
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7120940/>

Silva SJRD, Germano Mendes RP, Alves da Silva CT, Lorusso A, Kohl A, Pena L.
Insights into SARS-CoV-2, the Coronavirus Underlying COVID-19: Recent Genomic Data and the Development of Reverse Genetics Systems.
J Gen Virol. 2020;101(10):1021-1024. doi:10.1099/jgv.0.001458
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7660456/>

Thi Nhu Thao, T., Labroussaa, F., Ebert, N. et al.
Rapid reconstruction of SARS-CoV-2 using a synthetic genomics platform.
Nature 582, 561–565 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2294-9>
<https://www.nature.com/articles/s41586-020-2294-9>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21843/>

Con l'avvento delle moderne tecnologie di sequenziamento del DNA e della PCR, i ricercatori si sono trovati di fronte ad un elevato numero di sequenze geniche la cui funzione era ancora sconosciuta. Quindi è nata l'esigenza di alterare la sequenza e di conseguenza la funzione di tali geni per poterne studiare le conseguenze a livello fenotipico.

Strumenti importanti per la genetica inversa sono la mutagenesi in vitro e la distruzione genica, nota anche come knockout genico. Un approccio consiste nell'inserire un marcatore selezionabile nel mezzo di un gene clonato e quindi utilizzare questo costrutto per trasformare un destinatario wild-type.

I SISTEMI DI GENETICA INVERSA (RGS) E LO STUDIO DEI CORONAVIRUS ANIMALI POTENZIALMENTE PERICOLOSI PER L'UOMO. ⁸⁷

Gli RGS sono stati ampiamente utilizzati nell'analisi dell'insorgenza e del potenziale patogeno dei CoVs zoonotici. Ad esempio, chimere zibetto-uomo di SARS-CoV sono state utilizzate per dimostrare che il gene S dei ceppi di zibetto non può mediare in modo efficiente la replicazione virale nelle cellule che esprimono ACE2 umano, suggerendo che le mutazioni del gene S sono state fondamentali per l'insorgenza nell'uomo del SARS-CoV ⁸⁸.

Un ostacolo significativo allo studio dei CoVs zoonotici, inclusi HKU3-CoV e HKU5-CoV, è stata la difficoltà nel trovare un sistema di coltura praticabile a causa dell'incompatibilità dei recettori o di possibili problemi con il genoma virale complessivo.

La sostituzione di porzioni minime del gene S con genomi sintetizzati *de novo* funzionanti di HKU3 e HKU5, è stata utilizzata per superare i problemi di legame al recettore, (**Fig. A**).

Una volta assemblati, questi virus chimerici potevano infettare e replicarsi in modo efficiente in vitro e in vivo, dimostrando che il legame al recettore era una barriera primaria per l'infezione da HKU3 e HKU5 delle cellule umane ⁸⁹.

Per testare la capacità dei geni S del CoV di mediare l'infezione è stata utilizzata una strategia complementare (**Fig. B**). I geni S dei CoV zoonotici SHC014-CoV e WIV1-CoV sono stati inseriti in una sequenza competente per la replicazione nel topo adattato per il SARS-CoV MA15.

Le chimere SHC014-MA15 e WIV1-MA15 hanno dimostrato di essere in grado di replicarsi in vitro e in vivo, suggerendo che questi virus potrebbero emergere nell'uomo ⁹⁰. Questi studi iniziali hanno giustificato

⁸⁷ Johnson BA, Graham RL, Menachery VD.

Viral metagenomics, protein structure, and reverse genetics: Key strategies for investigating coronaviruses. *Virology*. 2018 Apr;517:30-37. doi: 10.1016/j.virol.2017.12.009. Epub 2017 Dec 24. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5869085/>

⁸⁸ Sheahan T, Rockx B, Donaldson E, Corti D, Baric R.

Pathways of cross-species transmission of synthetically reconstructed zoonotic severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Virol*. 2008;82(17):8721-8732. doi:10.1128/JVI.00818-08 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2519660/>

⁸⁹ Agnihothram S, Yount BL Jr, Donaldson EF, et al.

A mouse model for Betacoronavirus subgroup 2c using a bat coronavirus strain HKU5 variant. *mBio*. 2014;5(2):e00047-e14. Published 2014 Mar 25. doi:10.1128/mBio.00047-14 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3977350/>

Becker MM, Graham RL, Donaldson EF, Rockx B, Sims AC, Sheahan T, Pickles RJ, Corti D, Johnston RE, Baric RS, Denison MR.

Synthetic recombinant bat SARS-like coronavirus is infectious in cultured cells and in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Dec 16;105(50):19944-9. doi: 10.1073/pnas.0808116105. Epub 2008 Nov 26. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2588415/>

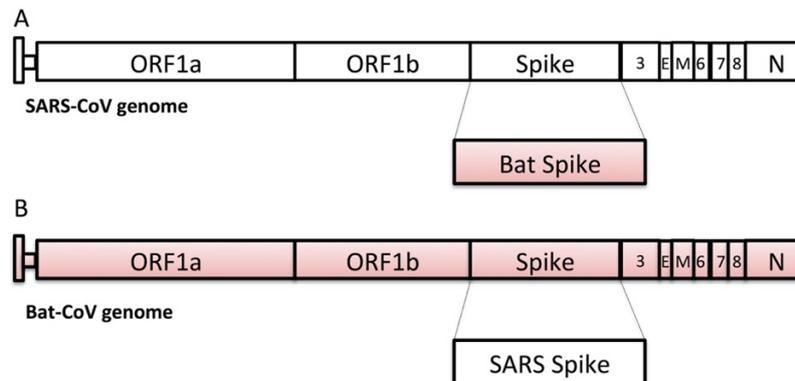
⁹⁰ Menachery VD, et al

A SARS-like cluster of circulating bat coronaviruses shows potential for human emergence. *Nat Med*. 2015 Dec;21(12):1508-13. doi: 10.1038/nm.3985. Epub 2015 Nov 9. Erratum in: *Nat Med*. 2016 Apr;22(4):446. Erratum in: *Nat Med*. 2020 Jul;26(7):1146. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4797993/>

Menachery VD, Yount BL Jr, Sims AC, et al.
SARS-like WIV1-CoV poised for human emergence.

ulteriori esami e caratterizzazioni di SHC014-CoV e WIV1-CoV a lunghezza intera e hanno indicato che per l'insorgenza e la patogenesi sono necessarie specifiche mutazioni nella sequenza virale.

Insieme, queste due strategie sfruttano la genetica inversa per creare coronavirus chimerici, aggirando i limiti dei sistemi di coltura specie-specifici per analizzare il potenziale di insorgenza dei CoVs zoonotici nell'uomo.



<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682217304142>

Doppio approccio per sfruttare la genetica inversa. Utilizzando i cloni molecolari del coronavirus, sono state impiegate due strategie per esplorare l'emergenza e il potenziale patogeno di sequenze derivate da popolazioni zoonotiche. **A)** Sostituendo le proteine spike wild-type - questa strategia esplora la capacità delle proteine spike nel contesto di una sequenza virale nota per essere capace di replicazione. Questi studi forniscono informazioni sul potenziale delle proteine spike di mediare l'infezione di cellule umane e causare malattie in vivo e aiutano a esaminare l'ampia efficacia delle terapie dirette contro le proteine spike di CoV. **B)** Utilizzando porzioni o proteine intere spike di CoV competenti per la replicazione - questo approccio esamina la capacità della sequenza virale nel mediare infezioni e patogenesi. Questi studi forniscono informazioni sulla capacità della sequenza selezionata di infettare e causare malattie se associata al legame / ingresso del recettore. Questo approccio può anche valutare l'efficacia di terapie mirate a porzioni del genoma del CoV diverse dalla spike. Entrambi gli approcci sono stati utilizzati per esaminare i virus dei pipistrelli attualmente in circolazione nelle popolazioni animali di tutto il mondo.

SISTEMI DI GENETICA INVERSA UTILIZZATI PER LO STUDIO DEL SARS-COV-2

Nel gennaio 2020 sono state pubblicate le sequenze complete del genoma virale di cinque pazienti a Wuhan durante una fase iniziale dell'epidemia e il SARS-CoV-2 è risultato essere un nuovo CoV, con un'identità di sequenza appena inferiore all'80% rispetto a SARS-CoV⁹¹.

I virus più strettamente correlati al SARS-CoV-2 erano i coronavirus isolati dai pipistrelli, in particolare RaTG13. Pertanto, è stato ipotizzato che i pipistrelli - un noto serbatoio di coronavirus - potrebbero fungere da serbatoio per questo nuovo coronavirus.

Le sequenze genomiche di numerosi ceppi di SARS-CoV-2 da tutto il mondo sono ora disponibili al pubblico.⁹² Questi dati permetteranno di ottenere una caratterizzazione dettagliata della sequenza e delle funzioni proteiche e di svolgere studi comparativi.

I sistemi di genetica inversa possono essere utilizzati per identificare in modo inequivocabile le caratteristiche chiave, per esempio i marcatori molecolari di virulenza, la tipologia dell'ospite e la trasmissibilità del SARS-CoV-2 possono essere confrontati con quelli di virus correlati al fine di far luce sulla biologia di questo patogeno emergente.

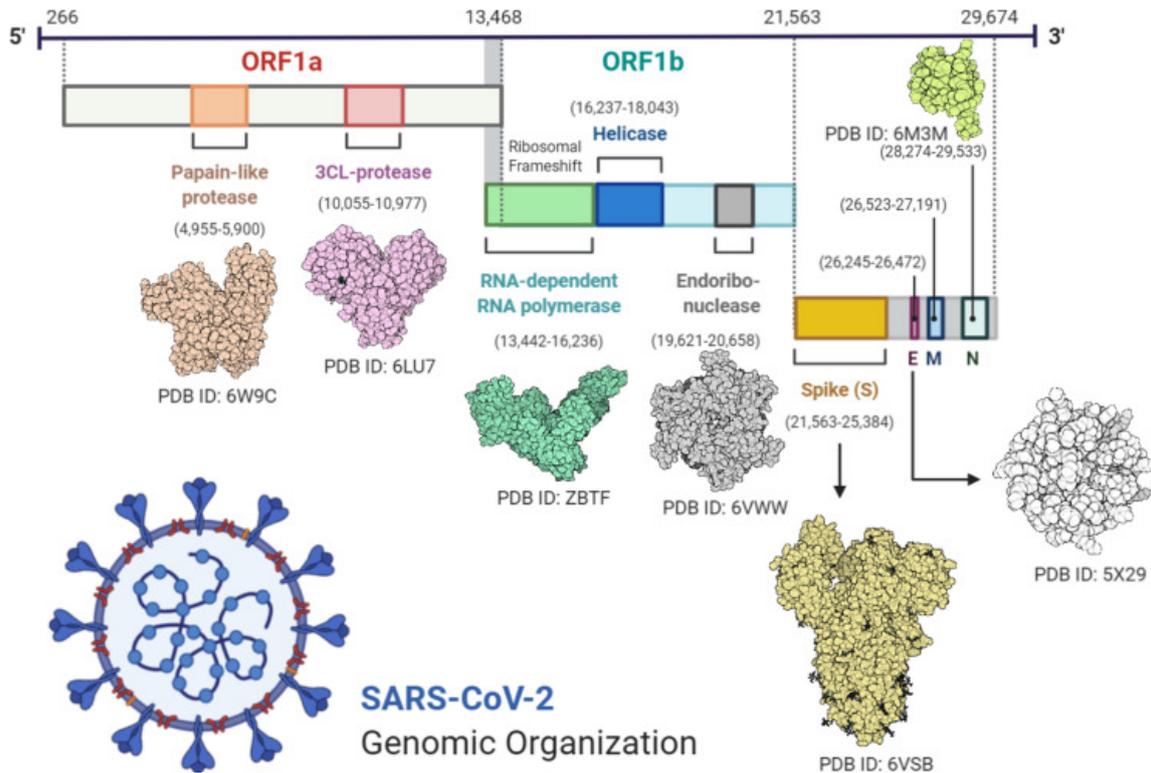
Di seguito sono riassunte l'organizzazione del genoma del SARS-Cov-2 e le strategie per i sistemi di genetica inversa per generare virus ricombinanti utili per studiare le proprietà e l'evoluzione del genoma virale.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2016;113(11):3048-3053. doi:10.1073/pnas.1517719113
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4801244/>

⁹¹ <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/sequencing-of-SARS-CoV-2.pdf>

⁹² <https://www.gisaid.org/>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sars-cov-2/>

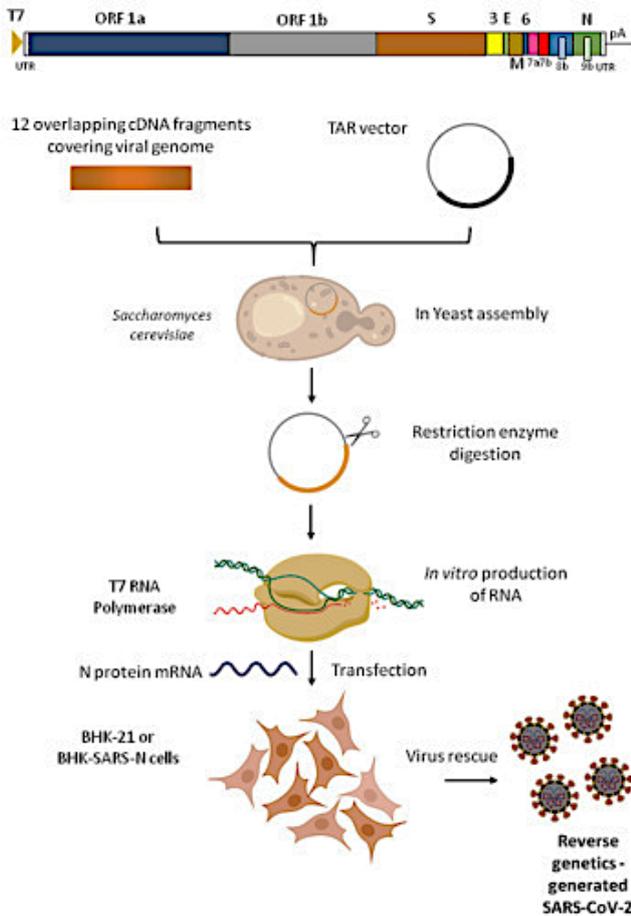
Thi Nhu Thao T,
Rapid reconstruction of SARS-CoV-2 using a synthetic genomics platform.
Nature. 2020 Jun;582(7813):561-565. doi: 10.1038/s41586-020-2294-9. Epub 2020 May 4.
<https://www.nature.com/articles/s41586-020-2294-9>



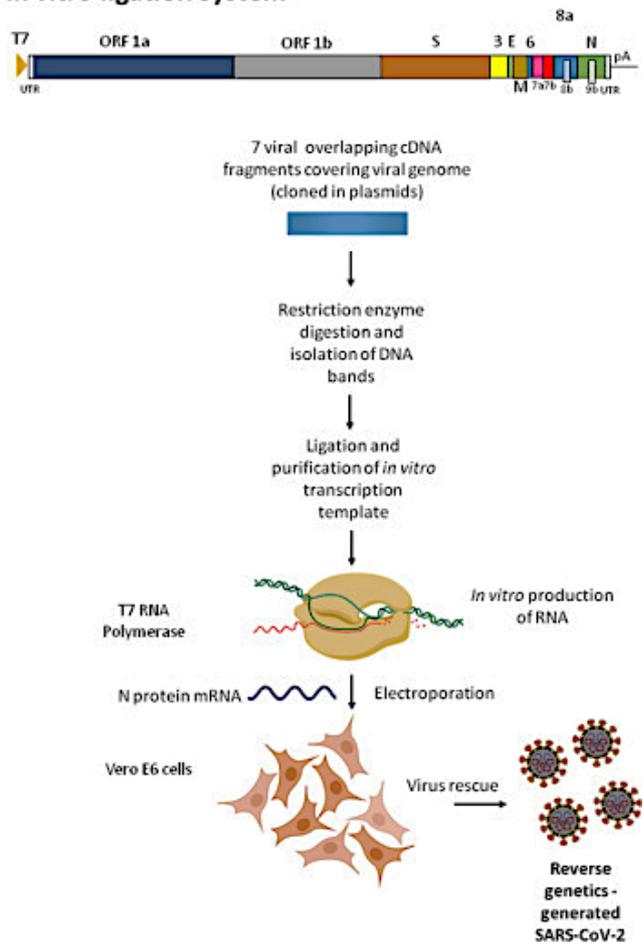
SARS-CoV-2
Genomic Organization

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7755200/>
Diagramma che rappresenta l'organizzazione genomica di SARS-CoV-2.

yeast-based system



in vitro ligation system



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7660456/>
Sistemi di genetica inversa per SARS-CoV-2. (a) Descrizione del sistema di assemblaggio e recupero a base di *Saccharomyces cerevisiae* (b) Descrizione del sistema di legatura in vitro. Una rappresentazione schematica dell'organizzazione del genoma di SARS-CoV-2 è mostrata nella parte superiore dei pannelli. Promotore della RNA polimerasi T7, T7; UTR, regione non tradotta; pA, coda di poli(A).

LA CONTROVERSIA SULL'ORIGINE DEL SARS-COV-2

Pur non essendo oggetto di questa revisione, vale la pena segnalare che la discussione sull'origine dell'insorgenza umana del SARS-Cov-2 ha portato alla pubblicazione di diversi studi, tra cui alcuni molto recenti sia sull'evoluzione naturale del SARS-Cov-2 mediante ricombinazione di ceppi di CoVs di diverse specie animali,⁹³ che sull'uso della genetica inversa per la selezione artificiale di chimere di Covs in grado di infettare l'uomo.⁹⁴

APPROFONDIMENTO

[Replicazione e genetica virale](#)
[Genetica-virale](#)

VIDEO

[virus meccanismi replicativi](#)
[Cos'è il DNA ricombinante](#)
[Crispr-cas 9 le forbici del DNA](#)

LIBRO [La Genomica funzionale](#)

METODI PER L'ATTENUAZIONE DEI VIRUS VACCINALI

I coronavirus hanno diversi geni che non sono necessari per la replicazione e che possono essere eliminati, portando all'attenuazione in vivo. La delezione di varie proteine non strutturali e della proteina E strutturale, è stata utilizzata come strategia per progettare ceppi vaccinali di diversi coronavirus zoonotici e veterinari. La delezione della proteina E porta all'attenuazione e alla generazione di un ceppo vaccinale efficace⁹⁵, ma è stata riportata la reversione del fenotipo attenuato⁹⁶. La **delezione dei fattori di virulenza** è quindi il meccanismo di attenuazione più appropriato.

⁹³ Tagliamonte MS, Abid N, Borocci S, Sangiovanni E, Ostrov DA, Kosakovsky Pond SL, Salemi M, Chillemi G, Mavian C. Multiple Recombination Events and Strong Purifying Selection at the Origin of SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein Increased Correlated Dynamic Movements.

Int J Mol Sci. 2020 Dec 23;22(1):E80. doi: 10.3390/ijms22010080.
<https://www.mdpi.com/1422-0067/22/1/80>

⁹⁴ Segreto R, Deigin Y.

The genetic structure of SARS-CoV-2 does not rule out a laboratory origin: SARS-COV-2 chimeric structure and furin cleavage site might be the result of genetic manipulation [published online ahead of print, 2020 Nov 17]. Bioessays. 2020;e2000240. doi:10.1002/bies.202000240
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7744920/>

⁹⁵ Enjuanes L, Zuñiga S, Castaño-Rodríguez C, Gutierrez-Alvarez J, Canton J, Sola I. Molecular Basis of Coronavirus Virulence and Vaccine Development. Adv Virus Res. 2016;96:245-286. doi:10.1016/bs.aivir.2016.08.003
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7112271/>

Netland J, DeDiego ML, Zhao J, Fett C, Álvarez E, Nieto-Torres JL, Enjuanes L, Perlman S. Immunization with an attenuated severe acute respiratory syndrome coronavirus deleted in E protein protects against lethal respiratory disease. Virology. 2010 Mar 30;399(1):120-128. doi: 10.1016/j.virol.2010.01.004. Epub 2010 Jan 27.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2830353/>

Regla-Nava JA, Nieto-Torres JL, Jimenez-Guardeño JM, et al. Severe acute respiratory syndrome coronaviruses with mutations in the E protein are attenuated and promising vaccine candidates. J Virol. 2015;89(7):3870-3887. doi:10.1128/JVI.03566-14
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4403406/>

Fett C, DeDiego ML, Regla-Nava JA, Enjuanes L, Perlman S. Complete protection against severe acute respiratory syndrome coronavirus-mediated lethal respiratory disease in aged mice by immunization with a mouse-adapted virus lacking E protein. J Virol. 2013;87(12):6551-6559. doi:10.1128/JVI.00087-13
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3676143/>

⁹⁶ Jimenez-Guardeño JM, Regla-Nava JA, Nieto-Torres JL, et al. Identification of the Mechanisms Causing Reversion to Virulence in an Attenuated SARS-CoV for the Design of a Genetically Stable Vaccine. PLoS Pathog. 2015;11(10):e1005215. Published 2015 Oct 29. doi:10.1371/journal.ppat.1005215

Un altro approccio all'attenuazione virale è noto come **deottimizzazione del codone**⁹⁷, in cui la sequenza di acido nucleico viene modificata in modo che vengano utilizzati codoni non ottimali per codificare la sequenza di amminoacidi wild-type, e venga ridotta notevolmente la traduzione della proteina virale durante l'infezione con il virus vaccinale.

Tuttavia, la generazione di un ceppo attenuato di un agente patogeno da utilizzare come vaccino richiede la dimostrazione della sua incapacità di tornare patogeno per reversione genetica.⁹⁸ Ciò è particolarmente impegnativo nel caso dei coronavirus poiché sono noti per la ricombinazione in natura⁹⁹ e un ceppo vaccinale attenuato potrebbe, in teoria, ricombinarsi con i coronavirus selvaggi per ricreare un ceppo patogeno.¹⁰⁰

Finora, ci sono solo tre vaccini SARS-CoV-2 attenuati generati dalla deottimizzazione del codone, 2 in fase di sviluppo preclinico dalla Mehmet Ali Aydinlar University in Turchia, e dalla Indian Immunologicals Ltd e

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4626112/>

⁹⁷ Groenke N,
Mechanism of Virus Attenuation by Codon Pair Deoptimization.
Cell Rep. 2020 Apr 28;31(4):107586. doi: 10.1016/j.celrep.2020.107586. PMID: 32348767.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211124720305350>

⁹⁸ Bull JJ.
Evolutionary reversion of live viral vaccines: Can genetic engineering subdue it?
Virus Evol. 2015 Jan;1(1):vev005. doi: 10.1093/ve/vev005. Epub 2015 Jan 1.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4811365/>
Osterrieder N, Kunec D.
Attenuation of Viruses by Large-Scale Recoding of their Genomes: the Selection Is Always Biased.
Curr Clin Microbiol Rep. 2018;5(1):66-72. doi:10.1007/s40588-018-0080-3
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7100164/>

Gonçalves-Carneiro D, Bieniasz PD.
Mechanisms of Attenuation by Genetic Recoding of Viruses.
mBio. 2021 Jan 5;12(1):e02238-20. doi: 10.1128/mBio.02238-20. PMID: 33402534.
<https://mbio.asm.org/content/12/1/e02238-20.long>

Hanley KA.
The double-edged sword: How evolution can make or break a live-attenuated virus vaccine.
Evolution (N Y). 2011;4(4):635-643. doi:10.1007/s12052-011-0365-y
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3314307/>

⁹⁹ Tao Y, Shi M, Chommanard C, et al.
Surveillance of Bat Coronaviruses in Kenya Identifies Relatives of Human Coronaviruses NL63 and 229E and Their Recombination History.
J Virol. 2017;91(5):e01953-16. Published 2017 Feb 14. doi:10.1128/JVI.01953-16
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5309958/>

Lau SK, Feng Y, Chen H, et al.
Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) Coronavirus ORF8 Protein Is Acquired from SARS-Related Coronavirus from Greater Horseshoe Bats through Recombination.
J Virol. 2015;89(20):10532-10547. doi:10.1128/JVI.01048-15
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4580176/>

Luo CM, Wang N, Yang XL, et al.
Discovery of Novel Bat Coronaviruses in South China That Use the Same Receptor as Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus.
J Virol. 2018;92(13):e00116-18. Published 2018 Jun 13. doi:10.1128/JVI.00116-18
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6002729/>

¹⁰⁰ Gundlach BR, Lewis MG, Sopper S, et al.
Evidence for recombination of live, attenuated immunodeficiency virus vaccine with challenge virus to a more virulent strain.
J Virol. 2000;74(8):3537-3542. doi:10.1128/jvi.74.8.3537-3542.2000
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC111861/>

Kiseleva I, Dubrovina I, Bazhenova E, Fedorova E, Larionova N, Rudenko L.
Possible outcomes of reassortment in vivo between wild type and live attenuated influenza vaccine strains. Vaccine. 2012 Dec 7;30(51):7395-9. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.09.076. Epub 2012 Oct 9.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23063833/>

Griffith University e uno in fase clinica dalla Serum Institute of India/Codagenix. Quest'ultimo è impiegato come spray nasale ed è attualmente sperimentato in Inghilterra.¹⁰¹



1. Recode



2. Synthesize



3. Transfect



4. Recover

<https://codagenix.com/technology/platform-overview/>

I genomi virali vengono elaborati dall'algoritmo computerizzato di Codagenix per introdurre centinaia di mutazioni silenziose nel genoma per utilizzare coppie di codoni sottorappresentate nelle cellule umane (1). Il genoma risultante che è "de-ottimizzato" per la traduzione nella cellula ospite umana viene sintetizzato da zero (2), assemblato in un intero genoma, trasfettato in cellule (3) e virus vivi, "de-ottimizzati", attenuati vengono recuperati (4). Questo rapido processo basato sulla coltura cellulare può generare candidati vaccini principali pronti per gli studi sugli animali in settimane rispetto ai mesi, per gli approcci tradizionali per attenuare i virus vivi.

APPROFONDIMENTO: LA REVERSIONE GENETICA¹⁰²

La **ricombinazione** descrive un processo mediante il quale vengono scambiate sequenze di acidi nucleici da due diversi virus parentali in modo che la progenie contenga sequenze derivate da entrambi i genitori. Sia i virus a RNA che quelli a DNA possono subire ricombinazione quando due varianti genomiche correlate di un virus co-infettano una cellula.

Nei sistemi virali esistono tre diversi meccanismi di ricombinazione, dettati dalle strutture dei genomi virali. Per i **virus a DNA**, la ricombinazione avviene per rottura fisica e ricongiungimento di molecole di DNA parentale attraverso regioni di omologia di sequenza, in modo simile o identico allo stesso processo nei batteri o negli organismi superiori.

Per i **virus a RNA** contenenti genomi segmentati, lo scambio genico avviene principalmente attraverso il **riassortimento** dei singoli segmenti del genoma genitoriale in virus della progenie,¹⁰³ tuttavia è stata segnalata anche la ricombinazione intragenica per gli orthomyxovirus segmentati, i reovirus e i bunyavirus¹⁰⁴.

¹⁰¹ Safety and Immunogenicity of COVI-VAC, a Live Attenuated Vaccine Against COVID-19
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04619628>

<https://codagenix.com/technology/platform-overview/>

¹⁰² Condit RC, et al Brighton Collaboration Viral Vector Vaccines Safety Working Group (V3SWG). Unique safety issues associated with virus-vectored vaccines: Potential for and theoretical consequences of recombination with wild type virus strains. *Vaccine*. 2016 Dec 12;34(51):6610-6616. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.04.060. Epub 2016 Jun 23. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5204448/>

¹⁰³ Muslin C, Mac Kain A, Bessaud M, Blondel B, Delpeyroux F. Recombination in Enteroviruses, a Multi-Step Modular Evolutionary Process. *Viruses*. 2019;11(9):859. Published 2019 Sep 14. doi:10.3390/v11090859 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6784155/>

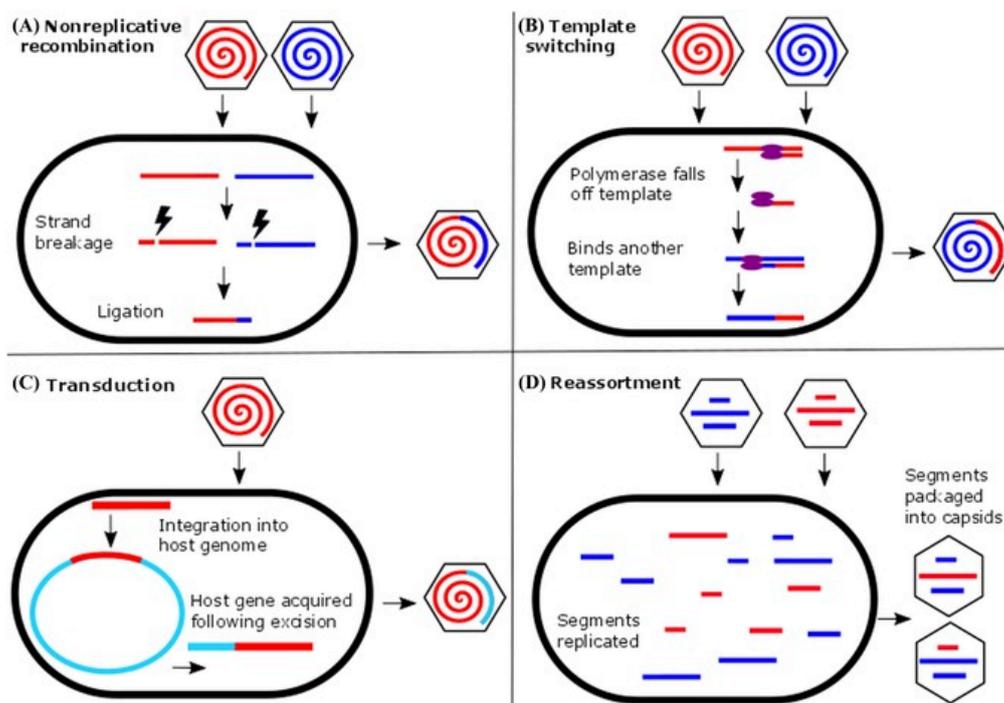
¹⁰⁴ McDonald SM, Nelson MI, Turner PE, Patton JT. Reassortment in segmented RNA viruses: mechanisms and outcomes. *Nat Rev Microbiol*. 2016;14(7):448-460. doi:10.1038/nrmicro.2016.46 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5119462/>

Lowen AC. It's in the mix: Reassortment of segmented viral genomes. *PLoS Pathog*. 2018;14(9):e1007200. Published 2018 Sep 13. doi:10.1371/journal.ppat.1007200 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6136819/>

Tao H, Steel J, Lowen AC. Intrahost dynamics of influenza virus reassortment. *J Virol*. 2014;88(13):7485-7492. doi:10.1128/JVI.00715-14 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4054463/>

La ricombinazione è stata osservata in diverse famiglie di **virus RNA a filamento singolo** (ssRNA) (-) e (+) sia in laboratorio che in natura; picornavirus, coronavirus, togavirus e retrovirus, tutti con genomi ssRNA di senso positivo, mostrano una ricombinazione relativamente efficiente.¹⁰⁵

La frequenza di ricombinazione tra virus a RNA di senso negativo (escluso il riassortimento dei genomi segmentati) sembra essere relativamente bassa¹⁰⁶.



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7167663/>

Principali meccanismi di ricombinazione genetica del virus. **(A)** Nella ricombinazione non replicativa, la rottura e la riparazione del filamento di acido nucleico consentono la ricombinazione di materiale genetico da diverse fonti nello stesso genoma virale. La ricombinazione può avvenire tra sequenze omologhe o non omologhe e tra virus coinfectanti o tra virus e filamenti di acidi nucleici estranei. **(B)** Nella ricombinazione replicativa o nella commutazione dello stampo, una molecola di polimerasi cambia lo stampo durante il processo di replicazione di un filamento di acido nucleico. Se i modelli derivano da fonti diverse, è possibile introdurre nuovo materiale genetico nel genoma del virus. **(C)** Durante il processo di integrazione del virus e di escissione da un genoma dell'ospite, i virus possono acquisire materiale genetico dall'ospite. Questi geni possono aumentare l'infettività o aiutare nella soppressione dell'ospite. **(D)** Il riassortimento avviene in seguito alla coinfezione di una cellula ospite da parte di più virus segmentati. I segmenti del genoma replicato sono confezionati in procapsidi indipendentemente dal genitore di origine. In questo modo, i segmenti di due o più genitori possono essere impacchettati nello stesso procapside, dando origine a una progenie geneticamente diversa da entrambi i genitori.

Phan TG, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H.

Evidence of intragenic recombination in G1 rotavirus VP7 genes.

J Virol. 2007;81(18):10188-10194. doi:10.1128/JVI.00337-07

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2045391/>

¹⁰⁵ Bentley K, Evans DJ.

Mechanisms and consequences of positive-strand RNA virus recombination.

J Gen Virol. 2018 Oct;99(10):1345-1356. doi: 10.1099/jgv.0.001142. Epub 2018 Aug 29. PMID: 30156526.

<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/jgv.0.001142>

Zhu Z, Meng K, Meng G.

Genomic recombination events may reveal the evolution of coronavirus and the origin of SARS-CoV-2.

Sci Rep. 2020 Dec 10;10(1):21617. doi: 10.1038/s41598-020-78703-6. PMID: 33303849; PMCID: PMC7728743.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7728743/>

Yi H.

2019 Novel Coronavirus Is Undergoing Active Recombination. C

lin Infect Dis. 2020 Jul 28;71(15):884-887. doi: 10.1093/cid/ciaa219.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7108124/pdf/ciaa219.pdf>

Neches RY, McGee MD, Kyrpides NC.

Recombination should not be an afterthought.

Nat Rev Microbiol. 2020;18(11):606. doi:10.1038/s41579-020-00451-1

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7503439/>

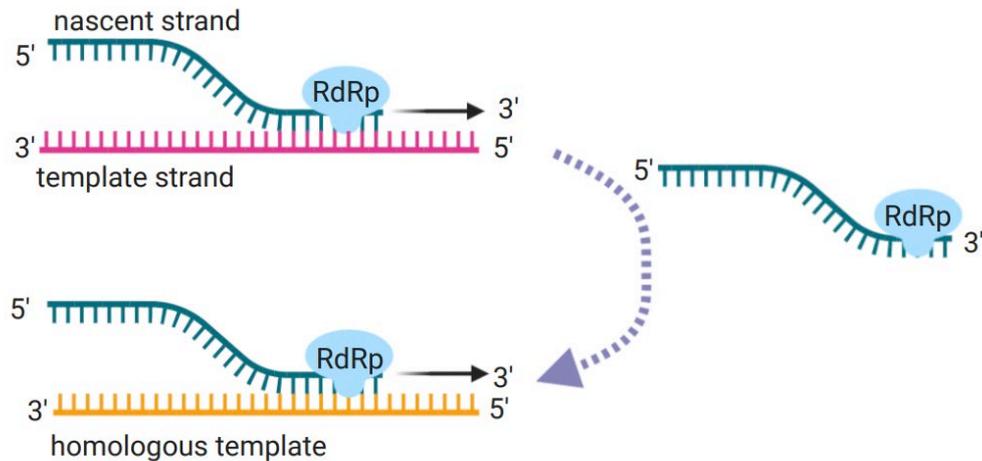
¹⁰⁶ Chare ER, Gould EA, Holmes EC.

Phylogenetic analysis reveals a low rate of homologous recombination in negative-sense RNA viruses.

J Gen Virol. 2003 Oct;84(Pt 10):2691-2703. doi: 10.1099/vir.0.19277-0.

<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.19277-0>

Si pensa che la ricombinazione nei virus a RNA, inclusi i coronavirus ¹⁰⁷ e il SARS-Cov-2 ¹⁰⁸, avvenga durante la replicazione tramite "copy choice", (nella cellula ospite mancano gli enzimi per ricombinare l'RNA e quindi la RNA polimerasi RNA-dipendente salta da uno stampo all'altro durante la sintesi dell'RNA), con il risultato che il genoma appena sintetizzato contiene sequenze di due diverse molecole parentali.



<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.09.01.278952v1.full.pdf>

La ricombinazione a scelta di copia (copy choice) è il meccanismo di ricombinazione primaria ipotizzato per i virus a RNA. Durante la sintesi del filamento negativo, il complesso di replicazione e il filamento nascente si dissociano dal filamento modello (template). Da lì, il complesso di replica può cambiare modello o riassociarsi con un filamento modello omologo o replicato. RdRp: RNA polimerasi RNA dipendente

Sebbene la ricombinazione richiede chiaramente la co-infezione di una cellula con due virus diversi, le circostanze che portano a tale co-infezione in vivo non sono chiaramente comprese. La co-infezione potrebbe teoricamente derivare dall'infezione con una popolazione eterogenea di virus, da infezioni seriali simultanee o sovrapposte con virus diversi o dall'infezione di un individuo che ospita un'infezione persistente, latente o riattivata con un virus diverso. ¹⁰⁹

¹⁰⁷ Sawicki SG, Sawicki DL, Siddell SG.

A contemporary view of coronavirus transcription.

J Virol. 2007;81(1):20-29. doi:10.1128/JVI.01358-06

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1797243/>

Pilipenko EV, Gmyl AP, Agol VI.

A model for rearrangements in RNA genomes.

Nucleic Acids Res. 1995;23(11):1870-1875. doi:10.1093/nar/23.11.1870

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC306956/pdf/nar00011-0040.pdf>

Sola I, Almazán F, Zúñiga S, Enjuanes L.

Continuous and Discontinuous RNA Synthesis in Coronaviruses.

Annu Rev Virol. 2015;2(1):265-288. doi:10.1146/annurev-virology-100114-055218

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6025776/>

Enjuanes L, Almazán F, Sola I, Zúñiga S.

Biochemical aspects of coronavirus replication and virus-host interaction.

Annu Rev Microbiol. 2006;60:211-30. doi: 10.1146/annurev.micro.60.080805.142157.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16712436/>

¹⁰⁸ Brianna Chrisman et al

Structural Variants in SARS-CoV-2 Occur at Template-Switching Hotspots

bioRxiv 2020.09.01.278952; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.09.01.278952>

<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.09.01.278952v1.full.pdf>

Gallaher WR.

A palindromic RNA sequence as a common breakpoint contributor to copy-choice recombination in SARS-COV-2.

Arch Virol. 2020;165(10):2341-2348. doi:10.1007/s00705-020-04750-z

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7394270/>

Wang Q, Wu J, Wang H, et al.

Structural Basis for RNA Replication by the SARS-CoV-2 Polymerase.

Cell. 2020;182(2):417-428.e13. doi:10.1016/j.cell.2020.05.034

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7242921/>

¹⁰⁹ Santacroce L, Charitos IA, Carretta DM, De Nitto E, Lovero R.

Diversi studi hanno approfondito dal punto di vista bionformatico la possibile dinamica degli eventi di ricombinazione che potrebbero aver portato alla selezione di virus pandemici (come per es. il virus della "influenza Spagnola" del 2018 che si ritiene sia stato originato per ricombinazione tra i virus dell'influenza aviaria e dell'influenza A umana ¹¹⁰) e alla loro insorgenza nell'uomo.

Inoltre, la ricombinazione tra i virus nella popolazione umana è un fenomeno plausibile, come esemplificato da studi recenti che descrivono i ricombinanti del virus della varicella zoster, dell'epatite B e di enterovirus.¹¹¹

I virus vaccinali possono costituire un serbatoio per la ricombinazione a lungo termine in natura ed è stata documentata la ricombinazione tra ceppi vaccinali attenuati e virus selvatici circolanti o anche tra due diversi ceppi vaccinali attenuati vivi.

Nello specifico, esistono prove che il virus del vaiolo usato come vaccino durante la campagna di eradicazione del vaiolo in Brasile ha creato un serbatoio durevole in natura ed è la causa di numerose infezioni simili al vaiolo bovino nei bovini e nell'uomo ¹¹².

Allo stesso modo, il vaccino contro l'herpesvirus bovino può costituire un serbatoio latente negli animali vaccinati che, attraverso la riattivazione, può diffondersi ad altri animali ¹¹³.

Numerosi esempi documentano la probabile ricombinazione tra virus vaccinali vivi attenuati e virus selvatici. L'analisi filogenetica ha rivelato la ricombinazione tra ceppi circolanti selvatici del virus della malattia di Newcastle (NDV), un paramixovirus aviario e ceppi vaccinali NDV attenuati ¹¹⁴.

The human coronaviruses (HCoVs) and the molecular mechanisms of SARS-CoV-2 infection.
J Mol Med (Berl). 2021;99(1):93-106. doi:10.1007/s00109-020-02012-8
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7710368/>

Dennehy JJ.
Evolutionary ecology of virus emergence.
Ann N Y Acad Sci. 2017;1389(1):124-146. doi:10.1111/nyas.13304
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7167663/>

Holmes EC, Drummond AJ.
The evolutionary genetics of viral emergence.
Curr Top Microbiol Immunol. 2007;315:51-66. doi: 10.1007/978-3-540-70962-6_3.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7120214/pdf/978-3-540-70962-6_Chapter_3.pdf

¹¹⁰ He CQ, He M, He HB, Wang HM, Ding NZ.
The matrix segment of the "Spanish flu" virus originated from intragenic recombination between avian and human influenza A viruses.
Transbound Emerg Dis. 2019;66(5):2188-2195. doi:10.1111/tbed.13282
http://www.actabp.pl/pdf/3_2014/427.pdf

¹¹¹ Norberg P, Depledge DP, Kundu S, et al.
Recombination of Globally Circulating Varicella-Zoster Virus.
J Virol. 2015;89(14):7133-7146. doi:10.1128/JVI.00437-15
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4473579/>

Castelhano N, Araujo NM, Arenas M.
Heterogeneous recombination among Hepatitis B virus genotypes.
Infect Genet Evol. 2017 Oct;54:486-490. doi: 10.1016/j.meegid.2017.08.015. Epub 2017 Aug 18. PMID: 28827173.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28827173/>

Kyriakopoulou Z, Pliaka V, Amoutzias GD, Markoulatos P.
Recombination among human non-polio enteroviruses: implications for epidemiology and evolution.
Virus Genes. 2015 Apr;50(2):177-88. doi: 10.1007/s11262-014-1152-y. Epub 2014 Dec 24. PMID: 25537948.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25537948/>

¹¹² Moussatché N, Damaso CR, McFadden G.
When good vaccines go wild: Feral Orthopoxvirus in developing countries and beyond.
J Infect Dev Ctries. 2008 Jun 1;2(3):156-73. doi: 10.3855/jidc.258.
<https://jidc.org/index.php/journal/article/view/19738346/146>

¹¹³ Dispas M, Schynts F, Lemaire M, Letellier C, Vanopdenbosch E, Thiry E, Kerkhofs P.
Isolation of a glycoprotein E-deleted bovine herpesvirus type 1 strain in the field.
Vet Rec. 2003 Aug 16;153(7):209-12. doi: 10.1136/vr.153.7.209. PMID: 12956298.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12956298/>

¹¹⁴ Chong YL, Padhi A, Hudson PJ, Poss M.
The effect of vaccination on the evolution and population dynamics of avian paramyxovirus-1.

I virus attenuati contenuti nel vaccino antipolio orale spesso si ricombinano con ceppi indigeni di enterovirus umani correlati per produrre poliovirus circolanti derivati dal vaccino (cVDPV), che possono causare malattie paralitiche ¹¹⁵.

L'analisi di due ceppi di malattia isolati in modo indipendente del virus della diarrea virale bovina (BVDV) del pestivirus ha dimostrato che queste varianti sono nate tramite ricombinazione sia omologa che non omologa tra un ceppo BVDV persistente e uno vaccinale, con conseguente evoluzione di varianti con patogenicità aumentata rispetto ai ceppi parentali ¹¹⁶.

Inoltre, la ricombinazione tra ceppi vaccinali di herpesvirus aviario attenuati di derivazione indipendente può dare origine a virus ricombinanti patogeni circolanti ¹¹⁷.

Infine e con una modalità sorprendente, esistono prove che la reticuloendoteliosi da malattia retrovirale è stata introdotta nelle popolazioni aviarie attraverso la contaminazione durante lo sviluppo di vaccini contro il vaiolo degli uccelli (un poxvirus) e la malattia di Marek (un herpesvirus), e ora circola in natura come provirus integrato in alcuni genomi di pollame ¹¹⁸.

Tutti questi esempi attestano il potenziale di interazione genetica tra virus vaccinali e virus in natura, molto variabile a seconda dei virus coinvolti, ed è importante che le conseguenze impreviste di tale evento vengano considerate sia dagli sviluppatori che dai regolatori.

INTEGRAZIONE DEGLI RNA NON RETROVIRALI NEL DNA GENOMICO

I virus a RNA (RNA non retrovirali) hanno dimostrato anche di essere in grado di ricombinarsi con il genoma del dsDNA ospite delle cellule eucariote ¹¹⁹ e, più sorprendentemente, con i genomi dei virus a ssDNA. ¹²⁰

PLoS Pathog. 2010;6(4):e1000872. Published 2010 Apr 22. doi:10.1371/journal.ppat.1000872
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2858710/>

¹¹⁵ Kew OM, Wright PF, Agol VI, et al.
 Circulating vaccine-derived polioviruses: current state of knowledge.
 Bull World Health Organ. 2004;82(1):16-23.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2585883/pdf/15106296.pdf>

¹¹⁶ Becher P, Orlich M, Thiel HJ.
 RNA recombination between persisting pestivirus and a vaccine strain: generation of cytopathogenic virus and induction of lethal disease.
 J Virol. 2001;75(14):6256-6264. doi:10.1128/JVI.75.14.6256-6264.2001
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC114347/>

¹¹⁷ Lee SW, et al
 Attenuated vaccines can recombine to form virulent field viruses.
 Science. 2012 Jul 13;337(6091):188. doi: 10.1126/science.1217134.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22798607/>

¹¹⁸ Niewiadomska AM, Gifford RJ.
 The extraordinary evolutionary history of the reticuloendotheliosis viruses.
 PLoS Biol. 2013;11(8):e1001642. doi:10.1371/journal.pbio.1001642
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3754887/>

¹¹⁹ Stedman KM.
 Deep Recombination: RNA and ssDNA Virus Genes in DNA Virus and Host Genomes.
 Annu Rev Virol. 2015 Nov;2(1):203-17. doi: 10.1146/annurev-virology-100114-055127. Epub 2015 Sep 2.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26958913/>

Pistello M, Antonelli G.
 Integration of the viral genome into the host cell genome: a double-edged sword.
 Clin Microbiol Infect. 2016 Apr;22(4):296-298. doi: 10.1016/j.cmi.2016.01.022. Epub 2016 Feb 3
[https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(16\)00082-3/fulltext](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(16)00082-3/fulltext)

¹²⁰ Stedman K.
 Mechanisms for RNA capture by ssDNA viruses: grand theft RNA.
 J Mol Evol. 2013 Jun;76(6):359-64. doi: 10.1007/s00239-013-9569-9. Epub 2013 Jun 20.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23784142/>

Diemer GS, Stedman KM.
 A novel virus genome discovered in an extreme environment suggests recombination between unrelated groups of RNA and DNA viruses.
 Biol Direct. 2012;7:13. Published 2012 Jun 11. doi:10.1186/1745-6150-7-13
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3372434/>

La ricombinazione RNA-DNA consente ai virus ssDNA di accedere ad una varietà di sequenze molto più ampia rispetto alla sola sostituzione nucleotidica e alla ricombinazione DNA-DNA, mentre l'integrazione profonda di elementi virali nel DNA genomico sembra fornisca una difesa contro future infezioni da parte dello stesso virus o di un virus simile.

Questo fenomeno è stato dimostrato recentemente nella ricerca in pre-pubblicazione di Liguozhang et al anche per il SARS-CoV-2¹²¹, con il riscontro di trascritti chimerici coerenti con la trascrizione di sequenze virali integrate nel genoma.

Gli autori hanno rilevato che l'espressione endogena umana di trascrittasi inversa (LINE-1) * poteva essere indotta dall'infezione da SARS-CoV-2, o dall'esposizione a citochine in cellule in coltura, suggerendo un meccanismo molecolare per la retro-integrazione di SARS-CoV-2 nei pazienti, in cui l'infezione e la conseguente tempesta di citochine caratteristica della COVID-19 favoriscono l'integrazione.

* il genoma umano contiene circa il 17% di LINE-1. Le proteine LINE-1 hanno dimostrato di essere dei chaperone degli acidi nucleici con un'elevata affinità di legame per l'RNA, quindi possono retro-integrare gli RNA virali esogeni.¹²²

Questa nuova caratteristica dell'infezione da SARS-CoV-2 può spiegare perché i pazienti possono continuare a produrre RNA virale non infettivo dopo il recupero e la positività continua o ricorrente per lunghi periodi del test molecolare.

Infatti, le sequenze di SARS-CoV-2 retro-inserite sono molto probabilmente frammenti sub-genomici, poiché le giunzioni di integrazione sono per lo più arricchite in corrispondenza della sequenza N, escludendo la produzione di virus infettivo, come avviene anche per altri virus (es. bornavirus¹²³). Tuttavia non è al momento possibile escludere che l'integrazione porti ad un'infezione cronica in grado di riacutizzarsi in seguito a stimoli scatenanti.

Da una prospettiva evolutiva, la retro-integrazione dell'RNA virale mediato da LINE-1 potrebbe essere una risposta adattativa da parte dell'ospite per fornire un'espressione sostenuta di antigene, eventualmente allo scopo di migliorare l'immunità protettiva.¹²⁴

Dall'altra parte, la retro-integrazione degli RNA virali potrebbe essere dannosa e causare una risposta immunitaria più grave nei pazienti, come una "tempesta di citochine" o reazioni autoimmuni, come avviene con altri virus integrati nel genoma.¹²⁵

Stedman KM.

Deep Recombination: RNA and ssDNA Virus Genes in DNA Virus and Host Genomes. *Annu Rev Virol.* 2015 Nov;2(1):203-17. doi: 10.1146/annurev-virology-100114-055127. Epub 2015 Sep 2. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26958913/>

¹²¹ Zhang L, Richards A, Khalil A, Wogram E, Ma H, Young RA, Jaenisch R. SARS-CoV-2 RNA reverse-transcribed and integrated into the human genome. *bioRxiv [Preprint]*. 2020 Dec 13:2020.12.12.422516. doi: 10.1101/2020.12.12.422516. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.12.12.422516v1.full.pdf>

¹²² Richardson SR, Doucet AJ, Kopera HC, Moldovan JB, Garcia-Perez JL, Moran JV. The Influence of LINE-1 and SINE Retrotransposons on Mammalian Genomes. *Microbiol Spectr.* 2015;3(2):MDNA3-2014. doi:10.1128/microbiolspec.MDNA3-0061-2014 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4498412/>

¹²³ Horie M, Honda T, Suzuki Y, et al. Endogenous non-retroviral RNA virus elements in mammalian genomes. *Nature.* 2010;463(7277):84-87. doi:10.1038/nature08695 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2818285/>

¹²⁴ <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29028182/>
Hurwitz JL, Jones BG, Charpentier E, Woodland DL. Hypothesis: RNA and DNA Viral Sequence Integration into the Mammalian Host Genome Supports Long-Term B Cell and T Cell Adaptive Immunity. *Viral Immunol.* 2017 Nov;30(9):628-632. doi: 10.1089/vim.2017.0099. Epub 2017 Oct 13.

¹²⁵ Balada E, Vilardell-Tarrés M, Ordi-Ros J. Implication of human endogenous retroviruses in the development of autoimmune diseases.

Questi risultati possono essere rilevanti anche per gli attuali studi clinici di terapie antivirali.

La dipendenza dai test PCR per valutare l'effetto dei trattamenti sulla replicazione virale e sulla carica virale potrebbe non riflettere l'efficacia del trattamento nel sopprimere la replicazione virale, poiché il test PCR può rilevare trascritti virali da sequenze virali stabilmente integrate nel genoma piuttosto che dovute al virus infettivo.

INTERAZIONE DEI VIRUS A RNA CON IL MICROBIOTA INTESTINALE

Un filone di ricerca piuttosto recente sta indagando sulle modalità con cui interagiscono i batteri del microbiota e i virus delle cellule eucariote.

È interessante notare che i batteri intestinali possono promuovere l'infezione di diversi virus a RNA enterici dei mammiferi.

Erickson et al ¹²⁶ hanno esaminato un pannello di 41 ceppi batterici come piattaforma per determinare in che modo i diversi batteri influiscono sull'infezione del poliovirus, un modello di virus enterico.

La maggior parte dei ceppi batterici, compresi quelli estratti dal contenuto cecale dei topi, legava il poliovirus e ciascun batterio era in grado di legare più virioni.

Alcuni ceppi batterici hanno aumentato la co-infezione virale delle cellule di mammifero anche a un basso rapporto virus/cellula ospite.

La co-infezione virale mediata dai batteri correlava con l'aderenza batterica alle cellule.

È importante sottolineare che i ceppi batterici che hanno indotto la co-infezione virale hanno facilitato la ricombinazione genetica tra virus diversi, rimuovendo così mutazioni deleterie e ripristinando il fitness (capacità replicativa) virale.

Pertanto, le interazioni batteri-virus possono aumentare il fitness dei virus attraverso la ricombinazione virale nei siti iniziali di infezione.¹²⁷

Nella figura seguente sono rappresentati i meccanismi specifici di potenziamento batterico delle infezioni da virus enterici dei mammiferi:

- i glicani batterici possono stabilizzare i virioni e aumentare il legame del virus alle cellule bersaglio;
- le interazioni batteriche con i virus enterici possono regolare le risposte immunitarie antivirali in maniera pro-virale.
- Infine, le interazioni batteriche possono facilitare le co-infezioni virali delle cellule bersaglio e la successiva ricombinazione virale.

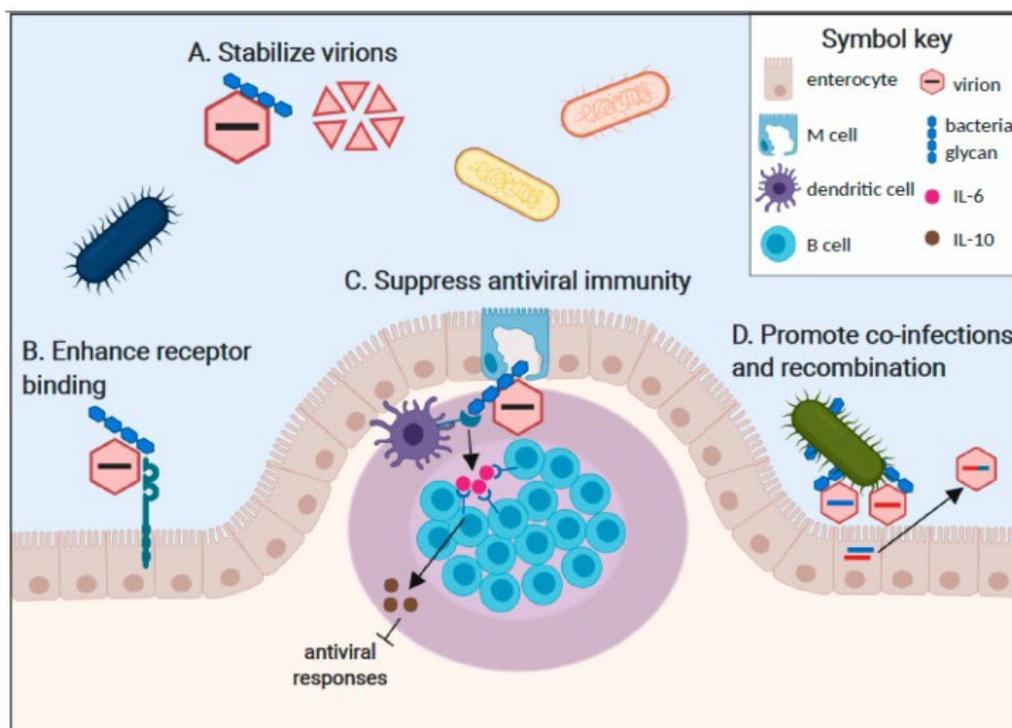
Int Rev Immunol. 2010 Aug;29(4):351-70. doi: 10.3109/08830185.2010.485333.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20635879/>

Voisset C, Weiss RA, Griffiths DJ.
Human RNA "rumor" viruses: the search for novel human retroviruses in chronic disease.
Microbiol Mol Biol Rev. 2008 Mar;72(1):157-96, table of contents. doi: 10.1128/MMBR.00033-07.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2268285/>

¹²⁶ Erickson AK, Jesudhasan PR, Mayer MJ, Narbad A, Winter SE, Pfeiffer JK.
Bacteria Facilitate Enteric Virus Co-infection of Mammalian Cells and Promote Genetic Recombination.
Cell Host Microbe. 2018;23(1):77-88.e5. doi:10.1016/j.chom.2017.11.007
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5764776/>

¹²⁷ Roth AN, Grau KR, Karst SM.
Diverse Mechanisms Underlie Enhancement of Enteric Viruses by the Mammalian Intestinal Microbiota.
Viruses. 2019;11(8):760. Published 2019 Aug 17. doi:10.3390/v11080760
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6722614/>

Neu U, Mainou BA.
Virus interactions with bacteria: Partners in the infectious dance.
PLoS Pathog. 2020;16(2):e1008234. Published 2020 Feb 11. doi:10.1371/journal.ppat.1008234
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7012391/>



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6722614/>

I batteri commensali aumentano le infezioni da virus enterici in diversi modi. **A.** Il legame del virione ai glicani batterici aumenta la stabilità delle particelle di fronte agli stress ambientali e quindi migliora l'efficienza della trasmissione da ospite a ospite. Le particelle di poliovirus, reovirus e norovirus sono stabilizzate da ligandi batterici. **B.** Le interazioni dirette delle particelle virali legate ai glicani con i recettori di ingresso cellulari aumentano la stabilità delle interazioni del capsido-recettore e promuovono l'inizio dell'infezione. È stata segnalata un'interazione specifica tra il poliovirus, il suo recettore (PVR) e il lipopolisaccaride (LPS) batterico. **C.** Il rilevamento immunitario dei componenti batterici commensali si traduce in un microambiente gastrointestinale tollerogeno che promuove la replicazione del virus enterico. Ad esempio, il rilevamento delle cellule dendritiche e dei macrofagi della MMTV legata a LPS attraverso TLR4 determina il rilascio di IL-6, che stimola le cellule B a esprimere la citochina antinfiammatoria IL-10. **D.** Il clustering multivirionale sulle superfici batteriche aumenta la frequenza della coinfezione virale di una singola cellula, determinando il potenziale di ricombinazione che può portare a una migliore idoneità dei ceppi virali ricombinanti della progenie.

Uno studio sull'interazione tra SARS-CoV-2 e i batteri del microbiota intestinale del laboratorio del dott. Schmidtchen¹²⁸ ha dimostrato che la glicoproteina dell'involucro di SARS-CoV-2 e di SARS-CoV è in grado di legarsi al lipopolisaccaride (LPS) di *Escherichia coli* e al lipide A, la porzione tossica di LPS e conservato nei batteri Gram-negativi.

Gli autori hanno osservato che la proteina Spike era in grado di legarsi all'LPS con un'affinità simile al CD14, il recettore utilizzato dalle cellule immunitarie per catturare l'LPS e trasferirlo ai recettori toll-like per la segnalazione infiammatoria, e che la combinazione di una bassa concentrazione di Spike e LPS, con un effetto minimo di per sé, era in grado di indurre una forte attivazione del promotore NF-κB (un'attivazione disregolata di NF-κB è nota per essere un processo patogenico chiave di varie malattie infiammatorie, poiché controlla l'attività di citochine proinfiammatorie multiple).¹²⁹

Questa scoperta supporta l'ipotesi dell'interazione virus-microbiota come potenziale meccanismo di innesco per la tempesta di citochine osservata nei pazienti COVID19, soprattutto perché l'incidenza della co-infezione da Gram-negativi nei casi gravi è elevata.

Sebbene il legame descritto dagli autori dell'LPS alla proteina SARS-CoV-2 S sia nuovo, l'interazione tra le proteine S e le endotossine non è necessariamente nuova in natura.

¹²⁸ Petruk G, Puthia M, Petrlova J, Samsudin F, Strömdahl AC, Cerps S, Uller L, Kjellström S, Bond PJ, Schmidtchen A. SARS-CoV-2 Spike protein binds to bacterial lipopolysaccharide and boosts proinflammatory activity. *J Mol Cell Biol.* 2020 Dec 9:mjaa067. doi: 10.1093/jmcb/mjaa067. <https://academic.oup.com/jmcb/advance-article/doi/10.1093/jmcb/mjaa067/6028992>

¹²⁹ Carissimo G, Ng LFP. A promiscuous interaction of SARS-CoV-2 with bacterial products. *J Mol Cell Biol.* 2020 Dec 16:mjaa068. doi: 10.1093/jmcb/mjaa068. <https://academic.oup.com/jmcb/advance-article/doi/10.1093/jmcb/mjaa068/6039176>

Infatti, le interazioni tra virus e batteri per l'induzione di gravi malattie respiratorie sono state descritte sin dai primi anni '30.¹³⁰

È quindi possibile che SARS-CoV-2 si sia evoluto per legarsi all'LPS per indurre una forte risposta pro-infiammatoria a favore della replicazione virale o l'evasione immunitaria.

Tuttavia, ci sono molte altre pressioni evolutive che potrebbero spiegare il legame di LPS alla proteina Spike. Si potrebbe ipotizzare da esempi in letteratura che, analogamente ai reovirus, questa interazione potrebbe influenzare la stabilità termica della Spike consentendo alla particella virale di resistere a un più ampio intervallo di temperature¹³¹.

Questa interazione potrebbe anche consentire al coronavirus di legarsi ai batteri promuovendo l'ingresso di più particelle a una singola cellula epiteliale in maniera simile ai poliovirus.

Inoltre, è anche possibile che questa interazione spieghi la persistenza di SARS-CoV-2 nell'intestino, in modo simile al meccanismo infettivo dei Norovirus¹³².

COMPORAMENTO SIMILE AI BATTERIOFAGI DI SARS-COV-2

Il gruppo di ricerca di del dott. C. Brogna et hanno raccolto una serie di propri studi nel recente libro "SARS-CoV-2: "SARS-CoV-2: LA COMPLETA VERITÀ"¹³³ osservando con documentazione fotografica, che il SARS-CoV-2 si comporta anche un batteriofago, cioè un virus in grado di infettare i batteri che costituiscono la normale flora intestinale (oro-rino-alveolo-fecale) umana.

Le foto dell'infezione del virus nelle cellule batteriche sono reperibili nel libro del dott. Carlo Brogna

Lo studio effettuato su colture batteriche miste mette in discussione la validità dell'approccio utilizzato per definire il ciclo vitale del SARS-Cov-2, cioè l'impiego esclusivo della coltura in cellule Vero trattate con antibiotici, evidenziandone la limitatezza.

¹³⁰ Shope RE.

Swine influenza : i. experimental transmission and pathology.
J Exp Med. 1931;54(3):349-359. doi:10.1084/jem.54.3.349
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2131998/pdf/349.pdf>

¹³¹ Berger AK, Yi H, Kearns DB, Mainou BA.

Bacteria and bacterial envelope components enhance mammalian reovirus thermostability.
PLoS Pathog. 2017;13(12):e1006768. Published 2017 Dec 6. doi:10.1371/journal.ppat.1006768
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5734793/>

¹³² Berger AK, Mainou BA.

Interactions between Enteric Bacteria and Eukaryotic Viruses Impact the Outcome of Infection.
Viruses. 2018;10(1):19. Published 2018 Jan 3. doi:10.3390/v10010019
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5795432/>

Baldrige MT, Nice TJ, McCune BT, et al.

Commensal microbes and interferon-λ determine persistence of enteric murine norovirus infection.
Science. 2015;347(6219):266-269. doi:10.1126/science.1258025
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4409937/>

¹³³ SARS-CoV-2: LA COMPLETA VERITÀ di Carlo Brogna

BROGNA, CARLO. SARS-Cov-2: LA COMPLETA VERITÀ: SARS-CoV-2: THE REAL TRUTH (Italian Edition) (p.2). Edizione del Kindle.
<https://www.amazon.it/SARS-Cov-2-COMPLETA-VERITA-SARS-CoV-2-TRUTH-ebook/dp/B08T234TMS>

Petrillo, Mauro, Brogna, Carlo, Cristoni, Simone, Querci, Maddalena, Piazza, Ornella, & Van den Eede, Guy.

Increase of SARS-CoV-2 RNA load in faecal samples prompts for rethinking of SARS-CoV-2 biology and COVID-19 epidemiology (Version v1). Zenodo. (2020, October 14). <http://doi.org/10.5281/zenodo.4088208>
<https://zenodo.org/record/4088208#.YA3t6y2h3jA>

L'autore afferma che *“lo studio esclusivo del Coronavirus SARS-CoV-2 in una “Vero Cell” di laboratorio, simile alla cellula eucariotica umana ma comunque non identica ad essa, è limitante e limitato, e non permette di contemplare molte altre interazioni biologiche e biochimiche possibili che il virus può instaurare con altri tipi di cellule, come quelle da me osservate tra SARS-Cov-2 e i batteri della flora intestinale umana normale.*

Dunque, il secondo postulato di Kock (1843-1910), che enuncia che “deve essere possibile isolare il microrganismo dall'ospite malato e farlo crescere e riprodurre in coltura pura in laboratorio”, poteva andar bene per una malattia come la tubercolosi.

Ed anche alla luce di queste evidenze questo postulato andrebbe integrato come segue: “Ogni patogeno deve essere osservato tanto in coltura e in ambiente misto, insieme ad altri microrganismi, al fine di analizzarne le sue interazioni con le altre specie, quanto come patogeno isolato in coltura pura”.

I risultati più significativi dello studio condotto su campioni fecali di pazienti infettati da SARS-cov-2 sono riassunti da pag 36 del libro [Terapia domiciliare farmacologica del paziente sintomatico](#), mentre la metodica è disponibile nell'articolo in pre-print *“Detection of toxin-like peptides in plasma and urine samples from COVID-19 patients”*.¹³⁴

Va sottolineato che tra le proteine prodotte in seguito all'interazione batteri-virus, si riscontravano diverse forme di **conotossine***, e di queste alcune erano in grado di occupare e bloccare i siti recettoriali nervosi cui si lega l'acetilcolina per trasmettere fino al cervello l'informazione olfattiva.

Questo rappresenta un meccanismo plausibile della perdita dell'olfatto in chi è contagiato dal SARS-Cov-2, cioè che la captazione degli odori avviene normalmente, ma la trasmissione dell'informazione mediata dall'acetilcolina, si blocca lungo il tragitto, senza mai raggiungere la corteccia cerebrale temporale, dove si realizza a livello cosciente l'esperienza olfattiva.¹³⁵

* La maggior parte delle conotossine sono peptidi derivati da geni che vengono sintetizzati a livello del ribosoma e ulteriormente elaborati nel reticolo endoplasmatico (ER) e nell'apparato di Golgi delle cellule secretorie della ghiandola velenifera delle lumache marine predatrici. Le cinque classi farmacologiche di conotossine meglio studiate sono tutti canali ionici espressi nel sistema nervoso e locomotore: α (inibitori del recettore dell'acetilcolina, nAChR), ω (inibitori dei canali del calcio voltaggio-dipendenti, VGCC), κ (inibitori dei canali del potassio voltaggio-dipendenti, VGKC), μ (inibitori dei canali del sodio voltaggio-dipendenti, VGSC) e δ (ritardatori di attivazione dei canali del sodio voltaggio-dipendenti, VGSC)¹³⁶

L'osservazione che le varie forme di conotossine riscontrate nel plasma e nelle urine si differenziavano per piccole sequenze amminoacidiche, ha portato gli autori a testare l'ipotesi che fossero prodotte dai batteri intestinali anziché dalle cellule epiteliali. Allo scopo, si inoculavano le feci di pazienti sani con il SARS-CoV-2, ottenendo la conferma della replicazione del virus all'interno delle feci.

Questo stava a significare che il virus trovava terreno fertile per riprodursi nelle feci e, più precisamente, nei batteri presenti nelle feci di pazienti sani.

¹³⁴ Brogna, Carlo, Petrillo, Mauro, Cristoni, Simone, Querci, Maddalena, Piazza, Ornella, & Van den Eede, Guy. Detection of toxin-like peptides in plasma and urine samples from COVID-19 patients (Version v1). Zenodo. (2020, October 27) <http://doi.org/10.5281/zenodo.4139341>
<https://zenodo.org/record/4139341#.YA30ApNKjJA>

¹³⁵ Brogna, C. The Covid-19 Virus Double Pathogenic Mechanism. A New Perspective. Preprints 2020, 2020040165 (doi: 10.20944/preprints202004.0165.v2). <https://www.preprints.org/manuscript/202004.0165/v2>

¹³⁶ Bjørn-Yoshimoto WE, Ramiro IBL, Yandell M, et al. Curses or Cures: A Review of the Numerous Benefits Versus the Biosecurity Concerns of Conotoxin Research. Biomedicine. 2020;8(8):235. Published 2020 Jul 22. doi:10.3390/biomedicine8080235
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7460000/>

Poiché la perdita dell'olfatto non avviene in tutte le persone infettate, è stato ipotizzato che solo nei pazienti i cui batteri intestinali hanno prodotto dosi rilevanti di conotossine con la corretta conformazione e in grado di occupare i recettori dell'acetilcolina, la trasmissione nervosa lungo le vie olfattive si blocca e si determina l'iposmia.

Oltre alle conotossine, l'infezione dei batteri da parte del SARS-Cov-2 determina la produzione di altre tossine tra le quali:

- **la fosfolipasi A2:** le fosfolipasi sono importanti fattori di virulenza in quanto aiutano i patogeni batterici a invadere le cellule ospiti distruggendo i fosfolipidi delle membrane cellulari ¹³⁷ e i loro prodotti potrebbero agire come molecole di segnalazione (trombossani e leucotrieni) ¹³⁸.

Per il meccanismo della tempesta eicosanoide nel COVID-19 si veda il libro "[Terapia domiciliare farmacologica del paziente sintomatico](#) – sezione antinfiammatori"

È stato segnalato che le sPLA2 ottenute da un veleno di serpente possiedono una potente attività virucida (neutralizzante) contro il virus della Dengue e della febbre gialla per l'effetto sui doppi strati lipidici dell'involucro virale.¹³⁹

- **La proteina attivante la protrombina:** ¹⁴⁰ proteina che stimola gli eventi dell'ultima fase della cascata della coagulazione e induce un aumento della coagulazione, determinando le micro-embolie, riscontrabili nelle fasi della complicazione grave fatale da COVID-19. ¹⁴¹

Per il meccanismo della coagulopatia nel COVID-19 si veda il libro "[Complicazioni respiratorie: immunopatologia](#)" - sezione Coagulopatia

L'induzione della coagulazione è un meccanismo di difesa dell'immunità innata nei confronti dell'eccessiva diffusione di microrganismi che causano la sepsi, tuttavia può essere scatenata da batteri come lo *S. Aureus* che utilizzano i biofilm di fibrina per proteggersi dall'attacco del sistema immunitario e degli antibiotici. ¹⁴²

¹³⁷ Kumari Bandana, Kaur Jashandeep, Kaur Jagdeep.
Phospholipases in Bacterial Virulence and Pathogenesis.
Adv Biotech & Micro. 2018; 10(5): 555798. DOI: 10.19080/AIBM.2018.10.555798
<https://juniperpublishers.com/aibm/pdf/AIBM.MS.ID.555798.pdf>

¹³⁸ Hoxha M.
What about COVID-19 and arachidonic acid pathway?
Eur J Clin Pharmacol. 2020;76(11):1501-1504. doi:10.1007/s00228-020-02941-w
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7314570/>

Robb CT, Goepf M, Rossi AG, Yao C.
Non-steroidal anti-inflammatory drugs, prostaglandins, and COVID-19.
Br J Pharmacol. 2020 Nov;177(21):4899-4920. doi: 10.1111/bph.15206. Epub 2020 Aug 27. PMID: 32700336; PMCID: PMC7405053.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32700336/>

¹³⁹ Chen, M., Aoki-Utsubo, C., Kameoka, M. et al.
Broad-spectrum antiviral agents: secreted phospholipase A2 targets viral envelope lipid bilayers derived from the endoplasmic reticulum membrane.
Sci Rep 7, 15931 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16130-w>
<https://www.nature.com/articles/s41598-017-16130-w>

¹⁴⁰ Whelihan MF, Zachary V, Orfeo T, Mann KG.
Prothrombin activation in blood coagulation: the erythrocyte contribution to thrombin generation [published correction appears in Blood. 2013 Aug 22;122(8):1532]. Blood. 2012;120(18):3837-3845. doi:10.1182/blood-2012-05-427856
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3488894/>

¹⁴¹ Castro RA, Frishman WH.
Thrombotic Complications of COVID-19 Infection: A Review. Cardiol Rev. 2021 Jan/Feb;29(1):43-47. doi: 10.1097/CRD.0000000000000347.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32947478/>

¹⁴² Liesenborghs L, Verhamme P, Vanassche T.
Staphylococcus aureus, master manipulator of the human hemostatic system.
J Thromb Haemost. 2018 Mar;16(3):441-454. doi: 10.1111/jth.13928. Epub 2018 Jan 29.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jth.13928>

- molte altre proteine, simili alle fosfodiesterasi, alle zinco-metallo proteinasi, alle serin-proteasi, alle bradichinine, ecc

La scoperta di un ruolo dei batteri intestinali nella replicazione virale cambia non solo l'approccio terapeutico ma anche epidemiologico alla malattia, dal momento che si registra la presenza del SARS-COV-2, attivo ed ancora in grado di infettare e replicarsi, nelle feci dei pazienti.

Questo vuol dire che la contagiosità di un paziente dichiarato sano attraverso la negatività ad un tampone naso-faringeo, in realtà, è ancora in atto e può avvenire per via oro-fecale, ovvero per contatto diretto con superfici infette.

Per concludere, di seguito viene suggerito un nuovo **modello a doppia patogenicità del SARS-Cov-2**, in cui il virus si comporta come un "cavallo di Troia", che nel passaggio attraverso l'ospite intermedio ha probabilmente acquisito, in modo casuale e naturale, sequenze geniche semplici o piccole (micro-RNA?) definite "**The Zero Point Factors**" (fattori del punto zero).

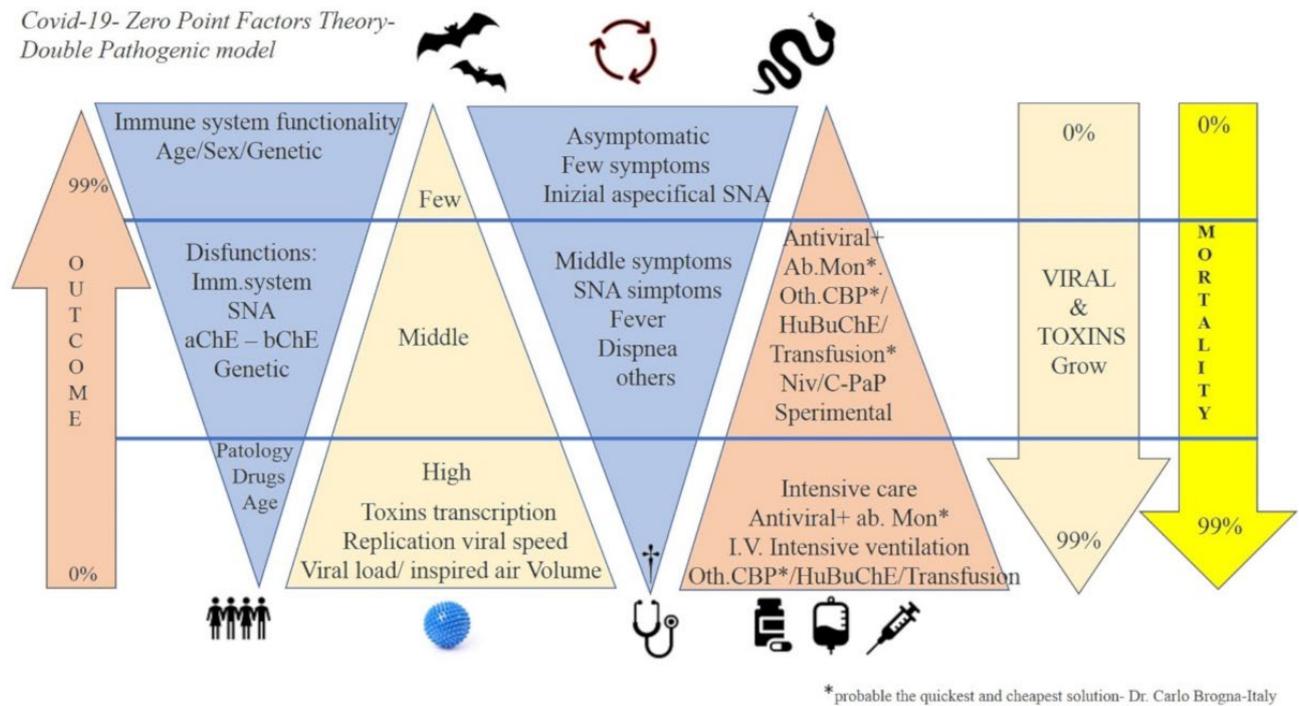
Durante l'infezione si genera un circuito: più rapida è la viremia e la replicazione, più fattori/tossine vengono tradotti, e più la viremia aumenterà grazie a quest'ultima azione sul sistema immunitario.

Inoltre, il sistema immunitario ha anche significative variazioni interindividuali di età, genetica, patologie, ecc. e più tempo impiega il sistema immunitario a produrre anticorpi contro il virus, più fattori vengono rilasciati nella circolazione e più il sistema immunitario sarà bloccato dalla viremia e dai fattori con una doppia azione sinergica.

In questo modello le condizioni determinanti sono il tempo di esposizione, la carica virale iniziale e/o ripetuta (numero di particelle virali/volume aria inalata). I fattori di punto zero potrebbero agire a livello delle sinapsi colinergiche centrali e periferiche, sui recettori nicotinici e sui fattori di coagulazione aumentando la patogenicità del virus.

I soggetti che potrebbero essere quindi a maggior rischio sono i pazienti con sovraespressione del recettore ACE2 (assunzione di farmaci ACE inibitori); gli operatori sanitari, per l'aumento dei tempi di esposizione; i soggetti con un sistema immunitario depresso (oncologia, malattie autoimmuni, trattamento con immunosoppressori, ecc.); pazienti con malattie cardiache e respiratorie (sia per i fattori di tossicità prodotti che per la viremia); pazienti con livelli più bassi o un funzionamento alterato della colinesterasi (diverso per età, sesso, razza e fenotipo); malattie neuronali come il Parkinson (PD), l'Alzheimer (AD), ecc. o pazienti autoimmuni come la Miastenia Gravis che vengono trattati con inibitori dell'acetilcolinesterasi; agricoltori con esposizione stagionale a organofosforati (pesticidi).

L'esito della malattia dipenderebbe quindi dal duplice meccanismo d'azione dei patogeni: da un lato i fattori legati all'infezione virale e dall'altro i fattori di tossicità causati dalla produzione di tossine peptidiche.



<https://www.preprints.org/manuscript/202004.0165/v2>
 Nuovo probabile modello a doppia patogenicità (M.D.Carlo Brogna)

Il dott. Brogna nel suo libro indica infine gli approcci terapeutici più appropriati sulla base dei risultati della sua ricerca:

- la malattia va curata prima di tutto come una **sindrome da avvelenamento**, e quindi neutralizzando le tossine, causa della sintomatologia della COVID-19 con degli **antidoti**.
- In associazione agli antidoti, che inattivano le tossine già prodotte e circolanti, bisognerà puntare a **bloccare la nuova produzione di tossine**. Bisognerà, cioè, “congelare” temporaneamente, e con criterio, con farmaci antibiotici batteriostatici o battericidi, tutti quei batteri della flora intestinale che, interessati dal SARS-COV-2, sintetizzano queste proteine.
 A tal fine, somministrati in maniera precoce, gli **antibiotici** azitromicina, vancomicina e metronidazolo si sono dimostrati in grado (in vitro) di spegnere tanto la replicazione virale quanto la sintesi di tossine. L’amoxicillina, invece, pur bloccando la replicazione virale, non arresta del tutto la sintesi di tossine. Alla terapia antibiotica va associata, poi, una **terapia probiotica coadiuvante**.
 I pazienti che hanno assunto azitromicina o amoxicillina e probiotici (tra cui il Lactobacillus reuteri e il Bacillus clausii) al “tempo zero”, evitando la somministrazione di antiinfiammatori non steroidei e inibitori blandi della ciclossigenasi 1 (tra cui anche paracetamolo), hanno avuto una pronta guarigione e una blanda sintomatologia iniziale.
- Gli effetti clinici positivi dell’antibioticoterapia (di norma non indicata per il trattamento di un’infezione di origine virale) conferma ulteriormente il ruolo centrale dei batteri della flora intestinale nella genesi delle manifestazioni cliniche della COVID-19.
 Allo stesso modo, l’utilità del **desametasone**, riscontrata empiricamente nel contenere la sintomatologia della COVID-19, trova spiegazione nel fatto di essere in grado di inibire le Fosfolipasi A2, una delle proteine toxin-like riscontrate in pazienti infetti e notoriamente in grado di attivare una cascata di eventi biochimici alla base del quadro clinico della COVID-19.
- Soprattutto nei pazienti COVID-19 positivi sintomatici e con stato di salute generale già compromesso (pazienti con patologie cardiocircolatorie concomitanti, ad esempio), bisogna **evitare la somministrazione di farmaci che potrebbero far precipitare la condizione patologica di base** (la patologia cardiocircolatoria, per seguire con l’esempio sopracitato).
 La somministrazione, ad esempio, di inibitori della Ciclossigenasi-1 (COX-1), ossia di acido acetilsalicilico, ibuprofene, etc., è da evitare perché potenzia la produzione di:

-Trombossano A2, i cui effetti noti di vasocostrizione ed aggregazione piastrinica peggiorano drammaticamente il quadro clinico dei pazienti COVID sintomatici e con disturbi cardiovascolari già in atto, favorendo quadri trombotici ed ischemici.

-Leucotrieni, tramite l'iperattivazione delle Lipossigenasi, i cui effetti principali sono quelli di potenziare la costrizione del territorio bronchiale, che nei pazienti con concomitanti patologie dell'albero respiratorio potrebbero rivelarsi senza dubbio fatali.

A conclusione della sua discussione riporta altre importanti riflessioni:

- le tossine hanno una maggiore efficacia a basse temperature (stagione invernale) e questo può spiegare l'andamento stagionale dell'infezione.
- il SARS-Cov-2, in quanto batteriofago può inquinare i reflui, il settore agroalimentare e l'ittico in particolare.
- la vaccinazione contro il SARS-Cov-2 non proteggerà i vaccinati dall'aumento del rischio di sviluppare malattie cardiovascolari, polmonari e degenerative dovute alla produzione di tossine batteriche in caso d'infezione.
- la struttura del SARS-Cov-2 subirà molte mutazioni dovute alle modificazioni genetiche indotta dai batteri per difendersi dall'attacco del batteriofago, che saranno diverse per ogni individuo e ciclo replicativo.
- il SARS-Cov-2, dopo l'infezione, potrebbe essere presente nei batteri con una struttura simile ad un cromosoma batterico artificiale o a un plasmide, cioè potrebbe essere integrato dai processi replicativi dei batteri stessi in DNA circolari ed essere avvolto da un involucro di proteine di superficie dei coronavirus. Questa ipotesi è suggerita dal fatto che nei pazienti COVID-19 si ha una neutrofilia, tipica delle infezioni batteriche (vedi libro "Complicazioni respiratorie: immunopatologia" – sezione Neutrofili), dalle sue misure inferiori (50-200 nm) rispetto a quelle descritte in letteratura e da una corona molto più modesta di quella riscontrata nelle colture del virus nelle cellule Vero.

Questa ipotesi di lavoro merita di essere approfondita perché spiegherebbe la persistenza del virus nelle feci per lunghi periodi.¹⁴³ Tuttavia, sebbene ad oggi non risulti che virus batterici a ssRNA siano retrotrascritti e integrati nel DNA come profagi o presenti a livello extracromosomico, come avviene per i fagi a DNA,¹⁴⁴ è nota la presenza nei genomi batterici di elementi retrovirali (retroni) con la produzione di trascrittasi inversa e la formazione di ibridi DNA-RNA.¹⁴⁵

¹⁴³ Zhang Y, Chen C, Song Y, et al.

Excretion of SARS-CoV-2 through faecal specimens.

Emerg Microbes Infect. 2020;9(1):2501-2508. doi:10.1080/22221751.2020.1844551

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7717617/>

¹⁴⁴ Witzany G. (eds) Biocommunication of Phages. Springer, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-45885-0>

¹⁴⁵ Bacterial retrons function in anti-phage defense

Adi Millman, Aude Bernheim, Avigail Stokar-Avihail, Taya Fedorenko, Maya Voichok, Azita Leavitt, Rotem Sorek

bioRxiv 2020.06.21.156273; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.06.21.156273>

<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.06.21.156273v1.full.pdf>

Lampson BC, Inouye M, Inouye S.

Retrons, msDNA, and the bacterial genome.

Cytogenet Genome Res. 2005;110(1-4):491-9. doi: 10.1159/000084982.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16093702/>

VACCINI A VIRUS INATTIVATI

- CoronaVac (PiCoVacc) / *Sinovac Research and Development Co., Ltd*
- Sinopharm + Wuhan Institute of Biological Products
- BBIBP-CorV / *Sinopharm + Beijing Institute of Biological Products*
- Institute of Medical Biology + Chinese Academy of Medical Sciences
- QazCovid-in / *Research Institute for Biological Safety Problems, Rep of Kazakhstan*
- BBV152 / *Bharat Biotech International Limited*
- Shenzhen Kangtai Biological Products Co., Ltd.
- VLA2001 / *Valneva, National Institute for Health Research, United Kingdom*

Un vaccino inattivato è costituito da particelle virali intere la cui capacità replicativa è bloccata, ma che mantengono la capacità di indurre una risposta immunitaria.

CRITICITÀ DEI VACCINI INATTIVATI

In generale, tutti i vaccini virali inattivati seguono un ciclo di produzione simile in cui l'agente patogeno viene prima coltivato su un substrato per produrre grandi quantità di antigene.¹⁴⁶ Storicamente, i produttori di vaccini hanno utilizzato cellule primarie, tessuti, uova fecondate e persino interi organismi come substrati per la propagazione dei virus¹⁴⁷.

Oggi, le industrie si stanno spostando sempre più verso la crescita dei virus su [linee cellulari continue](#) *. Ciò porta alcuni vantaggi come la riduzione dei costi di produzione, una maggiore sicurezza dei vaccini e un aumento della capacità produttiva relativamente semplice¹⁴⁸.

Una volta che il virus si è propagato, viene spesso purificato e concentrato prima dell'inattivazione. L'inattivazione può essere eseguita utilizzando metodi chimici o fisici, o una combinazione dei due. È stata descritta un'ampia gamma di agenti o metodi di inattivazione ben consolidati e nuovi per inattivare in maniera efficace i virus a fini vaccinali.¹⁴⁹

¹⁴⁶ Sanders B, Koldijk M, Schuitemaker H.
Inactivated Viral Vaccines.

Vaccine Analysis: Strategies, Principles, and Control. 2014;45-80. Published 2014 Nov 28. doi:10.1007/978-3-662-45024-6_2
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7189890/>

¹⁴⁷ Hess RD, Weber F, Watson K, Schmitt S.

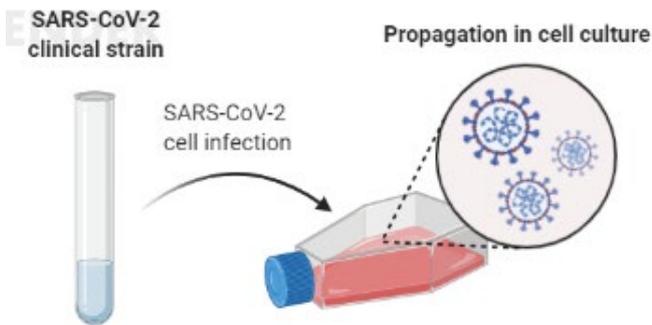
Regulatory, biosafety and safety challenges for novel cells as substrates for human vaccines. *Vaccine*. 2012 Apr 5;30(17):2715-27. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.02.015. Epub 2012 Feb 17.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22342707/>

¹⁴⁸ Barrett PN, Mundt W, Kistner O, Howard MK.

Vero cell platform in vaccine production: moving towards cell culture-based viral vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2009 May;8(5):607-18. doi: 10.1586/erv.09.19.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19397417/>

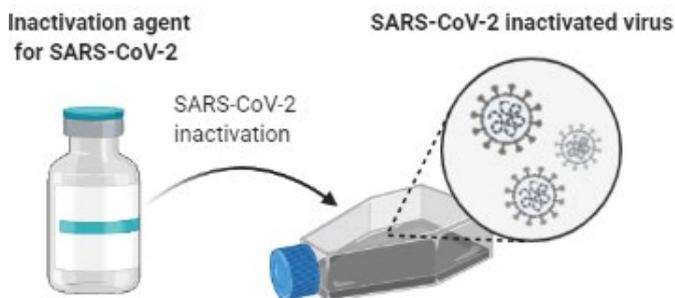
¹⁴⁹ Qiuhui Li, Huiya Ma, Yuanyuan Zhang, Kun Feng, Pengfei Yang, Jianjun Li, Hongli Zhu, Chao Chen, Kunping Yan.

HPLC method for Residual 2-Bromoethylamine Hydrobromide in Hemoglobin-based Oxygen Carriers Derived with 4-Methoxybenzenesulfonyl Chloride. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* (2018) 41:13-14, pages 819-824.
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/erv.12.38>



<https://www.pqegroup.com/wp-content/uploads/2020/08/ITA-PQE-Group-infodemic-project-Lotta-al-SARS-CoV-2-prevenzione-e-vaccini.pdf>

I vaccini virali inattivi vengono creati propagando virus in colture cellulari (come nelle cellule Vero) seguite da inattivazione utilizzando un reagente chimico (come il beta-propiolattone). Dopo la vaccinazione, questo consente al corpo di generare una risposta immunitaria diversificata contro numerosi antigeni virali senza avere la minaccia di essere effettivamente infettato a causa del virus.



Method		Type	Mechanism
Formaldehyde	<chem>HCHO</chem>	Alkylating agent	Monohydroxymethylation of adenine
		Crosslinker	Crosslinking of RNA to capsid proteins, causing a block of genome reading
Glutaraldehyde	<chem>O=C(CCC(=O)O)O</chem>	Crosslinker	Crosslinking of proteins by formation of inter- and intra-molecular methylene bridges between hydroxymethylated amines
			Crosslinking of proteins by the same mechanism as formaldehyde (described above)
2,2'-dithiodipyridine	<chem>C1=CC=C(S2C=CC=NC2=S1)C3=CC=NC=C3</chem>	Crosslinker	Crosslinking of proteins by oxidation of S-H groups causing formation of S-S bridges, which results in a covalent modification and functional inactivation of S-H-containing internal viral proteins
β-propiolactone	<chem>C1OC(=O)C1</chem>	Alkylating agent	Alkylation of RNA and DNA as a consensus mechanism
		Crosslinker	Crosslinking of proteins
Binary ethylene imine	<chem>C1CCN1</chem>	Alkylating agent	Alkylation of RNA and DNA at low concentrations. Most likely genome reading is blocked by alkylation of guanine or adenine by binary ethylene imine
pH		Denaturation agent	Alkylation of proteins (nucleocapsid) at high concentrations
		RNA degradation	Denaturation of viral functionally active proteins
Temperature		Denaturation agent	The close proximity of the hydroxyl group to the phosphor center of each internucleotide linkage facilitates transesterification under strongly acidic or strongly basic conditions, with a breakage of the phosphodiester bond as a consequence
		RNA degradation	A high temperature denatures viral functionally active proteins
Gamma irradiation		Radiation	Virus inactivation at 'low' temperature (below 41°C) is considered to be caused by degradation of the nucleic acid
			Formation of free radicals that damage proteins
Ultraviolet light		Radiation	Viruses are inactivated primarily by direct damage, via disruption of the genome
			Induction of dimer formation between adjacent uracils in RNA. Dimer formation leads to pressure and breakage of the sugar backbone causing a block of genome reading
			Works more slowly, ultraviolet light also causes structural modifications of the capsid proteins resulting in the formation of large and small photoproducts

<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/erv.12.38>
Panoramica dei metodi di inattivazione per lo sviluppo di vaccini con virus uccisi

Alcuni esempi di agenti sperimentati sono l'acido ascorbico ¹⁵⁰, i derivati dell'etilenimmina ¹⁵¹, gli psorleni ¹⁵², il perossido di idrogeno ¹⁵³, l'irradiazione gamma ¹⁵⁴, trattamento UV ¹⁵⁵, calore ¹⁵⁶ e molti altri ¹⁵⁷. Tuttavia, solo la formaldeide e il β -propiolattone (BPL) sono ampiamente utilizzati per l'inattivazione dei vaccini virali umani autorizzati da decenni. ¹⁵⁸

<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/erv.12.38>
Meccanismo di reazione della formaldeide con DNA / RNA o amminoacidi.
Reazione con (A) DNA o RNA (adenina) e, in modo simile, (B) amminoacidi (ad es. Lisina) di proteine con un gruppo amminico primario: monoidrossi metilazione e formazione di ponti metilenici.
A: Adenine; Lys: Lisina.

<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/erv.12.38>
Meccanismo di reazione della glutaraldeide con gli amminoacidi delle proteine (ad esempio, con il gruppo amminico primario della lisina).
Lys: Lisina.

<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/erv.12.38>
Meccanismo di reazione del β -propiolattone con DNA o RNA (guanina).

¹⁵⁰ Madhusudana SN, Shamsundar R, Seetharaman S.
In vitro inactivation of the rabies virus by ascorbic acid.

Int J Infect Dis. 2004 Jan;8(1):21-5. doi: 10.1016/j.ijid.2003.09.002. PMID: 14690777.
[https://www.ijidonline.com/article/S1201-9712\(03\)00004-3/fulltext](https://www.ijidonline.com/article/S1201-9712(03)00004-3/fulltext)

¹⁵¹ Larghi OP, Nebel AE.
Rabies virus inactivation by binary ethylenimine: new method for inactivated vaccine production.

J Clin Microbiol. 1980;11(2):120-122. doi:10.1128/JCM.11.2.120-122.1980
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC273335/pdf/jcm00175-0026.pdf>

¹⁵² Maves RC, Oré RM, Porter KR, Kochel TJ.
Immunogenicity and protective efficacy of a psoralen-inactivated dengue-1 virus vaccine candidate in Aotus nancymae monkeys.
Vaccine. 2011 Mar 24;29(15):2691-6. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.01.077. Epub 2011 Feb 17.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21303709/21303709>.

¹⁵³ Amanna IJ, Raué HP, Slifka MK.
Development of a new hydrogen peroxide-based vaccine platform.
Nat Med. 2012;18(6):974-979. doi:10.1038/nm.2763
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3506259/>

¹⁵⁴ Martin SS, Bakken RR, Lind CM, et al.
Comparison of the immunological responses and efficacy of gamma-irradiated V3526 vaccine formulations against subcutaneous and aerosol challenge with Venezuelan equine encephalitis virus subtype IAB.
Vaccine. 2010;28(4):1031-1040. doi:10.1016/j.vaccine.2009.10.126
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2815090/>

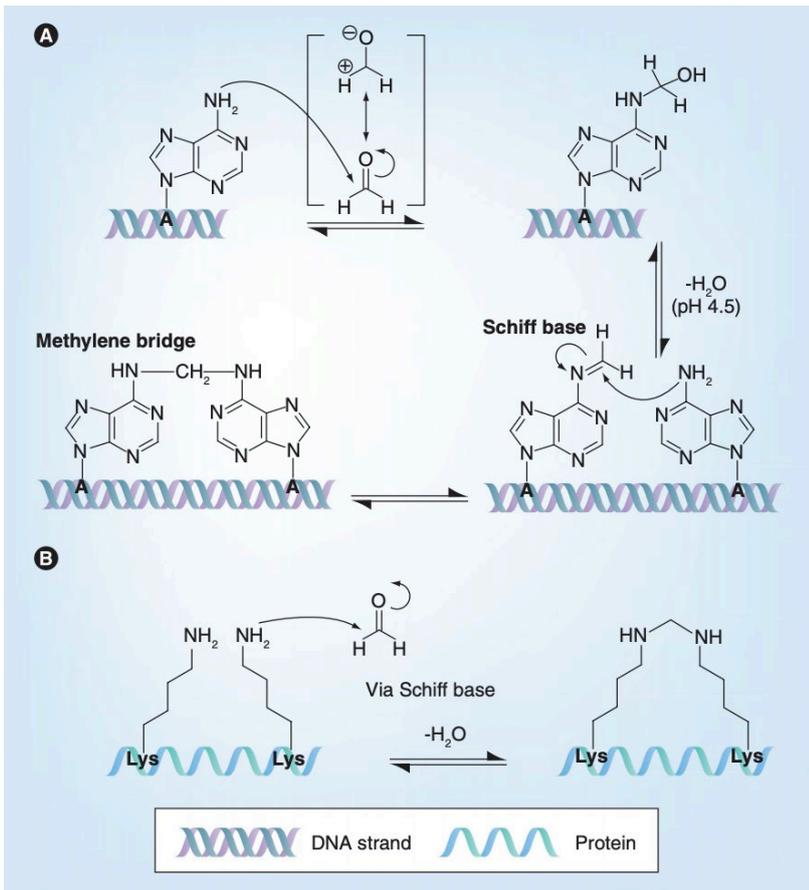
Alsharifi M, Müllbacher A.
The gamma-irradiated influenza vaccine and the prospect of producing safe vaccines in general.
Immunol Cell Biol. 2010 Feb;88(2):103-4. doi: 10.1038/icb.2009.81. Epub 2009 Oct 27.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19859081/>

¹⁵⁵ Budowsky EI, Bresler SE, Friedman EA, Zheleznova NV.
Principles of selective inactivation of viral genome. I. UV-induced inactivation of influenza virus.
Arch Virol. 1981;68(3-4):239-47. doi: 10.1007/BF01314577.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7271457/>

¹⁵⁶ Nims RW, Plavsic M.
Polyomavirus inactivation - a review.
Biologicals. 2013 Mar;41(2):63-70. doi: 10.1016/j.biologicals.2012.09.011. Epub 2012 Oct 30.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23116715/>

¹⁵⁷ Stauffer F, El-Bacha T, Da Poian AT.
Advances in the development of inactivated virus vaccines.
Recent Pat Antiinfect Drug Discov. 2006 Nov;1(3):291-6. doi: 10.2174/157489106778777673.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18221154/>

¹⁵⁸ Herrera-Rodriguez J, Signorazzi A, Holtrop M, de Vries-Idema J, Huckriede A.
Inactivated or damaged? Comparing the effect of inactivation methods on influenza virions to optimize vaccine production.
Vaccine. 2019;37(12):1630-1637. doi:10.1016/j.vaccine.2019.01.086
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7115651/>

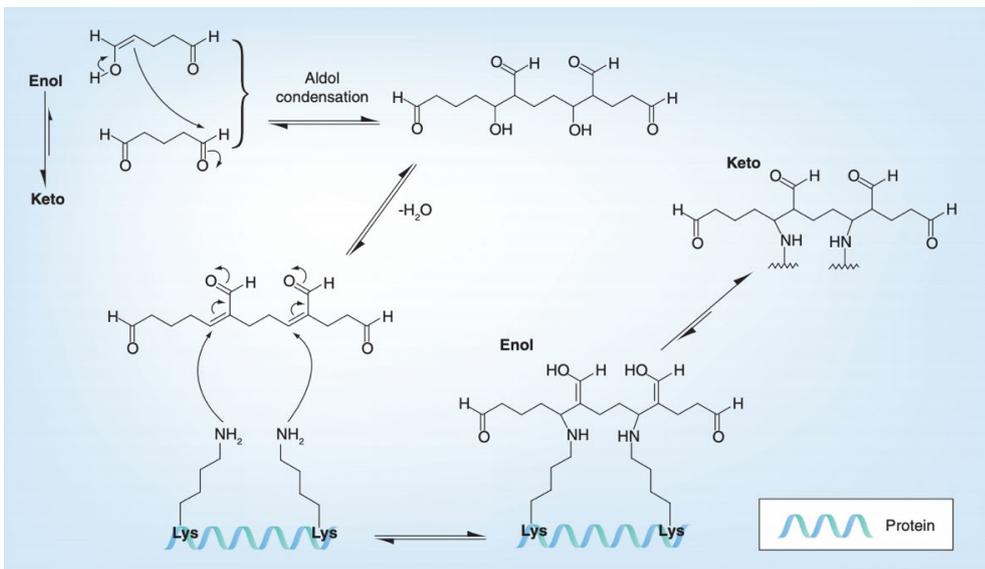


<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/erv.12.38>

Meccanismo di reazione della formaldeide con DNA / RNA o amminoacidi.

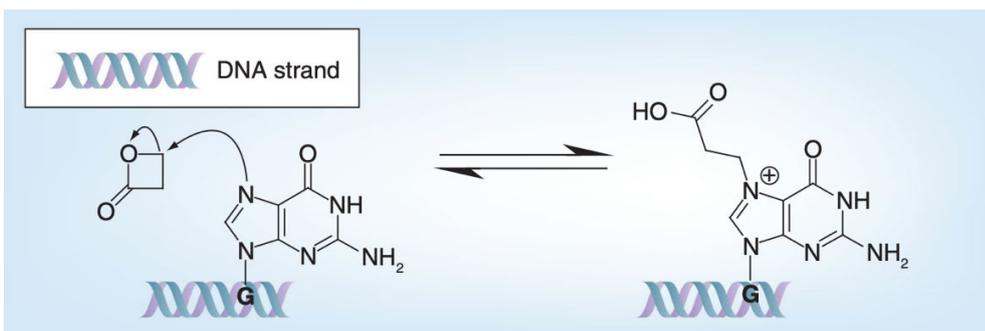
Reazione con (A) DNA o RNA (adenina) e, in modo simile, (B) amminoacidi (ad es. Lisina) di proteine con un gruppo amminico primario: monoidrossi metilazione e formazione di ponti metilenici.

A: Adenine; Lys: Lisina.

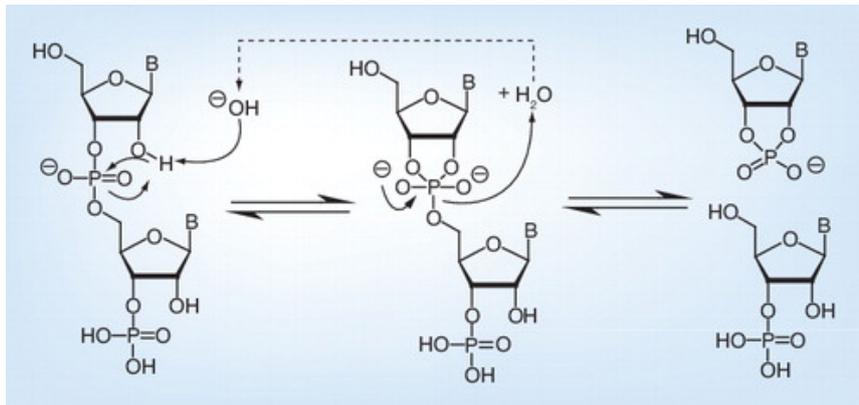


Meccanismo di reazione della glutaraldeide con gli amminoacidi delle proteine (ad esempio, con il gruppo amminico primario della lisina).

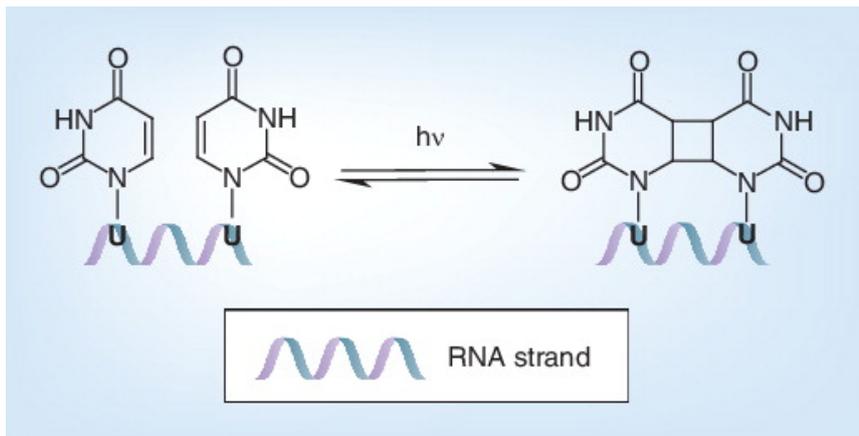
Lys: Lisina.



Meccanismo di reazione del β -propiolattone con DNA o RNA (guanina).



Degradazione dell'RNA in un ambiente alcalino.
B: Nucleobase.



Degradazione dell'RNA in un ambiente alcalino.
B: Nucleobase.

Gli eventi storici hanno plasmato il modo in cui i vaccini inattivati sono attualmente sviluppati e caratterizzati oggi.

L'**incidente di Cutter** nel 1955 fu uno dei peggiori disastri farmaceutici nella storia degli Stati Uniti.

380.000 dosi di vaccino contro il virus inattivato (IPV), prodotto nei laboratori Cutter, furono somministrate a bambini sani.

Tuttavia, questi vaccini contenevano poliovirus competente per la replicazione a causa di una purificazione inadeguata dell'eluato virale durante la produzione.

La presenza di detriti cellulari nei pool dei vaccini ha impedito un'adeguata esposizione delle particelle virali alla formaldeide e quindi la completa inattivazione¹⁵⁹.

Di conseguenza, 40.000 bambini che hanno ricevuto il vaccino hanno contratto la poliomielite abortiva, 51 sono rimasti paralizzati permanentemente e cinque sono morti¹⁶⁰.

I requisiti federali per i produttori di vaccini sono stati immediatamente rivisti in conseguenza dell'incidente di Cutter, creando un sistema migliore di regolamentazione dei vaccini. Tuttavia, l'eredità di questo danno da vaccino rimane e i produttori di vaccini dovrebbero sempre prestare la massima cautela quando si inattivano i patogeni per garantire la completa inattivazione.

Un'altra reazione grave riguarda due vaccini inattivati che hanno portato allo sviluppo della malattia potenziata e persino alla morte, quando le persone vaccinate si sono infettate con l'agente patogeno.

Infatti, gli studi clinici con il **virus respiratorio sinciziale (RSV) inattivato con formalina** in neonati hanno avuto un esito disastroso.

¹⁵⁹ Offit PA.

The Cutter incident, 50 years later.

N Engl J Med. 2005 Apr 7;352(14):1411-2. doi: 10.1056/NEJMp048180.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15814877/>

¹⁶⁰ Nathanson N, Langmuir Ad.

The Cutter incident. Poliomyelitis following formaldehyde- inactivated poliovirus vaccination in the United States during the Spring of 1955. ii. relationship of poliomyelitis to Cutter vaccine.

Am J Hyg. 1963 Jul;78:29-60. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a120328.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14043545/>

Non solo il vaccino non è riuscito a prevenire la malattia, ma l'80% dei destinatari del vaccino è stato ricoverato in ospedale dopo essere stato infettato con l'RSV circolante rispetto all'ospedalizzazione di solo il 5% nel gruppo non vaccinato di controllo.

Inoltre, due destinatari del vaccino sono deceduti in conseguenza del potenziamento della malattia indotta dal vaccino¹⁶¹.

La malattia potenziata è stata successivamente attribuita a una risposta immunitaria sfavorevole a causa di una risposta Th2 alterata e della mancanza di maturazione dell'affinità anticorpale dopo la vaccinazione¹⁶². Inoltre, una grande porzione di anticorpi indotti dal vaccino era diretta verso epitopi non protettivi poiché il trattamento con formalina aveva alterato gli epitopi che inducono anticorpi funzionali (neutralizzanti e inibitori della fusione) che si presume siano necessari per la protezione¹⁶³.

Un vaccino contro il **morbillo inattivato con formalina** è stato autorizzato nel 1963 e sfortunatamente ha avuto un esito simile, anche se meno grave.

Il vaccino ha indotto anticorpi neutralizzanti, tuttavia, l'immunità è diminuita rapidamente e i riceventi hanno riacquisito la suscettibilità al morbillo.

Una volta contratto, si è sviluppata una malattia del morbillo più grave e atipica¹⁶⁴.

Come con l'RSV, la malattia potenziata era associata a una mancanza di risposta citolitica dei linfociti T e anticorpi a bassa avidità¹⁶⁵, legati all'alterazione indotta dalla formaldeide della proteina F del morbillo¹⁶⁶.

¹⁶¹ Kapikian AZ, Mitchell RH, Chanock RM, Shvedoff RA, Stewart CE.

An epidemiologic study of altered clinical reactivity to respiratory syncytial (RS) virus infection in children previously vaccinated with an inactivated RS virus vaccine.

Am J Epidemiol. 1969 Apr;89(4):405-21. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a120954.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4305197/>

Kim HW, Canchola JG, Brandt CD, Pyles G, Chanock RM, Jensen K, Parrott RH.

Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine.

Am J Epidemiol. 1969 Apr;89(4):422-34. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a120955.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4305198/>

¹⁶² Delgado MF, Coviello S, Monsalvo AC, et al.

Lack of antibody affinity maturation due to poor Toll-like receptor stimulation leads to enhanced respiratory syncytial virus disease.

Nat Med. 2009;15(1):34-41. doi:10.1038/nm.1894

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2987729/>

Johnson TR, Graham BS.

Contribution of respiratory syncytial virus G antigenicity to vaccine-enhanced illness and the implications for severe disease during primary respiratory syncytial virus infection.

Pediatr Infect Dis J. 2004 Jan;23(1 Suppl):S46-57. doi: 10.1097/01.inf.0000108192.94692.d2.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14730270/>

¹⁶³ Murphy BR, Walsh EE.

Formalin-inactivated respiratory syncytial virus vaccine induces antibodies to the fusion glycoprotein that are deficient in fusion-inhibiting activity.

J Clin Microbiol. 1988;26(8):1595-1597. doi:10.1128/JCM.26.8.1595-1597.1988

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC266671/pdf/jcm00080-0171.pdf>

Murphy BR, Prince GA, Walsh EE, et al.

Dissociation between serum neutralizing and glycoprotein antibody responses of infants and children who received inactivated respiratory syncytial virus vaccine.

J Clin Microbiol. 1986;24(2):197-202. doi:10.1128/JCM.24.2.197-202.1986

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC268874/>

¹⁶⁴ Griffin DE, Pan CH.

Measles: old vaccines, new vaccines.

Curr Top Microbiol Immunol. 2009;330:191-212. doi: 10.1007/978-3-540-70617-5_10.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19203111/>

¹⁶⁵ Polack FP, Auwaerter PG, Lee SH, Nousari HC, Valsamakis A, Leiferman KM, Diwan A, Adams RJ, Griffin DE.

Production of atypical measles in rhesus macaques: evidence for disease mediated by immune complex formation and eosinophils in the presence of fusion-inhibiting antibody.

Nat Med. 1999 Jun;5(6):629-34. doi: 10.1038/9473.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10371500/>

¹⁶⁶ Annunziato D, Kaplan MH, Hall WW, Ichinose H, Lin JH, Balsam D, Paladino VS.

Atypical measles syndrome: pathologic and serologic findings.

Pediatrics. 1982 Aug;70(2):203-9.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7099785/>

E' stato suggerito che i gruppi carbonilici sugli antigeni del vaccino introdotti dal trattamento con formaldeide inducono effetti profondi sull'immunogenicità, che possono far pendere l'equilibrio tra protezione ed effetti avversi o una malattia potenziata ¹⁶⁷.

Questi sfortunati eventi servono da monito a tutti gli sviluppatori di vaccini; l'inattivazione di un patogeno non si traduce necessariamente in un vaccino che per definizione suscita immunità protettiva e gli epitopi virali necessari per l'induzione dell'immunità protettiva dovrebbero essere preservati dopo l'inattivazione.

Per ottenere un livello di sicurezza così elevato, le analisi dell'inattivazione del virus sono fondamentali per la produzione di un vaccino inattivato.

La **cinetica di inattivazione** (KOI) deve essere acquisita completamente e per accertare la completezza dell'inattivazione, il test di inattivazione efficace deve essere validato e ben caratterizzato rispetto a sensibilità e robustezza.

Il KOI differirà in base al patogeno e al metodo di inattivazione, pertanto, per garantire la sicurezza della massa vaccinale inattivata, il processo di inattivazione dovrebbe essere ampiamente studiato e l'osservazione di un KOI riproducibile è essenziale.

La quantificazione dell'infettività virale nel vaccino bulk o negli intermedi in-process viene solitamente ottenuta mediante un saggio in vitro basato su colture cellulari, tuttavia questo può essere fatto anche in vivo.

Generalmente, la linea cellulare utilizzata per la propagazione del virus o una linea cellulare alternativa, dimostrata essere ugualmente sensibile, viene inoculata con il campione di virus (inattivato) per amplificare qualsiasi potenziale unità infettiva presente.

La presenza o l'assenza di virus nelle colture in vitro può essere rilevata con vari metodi; per i virus litici ciò è reso possibile dal monitoraggio dell'effetto citopatico (CPE), per i virus non litici possono essere utilizzati metodi basati sull'amplificazione del genoma (PCR) o sul rilevamento dell'antigene (immunofluorescenza o ELISA).

Inoltre, può essere eseguita una seconda fase che prevede l'inoculo di materiale amplificato in un modello in vivo appropriato seguito dal monitoraggio dell'insorgenza dei sintomi della malattia.

Poiché il test per un'inattivazione efficace dipende dalla sensibilità del test, dal volume del campione e dall'assenza di interferenza da parte di particelle inattivate, il test utilizzato per confermare la **completezza dell'inattivazione (COI)** deve essere messo a punto per la sensibilità del saggio e gli effetti matrice, in particolare con l'uso di controlli positivi comprendenti campioni addizionati con una concentrazione nota di virus per confermare la suscettibilità delle colture cellulari, mentre i controlli negativi della matrice servono per garantire che nessun altro componente nella formulazione induca la morte cellulare o interferisca con la sensibilità del test.

Quando si fa un'[inferenza](#) sul COI, entrano in campo due variabili. La prima riguarda la sensibilità del test COI che deve essere caratterizzato per assegnare un numero minimo di unità infettive (cioè, limite inferiore di rilevamento) rilevate utilizzando il test. La seconda riguarda la dimensione del campionamento; maggiore è il volume del campione di prova, maggiore è la possibilità di rilevare una potenziale unità infettiva nell'intero lotto.

La combinazione di queste due variabili consente al produttore di specificare un livello massimo tollerabile di infettività in uscita ¹⁶⁸ o di aderire a un criterio predefinito.

¹⁶⁷ Moghaddam A, Olszewska W, Wang B, Tregoning JS, Helson R, Sattentau QJ, Openshaw PJ. A potential molecular mechanism for hypersensitivity caused by formalin-inactivated vaccines. Nat Med. 2006 Aug;12(8):905-7. doi: 10.1038/nm1456. Epub 2006 Jul 23. <https://spiral.imperial.ac.uk/handle/10044/1/21962>

¹⁶⁸ Cornfield J, Halperin M, Moore F. Some statistical aspects of safety testing the Salk poliomyelitis vaccine. Public Health Rep. 1956;71(10):1045-1056. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2031000/pdf/pubhealthreporig00154-0095.pdf>

Annex 5 Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of tetanus vaccines (adsorbed) https://www.who.int/biologicals/vaccines/Tetanus_Recommendations_TRS_980_Annex_5.pdf

Manual for Quality Control of Diphtheria, Tetanus and Pertussis Vaccines

L'Organizzazione Mondiale della Sanità e la Farmacopea Europea (Ph. Eur.) hanno stabilito delle linee guida, per ciascun tipo di antigene vaccinale inattivato,¹⁶⁹ per testare un' inattivazione efficace con un campione minimo, espresso in volume o numero di dosi, che deve essere testato.

Inoltre, i tipi di cellule, la durata dell'incubazione e la diluizione del campione di vaccino prima dell'inoculo sono parametri che possono influenzare la sensibilità del COI e quindi devono essere accuratamente ottimizzati.¹⁷⁰

Una volta inattivato, la massa virale viene ulteriormente purificata per rimuovere i contaminanti, ciò può essere ottenuto utilizzando varie tecniche come l'ultrafiltrazione, la cromatografia ad esclusione dimensionale (SEC) e la centrifugazione in gradiente di saccarosio.

Inoltre, sono necessari test per valutare la purezza del prodotto vaccinale, come i test per l'assenza di contaminanti derivanti dal processo di produzione quali proteine della cellula ospite e DNA.

Inoltre, per garantire che non si verifichino modifiche degli epitopi durante l'inattivazione, come è stato osservato in passato con RSV e morbillo, è necessario misurare la potenza immunogenica della particella virale inattivata.

Ciò può essere ottenuto misurando la risposta immunitaria prima e dopo l'immunizzazione in vivo, attraverso ad esempio il saggio di potenza nel ratto che viene utilizzato per misurare gli anticorpi neutralizzanti il poliovirus dopo l'immunizzazione dei ratti con un vaccino contro il virus inattivato¹⁷¹.

Il test di immunogenicità in vivo può anche essere correlato a test di potenza in vitro basati su cellule; come ad es. il test ELISA dell'antigene D che quantifica il contenuto antigenico delle particelle di poliovirus inattivate e viene di conseguenza utilizzato per il dosaggio del vaccino¹⁷².

Naturalmente, lo sviluppo di tali saggi richiede la conoscenza degli epitopi neutralizzanti necessari per un'adeguata risposta immunitaria e, di conseguenza, protezione.

Non solo i vaccini inattivati possiedono un profilo di sicurezza più elevato rispetto ai vaccini vivi, ma sono anche generalmente meno reattogenici, relativamente semplici e tecnicamente fattibili da produrre con meno ostacoli normativi per l'autorizzazione¹⁷³.

<https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/284404/retrieve>

Thaysen-Andersen M, Jørgensen SB, Wilhelmsen ES, Petersen JW, Højrup P. Investigation of the detoxification mechanism of formaldehyde-treated tetanus toxin.

Vaccine. 2007 Mar 8;25(12):2213-27. doi: 10.1016/j.vaccine.2006.12.033. Epub 2007 Jan 2.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17240009/>

¹⁶⁹ Sanders B, Koldijk M, Schuitemaker H.

Inactivated Viral Vaccines.

Vaccine Analysis: Strategies, Principles, and Control. 2014;45-80. Published 2014 Nov 28. doi:10.1007/978-3-662-45024-6_2

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7189890/>

¹⁷⁰ Markey K, Asokanathan C, Feavers I.

Assays for Determining Pertussis Toxin Activity in Acellular Pertussis Vaccines.

Toxins (Basel). 2019;11(7):417. Published 2019 Jul 17. doi:10.3390/toxins11070417

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6669641/>

Yuen CT, Asokanathan C, Cook S, Lin N, Xing D.

Effect of different detoxification procedures on the residual pertussis toxin activities in vaccines.

Vaccine. 2016 Apr 19;34(18):2129-34. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.03.007. Epub 2016 Mar 11.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26973066/>

¹⁷¹ van Steenis G, van Wezel AL, Sekhuis VM.

Potency testing of killed polio vaccine in rats.

Dev Biol Stand. 1981;47:119-28. PMID: 6262142.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6262142/>

¹⁷² Beale AJ.

The D-antigen content in poliovaccine as a measure of potency.

Lancet. 1961 Nov 25;2(7213):1166-8. doi: 10.1016/s0140-6736(61)90843-1

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13866114/>

¹⁷³ Zepp F.

Principles of vaccine design-Lessons from nature.

Vaccine. 2010 Aug 31;28 Suppl 3:C14-24. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.07.020.

Tuttavia, i vaccini inattivati sono tipicamente associati a una minore immunogenicità che può implicare la necessità di dosi multiple o l'aggiunta di adiuvanti che di conseguenza fanno aumentare il prezzo del vaccino.

Pertanto, la scelta di un approccio vaccinale inattivato è in generale un compromesso tra una maggiore sicurezza (se l'inattivazione è ovviamente completa) e un percorso rapido per l'approvazione normativa, e il rischio di ridotta antigenicità dell'immunogeno che spesso richiede l'aggiunta di adiuvanti e/o dosi multiple, le quali non solo aumentano i costi di produzione ma anche la complessità della formulazione e della somministrazione.

VACCINO INATTIVATO DEL SARS-COV-2

Un esempio di produzione di vaccino inattivato contro il SARS-Cov-2 è quello riportato da Wang et al. del Beijing Institute of Biological Products Company, a partire da tre ceppi di SARS-CoV-2 isolati da pazienti ospedalizzati, di cui il ceppo HBO2 ha mostrato una replicazione ottimale e ha avuto la più alta resa di virus quando coltivato in vitro in cellule Vero.

HBO2 è stato fatto passare dieci volte nelle cellule Vero per indurre l'adattamento alla crescita in coltura; al decimo passaggio è stato sequenziato in profondità e ha mostrato un'omologia del 99,95% rispetto alla sequenza aminoacidica completa e del 100% della proteina S rispetto al 7° passaggio, indicando che il virus si era adattato e aveva raggiunto una sequenza genetica stabile, rendendolo adatto per produzione in coltura. Questo ceppo è stato quindi prodotto in massa nelle cellule Vero e inattivato mediante l'aggiunta di β -propionolattone. Il virus inattivato risultante è stato infine miscelato con idrossido di alluminio prima della somministrazione.¹⁷⁴

Altri esempi di vaccini inattivati di cui sono riportati gli studi preclinici, sono il PiCoVacc/CoronaVac (sono stati isolati i ceppi di SARS-CoV-2 dai campioni di liquido di lavaggio broncoalveolare (BALF) di 11 pazienti ospedalizzati (inclusi 5 pazienti in terapia intensiva), di cui 5 dalla Cina, 3 dall'Italia, 1 dalla Svizzera, 1 dal Regno Unito e 1 dalla Spagna)¹⁷⁵ e il BBiBp-CorV.¹⁷⁶

Tutti questi ceppi sono stati isolati dalle cellule Vero, che sono state certificate dall'OMS per la produzione di vaccini.¹⁷⁷ Le cellule Vero sono state infettate attraverso i tamponi faringei dei pazienti per prevenire possibili mutazioni durante la coltura virale e l'isolamento.

E' riportato in letteratura che il vaccino inattivato contro il SARS-CoV aumenta la risposta polmonare pro-infiammatoria eosinofila al momento della reinfezione (challenge test)¹⁷⁸, pertanto, esiste la possibilità che i

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20713252/>

¹⁷⁴ Wang H, Zhang Y, Huang B, et al.
Development of an Inactivated Vaccine Candidate, BBiBp-CorV, with Potent Protection against SARS-CoV-2.
Cell. 2020;182(3):713-721.e9. doi:10.1016/j.cell.2020.06.008
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7275151/>

¹⁷⁵ Gao Q, Bao L, Mao H, et al.
Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2.
Science. 2020;369(6499):77-81. doi:10.1126/science.abc1932
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7202686/>

¹⁷⁶ Wang H, Zhang Y, Huang B, et al.
Development of an Inactivated Vaccine Candidate, BBiBp-CorV, with Potent Protection against SARS-CoV-2.
Cell. 2020;182(3):713-721.e9. doi:10.1016/j.cell.2020.06.008
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7275151/>

¹⁷⁷ https://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/cells/WHO_TRS_878_A1Animalcells.pdf

¹⁷⁸ Bolles M, Deming D, Long K, et al.
A double-inactivated severe acute respiratory syndrome coronavirus vaccine provides incomplete protection in mice and induces increased eosinophilic proinflammatory pulmonary response upon challenge.
J Virol. 2011;85(23):12201-12215. doi:10.1128/JVI.06048-11
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3209347/>

Tseng CT, Sbrana E, Iwata-Yoshikawa N, et al.
Immunization with SARS coronavirus vaccines leads to pulmonary immunopathology on challenge with the SARS virus

vaccini contro il SARS-CoV-2 possano causare un'immunopatologia simile associata al vaccino, come si approfondirà nella sezione dedicata al meccanismo delle reazioni avverse da vaccino COVID-19 (parte seconda).¹⁷⁹

Gli studi hanno dimostrato che la vaccinazione con la proteina N di SARS-CoV potenzia i cambiamenti immunopatologici nei polmoni,¹⁸⁰ e che l'induzione di linfociti T proteina-specifici per la proteina N di SARS-CoV e il profilo delle citochine Th2 alterato possono essere la causa delle reazioni avverse.¹⁸¹

[published correction appears in PLoS One. 2012;7(8). doi:10.1371/annotation/2965cfae-b77d-4014-8b7b-236e01a35492]. PLoS One. 2012;7(4):e35421. doi:10.1371/journal.pone.0035421
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3335060/>

¹⁷⁹ Simon HU, Karaulov AV, Bachmann MF.

Strategies to Prevent SARS-CoV-2-Mediated Eosinophilic Disease in Association with COVID-19 Vaccination and Infection. *Int Arch Allergy Immunol*. 2020;181(8):624-628. doi: 10.1159/000509368. Epub 2020 Jun 16.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7360494/>

¹⁸⁰ Yasui F, Kai C, et al

Prior immunization with severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus (SARS-CoV) nucleocapsid protein causes severe pneumonia in mice infected with SARS-CoV. *J Immunol*. 2008 Nov 1;181(9):6337-48. doi: 10.4049/jimmunol.181.9.6337.
<https://www.jimmunol.org/content/jimmunol/181/9/6337.full.pdf>

¹⁸¹ Deming D, et al

Vaccine efficacy in senescent mice challenged with recombinant SARS-CoV bearing epidemic and zoonotic spike variants. *PLoS Med*. 2006 Dec;3(12):e525. doi: 10.1371/journal.pmed.0030525. Erratum in: *PLoS Med*. 2007 Feb;4(2):e80.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1716185/>

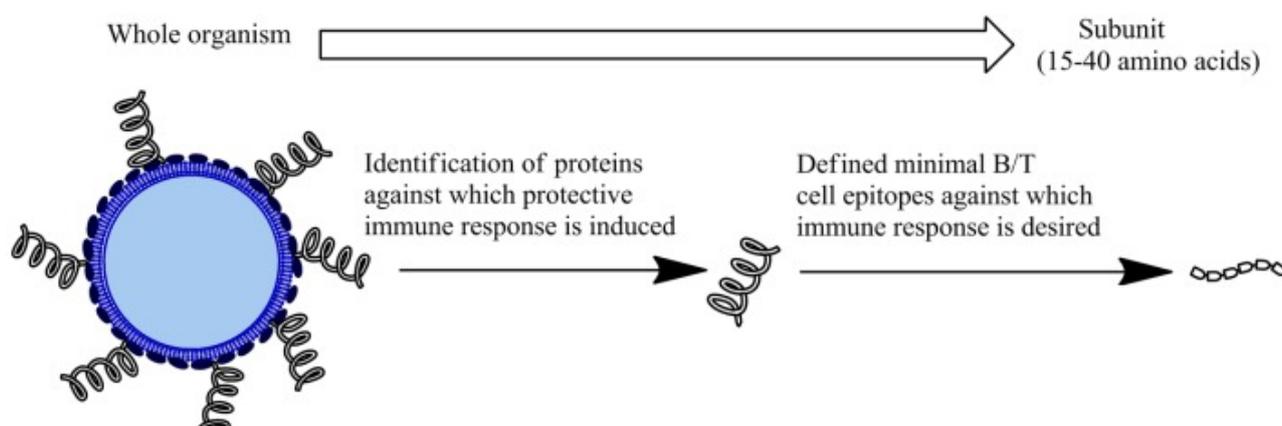
Iwata-Yoshikawa N, Uda A, Suzuki T, et al.

Effects of Toll-like receptor stimulation on eosinophilic infiltration in lungs of BALB/c mice immunized with UV-inactivated severe acute respiratory syndrome-related coronavirus vaccine. *J Virol*. 2014;88(15):8597-8614. doi:10.1128/JVI.00983-14
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4135953/>

VACCINI A SUBUNITÀ PROTEICHE

- SARS-CoV-2 rS/Matrix M1-Adjuvant (Full length recombinant SARS CoV-2 glycoprotein nanoparticle vaccine adjuvanted with Matrix M) – NVX-CoV2373 / Novavax
- Recombinant SARS-CoV-2 vaccine (CHO Cell) / Anhui Zhifei Longcom Biopharmaceutical + Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences
- KBP-COVID-19 (RBD-based) / Kentucky Bioprocessing Inc.
- SARS-CoV-2 vaccine formulation 1 with adjuvant 1 (S protein (baculovirus production) / Sanofi Pasteur + GSK
- SCB-2019 + AS03 or CpG 1018 adjuvant plus Alum adjuvant (Native like Trimeric subunit Spike Protein vaccine) / Clover Biopharmaceuticals Inc./GSK/Dynavax
- COVID19 vaccine/ Vaxine Pty Ltd. + Medytox
- MF59 adjuvanted SARS-CoV-2 Sclamp vaccine / CSL Ltd. + Seqirus + University of Queensland
- MVC-COV1901 (S-2P protein + CpG 1018) / Medigen Vaccine Biologics + Dynavax + National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID)
- FINLAY-FR anti-SARS-CoV-2 Vaccine (RBD + adjuvant) / Instituto Finlay de Vacunas
- EpiVacCorona (EpiVacCorona vaccine based on peptide antigens for the prevention of COVID-19) / Federal Budgetary Research Institution State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector"
- RBD (baculovirus production expressed in Sf9 cells) Recombinant SARS-CoV-2 vaccine (Sf9 Cell) / West China Hospital + Sichuan University
- IMP CoVac-1 (SARS-CoV-2 HLA-DR peptides) / University Hospital Tuebingen
- UB-612 (Multitope peptide based S1-RBD-protein based vaccine) / COVAXX + United Biomedical Inc
- AdimrSC-2f (recombinant RBD +/- Aluminium) / Adimmune Corporation
- CIGB-669 (RBD+AgnHB) / Center for Genetic Engineering and Biotechnology (CIGB)
- CIGB-66 (RBD+aluminium hydroxide) / Center for Genetic Engineering and Biotechnology (CIGB)
- BECOV2 / Biological ELimited
- Recombinant Sars-CoV-2 Spike protein, Aluminum adjuvanted / Nanogen Pharmaceutical Biotechnology
- Recombinant protein vaccine S-268019 (using Baculovirus expression vector system) / Shionogi

Piuttosto che iniettare un intero agente patogeno per innescare una risposta immunitaria, i vaccini a subunità (a volte chiamati vaccini acellulari) contengono pezzi purificati di esso, che sono stati appositamente selezionati per la loro capacità di stimolare le cellule immunitarie.¹⁸²



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3793171/>

Vaccini a subunità. Un'alternativa ai vaccini patogeni interi inattivati o attenuati. Composto da frammento / i del microrganismo per generare una risposta immunitaria protettiva.

¹⁸² Zaman M, Toth I.

Immunostimulation by synthetic lipopeptide-based vaccine candidates: structure-activity relationships.

Front Immunol. 2013;4:318. Published 2013 Oct 9. doi:10.3389/fimmu.2013.00318

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3793171/>

Poiché questi frammenti non sono in grado di causare malattie, i vaccini a subunità sono considerati molto sicuri. Ne esistono di diversi tipi:

- i vaccini a subunità proteica contengono proteine specifiche isolate da patogeni virali o batterici;
- i vaccini polisaccaridici contengono catene di molecole di zucchero (polisaccaridi) presenti nelle pareti cellulari di alcuni batteri;
- i vaccini a subunità coniugata legano una catena polisaccaridica a una proteina vettore per aumentare la risposta immunitaria.

Tra i vaccini a subunità già ampiamente utilizzati troviamo i vaccini contro l'epatite B e la pertosse acellulare (subunità proteica), il vaccino polisaccaride pneumococcico (polisaccaride) e il vaccino MenACWY, che contiene polisaccaridi dalla superficie di quattro tipi di batteri che causano la malattia meningococcica uniti alla difterite o al tossico tetanico (subunità coniugata).

Contro il virus che causa la COVID-19 sono stati sviluppati solo vaccini a subunità proteica.

I vaccini a subunità peptidica sono generalmente composti da 30-60 aminoacidi che rappresentano l'antigene o gli antigeni di interesse (sequenze peptidiche immunogeniche).¹⁸³

APPROFONDIMENTO: L'INTERAZIONE ANTIGENE-ANTICORPO

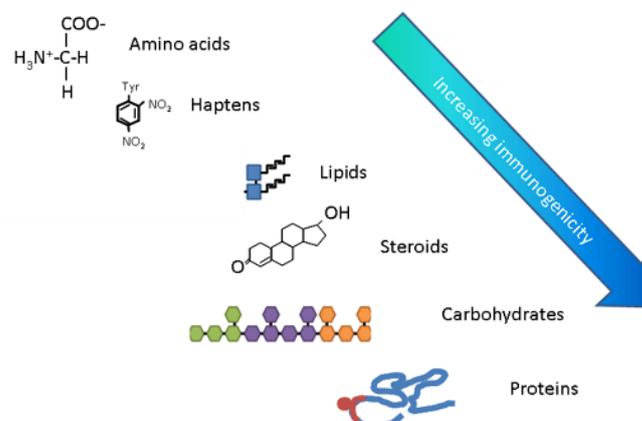
IMMUNODOMINANZA¹⁸⁴

Qualunque sostanza in grado di suscitare una risposta immune si definisce **immunogenica**, e viene detta **immunogeno**.

L'**antigene** è quella sostanza in grado di legarsi ad uno specifico anticorpo (oppure a un linfocita T): tutti gli antigeni sono potenzialmente in grado di stimolare la produzione di anticorpi specifici, ma solo alcuni sono in grado di farlo realmente, perché la maggior parte si comportano da **apteni**, ovvero ci riescono solo se legati ad una molecola (**carrier**) che li fa diventare immunogeni.

Quindi, una molecola può essere antigenica (cioè può reagire con i prodotti o componenti del sistema immunitario) ma non essere immunogenica (cioè non essere in grado da sola di indurre una risposta immunitaria). Ne segue che tutti gli immunogeni sono antigeni, ma non tutti gli antigeni sono immunogeni.

Immunogenicity



¹⁸³ Rueckert C, Guzmán CA.

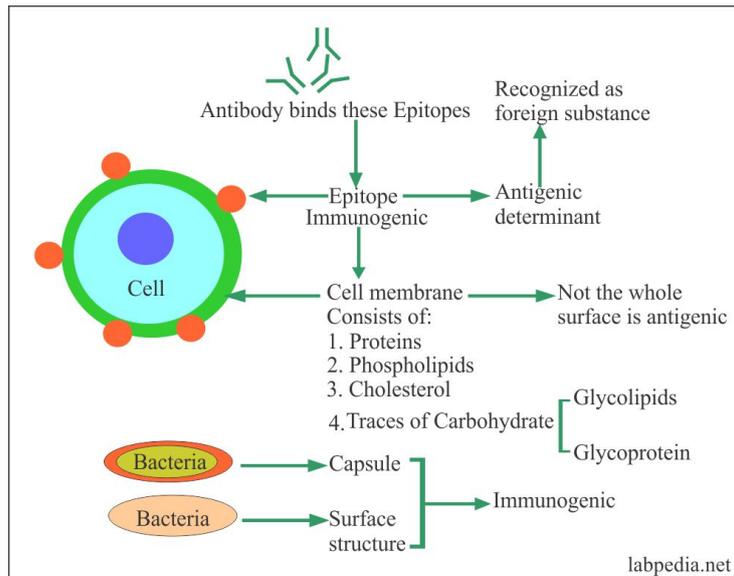
Vaccines: from empirical development to rational design.

PLoS Pathog. 2012;8(11):e1003001. doi:10.1371/journal.ppat.1003001

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3493475/>

¹⁸⁴ <https://didattica-2000.archived.uniroma2.it/immunology/deposito/Antigeni.pdf>

<https://www.labpedia.net/elementary-immunology/chapter-3-immunogen-and-antigen/>



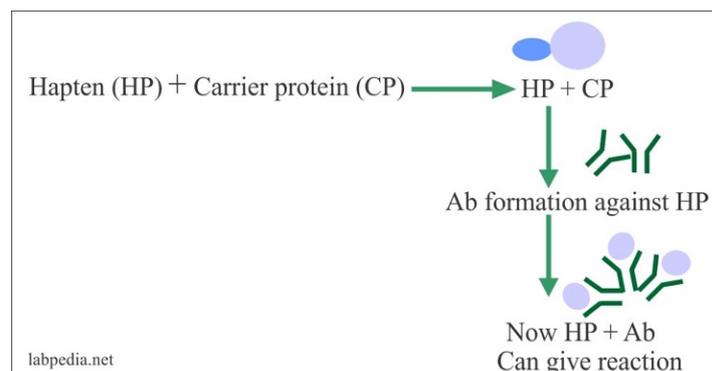
<https://www.labpedia.net/elementary-immunology/chapter-3-immunogen-and-antigen/>
<https://www.microbiologybook.org/mayer/antigens2000.htm>

EPITOPO o DETERMINANTE ANTIGENICO

Parte di un antigene che entra in contatto con il sito di legame di un anticorpo o col recettore per l'antigene delle cellule T. Gli epitopi sono quindi le porzioni più importanti dell'antigene, capaci di evocare la risposta immunitaria.

APTENE

Molecola a basso peso molecolare (< 4 kD) in grado di agire come epitopo ma che di per sé non è in grado di evocare una risposta anticorpale. Come già visto, l'aptene è una molecola antigenica ma non immunogena, a meno che non sia legata ad un carrier; induce una risposta immunitaria solo nel caso in cui il sistema immunitario sia venuto precedentemente a contatto col complesso aptene-carrier.



<https://www.labpedia.net/elementary-immunology/chapter-3-immunogen-and-antigen/>

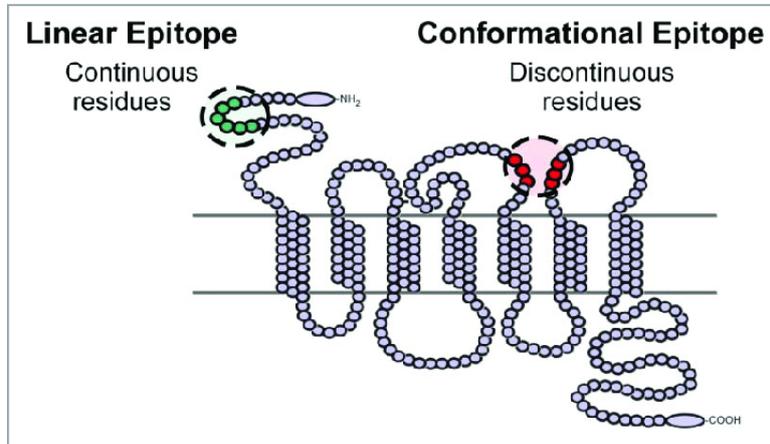
I determinanti antigenici possiedono alcuni residui più importanti di altri (**epitopi immuno-dominanti**).

Un antigene possiede normalmente più di un epitopo, e la risposta che indurrà sarà policlonale, cioè verranno attivati più cloni linfocitari.

Vi sono tuttavia alcune molecole antigeniche che posseggono uno o pochi epitopi immunodominanti, e sono in grado quindi di indurre una risposta monoclonale (se un solo clone viene attivato) od oligoclonale (quando vengono attivati pochi cloni). All'interno di una molecola antigenica può vigere una gerarchia nell'immunodominanza degli epitopi, con conseguente attivazione preferenziale di alcuni cloni confronto ad altri.

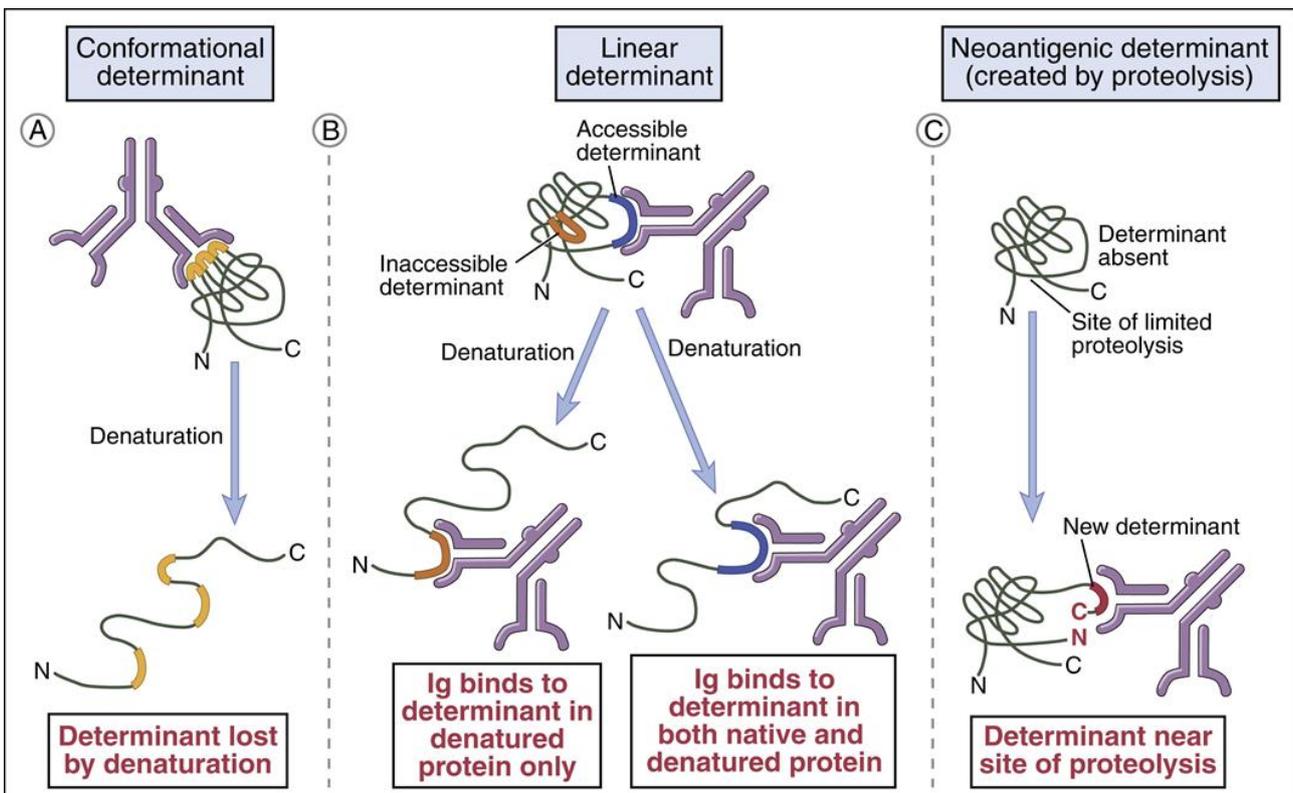
Questi tipi di **determinanti antigenici** sono detti **continui (o lineari)** poiché dati da aminoacidi disposti in modo lineare, cioè uno dopo l'altro nella sequenza primaria della proteina.

Esistono però altri tipi di **determinanti**, la cui esistenza è stata dimostrata utilizzando molecole di lisozima, detti **discontinui (o conformazionali)** formati da aminoacidi discontinui nella sequenza primaria, ma che diventano contigui nella struttura terziaria, perché sono portati ad unirsi grazie al ripiegamento tridimensionale della proteina. (ad es. 2 regioni legate da ponti disolfuro)¹⁸⁵



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5825199/>

Epitopi lineari e conformazionali. Gli epitopi lineari sono costituiti da residui continui su una sequenza proteica. Gli epitopi conformazionali sono costituiti da residui che sono discontinui nella sequenza proteica ma si trovano in stretta vicinanza per formare una superficie antigenica sulla struttura tridimensionale della proteina. Gli epitopi conformazionali sono meno evidenti e più brevettabili degli epitopi lineari.



<https://oncohemakey.com/immunogenicity-and-antigenicity/>

¹⁸⁵ Immunogenicity and Antigenicity

<https://oncohemakey.com/immunogenicity-and-antigenicity/>

Neil S. Greenspan, Lisa A. Cavacini,
15 - Immunoglobulin Function,

Editor(s): Robert R. Rich, Thomas A. Fleisher, William T. Shearer, Harry W. Schroeder, Anthony J. Frew, Cornelia M. Weyand, Clinical Immunology (Fifth Edition), Elsevier, 2019, Pages 223-233.e1, ISBN 9780702068966,

<https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6896-6.00015-6>.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780702068966000156>

La natura dei determinanti antigenici. I determinanti antigenici (mostrati in arancione, rosso e blu) possono dipendere dal ripiegamento (conformazione) delle proteine e dalla struttura primaria. Alcuni determinanti sono accessibili nelle proteine native e si perdono durante la denaturazione (A), mentre altri sono esposti solo durante il dispiegamento delle proteine (B). I neodeterminanti derivano da modificazioni postsintetiche come la scissione del legame peptidico (C). (Da Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S: Cellular and molecular immunology, ed 6 [edizione aggiornata], Philadelphia, 2010, Saunders.)

Gli epitopi lineari, in particolare, sono riconosciuti sia dai linfociti T che dai linfociti B, mentre quelli conformazionali solo dai linfociti B.

Durante l'ipermutazione somatica gli anticorpi ad affinità maggiore sono quelli diretti contro epitopi dominanti (epitopi immuno-dominanti) mentre quelli meno affini contro epitopi più nascosti.

Nel corso di una risposta immunitaria si ha quindi una sorta di "selezione darwiniana" tra gli epitopi più importanti, verso i quali vengono prodotti anticorpi più affini.

Sulla base di queste evidenze, la teoria accettata è che gli epitopi immuno-dominanti si trovino su porzioni idrofiliche degli antigeni (perché più facilmente raggiungibili dagli anticorpi) piuttosto che idrofobiche, e che questi epitopi siano quelli contro cui, con maggiore probabilità, reagiranno gli anticorpi, anche in individui diversi, e pertanto sono solitamente utilizzati per la preparazione di vaccini.

IMMUNOGENICITÀ E IMMUNOTOLLERANZA: IL PARADIGMA DELL'IDROFOBICITÀ

Recentemente è stata messa in dubbio l'ipotesi che l'immunotolleranza possa derivare da un processo di selezione negativa di linfociti autoreattivi ¹⁸⁶.

Infatti, le analisi immunoproteomiche mostrano che quasi tutti gli epitopi che sono stati validati sperimentalmente come immunoreattivi nell'ospite umano e derivano da patogeni come ad es. il virus dell'epatite C (HCV), il virus Epstein-Barr, e il papillomavirus umano, sono composti da sequenze di amminoacidi (aa) condivise con proteine umane [¹⁸⁷ e ulteriori riferimenti in esse].

La condivisione peptidica tra epitopi virali e proteine umane documenta che la delezione dei linfociti autoreattivi non si verifica e, al di là delle implicazioni patologiche in termini di reattività crociata e conseguenti tumori e malattie autoimmuni, ripropone la discussa questione di cosa sia l'immunotolleranza e quali siano i meccanismi molecolari che rendono un antigene tollerato (o, viceversa, immunogenico).

Quindi, l'osservazione che l'immunotolleranza verso un antigene può essere definita dalla frequenza dei determinanti peptidici dell'antigene ¹⁸⁸ è rilevante.

¹⁸⁶ Cohn M, Mitchison NA, Paul WE, Silverstein AM, Talmage DW, Weigert M. Reflections on the clonal-selection theory. Nat Rev Immunol. 2007 Oct;7(10):823-30. doi: 10.1038/nri2177. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17893695/>

Rose NR. Negative selection, epitope mimicry and autoimmunity. Curr Opin Immunol. 2017 Dec;49:51-55. doi: 10.1016/j.coi.2017.08.014. Epub 2017 Nov 3. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29102863/>

¹⁸⁷ Kanduc D. From hepatitis C virus immunoproteomics to rheumatology via cross-reactivity in one table. Curr Opin Rheumatol. 2019 Sep;31(5):488-492. doi: 10.1097/BOR.0000000000000606. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31356379/>

Kanduc D, Shoenfeld Y. Human Papillomavirus Epitope Mimicry and Autoimmunity: The Molecular Truth of Peptide Sharing. Pathobiology. 2019;86(5-6):285-295. doi: 10.1159/000502889. Epub 2019 Oct 8. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31593963/>

Kanduc D, Shoenfeld Y. From Anti-EBV Immune Responses to the EBV Disease via Cross-reactivity. Glob Med Genet. 2020 Aug;7(2):51-63. doi: 10.1055/s-0040-1715641. Epub 2020 Aug 31. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7490125/>

¹⁸⁸ Kanduc D. Immunogenicity, Immunopathogenicity, and Immunotolerance in One Graph. Anticancer Agents Med Chem. 2015;15(10):1264-8. doi: 10.2174/1871520615666150716105543.

Tale concetto nasce dal fatto che le sequenze peptidiche frequenti sono per lo più incapaci di evocare una risposta immunitaria, mentre le sequenze peptidiche rare sono specificamente mirate dalle risposte immunitarie e sembrano essere associate all'immunogenicità.

Inoltre, dal punto di vista chimico-fisico, proprietà specifiche come l'idrofilia e l'idrofobicità hanno dimostrato di caratterizzare rispettivamente le sequenze peptidiche frequenti tollerate e il peptide raro immunogenico.¹⁸⁹

Nella recente pubblicazione *"Hydrophobicity and the Physico-Chemical Basis of Immunotolerance"*¹⁹⁰ la dr.ssa Kanduc suggerisce che la questione del sé verso il riconoscimento del non-sé (cioè, immunotolleranza vs. immunogenicità) trova una spiegazione scientifica logica nel **paradigma dell'idrofobicità**.

In particolare, questo studio indica l'idrofobicità quale movente primario della generazione delle risposte immunitarie.

Infatti, è risultato che l'idrofobicità:

(1) *caratterizza i determinanti pentapeptidici immunogenici rari/che non si verificano mai.*

La generazione di anticorpi inizia con una debole interazione elettrostatica tra il BCR legato alla membrana e l'antigene¹⁹¹. L'interazione primaria debole può decadere o, in alternativa, evolversi in un'interazione secondaria più forte che innesca una cascata di segnalazione intracellulare delle cellule B e una successione di eventi (vale a dire, internalizzazione dell'antigene e presentazione alle cellule T helper, ricombinazione VDJ, ipermutazione somatica e cambio di isotipo per ricombinazione¹⁹²) che porta alla generazione di anticorpi ad alta affinità¹⁹³.

In particolare, 2 sono i fattori che governano il primo incontro BCR-antigene e la sua evoluzione in un legame produttivo:

(1) *la piccola dimensione della superficie di contatto tra BCR e antigene* (l'analisi dell'energia di legame dei complessi antigene-anticorpo, la mutagenesi sito-diretta e gli esperimenti di mappatura degli epitopi hanno convalidato definitivamente il **pentapeptide come unità di misura minima del riconoscimento immunitario**¹⁹⁴. Parallelamente, anche la dimensione massima degli epitopi polisaccaridici è risultata prossima a quella dei penta- o esasaccaridi).

¹⁸⁹ Capone G, Novello G, Fasano C, et al.

The oligodeoxynucleotide sequences corresponding to never-expressed peptide motifs are mainly located in the non-coding strand. BMC Bioinformatics. 2010;11:383. Published 2010 Jul 20. doi:10.1186/1471-2105-11-383 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2919516/>

¹⁹⁰ Kanduc D.

Hydrophobicity and the Physico-Chemical Basis of Immunotolerance. Pathobiology. 2020;87(4):268-276. doi: 10.1159/000508903. Epub 2020 Jul 29. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32726789/>

¹⁹¹ van Oss CJ.

Nature of specific ligand-receptor bonds, in particular the antigen-antibody bond. J Immunoassay. 2000 May-Aug;21(2-3):109-42. doi: 10.1080/01971520009349531. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10929884/>

Van Oss CJ.

Hydrophobic, hydrophilic and other interactions in epitope-paratope binding. Mol Immunol. 1995 Feb;32(3):199-211. doi: 10.1016/0161-5890(94)00124-j. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7534869/>

¹⁹² <http://atlasgeneticsoncology.org/Educ/PolyIGID30013IS.html>

¹⁹³ Kwak K, Akkaya M, Pierce SK.

B cell signaling in context. Nat Immunol. 2019 Aug;20(8):963-969. doi: 10.1038/s41590-019-0427-9. Epub 2019 Jul 8. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31285625/>

¹⁹⁴ Reddehase MJ, Rothbard JB, Koszinowski UH.

A pentapeptide as minimal antigenic determinant for MHC class I-restricted T lymphocytes. Nature. 1989 Feb 16;337(6208):651-3. doi: 10.1038/337651a0. https://core.ac.uk/reader/12167563?utm_source=linkout

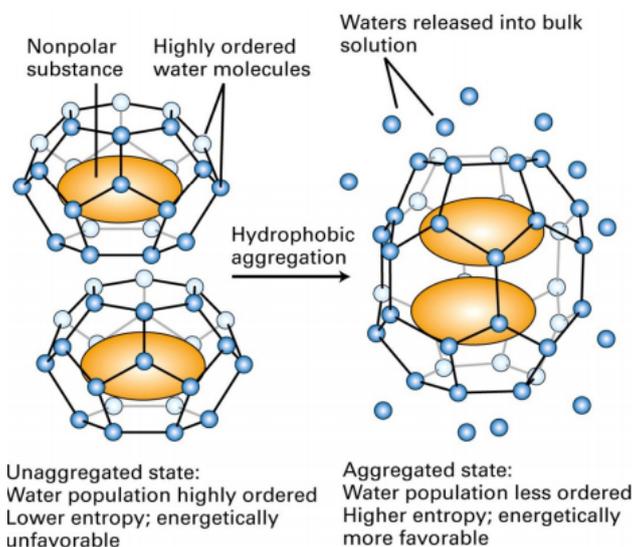
- (2) *la debolezza dell'interazione primaria tra BCR e antigene*. Il proteoma umano è costituito da ~2,4 milioni di pentapeptidi, circa mezzo milione dei quali si verificano una sola volta, mentre i restanti ricorrono ripetutamente nelle proteine umane anche centinaia di volte. Includendo più occorrenze, il proteoma umano è costituito da ~16 milioni di pentapeptidi ¹⁹⁵.

Una tale ridondanza pentapeptidica riduce ulteriormente la probabilità che un'interazione primaria BCR-pentapeptide proceda verso un'interazione secondaria produttiva più forte. L'affollamento di pentapeptidi sul BCR è ovviamente maggiore per pentapeptidi frequenti, quindi maggiore è la frequenza di un antigene pentapeptidico, minore è la possibilità di un legame durevole e produttivo con il BCR. Dal punto di vista immunologico, il risultato finale sarà la non reattività delle BCR, ovvero uno stato di anergia o immunotolleranza.

- (2) *è il fattore chimico-fisico mediante il quale la forza di attrazione apolare di van der Waals può trasformare l'interazione elettrostatica primaria casuale, debole e aspecifica in una interazione secondaria più forte e specifica*.

Sebbene la forza attrattiva apolare di van der Waals sia debole (da ~0,5 a 1 kcal / mol) ¹⁹⁶, può vincere la forza di idratazione locale e provocare l'espulsione di molecole d'acqua dal contatto superficiale tra le entità apolari (Fig. seguente) perché l'espulsione dell'acqua è accompagnata da un aumento dell'entropia (cioè è un processo energeticamente favorito) dovuto al passaggio delle molecole d'acqua da uno stato ordinato a uno disordinato casuale.

L'estrusione di acqua dall'interazione superficiale BCR-pentapeptide avvicina il BCR e l'antigene pentapeptidico, rafforzando in questo modo l'interazione elettrostatica primaria. Ciò porta ad ipotizzare che, in generale, le molecole d'acqua all'interfaccia BCR-pentapeptide verranno espulse in misura e con una forza proporzionale all'idrofobicità e rarità dell'antigene pentapeptide.



http://lbam.pwr.edu.pl/FILES/Lecture_12_Biophysics_Hydrophobic_effect.pdf

L'effetto idrofobo. La forza attrattiva di Van der Waals porta all'aggregazione di gruppi apolari e all'estrusione di molecole d'acqua (punti grigi) dalla superficie di contatto.

Di conseguenza, forze polari (o legami idrogeno) possono intervenire e contribuire a rafforzare l'interazione primaria.

¹⁹⁵ Capone G, De Marinis A, Simone S, Kusalik A, Kanduc D.

Mapping the human proteome for non-redundant peptide islands.

Amino Acids. 2008 Jun;35(1):209-16. doi: 10.1007/s00726-007-0563-7. Epub 2007 Aug 15.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17701099/>

¹⁹⁶ Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biochemistry. 5th edition. New York: WH Freeman. Section 1.3, Chemical Bonds in Biochemistry, 2002.

I legami idrogeno sono dovuti all'interazione acido-base tra un gruppo idrossile e un'altra molecola polare e sono deboli, con energie comprese tra 1 e 3 kcal / mol e, a differenza delle forze elettrostatiche, hanno una lunghezza di $\sim 0,2$ nm.

In pratica, il legame idrogeno non può esercitare la sua attrazione a distanze che superano 0,2 nm e non può svolgere un ruolo principale nelle interazioni primarie BCR-antigene pentapeptidico, ma quando BCR e pentapeptide dell'antigene si avvicinano l'un l'altro sotto l'effetto della forza di attrazione di van der Waals, anche le catene vicine di BCR e pentapeptide dell'antigene si avvicinano l'una all'altra.

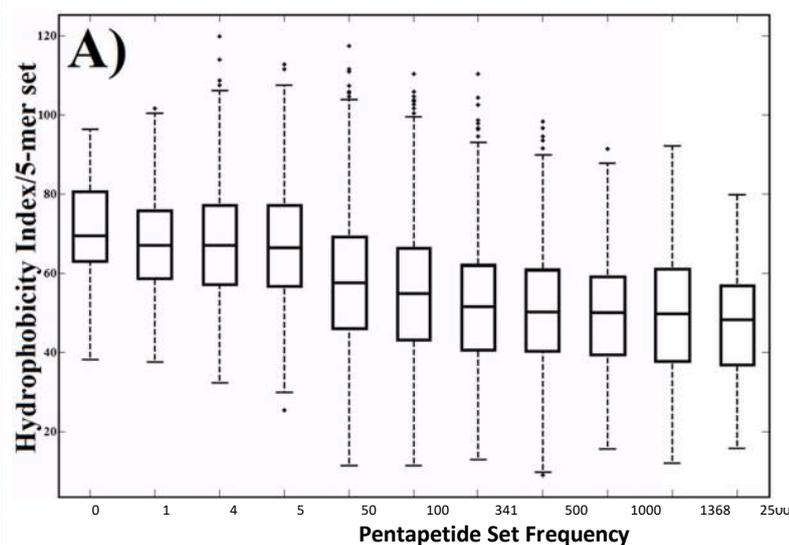
In queste circostanze, i legami idrogeno diretti possono contribuire a formare legami secondari, sia tra BCR e pentapeptide dell'antigene, sia tra catene opposte in prossimità di BCR e il pentapeptide dell'antigene.

Quindi, la vicinanza tra BCR e il pentapeptide dell'antigene può portare a cambiamenti conformazionali che producono un adattamento stereochimico ottimale finale che è la condizione indispensabile per la generazione di legami specifici ad alta energia tra anticorpo e antigene.

(3) è il filtro mediante il quale la sequenza terminale del BCR della linea germinale evita le sequenze frequenti e seleziona e lega positivamente i determinanti pentapeptidici idrofobici rari/mai presenti, discriminando in questo modo il sé dal non sé.

Rispetto ai pentapeptidi frequenti, i pentapeptidi immunogenici a bassa/zero frequenza sono generalmente dotati di livelli di idrofobicità più elevati, come mostrato nella Figura seguente¹⁹⁷.

In particolare, la metionina idrofobica (M), la fenilalanina (F), il triptofano (W) e la tirosina (Y) sono i componenti principali dei pentapeptidi antigeni immunogenici, a bassa/zero frequenza, mentre, al contrario, i non immunogenici, i pentapeptidi frequenti sono composti principalmente da residui aminoacidi idrofili.



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2919516/>

Caratterizzazione statistica dell'idrofobicità con differenti frequenze nel proteoma universale.

I boxplots mostrano la distribuzione dei valori di ciascun fattore fisico-biochimico per ogni set di pentapeptidi. La linea all'interno di ogni casella rappresenta il valore mediano. La parte superiore e inferiore di ciascuna casella rappresentano rispettivamente il 75° e il 25° percentile. I baffi mostrano l'intervallo di valori che non sono considerati valori anomali.

I valori anomali vengono tracciati individualmente come segni più.

I valori p tra le diverse classi di 5-mers per idrofobicità erano tutti inferiori a 0,001, indicando in ogni caso che le medie dei diversi set sono diverse.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2919516/>

L'idrofobicità delinea un contesto scientifico per la comprensione dell'immunità protettiva e dell'autoimmunità e fornisce anche una nuova prospettiva di ricerca per fenomeni immunologici ancora inspiegabili come l'effetto adiuvante dell'allume.

¹⁹⁷ Capone G, De Marinis A, Simone S, Kuslik A, Kanduc D.

Mapping the human proteome for non-redundant peptide islands. Amino Acids. 2008 Jun;35(1):209-16. doi: 10.1007/s00726-007-0563-7. Epub 2007 Aug 15.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17701099/>

Infatti, già nel 1997, Naim et al.¹⁹⁸, nel descrivere le proprietà dell'allume, ha evidenziato che i cationi possono neutralizzare in tutto o in parte i composti caricati negativamente, facendo sì che tali composti diventino più idrofobici.

Pertanto, si può presumere che gli ioni Al^{3+} dell'allume, a pH neutro, possano avere un effetto idrofobizzante sulle proteine caricate negativamente,¹⁹⁹ con gli effetti immunogenici descritti sopra.

Per concludere, l'affinità degli anticorpi generati dipende in gran parte dal numero e dal tipo di amminoacidi che formano i ripiegamenti delle CDR e determinano la topografia della superficie del sito di legame²⁰⁰.

Il paradigma dell'idrofobicità può quindi rappresentare un radicale cambiamento nel nostro modo di studiare e utilizzare il sistema immunitario nel cancro e nelle malattie infettive, che rimangono i problemi di salute più cruciali per la popolazione umana.

Anticorpi e autoimmunità

Come già visto, la regione di legame dell'antigene (paratopo) e il determinante antigenico (epitopo) sono tenuti insieme da forze non covalenti, che determinano anche l'affinità di questi anticorpi²⁰¹.

Questa interazione è anche orchestrata dalla complementarità nella carica e nella forma del paratopo-epitopo.²⁰²

In generale, un anticorpo dovrebbe discriminare tra auto-molecole (prodotte dall'organismo) e antigeni estranei esogeni (come virus e batteri) per limitare la sua funzione contro gli antigeni esterni e dimostrare la necessaria tolleranza agli auto-antigeni.

L'incapacità di distinguere tra questi processi di interazione potrebbe spiegare diverse malattie autoimmuni.

¹⁹⁸ Naim JO, van Oss CJ, Wu W, Giese RF, Nickerson PA.
Mechanisms of adjuvancy: I--Metal oxides as adjuvants.
Vaccine. 1997 Aug;15(11):1183-93. doi: 10.1016/S0264-410X(97)00016-9.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9286042/>

¹⁹⁹ al-Shakhshir RH, Regnier FE, White JL, Hem SL.
Contribution of electrostatic and hydrophobic interactions to the adsorption of proteins by aluminium-containing adjuvants.
Vaccine. 1995 Jan;13(1):41-4. doi: 10.1016/0264-410X(95)80009-3.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7762276/>

Subunit Vaccine Delivery
Camilla Foged
January 2015 Publisher: Springer ISBN: 978-1-4939-1417-3 Editor: Foged, C., Rades, Th., Perrie, Y., Hook, S

²⁰⁰ Kaur H, Salunke DM.
Antibody promiscuity: Understanding the paradigm shift in antigen recognition.
IUBMB Life. 2015 Jul;67(7):498-505. doi: 10.1002/iub.1397. Epub 2015 Jul 15.
<https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/iub.1397>

²⁰¹ Van Oss CJ.
Hydrophobic, hydrophilic and other interactions in epitope-paratope binding.
Mol Immunol. 1995 Feb;32(3):199-211. doi: 10.1016/0161-5890(94)00124-j.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7534869/>

²⁰² Al Qaraghuli, M.M., et al.
Defining the complementarities between antibodies and haptens to refine our understanding and aid the prediction of a successful binding interaction.
BMC Biotechnol 15, 99 (2015). <https://doi.org/10.1186/s12896-015-0217-x>
<https://bmcbiotechnol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12896-015-0217-x>

Kim, Su & Shin, Ki-Roo & Zhang, Byoung-Tak. (2004).
Molecular immunocomputing with application to alphabetical pattern recognition mimics the characterization of ABO blood type. 2003 Congress on Evolutionary Computation, CEC 2003 - Proceedings. 4. 2549 - 2556 Vol.4. 10.1109/CEC.2003.1299409.
https://www.researchgate.net/publication/4074726_Molecular_immunocomputing_with_application_to_alphabetical_pattern_recognition_mimic_s_the_characterization_of_ABO_blood_type

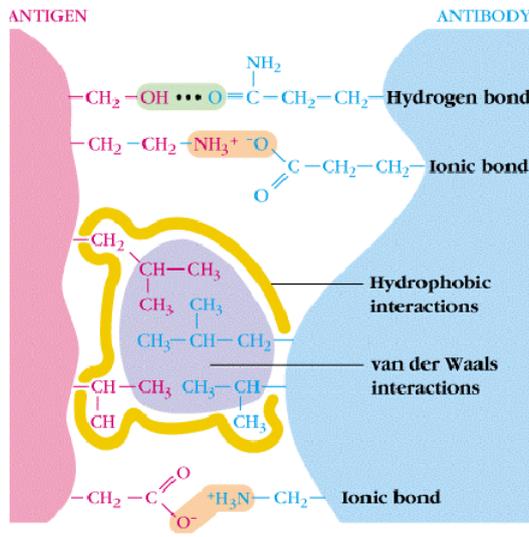


Fig. 1

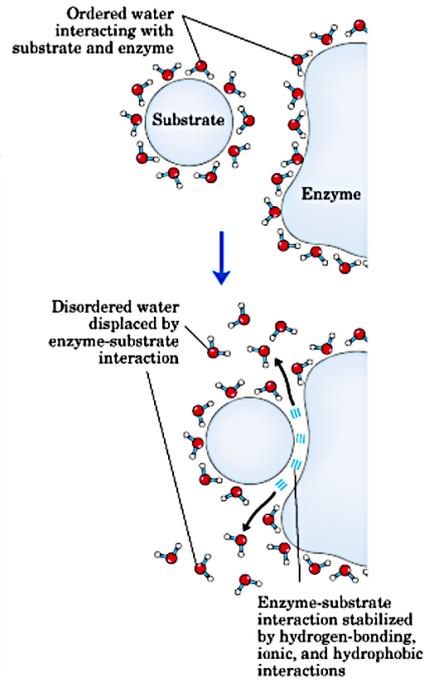


Fig. 2

Fig. 1

https://www.researchgate.net/publication/4074726_Molecular_immunocomputing_with_application_to_alphabetical_pattern_recognition_mimics_the_characterization_of_ABO_blood_type The noncovalent interactions that form the basis of antigen-antibody (Ag-Ab) binding

Fig.2 http://lbam.pwr.edu.pl/FILES/Lecture_12_Biophysics_Hydrophobic_effect.pdf

Nel suo recente articolo *“On the Inexistence of a Negative Selection Process”*²⁰³ la dr.ssa Kanduc ribadisce i seguenti concetti:

- *il fatto che gli epitopi immunoreattivi derivati da patogeni siano costituiti principalmente da frammenti di peptidi comuni alle proteine umane è la prova indiscutibile che la “selezione negativa” dei linfociti autoreattivi non esiste.*

L'anormale condivisione peptidica tra epitopi microbici immunoreattivi e proteine umane inficia l'attuale modello di auto-tolleranza basato su un processo di selezione negativa secondo cui i linfociti con specificità per sequenze espresse nell'ospite vengono cancellati dal repertorio immunologico per evitare autoreattività e la conseguente autoimmunità.

- *A corollario dell'autoreattività della risposta immunitaria antimicrobica, viene meno anche il ruolo difensivo univoco attribuito agli anticorpi.*

Attualmente, gli anticorpi sono definiti come la principale difesa contro le infezioni. Al contrario, la massiccia condivisione di peptidi tra proteine umane ed epitopi immunoreattivi derivati da patogeni indica che l'autoreattività e la conseguente autoimmunità caratterizzano la risposta immunitaria alle infezioni.

Un esempio paradigmatico è offerto dalla corrispondenza simmetrica che lega gli epitopi EBV alla malattia da EBV, dai linfomi alle malattie cardiache, attraverso la condivisione dei peptidi.²⁰⁴

- *In forme più o meno serie, la reattività crociata e l'autoimmunità sembrano essere una conseguenza costante a seguito di infezione o immunizzazione attiva, conferendo così un carattere patogeno alla risposta immunitaria contro gli agenti infettivi.*²⁰⁵

²⁰³ Darja Kanduc

Immunobiology: On the Inexistence of a Negative Selection Process

Advanced Studies in Biology, Vol. 12, 2020, no. 1, 19 – 28 <https://doi.org/10.12988/asb.2020.91221>

<http://www.m-hikari.com/asb/asb2020/asb1-2020/p/kanducASB1-2020.pdf>

²⁰⁴ Kanduc D, Shoenfeld Y.

From Anti-EBV Immune Responses to the EBV Disease via Cross-reactivity.

Glob Med Genet. 2020;7(2):51-63. doi:10.1055/s-0040-1715641

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7490125/>

²⁰⁵ Ray SK, Putterman C, Diamond B.

Pathogenic autoantibodies are routinely generated during the response to foreign antigen: a paradigm for autoimmune disease.

L'universo anticorpale potenzialmente infinito derivante dalla ricombinazione genica e dalla maturazione dell'affinità ha portato a supporre che il repertorio anticorpale di ogni individuo sia unico.

Allo stesso modo, il numero di potenziali epitopi bersaglio sugli antigeni patogeni ha portato a supporre che la generazione di specifici modelli di anticorpi anti-patogeni debba seguire ad ogni incontro con un antigene estraneo.

- *In realtà, i termini "infinito" e "universo" dovrebbero essere cancellati, essendo 5-6 aa residui sufficienti a delineare un determinante immunitario antigenico. Questo produce un numero finito (tra 20^5 e 20^6) di sequenze immunitarie antigeniche e anticorpi correlati.*

L'osservazione clinica che il primo incontro con un agente patogeno modella e condiziona il modo in cui reagisce il sistema immunitario a successive esposizioni a patogeni ha portato allo studio del fenomeno chiamato "*peccato antigenico originale*" o "imprinting immunologico", descritto per la prima volta negli anni '40 e rimasto inspiegabile fino a tempi recenti, fino a quando ha trovato una spiegazione logica nella massiccia condivisione di peptidi tra i patogeni infettivi e l'ospite umano.

- *Infatti, secondo Kanduc e Shoenfeld²⁰⁶, le risposte immunitarie preesistenti contro i determinanti immunitari di un primo patogeno possono essere potenziate da una successiva esposizione agli stessi determinanti immunitari identici presenti in un secondo patogeno simile o diverso. Ciò significa che la risposta primaria a un patogeno si trasforma in una risposta secondaria a un patogeno diverso incontrato in precedenza.*

Una risposta secondaria anamnestic, ad alta avidità, alta affinità e quantitativamente anormale viene scatenata contro il patogeno sensibilizzante precedente non più presente nell'organismo, mentre nessuna risposta immunitaria viene suscitata contro il patogeno incontrato per ultimo in seguito all'infezione o all'immunizzazione attiva.

Tradotto nel processo di maturazione immunologica, gli incontri immunogenici durante i primi anni di vita di un individuo formano un modello di risposte immunitarie (che a livello cellulare corrispondono ad un insieme di linfociti reattivi) che determineranno, controlleranno e domineranno il sistema immunitario nell'età adulta.

Tale imprinting precoce o "memoria immunologica" si fissa saldamente nel sistema immunitario precoce dell'individuo e non può essere dimenticato, condizionando le future risposte immunitarie nell'organismo adulto, e durante qualsiasi infezione o immunizzazione attiva, il sistema immunitario darà la priorità alla produzione di linfociti reattivi contro i determinanti immunitari già incontrati.

- *Questo può spiegare perché gli sforzi per attivare la popolazione linfocitaria al fine di proteggere con immunizzazioni attive sono destinati a rimanere fallimentari.²⁰⁷*

Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Mar 5;93(5):2019-24. doi: 10.1073/pnas.93.5.2019.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC39902/>

²⁰⁶ Kanduc, Darja & Shoenfeld, Yehuda
Inter-Pathogen Peptide Sharing and the Original Antigenic Sin: Solving a Paradox.
The Open Immunology Journal (2018). 08. 16-27. 10.2174/1874226201808010016.
https://cdn.onb.it/2018/10/Kanduc_Shoenfeld-2018.pdf
http://www.onb.it/wp-content/uploads/2018/10/Kanduc_Shoenfeld_tradClaudioAndreini.pdf

²⁰⁷ Ladhani S., Heath P.T., Slack M.P. et al.,
Haemophilus influenzae serotype b conjugate vaccine failure in twelve countries with established national childhood immunization programmes,
Clin. Microbiol. Infect., 16 (2010), 948-954. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02945.x>
[https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(14\)61756-0/fulltext](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(14)61756-0/fulltext)

Mahalingam S., Herring B.L., Halstead S.B.,
Call to action for dengue vaccine failure,
Emerg. Infect. Dis., 19 (2013), 1335-1337. <https://doi.org/10.3201/eid1908.121864>
https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/19/8/12-1864_article

Ramsay M., Brown K.,
The public health implications of secondary measles vaccine failure,
J. Prim. Health Care, 5 (2013), 92. <https://doi.org/10.1071/hc13092>
<https://www.publish.csiro.au/hc/pdf/HC13092>

Queste evidenze sottolineano la necessità di rivedere i meccanismi che governano le risposte immunitarie alla luce della vasta condivisione di peptidi inter- e intra-proteomici tra le entità microbiche e le proteine umane.

Secondo l'autore, questi dati indicano che non esiste la selezione negativa a priori dei linfociti autoreattivi secondo Burnet, ma piuttosto avviene una selezione positiva a posteriori dei linfociti reattivi quale meccanismo che guida la memoria alla base della maturazione e attività del sistema immunitario.

RICONOSCIMENTO DEGLI ANTIGENI DA PARTE DEI LINFOCITI T E B

I linfociti T e B hanno il recettore per l'antigene strutturalmente correlato e codificato da una famiglia di geni simili (supergene family). Nonostante questo, il loro meccanismo di riconoscimento antigenico varia considerevolmente.

Una prima differenza è data dal fatto che il linfocita T riconosce il determinante antigenico associato a molecole codificate dall'MHC sulla superficie di cellule accessorie, mentre il linfocita B riconosce il solo determinante antigenico e non richiede strettamente la presenza di una cellula accessoria.

I linfociti T, a differenza dei B, per riconoscere l'antigene su di una cellula accessoria richiedono che l'antigene sia processato o degradato o, come più recentemente dimostrato, sia almeno modificata la sua conformazione.

Una differenza che ne consegue è che il linfocita T, a differenza del B, non discrimina tra conformazioni native e denaturate dell'antigene.

<https://mainebiotechnology.com/antigen-presentation-gift-keeps-giving/>

Esistono tre tipi principali di recettori immunitari che hanno lo scopo specifico di legare gli antigeni proteici: recettori delle cellule B (e anticorpi), recettori delle cellule T e Complesso Maggiore di istocompatibilità (MHC). Le cellule T hanno un recettore delle cellule T (TCR) che è strutturalmente correlato a un BCR, ma a differenza dei BCR, i TCR non interagiscono con gli antigeni nativi. Piuttosto i TCR hanno antigeni presentati da MHC come un frammento peptidico (epitopo TCR) e riconoscono specificamente sia l'MHC che il peptide. L'MHC mostra il frammento del peptide nel contesto che è riconoscibile per il TCR per interagire con l'epitopo. Pertanto, gli antigeni proteici devono essere digeriti, elaborati e legati da MHC per essere presentati ai linfociti T. MHC I presenterà antigeni intracellulari e MHC II presenterà antigeni extracellulari. In entrambi i casi, gli antigeni vengono elaborati e legati dall'MHC e il complesso peptidico antigene-MHC viene visualizzato sulla superficie della cellula per consentire la sorveglianza delle cellule T. Tutte le cellule nucleate hanno la capacità di elaborare proteine intracellulari (antigeni) e presentare i peptidi attraverso MHC I sulla superficie della cellula. Una popolazione definita di cellule, chiamate cellule presentanti l'antigene (APC), ha la capacità di importare antigeni extracellulari, trasformarli in peptidi e presentarli tramite molecole MHC II sulla loro superficie cellulare.

Michael A, Picker L.J., Moore J.P., Burton D.R.,
Another HIV vaccine failure: where to next?
Nat. Med., 19 (2013), 1576-1577. <https://doi.org/10.1038/nm.3413>
<https://www.nature.com/articles/nm.3413>

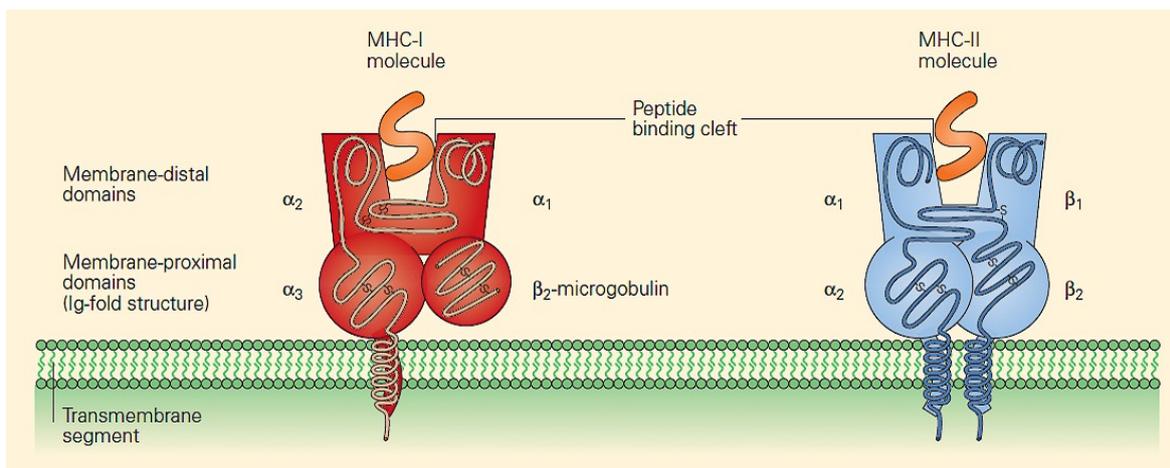
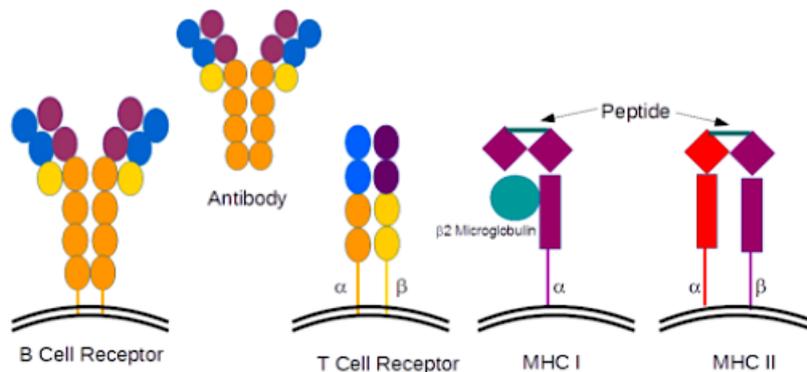
Cherry J.D.,
Epidemic pertussis and acellular pertussis vaccine failure in the 21st century,
Pediatrics, 135 (2015), 1130-1132. <https://doi.org/10.1542/peds.2014-4118>
<https://escholarship.org/uc/item/3q93v54z>

Lopez-Lacort M., Collado S., Díez-Gandía A., Díez-Domingo J.,
Rotavirus, vaccine failure or diagnostic error?
Vaccine, 34 (2016), 5912-5915. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.10.032>
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X16309537?via%3Dihub>

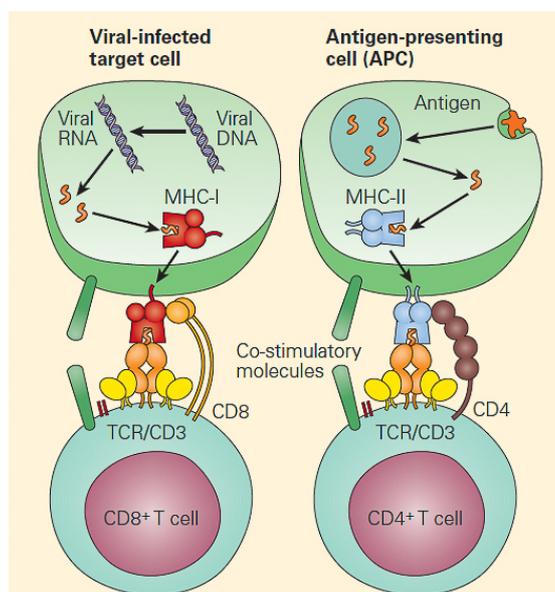
Wiedermann U., Garner-Spitzer E., Wagner A.,
Primary vaccine failure to routine vaccines: Why and what to do?
Hum. Vaccin, Immunother, 12 (2016), 239-243. <https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1093263>
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21645515.2015.1093263>

Poland G.A.,
Influenza vaccine failure: failure to protect or failure to understand?
Expert Rev. Vaccines, 17 (2018), 495-502. <https://doi.org/10.1080/14760584.2018.1484284>
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14760584.2018.1484284>

Masters N.B., Wagner A.L., Ding Y., Zhang Y., Boulton M.L.,
Assessing measles vaccine failure in Tianjin, China,
Vaccine, 37 (2019), 3251-3254. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.05.005>
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X19305985?via%3Dihub>



<https://www.immunopaedia.org.za/immunology/basics/4-mhc-antigen-presentation/>



<https://www.immunopaedia.org.za/immunology/basics/4-mhc-antigen-presentation/>

Gli antigeni endogeni sono generalmente presentati alle cellule T CD8⁺ (pannello di sinistra) e gli antigeni esogeni sono generalmente presentati alle cellule T CD4⁺ (pannello di destra).

I linfociti T, e più precisamente il loro recettore, riconoscono una sequenza lineare di aminoacidi (circa 5-12 aminoacidi della struttura primaria di una proteina) presenti in una struttura secondaria (alfa elica).

Al contrario, i linfociti B, o più propriamente il loro recettore immunoglobulinico, legano sia sequenze di aminoacidi primarie o secondarie (sequenziali) che sequenze terziarie (conformazionali).

Ulteriori analisi utilizzando peptidi sintetici hanno dimostrato che i linfociti T riescono a discriminare differenze al livello anche di un solo aminoacido.

Questa grande specificità dei linfociti T di discriminare pochi aminoacidi viene ulteriormente aumentata dall'associazione con le molecole MHC: per esempio è stato osservato che la sostituzione di un singolo

amminoacido sulla catena alfa di DR (una molecola di MHC di classe II umana) altera il riconoscimento associativo. Ciò dimostra la fine specificità discriminativa del recettore del linfocita T e dà un'idea della variabilità del suo repertorio recettoriale.

Quando il sistema immunitario incontra un antigene T-dipendente convenzionale, solo una piccola frazione (1 su 10^4 - 10^5) della popolazione di cellule T è in grado di riconoscere l'antigene e attivarsi (risposta monoclonale/oligoclonale). Tuttavia, ci sono alcuni antigeni che attivano in maniera policlonale una grande frazione delle cellule T (fino al 25%) chiamati **superantigeni**.

Il primo passaggio per stimolare le risposte adattative richiede la corretta cattura, elaborazione e visualizzazione degli antigeni ai linfociti da parte delle cellule presentanti l'antigene (APC).

Le cellule dendritiche (DC) rappresentano il tipo di cellula più specializzato in questo senso: catturano antigeni da un ambiente esterno per presentarli, negli organi linfoidi secondari, a cellule T naïve.

Altri tipi di cellule possono agire come APC in diversi stadi della risposta immunitaria (ad esempio macrofagi e cellule B).

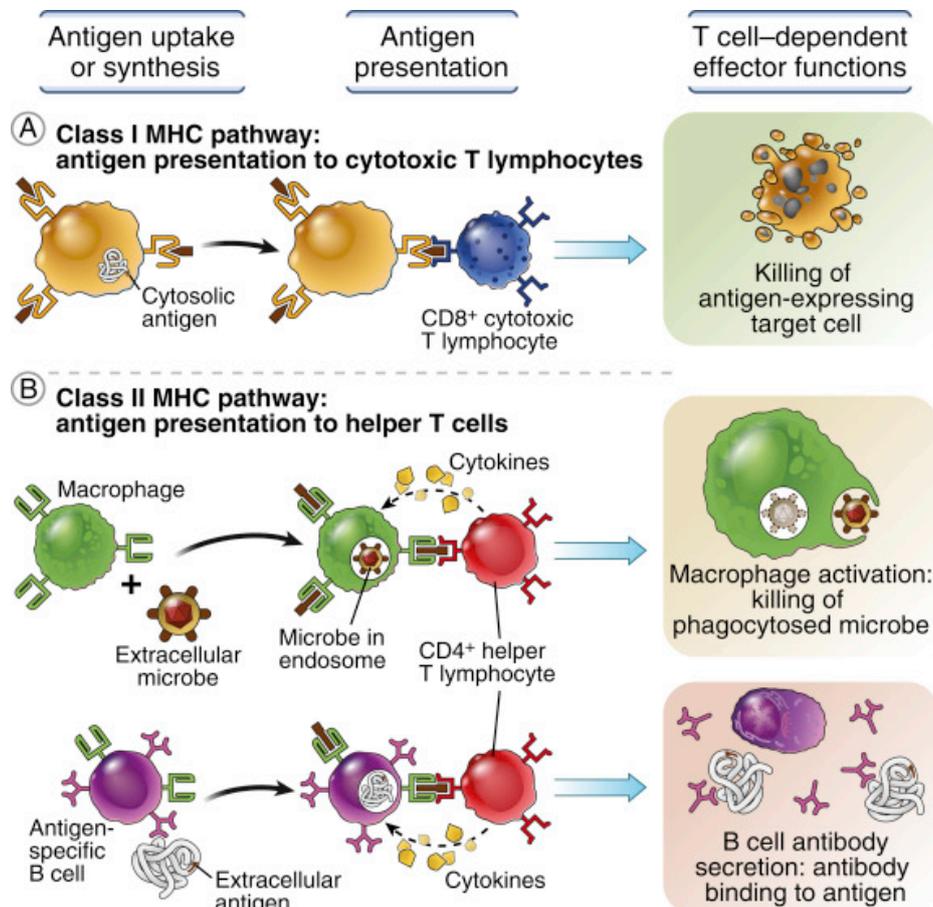
La cattura dei microbi e la successiva digestione delle loro proteine è seguita dall'espressione superficiale di peptidi microbici (≈ 10 residui di amminoacidi) in associazione con le molecole MHC.

I meccanismi di elaborazione dell'antigene sono predisposti per generare frammenti peptidici adatti alla loro co-espressione con le molecole MHC sulla superficie cellulare.

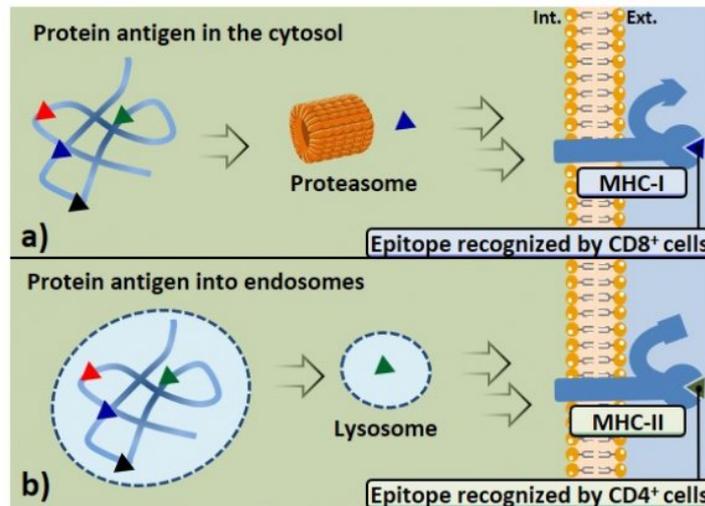
La presentazione MHC di antigeni sia del self che estranei, consente al sistema immunitario di prevenire il targeting delle proprie cellule e il riconoscimento di cellule infette o mutate.

Gli epitopi ottenuti dalla via MHC-I interagiranno con i linfociti che esprimono CD8 (Figura a).

Gli antigeni che subiscono l'internalizzazione dall'ambiente extracellulare attraverso le vescicole degli APC sono generalmente processati in endo-lisosomi; questa via porta all'espressione di epitopi peptidici sulle molecole MHC-II, che sono riconosciute dalle cellule $CD4^+$ (Figura b).



<https://basicmedicalkey.com/antigen-capture-and-presentation-to-lymphocytes-what-lymphocytes-see/>



<http://www.glycopedia.eu/e-chapters/Overview-of-Immune-Responses-A-Primer-72/Antigen-presentation>

Vie di elaborazione e presentazione degli antigeni proteici. a) Via MHC-I. b) Via MHC-II. È interessante osservare che se la stessa proteina passa attraverso percorsi diversi, l'epitopo peptidico associato a MHC risultante potrebbe essere diverso in termini di sequenza peptidica

Le cellule presentanti l'antigene come i macrofagi, ma soprattutto le DC, esprimono diversi recettori di superficie (PRR) in grado di riconoscere strutture condivise da molti patogeni (PAMP); questi recettori possono legare e interiorizzare in modo efficiente una grande varietà di antigeni, promuovendo così la loro presentazione sulle MHC di classe II. Anche le cellule B attraverso i suoi recettori di superficie (BCR) possono anche essere ascritte tra le APC.²⁰⁸

Intrinsic and extrinsic danger signals and outcomes*			
Condition:	Infectious inflammation	"Sterile" inflammation	* Abbreviations: PAMPs: Pathogen associated molecular patterns DAMPs: Danger associated molecular patterns PRRs: Pattern recognition receptors TLRs: Toll-like receptors NOD-like receptors: Nucleotide oligomerization domain (NOD) receptors (NLRs) NLRPs: NOD-like receptor proteins
Signals:	PAMPs	DAMPs (including alarmins)	
Sources:	Extrinsic	Endogenous	
Targets:	TLRs	NOD receptors (NLRPs)	
Location:	Cell surface	Cytosol	
Examples of ligands or factors:	LPS Lipoteicoic acid CpG-DNA Flagellin Poly IC	Heat shock proteins Uric acid crystals Hyaluronin Heparin sulfate Defensins Cathepsin G HMGB1	
Responses:	Proinflammatory mediator production Complement activation		

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3531600/>

I segnali intrinseci (DAMP) ed estrinseci (PAMP) si sviluppano durante una condizione infettiva (ad es. polmonite batterica) che causa infiammazione e sepsi che è spesso associata allo sviluppo di SIRS, all'accumulo di ROS e RNS nei tessuti, insufficienza multiorgano (MOF) e letalità. I recettori (PRR) per questi segnali coinvolgono sia i TLR che i recettori simili a NOD. L'elenco dei ligandi che interagiscono con TLR e recettori NOD è in qualche modo artificiale. Ad esempio, mentre HMGB1 (considerato un DAMP) interagisce con TLR4, interagisce anche con TLR2 e con il recettore per i prodotti di glicazione avanzata (RAGE). Le proteine da shock termico (DAMP) reagiscono con TLR2, TLR4 e con i recettori sulle cellule presentanti l'antigene (CD36, un recettore scavenger). L'infiammazione "sterile" si verifica dopo shock emorragico, politrauma, ischemia / ri-perfusione e di solito non è associata alla presenza di un agente infettivo. In tutti i casi, sembra che si verifichi la stessa cascata di eventi a valle.

Le DC trasportano il carico antigenico ai linfonodi drenanti, dove le cellule T naïve ricircolano, aumentando la probabilità della loro interazione. Secondo l'**ipotesi della selezione clonale**²⁰⁹ anche prima dell'esposizione

²⁰⁸ Ward PA.

New approaches to the study of sepsis.

EMBO Mol Med. 2012;4(12):1234-1243. doi:10.1002/emmm.201201375

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3531600/>

²⁰⁹ Cohn M, Mitchison NA, Paul WE, Silverstein AM, Talmage DW, Weigert M.

agli antigeni, esiste un gran numero di linfociti con specificità differenti per un pannello di antigeni negli organi linfoidei secondari; ogni linfocita (e la sua progenie) con una specificità comune è indicato come un clone. A maturazione si osserva l'espansione dei cloni che meglio interagiscono con l'antigene, aumentando l'entità dell'azione e l'efficacia della risposta.

Tale ipotesi di selezione andrà rivista alla luce del nuovo paradigma sull'idrofobicità discusso sopra e del concetto di olobionte, in relazione sia allo sviluppo dell'immunosoppressione/autoimmunità ma anche alla progettazione dei vaccini.²¹⁰

Infatti, la produzione di anticorpi mirati ad epitopi immunogenici vaccinali progettati sulla base della teoria della selezione clonale classica potrebbe spiegare l'insorgenza di reazioni avverse su base autoimmune a carico sia delle cellule eucariote che del microbiota.

I vaccini contro il SARS-CoV-2 sono stati in gran parte realizzati a partire da uno studio bioinformatico approfondito degli epitopi immunogeni sia per valutarne il mimetismo molecolare (vedi di seguito) che per predirne la potenziale capacità protettiva. Si rimanda alla letteratura citata per un approfondimento delle metodiche e risultati ottenuti.²¹¹

Reflections on the clonal-selection theory.
Nat Rev Immunol. 2007 Oct;7(10):823-30. doi: 10.1038/nri2177.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17893695/>

Chen, Jun. (2021). Biologically Inspired Optimisation Algorithms for Transparent Knowledge Extraction Allied to Engineering Materials Processing.
https://www.researchgate.net/publication/42424453_Biologically_Inspired_Optimisation_Algorithms_for_Transparent_Knowledge_Extraction_Allied_to_Engineering_Materials_Processing

²¹⁰ Segal Y, Shoenfeld Y.
Vaccine-induced autoimmunity: the role of molecular mimicry and immune crossreaction.
Cell Mol Immunol. 2018;15(6):586-594. doi:10.1038/cmi.2017.151
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6078966/>

Rojas Met al
Molecular mimicry and autoimmunity.
J Autoimmun. 2018 Dec;95:100-123. doi: 10.1016/j.jaut.2018.10.012. Epub 2018 Oct 26.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896841118305365?via%3Dihub>

²¹¹ Tahir Ul Qamar M et al
Reverse vaccinology assisted designing of multiepitope-based subunit vaccine against SARS-CoV-2.
Infect Dis Poverty. 2020 Sep 16;9(1):132. doi: 10.1186/s40249-020-00752-w.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7492789/>

Baruah V, Bose S.
Immunoinformatics-aided identification of T cell and B cell epitopes in the surface glycoprotein of 2019-nCoV.

J Med Virol. 2020;92(5):495-500. doi:10.1002/jmv.25698
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7166505/>

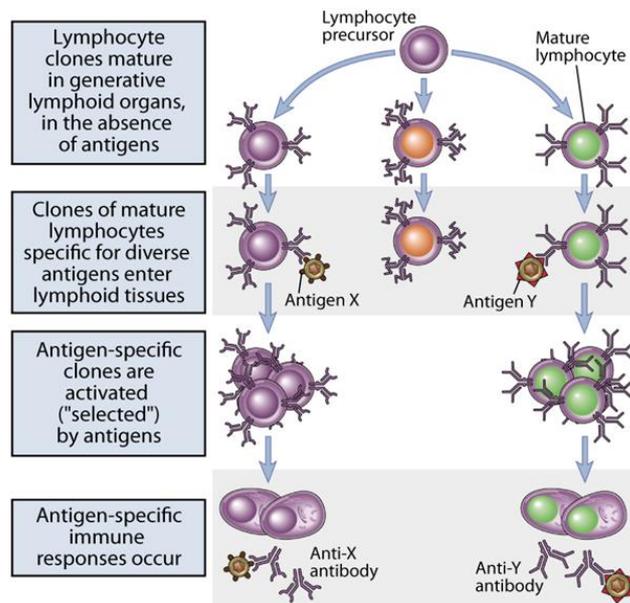
Chen Z, Ruan P, Wang L, Nie X, Ma X, Tan Y.
T and B cell Epitope analysis of SARS-CoV-2 S protein based on immunoinformatics and experimental research.
J Cell Mol Med. 2020 Dec 15. doi: 10.1111/jcmm.16200.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/jcmm.16200>

Ashik AI, Hasan M, Tasnim AT, Chowdhury MB, Hossain T, Ahmed S.
An immunoinformatics study on the spike protein of SARS-CoV-2 revealing potential epitopes as vaccine candidates.
Heliyon. 2020 Sep;6(9):e04865. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e04865. Epub 2020 Sep 4.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7472982/>

Poran A et al
Sequence-based prediction of SARS-CoV-2 vaccine targets using a mass spectrometry-based bioinformatics predictor identifies immunogenic T cell epitopes.
Genome Med. 2020 Aug 13;12(1):70. doi: 10.1186/s13073-020-00767-w.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7425796/>

Kim A et al
Divergent paths for the selection of immunodominant epitopes from distinct antigenic sources.
Nat Commun. 2014 Nov 21;5:5369. doi: 10.1038/ncomms6369.
<https://www.nature.com/articles/ncomms6369>

Dar HA, Waheed Y, Najmi MH, et al.
Multiepitope Subunit Vaccine Design against COVID-19 Based on the Spike Protein of SARS-CoV-2: An In Silico Analysis.



https://biology-forums.com/gallery/5195_05_08_11_11_28_29.jpeg

IMMUNOTOLLERANZA, AUTOIMMUNITÀ E L'OLOBIONTE

Pur non essendo di pertinenza di questo approfondimento, vale la pena ricordare che gli studi sul microbioma e il virobioma stanno consolidando sempre di più il concetto che batteri, virus e cellule eucariote interagiscono tra loro secondo un equilibrio dinamico e simbiotico definito **olobionte** (l'olobioma è la somma totale dei genomi componenti in un organismo eucariotico; comprende il genoma di un singolo membro di un dato taxon (il genoma dell'ospite) e il microbioma (i genomi del microbiota simbiotico ²¹²)).

Ciò significa che anche il concetto classico della funzione del sistema immunitario di discriminare tra il sé (antigeni/immunogeni prodotti dalle cellule eucariote) e il non sé (antigeni/immunogeni prodotti agenti patogeni estranei) sta per essere superato. ²¹³

J Immunol Res. 2020;2020:8893483. Published 2020 Nov 19. doi:10.1155/2020/8893483
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7678744/>

Abd Albagi SO, Al-Nour MY, Elhag M, et al.

A multiple peptides vaccine against COVID-19 designed from the nucleocapsid phosphoprotein (N) and Spike Glycoprotein (S) via the immunoinformatics approach.

Inform Med Unlocked. 2020;21:100476. doi:10.1016/j.imu.2020.100476

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7654333/>

²¹² Guerrero R, Margulis L, Berlanga M.

Symbiogenesis: the holobiont as a unit of evolution.

Int Microbiol. 2013 Sep;16(3):133-43. doi: 10.2436/20.1501.01.188.

<http://revistes.iec.cat/index.php/IM/article/viewFile/74108/73862>

²¹³ Postler TS, Ghosh S.

Understanding the Holobiont: How Microbial Metabolites Affect Human Health and Shape the Immune System.

Cell Metab. 2017;26(1):110-130. doi:10.1016/j.cmet.2017.05.008

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5535818/>

Thomas-Vaslin V.

Individuation and the Organization in Complex Living Ecosystem: Recursive Integration and Self-assertion by Holon-Lymphocytes.

Acta Biotheor. 2020 Mar;68(1):171-199. doi: 10.1007/s10441-019-09364-w. Epub 2019 Sep 20.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31541308/>

Gilbert SF, Sapp J, Tauber AI.

A symbiotic view of life: we have never been individuals.

Q Rev Biol. 2012 Dec;87(4):325-41. doi: 10.1086/668166.

<https://works.swarthmore.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1164&context=fac-biology>

Gilbert SF.

Symbiosis as the way of eukaryotic life: the dependent co-origination of the body.

J Biosci. 2014 Apr;39(2):201-9. doi: 10.1007/s12038-013-9343-6.

<https://www.ias.ac.in/article/fulltext/jbsc/039/02/0201-0209>

Un'interessante ipotesi suggerisce che il mimetismo molecolare ²¹⁴, una condizione in cui diversi organismi condividono antigeni comuni, è un meccanismo per stabilire la tolleranza tra i commensali e i loro ospiti (**olo-immunità**). ²¹⁵

***mimetismo molecolare:** è uno dei principali meccanismi mediante i quali agenti infettivi o chimici possono indurre l'autoimmunità. Si verifica quando le somiglianze tra peptidi estranei e auto-peptidi favoriscono un'attivazione di cellule T o B autoreattive da parte di un antigene di derivazione estranea in un individuo suscettibile. Tuttavia, è improbabile che il mimetismo molecolare sia l'unico meccanismo alla base delle risposte autoimmuni; altri fattori come la violazione della tolleranza centrale, l'attivazione aspecifica da parte delle cellule spettatrici, o stimoli antigenici persistenti possono contribuire allo sviluppo di malattie autoimmuni. La genetica dell'ospite, l'esposizione al microbiota e alle sostanze chimiche ambientali o a iatrogeni (farmaci e vaccini) sono ulteriori collegamenti alla nostra comprensione del mimetismo molecolare. ²¹⁶

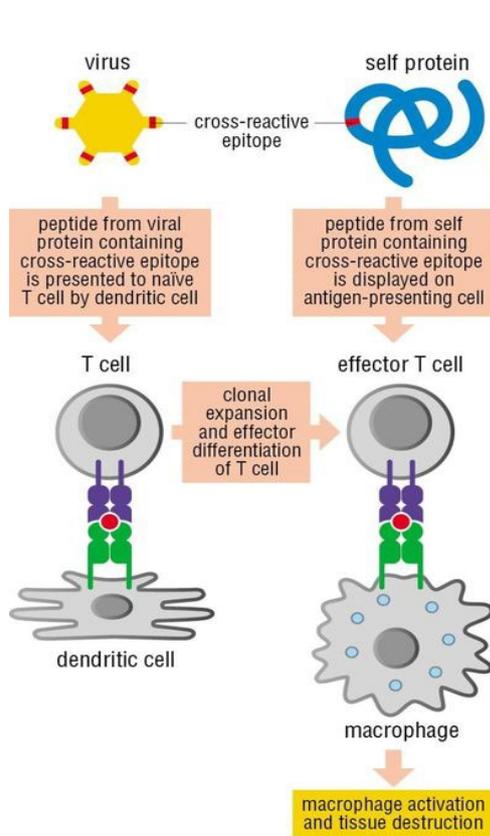


Fig. 1

<https://slideplayer.com/slide/16159576/>

Immune-Mediated Diseases and Autoimmunity

Fig. 1 Se c'è una reazione crociata tra l'antigene dell'agente infettivo e un componente del self, l'anticorpo a reazione crociata o le cellule T possono avviare la malattia autoimmune

Se una proteina virale e un'autoproteina contengono epitopi peptidici riconosciuti dalla stessa cellula T, la cellula T specifica del virus può attaccare non solo le cellule infettate dal virus ma anche le cellule non infettate che mostrano lo stesso auto-epitopo

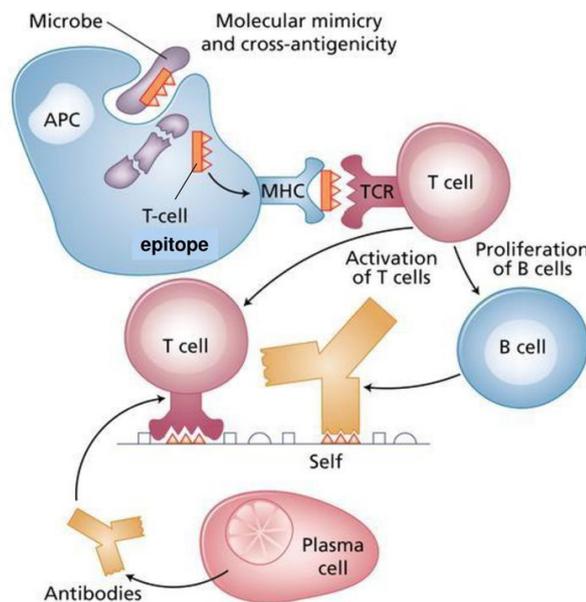


Fig. 2

Gilbert SF.
Evolutionary transitions revisited: Holobiont evo-devo.
J Exp Zool B Mol Dev Evol. 2019 Dec;332(8):307-314. doi: 10.1002/jez.b.22903. Epub 2019 Sep 29.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31565856/>

Triviño V, Suárez J.
Holobionts: Ecological communities, hybrids, or biological individuals? A metaphysical perspective on multispecies systems.
Stud Hist Philos Biol Biomed Sci. 2020 Dec;84:101323. doi: 10.1016/j.shpsc.2020.101323. Epub 2020 Aug 9.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32788054/>

²¹⁴ Fujinami RS, von Herrath MG, Christen U, Whitton JL.
Molecular mimicry, bystander activation, or viral persistence: infections and autoimmune disease.
Clin Microbiol Rev. 2006;19(1):80-94. doi:10.1128/CMR.19.1.80-94.2006
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1360274/>

²¹⁵ Land WG.
How evolution tells us to induce allotolerance.
Exp Clin Transplant. 2015 Apr;13 Suppl 1:46-54.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25894127/>

²¹⁶ Rojas Met al
Molecular mimicry and autoimmunity.
J Autoimmun. 2018 Dec;95:100-123. doi: 10.1016/j.jaut.2018.10.012. Epub 2018 Oct 26.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896841118305365?via%3Dihub>

Fig. 2 Nel mimetismo molecolare, gli antigeni della superficie cellulare di alcuni patogeni microbici assomigliano alle auto-proteine. Quando il sistema immunitario riconosce questi patogeni, le auto-proteine vengono attaccate dal "fuoco amico" (un caso di identità errata). La connessione tra "mal di gola" e malattie cardiache reumatiche è uno degli esempi più emblematici di tale antigenicità incrociata.

Le cellule del tessuto del sé possono essere indotte a esprimere il complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) quando stimolate con γ -interferone. Un rilascio eccessivo di citochine durante infezioni o infiammazioni può risvegliare le cellule T auto-tolleranti, una teoria in linea con le riattivazioni di malattie autoimmuni osservate dopo infezioni virali. APC: cellula che presenta l'antigene; TCR — Recettore delle cellule T.

Tale meccanismo può essere plausibile anche in seguito a vaccinazione

il mimetismo microbioma-ospite implica anche che da un lato l'autoimmunità diretta agli antigeni dell'ospite attaccherà anche i componenti del microbioma e, dall'altro che un attacco immunologico al microbioma può reagire in modo crociato con gli antigeni dell'ospite producendo "olo-autoimmunità". ²¹⁷

Anche la COVID-19 può essere inserita in questo contesto in quanto tra le sue manifestazioni cliniche c'è un'ampia casistica di malattie autoimmuni, in conseguenza di un processo autoimmune dovuto al mimetismo molecolare tra SARS-Cov-2 e proteine umane. ²¹⁸

²¹⁷ Root-Bernstein R.

Autoimmunity and the microbiome: T-cell receptor mimicry of "self" and microbial antigens mediates self-tolerance in holobionts: The concepts of "holoimmunity" (TcR-mediated tolerance for the holobiont) and "holoautoimmunity" (loss of tolerance for the holobiont) are introduced.

Bioessays. 2016;38(11):1068-1083. doi:10.1002/bies.201600083

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7161894/>

Swiatczak B, Tauber AI.

Holoimmunity Revisited.

Bioessays. 2018 Nov;40(11):e1800117. doi: 10.1002/bies.201800117. Epub 2018 Sep 28.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30264468/>

Root-Bernstein, Robert.

A General Theory of Autoimmune Disease Causation: Integrating Innate and Adaptive Immunity, Altered Antigen Processing, Sex and Genetic Predispositions, and Microbiome Effects.

Preprints (2019). 10.13140/RG.2.2.14654.54089.

https://www.researchgate.net/publication/333481656_A_General_Theory_of_Autoimmune_Disease_Causation_Integrating_Innate_and_Adaptive_Immunity_Altered_Antigen_Processing_Sex_and_Genetic_Predispositions_and_Microbiome_Effects

Root-Bernstein R.

Synergistic Activation of Toll-Like and NOD Receptors by Complementary Antigens as Facilitators of Autoimmune Disease: Review, Model and Novel Predictions. Int J Mol Sci. 2020;21(13):4645. Published 2020 Jun 30. doi:10.3390/ijms21134645

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7369971/>

²¹⁸ Halpert G, Shoenfeld Y. SARS-CoV-2, the autoimmune virus.

Autoimmun Rev. 2020;19(12):102695. doi:10.1016/j.autrev.2020.102695

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7598743/>

Kanduc D, Shoenfeld Y.

On the molecular determinants of the SARS-CoV-2 attack.

Clin Immunol. 2020;215:108426. doi:10.1016/j.clim.2020.108426

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7165084/>

Kanduc D.

From Anti-SARS-CoV-2 Immune Responses to COVID-19 via Molecular Mimicry.

Antibodies (Basel). 2020;9(3):33. Published 2020 Jul 16. doi:10.3390/antib9030033

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7551747/>

Kanduc D, Shoenfeld Y.

Molecular mimicry between SARS-CoV-2 spike glycoprotein and mammalian proteomes: implications for the vaccine.

Immunol Res. 2020;68(5):310-313. doi:10.1007/s12026-020-09152-6

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7499017/>

Vojdani A, Kharrazian D.

Potential antigenic cross-reactivity between SARS-CoV-2 and human tissue with a possible link to an increase in autoimmune diseases.

Clin Immunol. 2020;217:108480. doi:10.1016/j.clim.2020.108480

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7246018/>

Ehrenfeld M, Tincani A, Andreoli L, et al.

Covid-19 and autoimmunity.

Autoimmun Rev. 2020;19(8):102597. doi:10.1016/j.autrev.2020.102597

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7289100/>

Angileri F, Legare S, Marino Gammazza A, Conway de Macario E, JI Macario A, Cappello F.

Molecular mimicry may explain multi-organ damage in COVID-19.

Autoimmun Rev. 2020;19(8):102591. doi:10.1016/j.autrev.2020.102591

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7289093/>

Cappello F, Gammazza AM, Dieli F, de Macario, Macario AJ.

TIPOLOGIA DI VACCINI A SUBUNITA'

I **vaccini a subunità** contengono frammenti di proteine e/o polisaccaridi del patogeno, che sono stati attentamente studiati per identificare quali combinazioni di queste molecole possono produrre una risposta immunitaria forte ed efficace. Tali vaccini sono ritenuti più sicuri, relativamente economici e facili da produrre e più stabili di quelli contenenti virus o batteri interi.²¹⁹

Uno svantaggio di questa precisione è che gli antigeni utilizzati per suscitare una risposta immunitaria possono mancare dei PAMPs. Queste strutture vengono lette dalle cellule immunitarie e riconosciute come segnali di pericolo, quindi la loro assenza può provocare una risposta immunitaria più debole.

Inoltre, poiché gli antigeni non infettano le cellule, i vaccini a subunità innescano principalmente solo risposte immunitarie mediate da anticorpi. Ancora una volta, questo significa che la risposta immunitaria potrebbe essere più debole rispetto ad altri tipi di vaccini.

Per superare questo problema, i vaccini a subunità vengono talvolta somministrati insieme agli adiuvanti (agenti che stimolano il sistema immunitario) e possono essere necessarie dosi di richiamo.

Tutti i vaccini delle subunità sono realizzati utilizzando organismi viventi, come batteri e lieviti, che richiedono substrati su cui coltivarli e un'igiene rigorosa per evitare la contaminazione con altri microorganismi. Di seguito si riporta come esempio lo schema della linea produttiva per il vaccino antinfluenzale:²²⁰

Does SARS-CoV-2 Trigger Stress-Induced Autoimmunity by Molecular Mimicry? A Hypothesis.
J Clin Med. 2020;9(7):2038. Published 2020 Jun 29. doi:10.3390/jcm9072038
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7408943/>

Venkatakrishnan, et al.
Benchmarking evolutionary tinkering underlying human-viral molecular mimicry shows multiple host pulmonary-arterial peptides mimicked by SARS-CoV-2.
Cell Death Discov. 6, 96 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41420-020-00321-y>
<https://www.nature.com/articles/s41420-020-00321-y>

Lucchese, G., Flöel, A.
SARS-CoV-2 and Guillain-Barré syndrome: molecular mimicry with human heat shock proteins as potential pathogenic mechanism.
Cell Stress and Chaperones 25, 731-735 (2020). <https://doi.org/10.1007/s12192-020-01145-6>
<https://link.springer.com/article/10.1007/s12192-020-01145-6>

Molecular Mimicry Map (3M) of SARS-CoV-2: Prediction of potentially immunopathogenic SARS-CoV-2 epitopes via a novel immunoinformatic approach
Hyunsu An, Jihwan Park
bioRxiv 2020.11.12.344424; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.11.12.344424>
<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.11.12.344424v1.full>

Lyons-Weiler J.
Pathogenic priming likely contributes to serious and critical illness and mortality in COVID-19 via autoimmunity.
J Transl Autoimmun. 2020 Apr 9;3:100051. doi: 10.1016/j.jtauto.2020.100051.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7142689/>

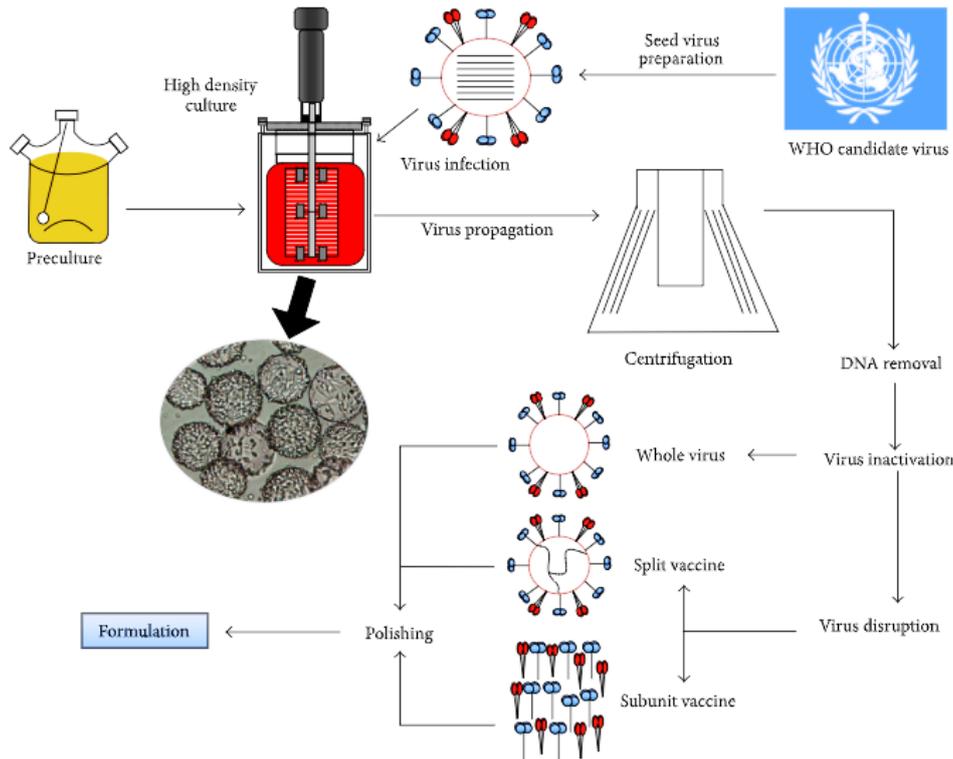
²¹⁹ Gupta V, Sengupta M, Prakash J, Tripathy BC.
Production of Recombinant Pharmaceutical Proteins.
Basic and Applied Aspects of Biotechnology. 2016;77-101. Published 2016 Oct 23. doi:10.1007/978-981-10-0875-7_4
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7120688/>

Vartak A, Suheck SJ.
Recent Advances in Subunit Vaccine Carriers.
Vaccines (Basel). 2016;4(2):12. Published 2016 Apr 19. doi:10.3390/vaccines4020012
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4931629/>

Production and delivery of recombinant subunit vaccines
<http://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:8775/FULLTEXT01.pdf>

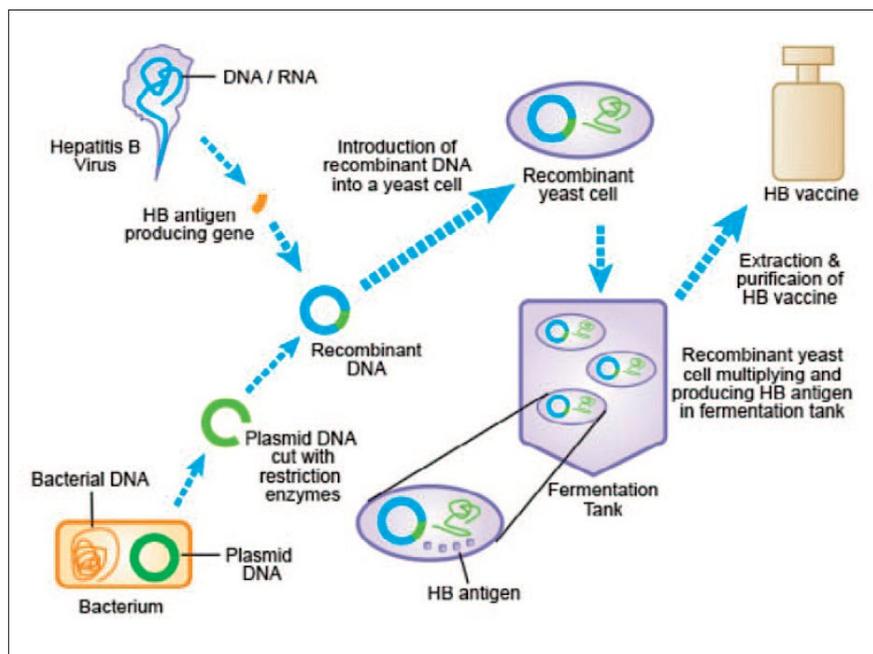
Hansson, M., Nygren, P.-Å., & Ståhl, S.
Design and production of recombinant subunit vaccines.
Biotechnology and Applied Biochemistry, (2000).32(2), 95. doi:10.1042/ba20000034
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11001870/>

²²⁰ Milián E, Kamen AA.



<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/504831/>

Il metodo di produzione dipende dal tipo di vaccino a subunità: i **vaccini a subunità proteica**, come il vaccino contro l'epatite B ricombinante, vengono prodotti inserendo il codice genetico dell'antigene in cellule di lievito, che sono relativamente facili da coltivare e in grado di sintetizzare grandi quantità di proteine. Il lievito viene coltivato in grandi serbatoi di fermentazione e poi lisato, consentendo la raccolta dell'antigene. Questa proteina purificata viene quindi aggiunta ad altri componenti del vaccino, come i conservanti per mantenerla stabile e gli adiuvanti per potenziare la risposta immunitaria, in questo caso alluminio adiuvante.



<https://www.ddw-online.com/creating-vaccines-drop-by-drop-1273-202008/>

Current and emerging cell culture manufacturing technologies for influenza vaccines.
Biomed Res Int. 2015;2015:504831. doi:10.1155/2015/504831
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4359798/>

rappresentazione schematica della produzione del vaccino anti epatite B. Un gene che produce l'antigene del virus dell'epatite B viene inserito in un vettore plasmidico batterico. Una cella di lievito viene quindi trasformata usando questo vettore e cresciuta in un reattore di fermentazione per produrre gli antigeni del l'epatite B, i quali vengono poi isolati e purificati per produrre il vaccino.

Per i **vaccini polisaccaridici o coniugati**, le tecnologie di produzione sono processi complessi e in più fasi. Nell'esempio riportato nella figura seguente del vaccino contro l'*Haemophilus influenzae* di tipo B comprendono:

- (i) la coltivazione separata di ceppi batterici che producono gli antigeni polisaccaridici e la proteina di trasporto,
- (ii) purificazione separata dell'antigene polisaccaridico e della proteina carrier,
- (iii) scissione chimica dei polisaccaridi LPS dal lipide A seguita da una seconda fase di purificazione,
- (iv) accoppiamento chimico dei polisaccaridi alla proteina vettore, e
- (v) una terza fase di purificazione per ottenere il prodotto finale.²²¹

Ad ogni passaggio si verificano perdite considerevoli e, a causa della natura casuale dell'accoppiamento chimico, i prodotti finali sono mal definiti.

I processi richiedono molto tempo e sono costosi e spesso è necessaria la coltivazione su larga scala di batteri patogeni per la biosintesi dei polisaccaridi, rendendo i vaccini coniugati troppo costosi per le campagne di vaccinazione nei paesi in via di sviluppo.

Sono quindi state messe a punto anche metodiche per la produzione degli antigeni coniugati in linee cellulari batteriche (tecnologia di accoppiamento proteina-glicano), che si basano su un sistema di N-glicosilazione del *Campylobacter jejuni*, che può essere espresso funzionalmente in *E. coli*, e sulla capacità di *E. coli* di sintetizzare polisaccaridi eterologhi sul suo vettore glicosil-lipidico.²²²

²²¹ <https://www.gavi.org/vaccineswork/what-are-protein-subunit-vaccines-and-how-could-they-be-used-against-covid-19>

Foged, Camilla. (2015). Subunit Vaccine Delivery.
https://www.researchgate.net/publication/269311879_Subunit_Vaccine_Delivery/citation/download

Berti F, Adamo R.
Antimicrobial glycoconjugate vaccines: an overview of classic and modern approaches for protein modification.
Chem Soc Rev. 2018 Dec 10;47(24):9015-9025. doi: 10.1039/c8cs00495a.
<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2018/cs/c8cs00495a>

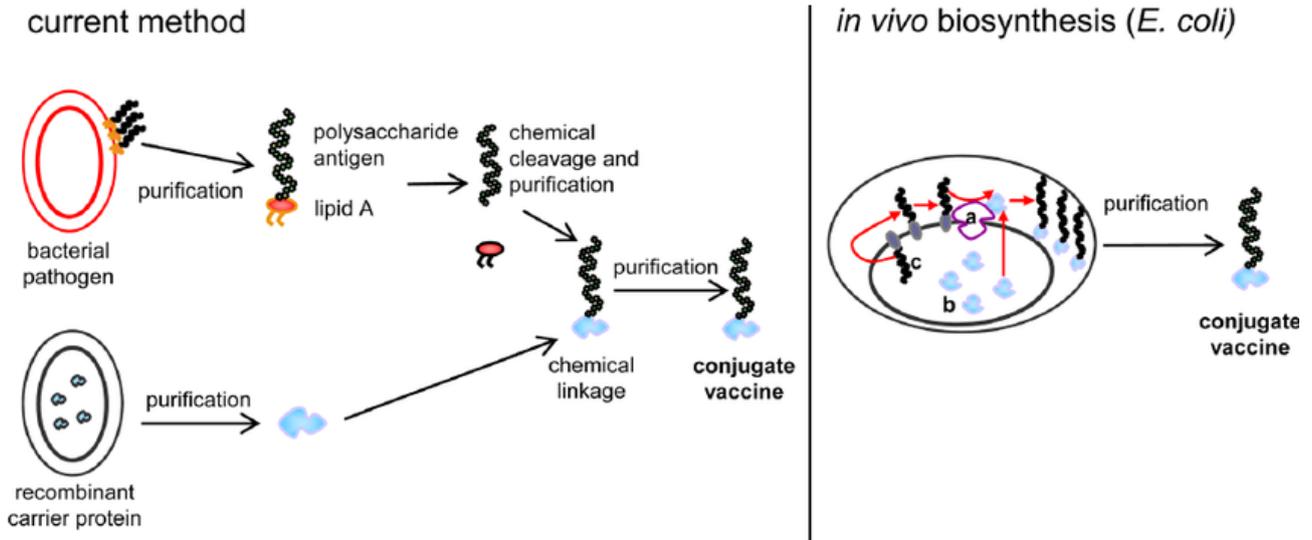
Lang S, Huang X.
Carbohydrate Conjugates in Vaccine Developments.
Front Chem. 2020;8:284. Published 2020 Apr 15. doi:10.3389/fchem.2020.00284
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7174737/>

²²² Ihssen J, Kowarik M, Dilettoso S, Tanner C, Wacker M, Thöny-Meyer L.
Production of glycoprotein vaccines in Escherichia coli.
Microb Cell Fact. 2010;9:61. Published 2010 Aug 11. doi:10.1186/1475-2859-9-61
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2927510/>

Feldman MF, Wacker M, Hernandez M, et al.
Engineering N-linked protein glycosylation with diverse O antigen lipopolysaccharide structures in Escherichia coli.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(8):3016-3021. doi:10.1073/pnas.0500044102
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC549450/>

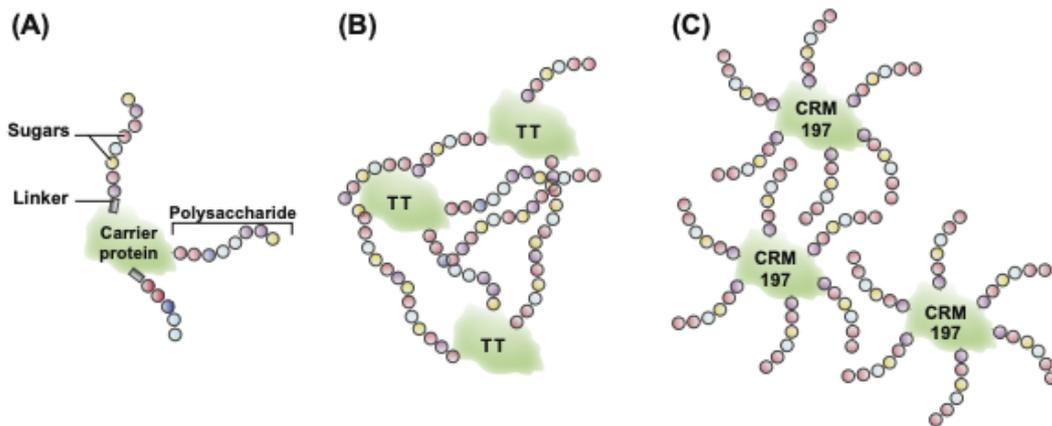
Yates LE, Mills DC, DeLisa MP.
Bacterial Glycoengineering as a Biosynthetic Route to Customized Glycomolecules.
Adv Biochem Eng Biotechnol. 2018 Aug 12. doi: 10.1007/10_2018_72.
<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/118224v1.full.pdf>

Chapter 14 - Vaccination,
Editor(s): Tak W. Mak, Mary E. Saunders, Bradley D. Jett, Primer to the Immune Response (Second Edition),
Academic Cell, 2014, Pages 333-375, ISBN 9780123852458, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385245-8.00014-5>.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123852458000145>



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2927510/>

Metodo attuale per la produzione di vaccini coniugati e biosintesi in vivo. a: oligosaccariltransferasi PglB, b: proteina vettore con sequenza segnale per la secrezione nel periplasma, c: polisaccaridi legati all'undecaprenilpirofosfato.



<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123852458000145>

Esempi di strutture di vaccini coniugati

(A) Gli antigeni polisaccaridici derivati da patogeni di varie lunghezze e composizioni zuccherine possono essere isolati da capsule batteriche e uniti direttamente o tramite molecole di collegamento a una proteina vettore per formare un vaccino coniugato. (B) Quando il tossoide tetanico (TT) viene utilizzato come proteina di trasporto, il collegamento casuale della proteina polisaccaride e la reticolazione tra le catene polisaccaridiche danno origine a una struttura coniugata non omogenea, a maglie, non ben definita. (C) Per formare una struttura coniugata più omogenea e ben definita, le catene polisaccaridiche possono essere collegate alla proteina di trasporto CRM197

CRITICITÀ DEI VACCINI A SUBUNITÀ PROTEICA

I vaccini a subunità inducono principalmente le cellule CD4⁺ T_H e le risposte anticorpali, pertanto, la maggior parte di questi vaccini contiene la proteina S del SARS-CoV-2 a lunghezza intera o parti di essa con l'obiettivo di indurre anticorpi neutralizzanti.

I vaccini a subunità possono essere progettati per focalizzare la risposta immunitaria verso epitopi neutralizzanti, per evitare la produzione di anticorpi non neutralizzanti che possono promuovere il potenziamento della malattia (ADE)²²³. Tuttavia, a differenza dei vaccini a base di acido nucleico o con vettori virali, le proteine S ricombinanti nei vaccini a subunità potrebbero avere una conformazione dell'epitopo impropria, a meno che non siano prodotte in cellule di mammifero²²⁴.

²²³ Oscherwitz J.

The promise and challenge of epitope-focused vaccines.

Hum Vaccin Immunother. 2016;12(8):2113-2116. doi:10.1080/21645515.2016.1160977

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4994726/>

²²⁴ Du L, Zhao G, Chan CC, Sun S, Chen M, Liu Z, Guo H, He Y, Zhou Y, Zheng BJ, Jiang S.

Recombinant receptor-binding domain of SARS-CoV spike protein expressed in mammalian, insect and E. coli cells elicits potent neutralizing antibody and protective immunity.

Le proteine o i peptidi da soli sono scarsamente immunogenici e generalmente richiedono non solo l'aggiunta di un adiuvante ma anche una somministrazione ripetuta, sono scarsi attivatori della risposta delle cellule T CD8⁺ e non si prestano per la vaccinazione della mucosa respiratoria.

Come nel caso dei vaccini virali inattivati, l'uso di alluminio come adiuvante altera la risposta immunitaria verso risposte simili a quelle indotte dalle cellule Th2 (immunopatologia eosinofila)²²⁵, che è indesiderabile per la difesa dell'ospite contro il SARS-CoV-2 e può avere un ruolo nel potenziamento della malattia²²⁶.

Per superare questa criticità i vaccini a subunità per la COVID-19 sviluppati da GlaxoSmithKline e Novavax utilizzano rispettivamente gli adiuvanti AS03 e Matrix-M²²⁷.

Name	Components	Receptor/pathway	Disease target tested in the clinic
Alum ^a	Aluminum salts (aluminum hydroxide, aluminum phosphate)	NLRP3 uric acid, DNA	Anthrax ^a , Diphtheria ^a , Tetanus ^a , Pneumococcus ^a , hepatitis A ^a , Hepatitis B ^a , Japanese Encephalitis ^a , Meningococcal B ^a and C ^a , human papillomavirus ^a , SARS, COVID-19
MF59 ^a , AS03 ^a	Oil-in-water emulsion squalene oil plus surfactants	MyD88, ASC, ATP	Influenza ^a , COVID-19
CpG 1018 ^a	Synthetic DNA alone or formulated with Alum	TLR9	Hepatitis B ^a , Malaria, Influenza, Anthrax, Cancer, COVID-19
Matrix M/IscoMatrix	Saponin	Unknown	Hepatitis C, Influenza, HSV, human papillomavirus, Malaria, Cancer, COVID-19
Advax	polysaccharide particle made from delta inulin	Unknown	HIV, Influenza, Hepatitis B, COVID-19

Virology. 2009 Oct 10;393(1):144-50. doi: 10.1016/j.virol.2009.07.018. Epub 2009 Aug 15. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2753736/>

²²⁵ Bolles M, Deming D, Long K, et al.

A double-inactivated severe acute respiratory syndrome coronavirus vaccine provides incomplete protection in mice and induces increased eosinophilic proinflammatory pulmonary response upon challenge.

J Virol. 2011;85(23):12201-12215. doi:10.1128/JVI.06048-11

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3209347/>

²²⁶ Diamond MS, Pierson TC.

The Challenges of Vaccine Development against a New Virus during a Pandemic.

Cell Host Microbe. 2020;27(5):699-703. doi:10.1016/j.chom.2020.04.021

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7219397/>

Del Giudice G, Rappuoli R, Didierlaurent AM.

Correlates of adjuvanticity: A review on adjuvants in licensed vaccines.

Semin Immunol. 2018 Oct;39:14-21. doi: 10.1016/j.smim.2018.05.001. Epub 2018 May 23.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044532318300514?via%3Dihub>

²²⁷ Jeyanathan M, Afkhami S, Smaill F, Miller MS, Lichty BD, Xing Z.

Immunological considerations for COVID-19 vaccine strategies.

Nat Rev Immunol. 2020;20(10):615-632. doi:10.1038/s41577-020-00434-6

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7472682/>

Pollet J, Chen WH, Strych U.

Recombinant protein vaccines, a proven approach against coronavirus pandemics

[published online ahead of print, 2021 Jan 7]. Adv Drug Deliv Rev. 2021;170:71-82. doi:10.1016/j.addr.2021.01.001

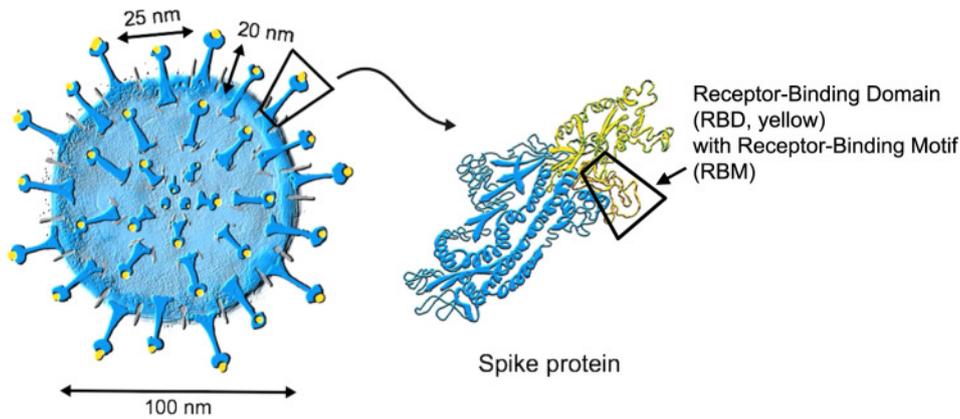
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7788321/>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7788321/>

Elenco degli adiuvanti utilizzati nella proteina ricombinante COVID-19 candidati al vaccino attualmente testati nella clinica.

Come è noto, il SARS-CoV-2 condivide un'ampia omologia di sequenza, nonché omologie strutturali e funzionali con precedenti coronavirus, vale a dire la SARS, e la MERS, ed è stato dimostrato che gli anticorpi anti-SARS contro la proteina S sono in grado di inibire il legame di SARS-CoV-2 con ACE-2.

Queste osservazioni hanno concentrato lo sviluppo del vaccino sugli antigeni derivati dalla proteina spike. Mentre alcuni gruppi si sono concentrati sull'intera subunità S1, altri utilizzano l'RBD come loro candidato antigene vaccinale primario.²²⁸



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7782831/>

Struttura di SARS-CoV-2.

I coronavirus prendono il nome dai tipici picchi costituiti dalla proteina spike (S) inserita nella membrana del doppio strato lipidico del virus. Il dominio di legame del recettore (RBD) e il suo motivo di legame al recettore (RBM) consentono l'interazione con il recettore della superficie cellulare ACE2 che media l'ingresso del virus nelle cellule ospiti. Questo può essere bloccato neutralizzando gli anticorpi. Pertanto, la maggior parte degli epitopi neutralizzanti si trova su RBD / RBM. Oltre alla proteina S, SARS-CoV-2 ha altre due proteine di superficie virali (non mostrate): involucro (E) e matrice (M).

Una ragione per concentrarsi sul RBD risiede nelle osservazioni con l'omologo vaccino contro la proteina S della SARS nei topi, realizzato dai Drs. Jiang e Tseng, che hanno riscontrato una patologia polmonare nei topi dovuta al potenziamento dipendente dall'anticorpo con la proteina S a lunghezza intera come antigene vaccinale, ma non con l'RBD.²²⁹ Nell'ADE, gli anticorpi presenti negli individui vaccinati favoriscono l'ingresso di particelle virali nella cellula ospite attraverso un meccanismo aggiuntivo che utilizza il recettore Fc gamma. In particolare, gli anticorpi non neutralizzanti che non interferiscono con il legame dell'RBD con l'ACE-2 potrebbero quindi aumentare il rischio di ADE.

Pertanto, la riduzione delle dimensioni dell'antigene per limitare l'esposizione ad epitopi non neutralizzanti potrebbe ridurre il rischio di immunopatologia indesiderata.

²²⁸ Lim HX, Lim J, Jazayeri SD, Poppema S, Poh CL.

Development of multi-epitope peptide-based vaccines against SARS-CoV-2

[published online ahead of print, 2020 Oct 1]. Biomed J. 2020;doi:10.1016/j.bj.2020.09.005

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7527307/>

Lin L, Ting S, Yufei H, Wendong L, Yubo F, Jing Z.

Epitope-based peptide vaccines predicted against novel coronavirus disease caused by SARS-CoV-2.

Virus Res. 2020;288:198082. doi:10.1016/j.virusres.2020.198082

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7328648/>

Bachmann MF, Mohsen MO, Zha L, Vogel M, Speiser DE.

SARS-CoV-2 structural features may explain limited neutralizing-antibody responses.

NPJ Vaccines. 2021;6(1):2. Published 2021 Jan 4. doi:10.1038/s41541-020-00264-6

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7782831/>

²²⁹ Tseng CT, Sbrana E et al.

Immunization with SARS coronavirus vaccines leads to pulmonary immunopathology on challenge with the SARS virus

[published correction appears in PLoS One. 2012;7(8). doi:10.1371/annotation/2965cfae-b77d-4014-8b7b-236e01a35492]. PLoS One.

2012;7(4):e35421. doi:10.1371/journal.pone.0035421

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3335060/>

Du L, He Y, Zhou Y, Liu S, Zheng BJ, Jiang S.

The spike protein of SARS-CoV-2--a target for vaccine and therapeutic development

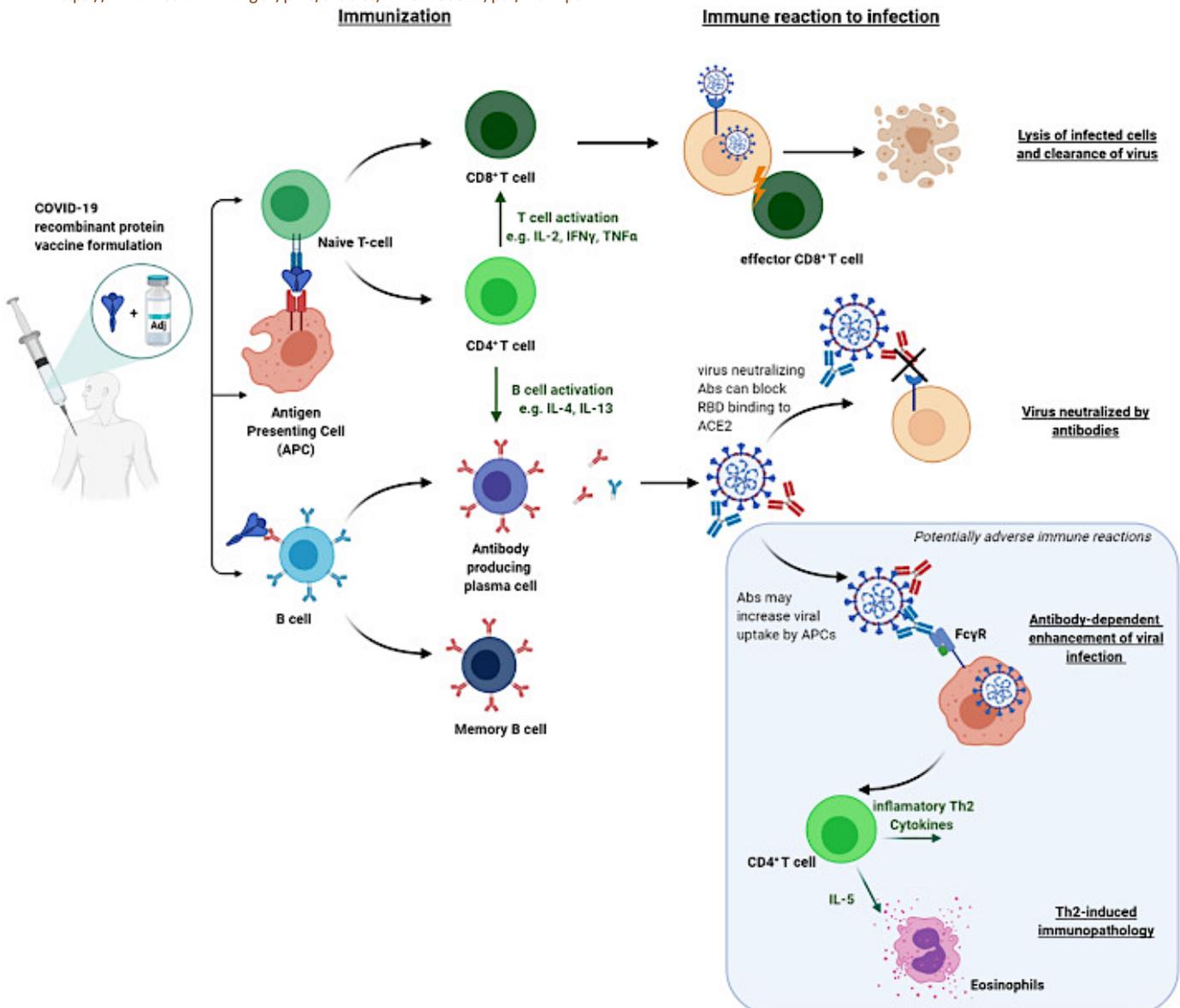
Nat Rev Microbiol. 2009 Mar;7(3):226-36. doi: 10.1038/nrmicro2090. Epub 2009 Feb 9.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19198616/>

Select recombinant protein vaccine candidates in clinical trials for COVID-19 as of December 8, 2020 [5]

Antigen	Vaccine developer	Platform/technology	Adjuvants
Full-length S-protein based vaccines			
Trimer	Novavax	Insect cells	Matrix M
S-protein	Sanofi Pasteur/GSK	Insect cells	2 different adjuvants (likely variants of AS03)
SCB-2019 trimer	Clover Biopharmaceuticals Inc./GSK/Dynavax	CHO cells	Alum+CpG 1018 or AS03
S-2P (MVC-COV1901)	Medigen Vaccine Biologics Corporation/NIAID/Dynavax	CHO cells	Alum+CpG1018
Covax-19	Vaxine Pty Ltd/Medytox	Insect cells	AdvaxCpG55.2
RBD-based vaccines			
AdimrSC-2f	Adimmune	Baculovirus/Sf9	Alum
SARS-CoV-2-RBDN1C1	Biological E/BCM	Yeast	Alum+CpG
FINLAY-FR-1/2	Instituto Finlay de Vacunas, Cuba		
KBP-201	Kentucky Bioprocessing, Inc	Plants	
RBD Dimer	Anhui Zhifei Longcom Biopharmaceutical/Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences	CHO Cells	Aluminum preparation
RBD	West China Hospital, Sichuan University P	Insect Cells	Alum
Multi-epitope vaccines			
Multitope Peptide-based Vaccine (MPV)	COVAXX	Peptides	CpG and alum (AdjuPhos®)
EpiVacCoron	Vektor Laboratories, Russia	Chemical synthesis	Alum
CoVax-1	University Hospital Tübingen	Peptides	Montanide ISA51

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7788321/pdf/main.pdf>



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7788321/>

Panoramica delle reazioni immunitarie innescate dai vaccini proteici ricombinanti e il loro ruolo nella protezione contro COVID-19

VEICOLI PER IL TRASPORTO DEGLI ANTIGENI VACCINALI

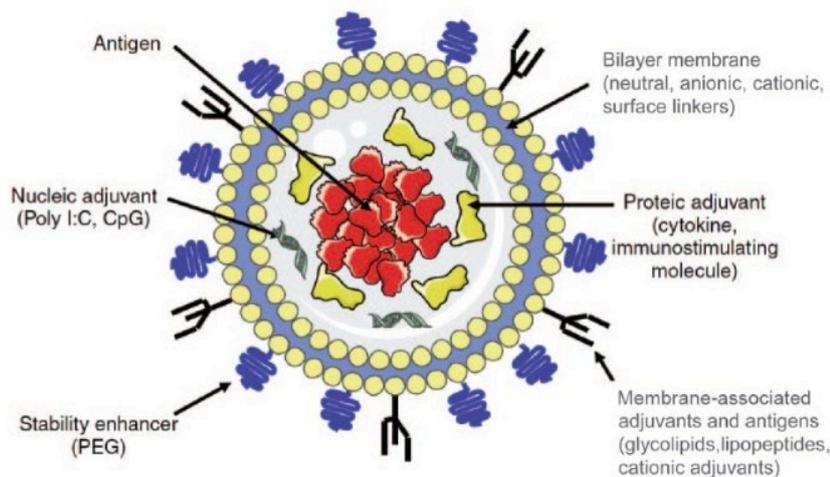
Un significativo miglioramento delle risposte indotte dal vaccino può essere ottenuto somministrando l'antigene del vaccino in un veicolo di somministrazione non tossico.

Il veicolo protegge i componenti del vaccino dalla degradazione della proteasi o della nucleasi (aumentandone la persistenza nei tessuti) e possono anche agire come adiuvanti (inducendo infiammazione). Alcuni veicoli facilitano l'esposizione di più molecole dell'antigene del vaccino sulla superficie del veicolo, creando una forma polivalente dell'antigene che aumenta la sua immunogenicità.

Queste proprietà hanno reso i veicoli per il trasporto fondamentali per la vaccinazione sperimentale per i vaccini a subunità e a DNA.

Sono stati ideati diversi tipi di veicoli per il trasporto, alcuni dei quali stanno iniziando ad essere utilizzati per la vaccinazione umana.²³⁰

Liposomi²³¹



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4212474/>

Rappresentazione schematica di un piccolo liposoma unilamellare che mostra la versatilità di incorporazione di vari composti mediante incapsulamento nello spazio interno acquoso o integrazione nel doppio strato o attacco superficiale sulla membrana del doppio strato lipidico.

CpG, citosina-fosforotioato-guanina oligodeossinucleotide;

PEG, poli (glicole etilenico)

I liposomi vengono preparati miscelando l'antigene vaccinale di interesse con una sospensione di fosfolipidi in condizioni che favoriscono la formazione di una struttura a doppio strato lipidico sferica.

L'antigene del vaccino è intrappolato nel centro acquoso del liposoma idrofobico, che di solito ha dimensioni comprese tra 100 e 10.000 nm.

I liposomi sono prontamente fagocitati da DC e macrofagi, il che significa che l'antigene viene rapidamente elaborato e utilizzato per avviare l'attivazione delle cellule T.

Inoltre, i ligandi PRR possono essere incorporati nei liposomi per fungere da adiuvanti.

²³⁰ Chapter 14 - Vaccination, Editor(s): Tak W. Mak, Mary E. Saunders, Bradley D. Jett, Primer to the Immune Response (Second Edition), Academic Cell, 2014, Pages 333-375, ISBN 9780123852458, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385245-8.00014-5>, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123852458000145>

Reshma J. Nevagi, Istvan Toth, Mariusz Skwarczynski, 12 - Peptide-based vaccines Editor(s): Sotirios Koutsopoulos, Peptide Applications in Biomedicine, Biotechnology and Bioengineering, Woodhead Publishing, 2018, Pages 327-358, ISBN 9780081007365, <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100736-5.00012-0>, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081007365000120>

Foged, Camilla. (2015). Subunit Vaccine Delivery. https://www.researchgate.net/publication/269311879_Subunit_Vaccine_Delivery/citation/download

²³¹ Wang N, Chen M, Wang T. Liposomes used as a vaccine adjuvant-delivery system: From basics to clinical immunization. J Control Release. 2019;303:130-150. doi:10.1016/j.jconrel.2019.04.025 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7111479/>

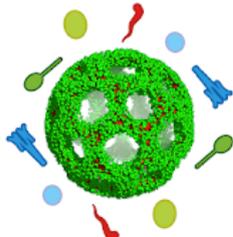
Schwendener RA. Liposomes as vaccine delivery systems: a review of the recent advances. Ther Adv Vaccines. 2014;2(6):159-182. doi:10.1177/2051013614541440 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4212474/>

Vaccini liposomiali per il virus dell'epatite A (HAV) e l'influenza sono ora autorizzati per l'uso in alcuni paesi. Un vaccino antimalarico a base di liposomi è attualmente in fase di sperimentazione in studi clinici.

ISCOM ²³²

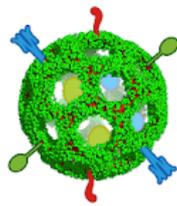
ISCOM matrix

Cholesterol
Phosphatidylcholine } Lipids
Quillaja saponin (Quil A)



mixed with antigen

Classic ISCOM



Antigen mixed in
during ISCOM
formulation

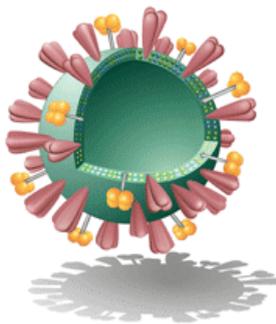
I "complessi immunostimolanti" sono sfere vuote costituite da colesterolo, fosfolipidi e detergente. Immunogeni proteici relativamente voluminosi possono essere facilmente inseriti all'interno della sfera.

Per il sistema immunitario, l'ISCOM assomiglia a un antigene multivalente con una forma che invita alla fagocitosi da parte degli APC.

Inoltre, il detergente nell'ISCOM è un potente adiuvante.

A seconda delle dimensioni dell'ISCOM, può essere definito nanoparticella (50 nm) o microparticella (100–50.000 nm). Entrambi i tipi di particelle rientrano nella gamma delle dimensioni dei patogeni naturali.

Virosomi ²³³



Hemagglutinin
Neuraminidase
Phosphatidylcholine
Phosphatidylethanolamine

I virosomi sono come "virus artificiali" non replicanti che possono essere utilizzati per fornire gli antigeni del vaccino direttamente in una cellula ospite.

Un virosoma è fondamentalmente un liposoma ricoperto dalle glicoproteine dell'involucro di un virus. Gli antigeni patogeni di interesse vengono catturati all'interno del lume del virosoma o sono chimicamente reticolati alla sua superficie.

<https://www.biopharminternational.com/view/virosomes-novel-strategy-drug-delivery-and-targeting>

A causa delle proteine dell'involucro virale, un virosoma può legarsi e "infettare" le cellule ospiti e rilasciare l'antigene direttamente nel percorso di elaborazione dell'antigene con le MHC di classe I. In alternativa, il virosoma può essere fagocitato da un APC.

Un vaccino virosomico che incorpora la proteina HA del virus dell'influenza nei liposomi è stato ideato per l'immunizzazione contro l'influenza stagionale.

²³² Garcia A, Lema D.

An Updated Review of ISCOMSTM and ISCOMATRIXTM Vaccines.

Curr Pharm Des. 2016;22(41):6294-6299. doi: 10.2174/1381612822666160915161302.

https://www.researchgate.net/publication/308202867_An_Updated_Review_of_Iscoms_TM_and_Iscomatrix_TM_Vaccines

Pedersen JS, Oliveira CL, Hübschmann HB, et al.

Structure of immune stimulating complex matrices and immune stimulating complexes in suspension determined by small-angle x-ray scattering.

Biophys J. 2012;102(10):2372-2380. doi:10.1016/j.bpj.2012.03.071

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3353015/>

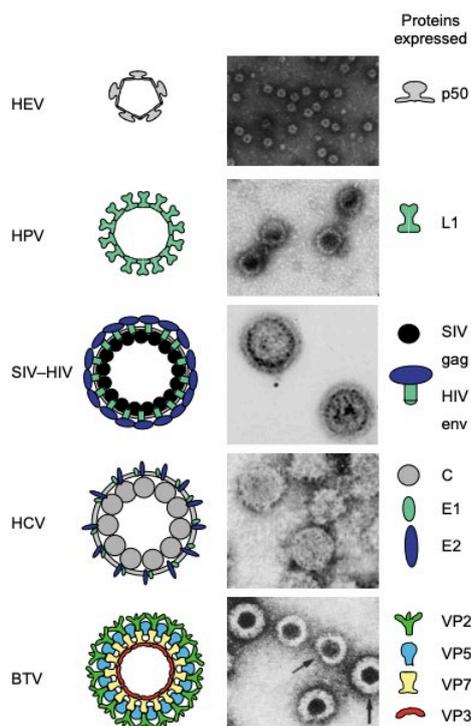
²³³ Basavaraj, K.N., et al.

Nanotechnology Based Virosomal Drug Delivery Systems.

J Nanotech Mater Sci (2014) 1(1):27-35. <https://doi.org/10.15436/2377-1372.14.00>

<https://www.ommegaonline.org/article-details/Nanotechnology-Based-Virosomal-Drug-Delivery-Systems/59>

Particelle simili a virus ²³⁴



Le particelle simili ai virus (VLP) sono strutture di 30-90 nm che risultano dall'autoassemblaggio di proteine virali senza un genoma di acido nucleico o un involucro lipidico.

A volte sono le proteine di superficie del virus di interesse che formano la struttura della VLP a forma di bastoncino o icosaedrica, oppure sono formate dalle proteine del nucleo virale.

Le superfici di queste VLP hanno una struttura ripetitiva che è ideale per indurre la produzione di anticorpi.

Le VLP possono anche essere costruite per contenere ligandi PRR come adiuvanti aggiuntivi.

È interessante notare che, sebbene le VLP non possano replicarsi perché mancano di enzimi e acidi nucleici, a volte una VLP si assembla spontaneamente attorno a un frammento di RNA o DNA.

Questa capacità offre agli sviluppatori di vaccini l'opportunità di manipolare una VLP e fargli incorporare ligandi TLR7/9 come sequenze di ssRNA o CpG.

[https://www.cell.com/trends/microbiology/comments/S0966-842X\(03\)00208-7](https://www.cell.com/trends/microbiology/comments/S0966-842X(03)00208-7)

La conservazione dei vaccini

Diverse formulazioni di vaccini richiedono una refrigerazione costante. La necessità di una catena del freddo rende la loro distribuzione globale e applicazione logisticamente difficile, e per le nazioni sottosviluppate e in via di sviluppo con climi tropicali, quasi impossibile. In effetti, una delle maggiori sfide è stata la dipendenza dal trasporto refrigerato di vaccini in soluzione.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità ha stimato che circa 2,8 milioni di dosi di vaccini siano andate perse in cinque paesi nel 2011 perché la catena del freddo è stata interrotta, e che meno del 10% dei paesi ha soddisfatto le raccomandazioni dell'OMS per pratiche efficaci di gestione dei vaccini.

Ciò includeva le perdite in paesi come la Nigeria, dove il 41% dei frigoriferi non funzionava, e l'Etiopia, che aveva circa il 30% delle sue apparecchiature per la catena del freddo fuori servizio.

La perdita di milioni di dosi di vaccini COVID-19 potrebbe essere disastrosa per la gestione della pandemia.²³⁵

²³⁴ Roldão A, Mellado MC, Castilho LR, Carrondo MJ, Alves PM. Virus-like particles in vaccine development. *Expert Rev Vaccines*. 2010 Oct;9(10):1149-76. doi: 10.1586/erv.10.115. PMID: 20923267. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20923267/>

Mohsen, M. O., Zha, L., Cabral-Miranda, G., & Bachmann, M. F. Major findings and recent advances in virus-like particle (VLP)-based vaccines. *Seminars in Immunology* (2017) 34, 123–132. doi:10.1016/j.smim.2017.08.014

Syomin BV, Ilyin YV. Virus-Like Particles as an Instrument of Vaccine Production. *Mol Biol*. 2019;53(3):323-334. doi:10.1134/S0026893319030154

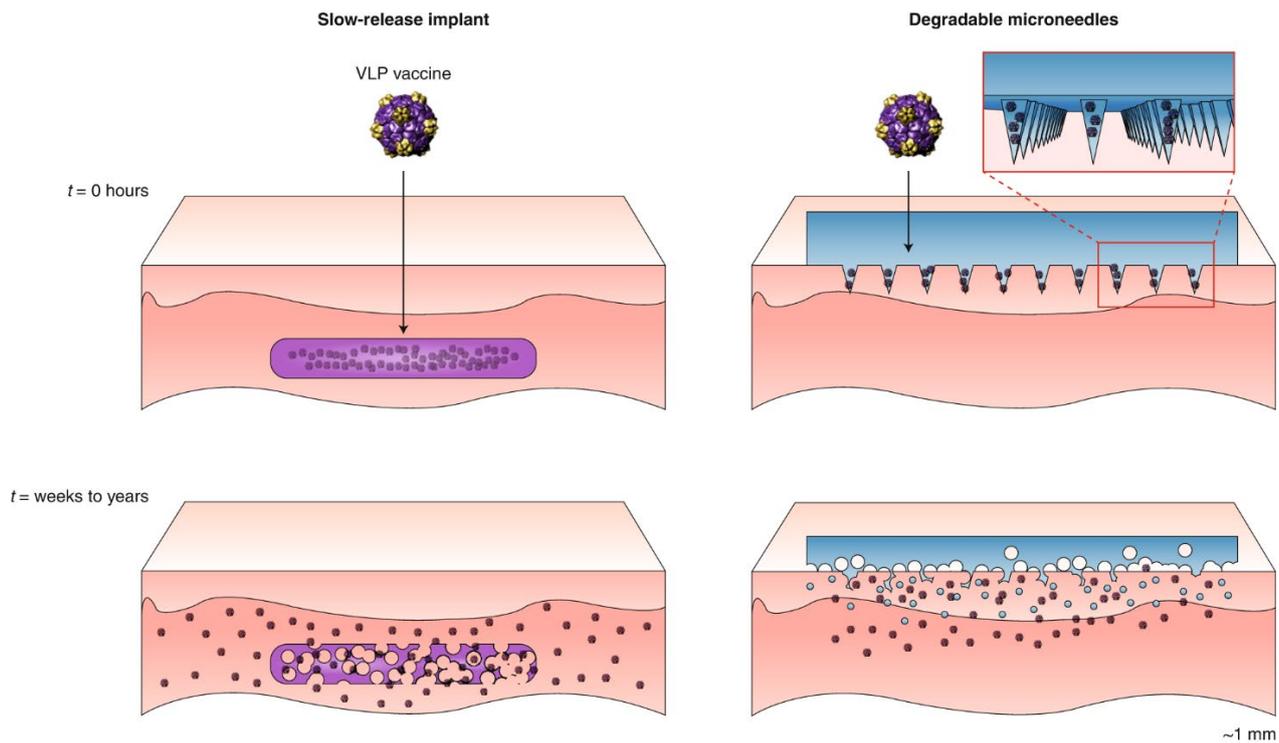
Noad, R., & Roy, P. (2003). Virus-like particles as immunogens. *Trends in Microbiology*, 11(9), 438–444. doi:10.1016/s0966-842x(03)00208-7 [https://www.cell.com/trends/microbiology/comments/S0966-842X\(03\)00208-7](https://www.cell.com/trends/microbiology/comments/S0966-842X(03)00208-7)

²³⁵ https://www.who.int/immunization/call-to-action_ipac-iscl.pdf

Sebbene siano disponibili alcuni vaccini liofilizzati che possono essere conservati a temperatura ambiente, tali soluzioni sono difficili da produrre e presentano sfide per gli operatori sanitari che devono ricostituirli in loco.²³⁶

Le campagne di vaccinazione per essere efficienti richiedono anche l'accesso agli operatori sanitari (HCP), il che è difficile nei paesi in via di sviluppo poveri di risorse o densamente popolati in circostanze normali, ma rappresenta una sfida maggiore durante una pandemia globale in cui il sistema sanitario è già sotto pressione.

Recentemente, sono emerse alternative moderne a tali sfide di distribuzione e accesso, come l'impiego di impianti monodose a rilascio lento²³⁷, vaccini a base di film²³⁸ e cerotti a base di microaghi²³⁹ che potrebbero ridurre la dipendenza dalla catena del freddo e garantire la vaccinazione anche in situazioni in cui operatori sanitari qualificati sono rari o molto richiesti.



<https://www.nature.com/articles/s41565-020-0737-y>

I vaccini sono incapsulati in componenti polimerici in un impianto o in un cerotto con microaghi. Nel tempo il polimero si idrolizzerà nell'ambiente acquoso del corpo e rilascerà il vaccino attivo. La velocità di degradazione del dispositivo e la successiva velocità di rilascio del vaccino possono essere regolate in base al materiale in cui è incorporato il vaccino. La differenza principale tra i due dispositivi è la modalità di somministrazione. Gli impianti vengono somministrati per via sottocutanea da un operatore sanitario qualificato, mentre i cerotti con microago possono essere applicati autonomamente in modo indolore.

²³⁶ Kristensen DD, Lorenson T, Bartholomew K, Villadiego S.

Can thermostable vaccines help address cold-chain challenges? Results from stakeholder interviews in six low- and middle-income countries.

Vaccine. 2016 Feb 10;34(7):899-904. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.01.001. Epub 2016 Jan 8.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4744085/>

²³⁷ Engert, Julia. (2015). Implants as Sustained Release Delivery Devices for Vaccine Antigens.

10.1007/978-1-4939-1417-3_12. In book: Subunit Vaccine Delivery (pp.221-241)

https://www.researchgate.net/publication/278681098_Implants_as_Sustained_Release_Delivery_Devices_for_Vaccine_Antigens

Bobbala S, Hook S.

Vaccine implants: current status and recent advancements.

Emerg Top Life Sci. 2020 Dec 11;4(3):319-330. doi: 10.1042/ETLS20200164. PMID: 33231265.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33231265/>

²³⁸ Bajrovic I, Schafer SC, Romanovicz DK, Croyle MA.

Novel technology for storage and distribution of live vaccines and other biological medicines at ambient temperature.

Sci Adv. 2020;6(10):eaa4819. Published 2020 Mar 4. doi:10.1126/sciadv.aau4819

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7056310/>

²³⁹ Boopathy AV, Mandal A, Kulp DW, et al.

Enhancing humoral immunity via sustained-release implantable microneedle patch vaccination.

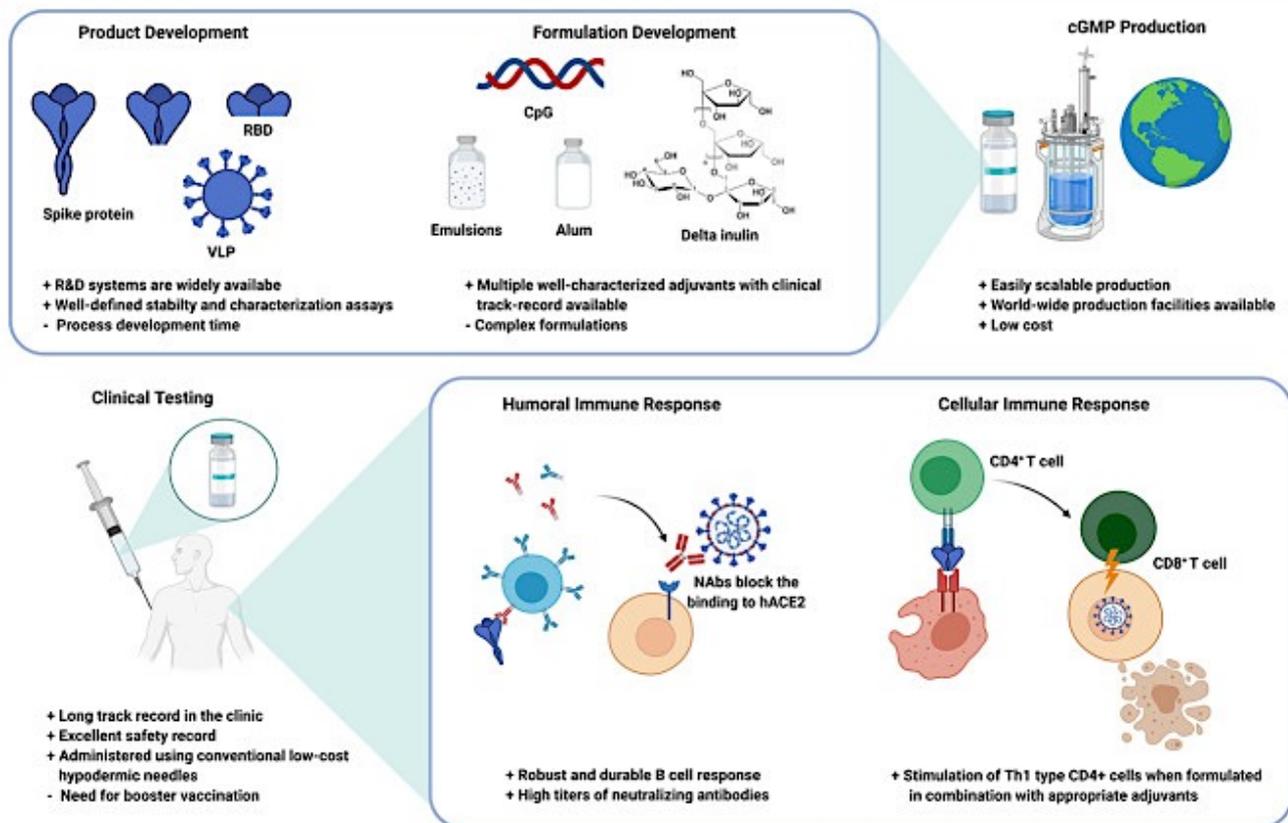
Proc Natl Acad Sci U S A. 2019;116(33):16473-16478. doi:10.1073/pnas.1902179116

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6697788/>

VACCINI A PARTICELLE SIMIL-VIRALI (VLP)

- o RBD SARS-CoV-2 HBsAg VLP vaccine / *Serum Institute of India + Accelagen Pty*
- o Coronavirus-Like Particle COVID-19 (CoVLP) / *Medicago Inc.*

Recombinant Proteins as a Platform Technology for COVID-19 Vaccines



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7788321/>

Le particelle simili ai virus (VLP) sono nanostrutture multiproteiche che imitano l'organizzazione e la conformazione dei virus nativi wild-type.

È importante notare che le VLP sono sottoprodotti naturali che si generano durante il ciclo infettivo di alcuni virus.²⁴⁰

Poiché queste VLP non contengono un genoma virale, non sono in grado di replicarsi nelle cellule e perciò dovrebbero avere un profilo di sicurezza migliorato rispetto ai vaccini virali attenuati.²⁴¹

²⁴⁰ Huang SN, Millman I, O'Connell A, Aronoff A, Gault H, Blumberg BS. Virus-like particles in Australia antigen-associated hepatitis. An immunoelectron microscopic study of human liver. *Am J Pathol.* 1972;67(3):453-470. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2032745/>

²⁴¹ Roldão A, Mellado MC, Castilho LR, Carrondo MJ, Alves PM. Virus-like particles in vaccine development. *Expert Rev Vaccines.* 2010 Oct;9(10):1149-76. doi: 10.1586/erv.10.115. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/erv.10.115?src=recsys>

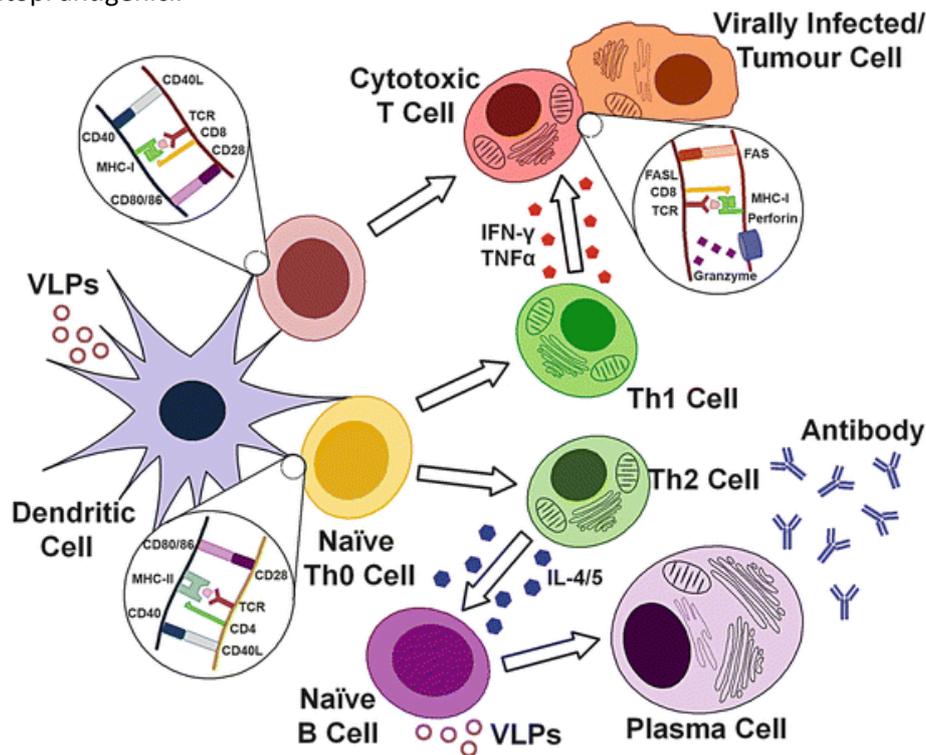
Mohsen MO, Zha L, Cabral-Miranda G, Bachmann MF. Major findings and recent advances in virus-like particle (VLP)-based vaccines. *Semin Immunol.* 2017 Dec;34:123-132. doi: 10.1016/j.smim.2017.08.014. Epub 2017 Sep 5. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28887001/>

Brisse M, Vrba SM, Kirk N, Liang Y, Ly H. Emerging Concepts and Technologies in Vaccine Development. *Front Immunol.* 2020;11:583077. Published 2020 Sep 30. doi:10.3389/fimmu.2020.583077 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7554600/>

La potenza di queste particelle può essere notevolmente migliorata se specifiche proteine virali native che hanno funzione immunosoppressiva vengono escluse dalla composizione delle VLP.

Non è richiesta l'attenuazione o l'inattivazione; questo è particolarmente importante in quanto gli epitopi sono comunemente modificati da trattamenti di inattivazione. Rispetto alle singole proteine o peptidi, le VLP presentano epitopi conformazionali più simili al virus nativo; quindi, la reattività degli anticorpi o la risposta del sistema immunitario dovrebbe essere significativamente migliorata.

Le VLP vengono assorbite dalle cellule dendritiche, dove vengono elaborate e presentate su molecole MHC di classe I e II per attivare la risposta immunitaria adattativa. La successiva stimolazione dei linfociti T CD8⁺ e dei linfociti T helper CD4⁺ porta rispettivamente all'attivazione delle risposte cellulo-mediate e delle cellule B (con produzione di anticorpi)²⁴². Di conseguenza, i vaccini VLP sono considerati altamente immunogenici e possono stimolare risposte immunitarie cellulari e umorali robuste a causa della presenza altamente ripetitiva di epitopi antigenici.²⁴³



Foged, Camilla. (2015). Subunit Vaccine Delivery. pag 172

https://www.researchgate.net/publication/269311879_Subunit_Vaccine_Delivery/citation/download

La risposta immunitaria alle VLP. I VLP hanno la capacità di stimolare sia il sistema immunitario cellulo-mediatore che quello umorale. La risposta immunitaria desiderata può essere promossa attraverso la selezione dell'adiuvante

I vaccini VLP utilizzano piattaforme in grado di produrre particelle che imitano la struttura dei virus autentici e possono essere prodotti esprimendo proteine antigeniche in un sistema eucariotico o procariotico, con conseguente formazione di particelle con una capacità intrinseca delle proteine antigeniche di autoassemblarsi. In alternativa, i vaccini VLP possono anche essere realizzati producendo VLP vuote e legando chimicamente peptidi antigenici sulle particelle preformate.²⁴⁴

²⁴² Win SJ, Ward VK, Dunbar PR, Young SL, Baird MA.

Cross-presentation of epitopes on virus-like particles via the MHC I receptor recycling pathway.

Immunol Cell Biol. 2011 Aug;89(6):681-8. doi: 10.1038/icc.2010.161. Epub 2011 Jan 11.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21221122/>

Grgacic EV, Anderson DA.

Virus-like particles: passport to immune recognition.

Methods. 2006;40(1):60-65. doi:10.1016/j.ymeth.2006.07.018

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7128828/>

²⁴³ Noad R, Roy P.

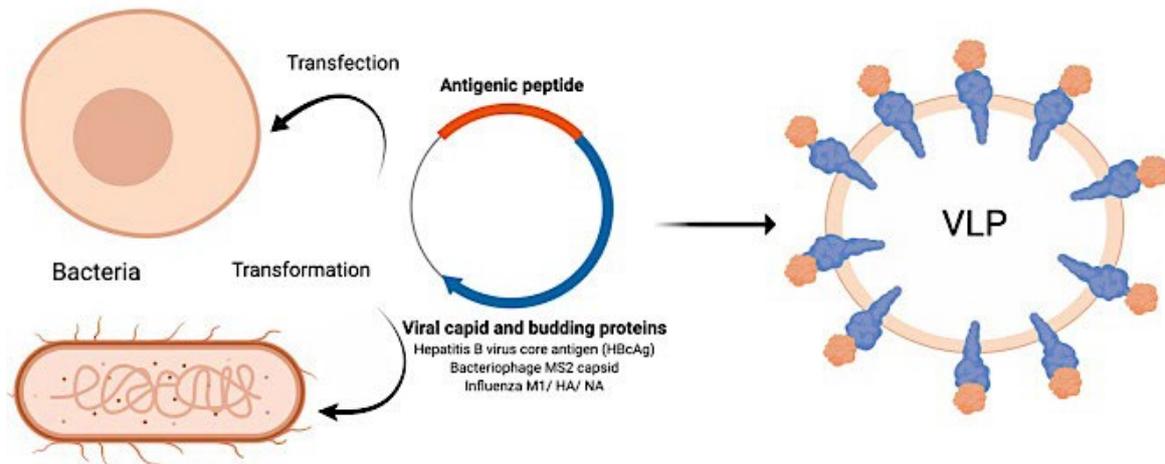
Virus-like particles as immunogens.

Trends Microbiol. 2003 Sep;11(9):438-44. doi: 10.1016/s0966-842x(03)00208-7.

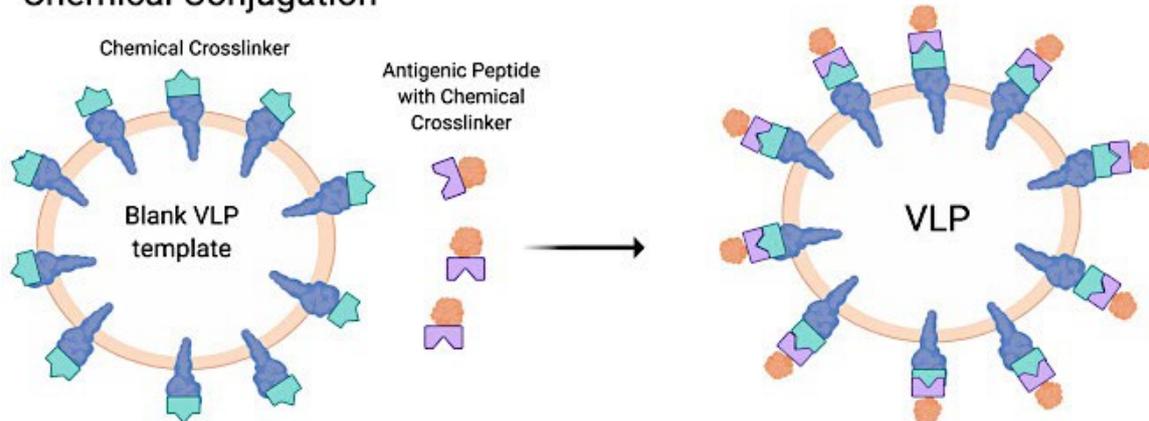
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13678860/>

Fusion proteins

Eukaryotic cells



Chemical Conjugation



Chackerian B.

Virus-like particles: flexible platforms for vaccine development.
Expert Rev Vaccines. 2007 Jun;6(3):381-90. doi: 10.1586/14760584.6.3.381.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17542753/>

²⁴⁴ Kushnir N, Streatfield SJ, Yusibov V.

Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: diversity of targets and production systems and advances in clinical development.
Vaccine. 2012;31(1):58-83. doi:10.1016/j.vaccine.2012.10.083
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7115575/>

Ong HK, Tan WS, Ho KL.

Virus like particles as a platform for cancer vaccine development.
PeerJ. 2017;5:e4053. Published 2017 Nov 15. doi:10.7717/peerj.4053
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5694210/>

Qian C, Liu X, Xu Q, et al.

Recent Progress on the Versatility of Virus-Like Particles.
Vaccines (Basel). 2020;8(1):139. Published 2020 Mar 20. doi:10.3390/vaccines8010139
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7157238/>

Jeong H, Seong BL.

Exploiting virus-like particles as innovative vaccines against emerging viral infections.
J Microbiol. 2017;55(3):220-230. doi:10.1007/s12275-017-7058-3
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7090582/pdf/12275_2017_Article_7058.pdf

Liu J, Dai S, Wang M, Hu Z, Wang H, Deng F.

Virus like particle-based vaccines against emerging infectious disease viruses.
Virol Sin. 2016;31(4):279-287. doi:10.1007/s12250-016-3756-y
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7090901/pdf/12250_2016_Article_3756.pdf

Lua LH, Connors NK, Sainsbury F, Chuan YP, Wibowo N, Middelberg AP.

Bioengineering virus-like particles as vaccines.
Biotechnol Bioeng. 2014 Mar;111(3):425-40. doi: 10.1002/bit.25159. Epub 2013 Dec 17.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24347238/>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7554600/>

Schema della produzione di vaccini VLP. La metodologia per produrre vaccini VLP è riassunta in questa vignetta. In breve, i vaccini VLP sono prodotti trasferendo cellule eucariotiche o trasformando cellule batteriche con un plasmide di DNA che codifica un peptide antigenico attaccato a un capside virale e / o altra proteina che è sufficiente per formare VLP. Il peptide antigenico è presente all'esterno del VLP che diventa disponibile per l'interazione con il sistema immunitario. Gli antigeni coniugati con un reticolante chimico possono anche essere attaccati a VLP contenenti proteine esterne coniugate a un reticolante chimico complementare, che si tradurrà in antigeni collegati al VLP e presentati sui bordi esterni.

In generale, le VLP possono essere classificate in **VLP senza involucro e con involucro**.

Le prime sono autoassemblate con almeno una proteina virale che viene espressa utilizzando un sistema ospite di espressione adatto come cellule di mammifero, cellule di insetti, lieviti, batteri e sistemi acellulari senza acquisizione di alcun componente ospite.

I lieviti e le cellule di mammifero sono i sistemi di espressione più comunemente impiegati nella produzione di vaccini commerciali basati su VLP di HBV e HPV.²⁴⁵

La produzione di VLP chimerici senza involucro strutturalmente più complessi permette l'esposizione di epitopi o peptidi eterologhi sulla superficie di VLP create tramite ingegneria genetica (Fig. 1A)²⁴⁶.

Le VLP senza involucro possono anche essere coniugate chimicamente con un antigene bersaglio tramite un linker chimico etero-bifunzionale come il sulfosuccinimidil 4- (N-maleimidometil) cicloesano-1-carbossilato (sulfo-SMCC) e un nano-collante, in cui possono essere presenti le VLP chimeriche prodotte senza alterazioni genetiche estese e questo supera la limitazione imposta alla formazione di VLP (Fig. 1B)²⁴⁷.

Dall'altra parte, le **VLP con involucro** acquisiscono parte delle membrane delle cellule ospiti come parte del loro involucro lipidico, dove un epitopo o peptide estraneo può essere integrato e visualizzato sulla superficie²⁴⁸.

Similmente alle VLP senza involucro, le VLP con involucro possono essere prodotte esprimendo diverse proteine strutturali virali in un sistema di espressione adatto.

In alternativa, può essere impiegata una tecnica di trasferimento di proteine per esporre gli epitopi o i peptidi eterologhi sulla superficie delle VLP con involucro.

Questo approccio consente l'incorporazione spontanea della proteina ancorata al glicosilfosfatidilinositolo (GPI) o di altre molecole immunostimolatorie nel doppio strato lipidico delle VLP con involucro tramite una semplice fase di incubazione (Fig. 1C)²⁴⁹.

Il vantaggio principale della tecnologia di trasferimento delle proteine nella produzione di VLP con involucro chimerico è la sua capacità di mantenere la funzionalità della proteina incorporata senza una modifica genetica estesa.²⁵⁰

²⁴⁵ Kushnir N, Streatfield SJ, Yusibov V.

Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: diversity of targets and production systems and advances in clinical development. *Vaccine*. 2012;31(1):58-83. doi:10.1016/j.vaccine.2012.10.083
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7115575/>

²⁴⁶ Yong CY, Yeap SK, Ho KL, Omar AR, Tan WS.

Potential recombinant vaccine against influenza A virus based on M2e displayed on nodaviral capsid nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:2751-2763. Published 2015 Apr 2. doi:10.2147/IJN.S77405
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4396508/>

²⁴⁷ Jemon K, Young V, Wilson M, et al.

An enhanced heterologous virus-like particle for human papillomavirus type 16 tumour immunotherapy. *PLoS One*. 2013;8(6):e66866. Published 2013 Jun 14. doi:10.1371/journal.pone.0066866
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3682997/>

Lee KW, Tey BT, Ho KL, Tejo BA, Tan WS.

Nanoglu: an alternative way to display cell-internalizing peptide at the spikes of hepatitis B virus core nanoparticles for cell-targeting delivery. *Mol Pharm*. 2012 Sep 4;9(9):2415-23. doi: 10.1021/mp200389t. Epub 2012 Jul 26.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22775561/>

²⁴⁸ Haynes JR.

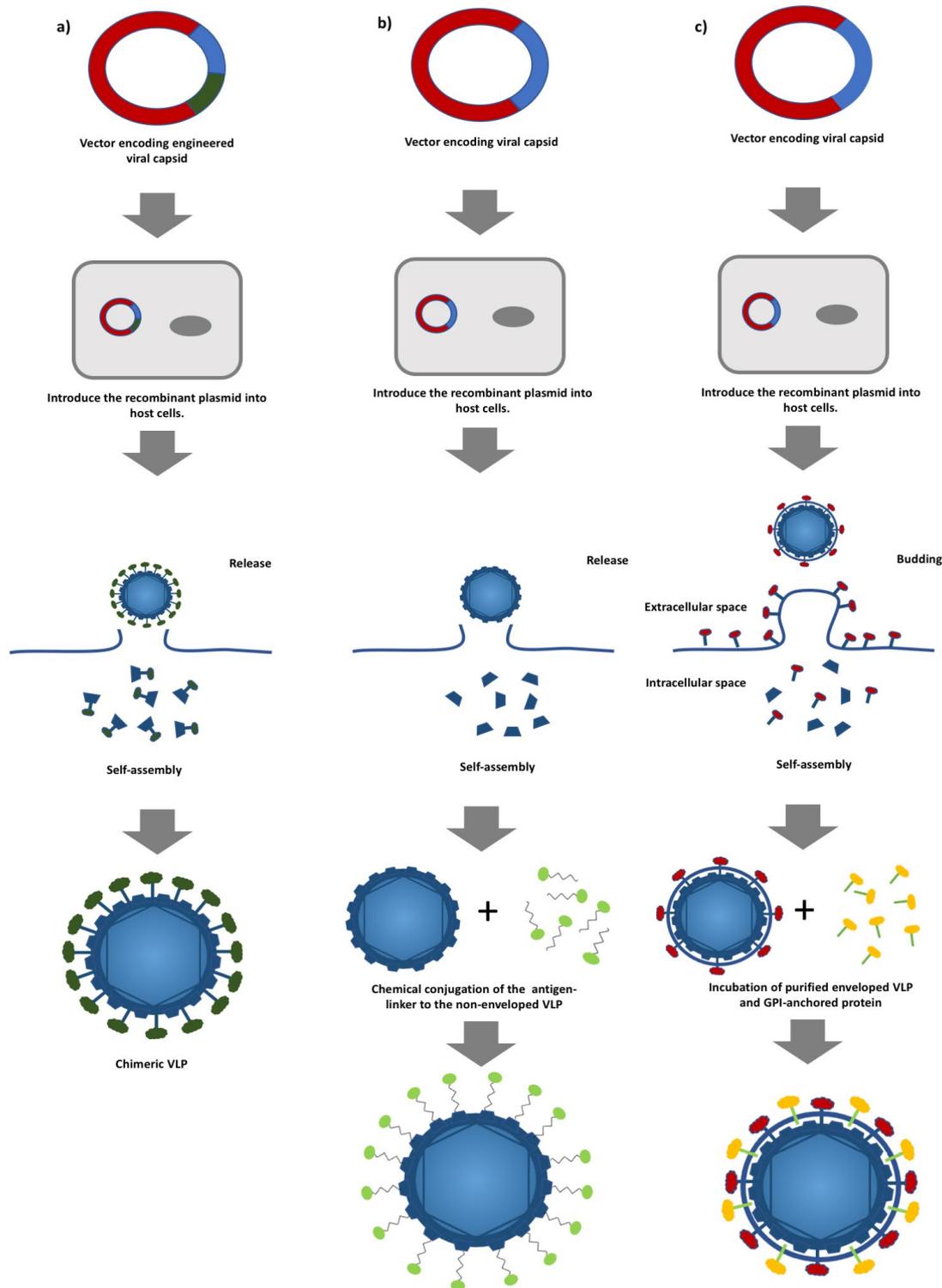
Influenza virus-like particle vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2009 Apr;8(4):435-45. doi: 10.1586/erv.09.8.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19348559/>

²⁴⁹ Patel JM et al.

Protein transfer-mediated surface engineering to adjuvantate virus-like nanoparticles for enhanced anti-viral immune responses. *Nanomedicine*. 2015;11(5):1097-1107. doi:10.1016/j.nano.2015.02.008
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4512837/>

²⁵⁰ Shashidharamurthy R, Bozeman EN, Patel J, Kaur R, Meganathan J, Selvaraj P. Immunotherapeutic strategies for cancer treatment: a novel protein transfer approach for cancer vaccine development.

Inoltre, grazie all'origine virale delle VLP, alcuni dei vaccini a base di VLP sono autoadiuvanti, in quanto contengono il pattern molecolare associato ai patogeni (PAMP) dei virus che sono in grado di potenziare l'attivazione del sistema immunitario innato attraverso i recettori Toll-like e i recettori del pattern di riconoscimento.²⁵¹



Med Res Rev. 2012 Nov;32(6):1197-219. doi: 10.1002/med.20237. Epub 2011 Jan 16. PMID: 23059764.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23059764/>

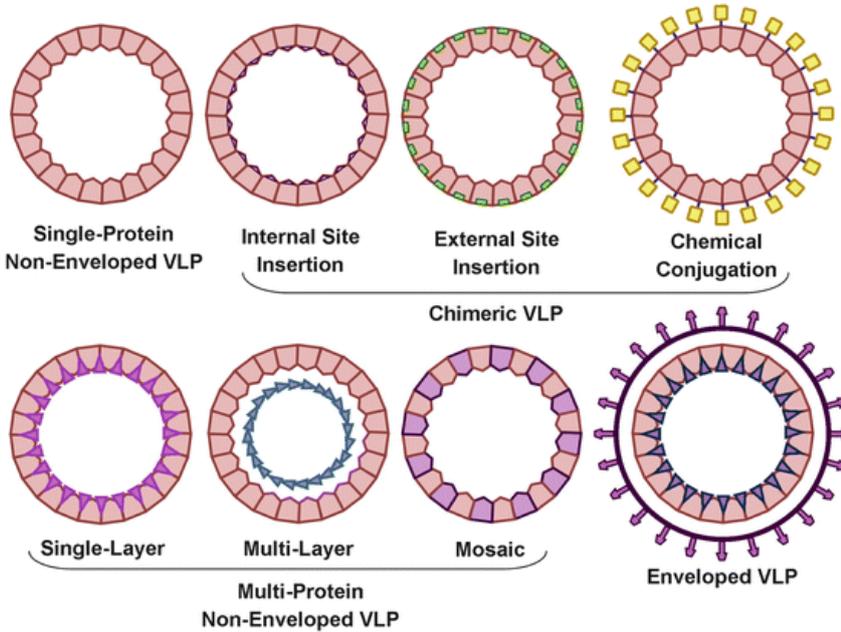
²⁵¹ Crisci E, Bárcena J, Montoya M.
Virus-like particles: the new frontier of vaccines for animal viral infections.
Vet Immunol Immunopathol. 2012;148(3-4):211-225. doi:10.1016/j.vetimm.2012.04.026
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7112581/>

Rynda-Apple A, Patterson DP, Douglas T.
Virus-like particles as antigenic nanomaterials for inducing protective immune responses in the lung.
Nanomedicine (Lond). 2014;9(12):1857-1868. doi:10.2217/nnm.14.107
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4415509/>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5694210/>

Un diagramma schematico della produzione di particelle simili a virus (VLP) utilizzando approcci diversi.

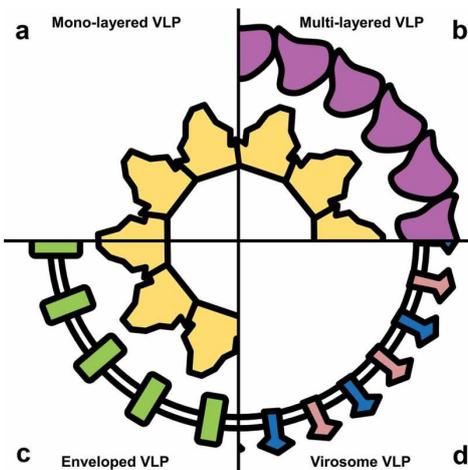
(A) Produzione di VLP chimerici senza involucro mediante ingegneria genetica. La proteina strutturale virale viene fusa con un antigene estraneo tramite ingegneria genetica seguita dall'espressione della proteina chimerica in un sistema ospite adatto. **(B)** Produzione di VLP chimerici senza involucro mediante coniugazione chimica. Le VLP senza involucro sono prodotte esprimendo una proteina strutturale virale e la decorazione della superficie delle VLP si ottiene coniugando un antigene estraneo alle VLP e **(C)** la produzione di VLP chimeriche con involucro mediante l'approccio del trasferimento di proteine. Le VLP avvolte sono prodotte esprimendo le proteine virali in cellule ospiti adatte seguite dall'incubazione con le proteine ancorate al glicosilfosfatidilinositolo (GPI). Gli antigeni estranei vengono quindi trasferiti al doppio strato lipidico delle VLP.



Foged, Camilla. (2015). Subunit Vaccine Delivery. pag 162
https://www.researchgate.net/publication/269311879_Subunit_Vaccine_Delivery/citation/download

Struttura VLP.

Le VLP possono essere classificate in base a caratteristiche strutturali come la composizione proteica del capsido, l'incapsulamento all'interno di un involucro a doppio strato lipidico e l'incorporazione di antigeni mediante l'inserimento ricombinante o la coniugazione chimica. Ulteriori combinazioni sono le VLP chimeriche multiproteiche e il mosaico con involucro o le VLP chimeriche.



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7103734/>
Biodiversità strutturale di VLP.

VLP può essere prodotto con una varietà di morfologie strutturali definite dalla struttura del virus genitore. Queste morfologie includono: **(a)** VLP monostrato, solitamente costituito da una singola proteina del capsido del virus; **(b)** VLP multistrato, formata da più proteine del capsido espresse contemporaneamente; **(c)** VLP con involucro, con un doppio strato lipidico formato sul capsido della VLP; e **(d)** virosomi, costituiti da proteine incorporate all'interno di un involucro a doppio strato lipidico.

SISTEMI DI ESPRESSIONE DELLE VLP

Diversi substrati cellulari tra cui batteri, lieviti, insetti, mammiferi e sistemi di espressione vegetale sono stati utilizzati per produrre VLP.

Table 9.2 VLP expression systems

	Advantages	Limitations
Bacteria (e.g. <i>Escherichia coli</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> • Rapid cell growth • Highest yield • Low production cost • Scalable 	<ul style="list-style-type: none"> • No post-translational modification • Limited applications for mammalian VLPs • May form inclusion bodies • Requires removal of endotoxins
Yeast (e.g. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> • Rapid cell growth • High yield • Low production cost • Scalable • Already has some regulatory approval 	<ul style="list-style-type: none"> • Limited post-translational modification • May form inclusion bodies
Insect cells/Baculovirus (e.g. <i>Spodoptera frugiperda</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> • Average cell growth • High yield • Scalable • Complex post-translational modification • Formation of multi-protein VLP 	<ul style="list-style-type: none"> • Requires removal of baculovirus proteins • May form inclusion bodies
Plant cells (e.g. <i>Nicotiana</i> sp.) 	<ul style="list-style-type: none"> • Rapid production • Low production cost • Scalable 	<ul style="list-style-type: none"> • Limited post-translational modification • Relatively new system
Mammalian cells (e.g. Chinese hamster ovary cells) 	<ul style="list-style-type: none"> • Scalable • Complex post-translational modification • Formation of multi-protein VLP • VLP 	<ul style="list-style-type: none"> • Slow growth • Low yield • Demanding culture conditions • High production cost • Potential infectious contamination
Cell free 	<ul style="list-style-type: none"> • Almost exclusive production of target protein • Limited cellular contaminants • Enables production of VLPs containing non-natural amino acids or toxic protein intermediates 	<ul style="list-style-type: none"> • Very high production cost • Limited scalability • Relatively new system, not well characterised

Adapted from Rebeaud and Bachmann (2012)

Foged, Camilla. (2015). Subunit Vaccine Delivery. pag 159
https://www.researchgate.net/publication/269311879_Subunit_Vaccine_Delivery/citation/download

Batteri

I batteri sono il sistema di espressione più utilizzato per la produzione di proteine ricombinanti, ma non sono una piattaforma preferita per la produzione di VLP a causa di una serie di fattori, inclusa l'assenza di un sistema di modifica post-traduzionale (PTM) come avviene nelle cellule di mammifero.

Tuttavia, i batteri vengono utilizzati per produrre VLP senza involucro basate su componenti di un patogeno con la capacità di autoassemblarsi nell'ospite batterico o come fusioni dell'antigene bersaglio del vaccino con proteine di superficie di batteriofagi (vaccini a VLP a base di batteriofagi).²⁵²

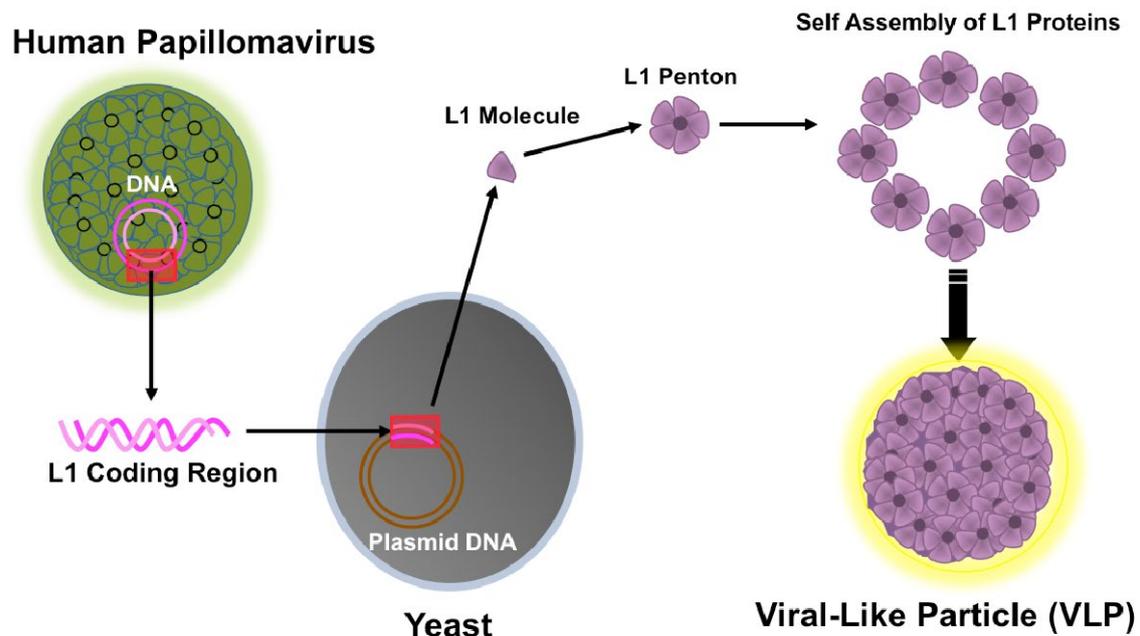
²⁵² Tissot AC, Renhofa R, Schmitz N, et al.
 Versatile virus-like particle carrier for epitope-based vaccines.
 PLoS One. 2010;5(3):e9809. Published 2010 Mar 23. doi:10.1371/journal.pone.0009809
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2843720/>

Lievito

Il lievito è una piattaforma consolidata per l'espressione di proteine ricombinanti e continua ad essere utilizzato per la produzione di VLP.

Due vaccini basati su VLP autorizzati da Merck and Co., Inc., Recombivax HB® e Gardasil®, sono stati prodotti utilizzando questo sistema che però presenta alcune limitazioni, in quanto si differenzia dalle cellule di mammifero nella PTM delle proteine, in particolare nella glicosilazione.

A causa di questa e di altre limitazioni, il sistema viene generalmente utilizzato per la produzione di VLP senza involucro.²⁵³



<https://www.corvelva.it/speciale-corvelva/vaccinegate/approfondimenti-sulle-sequenze-di-acidi-nucleici-dna-e-rna-relativi-al-frammento-l1-del-genoma-di-hpv-in-gardasil-9.html>

Dall'indagine sulla qualità sul **GARDASIL 9**® condotta da Corvelva sono risultate presenti in seguito all'analisi interlaboratorio le seguenti contaminazioni:²⁵⁴

analisi metagenomiche:

- conferma della presenza dei frammenti **L1 18, 16, 6** (RNA) presenti in maggior numero di copie del genoma 1 del virus HPV. La presenza di residui di DNA del frammento L1 nel vaccino per l'HPV è già stata riportata negli studi del prof. Lee,²⁵⁵ il quale ha ipotizzato che la presenza dell'alluminio stabilizzi la degradazione dei

Middelberg AP, Rivera-Hernandez T, Wibowo N, Lua LH, Fan Y, Magor G, Chang C, Chuan YP, Good MF, Batzloff MR. A microbial platform for rapid and low-cost virus-like particle and capsomere vaccines. *Vaccine*. 2011 Sep 22;29(41):7154-62. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.05.075. Epub 2011 Jun 7. PMID: 21651936. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21651936/>

Zhang W, Carmichael J, Ferguson J, Inglis S, Ashrafian H, Stanley M. Expression of human papillomavirus type 16 L1 protein in *Escherichia coli*: denaturation, renaturation, and self-assembly of virus-like particles in vitro. *Virology*. 1998 Apr 10;243(2):423-31. doi: 10.1006/viro.1998.9050. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004268229899050X?via%3Dihub>

²⁵³ Kim SN, Jeong HS, Park SN, Kim HJ. Purification and immunogenicity study of human papillomavirus type 16 L1 protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Virol Methods*. 2007 Jan;139(1):24-30. doi: 10.1016/j.jviromet.2006.09.004. Epub 2006 Oct 10. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17034867/>

²⁵⁴ <https://www.corvelva.it/speciale-corvelva/vaccinegate/sommario-delle-conferme-dei-dati-tramite-analisi-interlaboratorio.html>

²⁵⁵ Lee SH. Detection of human papillomavirus (HPV) L1 gene DNA possibly bound to particulate aluminum adjuvant in the HPV vaccine Gardasil. *J Inorg Biochem*. 2012 Dec;117:85-92. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2012.08.015. Epub 2012 Aug 30.

frammenti virali, potenziandone la capacità di attivare una potente risposta infiammatoria a lungo termine e di essere trasportati attraverso il sistema linfatico nei macrofagi in vari distretti dell'organismo.

- **Virus e materiale genetico avventizi:** Molluscum contagious, virus (Myoviridae), Fagi, Retrovirus (DNA): Murine leukemia virus, Human endogenous retrovirus K; Retrovirus (RNA): Murine leukemia virus; Lievito e i suoi virus; DNA/RNA umano e di topo (in tracce)

Approfondimenti sulle sequenze di acidi nucleici relativi al frammento L1 del genoma di HPV in Gardasil 9

analisi in spettrometria di massa:

- elevato numero di segnali di sostanze chimiche contaminanti di cui solo il 22% è risultato noto dal confronto in banca dati.

- Identificazione di **APDB** (amfetamina illegale) notificata ai NAS in data 23 maggio 2019

Report stupefacente APDB in campione Gardasil 9

Cellule di insetti

Un altro sistema che è stato ampiamente utilizzato per la produzione di VLP è il sistema di espressione con **baculovirus** in cellule di insetto.

Simili al lievito, le cellule degli insetti sono state utilizzate per produrre una serie di vaccini a base di VLP, in particolare, uno degli attuali vaccini HPV, Cervarix®.

Le cellule di insetti possono essere utilizzate per la produzione di VLP sia senza involucro che con involucro. I vaccini VLP con involucro sono tra i più avanzati nello sviluppo clinico, in quanto il sistema cellulare dell'insetto possiede PTM di tipo eucariotico inclusa la glicosilazione, ospita un accumulo di alto livello di proteine estranee e manca di patogeni dei mammiferi ²⁵⁶.

La contaminazione con particelle di baculovirus con involucro coprodotte ²⁵⁷ è la principale limitazione di questo sistema, che richiede lo sviluppo di schemi più complessi per la purificazione delle VLP.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23078778/>

Lee, Sin. (2012). Detection of human papillomavirus L1 gene DNA fragments in postmortem blood and spleen after Gardasil® vaccination—A case report. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 03. 1214-1224. 10.4236/abb.2012.38148..

https://www.researchgate.net/publication/273751788_Detection_of_human_papillomavirus_L1_gene_DNA_fragments_in_postmortem_blood_and_spleen_after_GardasilR_vaccination-A_case_report

Lee, Sin. (2013). Topological conformational changes of human papillomavirus (HPV) DNA bound to an insoluble aluminum salt—A study by low temperature PCR. *Advances in Biological Chemistry*. 03. 76-85. 10.4236/abc.2013.31010.

https://www.researchgate.net/publication/273751597_Topological_conformational_changes_of_human_papillomavirus_HPV_DNA_bound_to_an_insoluble_aluminum_salt-A_study_by_low_temperature_PCR

Lee SH.

Melting profiles may affect detection of residual HPV L1 gene DNA fragments in Gardasil®.

Curr Med Chem. 2014 Mar;21(7):932-40. doi: 10.2174/0929867321999140102110933.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24083601/>

²⁵⁶ Roy P, Noad R.

Virus-like particles as a vaccine delivery system: myths and facts.

Adv Exp Med Biol. 2009;655:145-158. doi:10.1007/978-1-4419-1132-2_11

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7124136/pdf/978-1-4419-1132-2_Chapter_11.pdf

Zepeda-Cervantes J, Ramírez-Jarquín JO, Vaca L.

Interaction Between Virus-Like Particles (VLPs) and Pattern Recognition Receptors (PRRs) From Dendritic Cells (DCs): Toward Better Engineering of VLPs.

Front Immunol. 2020 Jun 9;11:1100. doi: 10.3389/fimmu.2020.01100.

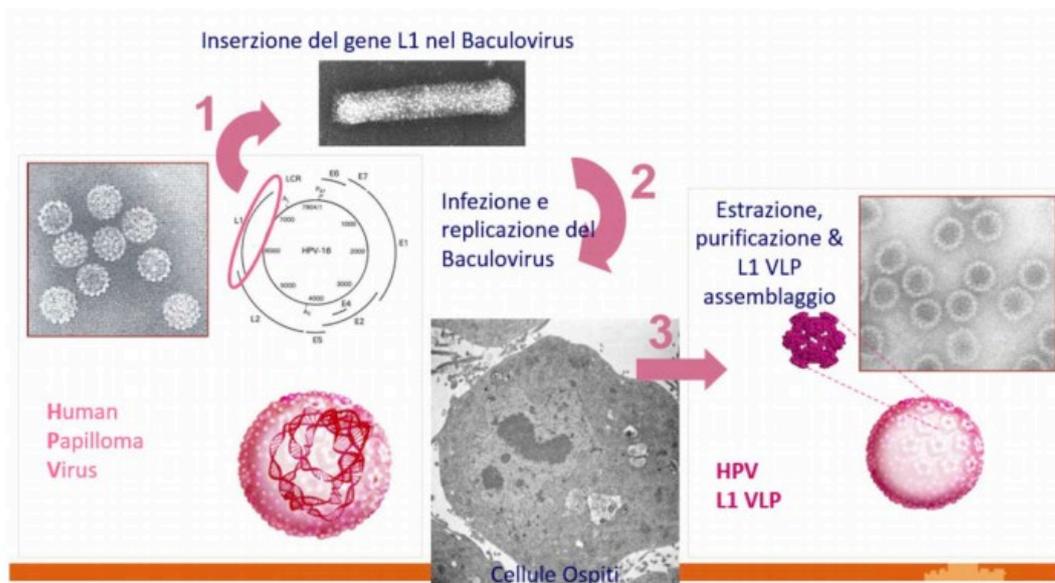
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7297083/>

²⁵⁷ Hervas-Stubbs S, Rueda P, Lopez L, Leclerc C.

Insect baculoviruses strongly potentiate adaptive immune responses by inducing type I IFN.

J Immunol. 2007 Feb 15;178(4):2361-9. doi: 10.4049/jimmunol.178.4.2361. Erratum in: *J Immunol*. 2007 May 15;178(10):6653.

<https://www.jimmunol.org/content/178/4/2361.long>



<https://salute.regione.emilia-romagna.it/screening/tumori-femminili/documentazione/atti-relativi-a-convegni-e-seminari-regionali/la-sorveglianza-epidemiologica-dello-screening-dei-tumori-del-collo-dell2019utero-in-emilia-romagna-15-marzo-2018/Pascucci.pdf>

Cellule di mammiferi e uccelli

Le VLP di HBsAg sono state prodotte con successo in cellule di mammifero (linea cellulare di ovaio di criceto cinese [CHO]) e sono risultate simili nella composizione e nella glicosilazione alle VLP delle proteine di HBsAg derivate dal plasma e alle VLP prodotte dal lievito per il contenuto lipidico.

Erano di dimensioni maggiori e consistevano in un numero maggiore di monomeri rispetto alle VLP derivate dal lievito, contribuendo a una maggiore immunogenicità delle VLP di origine mammifera.

Inoltre, in contrasto con le VLP HBsAg di origine dal lievito, le VLP HBsAg prodotte da cellule CHO hanno mostrato di avere una struttura tubolare.²⁵⁸

Cellule vegetali

Negli ultimi vent'anni, le piante hanno dimostrato un grande potenziale per la produzione di proteine ricombinanti per scopi industriali o farmaceutici, compreso lo sviluppo di vaccini.

Come piattaforme di produzione, i sistemi di espressione delle piante sono rapidi, altamente scalabili, economici e privi di agenti patogeni che possono essere presenti nei mammiferi.

Inoltre, la struttura, l'assemblaggio e le PTM delle proteine nelle piante sono simili a quelle delle cellule di mammifero.

L'espressione delle proteine ricombinanti nelle piante può essere ottenuta tramite l'introduzione stabile di un transgene nel genoma nucleare o plastidico, o mediante trasformazione transitoria utilizzando vettori virali vegetali²⁵⁹.

²⁵⁸ Diminsky D, Schirmbeck R, Reimann J, Barenholz Y.

Comparison between hepatitis B surface antigen (HBsAg) particles derived from mammalian cells (CHO) and yeast cells (*Hansenula polymorpha*): composition, structure and immunogenicity.

Vaccine. 1997 Apr-May;15(6-7):637-47. doi: 10.1016/s0264-410x(96)00239-3.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9178464/>

Patzer EJ, Nakamura GR, Simonsen CC, Levinson AD, Brands R.

Intracellular assembly and packaging of hepatitis B surface antigen particles occur in the endoplasmic reticulum.

J Virol. 1986;58(3):884-892. doi:10.1128/JVI.58.3.884-892.1986

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC252996/>

²⁵⁹ Mett V, Farrance CE, Green BJ, Yusibov V.

Plants as biofactories. Biologicals. 2008 Nov;36(6):354-8. doi: 10.1016/j.biologicals.2008.09.001. Epub 2008 Oct 19.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18938088/>

Yusibov V, Rabindran S.

Recent progress in the development of plant derived vaccines. Expert Rev Vaccines. 2008 Oct;7(8):1173-83. doi: 10.1586/14760584.7.8.1173.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18844592/>

Come per le cellule di mammifero, insetto e lievito, le piante possono essere utilizzate per produrre VLP sia senza involucro che con involucro.²⁶⁰

I vaccini VLP prodotti da piante sono stati prodotti su larga scala secondo le norme di buona pratica di fabbricazione (cGMP) e sono progrediti nello sviluppo clinico.²⁶¹

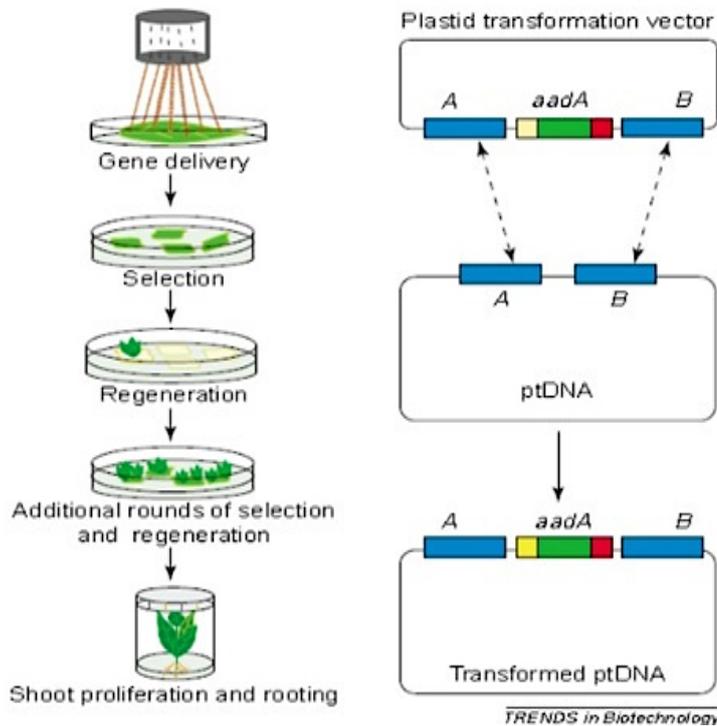


Fig.1

Fig.1 <https://upbiotech.wordpress.com/2018/12/27/trasformazione-dei-plastidi/>

La trasfezione all'interno dei plastidi si basa su due eventi di ricombinazione omologa che avvengono tra una regione di un vettore plasmidico e il genoma plastidico. Il vettore utilizzato per la trasfezione è un plasmide di E.coli che contiene, oltre alle due sequenze omologhe al genoma plastidico necessarie per la ricombinazione, il gene di interesse e un gene marker utile per la selezione efficace delle piante trasformate da quelle non trasformate. Uno dei marker più utilizzati in questo tipo di procedure è il gene aad che conferisce resistenza alla spectinomicina e alla streptomicina.

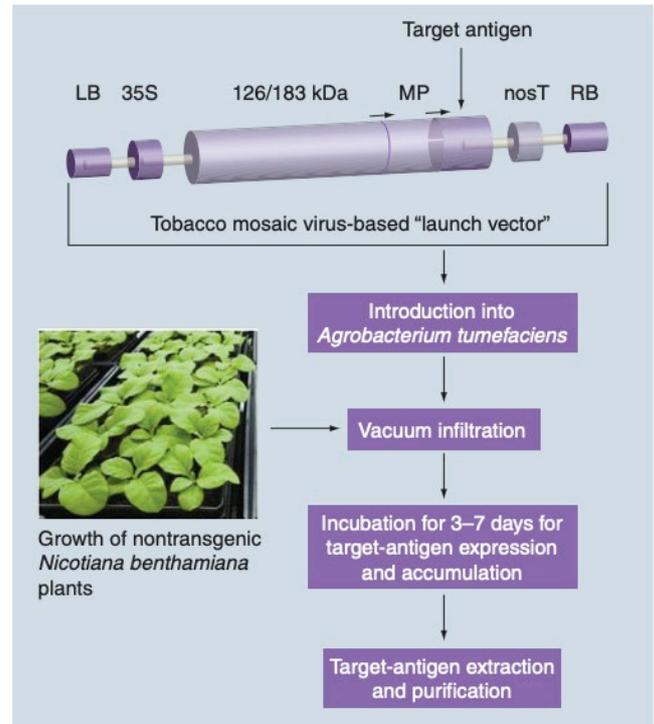


Fig.2

Fig.2 https://www.researchgate.net/publication/23308940_Recent_progress_in_the_development_of_plant-derived_vaccines

Diagramma schematico del sistema a vettore di lancio basato sul virus del mosaico del tabacco per la produzione di antigeni vaccinali in piante non transgeniche. Le frecce indicano le posizioni dei promotori di mRNA subgenomici. L'antigene bersaglio sostituisce la sequenza codificante la proteina del rivestimento. LB e RB si riferiscono rispettivamente al bordo sinistro e al bordo destro del T-DNA nel vettore binario *Agrobacterium tumefaciens*; questo T-DNA viene trasferito nei nuclei delle cellule vegetali in seguito ad agroinfiltrazione; 35S: promotore 35S del virus del mosaico del cavolfiore (un virus del DNA vegetale) che guida la trascrizione del transgene; MP: proteina di movimento richiesta per il movimento da cellula a cellula; nosT: terminatore trascrizionale nos dal gene nopalina sintasi di *A. tumefaciens*; 126 / 183kDa: proteine replicasi del virus del mosaico del tabacco necessarie per la replicazione del virus.

Sistemi senza cellule

Le VLP possono essere realizzate in vitro anche in condizioni prive di cellule²⁶² ed essere assemblate in virosomi utilizzando strutture simili alle membrane di VLP con involucro, o utilizzando impalcature polipeptidiche per creare nano-VLP simili alle VLP senza involucro.

²⁶⁰ D'Aoust MA, Lavoie PO, Couture MM, Trépanier S, Guay JM, Dargis M, Mongrand S, Landry N, Ward BJ, Vézina LP.

Influenza virus-like particles produced by transient expression in *Nicotiana benthamiana* induce a protective immune response against a lethal viral challenge in mice.

Plant Biotechnol J. 2008 Dec;6(9):930-40. doi: 10.1111/j.1467-7652.2008.00384.x.

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1467-7652.2008.00384.x>

Santi L, Batchelor L, Huang Z, et al.

An efficient plant viral expression system generating orally immunogenic Norwalk virus-like particles.

Vaccine. 2008;26(15):1846-1854. doi:10.1016/j.vaccine.2008.01.053

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2744496/>

²⁶¹ Landry N, Ward BJ, Trépanier S, et al.

Preclinical and clinical development of plant-made virus-like particle vaccine against avian H5N1 influenza.

PLoS One. 2010;5(12):e15559. Published 2010 Dec 22. doi:10.1371/journal.pone.0015559

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3008737/>

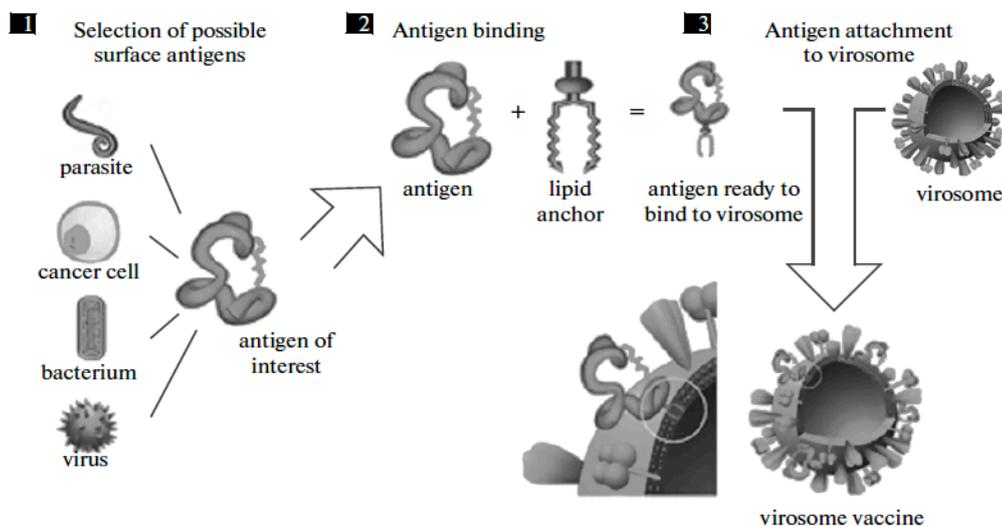
²⁶² Lua LH, Connors NK, Sainsbury F, Chuan YP, Wibowo N, Middelberg AP.

Bioengineering virus-like particles as vaccines.

Le nano-VLP sono uno degli ultimi sviluppi in questo campo e sono state testate solo in un contesto pre-clinico.²⁶³

L'approccio utilizza le proprietà naturali degli amminoacidi di un polipeptide di autoassemblarsi e consente l'inserimento di epitopi immunogenici.²⁶⁴

I virosomi rappresentano essenzialmente VLP con involucro assemblati in vitro piuttosto che all'interno di una cellula ospite.



https://www.researchgate.net/publication/51073781_Synthetic_peptide_vaccines
Vaccino a base di virosomi: fasi dello sviluppo del vaccino virosomico.

Fig.1 <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/ebo.11.8>
(A) virus influenzale. (B) virosoma influenzale senza carico utile. (C) virosoma influenzale che mostra l'antigene non influenzale sulla sua superficie.

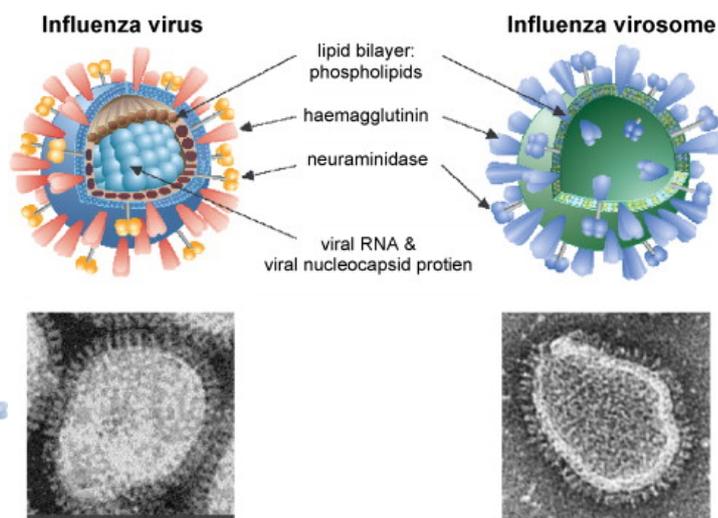


Fig. 2 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X09007063>
I virosomi sono involucri del virus dell'influenza ricostituiti privi di nucleo interno e informazioni genetiche. Imitando i virus influenzali nativi, i virosomi mantengono l'entrata cellulare e le proprietà di fusione di membrana che consentono la presentazione alla via MHC di classe I e II.

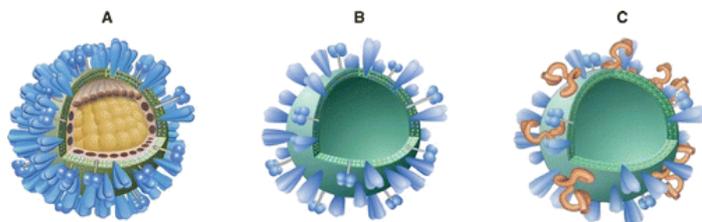


Fig.1

Fig. 2

Fig.1 <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/ebo.11.8>

Biotechnol Bioeng. 2014 Mar;111(3):425-40. doi: 10.1002/bit.25159. Epub 2013 Dec 17.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24347238/>

Jiayuan Sheng, Shaohua Lei, Lijuan Yuan and Xueyang Feng
Cell-free protein synthesis of norovirus virus-like particles
RSC Adv., 2017, 7, 28837-28840 DOI: 10.1039/C7RA03742B
<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2017/ra/c7ra03742b>

Spice AJ, Aw R, Bracewell DG, Polizzi KM.
Synthesis and Assembly of Hepatitis B Virus-Like Particles in a Pichia pastoris Cell-Free System.
Front Bioeng Biotechnol. 2020;8:72. Published 2020 Feb 14. doi:10.3389/fbioe.2020.00072
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7033515/>

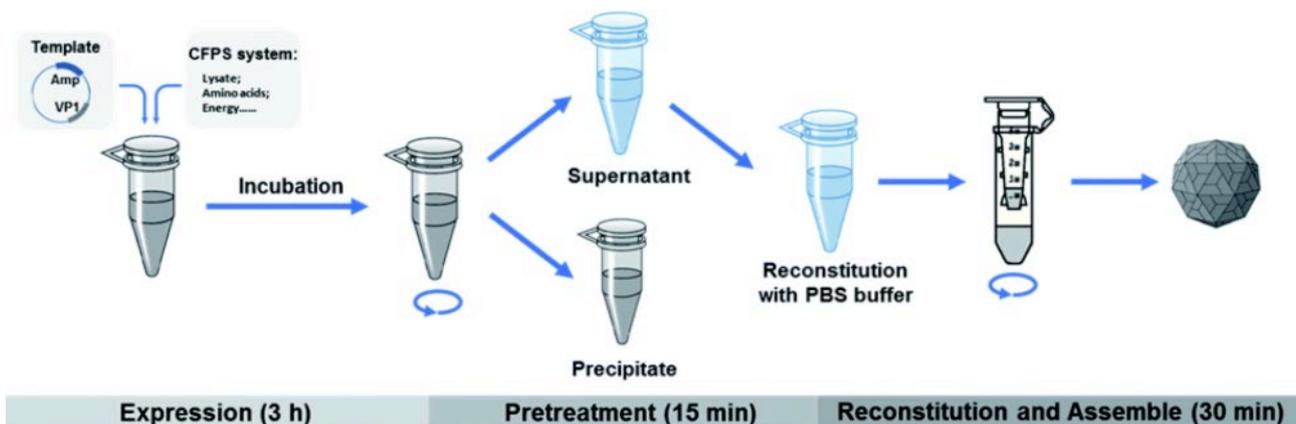
²⁶³ Hashemzadeh A, Avan A, Ferns GA, Khazaei M.
Vaccines based on virus-like nano-particles for use against Middle East Respiratory Syndrome (MERS) coronavirus.
Vaccine. 2020 Aug 10;38(36):5742-5746. doi: 10.1016/j.vaccine.2020.07.003. Epub 2020 Jul 11.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32684497/>

²⁶⁴ Kushnir N, Streatfield SJ, Yusibov V.
Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: diversity of targets and production systems and advances in clinical development.
Vaccine. 2012;31(1):58-83. doi:10.1016/j.vaccine.2012.10.083
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7115575/>

Per la produzione di virosomi, un virus parentale purificato e inattivato subisce la dissociazione con detergente per separare la frazione dell'involucro contenente lipidi e proteine virali associate alla membrana, dal complesso centrale contenente proteine interne e materiale genetico.

Dopo la rimozione del detergente, i componenti della frazione dell'involucro si assemblano in particelle virosomiche vuote.

A seconda del tipo desiderato di risposta immunitaria che deve essere indotta dal vaccino virosomiale, l'antigene ricombinante o sintetico può essere visualizzato sulla superficie del virosoma (mediante integrazione o ancoraggio nel doppio strato lipidico, legame incrociato con proteine virali associate alla membrana tramite un ancoraggio lipidico, o assorbimento alla superficie del doppio strato) o incorporati nel suo lume, stimolando rispettivamente la produzione di anticorpi o le risposte CTL.²⁶⁵



<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2017/ra/c7ra03742b>

Formulazione dei vaccini a VLP

La formulazione di un vaccino si riferisce ai componenti che costituiscono la soluzione finale somministrabile, compreso il vettore del vaccino, gli adiuvanti e gli eccipienti.

Per i vaccini a VLP, questi eccipienti possono includere una varietà di sali e composti preparati come soluzione acquosa o emulsione, che servono per mantenere la stabilità fisica della VLP per una maggiore durata di conservazione del vaccino.

Un uso appropriato dei tamponi può limitare le fluttuazioni del pH, mentre la protezione dalle fluttuazioni della temperatura e dall'essiccazione può essere fornita rispettivamente dai termoprotettori e dai lioprotettori.

La scienza della formulazione implica lo studio dei vari componenti di un vaccino in diverse condizioni ambientali, con l'intenzione di formulare un prodotto vaccinale stabile adatto per la via di somministrazione e con immunogenicità massimizzata.

²⁶⁵ Moser C, Amacker M, Zurbriggen R.

Influenza virosomes as a vaccine adjuvant and carrier system.

Expert Rev Vaccines. 2011 Apr;10(4):437-46. doi: 10.1586/erv.11.15.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21506642/>

Herzog C, Hartmann K, Künzi V, Kürsteiner O, Mischler R, Lazar H, Glück R.

Eleven years of Inflenza V-a virosomal adjuvanted influenza vaccine.

Vaccine. 2009 Jul 16;27(33):4381-7. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.05.029. Epub 2009 May 29.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19450630/>

Moysa, Alexander & Kolesanova, Ekaterina. (2010).

Synthetic peptide vaccines.

Biomeditsinskaia khimiia. 57. 14-30. 10.1134/S1990750810040025.

https://www.researchgate.net/publication/51073781_Synthetic_peptide_vaccines

Sanjib Bhattacharya, Bhaskar Mazumder

Virosomes: A Novel Strategy for Drug Delivery and Targeting

BioPharm International, BioPharm International-01-02-2011, Volume 2011 Supplement, Issue 1

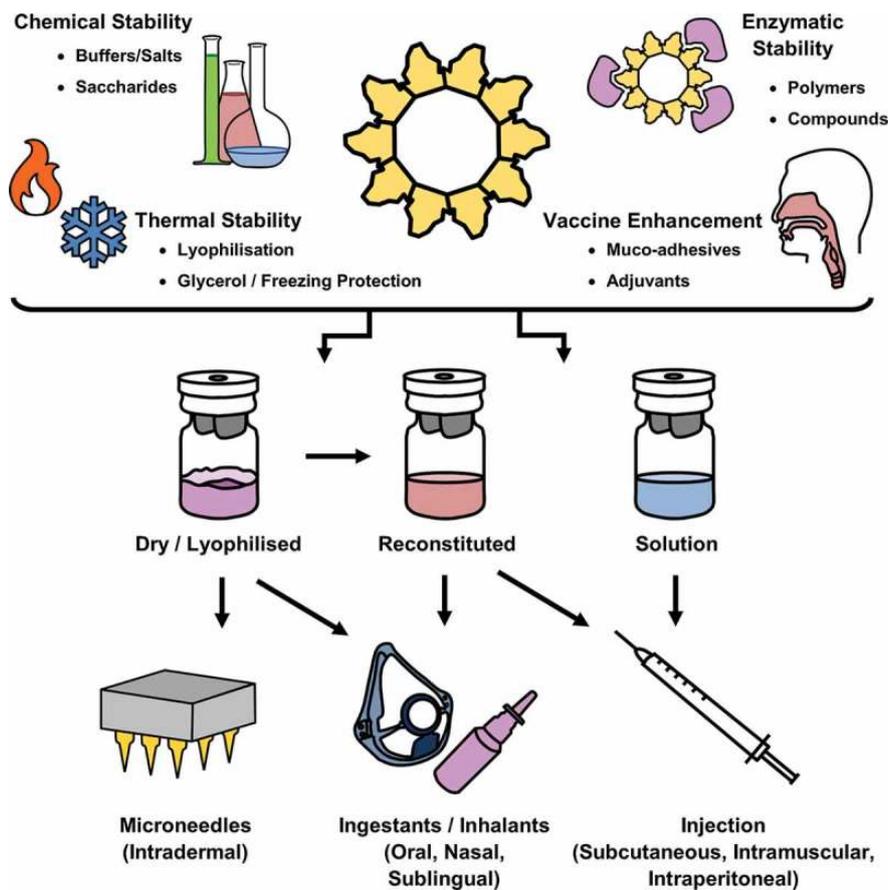
<https://www.biopharminternational.com/view/virosomes-novel-strategy-drug-delivery-and-targeting>

Singh, Narinder & Gautam, Surya & Kumari, Neelam & Kaur, Rupinder & Kaur, Manpreet. (2017).

Virosomes as Novel drug delivery System: An Overview. 5.

https://www.researchgate.net/publication/322118262_Virosomes_as_Novel_drug_delivery_System_An_Overview

La combinazione dei componenti della formulazione, degli stati di preparazione del vaccino a VLP e le vie di somministrazione sono delineate nella seguente figura.



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7103734/>

I ruoli della scienza della formulazione nei vaccini VLP.

Il ruolo della scienza della formulazione nella produzione di vaccini VLP include la composizione chimica di tamponi, conservanti, additivi e altri composti stabilizzanti per mantenere intatto la VLP. Ciò include la protezione del VLP dall'instabilità chimica o fisica e dalla degradazione enzimatica. Le formulazioni possono anche includere composti di rilascio mirati, come muco-adesivi e componenti immunogenici come adiuvanti. Anche la conservazione e la distribuzione dei vaccini a VLP e la successiva via di somministrazione sono considerazioni importanti nella scienza della formulazione, fondamentali per determinare l'efficacia e l'immunogenicità del vaccino.

La maggior parte dei vaccini a VLP attualmente sul mercato e in fase di valutazione clinica sono sospensioni liquide, pronte per la somministrazione.

Ciò pone rigide limitazioni alla conservazione e alla distribuzione del vaccino VLP per una somministrazione sicura e conforme. Ad esempio, il vaccino HPV commerciale Gardasil (Merck) deve essere refrigerato a 2–8 ° C e protetto dalla luce.

Gardasil non può essere congelato e le linee guida per l'uso di Gardasil consigliano di utilizzare il vaccino entro 72 ore se rimosso dal frigorifero a temperature inferiori a 25 ° C o se conservato a 0–2 ° C. Queste linee guida rispecchiano quelle di molti altri vaccini VLP commerciali e delineano le principali sfide di stabilità, conservazione e distribuzione che la scienza della formulazione deve indagare.²⁶⁶

Vaccini contro i coronavirus²⁶⁷

Nel caso dei coronavirus con involucro, le VLP si formano quando le proteine virali S, M ed E, con o senza N, sono co-esprese nelle cellule produttrici eucariotiche²⁶⁸.

²⁶⁶ Donaldson B, Lateef Z, Walker GF, Young SL, Ward VK. Virus-like particle vaccines: immunology and formulation for clinical translation. *Expert Rev Vaccines*. 2018;17(9):833-849. doi:10.1080/14760584.2018.1516552 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7103734/>

²⁶⁷ Jeyanathan M, Afkhami S, Smaill F, Miller MS, Lichty BD, Xing Z. Immunological considerations for COVID-19 vaccine strategies. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(10):615-632. doi:10.1038/s41577-020-00434-6 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7472682/>

²⁶⁸ Lu X, Chen Y, Bai B, et al. Immune responses against severe acute respiratory syndrome coronavirus induced by virus-like particles in mice. *Immunology*. 2007;122(4):496-502. doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02676.x <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2266036/>

Lokugamage KG, Yoshikawa-Iwata N, Ito N, Watts DM, Wyde PR, Wang N, Newman P, Kent Tseng CT, Peters CJ, Makino S. Chimeric coronavirus-like particles carrying severe acute respiratory syndrome coronavirus (SCoV) S protein protect mice against challenge with SCoV. *Vaccine*. 2008 Feb 6;26(6):797-808. doi: 10.1016/j.vaccine.2007.11.092. Epub 2007 Dec 26.

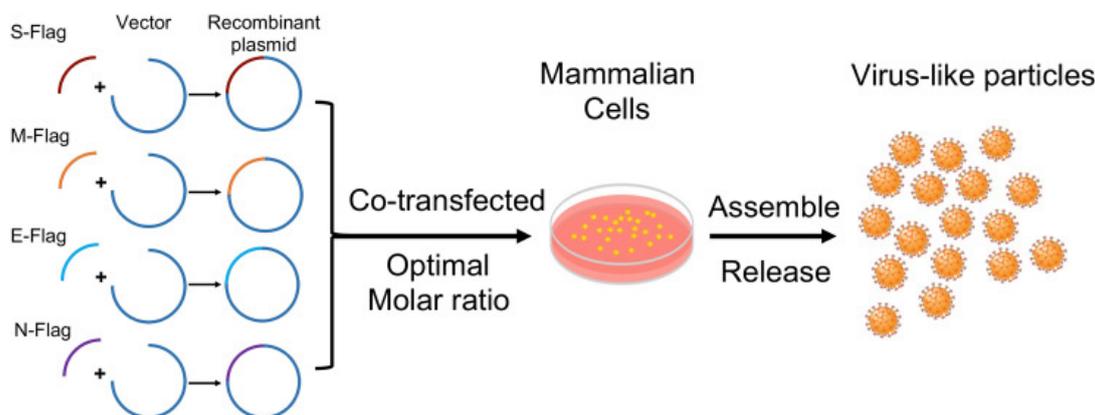
Ciò si traduce in un germogliamento attivo dalle cellule produttrici di VLP che sono strutturalmente identiche al virus infettivo ma mancano del genoma virale e quindi non sono infettive.

La presenza della proteina S sulla superficie delle VLP consente loro di legarsi ed entrare nelle cellule ACE2⁺ allo stesso modo del virus genitore²⁶⁹.

A differenza dei vaccini a subunità, la proteina S sulla superficie del VLP reticola il recettore delle cellule B e attiva direttamente le cellule B, ma come per i vaccini a subunità e inattivati, anche le VLP richiedono tipicamente un adiuvante²⁷⁰ e una somministrazione ripetuta²⁷¹.

In maniera simile ad altri membri della famiglia dei coronavirus, la proteina M del SARS-CoV-2 è la proteina dell'involucro più abbondante che spinge altri componenti strutturali ad assemblarsi nelle VLP.

Sebbene la proteina E sia stata anche implicata nella morfogenesi e nel rilascio virale, l'azione meccanicistica rimane non chiarita. La proteina S, che è responsabile del legame del recettore, della fusione di membrana e come bersaglio dello sviluppo di farmaci e vaccini, e la proteina N che incapsula il genoma virale in virioni, non sembrano avere ruoli indispensabili nell'assemblaggio delle VLP del SARS-CoV-2.²⁷²



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7409377/>
Schema delle costruzioni di SARS-CoV-2 VLP nel sistema di espressione dei mammiferi.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2267761/>

²⁶⁹ Naskalska A, Dabrowska A, Nowak P, et al.
Novel coronavirus-like particles targeting cells lining the respiratory tract.
PLoS One. 2018;13(9):e0203489. Published 2018 Sep 5. doi:10.1371/journal.pone.0203489
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6124810/>

²⁷⁰ Cimica V, Galarza JM.
Adjuvant formulations for virus-like particle (VLP) based vaccines.
Clin Immunol. 2017;183:99-108. doi:10.1016/j.clim.2017.08.004
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5673579/>

²⁷¹ Donaldson B, Lateef Z, Walker GF, Young SL, Ward VK.
Virus-like particle vaccines: immunology and formulation for clinical translation.
Expert Rev Vaccines. 2018;17(9):833-849. doi:10.1080/14760584.2018.1516552
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7103734/>

²⁷² Xu R, Shi M, Li J, Song P, Li N.
Construction of SARS-CoV-2 Virus-Like Particles by Mammalian Expression System [published correction appears in Front Bioeng Biotechnol. 2020 Sep 09;8:1026]. Front Bioeng Biotechnol. 2020;8:862. Published 2020 Jul 30. doi:10.3389/fbioe.2020.00862
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7409377/>

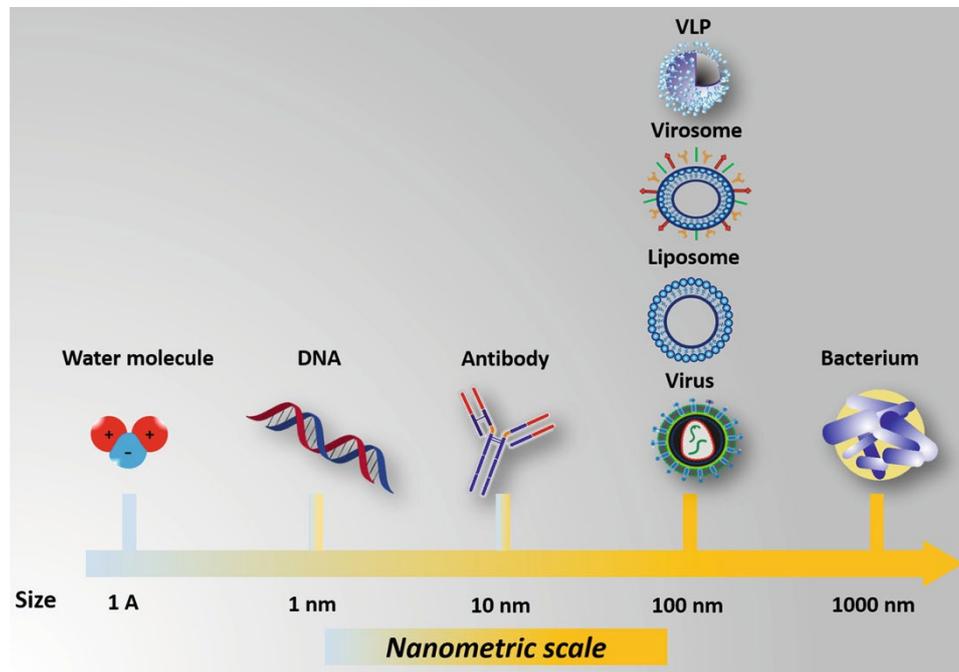
Swann H, Sharma A, Preece B, et al.
Minimal system for assembly of SARS-CoV-2 virus like particles.
Sci Rep. 2020;10(1):21877. Published 2020 Dec 14. doi:10.1038/s41598-020-78656-w
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7736577/>

Sharma A, Preece B, Swann H, et al.
Structural stability of SARS-CoV-2 virus like particles degrades with temperature.
Biochem Biophys Res Commun. 2021;534:343-346. doi:10.1016/j.bbrc.2020.11.080
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7699159/>

Ghorbani A, Zare F, Sazegari S, Afsharifar A, Eskandari MH, Pormohammad A.
Development of a novel platform of virus-like particle (VLP)-based vaccine against COVID-19 by exposing epitopes: an immunoinformatics approach.
New Microbes New Infect. 2020 Nov;38:100786. doi: 10.1016/j.nmni.2020.100786. Epub 2020 Oct 14.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7556220/>

VACCINI A NANOPARTICELLE

I vaccini a nanoparticelle (NP) sono prodotti reticolando chimicamente antigeni proteici e molecole carrier per aumentare l'immunogenicità e diminuire la degradazione degli antigeni²⁷³. Questi veicoli possono essere organici (principalmente a base di lipidi) o inorganici (principalmente a base di polimeri o metalli)²⁷⁴.



https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-31668-6_1

²⁷³ Frietze KM, Peabody DS, Chackerian B.
Engineering virus-like particles as vaccine platforms.
Curr Opin Virol. 2016;18:44-49. doi:10.1016/j.coviro.2016.03.001
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4983494/>

Zhao L, Seth A, Wibowo N, Zhao CX, Mitter N, Yu C, Middelberg AP.
Nanoparticle vaccines.
Vaccine. 2014 Jan 9;32(3):327-37. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.11.069. Epub 2013 Dec 2.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X13016319?via%3Dihub>

Kheirollahpour M, Mehrabi M, Dounighi NM, Mohammadi M, Masoudi A.
Nanoparticles and Vaccine Development.
Pharm Nanotechnol. 2020;8(1):6-21. doi: 10.2174/2211738507666191024162042.
https://www.researchgate.net/publication/336785181_Nanoparticles_and_Vaccine_Development

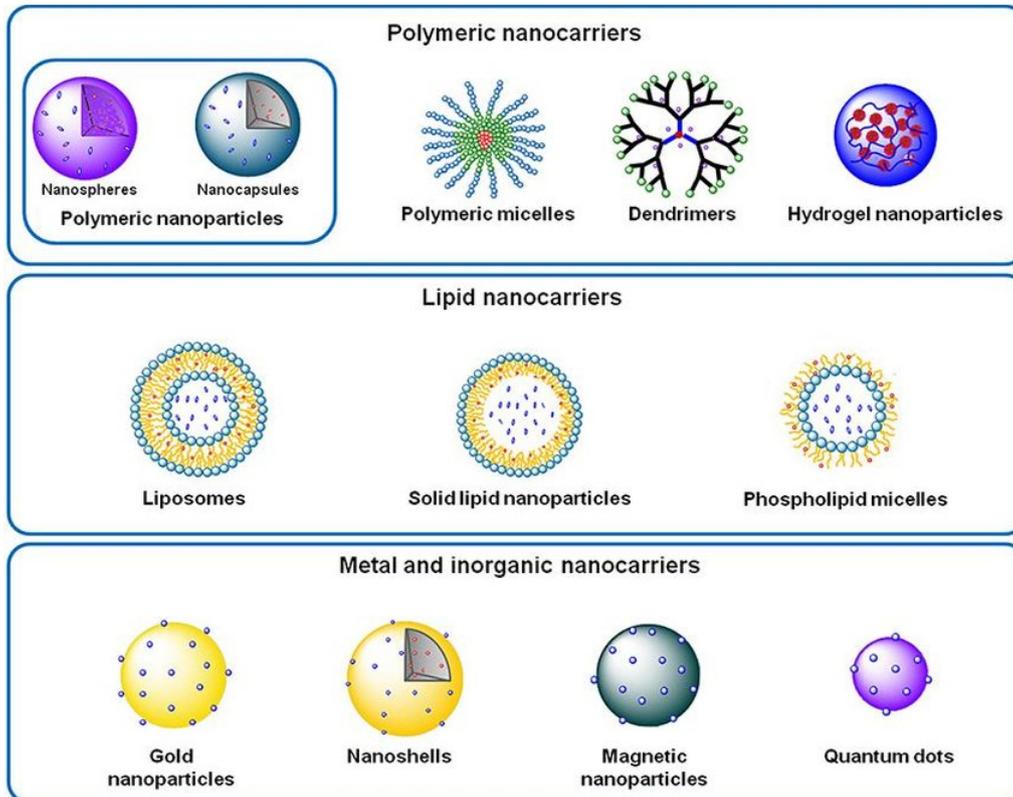
Mamo T, Poland GA.
Nanovaccinology: the next generation of vaccines meets 21st century materials science and engineering.
Vaccine. 2012 Oct 19;30(47):6609-11. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.08.023.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23067445/>

Dhande, Rahul & Patel, Arpita & Thakkar, Hetal. (2015).
Nanopharmaceuticals: A Boon or Bane.
https://www.researchgate.net/publication/281456859_Nanopharmaceuticals_A_Boon_or_Bane

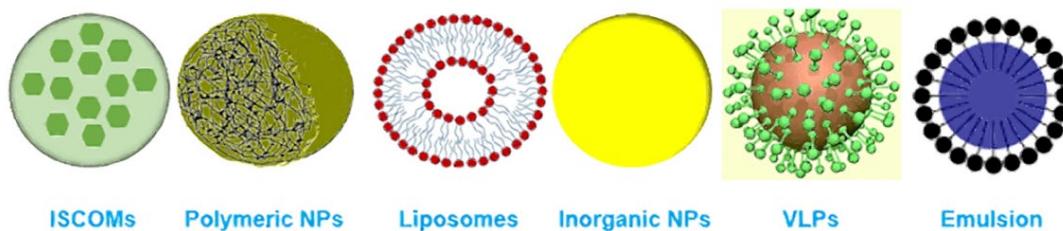
²⁷⁴ Pati R, Shevtsov M, Sonawane A.
Nanoparticle Vaccines Against Infectious Diseases.
Front Immunol. 2018;9:2224. Published 2018 Oct 4. doi:10.3389/fimmu.2018.02224
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6180194/>

Mi-Gyeong Kim, Joo Yeon Park, Yuna Shon, Gunwoo Kim, Gayong Shim, Yu-Kyoung Oh,
Nanotechnology and vaccine development
Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, Volume 9, Issue 5, 2014, Pages 227-235, ISSN 1818-0876,
<https://doi.org/10.1016/j.ajps.2014.06.002>
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S181808761400035X>

Rosales-Mendoza S., González-Ortega O. (2019)
Nanovaccines and the History of Vaccinology.
In: Nanovaccines. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-31668-6_1
https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-31668-6_1



https://www.researchgate.net/publication/281456859_Nanopharmaceuticals_A_Boon_or_Bane



https://www.researchgate.net/publication/336785181_Nanoparticles_and_Vaccine_Development
Structure of nanocarriers for vaccine antigen delivery.

Le NP hanno tassi di stabilità altrettanto elevati quanto quelli delle VLP, ma non stimolano la risposta immunitaria innata nella stessa misura delle VLP.

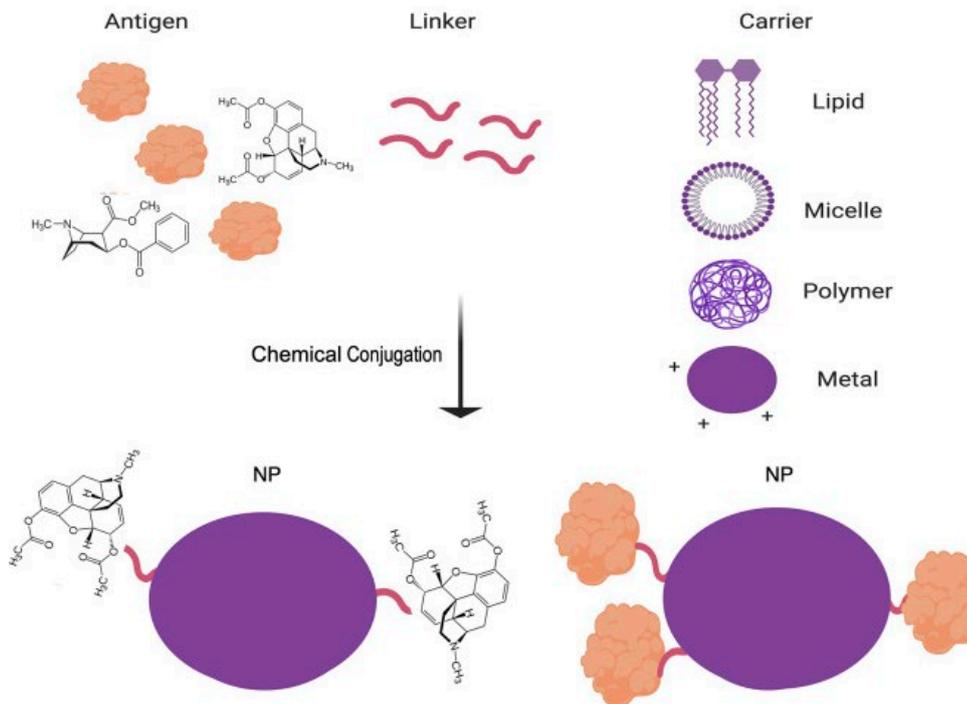
Tuttavia, le NP sono più semplici nella progettazione rispetto alle VLP perché mancano dei molteplici componenti proteici delle VLP, che riducono ulteriormente il loro costo di produzione e aumentano la loro riproducibilità e sicurezza.

Le sfide associate alla diminuzione dell'immunogenicità dei vaccini NP rispetto ai vaccini VLP possono essere in parte affrontate adattando il vettore per l'antigene desiderato in base a fattori quali dimensione, carica superficiale, forma e idrofobicità.²⁷⁵

²⁷⁵ Al-Halifa S, Gauthier L, Arpin D, Bourgault S, Archambault D. Nanoparticle-Based Vaccines Against Respiratory Viruses. *Front Immunol.* 2019;10:22. Published 2019 Jan 24. doi:10.3389/fimmu.2019.00022 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6353795/>

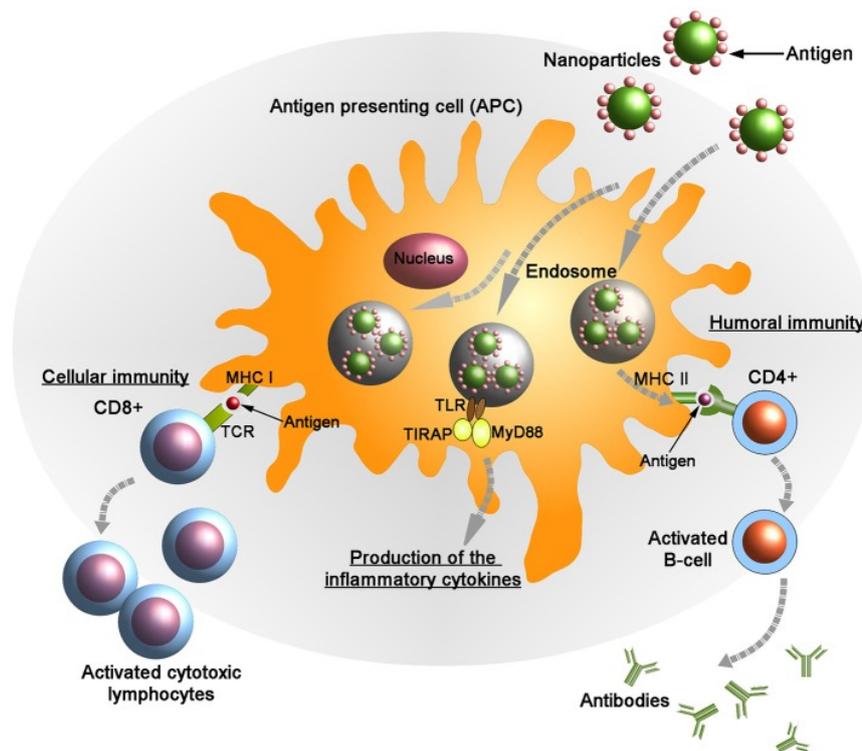
Zhao L, Seth A, Wibowo N, Zhao CX, Mitter N, Yu C, Middelberg AP. Nanoparticle vaccines. *Vaccine.* 2014 Jan 9;32(3):327-37. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.11.069. Epub 2013 Dec 2. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X13016319?via%3Dihub>

Kheirollahpour M, Mehrabi M, Dounighi NM, Mohammadi M, Masoudi A. Nanoparticles and Vaccine Development. *Pharm Nanotechnol.* 2020;8(1):6-21. doi: 10.2174/2211738507666191024162042. https://www.researchgate.net/publication/336785181_Nanoparticles_and_Vaccine_Development



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7554600/>
Schema della produzione di vaccini NP. La metodologia per produrre vaccini NP è riassunta in questa vignetta. In breve, i vaccini NP vengono prodotti assemblando un complesso di antigeni, una molecola linker e una molecola trasportatrice mediante coniugazione chimica.

Inoltre, i vettori possono essere utilizzati per indirizzare direttamente le NP alle cellule immunitarie e per aumentare la presentazione incrociata da parte delle cellule presentanti l'antigene (APC).²⁷⁶

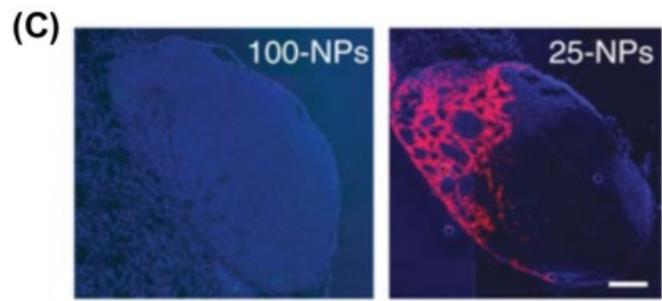
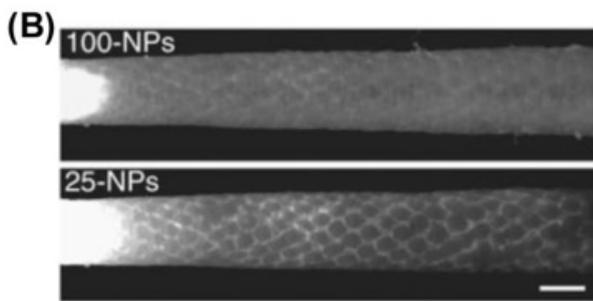
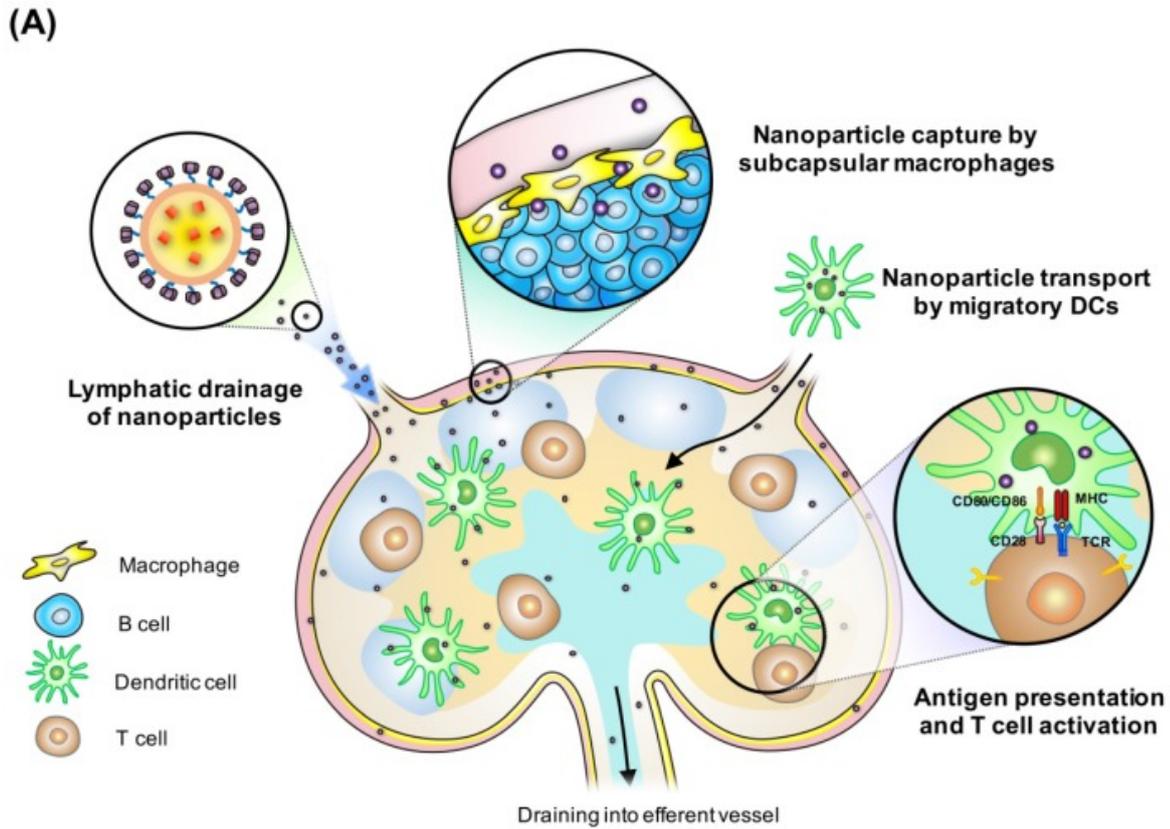


<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6180194/>
Trasporto mirato di molecole antigeniche utilizzando nanoparticelle ingegnerizzate in superficie nelle cellule presentanti l'antigene (APC). Gli antigeni endogeni generati sono presentati in un complesso con il complesso maggiore di istocompatibilità di classe I (MHC I) sulla membrana delle APC ai linfociti T CD8⁺. A seguito dell'interazione tra MHC I e il recettore delle cellule T (TCR) in presenza di molecole co-stimolatorie e citochine, le cellule CD8⁺ attivate uccidono le cellule infette inducendo citotossicità. Anche gli antigeni vengono presentati sulla superficie APC da molecole MHC di classe II ai linfociti T helper (CD4⁺). Successivamente, le cellule CD4⁺ attivano le cellule B che producono anticorpi antimicrobici. Dopo la stimolazione, le proteine adattatrici MyD88 (marker di differenziazione mieloide 88) e TIRAP (dominio TIR contenente la proteina dell'adattatore) si colocalizzano con TLR (recettore toll-like) consentendo l'attivazione della via NF-κB e portando alla produzione di citochine pro-infiammatorie

²⁷⁶ Chattopadhyay S, Chen JY, Chen HW, Hu CJ. Nanoparticle Vaccines Adopting Virus-like Features for Enhanced Immune Potentiation. *Nanotheranostics*. 2017;1(3):244-260. Published 2017 Jun 9. doi:10.7150/ntno.19796 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5646730/>

Kelly HG, Kent SJ, Wheatley AK. Immunological basis for enhanced immunity of nanoparticle vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2019 Mar;18(3):269-280. doi: 10.1080/14760584.2019.1578216. Epub 2019 Feb 14. PMID: 30707635. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30707635/>

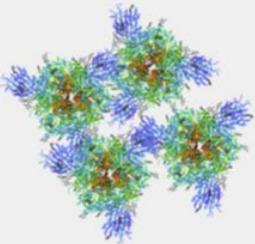
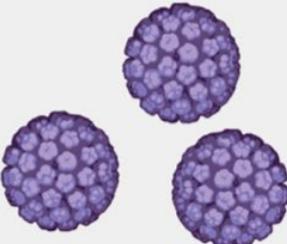
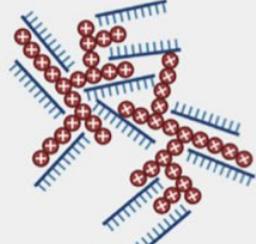
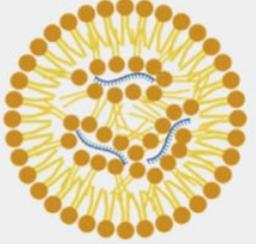
Gause KT, Wheatley AK, Cui J, Yan Y, Kent SJ, Caruso F. Immunological Principles Guiding the Rational Design of Particles for Vaccine Delivery. *ACS Nano*. 2017 Jan 24;11(1):54-68. doi: 10.1021/acsnano.6b07343. Epub 2017 Jan 11. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28075558/>



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5646730/>

(A) Schemi che illustrano i meccanismi alla base e i vantaggi del rilascio nei linfonodi da parte dei vaccini con nanoparticelle. Le nanoparticelle possono sfruttare il trasporto sia cellulo-mediato che convettivo per la localizzazione nei linfonodi. Le particelle che entrano nei linfonodi attraverso il drenaggio linfatico interstiziale vengono catturate dai macrofagi residenti nei linfonodi. Il rilascio facilitato dell'antigene da parte delle nanoparticelle facilita la presentazione dell'antigene e l'attivazione delle cellule T. (B) Imaging microlimangiografico a fluorescenza di nanoparticelle da 100 nm e 25 nm dopo iniezione tailed-based. Le particelle da 25 nm attraversano più efficacemente la rete linfatica. (C) Le nanoparticelle da 25 nm possono accumularsi in modo più efficiente nei linfonodi rispetto alle nanoparticelle da 100 nm, come evidenziato dalla microscopia a fluorescenza.

Di seguito si riassumono le varie piattaforme in fase di sperimentazione che impiegano le tecnologie a nanoparticelle per i vaccini contro il SARS-Cov-2. Ciascun tipo di piattaforma è discusso nelle sezioni dedicate.

			
<p>Protein Nanoparticles Proteins are made to assemble into aggregate nanoparticles through covalent linkages, ionic interaction, linker molecules (avidin/biotin) or other means.</p> <p><u>Advantages:</u> BCR clustering through stimulation with multimeric antigens produces more robust B cell activation, potentially recapitulates quaternary epitopes from the SARS-CoV-2 virion.</p> <p><u>Challenges:</u> Must be expressed, stored, and delivered without degradation or denaturation. Proteins delivered without adjuvant may require larger doses.</p> <p><u>FDA Approval:</u> None. FluBlok is protein based and approved for influenza but does not form nanoparticles.</p> <p><u>Technology:</u> Aggregate spike protein particle co-delivered with Matrix M (Novavax).</p>	<p>Virus-like Particle Viral protein antigens self assemble into nanoparticle that closely resembles that of a virus.</p> <p><u>Advantages:</u> Similar advantages to protein nanoparticles. Antigens recapitulate the surface of the virion surface.</p> <p><u>Challenges:</u> Precise ratios of each component which induce self-assembly upon expression must be determined. Expression of particles often competes with expression of free antigens or aggregates. Adjuvant co-delivery is often required.</p> <p><u>FDA Approval:</u> VLPs are approved as vaccines (e.g., Cervarix, Gardasil).</p> <p><u>Technology:</u> VLPs presenting spike protein. (Medicago, SpyBiotech/Serum Institute of India)</p>	<p>Polyplex Positively charged polymers ionically interact with nucleotides, forming a nanoparticle complex.</p> <p><u>Advantages:</u> Neutralization of charge as well as particle size can facilitate uptake by APCs. Nucleotides maybe partially or fully protected by polymer.</p> <p><u>Challenges:</u> Cationic polymers can adduct host DNA and can have toxicity concerns.</p> <p><u>FDA Approval:</u> Polyplexes are approved for topical application as wound dressing.</p> <p><u>Technology:</u> Branched Poly(β-amino ester) (PBAE) to deliver mRNA encoding spike protein for pulmonary delivery (Translate Bio).</p>	<p>Lipid Nanoparticle Positively charged liposomes ionically interact with nucleotides to form a nanoparticle or complex.</p> <p><u>Advantages:</u> Charge neutralization and size can facilitate APC uptake.</p> <p><u>Challenges:</u> Nucleotides potentially available for degradation. Pre-existing or induced immunity against PEG and phosphorylcholine. Cationic lipids can adduct host DNA and have toxicity concerns. Often requires very low storage temperatures.</p> <p><u>FDA Approval:</u> Liposomes and lipid complexes have been approved for decades, and internationally inactivated virus in lipids has been approved as a vaccine. siRNA based lipid carriers are FDA approved.</p> <p><u>Technology:</u> Lipid complex with mRNA encoding spike protein (Moderna, BioNTech, CureVac).</p>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7733686/pdf/main.pdf>

APPROFONDIMENTO: NANOTOSSICOLOGIA

Mentre la nanotecnologia e la produzione di nanoparticelle stanno crescendo in modo esponenziale, l'impatto tossicologico e il possibile rischio delle nanoparticelle per la salute umana e l'ambiente rimangono ancora molto da indagare.²⁷⁷

I **nanomateriali** (NM) sono materiali naturali o artificiali a base di particelle nanometriche in uno stato disaggregato o sotto forma di un aggregato/agglomerato²⁷⁸ con una distribuzione numero-dimensione del 50% o più delle particelle che hanno una o più dimensioni esterne nell'intervallo di dimensioni compreso tra 1 e 100 nanometri²⁷⁹.

A causa delle piccole dimensioni delle particelle e dei cambiamenti nella loro struttura interna, gli NM possono avere proprietà diverse che dipendono da un rapporto tra area superficiale e volume più elevato²⁸⁰. Pertanto, le proprietà fisico-chimiche degli NM possono differire dalle proprietà delle sostanze granulari o delle particelle più grandi²⁸¹.

L'Organizzazione internazionale per la standardizzazione (ISO) ha definito il nanomateriale come un materiale con qualsiasi dimensione esterna su nanoscala ("nano-oggetto") o con una struttura interna o superficiale su nanoscala ("materiale nanostrutturato")²⁸².

In particolare, un **nano-oggetto** è definito come una porzione di materiale discreto con una, due o tre dimensioni esterne su nanoscala.

Le "**nanoparticelle**" sono nano-oggetti con tutte le dimensioni esterne su nanoscala, dove le lunghezze degli assi più lungo e più corto non differiscono in modo significativo.

²⁷⁷ Zielińska A, Costa B, Ferreira MV, et al.

Nanotoxicology and Nanosafety: Safety-By-Design and Testing at a Glance.

Int J Environ Res Public Health. 2020;17(13):4657. Published 2020 Jun 28. doi:10.3390/ijerph17134657

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7369733/>

Elsaesser A, Howard CV.

Toxicology of nanoparticles.

Adv Drug Deliv Rev. 2012 Feb;64(2):129-37. doi: 10.1016/j.addr.2011.09.001. Epub 2011 Sep 8.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21925220/>

²⁷⁸ Boverhof DR, Bramante CM, Butala JH, Clancy SF, Lafranconi M, West J, Gordon SC.

Comparative assessment of nanomaterial definitions and safety evaluation considerations.

Regul Toxicol Pharmacol. 2015 Oct;73(1):137-50. doi: 10.1016/j.yrtph.2015.06.001. Epub 2015 Jun 23.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0273230015001488?via%3Dihub>

²⁷⁹ Rigano, Luigi & Lionetti, Nicola.

Nanobiomaterials in galenic formulations and cosmetics.

(2016). 10.1016/B978-0-323-42868-2.00006-1.

https://www.researchgate.net/publication/303413371_Nanobiomaterials_in_galenic_formulations_and_cosmetics

EFSA Scientific Committee, Hardy A, Benford D, et al.

Guidance on risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain: Part 1, human and animal health.

EFSA J. 2018;16(7):e05327. Published 2018 Jul 4. doi:10.2903/j.efsa.2018.5327

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7009542/>

²⁸⁰ Li X, Liu W, Sun L, Aifantis KE, Yu B, Fan Y, Feng Q, Cui F, Watari F.

Effects of physicochemical properties of nanomaterials on their toxicity.

J Biomed Mater Res A. 2015 Jul;103(7):2499-507. doi: 10.1002/jbm.a.35384. Epub 2014 Dec 19.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25530348/>

²⁸¹ Shin SW, Song IH, Um SH.

Role of Physicochemical Properties in Nanoparticle Toxicity.

Nanomaterials (Basel). 2015;5(3):1351-1365. Published 2015 Aug 19. doi:10.3390/nano5031351

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5304630/>

²⁸² Nanotechnologies — Plain language explanation of selected terms from the ISO/IEC 80004 series

<https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:tr:18401:ed-1:v1:en>

<https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:ts:80004:-2:ed-1:v1:en>

Se le dimensioni differiscono in modo significativo, tipicamente di più di un fattore tre, altri termini, come "**nanofibra**" (due dimensioni esterne in nanoscala) o "**nanoplate**" (una dimensione esterna su nanoscala) possono essere preferiti al termine nanoparticella.

A sua volta, un "**materiale nanostrutturato**" è definito come un materiale avente una nanostruttura interna o superficiale in cui una o più parti sono in una regione su nanoscala. La "**nanoscala**" è compresa tra circa 1 e 100 nm (ISO, 2017).

Secondo il vocabolario ISO delle nanotecnologie, un '**nano-oggetto ingegnerizzato**' è definito come un nano-oggetto progettato per uno scopo o una funzione specifica; un '**prodotto nano-oggetto**' è definito come nano-oggetto prodotto intenzionalmente per avere proprietà o composizione selezionate, e un '**nano-oggetto accidentale**' è definito come nano-oggetto generato come sottoprodotto non intenzionale di un processo (ISO, 2017).

Secondo le ISO, la dimensione è il parametro chiave per l'identificazione di un nanomateriale. Tutti i nanomateriali si presentano con una distribuzione dimensionale, in quanto le entità costituenti non hanno tutte le stesse dimensioni.

Spesso i materiali particolati comprendono particelle con lunghezze sia inferiori che superiori a 100 nm. A causa della reattività delle nanoparticelle, principalmente correlata alla loro elevata energia libera superficiale, i cluster più grandi ("particelle secondarie") spesso derivano dall'agglomerazione e/o dall'aggregazione delle particelle primarie che lo costituiscono. In alcuni casi, la distribuzione dimensionale dei nanomateriali prodotti copre un intervallo di lunghezze piuttosto ampio.

Queste definizioni tecniche, basate solo sulle dimensioni, sono insufficienti dal punto di vista della valutazione del rischio perché non includono altri elementi importanti (esaminati sotto) che dovrebbero essere presi in considerazione quando si determina se un nanomateriale possa richiedere un'ulteriore revisione.

La corretta caratterizzazione del nanomateriale, così come la comprensione dei processi che avvengono sulla superficie delle nanoparticelle a contatto con i sistemi viventi, è fondamentale per comprendere i possibili effetti tossicologici.

I parametri chiave per la tossicologia convenzionale sono la concentrazione e il tempo di esposizione. Questi fattori possono essere facilmente misurati per singole sostanze chimiche e, dopo aver stabilito la natura della risposta alle dosi di una determinata sostanza chimica, è possibile determinare i livelli di soglia al di sotto dei quali un composto chimico può essere considerato "sicuro" o "pericoloso".

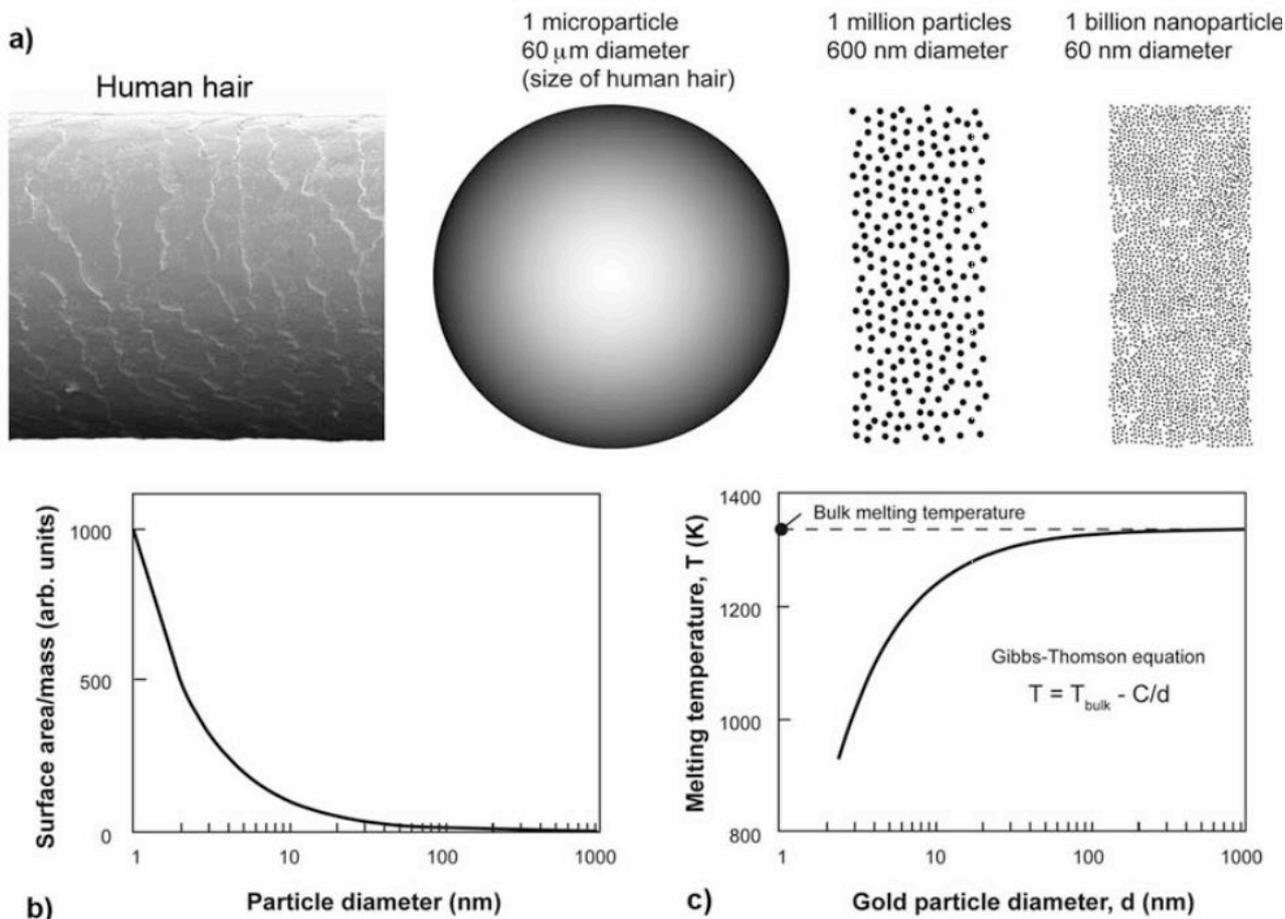
Sebbene comprendiamo ampiamente le proprietà della massa dei materiali (**bulk**) e/o delle sostanze chimiche a livello molecolare, sono state scoperte nuove proprietà dei materiali nella zona tra "molecola" e "bulk", ovvero la nanoscala.

Quando la massa dei materiali viene trasformata in frammenti di materia sempre più piccoli la loro chimica superficiale cambia e la reattività chimica aumenta ²⁸³.

²⁸³ Jefferson D. A.
The surface activity of ultrafine particles
Phil. Trans. R. Soc. A. 2000 358:2683–2692 <http://doi.org/10.1098/rsta.2000.0677>
<https://royalsocietypublishing.org/doi/pdf/10.1098/rsta.2000.0677>

Ju-Nam Y, Lead JR.
Manufactured nanoparticles: an overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications.
Sci Total Environ. 2008 Aug 1;400(1-3):396-414. doi: 10.1016/j.scitotenv.2008.06.042. Epub 2008 Aug 19.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18715626/>

Surface reactivity of metal nanoparticles - importance of surface-active agents and biomolecules from a transformation, mobility and toxicity perspective: Sara Skoglund Doctoral thesis
<https://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:1063551/FULLTEXT01.pdf>



<https://arxiv.org/pdf/0801.3280.pdf>

(a) Schemi che illustrano una microparticella di 60 μm di diametro, circa la dimensione di un capello umano - mostrata a sinistra in scala, e il numero di nanoparticelle con diametro di 600 nm e 60 nm aventi la stessa massa di una microparticella di 60 μm di diametro. (b) Area della superficie normalizzata rispetto alla massa verso il diametro delle particelle. (c) Temperatura di fusione dell'oro in funzione del diametro delle particelle, secondo l'equazione di Gibbs-Thomson, mostrata nel riquadro; la temperatura di fusione della massa dell'oro è 1336 K.

Secondo "REACH" (registrazione, valutazione, autorizzazione e restrizione delle sostanze chimiche), la valutazione della sicurezza dei nanomateriali dovrebbe seguire la metodologia di valutazione del rischio adottata per le sostanze chimiche convenzionali, che si basa sui seguenti requisiti:

- (1) valutazione degli effetti ,
- (2) valutazione dell'esposizione e
- (3) caratterizzazione del rischio.

La **fase 1** include la valutazione degli effetti. Il quoziente di rischio è considerato accettabile (superiore a 1) quando il valore di esposizione stimato è inferiore alla concentrazione dell'agente alla quale non è stato osservato alcun effetto avverso nello studio sperimentale effettuato per valutare il punto in esame, ad esempio la tossicità per inalazione o la genotossicità.

Se è necessario condurre esperimenti in vitro e/o in vivo per valutare gli effetti, possono essere raccomandate anche altre procedure per caratterizzare i NM in studio.

Molleman B , Hiemstra T .

Size and shape dependency of the surface energy of metallic nanoparticles: unifying the atomic and thermodynamic approaches.

Phys Chem Chem Phys. 2018 Aug 8;20(31):20575-20587. doi: 10.1039/c8cp02346h.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30059091/>

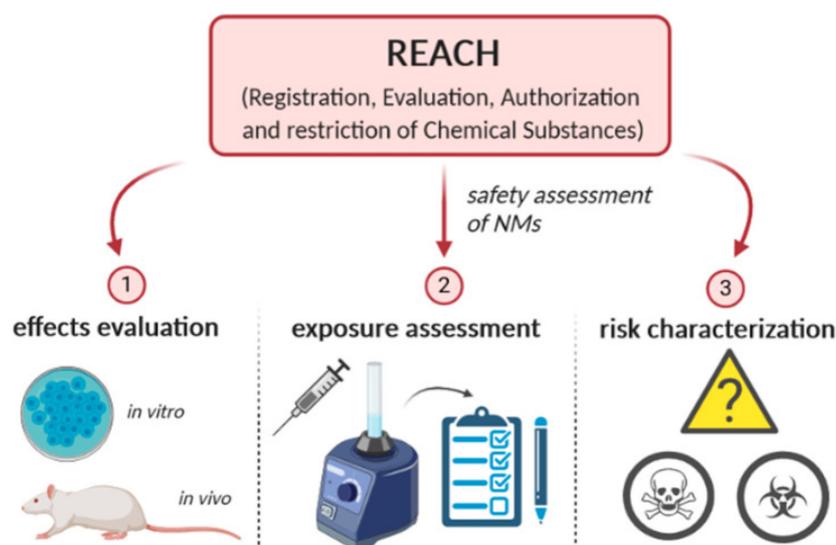
Buzea C, Pacheco II, Robbie K.

Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity.

Biointerphases. 2007 Dec;2(4):MR17-71. doi: 10.1116/1.2815690.

<https://arxiv.org/pdf/0801.3280.pdf>

Ciò include la raccolta di informazioni sui parametri fisico-chimici più rilevanti che possono influenzare la tossicità, cioè la distribuzione delle dimensioni, lo stato di aggregazione/agglomerazione, la forma, l'area superficiale, la reattività, la solubilità in acqua, la proprietà della superficie e la stabilità a lungo termine. La **fase 2** include l'identificazione di tutte le potenziali fonti di esposizione. Pertanto, è importante comprendere l'intero processo di produzione e le vie di esposizione più probabili. Ciò è importante anche per scegliere la strategia di test appropriata e per formulare raccomandazioni sulle misure di prevenzione dei rischi (**Fase 3**).²⁸⁴



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7369733/>

La metodologia di valutazione del rischio per i nanomateriali (NM) basata sui requisiti di registrazione, valutazione, autorizzazione e restrizione delle sostanze chimiche (REACH)

Tuttavia, i NM hanno proprietà diverse che possono influenzare il loro profilo tossicologico, quali:²⁸⁵

- (1) la **dimensione delle particelle**: la tossicità e l'assorbimento da parte delle cellule aumenteranno con le dimensioni più piccole dei NM;
- (2) la **carica delle particelle**: gli NM con carica positiva hanno una tossicità maggiore a causa di maggiori interazioni con superfici biologiche caricate negativamente;

²⁸⁴ Schwirn K, Voelker D, Galert W, Quik J, Tietjen L.

Environmental Risk Assessment of Nanomaterials in the Light of New Obligations Under the REACH Regulation: Which Challenges Remain and How to Approach Them?

Integr Environ Assess Manag. 2020;16(5):706-717. doi:10.1002/ieam.4267

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7497025/>

Boros BV, Ostafe V.

Evaluation of Ecotoxicology Assessment Methods of Nanomaterials and Their Effects.

Nanomaterials (Basel). 2020;10(4):610. Published 2020 Mar 26. doi:10.3390/nano10040610

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7221575/>

Liu X, Tang K, Harper S, Harper B, Steevens JA, Xu R. Predictive modeling of nanomaterial exposure effects in biological systems. Int J Nanomedicine. 2013;8 Suppl 1(Suppl 1):31-43. doi:10.2147/IJN.S40742

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3790277/>

Hofmann-Antenbrink M, Grainger DW, Hofmann H.

Nanoparticles in medicine: Current challenges facing inorganic nanoparticle toxicity assessments and standardizations.

Nanomedicine. 2015 Oct;11(7):1689-94. doi: 10.1016/j.nano.2015.05.005. Epub 2015 Jun 4.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26051651/>

²⁸⁵ Singh AV, Laux P, Luch A, Sudrik C, Wiehr S, Wild AM, Santomauro G, Bill J, Sitti M.

Review of emerging concepts in nanotoxicology: opportunities and challenges for safer nanomaterial design.

Toxicol Mech Methods. 2019 Jun;29(5):378-387. doi: 10.1080/15376516.2019.1566425. Epub 2019 Feb 12.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30636497/>

Albanese A, Tang PS, Chan WC.

The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems.

Annu Rev Biomed Eng. 2012;14:1-16. doi: 10.1146/annurev-bioeng-071811-150124. Epub 2012 Apr 18.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22524388/>

(3) la **dissoluzione ionica**: una dissoluzione ionica più elevata porta a una maggiore tossicità, e
 (4) la **forma**: i NM anisotropi a forma di bastoncino sono meno efficienti e possono causare danni significativi nel vicino infrarosso, causando la distruzione delle cellule bersaglio .

La citotossicità delle nanoparticelle è indotta da diversi fattori.

Alcuni casi di nanomateriali che inducono citotossicità sono dovuti alla sostanza stessa e alcune nanoparticelle mostrano tossicità senza un meccanismo chiaro.²⁸⁶

Si ritiene che le nanoparticelle di una particolare sostanza presentino rischi di tossicità maggiori rispetto alle particelle di dimensioni maggiori della stessa sostanza²⁸⁷.

Soprattutto, la distribuzione all'interno del corpo e l'accumulo di un tipo specifico di particella in un particolare distretto od organo che dipende dalla dimensione della particella e dalle caratteristiche della sua superficie, sono considerati fattori critici²⁸⁸. Inoltre, quando le nanoparticelle si accumulano nell'organismo senza un'adeguata escrezione, possono causare tossicità continuativa.

I principali siti di distribuzione e gli organi bersaglio delle nanoparticelle sono sconosciuti; tuttavia sembra che il fegato e la milza siano organi bersaglio²⁸⁹.

Se le nanoparticelle vengono ingerite, inalate o assorbite attraverso la pelle, possono indurre la formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) inclusi i radicali liberi²⁹⁰.

I ROS producono stress ossidativo, infiammazione e conseguente danno a vari componenti biologici come proteine, DNA, ecc.

²⁸⁶ Lewinski N, Colvin V, Drezek R.

Cytotoxicity of nanoparticles.

Small. 2008 Jan;4(1):26-49. doi: 10.1002/sml.200700595.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18165959/>

Favi PM, Gao M, Johana Sepúlveda Arango L, Ospina SP, Morales M, Pavon JJ, Webster TJ.

Shape and surface effects on the cytotoxicity of nanoparticles: Gold nanospheres versus gold nanostars.

J Biomed Mater Res A. 2015 Nov;103(11):3449-62. doi: 10.1002/jbm.a.35491. Epub 2015 May 6.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25904210/>

²⁸⁷ Pan Y, Neuss S, Leifert A, Fischler M, Wen F, Simon U, Schmid G, Brandau W, Jahnen-Dechent W.

Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles.

Small. 2007 Nov;3(11):1941-9. doi: 10.1002/sml.200700378.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17963284/>

Napierska D, Thomassen LC, Raboll V, Lison D, Gonzalez L, Kirsch-Volders M, Martens JA, Hoet PH.

Size-dependent cytotoxicity of monodisperse silica nanoparticles in human endothelial cells.

Small. 2009 Apr;5(7):846-53. doi: 10.1002/sml.200800461.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19288475/>

Carlson C, Hussain SM, Schrand AM, Braydich-Stolle LK, Hess KL, Jones RL, Schlager JJ.

Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species.

J Phys Chem B. 2008 Oct 30;112(43):13608-19. doi: 10.1021/jp712087m. Epub 2008 Oct 3.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18831567/>

²⁸⁸ Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J.

Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles

[published correction appears in Environ Health Perspect. 2010 Sep;118(9):A380]. Environ Health Perspect. 2005;113(7):823-839. doi:10.1289/ehp.7339

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1257642/>

²⁸⁹ Handy RD, Owen R, Valsami-Jones E.

The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs.

Ecotoxicology. 2008 Jul;17(5):315-25. doi: 10.1007/s10646-008-0206-0. Epub 2008 Apr 12

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18408994/>

Hussain SM, Hess KL, Gearhart JM, Geiss KT, Schlager JJ.

In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells.

Toxicol In Vitro. 2005 Oct;19(7):975-83. doi: 10.1016/j.tiv.2005.06.034. Epub 2005 Aug 25.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16125895/>

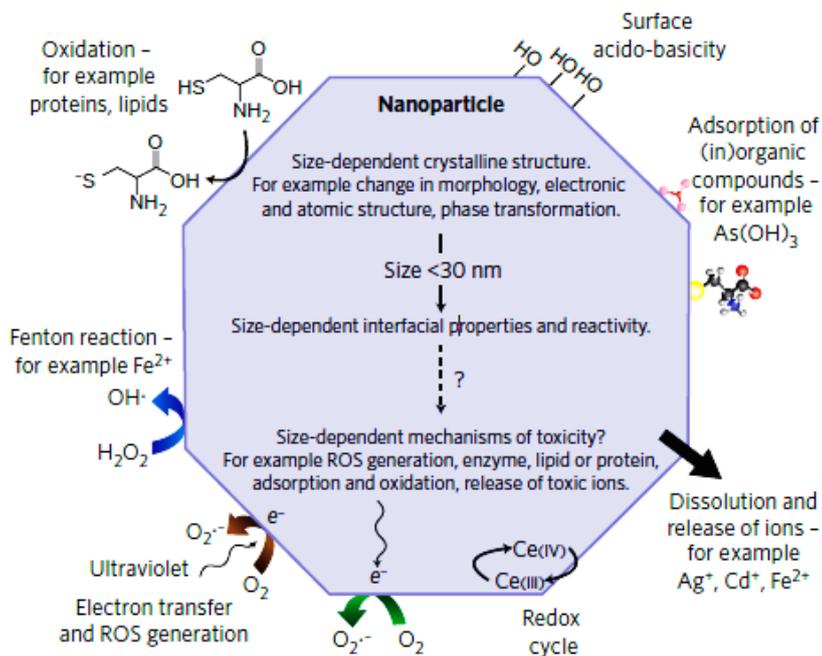
²⁹⁰ Brown JS, Zeman KL, Bennett WD.

Ultrafine particle deposition and clearance in the healthy and obstructed lung.

Am J Respir Crit Care Med. 2002 Nov 1;166(9):1240-7. doi: 10.1164/rccm.200205-3990C.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12403694/>

Oltre alla produzione di ROS, altri fattori che influenzano la tossicità includono le dimensioni, la morfologia, lo stato di agglomerazione, la forma, la composizione chimica, la struttura e la carica superficiale, lo stato di aggregazione e la solubilità ²⁹¹.



https://www.researchgate.net/publication/258559761_Surface_Reactivity_of_Manufactured_Nanoparticles
Sulla superficie di una nanoparticella inorganica possono verificarsi numerosi meccanismi chimico-fisici. La potenziale relazione tra la dipendenza dalle dimensioni della struttura cristallina delle nanoparticelle (tipicamente <30 nm), le loro proprietà interfaciali (ad esempio dissoluzione, ossidazione, adsorbimento / desorbimento, trasferimento di elettroni, cicli redox, reazioni di Fenton e acido-basicità superficiale) e potenziali meccanismi di tossicità (ad esempio, la generazione di ROS, il rilascio di ioni tossici, l'ossidazione delle proteine e l'adsorbimento degli inquinanti).

OH[•], radicale idrossile; O₂^{-•}, anione superossido

A causa delle loro piccole dimensioni, le nanoparticelle possono attraversare le giunzioni dei tessuti e persino le membrane cellulari dove inducono danni strutturali ai mitocondri, ²⁹² o invadono il nucleo dove causano gravi mutazioni del DNA ²⁹³ in grado di causare la morte cellulare, come si approfondirà in seguito ²⁹⁴.

I fattori sopra menzionati possono essere classificati nelle cinque caratteristiche della nanoparticella, che sono:

²⁹¹ Holsapple MP, Farland WH, Landry TD, Monteiro-Riviere NA, Carter JM, Walker NJ, Thomas KV.

Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part II: toxicological and safety evaluation of nanomaterials, current challenges and data needs.

Toxicol Sci. 2005 Nov;88(1):12-7. doi: 10.1093/toxsci/kfi293. Epub 2005 Aug 24.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16120754/>

Auffan, Melanie & Rose, Jerome & Chanéac, Corinne & Jolivet, Jean-Pierre & Mason, Armand & Wiesner, Mark & Bottero, Jean-Yves.

Surface Reactivity of Manufactured Nanoparticles.

Nanoethics and Nanotoxicology. (2011). 269-. doi: 10.1007/978-3-642-20177-6_12.

https://www.researchgate.net/publication/258559761_Surface_Reactivity_of_Manufactured_Nanoparticles

²⁹² Hoshino A, Fujioka K, Oku T, Nakamura S, Suga M, Yamaguchi Y, Suzuki K, Yasuhara M, Yamamoto K.

Quantum dots targeted to the assigned organelle in living cells.

Microbiol Immunol. 2004;48(12):985-94. doi: 10.1111/j.1348-0421.2004.tb03621.x.

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1348-0421.2004.tb03621.x>

Salnikov V, Lukyáenko YO, Frederick CA, Lederer WJ, Lukyáenko V.

Probing the outer mitochondrial membrane in cardiac mitochondria with nanoparticles.

Biophys J. 2007;92(3):1058-1071. doi:10.1529/biophysj.106.094318

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1779971/>

²⁹³ Donaldson K, Stone V.

Current hypotheses on the mechanisms of toxicity of ultrafine particles.

Ann Ist Super Sanita. 2003;39(3):405-10.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15098562/>

²⁹⁴ Wilson RF.

Nanotechnology: the challenge of regulating known unknowns.

J Law Med Ethics. 2006 Winter;34(4):704-13. doi: 10.1111/j.1748-720X.2006.00090.x.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17199812/>

Albanese A, Tang PS, Chan WC.

The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems.

Annu Rev Biomed Eng. 2012;14:1-16. doi: 10.1146/annurev-bioeng-071811-150124. Epub 2012 Apr 18.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22524388/>

la dimensione, la superficie, lo stato elettrostatico di superficie, la morfologia e lo stato di agglomerazione.
 295

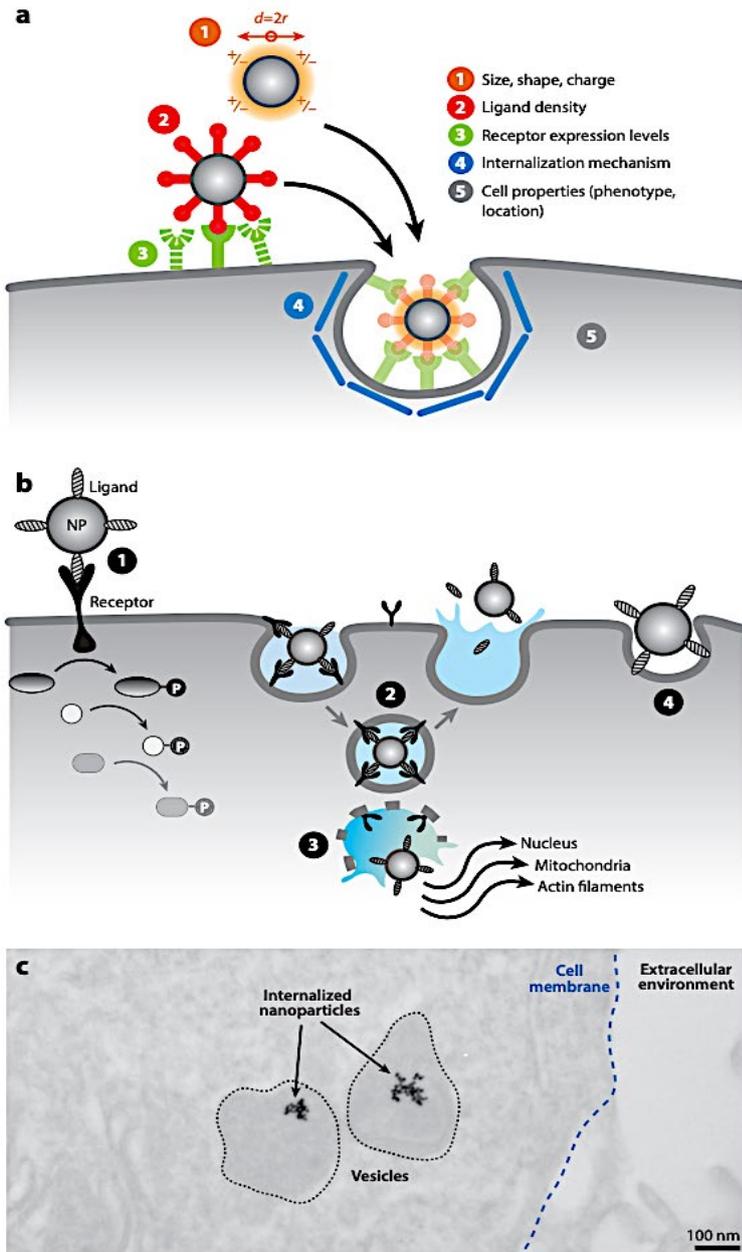
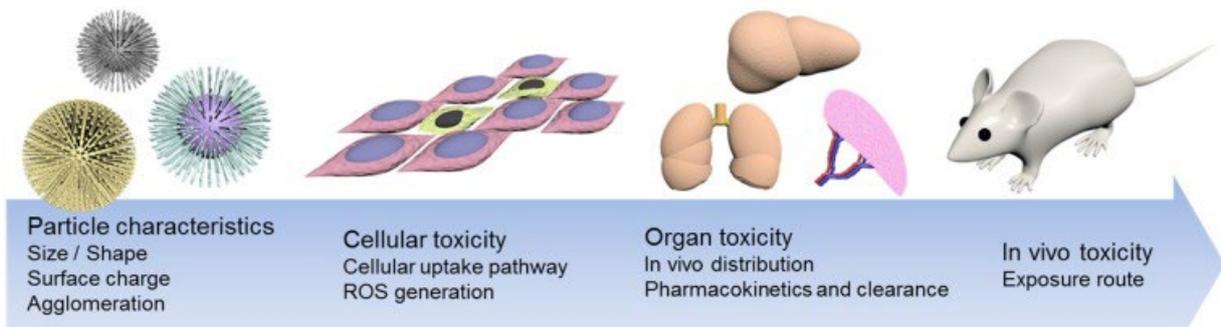


Fig.1 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22524388/>
 Interazioni nanoparticelle-cellula. (a) Elenco dei fattori che possono influenzare le interazioni nanoparticelle-cellula all'interfaccia nano-bio. (b) Nanoparticelle rivestite di ligando che interagiscono con le cellule. Le nanoparticelle rivestite di ligando si legano ai recettori sulla membrana e inducono una cascata di segnali senza entrare nella cellula. 1) Le nanoparticelle rivestite di ligando possono anche essere internalizzate ed esocitate dalla cellula, senza mai lasciare la vescicola. 2) Si legano al recettore di membrana, entrano nelle cellule e quindi escono dalla cellula. 3) Le nanoparticelle internalizzate possono sfuggire alla vescicola e interagire con vari organelli. Si legano ai recettori di membrana, entrano nella cellula e prendono di mira le strutture subcellulari. 4) Le nanoparticelle possono interagire in modo aspecifico con la membrana della superficie cellulare. Successivamente vengono interiorizzati. (c) Molteplici nanoparticelle d'oro rivestite di transferrina da 15 nm vengono internalizzate dalle cellule HeLa in vescicole intracellulari. Abbreviazione: NP, nanoparticella.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5304630/>
 Disegno schematico della citotossicità indotta da nanoparticelle. Le caratteristiche intrinseche delle nanoparticelle, come le dimensioni, la carica superficiale, l'agglomerazione, possono influenzare in modo significativo la citotossicità. Tale citotossicità può essere influenzata a livello della cellula, dell'organo e persino dei sistemi in vivo.
 Fig.2



²⁹⁵ Shin SW, Song IH, Um SH. Role of Physicochemical Properties in Nanoparticle Toxicity. *Nanomaterials* (Basel). 2015;5(3):1351-1365. Published 2015 Aug 19. doi:10.3390/nano5031351 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5304630/>

Ahmet Aydin, Hande Sipahi and Mohammad Charehsaz (October 31st 2012). Nanoparticles Toxicity and Their Routes of Exposures, *Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems*, Ali Demir Sezer, IntechOpen, DOI: 10.5772/51230. Available from: <https://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-novel-drug-carrier-systems/nanoparticles-toxicity-and-their-routes-of-exposures>

Dimensioni

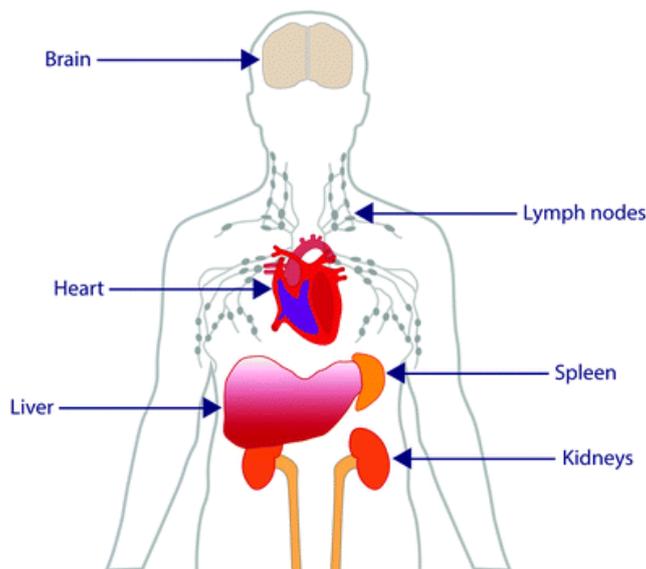
La citotossicità è indotta dall'interazione tra la superficie del nanomateriale e i componenti cellulari. Al diminuire del diametro, l'area superficiale della particella aumenta in modo esponenziale, pertanto, anche quando le particelle hanno la stessa composizione, possono avere livelli di citotossicità significativamente diversi a seconda delle dimensioni delle particelle e della reattività superficiale.

Inoltre, la dimensione delle particelle induce differenze significative nel meccanismo di rilascio cellulare e nella distribuzione in vivo.

Molti studi hanno esaminato la distribuzione in vivo dei nanomateriali ²⁹⁶.

Le nanoparticelle con un diametro maggiore di 6 nm non possono essere escrete dai reni e si accumulano in organi specifici, come il fegato e la milza, fino a quando non avviene la clearance da parte del sistema dei fagociti mononucleari ²⁹⁷.

La maggior parte delle nanoparticelle che si accumulano nel fegato e nella milza causano gravi effetti collaterali.



<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2020/bm/d0bm00558d>

Rappresentazione schematica delle principali aree di traslocazione e accumulo di nanoparticelle dopo la somministrazione.

Ad esempio, i quantum dots ²⁹⁸ di seleniuro di cadmio (CdSe) rimangono nel tessuto fino a otto mesi e causano epatotossicità ²⁹⁹.

²⁹⁶ Varna, Mariana & Ratajczak, Philippe & Ferreira, Irmine & Leboeuf, Christophe & Bousquet, Guilhem & Janin, Anne. In vivo Distribution of Inorganic Nanoparticles in Preclinical Models.

Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology. (2012). 03. 269-279. 10.4236/jbnb.2012.322033.

https://www.researchgate.net/publication/276489705_In_vivo_Distribution_of_Inorganic_Nanoparticles_in_Preclinical_Models

El-Ansary A, Al-Daihan S.

On the toxicity of therapeutically used nanoparticles: an overview.

J Toxicol. 2009;2009:754810. doi:10.1155/2009/754810

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2809332/>

²⁹⁷ Albanese A, Tang PS, Chan WC.

The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems.

Annu Rev Biomed Eng. 2012;14:1-16. doi: 10.1146/annurev-bioeng-071811-150124. Epub 2012 Apr 18.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22524388/>

Foulkes R, Man E, Thind J, Yeung S, Joy A, Hoskins C.

The regulation of nanomaterials and nanomedicines for clinical application: current and future perspectives.

Biomater Sci. 2020 Sep 7;8(17):4653-4664. doi: 10.1039/d0bm00558d. Epub 2020 Jul 16.

<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2020/bm/d0bm00558d>

²⁹⁸ Tyler Maxwell, Maria Gabriela Nogueira Campos, Stephen Smith, Mitsushita Doomra, Zon Thwin, Swadeshmukul Santra, Chapter 15 - Quantum Dots, Editor(s): Eun Ji Chung, Lorraine Leon, Carlos Rinaldi, In Micro and Nano Technologies,

Nanoparticles for Biomedical Applications, Elsevier, 2020, Pages 243-265, ISBN 9780128166628,

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816662-8.00015-1>.

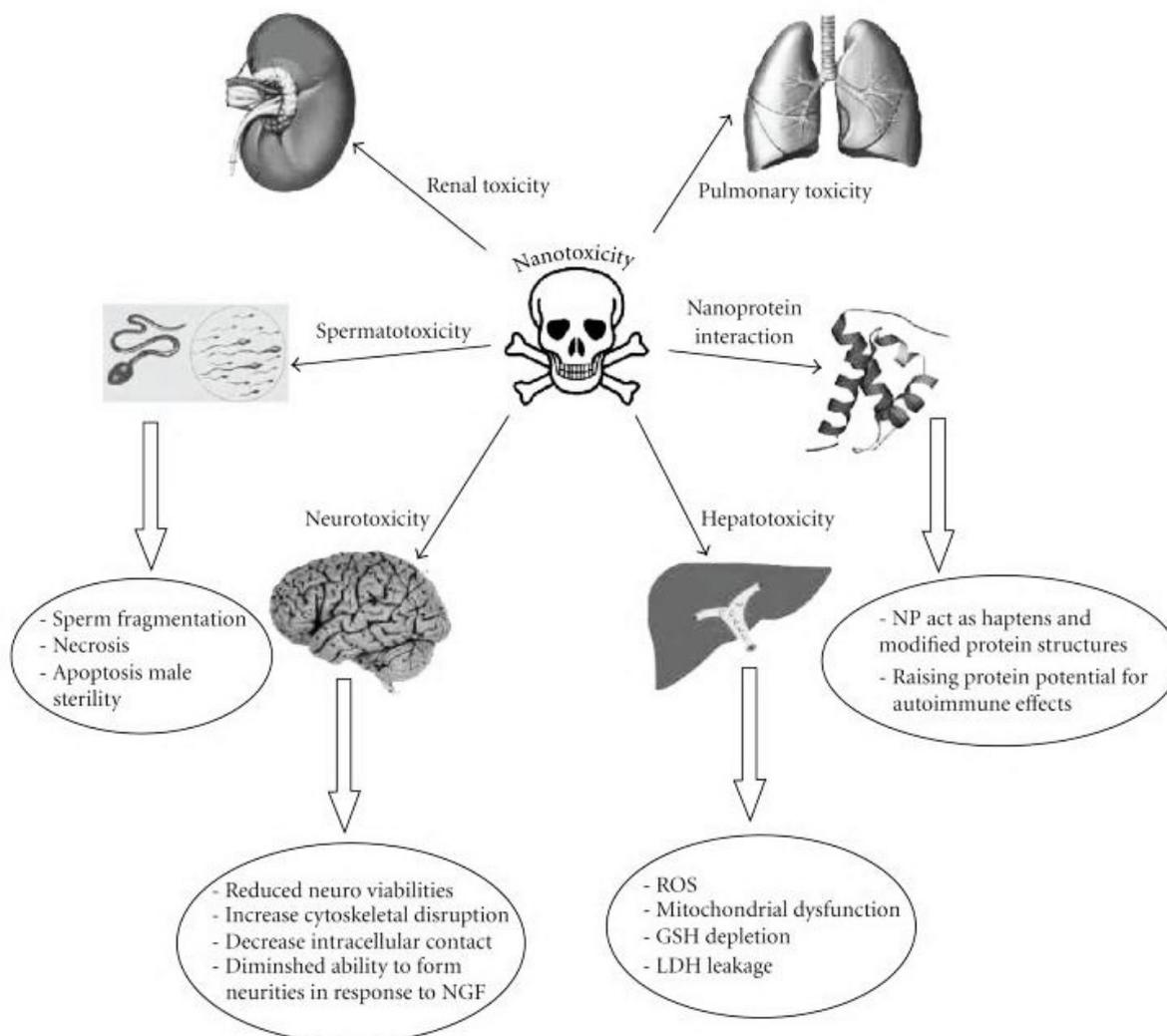
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128166628000151>

I punti quantici: storia, metodi di fabbricazione e applicazioni

http://tesi.cab.unipd.it/33121/1/tesi_577834_copia.pdf

²⁹⁹ Ballou B, Lagerholm BC, Ernst LA, Bruchez MP, Waggoner AS.

Questa farmacocinetica caratteristica delle nanoparticelle dipende dalla dimensione delle particelle e dalla chimica della superficie.



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2809332/>

A summary of the most important recorded toxic effects of therapeutically used nanoparticles

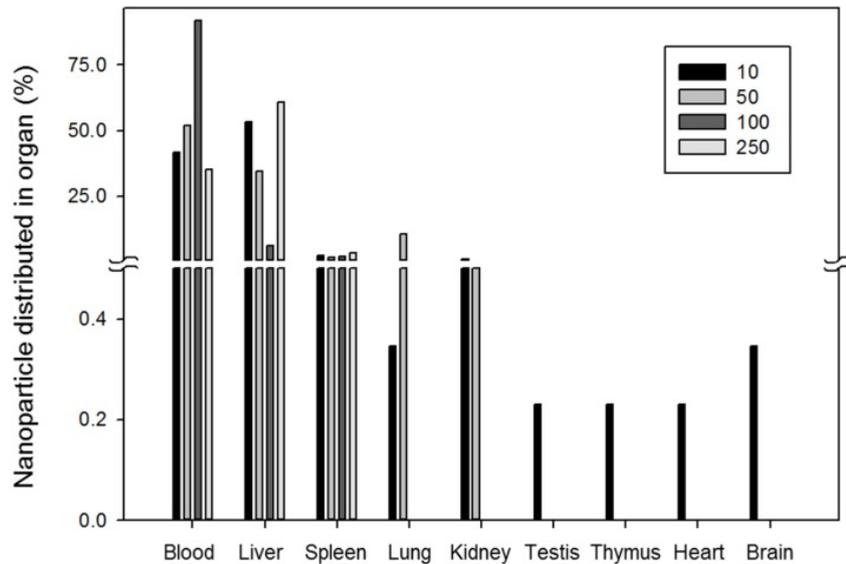
La distribuzione in vivo delle nanoparticelle d'oro in base alle dimensioni è stata valutata da De Jong et al.³⁰⁰, con l'utilizzo delle particelle di dimensioni comprese tra 10 e 250 nm dopo iniezione endovenosa in un modello di ratto.

Gli autori hanno scoperto che le nanoparticelle da 10 nm erano distribuite in modo diverso rispetto alle loro controparti più grandi e sono state trovate in quasi tutti gli organi, inclusi sangue, fegato, milza, reni, testicoli, timo, cuore, polmoni e cervello.

Nel frattempo, la maggior parte delle nanoparticelle più grandi di 50 nm sono state rilevate solo nel sangue, nel fegato e nella milza.

Noninvasive imaging of quantum dots in mice.
Bioconjug Chem. 2004 Jan-Feb;15(1):79-86. doi: 10.1021/bc034153y.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22524388/>

³⁰⁰ De Jong WH, Hagens WI, Krystek P, Burger MC, Sips AJ, Geertsma RE.
Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration.
Biomaterials. 2008 Apr;29(12):1912-9. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.12.037. Epub 2008 Feb 1.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18242692/>



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5304630/>

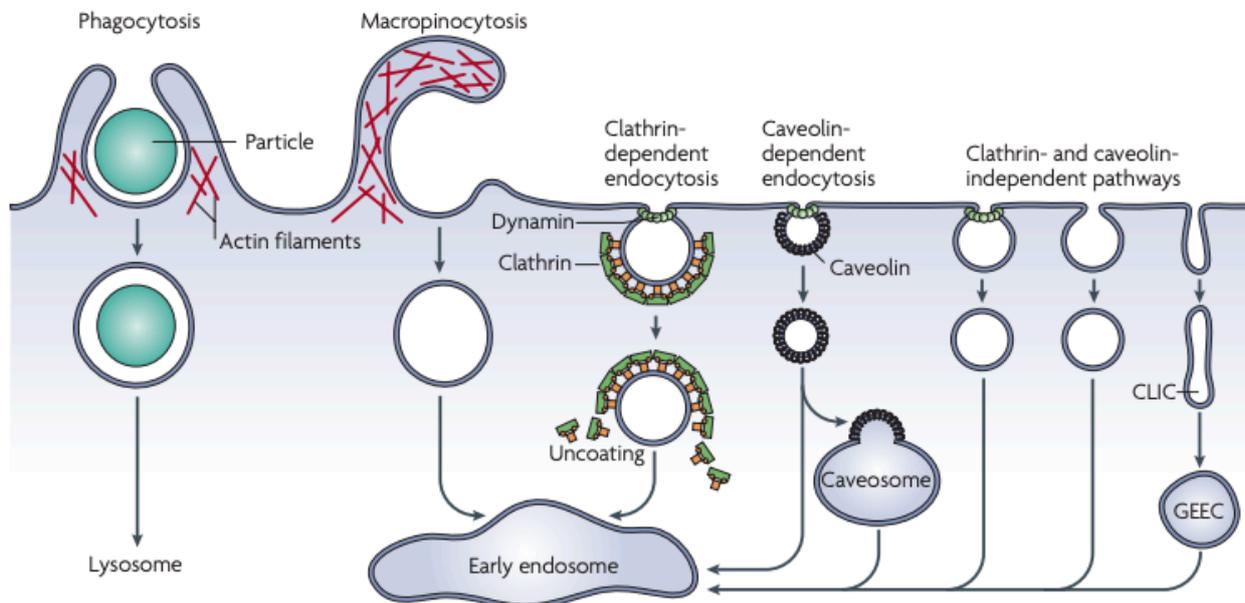
Distribuzione delle nanoparticelle d'oro in diversi organi nel ratto in base alla dimensione delle particelle (nm).

Assorbimento cellulare e citotossicità dipendenti dalle dimensioni

In termini di interazione cellulare, il meccanismo di assorbimento delle nanoparticelle e l'efficienza sono fattori chiave che influenzano la citotossicità.

Uno dei principali fattori che determinano l'efficienza e il meccanismo di assorbimento cellulare è la dimensione delle nanoparticelle. Le dimensioni adatte per l'assorbimento variano da 10 a 500 nm.

È molto probabile che le particelle di grandi dimensioni (> 1 µm) vengano inghiottite tramite macropinositosi. La dimensione di una vescicola coinvolta nell'endocitosi mediata da clatrina è di circa 100 nm, mentre la dimensione coinvolta nell'endocitosi mediata da caveola è di solito di circa 60-80 nm.



<https://www.nature.com/articles/nrm2216>

Vie di ingresso nelle cellule. Le particelle più grandi possono essere assorbite dalla fagocitosi, mentre l'assorbimento dei liquidi avviene dalla macropinositosi. Entrambi i processi sembrano essere innescati e dipendono dal rimodellamento mediato dall'actina della membrana plasmatica su larga scala. Rispetto alle altre vie endocitiche, la dimensione delle vescicole formate dalla fagocitosi e dalla macropinositosi è molto maggiore. Numerosi carichi possono essere endocitati mediante meccanismi indipendenti dalla proteina di rivestimento clatrina e dalla fissione GTPasi, dinamina. Questa recensione si concentra sui percorsi indipendenti dalla clatrina, alcuni dei quali sono anche indipendenti dalla dinamina (FIGS 2,3). La maggior parte dei carichi internalizzati viene consegnata all'endosoma precoce tramite vescicole (vescicole rivestite di clatrina o caveolina) o intermedi tubolari (noti come portatori indipendenti di clatrina e dinamina (CLIC)) che derivano dalla membrana plasmatica. Alcuni percorsi possono prima passare a compartimenti intermedi, come la proteina caveosoma o glicosil posfatidilinositolo arricchita dei primi compartimenti endosomiali (GEEC), in rotta verso l'endosoma precoce.

Superficie della particella:

Una superficie più ampia può causare una maggiore reattività con le particelle vicine, con conseguenti effetti potenzialmente dannosi se utilizzati in riempitivi, cosmetici e come trasportatori di farmaci ³⁰¹.

Si può concludere che diminuendo la dimensione delle particelle, la sua attività biologica aumenta in maniera sostanziale.

Le particelle più piccole occupano meno volume, in modo che un numero maggiore di particelle possa occupare un'area unitaria, con conseguente aumento dei meccanismi di tossicità fisiopatologica, ad esempio stress ossidativo, generazione di ROS, perturbazione mitocondriale, ecc. ³⁰².

I cambiamenti nella carica superficiale determinano notevoli differenze nella biodistribuzione in vivo delle nanoparticelle ³⁰³ e diversi gradi di tossicità ³⁰⁴. Le nanoparticelle con una superficie caricata positivamente tendono ad avere una tossicità molto più elevata.

È stato ampiamente riconosciuto nella comunità scientifica che le nanoparticelle in un contesto biologico o ambientale non sono mai costituite da particelle "nude" ³⁰⁵.

Non appena le particelle entrano in contatto con ambienti eterogenei, liquidi o gassosi, strutture più piccole come atomi, cluster di atomi, singole molecole e/o macromolecole si attaccano alla superficie della particella, legandosi fortemente o debolmente.

In un ambiente biologico in cui sono presenti biomolecole come proteine e polimeri, questo strato superficiale è stato chiamato "corona" ³⁰⁶.

³⁰¹ Nel A, Xia T, Mädler L, Li N.

Toxic potential of materials at the nanolevel.
Science. 2006 Feb 3;311(5761):622-7. doi: 10.1126/science.1114397.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16456071/>

³⁰² Oberdörster G et al; ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Nanomaterial Toxicity Screening Working Group.
Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy.
Part Fibre Toxicol. 2005 Oct 6;2:8. doi: 10.1186/1743-8977-2-8.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1260029/>

³⁰³ Hirn S, Semmler-Behnke M, Schleh C, et al.
Particle size-dependent and surface charge-dependent biodistribution of gold nanoparticles after intravenous administration.
Eur J Pharm Biopharm. 2011;77(3):407-416. doi:10.1016/j.ejpb.2010.12.029
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3051057/>

Asati A, Santra S, Kaitanis C, Perez JM. Surface-charge-dependent cell localization and cytotoxicity of cerium oxide nanoparticles. ACS Nano. 2010;4(9):5321-5331. doi:10.1021/nn100816s
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2947560/>

³⁰⁴ Jiang, J., Oberdörster, G. & Biswas, P.
Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies.
J Nanopart Res 11, 77–89 (2009). <https://doi.org/10.1007/s11051-008-9446-4>
<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11051-008-9446-4>

Fröhlich E.
The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles.
Int J Nanomedicine. 2012;7:5577-5591. doi:10.2147/IJN.S36111
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3493258/>

Ruenraroengsak P, Tetley TD.
Differential bioreactivity of neutral, cationic and anionic polystyrene nanoparticles with cells from the human alveolar compartment: robust response of alveolar type 1 epithelial cells.
Part Fibre Toxicol. 2015 Jul 2;12:19. doi: 10.1186/s12989-015-0091-7.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4489088/>

³⁰⁵ Navarro E, Baun A, Behra R, Hartmann NB, Filser J, Miao AJ, Quigg A, Santschi PH, Sigg L. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi.
Ecotoxicology. 2008 Jul;17(5):372-86. doi: 10.1007/s10646-008-0214-0. Epub 2008 May 7.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18461442/>

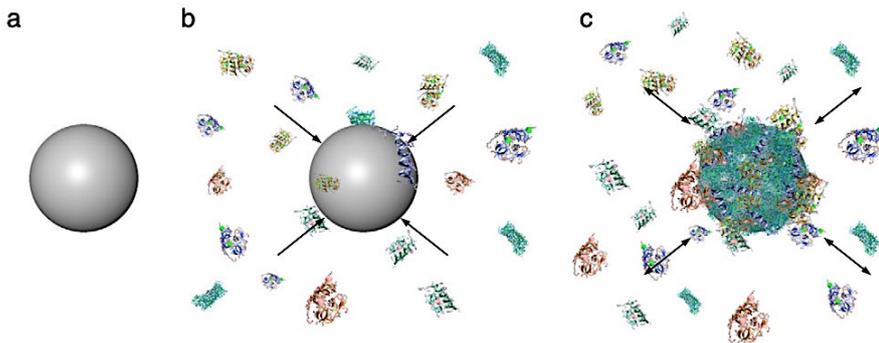
³⁰⁶ Lynch I, Cedervall T, Lundqvist M, Cabaleiro-Lago C, Linse S, Dawson KA.
The nanoparticle-protein complex as a biological entity; a complex fluids and surface science challenge for the 21st century.
Adv Colloid Interface Sci. 2007 Oct 31;134-135:167-74. doi: 10.1016/j.cis.2007.04.021. Epub 2007 May 5.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17574200/>

Hartland, A., Lead, J. R., Slaveykova, V. I., O'Carroll, D. & Valsami-Jones, E.

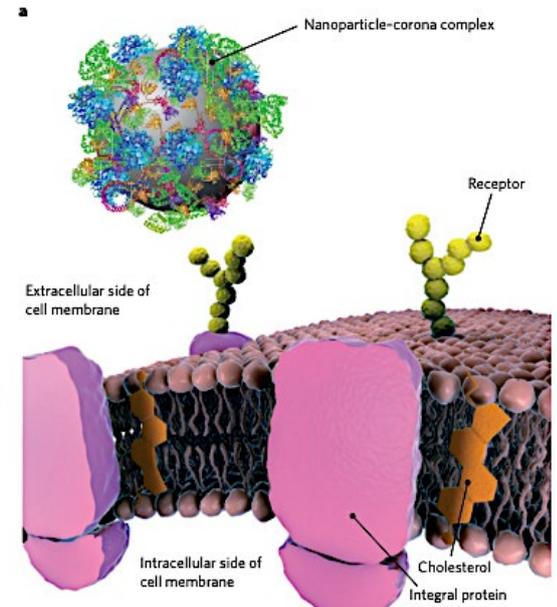
La ricerca ha dimostrato che non è il nanomateriale in sé ma la "corona" a definire principalmente le proprietà del composto "particella + corona".

Ne segue che è necessario studiare non solo le proprietà del nanomateriale ma anche l'ambiente in cui si trovano le nanoparticelle durante i test di nanotossicità³⁰⁷

Formazione di nanoparticelle + corona: a) particella "nuda", b) nanoparticelle a contatto con proteine, c) formazione della corona. La corona può essere costituita da una "corona dura", proteine saldamente attaccate alla superficie o da una "corona morbida" di proteine che sono solo debolmente legate alle nanoparticelle e formano uno strato in equilibrio con la matrice circostante.



<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21925220/>



<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23212421/>

Morfologia

Come altre fibre inalabili ben consolidate (ad esempio, amianto), le fibre su nanoscala (ad esempio, nanotubi di carbonio) hanno un serio rischio di infiammazione polmonare.

Inoltre, l'esposizione prolungata può causare diversi tipi di cancro. È difficile determinare se esiste un effetto tossico certo di singoli nanotubi o di un insieme di tali tubi. Alcuni studi hanno dimostrato che i nanotubi di carbonio sono più tossici di altre polveri di nerofumo o silice ultrafini.³⁰⁸

The Environmental Significance of Natural Nanoparticles.

Nature Education Knowledge (2013) 4(8):7

<https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/the-environmental-significance-of-natural-nanoparticles-105737311/>

Cedervall T, Lynch I, Lindman S, et al.

Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(7):2050-2055. doi:10.1073/pnas.0608582104

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1892985/>

Monopoli MP, Aberg C, Salvati A, Dawson KA.

Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials.

Nat Nanotechnol. 2012 Dec;7(12):779-86. doi: 10.1038/nnano.2012.207.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23212421/>

Murr LE, Garza KM, Soto KF, et al.

Cytotoxicity assessment of some carbon nanotubes and related carbon nanoparticle aggregates and the implications for anthropogenic carbon nanotube aggregates in the environment.

Int J Environ Res Public Health. 2005;2(1):31-42. doi:10.3390/ijerph2005010031

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3814694/>

³⁰⁷ Lynch I, Salvati A, Dawson KA.

Protein-nanoparticle interactions: What does the cell see?

Nat Nanotechnol. 2009 Sep;4(9):546-7. doi: 10.1038/nnano.2009.248.

<https://www.nature.com/articles/nnano.2009.248>

Elsaesser A, Howard CV.

Toxicology of nanoparticles.

Adv Drug Deliv Rev. 2012 Feb;64(2):129-37. doi: 10.1016/j.addr.2011.09.001. Epub 2011 Sep 8.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21925220/>

³⁰⁸ Cha KE, Myung H.

Cytotoxic effects of nanoparticles assessed in vitro and in vivo.

J Microbiol Biotechnol. 2007 Sep;17(9):1573-8.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18062241/>

NANOPARTICELLE E CELLULE

Membrane

In un contesto cellulare, le **membrane** sono doppi strati fosfo-lipidici che suddividono diversi compartimenti intracellulari con ciascuno funzioni specifiche e incapsulano anche l'intera cellula.

Per facilitare gli scambi tra compartimenti e/o cellule, le membrane devono essere permeabili. La membrana cellulare esterna è l'interfaccia della cellula con il suo ambiente esterno e consente il trasporto selettivo di ioni, molecole e anche nanoparticelle.

Le membrane intracellulari separano compartimenti distinti (mitocondri, vescicole, nucleo, ecc.) dal citosol. La stabilità della membrana può essere influenzata dalle nanoparticelle direttamente (ad es. danni fisici) o indirettamente (ad es. ossidazione) che possono portare alla morte cellulare.

È la capacità delle membrane di controllare l'omeostasi intracellulare, tramite permeabilità selettiva e meccanismi di trasporto, che le rende un bersaglio vulnerabile per i possibili effetti dannosi delle nanoparticelle.

Le interazioni delle nanoparticelle con le membrane dipendono in gran parte dalle proprietà superficiali delle nanoparticelle.

Questo è il motivo per cui le modifiche della superficie sono cruciali nella progettazione di sistemi di somministrazione di farmaci al fine di migliorare l'assorbimento delle nanoparticelle nelle cellule.

Anche la dimensione delle nanoparticelle gioca un ruolo importante poiché influenza la pressione superficiale e le forze di adesione.³⁰⁹

I **mitocondri**, in quanto centrali elettriche della cellula, sembrano essere il bersaglio principale dei fullereni e dei nanotubi di carbonio³¹⁰.

Tuttavia, anche altre nanoparticelle (ad esempio biossido di titanio, nanotubi di carbonio, polistirolo e argento) sembrano essere in grado di influenzare la funzione mitocondriale, portando all'apoptosi³¹¹.

Firme CP 3rd, Bandaru PR.

Toxicity issues in the application of carbon nanotubes to biological systems.
Nanomedicine. 2010 Apr;6(2):245-56. doi: 10.1016/j.nano.2009.07.003. Epub 2009 Aug 20.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19699321/>

³⁰⁹ Vasir JK, Labhasetwar V.

Quantification of the force of nanoparticle-cell membrane interactions and its influence on intracellular trafficking of nanoparticles.
Biomaterials. 2008;29(31):4244-4252. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.07.020
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2570224/>

Peetla C, Labhasetwar V. Biophysical characterization of nanoparticle-endothelial model cell membrane interactions.
Mol Pharm. 2008 May-Jun;5(3):418-29. doi: 10.1021/mp700140a. Epub 2008 Feb 14.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18271547/>

³¹⁰ Foley S, Crowley C, Smaih M, Bonfils C, Erlanger BF, Seta P, Larroque C.

Cellular localisation of a water-soluble fullerene derivative.
Biochem Biophys Res Commun. 2002 May 31;294(1):116-9. doi: 10.1016/S0006-291X(02)00445-X.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12054749/>

Zhu Y, Zhao Q, Li Y, Cai X, Li W.

The interaction and toxicity of multi-walled carbon nanotubes with *Stylonychia mytilus*.
J Nanosci Nanotechnol. 2006 May;6(5):1357-64. doi: 10.1166/jnn.2006.194.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16792365/>

³¹¹ Hussain SM, Hess KL, Gearhart JM, Geiss KT, Schlager JJ.

In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells.
Toxicol In Vitro. 2005 Oct;19(7):975-83. doi: 10.1016/j.tiv.2005.06.034. Epub 2005 Aug 25.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16125895/>

Xia T, Kovochich M, Brant J, Hotze M, Sempf J, Oberley T, Sioutas C, Yeh JI, Wiesner MR, Nel AE.

Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm.
Nano Lett. 2006 Aug;6(8):1794-807. doi: 10.1021/nl061025k.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16895376/>

Jia G, Wang H, Yan L, Wang X, Pei R, Yan T, Zhao Y, Guo X.

Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene.
Environ Sci Technol. 2005 Mar 1;39(5):1378-83. doi: 10.1021/es048729I.

Un altro compartimento intracellulare preferenziale è quello dei **lisosomi**, il sistema digerente della cellula. La ricerca ha dimostrato che le nanoparticelle generalmente finiscono nei lisosomi dove la cellula cerca di digerirle o di espellerle ³¹².

Infine, la **membrana nucleare** utilizza i pori nucleari per trasportare le sostanze dentro e fuori il nucleo. Alcune nanoparticelle, generalmente più piccole, sembrano in grado di diffondersi attraverso questi pori ³¹³ o di essere trasportate tramite meccanismi di trasporto mediati dal recettore per ottenere l'accesso all'area intra-nucleare. ³¹⁴

Macromolecole e proteine

L'apparato cellulare si basa in gran parte su proteine e altre macromolecole.

Questi esistono sotto forma di enzimi (es. gastrina), molecole di segnalazione cellulare (es. ormoni) o proteine strutturali (es. tubulina).

Il loro normale funzionamento è quindi fondamentale per tutte le attività cellulari vitali.

Una corretta conformazione molecolare è essenziale affinché le proteine funzionino come previsto e lievi cambiamenti conformazionali possono alterare o distruggere la funzione della proteina.

Durante il loro processo di assemblaggio gli chaperon svolgono un ruolo importante nel controllare il modo in cui le proteine si ripiegano ³¹⁵, al fine di ottenere una certa conformazione.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15787380/>

³¹²Mohammadinejad R, Moosavi MA, Tavakol S, et al.
Necrotic, apoptotic and autophagic cell fates triggered by nanoparticles.
Autophagy. 2019;15(1):4-33. doi:10.1080/15548627.2018.1509171
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6287681/>

Al-Rawi M, Diabaté S, Weiss C.
Uptake and intracellular localization of submicron and nano-sized SiO₂ particles in HeLa cells.
Arch Toxicol. 2011 Jul;85(7):813-26. doi: 10.1007/s00204-010-0642-5. Epub 2011 Jan 15.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21240478/>

³¹³Parfenov AS, Salnikov V, Lederer WJ, Lukyanenko V.
Aqueous diffusion pathways as a part of the ventricular cell ultrastructure.
Biophys J. 2006;90(3):1107-1119. doi:10.1529/biophysj.105.071787
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1367097/>

Godbey WT, Wu KK, Mikos AG.
Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96(9):5177-5181. doi:10.1073/pnas.96.9.5177
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC21837/>

³¹⁴Panté N, Kann M.
Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm.
Mol Biol Cell. 2002;13(2):425-434. doi:10.1091/mbc.01-06-0308
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC65638/>

Williams Y, Sukhanova A, Nowostawska M, Davies AM, Mitchell S, Oleinikov V, Gun'ko Y, Nabiev I, Kelleher D, Volkov Y.
Probing cell-type-specific intracellular nanoscale barriers using size-tuned quantum dots.
Small. 2009 Nov;5(22):2581-8. doi: 10.1002/sml.200900744.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19685445/>

Hoshino A, Fujioka K, Oku T, Nakamura S, Suga M, Yamaguchi Y, Suzuki K, Yasuhara M, Yamamoto K.
Quantum dots targeted to the assigned organelle in living cells.
Microbiol Immunol. 2004;48(12):985-94. doi: 10.1111/j.1348-0421.2004.tb03621.x.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1348-0421.2004.tb03621.x>

³¹⁵Englander SW, Mayne L, Krishna MM.
Protein folding and misfolding: mechanism and principles.
Q Rev Biophys. 2007;40(4):287-326. doi:10.1017/S0033583508004654
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3433742/>

Chandel TI, Zaman M, Khan MV, Ali M, Rabbani G, Ishtikhar M, Khan RH.
A mechanistic insight into protein-ligand interaction, folding, misfolding, aggregation and inhibition of protein aggregates: An overview.
Int J Biol Macromol. 2018 Jan;106:1115-1129. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.07.185. Epub 2017 Sep 8.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28890370/>

Chaperon molecolari e ripiegamento delle proteine
Funzione cellulare e traffico intracellulare

Le nanoparticelle della stessa grandezza delle molecole proteiche, sono in grado di interferire con i processi di segnalazione cellulare³¹⁶ o interagire con le proteine³¹⁷, sia con attività di tipo chaperone³¹⁸ o cambiando la configurazione dei peptidi in forme di aggregazione e fibrillazione³¹⁹.

Il ripiegamento errato delle proteine e la fibrillazione peptidica che portano a strutture simili all'amiloide sono associati a malattie neurodegenerative.³²⁰

Lo studio di possibili formazioni errate e sovrapproduzione di proteine e macromolecole a livello cellulare è importante nelle considerazioni nanotossicologiche.³²¹

³¹⁶ F. Marano F, Hussain S, Rodrigues-Lima F, Baeza-Squiban A, Boland S.
Nanoparticles: molecular targets and cell signalling.
Arch Toxicol. 2011 Jul;85(7):733-41. doi: 10.1007/s00204-010-0546-4. Epub 2010 May 26. PMID: 20502881.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20502881/>

³¹⁷ Dawson KA, Salvati A, Lynch I.
Nanotoxicology: nanoparticles reconstruct lipids.
Nat Nanotechnol. 2009 Feb;4(2):84-5. doi: 10.1038/nnano.2008.426. PMID: 19197306.
<https://www.nature.com/articles/nnano.2008.426>

Shang W, Nuffer JH, Dordick JS, Siegel RW.
Unfolding of ribonuclease A on silica nanoparticle surfaces.
Nano Lett. 2007 Jul;7(7):1991-5. doi: 10.1021/nl070777r. Epub 2007 Jun 9. PMID: 17559285.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17559285/>

³¹⁸ Takahashi H, Sawada S, Akiyoshi K. A
mphillic polysaccharide nanoballs: a new building block for nanogel biomedical engineering and artificial chaperones.
ACS Nano. 2011 Jan 25;5(1):337-45. doi: 10.1021/nn101447m. Epub 2010 Dec 7. PMID: 21138322.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21138322/>

K. Akiyoshi K, Sasaki Y, Sunamoto J.
Molecular chaperone-like activity of hydrogel nanoparticles of hydrophobized pullulan: thermal stabilization with refolding of carbonic anhydrase B.
Bioconjug Chem. 1999 May-Jun;10(3):321-4. doi: 10.1021/bc9801272. PMID: 10346859.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10346859/>

³¹⁹ Wu WH, Sun X, Yu YP, Hu J, Zhao L, Liu Q, Zhao YF, Li YM.
TiO₂ nanoparticles promote beta-amyloid fibrillation in vitro.
Biochem Biophys Res Commun. 2008 Aug 22;373(2):315-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.06.035. Epub 2008 Jun 20. PMID: 18571499.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18571499/>

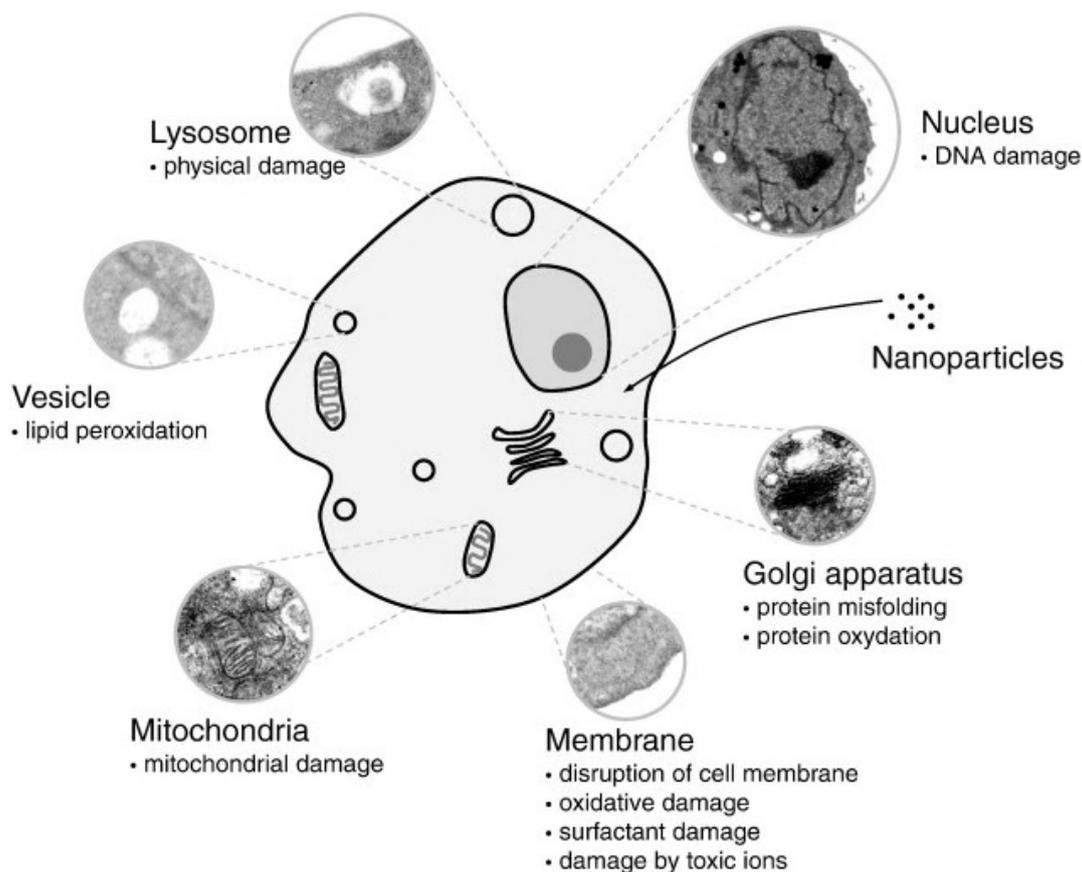
Wagner SC, Roskamp M, Pallerla M, Araghi RR, Schlecht S, Koksche B.
Nanoparticle-induced folding and fibril formation of coiled-coil-based model peptides.
Small. 2010 Jun 21;6(12):1321-8. doi: 10.1002/sml.200902067. PMID: 20517875.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20517875/>

Aili D, Enander K, Rydberg J, Nesterenko I, Björefors F, Baltzer L, Liedberg B.
Folding induced assembly of polypeptide decorated gold nanoparticles.
J Am Chem Soc. 2008 Apr 30;130(17):5780-8. doi: 10.1021/ja711330f. Epub 2008 Apr 2. PMID: 18380430.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18380430/>

³²⁰ Proteine che "fibrillano": l'amiloidosi. Nuove speranze per una malattia che il cardiologo deve conoscere
Eloisa Arbustini, Antonello Gavazzi*, Giampaolo Merlini
(Ital Heart J Suppl 2002; 3 (6): 590-597)
https://www.giornaledicardiologia.it/allegati/00771_2002_06/fulltext/06-02_02%20590-597.pdf

³²¹ Dawson KA, Salvati A, Lynch I.
Nanotoxicology: nanoparticles reconstruct lipids.
Nat Nanotechnol. 2009 Feb;4(2):84-5. doi: 10.1038/nnano.2008.426. PMID: 19197306.
<https://www.nature.com/articles/nnano.2008.426>

Bucciantini M, Giannoni E, Chiti F, Baroni F, Formigli L, Zurdo J, Taddei N, Ramponi G, Dobson CM, Stefani M.
Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. Nature. 2002 Apr 4;416(6880):507-11. doi: 10.1038/416507a. PMID: 11932737.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11932737/>



<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0169409X11002328>
Interazione delle nanoparticelle con le cellule: bersagli intracellulari e meccanismi nanotossicologici.

DNA

Fin dai primi studi in nanotossicologia, il DNA ha attirato un'attenzione speciale nella valutazione dei potenziali rischi tossicologici causati dai nanomateriali. Poiché i ricercatori hanno riferito che le nanoparticelle sono in grado di entrare nell'involucro nucleare, l'interesse per i possibili effetti genotossici delle nanoparticelle si è spostato al centro dell'attenzione.³²²

Diverse nanoparticelle sono state testate per la genotossicità³²³. Tuttavia, questi studi non sono stati in grado di identificare chiaramente quale parametro delle nanoparticelle è responsabile degli esiti positivi o negativi.

³²² Bhabra G, et al
Nanoparticles can cause DNA damage across a cellular barrier.
Nat Nanotechnol. 2009 Dec;4(12):876-83. doi: 10.1038/nnano.2009.313. PMID: 19893513.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19893513/>

Myllynen P.
Nanotoxicology: damaging DNA from a distance.
Nat Nanotechnol. 2009 Dec;4(12):795-6. doi: 10.1038/nnano.2009.365. PMID: 19966824.
<https://www.nature.com/articles/nnano.2009.365>

³²³ Zhanataev AK, Anisina EA, Kulakova AV, Shilovskiy IP, Lisitsyn AA, Koloskova OO, Khaitov MR, Durnev AD.
Genotoxicity of cationic lipopeptide nanoparticles.
Toxicol Lett. 2020 Aug 1;328:1-6. doi: 10.1016/j.toxlet.2020.04.011. Epub 2020 Apr 19.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32315709/>

Charles S, Jomini S, Fessard V, Bigorgne-Vizade E, Rousselle C, Michel C.
Assessment of the in vitro genotoxicity of TiO₂ nanoparticles in a regulatory context.
Nanotoxicology. 2018 May;12(4):357-374. doi: 10.1080/17435390.2018.1451567. Epub 2018 Mar 19. PMID: 29553842.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29553842/>

Rodriguez-Garraus A, Azqueta A, Vettorazzi A, López de Cerain A.
Genotoxicity of Silver Nanoparticles.
Nanomaterials (Basel). 2020;10(2):251. Published 2020 Jan 31. doi:10.3390/nano10020251

Inoltre, il meccanismo del potenziale danno al DNA non è completamente compreso. A parte l'intercalazione diretta o l'interazione fisica e/o elettrochimica con le nanoparticelle ³²⁴, si ritiene ancora una volta che i ROS giochino un ruolo chiave nel danno al DNA.

Ciò significa che le particelle non devono necessariamente raggiungere il nucleo, ma potrebbero ad esempio indurre genotossicità tramite stress ossidativo.

LA NANOTOSSICOLOGIA DELL'ALLUMINIO ADIUVANTE

L'alluminio adiuvante viene utilizzato nella pratica vaccinale da oltre 50 anni per indurre un'immunizzazione efficace.

Glenny e i suoi collaboratori furono i primi ricercatori a dimostrare l'effetto adiuvante dei composti di alluminio nel 1926, con l'iniezione del tossoide difterico precipitato con **allume di potassio** ($KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$). I vaccini preparati secondo questo principio sono indicati nella pratica vaccinale come vaccini a base di allume-precipitato.

Poiché tali preparazioni risultano essere particolarmente eterogenee, sono stati sviluppati **gel a base di alluminio idrossido idrato** con la capacità di adsorbire le proteine dell'antigene da una soluzione acquosa secondo procedure ben standardizzate; tali preparazioni sono denominate vaccini a base di alluminio adsorbito.

L'**alluminio fosfato** è stato introdotto nel 1946 in seguito alle ricerche di Ericson in cui il tossoide difterico veniva co-precipitato in una matrice di alluminio fosfato.

L'alluminio adiuvante provoca una **forte risposta Th2**, ma è piuttosto inefficace contro gli agenti patogeni che richiedono l'immunità Th1-cellulo-mediata.

Induce la risposta immunitaria mediante un **effetto depot e l'attivazione delle APC** (cellule presentanti l'antigene).

Recentemente, l'**inflammasoma NLRP3** è stato collegato alle sue proprietà immunostimolanti (e anche alla sua tossicità). ³²⁵

Un meccanismo di attivazione dell'inflammasoma è stato spiegato dal danno lisosomiale indotto dall'idrossido di alluminio, che innesca il rilascio di catepsina B libera che può avviare l'assemblaggio dell'inflammasoma, attivare la caspasi-1 e rilasciare citochine attive.

L'attivazione iniziale del fattore di trascrizione nucleare (NF- κ B) tramite il lipopolisaccaride (LPS) sembra essere richiesta per l'attivazione di NLRP3 da parte dell'idrossido di alluminio [62]. Inoltre, l'idrossido di alluminio può aumentare i livelli di acido urico nel sito di vaccinazione, il che potrebbe promuovere la conversione di pro-IL-1b e pro-IL-18 nelle loro forme attive attraverso l'attivazione di NLRP3. ³²⁶

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7075128/>

Karlsson HL. The comet assay in nanotoxicology research.

Anal Bioanal Chem. 2010 Sep;398(2):651-66. doi: 10.1007/s00216-010-3977-0. Epub 2010 Jul 18. PMID: 20640410.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20640410/>

³²⁴ Xie W, Wang L, Zhang Y, Su L, Shen A, Tan J, Hu J.

Nuclear targeted nanoprobe for single living cell detection by surface-enhanced Raman scattering.

Bioconj Chem. 2009 Apr;20(4):768-73. doi: 10.1021/bc800469g. PMID: 19267459.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19267459/>

Mehrabi M, Wilson R.

Intercalating gold nanoparticles as universal labels for DNA detection.

Small. 2007 Sep;3(9):1491-5. doi: 10.1002/smll.200700230. PMID: 17661307.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17661307/>

³²⁵ Ghimire TR.

The mechanisms of action of vaccines containing aluminum adjuvants: an in vitro vs in vivo paradigm.

Springerplus. 2015;4:181. Published 2015 Apr 16. doi:10.1186/s40064-015-0972-0

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4406982/>

³²⁶ Ivanov K, Garanina E, Rizvanov A, Khaiboullina S.

Inflammasomes as Targets for Adjuvants.

Pathogens. 2020;9(4):252. Published 2020 Mar 30. doi:10.3390/pathogens9040252

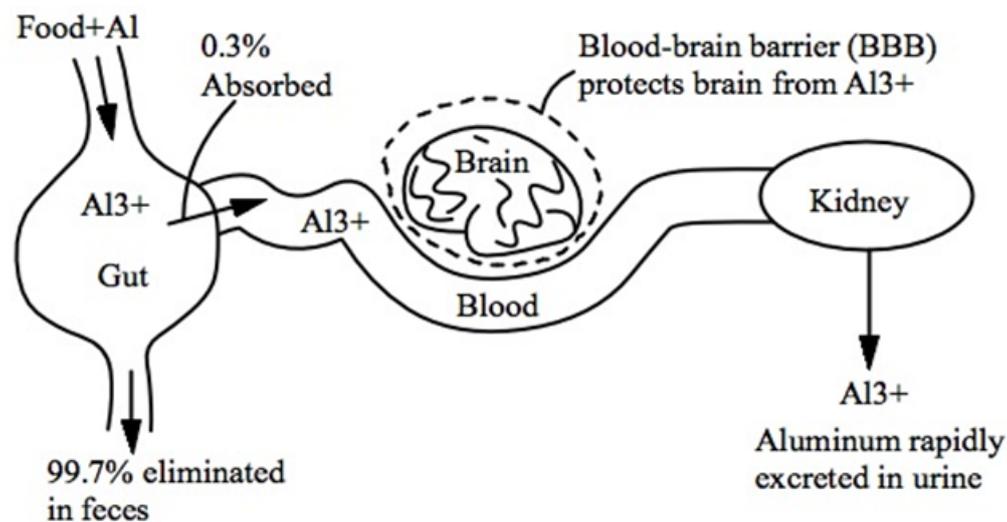
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7238254/>

E' importante tenere presente che l'alluminio utilizzato come adiuvante si trova nella forma di **nanoparticelle di Al idrossido e/o Al fosfato (da ora abbreviato in NA)**, e che la sicurezza dell'alluminio come adiuvante si è basata su studi relativi alla sua ingestione, per la quale si ha uno scarso assorbimento (circa 0,3%)³²⁷, rispetto alla somministrazione intramuscolare che raggiunge un assorbimento di circa il 100%.³²⁸

Cinetica dell'alluminio ingerito

L'alluminio ingerito entra nel sangue attraverso l'intestino. Nel sangue, l'alluminio assimilato per via orale è in forma ionica solubile in acqua, tipicamente Al^{3+} o come complesso di alluminio (es. con aminoacidi, ferritina ect).

L'alluminio ionico è tossico ma la sua penetrazione nel cervello è bloccata dalla barriera ematoencefalica (BBB), e viene poi rapidamente filtrato dal sangue nei reni senza causare un'eccessiva tossicità, se in quantità ridotte. Queste difese naturali sono adeguate a proteggere il cervello dai normali livelli presenti in natura di alluminio ingerito.



<http://vaccinepapers.org/vaccine-aluminum-travels-to-the-brain/>

Cinetica dell'alluminio somministrato per via intramuscolare

Quando invece l'alluminio viene iniettato a livello intramuscolare, le NA vengono fagocitate dai macrofagi prima che queste possano andare in soluzione.

Il problema delle NA è che non vengono digerite dagli enzimi dei macrofagi e quando sono al loro interno vanno in soluzione molto più lentamente.

Le NA quindi persistono per lungo tempo e i macrofagi lasciano fuoriuscire lentamente l'alluminio.

I macrofagi che fagocitano le NA diventano quindi dei veicoli di alluminio altamente contaminanti, in quanto lo diffondono in ogni distretto del corpo, compreso il cervello perchè sono in grado di attraversare la barriera ematoencefalica.

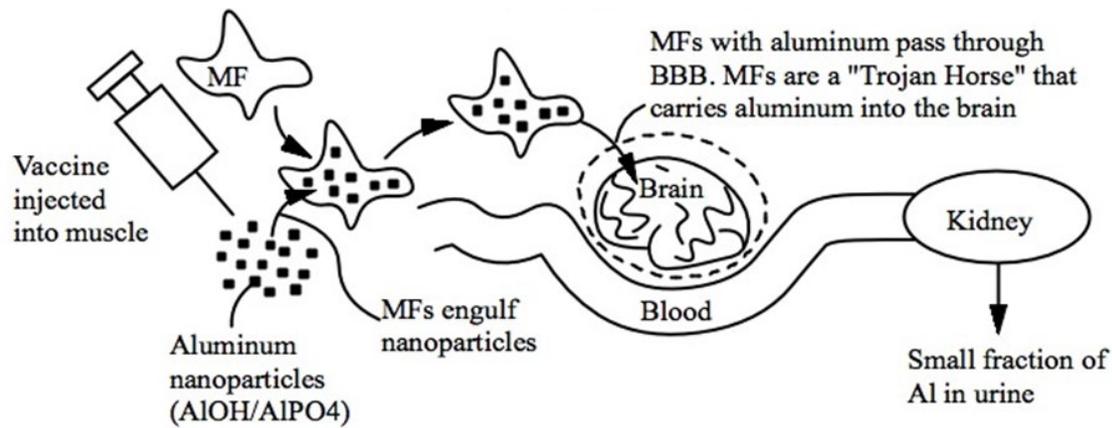
Una volta all'interno del cervello, l'alluminio danneggia le cellule cerebrali, e le sostanze tossiche prodotte a loro volta innescano un'inflammatione che attira altri macrofagi, che possono trasportare altro alluminio, e instaurano così un circolo vizioso che porta ad un danno cerebrale sempre più vasto.

³²⁷ Yokel RA, Hicks CL, Florence RL.

Aluminum bioavailability from basic sodium aluminum phosphate, an approved food additive emulsifying agent, incorporated in cheese. *Food Chem Toxicol.* 2008;46(6):2261-2266. doi:10.1016/j.fct.2008.03.004 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2449821/>

³²⁸ Yokel RA, McNamara PJ.

Aluminium toxicokinetics: an updated minireview. *Pharmacol Toxicol.* 2001 Apr;88(4):159-67. doi: 10.1034/j.1600-0773.2001.d01-98.x. PMID: 11322172. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11322172/>



<http://vaccinepapers.org/vaccine-aluminum-travels-to-the-brain/>

Prima che le nanoparticelle di alluminio possano dissolversi, vengono ingerite dai macrofagi (MFs). Gli MFs poi trasportano le nanoparticelle di alluminio in tutto il corpo, incluso il cervello. Le MFs attraverso la BBB. All'interno del cervello l'alluminio viene liberato lentamente dalle MFs e causano danno cerebrale.

Le evidenze scientifiche a supporto di questo meccanismo di veicolazione/traslocazione e tossicità dell'alluminio

Si tenga presente che il cervello è un organo estremamente sensibile all'alluminio; concentrazioni di alluminio pari a 10-100 nanoM (pari a 270 nanogrammi/L di alluminio) sono in grado di causare infiammazione rispettivamente delle cellule dei vasi sanguigni³²⁹ e dei neuroni umani.³³⁰

L'evidenza scientifica per questo meccanismo di veicolazione è documentata da più studi svolti da Università e laboratori finanziati con fondi governativi per dimostrare i seguenti passaggi:

- l'incorporazione delle NA da parte dei macrofagi, la traslocazione dei macrofagi nel cervello
- l'osservazione che i macrofagi trasportano le nanoparticelle nel cervello.

Inoltre è stato dimostrato anche l'intero processo: le NA iniettate in animali da esperimento sono state rilevate e fotografate nel cervello.

Si riportano di seguito i risultati di alcuni dei numerosi studi:

Mold et al (2014³³¹ e 2016³³²) hanno dimostrato per la prima volta l'inequivocabile identificazione di nanoparticelle di alluminio adiuvante all'interno delle cellule THP-1 (monocytic T helper 1 cell line) e che un

³²⁹ Alexandrov PN, Kruck TP, Lukiw WJ.

Nanomolar aluminum induces expression of the inflammatory systemic biomarker C-reactive protein (CRP) in human brain microvessel endothelial cells (hBMECs).

J Inorg Biochem. 2015 Nov;152:210-3. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2015.07.013. Epub 2015 Aug 1. PMID: 26265215.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26265215/>

³³⁰ Lukiw WJ, Percy ME, Kruck TP.

Nanomolar aluminum induces pro-inflammatory and pro-apoptotic gene expression in human brain cells in primary culture.

J Inorg Biochem. 2005 Sep;99(9):1895-8. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2005.04.021. PMID: 15961160.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15961160/>

³³¹ Mold M, Eriksson H, Siesjö P, Darabi A, Shardlow E, Exley C.

Unequivocal identification of intracellular aluminium adjuvant in a monocytic THP-1 cell line.

Sci Rep. 2014;4:6287. Published 2014 Sep 5. doi:10.1038/srep06287

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4155332/>

Mold M, Shardlow E, Exley C.

Insight into the cellular fate and toxicity of aluminium adjuvants used in clinically approved human vaccinations.

Sci Rep. 2016;6:31578. Published 2016 Aug 12. doi:10.1038/srep31578

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4981857/>

³³² Mold M, Shardlow E, Exley C.

Insight into the cellular fate and toxicity of aluminium adjuvants used in clinically approved human vaccinations.

Sci Rep. 2016;6:31578. Published 2016 Aug 12. doi:10.1038/srep31578

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4981857/>

sovraccarico di alluminio idrossido nel citoplasma delle cellule THP-1, pur senza indurre una citotossicità immediata può favorire il suo successivo trasporto attraverso il corpo compreso l'accesso al cervello.

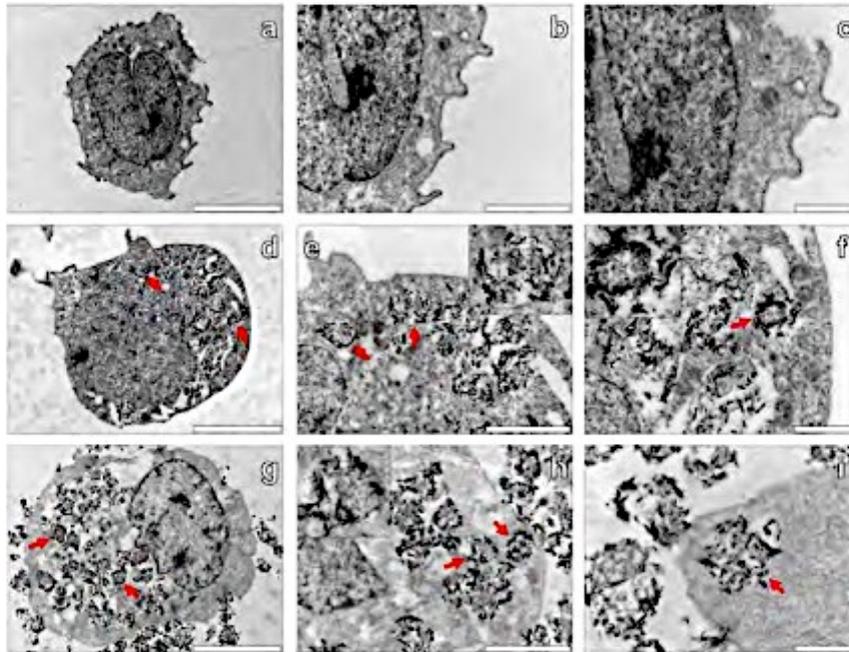
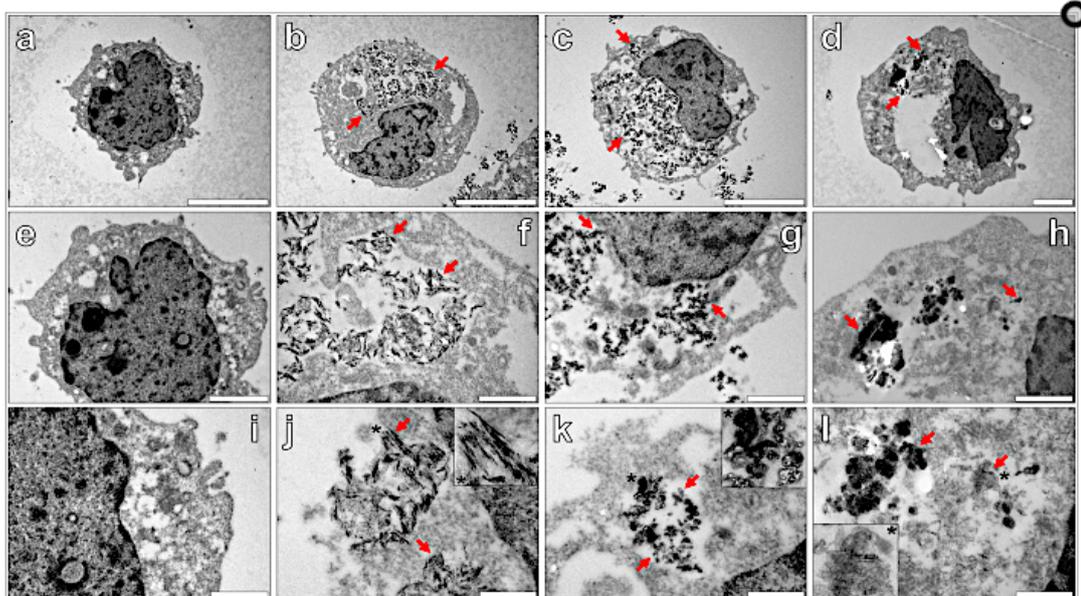


Figure 5 | Representative electron micrographs from TEM of Spurr resin-sectioned (100 nm sections) native THP-1 cells (a-c), THP-1 cells co-cultured with 50 µg/mL AlO(OH)^{SiO₂} adjuvant (24 h) (d-f) & THP-1 cells co-cultured with 200 µg/mL AlO(OH)^{SiO₂} adjuvant (24 h) (g-i). Cell resin-sections were stained for 20 min with 2% ethanolic uranyl acetate, rinsed with 30% ethanol followed by ultrapure water and finally allowed 24 h drying time prior to analysis via TEM. Inserts show close-ups of intracellular adjuvant particles contained within vesicle-like structures and the red arrows highlight their presence within the respective cell images. Magnification & scale bars: (a), (d). & (g). × 8 K, 5 µm, (b), (e). & (h). × 20 K, 2 µm, (c), (f). & (i). × 30 K, 1 µm, respectively.

Figure 8



Representative electron micrographs from TEM of Spurr resin-sectioned (100 nm sections) native THP-1 cells (a,e,i), THP-1 cells co-cultured with 50 µg/mL Alhydrogel[®] (24 h) (b,f,j) and 50 µg/mL Adju-Phos[®] (Brenntag Biosector, Denmark) adjuvant (24 h) (c,g,k) and 50 µg/mL Inject[™] Alum (Pierce, Thermo Scientific) adjuvant (24 h) (d,h,l). Cell resin-sections were stained for 20 min with 2% ethanolic uranyl acetate, rinsed with 30% ethanol followed by ultrapure water and finally allowed 24 h drying time prior to analysis via TEM. Inserts show close-ups of intracellular adjuvant particles contained within vesicle-like structures and the red arrows highlight their presence within the respective cell images. Magnification and scale bars: (a-c) X 8 K, 5 µm, (d) X 10 K, 2 µm, (e) X 15 K, 2 µm, (f-h) X 30 K, 1 µm, (i) X 30 K, 1 µm and (j-l) X 60 K, 0.5 µm, respectively.

Immagini di microscopia elettronica di nanoparticelle di alluminio adiuvante all'interno dei macrofagi, i quali ingeriscono (fagocitano) le nanoparticelle

Fig. 5 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25498314/>

Fig. 8 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4981857/>

Questi studi del gruppo di Mold e di altri, ³³³ hanno permesso di dimostrare che la fagocitosi è uno dei meccanismi più riconosciuti che governa l'internalizzazione cellulare e la successiva degradazione di nanoparticelle di alluminio adiuvante, attraverso il processo molecolare di autofagia.

Nelle ultime fasi dell'autofagia, la maturazione degli autofagosomi in autolisosomi acidifica i risultanti compartimenti vescicolari formati a circa pH 4,0 - 4.5.

Ciò provoca la degradazione del particolato di alluminio adiuvante internalizzato nei lisosomi, liberando in tal modo Al³⁺ (aq) nel citosol cellulare.

Il rilascio dell'enzima catepsina B agisce come segnale di pericolo endogeno, il quale insieme ai prodotti di degradazione dell'alluminio adiuvante che inducono la produzione di molecole immunostimolatorie (damage associated molecular patterns: DAMPs), trasformano le cellule presentanti l'antigene in cellule infiammatorie; tale effetto aumenta la mortalità cellulare in vitro e potrebbe essere responsabile dell'infiammazione nel sito d'iniezione.

Studi di Gherardi et al ³³⁴

³³³ Exley C, Mold MJ.

The binding, transport and fate of aluminium in biological cells.

J Trace Elem Med Biol. 2015 Apr;30:90-5. doi: 10.1016/j.jtemb.2014.11.002. Epub 2014 Nov 20. PMID: 25498314.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25498314/>

Ohlsson L, Exley C, Darabi A, Sandén E, Siesjö P, Eriksson H.

Aluminium based adjuvants and their effects on mitochondria and lysosomes of phagocytosing cells.

J Inorg Biochem. 2013 Nov;128:229-36. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2013.08.003. Epub 2013 Aug 9. PMID: 23992993.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23992993/>

Mile I, Svensson A, Darabi A, Mold M, Siesjö P, Eriksson H.

Al adjuvants can be tracked in viable cells by lumogallion staining.

J Immunol Methods. 2015 Jul;422:87-94. doi: 10.1016/j.jim.2015.04.008. Epub 2015 Apr 17. PMID: 25896212.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25896212/>

³³⁴ Crépeaux G, Eidi H, David MO, Baba-Amer Y, Tzavara E, Giros B, Authier FJ, Exley C, Shaw CA, Cadusseau J, Gherardi RK.

Non-linear dose-response of aluminium hydroxide adjuvant particles: Selective low dose neurotoxicity.

Toxicology. 2017 Jan 15;375:48-57. doi: 10.1016/j.tox.2016.11.018. Epub 2016 Nov 28. PMID: 27908630.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27908630/>

Gherardi RK, Aouizerate J, Cadusseau J, Yara S, Authier FJ.

Aluminum adjuvants of vaccines injected into the muscle: Normal fate, pathology and associated disease.

Morphologie. 2016 Jun;100(329):85-94. doi: 10.1016/j.morpho.2016.01.002. Epub 2016 Apr 6. PMID: 26948677.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26948677/>

Gherardi RK, Eidi H, Crépeaux G, Authier FJ, Cadusseau J.

Biopersistence and brain translocation of aluminum adjuvants of vaccines.

Front Neurol. 2015;6:4. Published 2015 Feb 5. doi:10.3389/fneur.2015.00004

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4318414/>

Eidi H, David MO, Crépeaux G, et al.

Fluorescent nanodiamonds as a relevant tag for the assessment of alum adjuvant particle biodisposition.

BMC Med. 2015;13:144. Published 2015 Jun 17. doi:10.1186/s12916-015-0388-2

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4482291/>

Gherardi RK, Cadusseau J, Authier FJ.

Bio-persistence et distribution systémique des particules injectées par voie intra-musculaire: quelle incidence sur la tolérance à long terme des adjuvants aluminiques? [Biopersistence and systemic distribution of intramuscularly injected particles: what impact on long-term tolerability of alum adjuvants?].

Bull Acad Natl Med. 2014 Jan;198(1):37-48; discussion 49-53. French. PMID: 26259285.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26259285/>

Khan Z, Combadière C, Authier FJ, et al.

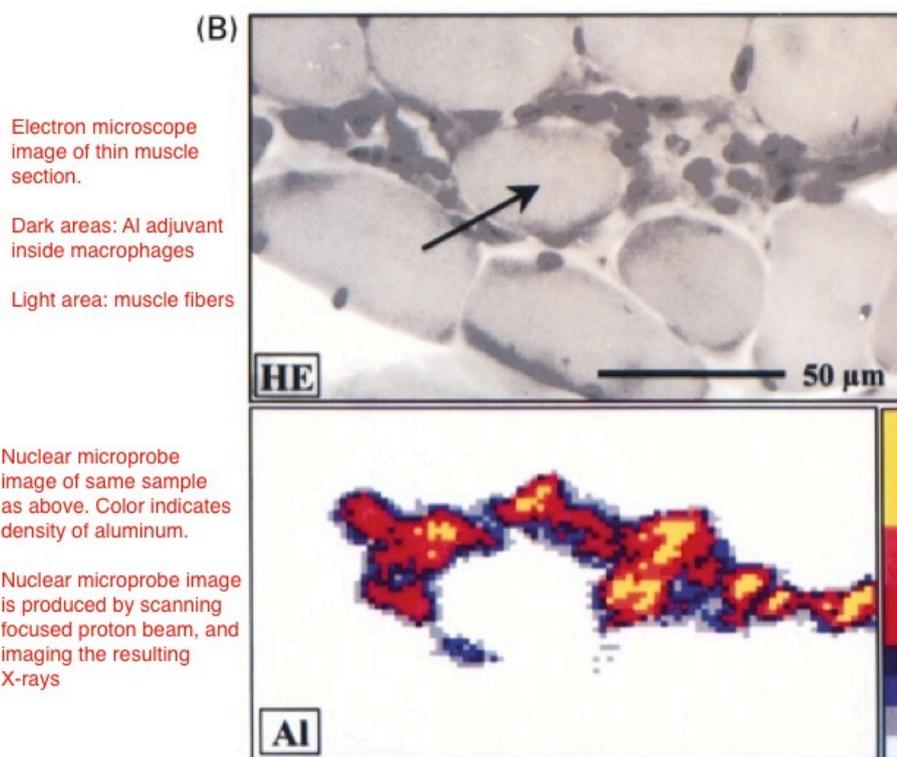
Slow CCL2-dependent translocation of biopersistent particles from muscle to brain.

BMC Med. 2013;11:99. Published 2013 Apr 4. doi:10.1186/1741-7015-11-99

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3616851/>

Un primo studio ³³⁵ in pazienti affetti da miofasciite macrofagica (MMF) ha rilevato NA all'interno dei macrofagi nel punto delle iniezioni intramuscolari del vaccino.

Sono stati ottenuti campioni dalla biopsia di tessuto muscolare da tre mesi a 8 anni dopo l'iniezione vaccinale (media: 36 mesi). La presenza di alluminio all'interno dei macrofagi è stata confermata mediante 3 metodi diversi. L'alluminio era presente solo nei macrofagi e non nelle cellule muscolari.



<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11522584/>

Immagini al Microscopio elettronico (in alto) e microsonda nucleare (o emissione di raggi X protone-indotta (PIXE); in basso) di sezioni sottili di muscolo prelevati da pazienti affetti da miofasciite macrofagica (MMF). Questo studio ha mostrato che le NA rimangono all'interno macrofagi (MFS) nel tessuto muscolare per 8 anni dopo l'iniezione intramuscolare.

L'infiammazione causata dal movimento dei macrofagi:

Uno studio del 2009 di **D'Mello et al** ³³⁶ ha dimostrato che l'infiammazione specifica del fegato (danno del fegato dovuto dal blocco del dotto biliare) causava l'ingresso di macrofagi periferici all'interno del SNC.

In particolare, in presenza di infiammazione epatica i topi presentavano livelli elevati di MCP-1 (monocyte chemoattractant protein o CCL2) e un aumento del numero di monociti circolanti esprimenti CCR2 (CCR2: recettore per CCL2; monociti: sono i precursori dei macrofagi).

Si ricorda che l'MCP-1 è anche un marcatore predittivo dell'esito fatale della sepsi e il suo aumento è associato al grado d'infiammazione sistemica. ³³⁷

³³⁵ Gherardi RK, Coquet M, Cherin P, Belec L, Moretto P, Dreyfus PA, Pellissier JF, Chariot P, Authier FJ. Macrophagic myofasciitis lesions assess long-term persistence of vaccine-derived aluminium hydroxide in muscle. *Brain*. 2001 Sep;124(Pt 9):1821-31. doi: 10.1093/brain/124.9.1821. PMID: 11522584. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11522584/>

³³⁶ D'Mello C, Le T, Swain MG. Cerebral microglia recruit monocytes into the brain in response to tumor necrosis factor α signaling during peripheral organ inflammation. *J Neurosci*. 2009;29(7):2089-2102. doi:10.1523/JNEUROSCI.3567-08.2009 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6666330/>.

³³⁷ Zhu T, Liao X, Feng T, Wu Q, Zhang J, Cao X, Li H. Plasma Monocyte Chemoattractant Protein 1 as a Predictive Marker for Sepsis Prognosis: A Prospective Cohort Study. *Tohoku J Exp Med*. 2017 Feb;241(2):139-147. doi: 10.1620/tjem.241.139. PMID: 28202856. https://www.jstage.jst.go.jp/article/tjem/241/2/241_139/_pdf/-char/en

In questo modello d’inflammatione, la microglia (la componente macrofagica residente nel SNC) era attivata e produceva MCP-1/CCL2 prima dell’infiltrazione dei monociti, e si è visto che tale stimolazione era mediata dalla via del segnale del TNF-alfa periferico (mediatore dell’inflammatione).

In altre parole, la microglia nel SNC è in grado di rilevare l’inflammatione epatica e di attivarsi per mezzo del TNF-alfa prodotto a livello periferico; la microglia attivata rilascia MCP-1 che attrae i macrofagi nel cervello dalla periferia.

Questa è una delle modalità con cui le NA vengono trasportate dai macrofagi nel SNC.

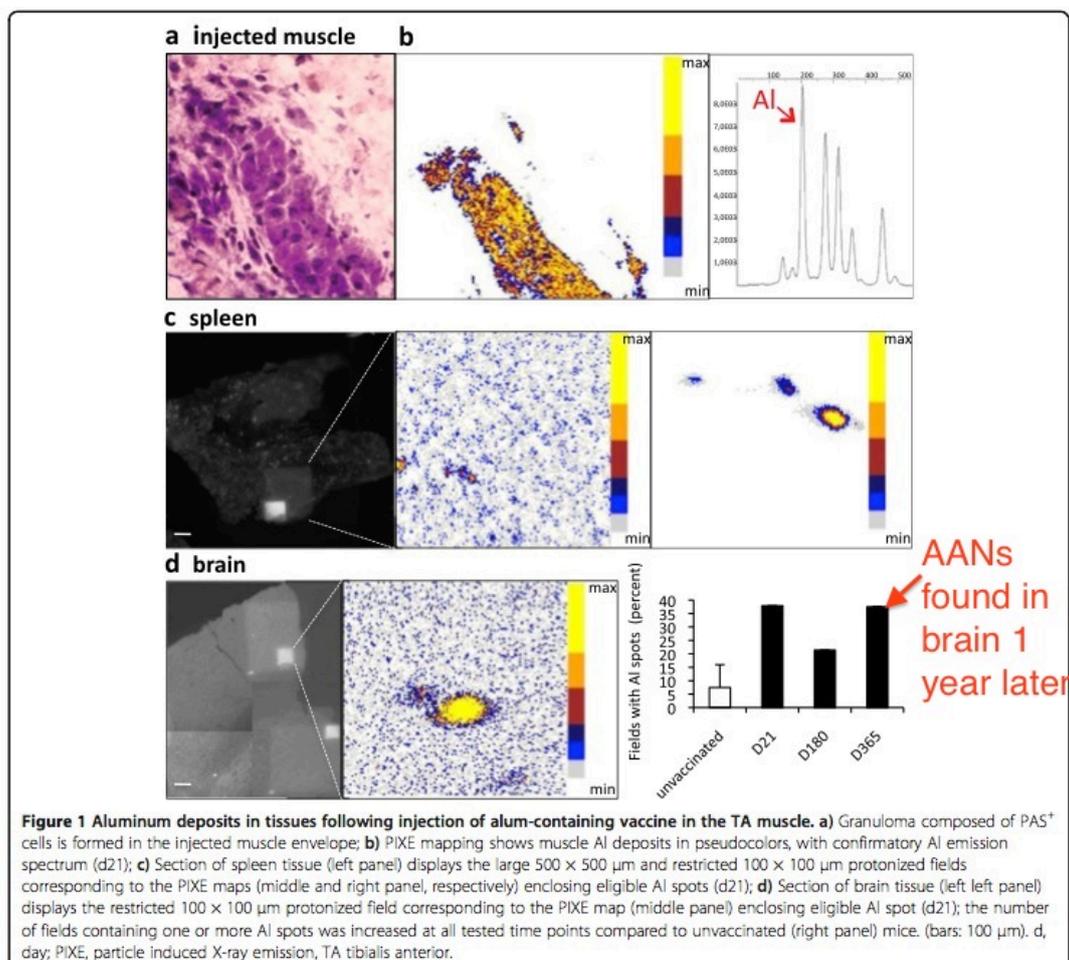
I risultati di tale studio identificano l’esistenza di una nuova via di comunicazione sistema immunitario-SNC che avviene nel corso di infiammazioni localizzate in organi periferici e può avere specifiche implicazioni nello sviluppo di alterazioni della neurotrasmissione cerebrale che s’incontrano in varie patologie infiammatorie che avvengono fuori del SNC; quindi un’inflammatione in qualsiasi parte del corpo può far penetrare nel cervello macrofagi che veicolano NA.

Le nanoparticelle di alluminio adiuvante fotografate nel tessuto cerebrale di topo:

Un importante lavoro di Khan et al.³³⁸ ha permesso di documentare che le NA e altre nanoparticelle (es. Latex) iniettate per via intramuscolare penetravano all’interno del cervello e nei reni e potevano essere rilevate fino ad un anno dopo l’iniezione.

Questi risultati contraddicono un assunto riguardo l’assenza di tossicità dell’alluminio adiuvante inoculato per via IM, cioè che l’alluminio rimane nel punto d’iniezione senza causare danno.

Di seguito è riportata la foto che mostra le NA nel cervello e nei reni:



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3616851/>

³³⁸ Khan Z, Combadière C, Authier FJ, et al. Slow CCL2-dependent translocation of biopersistent particles from muscle to brain. BMC Med. 2013;11:99. Published 2013 Apr 4. doi:10.1186/1741-7015-11-99 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3616851/>

Khan ha inoltre osservato che il trasporto delle NA nel SNC e nei tessuti è MPC-1- dipendente, e questo fatto è un'ulteriore evidenza che i macrofagi sono responsabili del trasporto delle nanoparticelle.

Il meccanismo con cui le nanoparticelle vengono veicolate attraverso i macrofagi in tutti i distretti dell'organismo (meccanismo detto del "cavallo di Troia") è oggetto di studio per l'applicazione farmaceutica, al fine di portare farmaci nel cervello attraverso la BBB.

Gli studi hanno dimostrato che le nanoparticelle (ad esempio contenenti serotonina, farmaci contro il cancro, o farmaci anti-HIV) possono essere trasportate attraverso la BBB utilizzando i macrofagi come carrier ³³⁹; un'altra importante applicazione delle nanoparticelle è la diagnostica in vivo dell'infiammazione cerebrale. ³⁴⁰

Ne segue che il trasporto di nanoparticelle veicolate dai macrofagi nel cervello è un fenomeno ampiamente accettato e verificato.

I macrofagi però fanno la stessa cosa con le NA provenienti dai vaccini. Dal momento che l'alluminio è una potente neurotossina e stimola fortemente l'infiammazione del cervello, ³⁴¹ ciò è una seria preoccupazione per la sicurezza dei vaccini.

Alcuni studi recenti sulla somministrazione di Al adiuvante nei topi ha rivelato una maggiore complessità del trasporto dell'Al adiuvante. ³⁴²

Tali studi hanno evidenziato che:

- 1) **il trasporto dipende dal sito d'iniezione** (la traslocazione è maggiore in seguito all'iniezione sottocutanea rispetto all'iniezione intramuscolare). Inoltre l'intervallo di dosaggio che provoca il trasporto nel cervello può variare a seconda della sede anatomica dell'iniezione.
- 2) **il trasporto dipende inversamente dal dosaggio**. Un dosaggio di 200 mcg / kg ha provocato il trasporto nel cervello (e cambiamenti comportamentali) mentre il dosaggio di 400 mcg / kg non ha avuto effetti

³³⁹ Reynolds JL, Mahato RI.

Nanomedicines for the Treatment of CNS Diseases.

J Neuroimmune Pharmacol. 2017 Mar;12(1):1-5. doi: 10.1007/s11481-017-9725-x. Epub 2017 Feb 1. PMID: 28150132.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28150132/>

Choi MR, Bardhan R, Stanton-Maxey KJ, et al.

Delivery of nanoparticles to brain metastases of breast cancer using a cellular Trojan horse.

Cancer Nanotechnol. 2012;3(1-6):47-54. doi:10.1007/s12645-012-0029-9

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3505533/>

³⁴⁰ Kirschbaum K, Sonner JK, Zeller MW, et al.

In vivo nanoparticle imaging of innate immune cells can serve as a marker of disease severity in a model of multiple sclerosis.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2016;113(46):13227-13232. doi:10.1073/pnas.1609397113

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5135308/>

³⁴¹ Alexandrov PN, Kruck TP, Lukiw WJ.

Nanomolar aluminum induces expression of the inflammatory systemic biomarker C-reactive protein (CRP) in human brain microvessel endothelial cells (hBMECs).

J Inorg Biochem. 2015 Nov;152:210-3. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2015.07.013. Epub 2015 Aug 1. PMID: 26265215.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26265215/>

Jovanova-Nesic K, Shoenfeld Y, Spector NH.

Aluminum excitotoxicity and neuroautoimmunity: the role of the brain expression of CD32+ (FcγRIIa), ICAM-1+ and CD3ξ in aging.

Curr Aging Sci. 2012 Dec;5(3):209-17. doi: 10.2174/1874609811205030007. PMID: 23387884.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23387884/>

³⁴² Crépeaux G, Eidi H, David MO, Tzavara E, Giros B, Exley C, Curmi PA, Shaw CA, Gherardi RK, Cadusseau J.

Highly delayed systemic translocation of aluminum-based adjuvant in CD1 mice following intramuscular injections.

J Inorg Biochem. 2015 Nov;152:199-205. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2015.07.004. Epub 2015 Jul 22. PMID: 26384437.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26384437/>

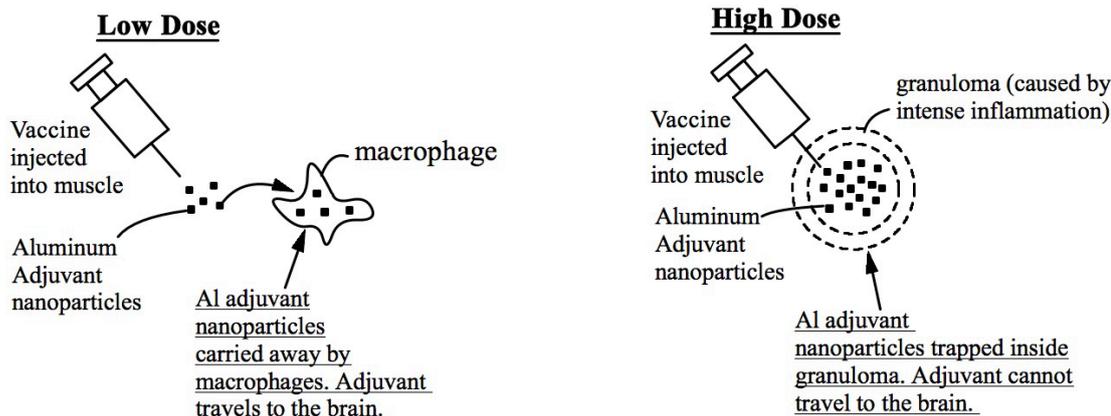
Eidi H, David MO, Crépeaux G, et al.

Fluorescent nanodiamonds as a relevant tag for the assessment of alum adjuvant particle biodisposition.

BMC Med. 2015;13:144. Published 2015 Jun 17. doi:10.1186/s12916-015-0388-2

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4482291/>

analoghi. Ciò può essere dovuto al fatto che la mobilità dei macrofagi viene compromessa ad alte dosi. Una maggiore infiammazione locale al sito di iniezione può causare una ridotta mobilità dei macrofagi.³⁴³



<http://vaccinepapers.org/al-adjuvant-causes-brain-inflammation-behavioral-disorders/>

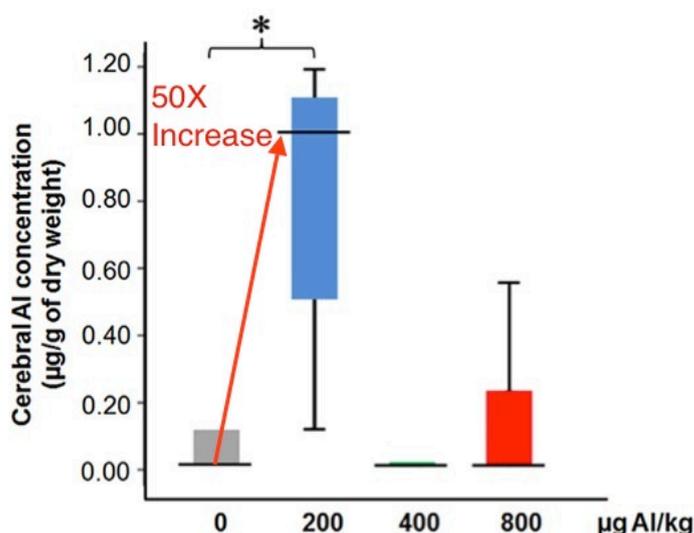


Fig. 3. Aluminium level determination in brain (µg/g of dry weight). Increased cerebral concentrations of aluminium were selectively observed with 200 µg/kg low Alhydrogel[®] dose. 5 mice/group; results expressed as median and range values, with quartiles boxes; non parametric Kruskal-Wallis test followed by Mann-Whitney test. * p < 0.05.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27908630/>

3) **l'estrema persistenza biologica delle particelle adiuvante Al.** Le particelle sono state osservate in tessuti e organi periferici fino a 270 giorni dopo la somministrazione, inclusi il cervello, la milza e i linfonodi.³⁴⁴ Ne segue da quanto discusso che le nanoparticelle di adiuvante sono biologicamente attive, e questo è il motivo per cui vengono utilizzate nei vaccini.³⁴⁵

³⁴³ Crépeaux G, Eidi H, David MO, Baba-Amer Y, Tzavara E, Giros B, Authier FJ, Exley C, Shaw CA, Cadusseau J, Gherardi RK. Non-linear dose-response of aluminium hydroxide adjuvant particles: Selective low dose neurotoxicity. Toxicology. 2017 Jan 15;375:48-57. doi: 10.1016/j.tox.2016.11.018. Epub 2016 Nov 28. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27908630/>

³⁴⁴ Vaccines and Autoimmunity June 2015, Wiley-Blackwell
Yehuda Shoenfeld , Nancy Agmon-Levin , Lucija Tomljenovic
Pag 261-270

³⁴⁵ Reddy ST, van der Vlies AJ, Simeoni E, Angeli V, Randolph GJ, O'Neil CP, Lee LK, Swartz MA, Hubbell JA. Exploiting lymphatic transport and complement activation in nanoparticle vaccines. Nat Biotechnol. 2007 Oct;25(10):1159-64. doi: 10.1038/nbt1332. Epub 2007 Sep 16. PMID: 17873867. <https://www.nature.com/articles/nbt1332>

Swartz MA, Hubbell JA, Reddy ST. Lymphatic drainage function and its immunological implications: from dendritic cell homing to vaccine design. Semin Immunol. 2008 Apr;20(2):147-56. doi: 10.1016/j.smim.2007.11.007. Epub 2008 Jan 16. PMID: 18201895.

Le NA causano infiammazione e attivazione del sistema immunitario (polarizzazione Th2 del sistema immunitario, produzione di citochine infiammatorie, attivazione del complemento), e come già visto viaggiano in tutte le parti del corpo (incluso il cervello che è protetto dalla barriera ematoencefalica dall'ingresso degli ioni Al³⁺).

Nella figura seguente sono riassunti i vari livelli a cui la tossicità dell'alluminio agisce.

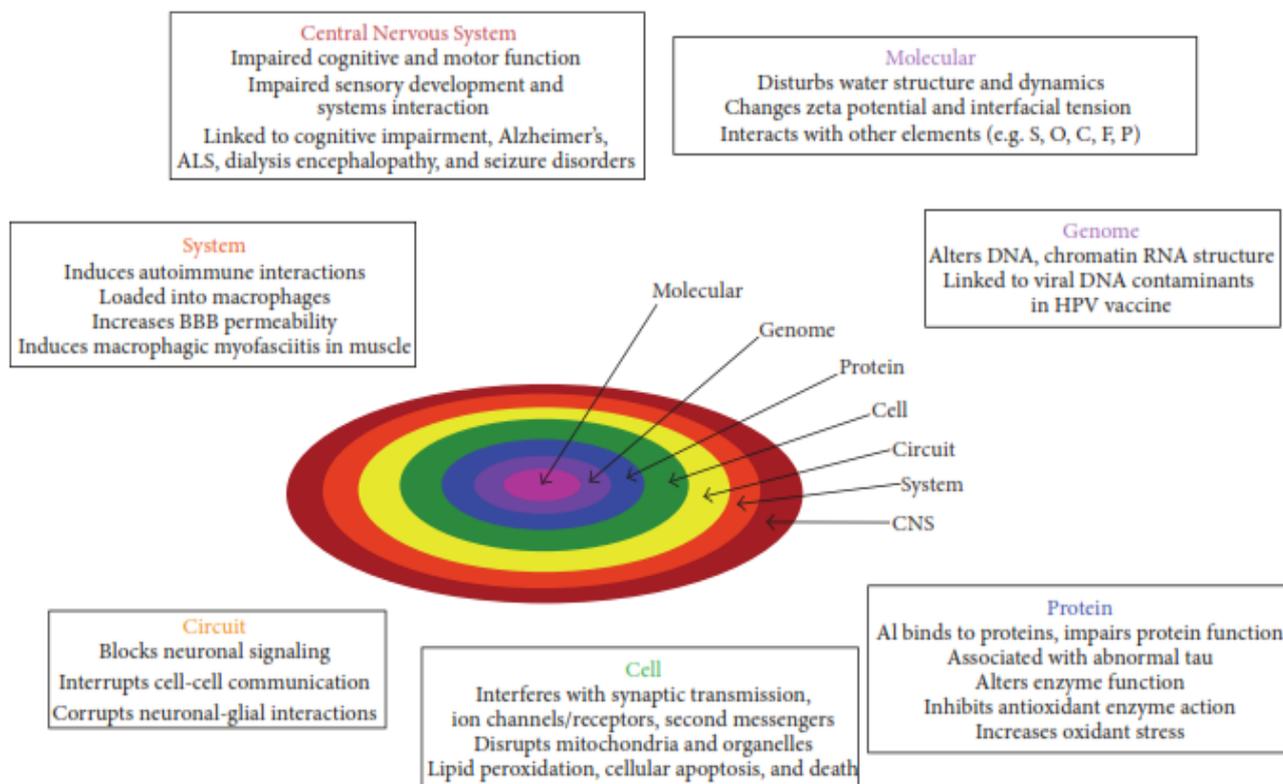


FIGURE 4: Schematic of the biosemiotic levels at which Al can impact the body and CNS.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4202242/>

Di seguito si riporta la risposta dell'EMA sulla tossicità dell'alluminio adiuvante al sig. Ivan Catalano, ex parlamentare e vicepresidente dell'ultima Commissione Uranio imposterito:

EMA/133566/201816 March 2018

1.7. Alluminio come adiuvante

Per sua informazione, tenga presente che l'uso di idrossido di alluminio e fosfato di alluminio nei vaccini come adiuvanti (usati per migliorare la risposta immunitaria) è ormai consolidato da molti anni. Queste sostanze sono definite nella farmacopea europea.⁹ In particolare, per i vaccini per uso umano la farmacopea specifica un massimo di 1,25 mg di alluminio per singola dose umana quando l'alluminio viene utilizzato in questo modo, se non diversamente giustificato e approvato per un prodotto specifico. Standard simili si applicano in altre parti del mondo.

Esistono attualmente 17 vaccini per uso umano che sono stati approvati tramite l'EMA (attraverso la cosiddetta procedura centralizzata), così come molti altri vaccini autorizzati a livello nazionale (Stato membro), che utilizzano idrossido di alluminio, fosfato di alluminio o idrossifosfato di alluminio amorfo solfato come adiuvante.

I benefici di un adiuvante in un vaccino devono essere valutati rispetto al rischio di qualsiasi reazione avversa inerente ad esso. **L'attuale atteggiamento nei confronti del rischio-beneficio della vaccinazione favorisce la sicurezza rispetto all'efficacia quando un vaccino viene somministrato a una popolazione sana. Una valutazione finale della sicurezza della nuova formulazione del vaccino può essere condotta solo sulla base di studi clinici.**¹⁸

Per ulteriori informazioni sui coadiuvanti consultare la seguente pagina Web:

http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general_content_000904.jsp&mid=WC0b01ac058002956b

⁹ Vaccines for human use monograph (Ph.Eur. 07/2017 0153)

Aluminium (2.5.13): maximum 1.25 mg of aluminium (Al) per single human dose where an aluminium adsorbent has been used in the vaccine, unless otherwise stated.

Calcium (2.5.14): maximum 1.3 mg of calcium (Ca) per single human dose where a calcium adsorbent has been used in the vaccine, unless otherwise stated.

Free formaldehyde (2.4.18): maximum 0.2 g/L of free formaldehyde in the final product where formaldehyde has been used in the preparation of the vaccine, unless otherwise stated.

Phenol (2.5.15): maximum 2.5 g/L in the final product where phenol has been used in the preparation of the vaccine, unless otherwise stated.

¹⁸ Adjuvants in vaccines for human use

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003809.pdf

Si aggiunge inoltre il quesito al parlamento Europeo [E-001327/2018](#) 2 March 2018 del prof. Romain Gherardi e la successiva risposta:

Oggetto: Dati scientifici sull'alluminio negli adiuvanti vaccinali

Nella sua risposta dell'11 febbraio 2016, la Commissione ha affermato che "le prove scientifiche disponibili supportano l'uso sicuro ed efficace degli adiuvanti di alluminio nei vaccini". Un rapporto pubblicato a settembre 2017 dall'Agenzia nazionale francese per la sicurezza dei medicinali e dei prodotti sanitari ha riaperto il dibattito nella comunità scientifica. L'Istituto nazionale francese per la salute e la ricerca medica (INSERM) ha scoperto che l'alluminio negli adiuvanti del vaccino iniettato nei topi rimane nei loro corpi per diversi mesi e alla fine raggiunge il cervello. Allo stesso tempo, un rappresentante dell'Accademia nazionale francese di farmacia ha sostenuto che la sperimentazione sugli animali è uno scarso fattore predittivo di rischio per gli esseri umani.

Secondo il professor Romain Gherardi, ricercatore dell'INSERM, è probabile che solo alcune persone con variazioni genetiche sperimentino effetti collaterali legati all'alluminio, come l'affaticamento cronico. In Francia sono stati diagnosticati oltre 600 casi di miofasciite macrofagica (MFM), una malattia complessa che causa dolori articolari, estrema stanchezza e compromissione cognitiva. Un'associazione per le persone che vivono con la MFM ha affermato che la malattia è causata da adiuvanti a base di alluminio.

1. Cosa fa la Commissione di questi risultati?
2. Intende chiedere ulteriori ricerche sui rischi presentati dall'alluminio nei coadiuvanti?

E-001327/2018 (2018/06/05)

Risposta data dal sig. Moedas a nome della Commissione

1. I vaccini possono contenere piccole quantità di alluminio che fungono da adiuvanti. Sono autorizzati a livello nazionale o centrale. L'Agenzia europea per i medicinali (EMA) ¹ è in contatto con l'Agenzia nazionale francese per la sicurezza dei medicinali e dei prodotti sanitari (ANMS), che ha finanziato la ricerca cui fa riferimento l'onorevole parlamentare. Nel settembre 2017, ANMS ha comunicato che i risultati dei nuovi studi, nonché la pubblicazione disponibile, non modificano il rapporto beneficio / rischio positivo dei vaccini ². L'EMA, in collaborazione con gli Stati membri dell'UE, monitora costantemente la sicurezza dell'alluminio vaccini contenenti, compresi gli studi riportati nella letteratura scientifica mondiale, e prenderà tutte le misure necessarie in caso di identificazione di un problema di sicurezza.

2. Attraverso l'iniziativa sui medicinali innovativi (IMI) ³, la Commissione finanzia la ricerca sulla sicurezza dei vaccini. I progetti IMI ADVANCE ⁴ e BioVacSafe ⁵ lavorano per fornire dati affidabili sui benefici / rischi dei vaccini commercializzati e per migliorare rispettivamente i test e il monitoraggio della sicurezza dei vaccini.

(1) <http://www.ema.europa.eu/ema/>

(2) <http://ansm.sante.fr/S-informer/Communiqués-Communiqués-Points-presse/Les-vaccins-contenant-de-l-aluminium-sont-surs-Communiqué>

(3) <http://www.imi.europa.eu/>

(4) ADVANCE, <http://www.advance-vaccines.eu/>

(5) BioVacSafe, <http://www.biovacsafe.eu/>

L'affermazione che "l'uso di idrossido di alluminio e fosfato di alluminio nei vaccini come adiuvanti (usati per migliorare la risposta immunitaria) è ormai consolidato da molti anni", non essendo supportata da dati provenienti da studi tossicologici per via iniettiva (l'agenzia ha fornito solo studi per via orale e ad uso continuativo) non è garanzia sufficiente di sicurezza.

L'ingente investimento di fondi da parte di BioVacSafe per la valutazione dei rischi dei vaccini (30.2 milioni di euro) non ha portato ad alcuna pubblicazione di studi sulla sicurezza specifici per l'alluminio in ambito clinico. (<http://www.biovacsafe.eu/scientific-publications>).

Ne segue che la carenza di dati che dovrebbero garantire in maniera inequivocabile, e non sulla base dell'uso consolidato, la sicurezza dell'alluminio adiuvante somministrato per via iniettiva è in palese contrasto con l'affermazione conclusiva: *“L'attuale attitudine al rapporto rischio-beneficio della vaccinazione favorisce la sicurezza rispetto all'efficacia quando un vaccino viene somministrato a una popolazione sana”*, come pure con la successiva: *“Una valutazione finale sulla sicurezza della nuova formulazione del vaccino può essere condotta solo sulla base di studi clinici”*, in quanto non sono mai stati effettuati studi clinici mirati alla valutazione della sicurezza a medio-lungo termine con gruppi di controllo mai vaccinati.

Si segnalano infine a conferma dei dati presentati, ulteriori referenze bibliografiche molto recenti alle quali si rimanda per un ulteriore approfondimento.³⁴⁶

IL SIGNIFICATO AMBIENTALE DELLE NANOPARTICELLE NATURALI³⁴⁷

Le nanoparticelle naturali trasportate dall'acqua sono ubiquitarie e fondamentali nel tamponamento dei sistemi ambientali, in quanto svolgono il duplice ruolo di limitare le concentrazioni di metalli potenzialmente tossici, e allo stesso tempo di fornire metalli a livelli che consentono lo svolgimento di reazioni biochimiche.

Colloidi ambientali e nanoparticelle possono essere trovati in una moltitudine di composizioni e conformazioni.

Il significato ambientale dei colloidali e delle nanoparticelle risiede nelle loro interazioni con i **metalli in traccia (TM)**, dei quali regolano la circolazione e la biodisponibilità nelle acque naturali.

I **colloidi** sono miscugli le cui particelle hanno dimensioni intermedie tra quelle di una soluzione e quelle di una sospensione, comprese cioè **tra 1nm e 100 nm** (sono per questo visibili solo all'ultramicroscopio).

Nei sistemi colloidali si possono distinguere due fasi: le particelle costituiscono la fase dispersa e sono uniformemente distribuite nell'acqua, che ne è la fase disperdente.

I colloidali sono responsabili della torbidità o del colore dell'acqua superficiale³⁴⁸

³⁴⁶ Asín J, Pascual-Alonso M, Pinczowski P, et al.

Cognition and behavior in sheep repetitively inoculated with aluminum adjuvant-containing vaccines or aluminum adjuvant only.

J Inorg Biochem. 2020;203:110934. doi:10.1016/j.jinorgbio.2019.110934

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31783216/>

Exley C.

An aluminium adjuvant in a vaccine is an acute exposure to aluminium.

J Trace Elem Med Biol. 2020;57:57-59. doi:10.1016/j.jtemb.2019.09.010

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31561170/>

Shardlow E, Mold M, Exley C.

The interaction of aluminium-based adjuvants with THP-1 macrophages in vitro: Implications for cellular survival and systemic translocation.

J Inorg Biochem. 2020;203:110915. doi:10.1016/j.jinorgbio.2019.110915

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31751817/>

de Miguel R, Asín J, Rodríguez-Largo A, et al.

Detection of aluminum in lumbar spinal cord of sheep subcutaneously inoculated with aluminum-hydroxide containing products.

J Inorg Biochem. 2020;204:110871. doi:10.1016/j.jinorgbio.2019.110871

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31901536/>

³⁴⁷ Hartland, A., Lead, J. R., Slaveykova, V. I., O'Carroll, D. & Valsami-Jones, E.

The Environmental Significance of Natural Nanoparticles. Nature Education Knowledge (2013) 4(8):7

<https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/the-environmental-significance-of-natural-nanoparticles-105737311/>

³⁴⁸ <https://www.lenntech.it/colloidi.htm>

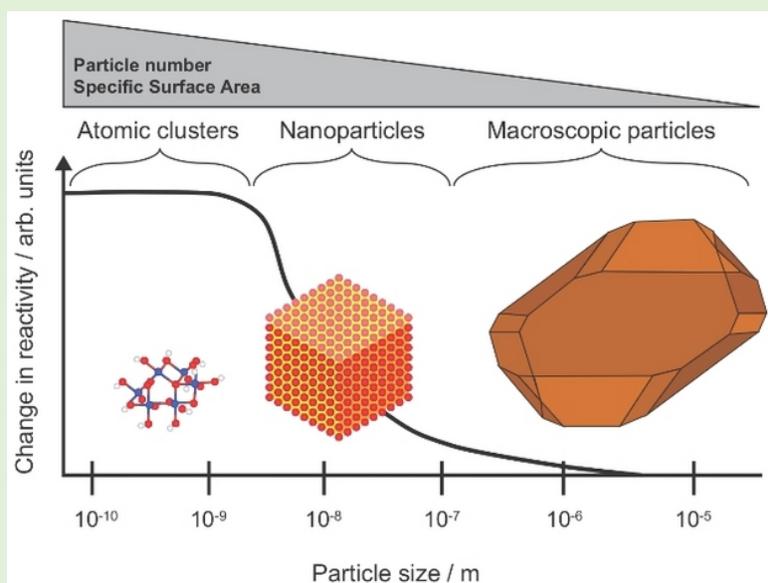
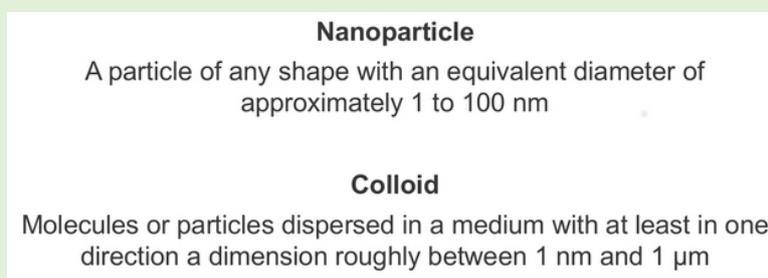
<http://www.galenotech.org/colloidi.htm>

Il **rapporto superficie/volume** fornisce ai colloidi proprietà molto buone di adsorbimento di ioni liberi. Tale fenomeno di adsorbimento ionico coinvolge la presenza di carica elettronica in superficie che determina alcune forze di repulsione e la stabilità in soluzione.

Esistono **origini differenti**: dissoluzione di sostanze minerali, erosione, decomposizione di materia organica, rifiuti da coltivazione ed acque reflue.

I **colloidi idrofobi** sono responsabili della colorazione dell'acqua ed hanno alla base un'origine organica con gruppi funzionali R-NH₂ o R-OH. Queste parti elettronegative generano legami a idrogeno con le molecole dell'acqua. Questo strato si oppone all'aggregazione dei colloidi ed è un fattore di stabilizzazione.

I **colloidi idrofili** hanno origini minerali. Sulla loro superficie ci sono cariche negative concentrate che rendono impossibile l'agglomerazione. I colloidi non sono mai 100 % idrofili né 100 % idrofobi, le reali percentuali dipendono dalla loro costituzione molecolare.



<https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/the-environmental-significance-of-natural-nanoparticles-105737311/>

Gran parte del pool ambientale di colloidi è costituito da prodotti di degradazione a basso peso molecolare del decadimento biologico (**materia umica**), vari composti organici fibrillari e simili a maglie, e minerali generati durante l'erosione chimica delle rocce, principalmente ossidi e ossidrossidi di ferro (Fe), manganese (Mn) e alluminio (Al) e alluminosilicati.

Il sottoinsieme più studiato della materia organica ambientale, le **sostanze umiche (HS)**, sono una frazione operativamente definita ed estratta chimicamente del pool totale di carbonio organico naturale.

<https://www.istitutomedici.edu.it/servizi-online/materiali-scaricabili/materiale-didattico/dispense-on-line/materiale-prof-giovanni-nalin/chimica/323-colloidi-e-sistemi-colloidali/file>

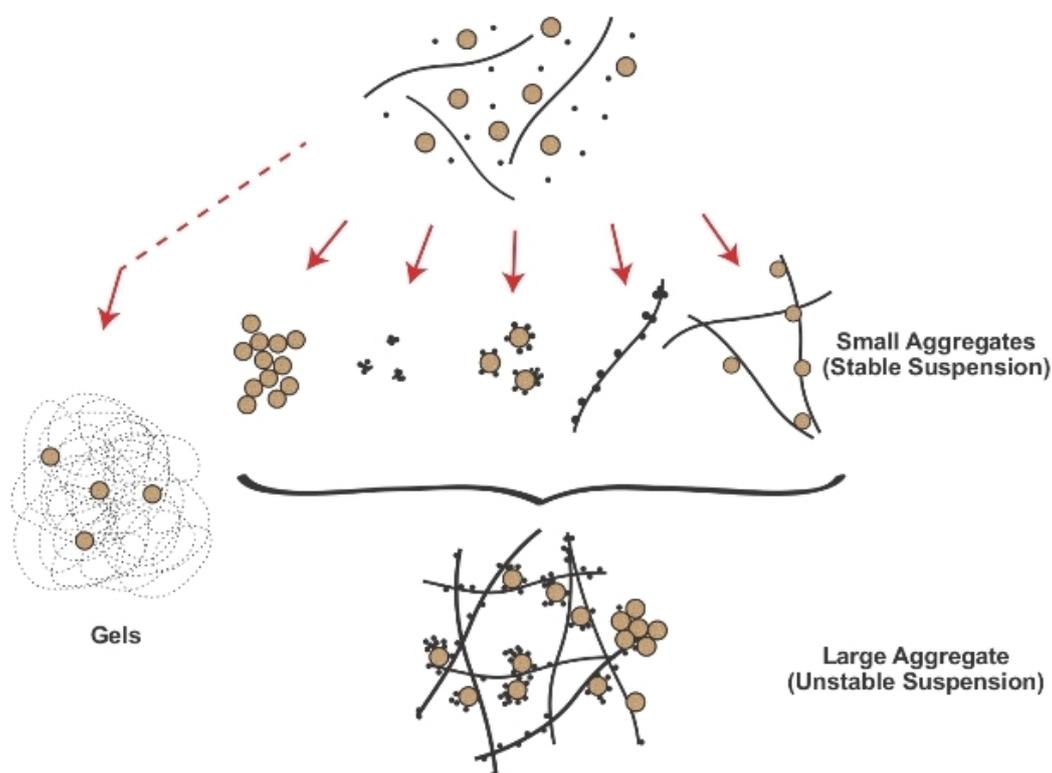
Sebbene non completamente rappresentativo della **materia organica naturale (NOM)**³⁴⁹, in termini di legame con i metalli in tracce, l'HS estratto si comporta in modo simile, sebbene non identico, alle loro controparti naturali e può rappresentare la componente più significativa dal punto di vista funzionale del NOM³⁵⁰.

L'HS esiste come materiale disperso all'estremità inferiore dell'intervallo dei nanometri (<5 nm), ma può aggregarsi per formare strutture più grandi (spesso come composti con **colloidi minerali** (ad esempio, ossidi di Fe e Mn e alluminosilicati), raggiungendo dimensioni potenzialmente al di fuori del nano-range³⁵¹.

Il materiale organico più abbondante che si trova nelle acque naturali è costituito da peptidi, proteine, peptidoglicani, polisaccaridi e biomolecole simili.

I polisaccaridi hanno configurazioni fibrillari o simili a maglie, mentre le proteine sono spesso globulari e differiscono dall'HS in quanto sono "più fresche", cioè meno degradate.

Questi tipi di composti hanno l'effetto di aumentare generalmente le dimensioni delle nanoparticelle e dei colloidi attraverso l'aggregazione, mentre l'HS spesso, ma non sempre, riduce l'aggregazione attraverso la carica e/o la stabilizzazione sterica³⁵².



<https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/the-environmental-significance-of-natural-nanoparticles-105737311/>

³⁴⁹ Filella, Montserrat.

NOM site binding heterogeneity in natural waters: Discrete approaches.

Journal of Molecular Liquids - J MOL LIQ. (2008). 143. 42-51. 10.1016/j.molliq.2008.04.018.

https://www.researchgate.net/publication/238117397_NOM_site_binding_heterogeneity_in_natural_waters_Discrete_approaches

³⁵⁰ E. Tipping, D.C. Higgins,

The effect of adsorbed humic substances on the colloid stability of haematite particles,

Colloids and Surfaces, Volume 5, Issue 2, 1982, Pages 85-92, ISSN 0166-6622, [https://doi.org/10.1016/0166-6622\(82\)80064-4](https://doi.org/10.1016/0166-6622(82)80064-4).

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0166662282800644>

³⁵¹ Björn, Stolpe & Hasselöv, Martin.

Changes in size distribution of fresh water nanoscale colloidal matter and associated elements on mixing with seawater.

Geochimica et Cosmochimica Acta. (2007). 71. 3292-3301. 10.1016/j.gca.2007.04.025.

https://www.researchgate.net/publication/222198993_Changes_in_size_distribution_of_fresh_water_nanoscale_colloidal_matter_and_associated_elements_on_mixing_with_seawater

³⁵² Buffle J, Leppard GG. Characterization of aquatic colloids and macromolecules. 1. Structure and behavior of colloidal material.

Environ Sci Technol. 1995 Sep 1;29(9):2169-75. doi: 10.1021/es00009a004. PMID: 22280252.

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/es00009a004>

Principali tipi di aggregati formati nel sistema a tre componenti colloidali: composti fulvici (FC) (o materia organica refrattaria aromatica) piccoli punti; colloidali inorganici (IC) - cerchi; biopolimeri rigidi -linee. Sia gli FC che i polisaccaridi possono formare anche gel, che sono rappresentati qui come aree grigie in cui può essere incorporato l'IC.

In tutti i sistemi ambientali, anche gli ossidi metallici, soprattutto di ferro e manganese, sono importanti fasi su nanoscala per la loro capacità di legare oligoelementi.

Al pH circa neutro delle acque naturali (~ pH 7), le nanoparticelle e i colloidali possiedono tipicamente una carica superficiale elettrostatica negativa a causa dei rivestimenti superficiali di sostanze umiche³⁵³.

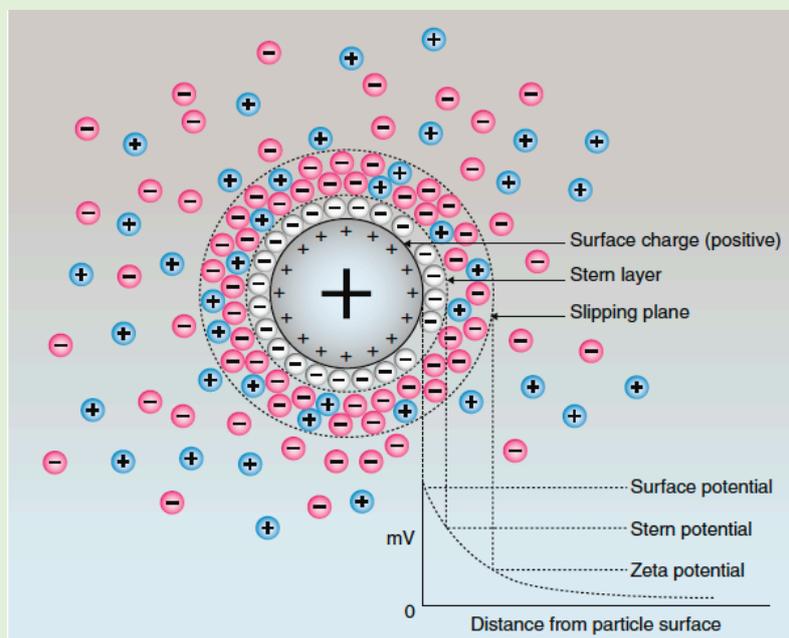
Le differenze di carica tra le superfici delle particelle conferiscono stabilità attraverso la repulsione della carica, il che significa che nanoparticelle e colloidali tendono a rimanere dispersi in acqua, formando una sospensione.

La carica superficiale di tutte le particelle può essere equalizzata da contro-ioni, che formano un doppio strato attorno alla particella.

Le particelle cariche in sospensione acquosa attraggono ioni di cariche opposte (contro-ioni), come illustrato dal modello a doppio strato di Gouy-Chapman.

Questo modello descrive l'esistenza di uno strato interno, lo strato di Stern e uno strato esterno più diffuso che circonda le particelle. Il potenziale elettrico diminuisce con la distanza dalla superficie delle particelle, e quello sul bordo esterno dello strato diffuso è noto come **potenziale zeta**.

Ciò va tenuto presente anche per i composti colloidali utilizzati in ambito vaccinale, come l'alluminio adiuvante. L'attrazione elettrostatica tra l'adiuvante di alluminio e un antigene proteico è possibile quando l'adiuvante e l'antigene hanno cariche elettriche opposte. L'idrossido di alluminio ha un punto alcalino di carica zero (PZC). A valori di pH inferiori al PZC, l'idrossido di alluminio viene caricato positivamente e a valori di pH superiori al PZC, l'idrossido di alluminio viene caricato negativamente. Ciò si riflette nel potenziale zeta della particella. Una situazione simile esiste per il fosfato di alluminio adiuvante, solo che in questo caso il PZC è acido. Il valore del pH effettivo per il PZC sia per l'idrossido di alluminio che per il fosfato di alluminio adiuvante dipende dal tipo di produzione.



Subunit Vaccine - Camilla Foged pag. 39

³⁵³ A. W. P. Vermeer, W. H. van Riemsdijk, and L. K. Koopal
Adsorption of Humic Acid to Mineral Particles. 1. Specific and Electrostatic Interactions
Langmuir 1998, 14, 10, 2810–2819 <https://doi.org/10.1021/la970624r>
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/la970624r>

E. Tipping, D.C. Higgins,
The effect of adsorbed humic substances on the colloid stability of haematite particles,
Colloids and Surfaces, Volume 5, Issue 2, 1982, Pages 85-92, ISSN 0166-6622, [https://doi.org/10.1016/0166-6622\(82\)80064-4](https://doi.org/10.1016/0166-6622(82)80064-4).
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0166662282800644>

L'importanza delle nanoparticelle (rispetto ai colloidali in generale) risiede nella loro capacità di legare grandi quantità di metalli in tracce, il che influisce sulla biodisponibilità di metalli vitali e tossici nelle acque naturali.

Si ritiene che i principi che governano queste reazioni di legame siano simili, indipendentemente dalle dimensioni e dalla chimica dei colloidali, e tipicamente si verificano attraverso la sfera interna, ad es. con il legame covalente, e reazioni di complessazione con gruppi funzionali superficiali.

La complessazione all'interno della sfera tra ioni metallici e ossidi metallici comuni, che si verifica anche per le sostanze umiche e altri colloidali, ha dimostrato essere il meccanismo predominante di adsorbimento.

Per definizione, i metalli nei complessi della sfera interna sono più legati e quindi sono meno labili dei metalli nei complessi della sfera esterna (coppie di ioni), con implicazioni per la biodisponibilità e l'ecotossicità dei metalli.

La **disponibilità biologica** è definita come *"il grado di assorbimento di una sostanza da parte di un organismo vivente"* ³⁵⁴.

A causa dell'interazione dei metalli in tracce con altri costituenti del sistema acquatico (come le nanoparticelle), solo una frazione della massa totale dei metalli in tracce presente interagisce con gli organismi e quindi la parte restante non è disponibile né come nutriente né come tossina a meno che non venga assorbita direttamente prima della dissociazione. ³⁵⁵

Le nanoparticelle e i colloidali regolano la biodisponibilità dei metalli in tracce influenzandone la speciazione e altri processi all'interfaccia organismo - ambiente.

Determinare la **speciazione** consiste nel distribuire un metallo, presente in un determinato campione, tra diverse forme o specie.

Si tratta di un processo estremamente importante per poter valutare la biodisponibilità e la tossicità di un elemento.

È utile distinguere tra quella fisica, ossia la sua distribuzione tra forme solubili, colloidali o sottoforma di particolato e quella chimica.

Quest'ultima si riferisce alla distribuzione tra varie specie chimiche distinte in soluzione, comprendendo sia la distinzione tra metallo complessato e libero, ma anche tra i diversi stati di ossidazione.

La somma delle concentrazioni delle varie forme dà la concentrazione totale. Questo lavoro viene fatto perché è noto che le differenti forme chimico-fisiche di un elemento possono manifestare differente impatto ambientale e differente tossicità.

In genere si definiscono labili le specie presenti all'equilibrio e inerti quelle in stato di non-equilibrio.

È dimostrato che per la maggior parte dei metalli le forme più tossiche sono costituite dai metalli liberi o acqua-ioni; i complessi forti e le associazioni colloidali sono invece quelle meno tossiche.

La tossicità è in relazione con la capacità di attraversare le membrane biologiche. Va precisato che è impossibile determinare tutte le forme chimiche dell'elemento nel campione.

Quello che normalmente si fa è determinare alcune frazioni presenti; in particolare si cerca di valutare la frazione di metallo labile, che è quella maggiormente interessante per gli studi di biodisponibilità. ³⁵⁶

³⁵⁴ Nordberg, Monica & Duffus, John & Templeton, Douglas.

Explanatory dictionary of key terms in toxicology: Part II (IUPAC Recommendations).

Pure Appl. Chem. (2010).82. 679-751. 10.1351/pac200779091583.

https://www.researchgate.net/publication/228530064_Explanatory_dictionary_of_key_terms_in_toxicology_Part_II_IUPAC_Recommendations

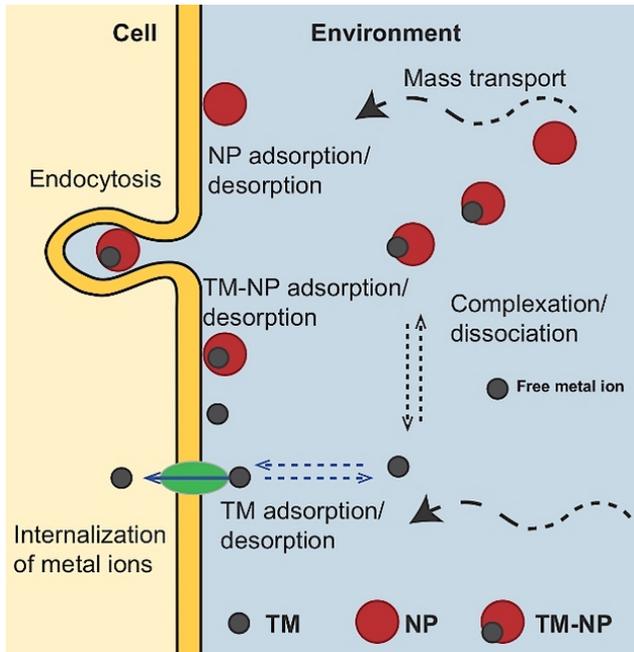
³⁵⁵ Zhao, Chun-Mei & Campbell, Peter & Wilkinson, Kevin.

When are metal complexes bioavailable?

Environmental Chemistry. (2016).13. 425-433. 10.1071/EN15205.

<https://www.publish.csiro.au/en/pdf/EN15205>

³⁵⁶ <https://www.tesionline.it/tesi/brano/speciazione-dei-metalli/13980>



<https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/the-environmental-significance-of-natural-nanoparticles-105737311/> Processi all'interfaccia organismo-ambiente che determinano la biodisponibilità della TM. In questo caso, TM rappresenta tracce di metallo libero e NP una nanoparticella, TM-NP è il TM legato alla nanoparticella. Diverse forme chimiche vengono trasportate dal terreno in prossimità degli organismi; durante il trasporto, i complessi TM (ad esempio, con nanoparticelle) possono dissociarsi / associarsi; le specie chimiche possono adsorbirsi allo strato protettivo di organismi (ad es. muco o pareti cellulari) e alle membrane cellulari, quindi attraversare le membrane cellulari mediante meccanismi diversi. A seconda della natura della MT, dell'organismo e del suo ambiente, uno qualsiasi dei processi sopra indicati potrebbe limitare la velocità. Se il trasporto della MT attraverso la membrana cellulare limita il processo complessivo di trasporto del metallo nella cellula, le bio-risposte a elementi sia essenziali che tossici possono essere correlate a qualsiasi specie di metallo in stato di equilibrio, compreso il metallo legato ai siti recettoriali sugli organismi - il modello del ligando biotico; o ioni metallici liberi nella soluzione - il modello di attività degli ioni liberi ¹. In condizioni di limitazione dei nutrienti o in biofilm in cui il trasporto di massa è il fattore limitante ¹, i complessi TM dovrebbero contribuire alla biodisponibilità a seconda della loro mobilità e labilità.

In generale, i colloidali riducono la biodisponibilità dei metalli in traccia diminuendone la frazione libera disponibile per attraversare la membrana cellulare di un organismo.

In effetti, è stato dimostrato che colloidali di diversa composizione limitano la biodisponibilità (e gli effetti dannosi) dei metalli tossici (ad esempio, Ag, Cd, Cu, Ni e Pb) per vari organismi, inclusi batteri, funghi, fitoplancton, dafnie, in maniera direttamente proporzionale alle concentrazioni di ioni metallici liberi ³⁵⁷.

Data la grande proporzione di metalli in tracce legati a nanoparticelle e colloidali nelle acque superficiali, ci si aspetta che mitigano gli effetti dannosi degli oligoelementi tossici diminuendone generalmente la biodisponibilità.

Inoltre, regolando la biodisponibilità dei micronutrienti (Cu, Co, Fe, Mn, Mo, Ni e Zn) utilizzati nei processi enzimatici ³⁵⁸, le nanoparticelle potrebbero influenzare la biomassa del fitoplancton e la biodiversità nell'oceano e nei laghi ³⁵⁹.

Tale alterazione potrebbe avere conseguenze profonde per i cicli biogeochimici di C, N, Fe e per le interazioni della rete alimentare, poiché il fitoplancton è responsabile di oltre il 40% della produttività primaria sulla Terra e rappresenta la base della catena alimentare acquatica.

³⁵⁷ Slaveykova, V.I. & Wilkinson, Kevin.

Predicting the Bioavailability of Metals and Metal Complexes: Critical Review of the Biotic Ligand Model. *Environmental Chemistry*. (2005) 2. 10.1071/EN04076.

https://www.researchgate.net/publication/37421640_Predicting_the_Bioavailability_of_Metals_and_Metal_Complexes_Critical_Review_of_the_Biotic_Ligand_Model

³⁵⁸ Morel FM, Price NM.

The biogeochemical cycles of trace metals in the oceans.

Science. 2003 May 9;300(5621):944-7. doi: 10.1126/science.1083545. PMID: 12738853.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12738853/>

³⁵⁹ Sterner, R. W. et al.

Phosphorus and trace metal limitation of algae and bacteria in Lake Superior

Limnol. Oceanogr. 49, 495-507 (2004) <https://doi.org/10.4319/lo.2004.49.2.0495>

<https://aslopubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.4319/lo.2004.49.2.0495>

Boyd, P., Ellwood, M.

The biogeochemical cycle of iron in the ocean.

Nature Geosci 3, 675-682 (2010). <https://doi.org/10.1038/ngeo964>

<https://www.nature.com/articles/ngeo964>

Tosca NJ, Jiang CZ, Rasmussen B, Muhling J.

Products of the iron cycle on the early Earth.

Free Radic Biol Med. 2019 Aug 20;140:138-153. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.005. Epub 2019 May 6. PMID: 31071438.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584918324936?via%3Dihub>

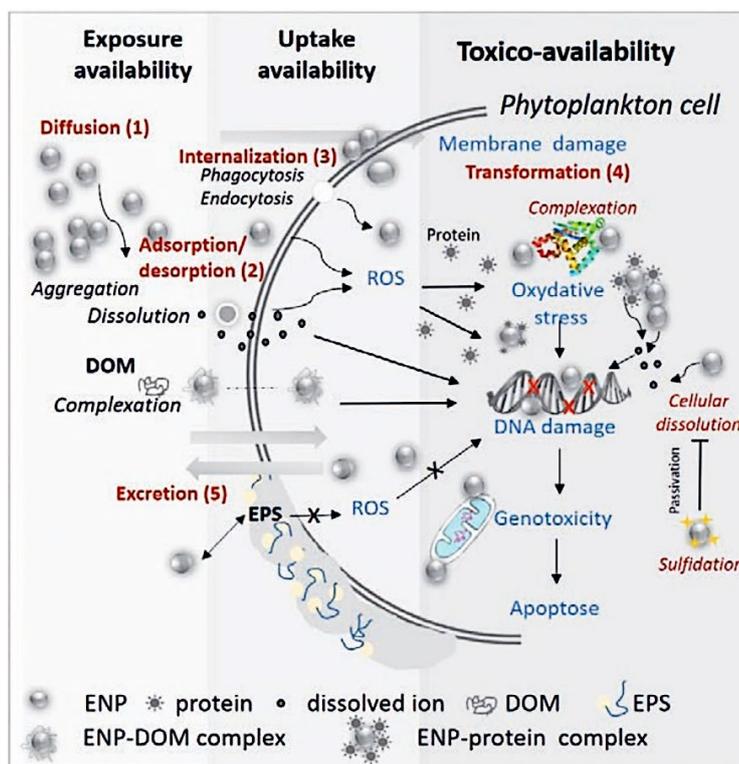
L'influenza delle nanoparticelle sulla biodisponibilità di elementi sia nutrienti che tossici è stata un fattore nell'evoluzione e nello sviluppo di organismi superiori, agendo potenzialmente con un effetto tampone sui sistemi ambientali contro il cambiamento ³⁶⁰.

Il motivo per cui le nanoparticelle prodotte industrialmente (a scopo farmaceutico o come scorie di processi industriali o urbani) sono oggetto di studio tossicologico, nonostante siano presenti in quantità molto inferiori rispetto alle loro controparti naturali, è dovuto al fatto che le nanoparticelle artificiali sono costituite da strutture e sostanze chimiche specifiche, distinte da quelle presenti in natura, per le quali gli organismi potrebbero non avere meccanismi di difesa appropriati. ³⁶¹

Nell'ambiente, in particolare quello acquatico, le nanoparticelle ingegnerizzate (ENP) sono presenti come miscele complesse con altri inquinanti, come i metalli in traccia, con cui possono agire in sinergismo, additività o antagonismo dei loro effetti combinati.

Nonostante il fatto che la tossicità e il rischio ambientale delle ENP abbiano ricevuto grande attenzione negli ultimi anni, le interazioni delle ENP con altri inquinanti e i conseguenti effetti sugli organismi acquatici rappresentano una sfida importante nella (nano) ecotossicologia.

Di seguito sono riportate due figure che rappresentano i vari meccanismi d'induzione del danno a livello cellulare.



When Environmental Chemistry Meets Ecotoxicology: Bioavailability of Inorganic Nanoparticles to Phytoplankton
ENP: nanoparticelle ingegnerizzate; DOM: materia organica dissolta; EPS: sostanze polimeriche extracellulari
È un paradigma importante in ecotossicologia che un contaminante deve essere biologicamente disponibile (biodisponibile) per avere un effetto significativo su organismi viventi come il fitoplancton. Nel caso degli ENP, la biodisponibilità al fitoplancton è il risultato di diversi processi interconnessi tra cui: (1) il trasporto degli ENP dal mezzo di esposizione alla superficie cellulare, ad es. tramite diffusione. Questo processo dipende dalle dimensioni e differisce per ENP singoli disciolti e aggregati formati nel mezzo dell'ambiente; (2) adsorbimento reversibile di diverse forme di ENP sulle pareti cellulari e sulla membrana; (3) internalizzazione (o meno) attraverso diversi meccanismi, ad es. per endocitosi e fagocitosi e / o alterando le membrane cellulari, (4) distribuzione e trasformazione cellulare, e (5) escrezione. Inoltre, la biodisponibilità può essere considerata costituita da tre componenti principali: "disponibilità di esposizione", "disponibilità di assorbimento effettiva o potenziale" e "disponibilità di sostanze tossiche". Le specie di fitoplancton possono influenzare la presenza e il destino delle ENP nell'ambiente acquatico direttamente producendo nanoparticelle metalliche da ioni di metalli disciolti, inducendo la trasformazione di ENP all'interno delle cellule o sulla superficie cellulare, e indirettamente secernendo diverse piccole molecole e sostanze polimeriche extracellulari (EPS).

³⁶⁰ Tipping, E. Cation binding by humic substances. Cambridge: University Press (2001).

³⁶¹ Xiaoliu Huangfu, Yanghui Xu, Caihong Liu, Qiang He, Jun Ma, Chengxue Ma, Ruixing Huang, A review on the interactions between engineered nanoparticles with extracellular and intracellular polymeric substances from wastewater treatment aggregates, Chemosphere, Volume 219, 2019, Pages 766-783, ISSN 0045-6535, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.12.044>, <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S004565351832366X>

Li, M.; Liu, W.; Slaveykova, V.I. Effects of Mixtures of Engineered Nanoparticles and Metallic Pollutants on Aquatic Organisms. *Environments* 2020, 7, 27. <https://doi.org/10.3390/environments7040027> <https://www.mdpi.com/2076-3298/7/4/27>

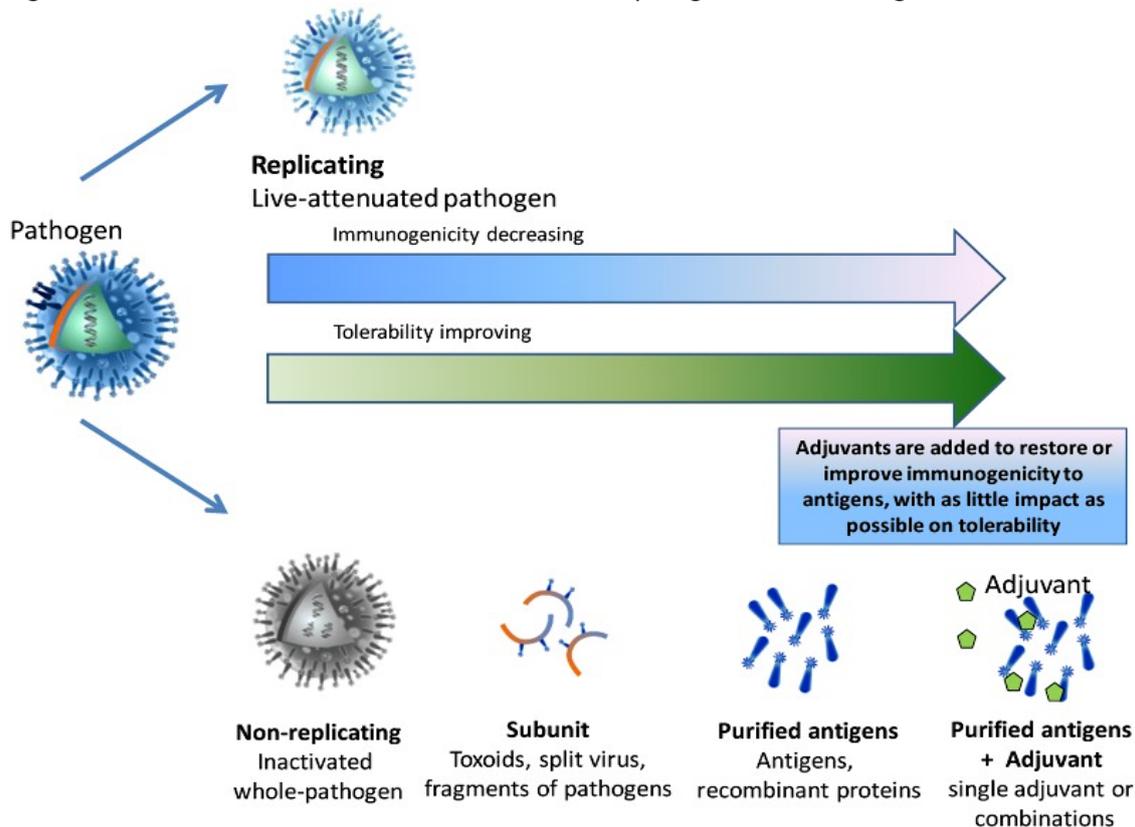
Slaveykova VI, Li M, Worms IA, Liu W. When Environmental Chemistry Meets Ecotoxicology: Bioavailability of Inorganic Nanoparticles to Phytoplankton. *Chimia (Aarau)*. 2020 Mar 25;74(3):115-121. doi: 10.2533/chimia.2020.115. PMID: 32197668. <http://docserver.ingentaconnect.com/deliver/connect/scs/00094293/v74n3/s3.pdf?expires=1611089689&id=0000&titleid=10984&checksum=9FD24A62BB69CE1582A7B3D2CAD08065>

ADIUVANTI VACCINALI

Gli adiuvanti sono sostanze aggiunte ai vaccini per aumentare l'immunogenicità di antigeni con capacità immunostimolatorie insufficienti e sono in uso nei vaccini umani per più di 90 anni.

Mentre i primi adiuvanti (alluminio, emulsioni olio in acqua) sono stati utilizzati empiricamente, l'aumento rapido della conoscenza su come il sistema immunitario interagisce con i patogeni sta portando ad una maggiore comprensione del ruolo degli adiuvanti e a formulazioni più mirate.³⁶²

Sebbene i vaccini contenenti un numero limitato di antigeni purificati abbiano generalmente profili di sicurezza migliorati rispetto ai vaccini vivi attenuati e ai vaccini patogeni interi, sono spesso anche meno immunogenici a causa della rimozione delle caratteristiche patologiche del microorganismo.³⁶³



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4494348/>
Bilanciamento immunogenicità e tollerabilità.

LA RISPOSTA IMMUNITARIA AL VACCINO

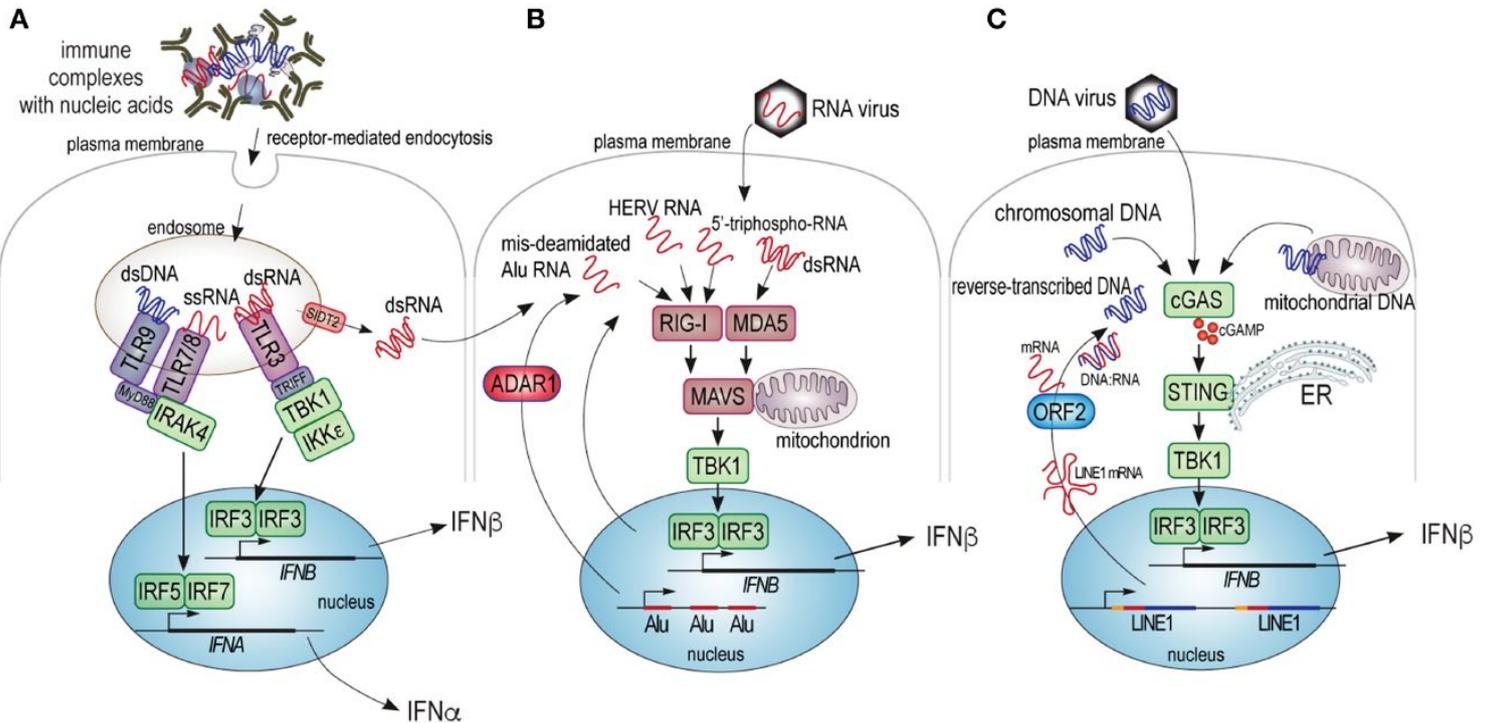
La risposta immunitaria a un agente infettivo (o all'immunizzazione) può essere sostanzialmente suddivisa in due fasi: la risposta innata e quella adattativa.

³⁶² Di Pasquale A, Preiss S, Tavares Da Silva F, Garçon N. Vaccine Adjuvants: from 1920 to 2015 and Beyond. Vaccines (Basel). 2015;3(2):320-343. Published 2015 Apr 16. doi:10.3390/vaccines3020320 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4494348/>

Shi S, Zhu H, Xia X, Liang Z, Ma X, Sun B. Vaccine adjuvants: Understanding the structure and mechanism of adjuvanticity. Vaccine. 2019 May 27;37(24):3167-3178. doi: 10.1016/j.vaccine.2019.04.055. Epub 2019 Apr 29. PMID: 31047671. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31047671/>

³⁶³ Geeraedts F, Goutagny N, Hornung V, et al. Superior immunogenicity of inactivated whole virus H5N1 influenza vaccine is primarily controlled by Toll-like receptor signalling. PLoS Pathog. 2008;4(8):e1000138. Published 2008 Aug 29. doi:10.1371/journal.ppat.1000138 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2516931/>

Quando si verifica l'esposizione ad agenti estranei, gli effettori cellulari della risposta immunitaria innata, come macrofagi, monociti, neutrofili e cellule dendritiche, sono in grado di riconoscere specifici pattern di superficie (pattern molecolari associati a patogeni o PAMPs) utilizzando recettori di riconoscimento del pattern (PRR) che classificano l'agente come un segnale di pericolo o come innocuo.³⁶⁴



https://www.researchgate.net/publication/332955385_Sources_of_Pathogenic_Nucleic_Acids_in_Systemic_Lupus_Erythematosus

Illustrazione schematica dei sensori cellulari di DNA e RNA patogeni e delle loro vie di segnalazione che portano alla produzione di IFN di tipo I. (A) Gli acidi nucleici extracellulari presenti negli immunocomplessi, nei mitocondri liberi o in altre strutture possono essere interiorizzati nelle cellule dall'endocitosi mediata dai recettori e trasferiti agli endosomi che contengono TLR3, 7, 8 o 9, che riconoscono dsRNA, ssRNA e dsDNA, rispettivamente. (B) L'RNA citosolico da virus esogeni o trascritti endogeni deaminati in modo improprio da ADAR1, o contenenti motivi retrovirali riconoscibili (HERV RNA) o altre specie di RNA potenzialmente aberranti possono innescare RIG-I o MDA5, che si legano principalmente ssRNA e dsRNA, rispettivamente. (C) DNA citosolico da virus esogeni, frammenti di cromatina, DNA mitocondriale o RNA trascritto inverso, innescano la dimerizzazione e l'attivazione di cGAS che porta alla sintesi di cGAMP, che attiva l'adattatore STING sulla superficie del reticolo endoplasmatico (ER). STING, a sua volta, attiva la chinasi TBK1, che attiva IRF3.

Il riconoscimento di un potenziale patogeno innesca una complessa serie di eventi che possono includere fagocitosi, rilascio di mediatori infiammatori tra cui chemochine e citochine, attivazione del complemento e reclutamento cellulare; tutto ciò può portare allo sviluppo di segni e sintomi di infiammazione locale nell'individuo.³⁶⁵

L'antigene assorbito dalle cellule innate, come le cellule dendritiche, viene elaborato, con differenziazione cellulare in APC.

Le APCs migrano nella regione del linfonodo drenante delle cellule T, dove si verifica il legame tra la risposta immunitaria innata e quella adattativa.

Lo sviluppo della memoria immunitaria è prevalentemente una risposta adattativa, sebbene sia stata dimostrata recentemente la formazione anche di una memoria dell'immunità innata (trained immunity), che si verificherà solo se i segnali corretti sono forniti dagli effettori della risposta innata.

³⁶⁴ Jensen S, Thomsen AR.

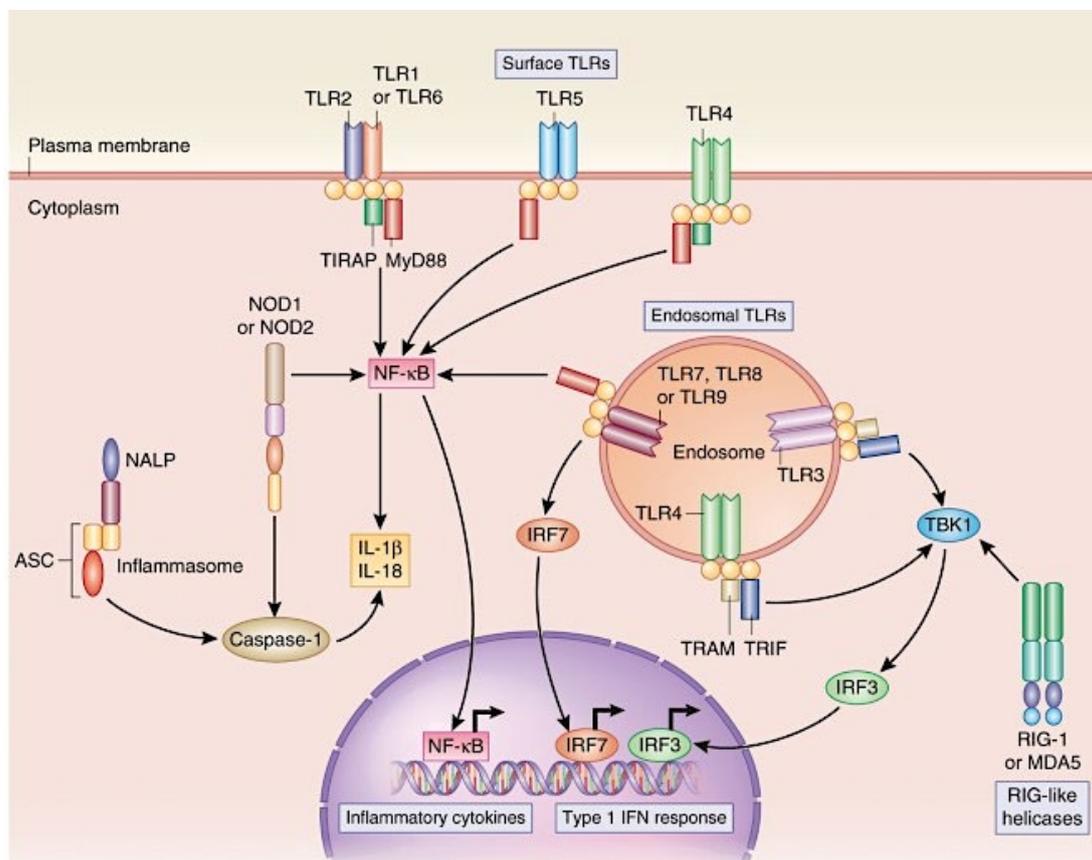
Sensing of RNA viruses: a review of innate immune receptors involved in recognizing RNA virus invasion. *J Virol.* 2012;86(6):2900-2910. doi:10.1128/JVI.05738-11 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3302314/>

³⁶⁵ Reed, S., Orr, M. & Fox, C.

Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nat Med* 19, 1597–1608 (2013). <https://doi.org/10.1038/nm.3409> <https://www.nature.com/articles/nm.3409>

Pertanto, il modo in cui la risposta immunitaria innata mette in moto la risposta immunitaria secondaria o adattativa ha profonde implicazioni per il tipo di risposta secondaria, la qualità della risposta e l'induzione della memoria immunologica.

Per un approfondimento sul sistema immunitario si veda il documento **Presentazione clinica e immunopatogenesi** da pag 24 ³⁶⁶



<https://www.nature.com/articles/nm.3409>

Diversi recettori di riconoscimento del pattern (PRR) che attivano una risposta immunitaria innata possono essere presi di mira dagli adiuvanti e vengono mostrati i dettagli delle loro vie di segnalazione a valle. I TLR, situati sulla superficie cellulare (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR11) o l'endosoma (TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9) sono bersagli per gli adiuvanti e quando attivati stimolano la segnalazione che porta all'attivazione della chiave fattori di trascrizione, come il fattore nucleare-κB (NF-κB). Questi fattori di trascrizione stimolano poi i programmi di espressione genica che portano alla produzione di chemochine e citochine che aiutano ad orientare particolari risposte immunitarie. Gli adiuvanti possono anche prendere di mira PRR citosolici come NLR e elicasi RIG-like. L'NLR NALP3 fa parte di un assemblaggio macromolecolare, l'inflammasoma, che porta all'attivazione della caspasi 1 e alla produzione delle citochine proinfiammatorie IL-1β e IL-18. ASC, proteina speck-simile associata all'apoptosi contenente CARD; IRF3, fattore di regolazione dell'interferone; MDA5, proteina 5 associata alla differenziazione del melanoma; MyD88, fattore di differenziazione mieloide 88; TBK1, chinasi 1 legante TANK; TIRAP, proteina adattatore contenente il dominio del recettore Toll-interleuchina 1; TRAM, molecola adattatore correlata a Trif; TRIF, interferone β che induce l'adattatore contenente il dominio TIR

La risposta immunitaria adattativa è in gran parte guidata dai linfociti: cellule T e cellule B.

Le attività relative delle popolazioni di cellule B e cellule T determinano il tipo di risposta immunitaria generata in risposta all'infezione.

Al riconoscimento di uno specifico antigene, le cellule B si differenziano in plasmacellule e rilasciano anticorpi specifici (IgM) in circolo.

Tuttavia, lo sviluppo della memoria immunitaria o la capacità di rispondere rapidamente alla riesposizione allo stesso antigene si verifica solo quando i linfociti B hanno ricevuto l'"aiuto" dei linfociti T, una cosiddetta "risposta dipendente dalle cellule T".

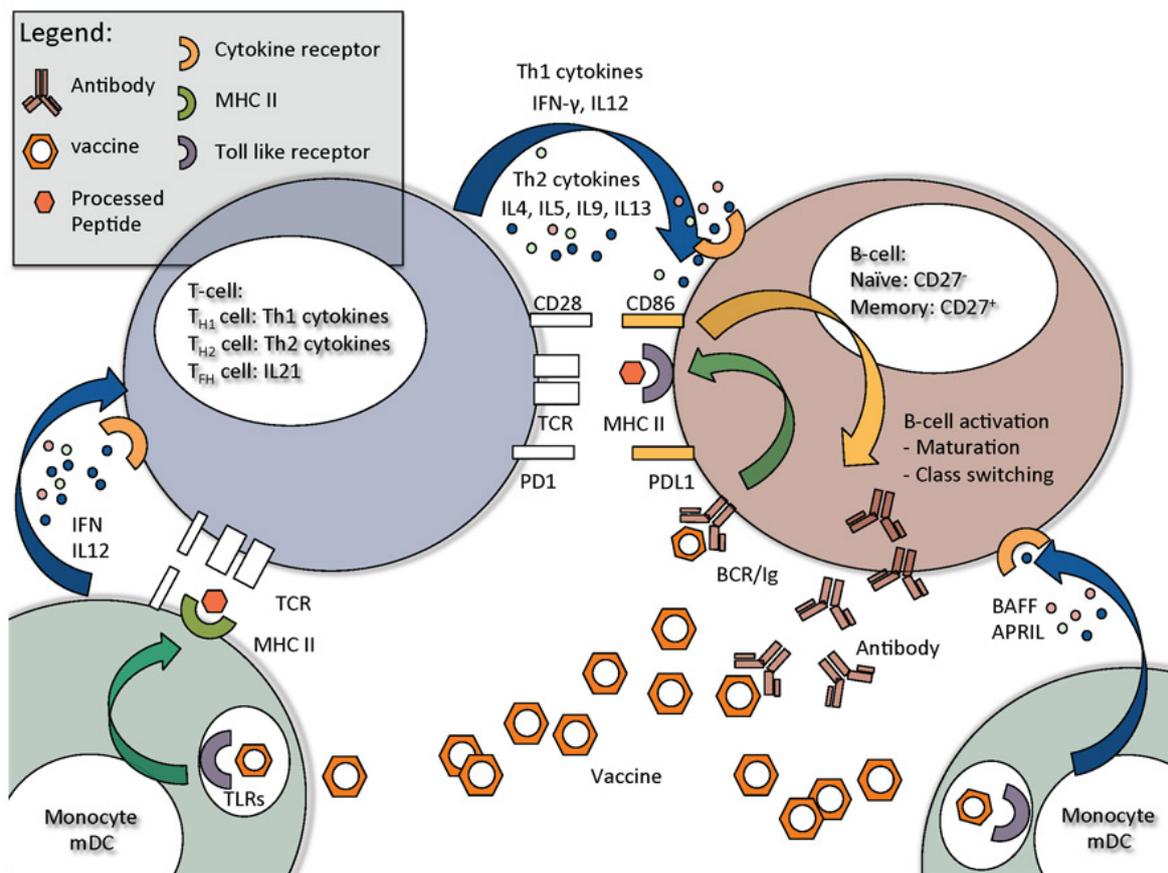
³⁶⁶ <https://www.studiesalute.it/salute/immunopatologia-COVID-19>

Le cellule T-helper CD4⁺ non sono in grado di riconoscere l'antigene a meno che non venga loro presentato dopo l'elaborazione da parte delle cellule presentanti l'antigene (APC) attivate durante la risposta immunitaria innata.

Le cellule T-helper attivate rilasciano mediatori infiammatori che sono specifici per una sottopopolazione di cellule T-helper (Th1, Th2, Th17 e Thf) ³⁶⁷, che ha implicazioni a valle per quanto efficacemente l'agente patogeno viene rimosso o contenuto.

In termini generali, le cellule Th1 sono necessarie per la rimozione dei patogeni intracellulari; le cellule Th2 per la rimozione dei parassiti extracellulari; le Th17 per la rimozione di batteri e funghi; e le cellule Thf (follicolari) per l'attivazione di una risposta delle cellule B dipendente dalle cellule T.

Le cellule Th1 e Th17 sono anche mediatori dell'autoimmunità, mentre le cellule Th2 sono associate ad asma e malattie allergiche. I linfociti T citotossici CD8⁺ attivati possono uccidere le cellule direttamente o attraverso il rilascio di citotossine.



<https://smw.ch/article/doi/smw.2014.13940>

Passaggi chiave nell'attivazione dei linfociti B e nell'interazione dei linfociti B con cellule T helper e monociti, macrofagi e cellule dendritiche derivati dai monociti

Il muscolo scheletrico è tipicamente il punto in cui il vaccino entra per la prima volta nel corpo: un muscolo a riposo di solito contiene poche cellule immunitarie, ma la somministrazione del vaccino innesca il

³⁶⁷ Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4⁺T cells: differentiation and functions. Clin Dev Immunol. 2012;2012:925135. doi:10.1155/2012/925135 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3312336/>

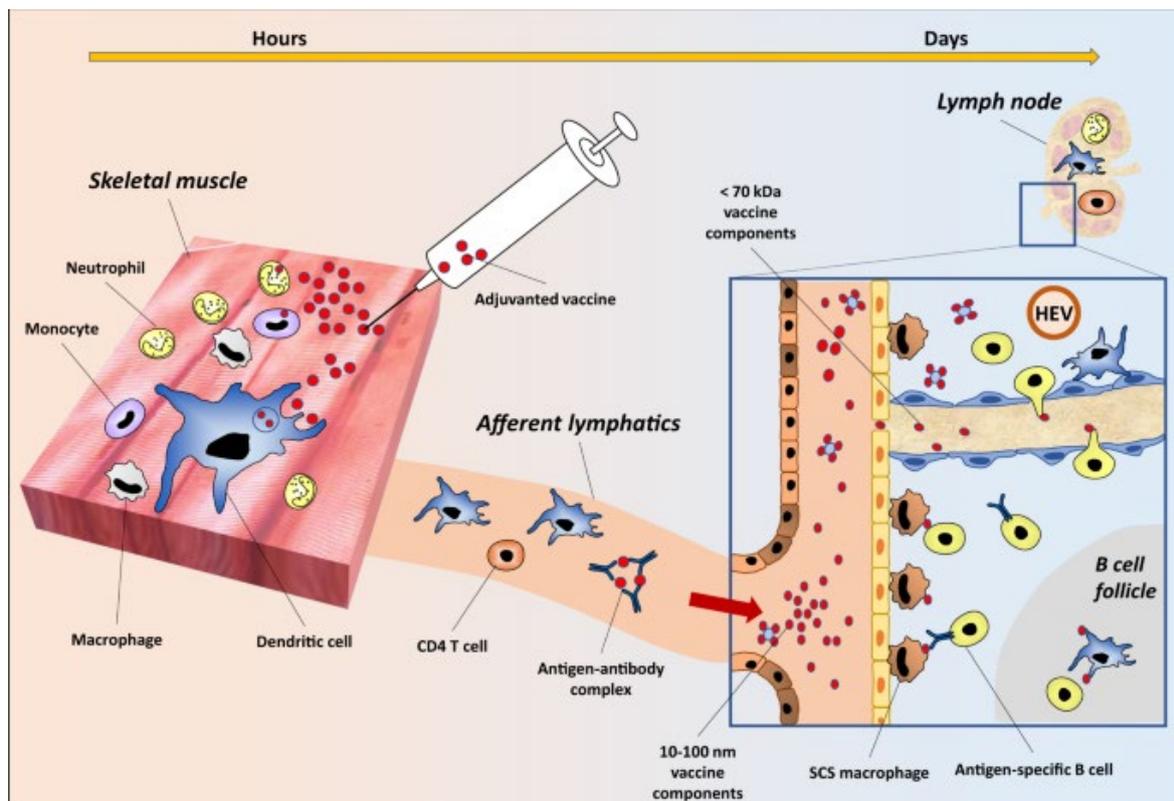
Egli A, et al. Vaccine adjuvants--understanding molecular mechanisms to improve vaccines. Swiss Med Wkly. 2014 May 20;144:w13940. doi: 10.4414/smw.2014.13940. PMID: 24844935. <https://smw.ch/article/doi/smw.2014.13940>

reclutamento di cellule immunitarie residenti nei tessuti e infiltranti, comprese le APC, che si attivano dopo la somministrazione del vaccino ³⁶⁸.

Le piattaforme di vaccini che si basano su sistemi di rilascio di DNA o RNA impiegano il meccanismo di espressione delle cellule muscolari per esprimere l'antigene nel sito di iniezione e promuovere il reclutamento di cellule immunitarie ³⁶⁹.

Per quanto riguarda i vaccini a subunità, gli antigeni vengono generalmente somministrati con adiuvanti vaccinali, che aiutano a indurre un'inflammatione transitoria nel muscolo e promuovere ulteriormente il reclutamento e l'attivazione delle cellule immunitarie ³⁷⁰.

La persistenza e la qualità degli stimoli immunitari indotti dall'adiuvante, comprese le citochine e le chemochine, rappresentano un'impronta digitale di ciascun adiuvante e forniscono risposte immunitarie qualitativamente uniche nel sito di iniezione.



<https://www.nature.com/articles/s41541-020-00238-8>

L'iniezione intramuscolare o sottocutanea innesca il reclutamento di cellule immunitarie nel sito di iniezione, dove si attivano, catturano l'antigene e migrano verso il linfonodo drenante. Antigeni, adiuvanti o altri componenti di dimensioni inferiori a 10–100 nm possono anche diffondersi nei sistemi linfatici e raggiungere il linfonodo attraverso i linfatici afferenti. Mentre molecole più piccole (<70 kDa) possono diffondersi attraverso le finestre del seno sottocapsulare, le molecole più grandi vengono trasferite alle cellule B con l'aiuto dei macrofagi del seno sottocapsulare. Le cellule B e le cellule dendritiche residenti possono anche rilevare le molecole nei condotti e trasferirle nell'area delle cellule B per avviare le risposte del centro germinale.

³⁶⁸ Lofano, G., Mallett, C.P., Bertholet, S. et al.

Technological approaches to streamline vaccination schedules, progressing towards single-dose vaccines.

npj Vaccines 5, 88 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41541-020-00238-8>

<https://www.nature.com/articles/s41541-020-00238-8>

³⁶⁹ Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D.

mRNA vaccines - a new era in vaccinology.

Nat Rev Drug Discov. 2018 Apr;17(4):261-279. doi: 10.1038/nrd.2017.243. Epub 2018 Jan 12. PMID: 29326426; PMCID: PMC5906799.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5906799/>

³⁷⁰ Liang F, Loré K.

Local innate immune responses in the vaccine adjuvant-injected muscle.

Clin Transl Immunology. 2016;5(4):e74. Published 2016 Apr 29. doi:10.1038/cti.2016.19

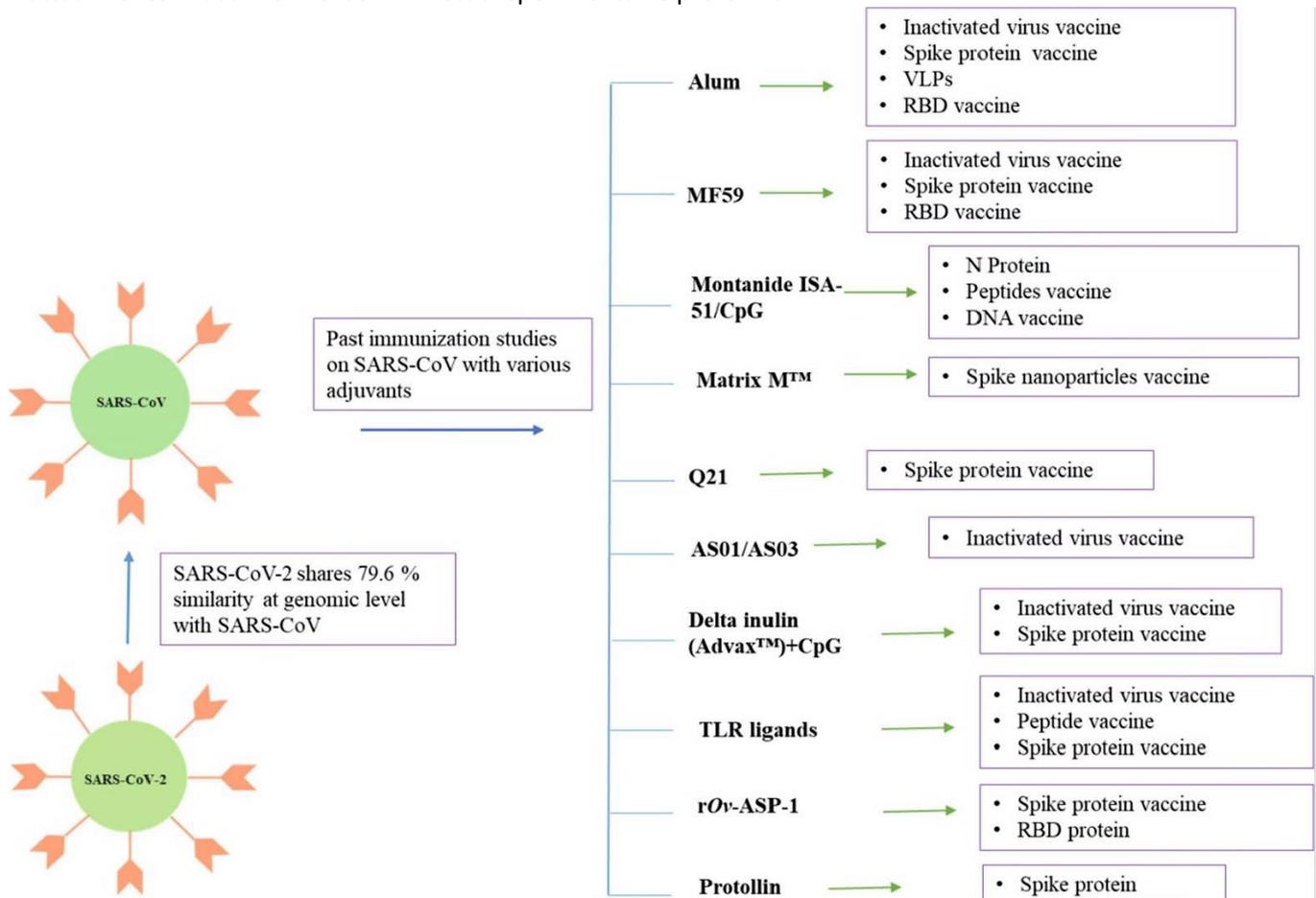
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4855268/>

I componenti altamente purificati del vaccino spesso mancano di PAMPs, il che significa che la risposta immunitaria innata iniziale non viene attivata in modo tale che si verifichi un'efficace risposta adattativa a valle.

Si ritiene che il meccanismo d'azione principale degli adiuvanti sia sulla risposta immunitaria innata. Gli adiuvanti possono agire come PAMPs, innescando la risposta immunitaria innata attraverso una varietà di meccanismi, che identificano i componenti del vaccino come un segnale di pericolo con attivazione e maturazione di APC e avvio di attività immunitarie adattative a valle.³⁷¹

Gli adiuvanti sono componenti critici sia dei vaccini a subunità che di alcuni vaccini inattivati perché inducono risposte immunitarie specifiche che sono più robuste e di lunga durata.

Una revisione della storia dello sviluppo del vaccino contro il coronavirus dimostra che solo pochi adiuvanti, inclusi sali di alluminio, emulsioni e agonisti del TLR, sono stati formulati per il SARS-CoV, il MERS-CoV e attualmente i vaccini SARS-CoV-2 in studi sperimentali e pre-clinici.³⁷²



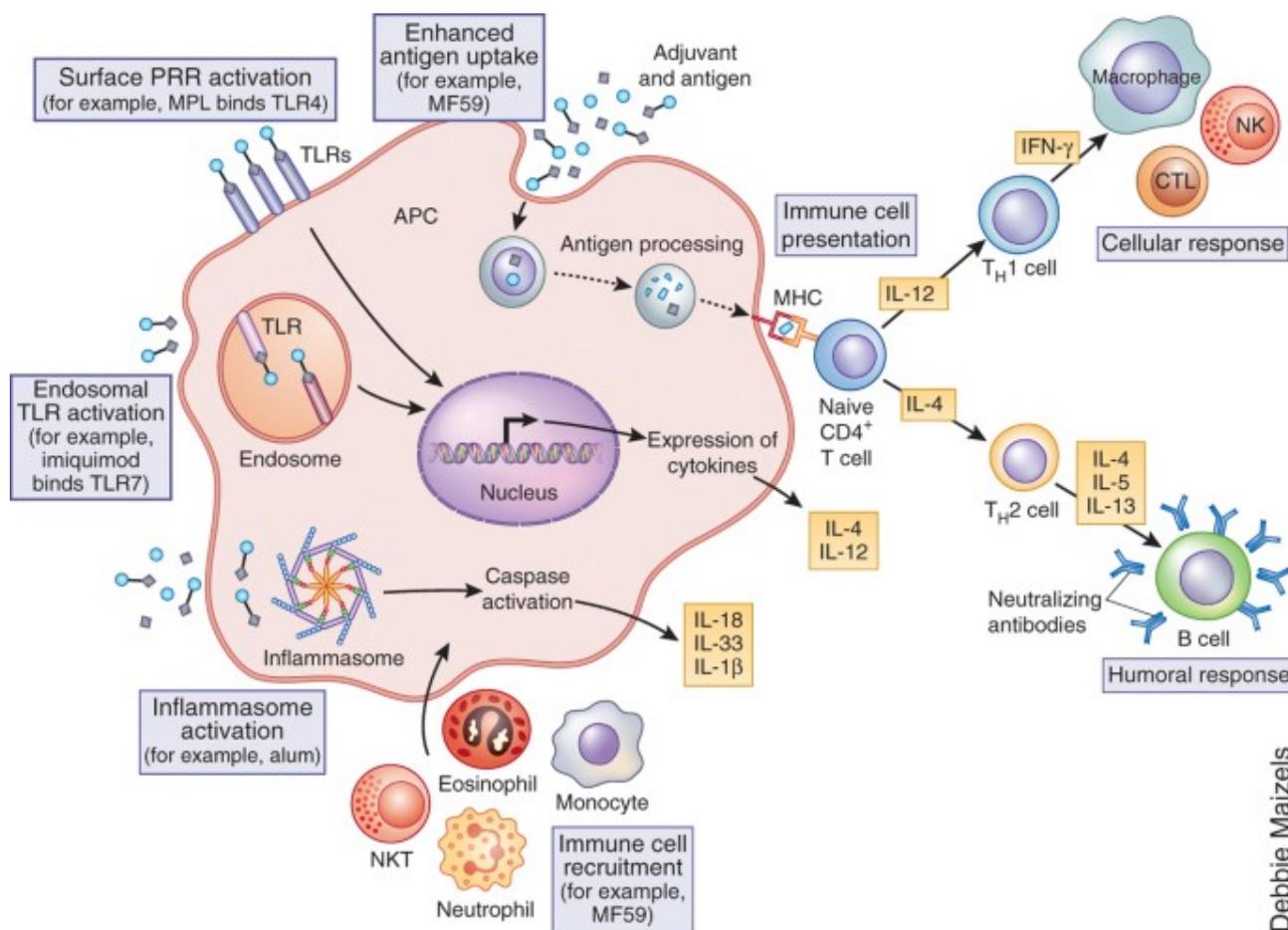
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7301105/>
As SARS-CoV-2 is highly similar to SARS-CoV at the genomic level, the outcomes of the past vaccine studies may expedite the development of a vaccine against COVID-19.

³⁷¹ Coffman RL, Sher A, Seder RA. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity*. 2010;33(4):492-503. doi:10.1016/j.immuni.2010.10.002 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3420356/>

³⁷² Gupta T, Gupta SK. Potential adjuvants for the development of a SARS-CoV-2 vaccine based on experimental results from similar coronaviruses. *Int Immunopharmacol*. 2020 Sep;86:106717. doi: 10.1016/j.intimp.2020.106717. Epub 2020 Jun 18. PMID: 32585611; PMCID: PMC7301105. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7301105/>

Liang Z, Zhu H, Wang X, et al. Adjuvants for Coronavirus Vaccines. *Front Immunol*. 2020;11:589833. Published 2020 Nov 6. doi:10.3389/fimmu.2020.589833 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7677582/>

Si fornisce di seguito una panoramica degli adiuvanti del vaccino che sono stati formulati nei candidati vaccini proteici COVID-19 segnalati e del loro meccanismo d'azione .³⁷³



<https://www.nature.com/articles/nm.3409>

Sono stati postulati numerosi meccanismi attraverso i quali gli adiuvanti mediano la loro attività. Molti adiuvanti possono agire come ligandi per PRR che attivano una risposta immunitaria innata. La segnalazione del recettore può quindi attivare fattori di trascrizione che inducono la produzione di citochine e chemochine che aiutano a dirigere una particolare risposta immunitaria, come una risposta di tipo Th1 o Th2, oltre a influenzare le cellule immunitarie che vengono reclutate nel sito di iniezione. L'attivazione dell'inflammasoma è stata anche implicata come meccanismo per alcuni adiuvanti. L'attivazione dell'inflammasoma porta alla produzione delle citochine proinfiammatorie IL-1β e IL-18. Alcuni adiuvanti influenzano anche la presentazione dell'antigene da parte dell'MHC. È possibile che alcuni coadiuvanti agiscano attraverso molteplici meccanismi; per esempio, è stato suggerito che l'allume possa influenzare l'assorbimento dell'antigene, la segnalazione del PRR, l'attivazione dell'inflammasoma e il reclutamento delle cellule immunitarie. NK, cellula natural killer

IDROSSIDO DI ALLUMINIO (ALLUME)

Le sospensioni semicristalline di alluminio sono gli adiuvanti più comunemente usati nello sviluppo di vaccini in tutto il mondo ³⁷⁴.

I sali di alluminio hanno un'elevata capacità legante e tipicamente adsorbono gli antigeni sulla loro superficie. Sebbene centinaia di milioni di persone siano state vaccinate con vaccini a base di alluminio, c'è ancora la discussione sull'esatto meccanismo d'azione.

³⁷³ Pollet J, Chen WH, Strych U.

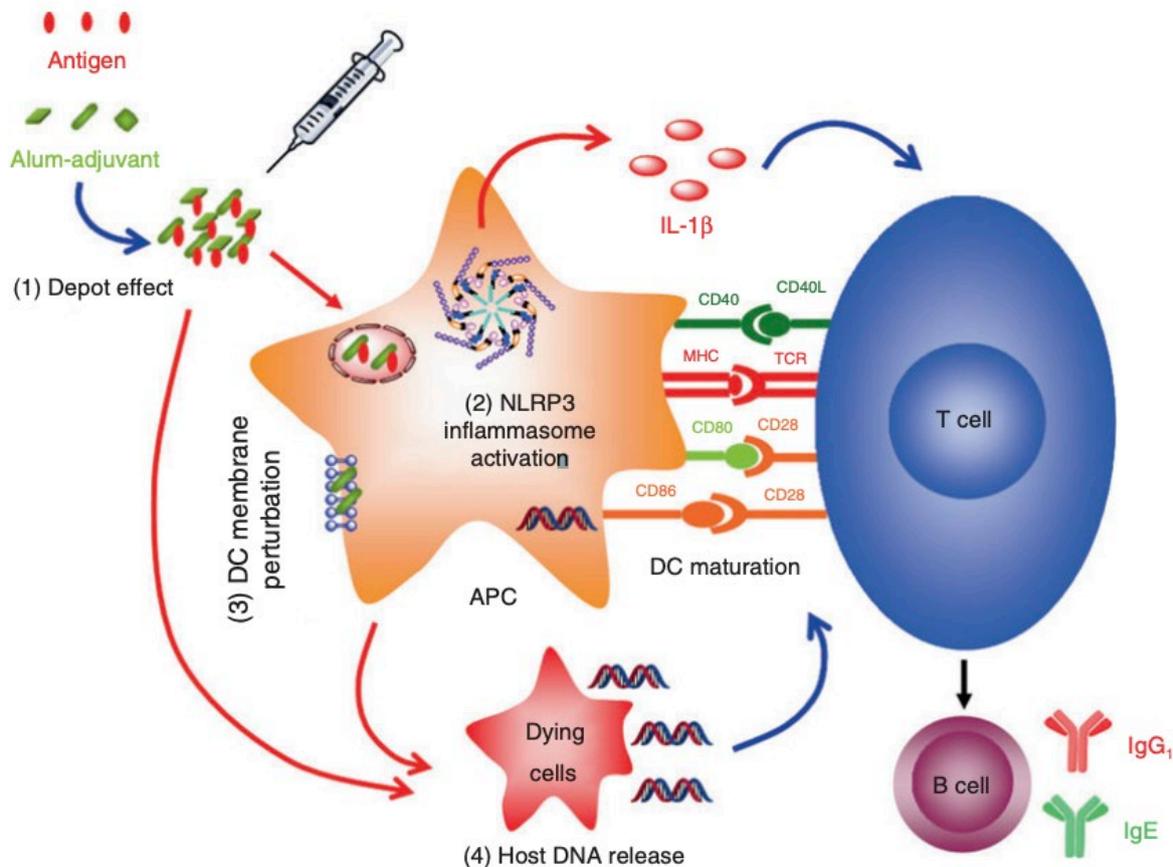
Recombinant protein vaccines, a proven approach against coronavirus pandemics [published online ahead of print, 2021 Jan 7]. Adv Drug Deliv Rev. 2021;170:71-82. doi:10.1016/j.addr.2021.01.001 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7788321/>

³⁷⁴ Shardlow E, Mold M, Exley C.

Unraveling the enigma: elucidating the relationship between the physicochemical properties of aluminium-based adjuvants and their immunological mechanisms of action. Allergy Asthma Clin Immunol. 2018;14:80. Published 2018 Nov 7. doi:10.1186/s13223-018-0305-2 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6223008/>

Le spiegazioni più ampiamente accettate includono un possibile effetto depot, il potenziamento della fagocitosi dell'antigene e l'attivazione della via pro-infiammatoria NLRP3³⁷⁵.

Le formulazioni a base di alluminio generalmente inducono una forte risposta immunitaria umorale in combinazione con la secrezione di citochine infiammatorie polarizzate Th2 (ad esempio IL-4, IL-6, IL-10).



https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007%2F978-94-017-9780-1_100901

Nanoadiuvanti a base di alluminio. Meccanismi delle risposte immunitarie indotte da nanoadiuvanti a base di alluminio, inclusi (1) l'effetto deposito, (2) attivazione dell'inflammasoma NLRP3, (3) perturbazione della membrana delle DC e (4) rilascio di DNA dell'ospite, che promuove la maturazione delle DC e migliora le risposte immunitarie adattative

Alcune indagini hanno osservato il verificarsi di un aumento della malattia anticorpo-dipendente (ADE) e un'immunopatologia eosinofila nei polmoni in risposta al challenge test con virus infettivi dopo l'immunizzazione con vaccino virale inattivato³⁷⁶.

³⁷⁵ He P, Zou Y, Hu Z.

Advances in aluminum hydroxide-based adjuvant research and its mechanism. *Hum Vaccin Immunother.* 2015;11(2):477-488. doi:10.1080/21645515.2014.1004026 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4514166/>

Sun B., Ji Z., Xia T. (2016)

Aluminum-Based Nano-adjuvants.

In: Bhushan B. (eds) *Encyclopedia of Nanotechnology*. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-017-9780-1_100901 https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007%2F978-94-017-9780-1_100901

³⁷⁶ Agrawal AS, Tao X, Algaissi A, et al.

Immunization with inactivated Middle East Respiratory Syndrome coronavirus vaccine leads to lung immunopathology on challenge with live virus. *Hum Vaccin Immunother.* 2016;12(9):2351-2356. doi:10.1080/21645515.2016.1177688 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5027702/>

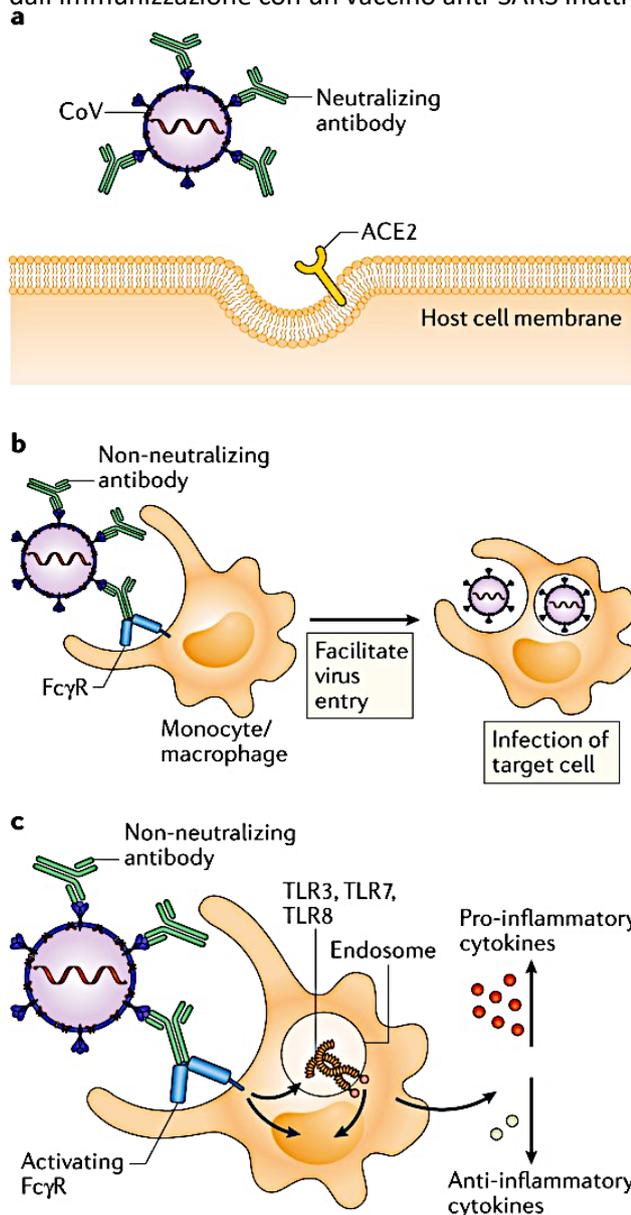
Bolles M, Deming D, Long K, et al.

A double-inactivated severe acute respiratory syndrome coronavirus vaccine provides incomplete protection in mice and induces increased eosinophilic proinflammatory pulmonary response upon challenge. *J Virol.* 2011;85(23):12201-12215. doi:10.1128/JVI.06048-11 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3209347/>

Tseng CT, Sbrana E, Iwata-Yoshikawa N, et al.

Immunization with SARS coronavirus vaccines leads to pulmonary immunopathology on challenge with the SARS virus [published correction appears in *PLoS One.* 2012;7(8). doi:10.1371/annotation/2965cfae-b77d-4014-8b7b-236e01a35492]. *PLoS One.* 2012;7(4):e35421. doi:10.1371/journal.pone.0035421 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3335060/>

Ulteriori studi hanno attribuito il verificarsi di alterazioni immunopatologiche o ADE alla presenza di anticorpi anti-N non neutralizzanti e di anticorpi neutralizzanti a bassa affinità o a livelli subottimali indotti dall'immunizzazione con un vaccino anti-SARS inattivato da solo o con allume ³⁷⁷.



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7187142/>

Potenziali esiti della risposta anticorpale al coronavirus.

- a) Nella neutralizzazione virale mediata da anticorpi, gli anticorpi neutralizzanti che si legano al dominio di legame del recettore (RBD) della proteina spike virale, così come altri domini, impediscono al virus di agganciarsi al suo recettore di ingresso, ACE2.
- b) Nel potenziamento dell'infezione dipendente dall'anticorpo, gli anticorpi non neutralizzanti di bassa qualità, bassa quantità si legano alle particelle virali attraverso i domini Fab. I recettori Fc (FcR) espressi su monociti o macrofagi si legano ai domini Fc degli anticorpi e facilitano l'ingresso e l'infezione virale.
- c) Nel potenziamento immunitario mediato da anticorpi, gli anticorpi non neutralizzanti di bassa qualità, bassa quantità si legano alle particelle virali. Dopo l'impegno dei domini Fc sugli anticorpi, l'attivazione di FcR con ITAM avvia la segnalazione per sovraregolare le citochine pro-infiammatorie e downregolare le citochine anti-infiammatorie. I complessi immunitari e l'RNA virale negli endosomi possono segnalare attraverso il recettore Toll-like 3 (TLR3), TLR7 e / o TLR8 per attivare le cellule ospiti, con conseguente immunopatologia.

Per un approfondimento sull'immunopatologia da vaccino si vedano i documenti [COVID-19 IL VACCINO](#) da pag 34

³⁷⁷ Yasui F, et al

Prior immunization with severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus (SARS-CoV) nucleocapsid protein causes severe pneumonia in mice infected with SARS-CoV.

J Immunol. 2008 Nov 1;181(9):6337-48. doi: 10.4049/jimmunol.181.9.6337. PMID: 18941225.

<https://www.jimmunol.org/content/181/9/6337.long>

Iwasaki A, Yang Y.

The potential danger of suboptimal antibody responses in COVID-19.

Nat Rev Immunol. 2020;20(6):339-341. doi:10.1038/s41577-020-0321-6

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7187142/>

Deming D, et al

Vaccine efficacy in senescent mice challenged with recombinant SARS-CoV bearing epidemic and zoonotic spike variants.

PLoS Med. 2006 Dec;3(12):e525. doi: 10.1371/journal.pmed.0030525. Erratum in: PLoS Med. 2007 Feb;4(2):e80. PMID: 17194199; PMCID:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1716185/>

COMPLICAZIONI RESPIRATORIE – PARTE SECONDA – Immunopatologia da pag 48 ³⁷⁸

L'inclusione di un adiuvante che favorisce una risposta prevalentemente Th1 al vaccino inattivato può alleviare il problema dell'immunopatologia di tipo Th2 causata dall'alluminio ³⁷⁹.

Sulla base di queste evidenze, la maggior parte delle formulazioni di vaccini COVID-19 proteici ricombinanti contenenti idrossido di alluminio (allume) includono un secondo adiuvante, come CpG, al fine di bilanciare la risposta immunitaria e anche stimolare la proliferazione di cellule CD4⁺ di tipo Th1.

ADIUVANTI BASATI SU EMULSIONI OLIO IN ACQUA

MF59

MF59[®] è un'emulsione olio in acqua sviluppata da Novartis. L'adiuvante contiene olio di squalene e due tensioattivi, Tween-80 e Span-85, emulsionati in un tampone di acido citrico ³⁸⁰.

I vaccini adiuvati con MF59 sono stati approvati per l'influenza pandemica e stagionale in oltre 38 paesi in tutto il mondo. ³⁸¹ Nelle formulazioni olio in acqua, l'antigene rimane tipicamente nella fase acquosa e non interagisce con le goccioline d'olio.

Non fornisce né trasporto diretto né effetto deposito per l'antigene. Gli antigeni e l'MF59 vengono assorbiti dai neutrofili e dai monociti, e successivamente seguiti dalle cellule dendritiche (DC) e dai linfociti B, e trasferiti ai linfonodi drenanti ³⁸².

L'MF59 ha effetto sulla proteina speck-simile associata all'apoptosi contenente un dominio di reclutamento delle caspasi (ASC) e stimola la segnalazione di IL-4 e Stat-6, ma è indipendente da qualsiasi cascata del segnale dell'interferone di tipo 1 o dell'inflammasoma.

È stato inoltre dimostrato che l'emulsione aumenta significativamente i livelli di IL-5 e IL-6 ³⁸³.

Come per l'alluminio, è stata osservata una reazione polmonare immunopatologica, nonché un aumento delle citochine IL-5 e IL-13, in studi su animali con vaccini contro il MERS-CoV inattivati e MF59-adiuvati.

³⁷⁸ [Parte 2 Complicazioni Polmonari Immunopatologia](#) studiesalute.it/salute

³⁷⁹ Deng Y, Lan J, Bao L, et al.

Enhanced protection in mice induced by immunization with inactivated whole viruses compare to spike protein of middle east respiratory syndrome coronavirus.

Emerg Microbes Infect. 2018;7(1):60. Published 2018 Apr 4. doi:10.1038/s41426-018-0056-7
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5884803/>

Honda-Okubo Y, Barnard D, Ong CH, Peng BH, Tseng CT, Petrovsky N.

Severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus vaccines formulated with delta inulin adjuvants provide enhanced protection while ameliorating lung eosinophilic immunopathology.

J Virol. 2015;89(6):2995-3007. doi:10.1128/JVI.02980-14
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4337527/>

³⁸⁰ Ko EJ, Kang SM.

Immunology and efficacy of MF59-adjuvanted vaccines.

Hum Vaccin Immunother. 2018;14(12):3041-3045. doi:10.1080/21645515.2018.1495301
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6343625/>

³⁸¹ O'Hagan DT.

MF59 is a safe and potent vaccine adjuvant that enhances protection against influenza virus infection.

Expert Rev Vaccines. 2007 Oct;6(5):699-710. doi: 10.1586/14760584.6.5.699.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17931151/>

³⁸² Dupuis M, Denis-Mize K, LaBarbara A, Peters W, Charo IF, McDonald DM, Ott G.

Immunization with the adjuvant MF59 induces macrophage trafficking and apoptosis.

Eur J Immunol. 2001 Oct;31(10):2910-8. doi: 10.1002/1521-4141(200110)31:10<2910::aid-immu2910>3.0.co;2-3. PMID: 11592066.
[https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1521-4141\(200110\)31:10%3C2910::AID-IMMU2910%3E3.0.CO;2-3](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1521-4141(200110)31:10%3C2910::AID-IMMU2910%3E3.0.CO;2-3)

³⁸³ Valensi JP, Carlson JR, Van Nest GA.

Systemic cytokine profiles in BALB/c mice immunized with trivalent influenza vaccine containing MF59 oil emulsion and other advanced adjuvants.

J Immunol. 1994 Nov 1;153(9):4029-39. PMID: 7930610.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7930610/>

È stato dimostrato che le infiltrazioni di eosinofili associate ad una maggiore produzione di citochine di tipo Th2 hanno aggravato l'immunopatologia polmonare dovuta ad ipersensibilità negli animali vaccinati con vaccini con virus inattivato adiuvato con MF59 rispetto ai vaccini con virus inattivati non adiuvati.³⁸⁴

A ciò si aggiunge un aumento del rischio di reazioni autoimmuni in soggetti geneticamente predisposti.³⁸⁵

AS01 e AS03

Si tratta di sistemi adiuvanti olio in acqua sviluppati da GlaxoSmithKline (GSK). L'**AS01** (sistema adiuvante 01) è un adiuvante a base di liposomi costituito da monofosforil-lipide A (MPL) e una molecola di saponina (QS-21), mentre **AS03** (sistema adiuvante 03) è un adiuvante a base di α -tocoferolo e squalene che è stato utilizzato nel vaccino contro l'influenza pandemica A/H1N1.

L'MPL viene estratto dalla *Salmonella minnesota* e il QS-21 * viene purificato dalla corteccia dell'albero sudamericano *Quillaja saponaria* Molina.

L'MPL agisce attraverso la via del segnale del Toll-like receptor-4 (TLR4), che si traduce nell'attivazione delle APC e nella produzione di citochine e interferoni (IFN).

È stato riportato che Q-21 induce una risposta anticorpale antigene-specifica e un'immunità cellulo-mediata³⁸⁶.

Quando co-somministrato con la proteina S del SARS-CoV ricombinante, Q-21 ha indotto titoli elevati di anticorpi sierici specifici per l'antigene nel challenge test³⁸⁷.

Il sistema AS01 è stato utilizzato anche nella preparazione del vaccino inattivato SARS-CoV in topi e criceti e va segnalato che lo studio non ha osservato la malattia da potenziamento (ADE) nei polmoni o nel fegato dei criceti in seguito alla stimolazione con SARS-CoV³⁸⁸.

* Le **saponine** sono composti glicosidici naturali. La loro capacità unica di stimolare sia la risposta immunitaria Th1 che la produzione di linfociti T citotossici (CTL) contro antigeni esogeni li rende ideali per l'uso nei vaccini a subunità, nei vaccini diretti contro i patogeni intracellulari, nonché per i vaccini antitumorali terapeutici. Tuttavia, le saponine di *Quillaja* presentano gravi inconvenienti quali elevata tossicità, effetto emolitico indesiderato e instabilità in fase acquosa, che ne limita l'uso come adiuvante nella vaccinazione.³⁸⁹

³⁸⁴ Agrawal AS, Tao X, Algaissi A, et al.

Immunization with inactivated Middle East Respiratory Syndrome coronavirus vaccine leads to lung immunopathology on challenge with live virus. *Hum Vaccin Immunother.* 2016;12(9):2351-2356. doi:10.1080/21645515.2016.1177688
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5027702/>

³⁸⁵ Yau, A.C.Y., Lönnblom, E., Zhong, J. et al.

Influence of hydrocarbon oil structure on adjuvanticity and autoimmunity. *Sci Rep* 7, 14998 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15096-z>
<https://www.nature.com/articles/s41598-017-15096-z>

³⁸⁶ Didierlaurent AM, Laupèze B, Di Pasquale A, Hergli N, Collignon C, Garçon N.

Adjuvant system AS01: helping to overcome the challenges of modern vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 2017 Jan;16(1):55-63. doi: 10.1080/14760584.2016.1213632. Epub 2016 Aug 2. PMID: 27448771.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27448771/>

Coccia M, Collignon C, Hervé C, et al.

Cellular and molecular synergy in AS01-adjuvanted vaccines results in an early IFN γ response promoting vaccine immunogenicity [published correction appears in *NPJ Vaccines.* 2018 Mar 21;3:13]. *NPJ Vaccines.* 2017;2:25. Published 2017 Sep 8. doi:10.1038/s41541-017-0027-3
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5627273/>

³⁸⁷ Bisht H, Roberts A, Vogel L, Subbarao K, Moss B.

Neutralizing antibody and protective immunity to SARS coronavirus infection of mice induced by a soluble recombinant polypeptide containing an N-terminal segment of the spike glycoprotein. *Virology.* 2005;334(2):160-165. doi:10.1016/j.virol.2005.01.042
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7111832/>

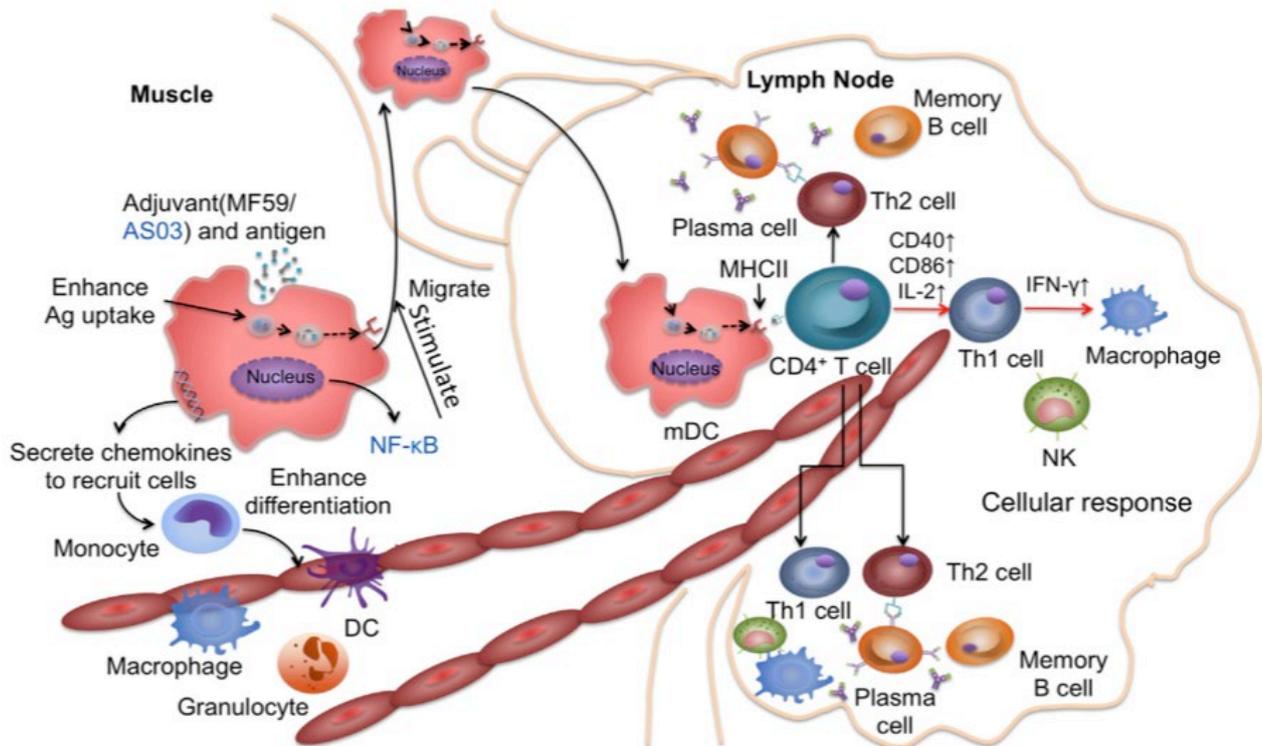
³⁸⁸ Roberts A, Lamirande EW, Vogel L, et al.

Immunogenicity and protective efficacy in mice and hamsters of a β -propiolactone inactivated whole virus SARS-CoV vaccine. *Viral Immunol.* 2010;23(5):509-519. doi:10.1089/vim.2010.0028
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2967819/>

³⁸⁹ Sun HX, Xie Y, Ye YP.

Advances in saponin-based adjuvants. *Vaccine.* 2009 Mar 13;27(12):1787-96. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.01.091. Epub 2009 Feb 7. PMID: 19208455.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19208455/>

L'adiuvante **Matrix-M** brevettato di Novavax è costituito da due particelle nanometriche separate, realizzate con una frazione di saponina diversa (Frazione-A e Frazione-C).
Le particelle di saponina vengono stabilizzate con colesterolo e fosfolipidi ³⁹⁰.
Come parte di diverse formulazioni di vaccini, Matrix-M ha dimostrato di aumentare le risposte di tipo Th1 e Th2, inducendo alti livelli di anticorpi neutralizzanti e potenziando il traffico di cellule immunitarie ³⁹¹.



<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31047671/>

Modelli per il meccanismo di attivazione di MF59 e AS03. Sia l'MF59 che l'AS03 creano un ambiente immunocompetente locale e transitorio dopo l'iniezione. Promuovono la produzione di citochine e chemochine e il reclutamento di cellule nel sito di iniezione. Le APC attivate caricate con antigene migrano verso i linfonodi drenanti dove le APC potrebbero innescare le cellule T CD4⁺ ingenui. Il reclutamento delle cellule immunitarie guidato dalle chemochine è la caratteristica chiave del meccanismo sia per MF59 che per AS03.

Podolak I, Galanty A, Sobolewska D.

Saponins as cytotoxic agents: a review.

Phytochem Rev. 2010 Sep;9(3):425-474. doi: 10.1007/s11101-010-9183-z. Epub 2010 Jun 25.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2928447/>

³⁹⁰ Magnusson SE, Altenburg AF, Bengtsson KL, Bosman F, de Vries RD, Rimmelzwaan GF, Stertman L.

Matrix-M™ adjuvant enhances immunogenicity of both protein- and modified vaccinia virus Ankara-based influenza vaccines in mice.

Immunol Res. 2018 Apr;66(2):224-233. doi: 10.1007/s12026-018-8991-x. PMID: 29594879; PMCID: PMC5899102.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5899102/>

³⁹¹ Magnusson SE, Reimer JM, Karlsson KH, Lilja L, Bengtsson KL, Stertman L.

Immune enhancing properties of the novel Matrix-M™ adjuvant leads to potentiated immune responses to an influenza vaccine in mice.

Vaccine. 2013 Mar 25;31(13):1725-33. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.01.039. Epub 2013 Feb 4. PMID: 23384754.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23384754/>

Osterhaus AD, Rimmelzwaan GF.

Induction of virus-specific immunity by iscoms.

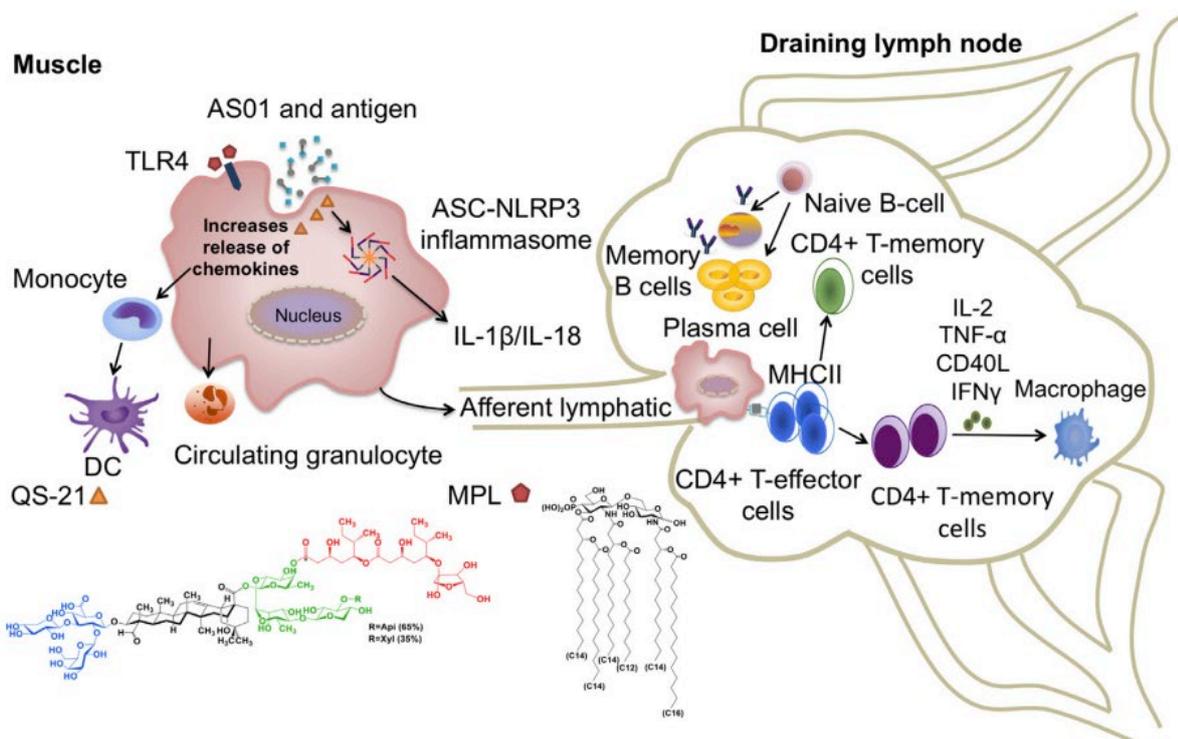
Dev Biol Stand. 1998;92:49-58. PMID: 9554259.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9554259/>

Reimer JM, Karlsson KH, Lövgren-Bengtsson K, Magnusson SE, Fuentes A, Stertman L. Matrix-M™ adjuvant induces local recruitment, activation and maturation of central immune cells in absence of antigen.

PLoS One. 2012;7(7):e41451. doi: 10.1371/journal.pone.0041451. Epub 2012 Jul 23. PMID: 22844480; PMCID: PMC3402407.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3402407/>



<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31047671/>

Meccanismi d'azione di AS01_B. L'adiuvante AS01_B e l'antigene vengono iniettati nel muscolo e assorbiti dagli APC. L'MPL attiva le APC tramite il TLR4. QS-21 attiva l'inflammasoma NLRP3, con conseguente rilascio di IL-1b e IL-18. MPL e QS-21 agiscono sinergicamente per aumentare il rilascio di chemochine, far circolare i granulociti e migliorare il reclutamento di monociti e cellule dendritiche. Nel drenaggio dei linfonodi, le cellule dendritiche altamente attivate inducono efficacemente la differenziazione delle cellule T CD4⁺ naïve nelle cellule T della memoria CD4⁺ e nelle cellule T-effettrici CD4⁺. Le citochine secrete dalle cellule T-effettrici CD4⁺ come IL-2, TNF-alfa, CD40L e IFN-c potrebbero stimolare la divisione delle cellule B naïve in plasmacellule e cellule B della memoria.

Oltre a MF59 e AS03, altri adiuvanti a base di emulsione come l'adiuvante di Freund* (solo in studi preclinici comparativi tra i vari adiuvanti) e Montanide ISA51 sono stati formulati anche nei vaccini CoV³⁹².

Il **Montanide** in particolare è un'emulsione acqua in olio (w/o) che contiene olio minerale e tensioattivo della famiglia dei mannidi monooleati.

Possiede attività immunostimolante e agisce sulla formazione di depositi nel sito di iniezione, con conseguente rilascio più lento di antigeni, infiammazione locale e reclutamento di cellule presentanti l'antigene (APC).

La combinazione di Montanide ISA-51 e CpG ODN (oligodeoxynucleotide) è stata ampiamente utilizzata in molti vaccini e per emulsionare la proteina N ricombinante di SARS-CoV, poiché la combinazione esercita un effetto sinergico nel potenziamento della risposta immunitaria Th1.³⁹³

* **L'adiuvante di Freund** è uno degli adiuvanti più comunemente usati nella ricerca per l'induzione di gravi patologie autoimmune e infiammatorie³⁹⁴, quindi non è consentito il suo uso sull'uomo.

³⁹² Zhang N, Channappanavar R, Ma C, et al. Identification of an ideal adjuvant for receptor-binding domain-based subunit vaccines against Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Cell Mol Immunol.* 2016;13(2):180-190. doi:10.1038/cmi.2015.03 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4786625/>

³⁹³ Gupta T, Gupta SK. Potential adjuvants for the development of a SARS-CoV-2 vaccine based on experimental results from similar coronaviruses. *Int Immunopharmacol.* 2020;86:106717. doi:10.1016/j.intimp.2020.106717 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7301105/>

³⁹⁴ Billiau A, Matthys P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *J Leukoc Biol.* 2001 Dec;70(6):849-60. PMID: 11739546. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11739546/>

È usato come emulsione acqua in olio ed è preparato da oli non metabolizzabili (olio di paraffina e monooleato di mannide).

Se contiene anche il *Mycobacterium tuberculosis* ucciso è noto come **adiuvante completo di Freund**, senza i batteri è l'**adiuvante incompleto di Freund**.

Sviluppato per la prima volta da Jules Freund negli anni '40, è progettato per fornire il rilascio continuo degli antigeni necessari per stimolare una risposta immunitaria forte e persistente.

ADIUVANTI A BASE DI AGONISTI TLR

Come già visto sopra, i TLR sono i recettori di riconoscimento dei pattern (PRR) che identificano i pattern molecolari associati ai patogeni (PAMP).

Questi sono presenti sulla superficie delle cellule e nei compartimenti endosomiali.

L'interazione con il ligando appropriato innesca il rilascio di citochine proinfiammatorie e IFN di tipo -1 (interferoni), che attivano le cellule del sistema immunitario innato e adattativo portando a risposte umorali e cellulose mediate potenziate dall'antigene specifico.

Pertanto, i ligandi TLR sono stati ampiamente studiati e testati come adiuvanti in molte preparazioni di vaccini umani e veterinari contro le malattie infettive.

Diversi ligandi TLR inducono un diverso tipo di risposta immunitaria (Th1/Th2/Th0) a seconda della via di segnalazione coinvolta.

I TLR valutati negli studi sugli adiuvanti dei vaccini e i loro ligandi sono i seguenti: TLR3 (dsRNA), TLR4 (LPS - MPL), TLR5 (Flagellin), TLR7 (ssRNA), TLR8 (ssRNA) e TLR9 (oligonucleotide CpG non metilato)³⁹⁵.

Di questi, solo il ligando TLR4, l'MPL, è stato approvato per l'uso in formulazioni di vaccini umani come il vaccino contro il papillomavirus umano (Cervarix™), l'epatite (Fendrix®, GSK Biologicals) e la malaria (RTS, S/AS01 o Mosquirix).

CPG

Dopo il primo lavoro nel 1995 che mostrava che i motivi della citosina-fosfoguanosina (CpG) nel DNA batterico potevano aumentare la stimolazione immunitaria, sono stati condotti ampi studi sul DNA batterico e sui suoi analoghi sintetici, i CpG oligodesossinucleotidi (CpG ODN)³⁹⁶.

I CpG ODN sono molecole di DNA sintetico, costituiti da una struttura di ODN fosforotioato contenenti motivi CpG non metilati³⁹⁷.

I motivi CpG si presentano con una frequenza maggiore nel DNA batterico e virale rispetto al DNA dei vertebrati³⁹⁸ e a seconda della loro struttura e delle funzioni biologiche, le sequenze contenenti CpG possono

Adjuvants in EAE. In: Lavi E., Constantinescu C.S. (eds) (2005) Experimental Models of Multiple Sclerosis. Springer, Boston, MA.

https://doi.org/10.1007/0-387-25518-4_5

https://link.springer.com/chapter/10.1007/0-387-25518-4_5

³⁹⁵ Duthie MS, Windish HP, Fox CB, Reed SG.

Use of defined TLR ligands as adjuvants within human vaccines.

Immunol Rev. 2011;239(1):178-196. doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00978.x

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5872835/>

³⁹⁶ Anderson, R. B.. "incorporation of CpG oligodeoxynucleotides into α 2-macroglobulin: development of a novel vaccine adjuvant delivery mechanism." (2007).

https://pdfs.semanticscholar.org/2eaf/2cad7de8b9cd058634a245abcae55ebe3332.pdf?_ga=2.174222948.714159447.1611069892-1565440789.1605823056

1565440789.1605823056

³⁹⁷ Scheiermann J, Klinman DM.

Clinical evaluation of CpG oligonucleotides as adjuvants for vaccines targeting infectious diseases and cancer.

Vaccine. 2014;32(48):6377-6389. doi:10.1016/j.vaccine.2014.06.065

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4252359/>

³⁹⁸ Bode C, Zhao G, Steinhagen F, Kinjo T, Klinman DM.

CpG DNA as a vaccine adjuvant.

Expert Rev Vaccines. 2011;10(4):499-511. doi:10.1586/erv.10.174

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3108434/>

essere suddivise nelle diverse classi A, B, C, P e S³⁹⁹. Tra queste, la classe CpG-B è quella più comunemente utilizzata negli studi pre-clinici e clinici⁴⁰⁰.

ODN type	Representative sequence	Structural characteristics	Immune effects
D- also referred to as A-class	GGTGCATCGATGCAGGGGGG	Mixed phosphodiester/phosphorothioate backbone Single CpG motif CpG flanking region forms a palindrome Poly G tail at 3' end	Induces strong pDC IFN- α secretion APC maturation
K- also referred to as B-class	TCCATGGACGTTCTGAGCGTT	Phosphorothioate backbone Multiple CpG motifs 5' motif most stimulatory	Induces strong B-cell activation pDC maturation Preferentially supports the production of TNF- α and IL-6
C	TCGTCGTTCTGAACGACGTTGAT	Phosphorothioate backbone Multiple CpG motifs TCG dimer at 5' end CpG motif imbedded in a central palindrome	Induces B-cell and pDC proliferation and differentiation Induces production of IL-6 and IFN- α
P	TCGTCGACGATCGGCGCGCGCG	Phosphorothioate backbone Two palindromes Multiple CpG motifs	Stimulates pDC and B cells Strong IFN- α secretion

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3108434/>

Confronto delle classi D, K, C e P di ODN

Le lettere in grassetto nelle sequenze ODN indicano palindromi auto-complementari; I motivi CpG sono sottolineati.

APC: cellula che presenta l'antigene; ODN: oligodeossinucleotide; pDC: cellula dendritica plasmacitoide.

I CpG ODN sono dei forti adiuvanti in grado di indurre risposte Th1, la generazione di linfociti T citotossici (CTL) e la secrezione di IFN-gamma⁴⁰¹.

La cascata del segnale innescata dall'interazione dei TLR-9 con i CpG ODN culmina nell'attivazione di geni che mediano una risposta infiammatoria.

Questa via del segnale procede attraverso la stimolazione di MyD88, IRAK e TRAF-6.

Successivamente, il reclutamento di varie MAP chinasi e fattori di trascrizione (inclusi NF- κ B, AP1 e IRF-7) sovraregola l'espressione dei geni proinfiammatori⁴⁰².

Il DNA dei CpG attiva direttamente le pDC e le cellule B, contribuendo all'induzione delle risposte immunitarie sia innate che adattative. La cascata di eventi avviata dai CpG supporta indirettamente la maturazione, differenziazione e proliferazione di cellule natural killer, cellule T e monociti/macrofagi.

³⁹⁹ Vollmer J, Krieg AM.

Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists.

Adv Drug Deliv Rev. 2009 Mar 28;61(3):195-204. doi: 10.1016/j.addr.2008.12.008. Epub 2009 Jan 13. PMID: 19211030.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19211030/>

⁴⁰⁰ Campbell JD.

Development of the CpG Adjuvant 1018: A Case Study.

Methods Mol Biol. 2017;1494:15-27. doi: 10.1007/978-1-4939-6445-1_2. PMID: 27718183.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27718183/>

⁴⁰¹ Lipford GB, Sparwasser T, Zimmermann S, Heeg K, Wagner H.

CpG-DNA-mediated transient lymphadenopathy is associated with a state of Th1 predisposition to antigen-driven responses.

J Immunol. 2000 Aug 1;165(3):1228-35. doi: 10.4049/jimmunol.165.3.1228. PMID: 10903720.

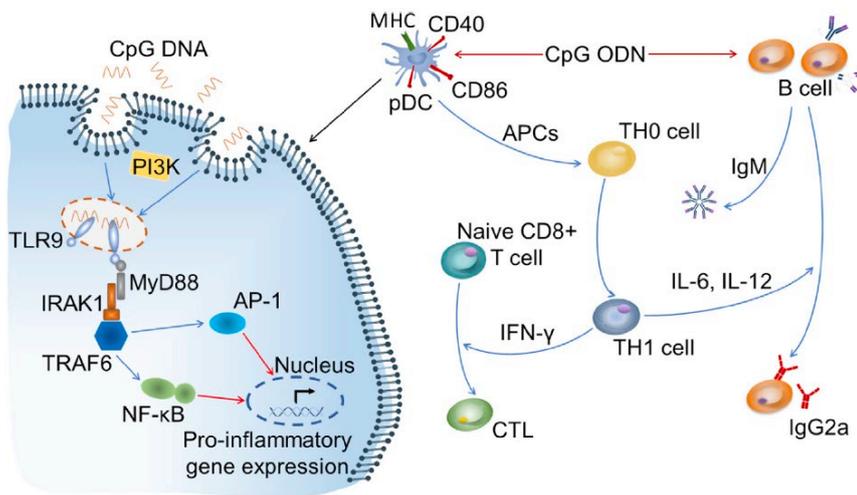
<https://www.jimmunol.org/content/165/3/1228.long>

⁴⁰² Klinman DM.

Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides.

Nat Rev Immunol. 2004 Apr;4(4):249-58. doi: 10.1038/nri1329. PMID: 15057783.

<https://www.nature.com/articles/nri1329>



<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31047671/>

Meccanismi d'azione dei CpG ODN. Come nuovo tipo di adiuvante, gli oligodesossinucleotidi sintetici (ODN) che contengono motivi CpG immunostimolatori sono a favore delle risposte delle cellule Th1. Dopo l'assorbimento iniziale di CpG ODN all'interno delle cellule che presentano l'antigene, il PI3K facilita la traslocazione nelle vescicole endosomiali contenenti TLR9. L'interazione tra TLR9 e CpG ODN trasduce il segnale di attivazione citoplasmatica. Gli ODN CpG attivano direttamente le cellule B e le cellule dendritiche plasmacitoidi, producendo un ambiente ricco di citochine proinfiammatorie e T helper 1 (Th1). Gli ODN CpG potrebbero facilitare la maturazione dei pDC e migliorare l'elaborazione e la presentazione dell'antigene. CpG ODN induce le cellule T a promuovere lo sviluppo di CTL tramite IFN-γ e aumenta la produzione di IL-6, IL-12 per supportare la secrezione di anticorpi IgG2a

Sebbene i vaccini siano tipicamente somministrati a scopo profilattico per ridurre la suscettibilità dell'ospite alle infezioni, ci sono situazioni in cui è necessaria l'immunità specifica del patogeno dopo l'esposizione (ad esempio, a seguito del rilascio di agenti patogeni a scopo bioterroristico).

In questi casi, è richiesto che i vaccini siano in grado di accelerare l'induzione dell'immunità e diversi studi indicano che gli ODN CpG accelerano lo sviluppo di risposte indotte dal vaccino.

Ad esempio, i topi vaccinati con AVA (vaccino adorsbitico contro l'antrace) adiuvato con CpG hanno sviluppato una risposta immunitaria tre volte più rapida di quelli immunizzati con AVA da solo, con una produzione di anticorpi vaccinali significativa osservata entro 5 giorni contro 15 giorni ($p < 0,05$).

La combinazione di CpG ODN con AVA ha accelerato la risposta sierica anti-PA IgG, producendo titoli sierici anti-PA che erano dieci volte superiori e significativamente più efficaci entro il giorno 10 al challenge test ($p < 0,05$).⁴⁰³

Per quanto riguarda il profilo di sicurezza, gli studi preclinici e clinici effettuati suggeriscono la possibilità che i CpG ODN possano aumentare la suscettibilità dell'ospite a malattie autoimmuni o predisporre a shock tossici. La stimolazione immunitaria indotta dai motivi CpG può ridurre la morte per apoptosi dei linfociti stimolati, indurre l'attivazione dei linfociti B policlonali, aumentare la produzione di auto-anticorpi e di citochine proinfiammatorie⁴⁰⁴ e di conseguenza aumentare il rischio di malattie autoimmuni.⁴⁰⁵

⁴⁰³ Klinman DM, Currie D, Lee G, Grippe V, Merkel T. Systemic but not mucosal immunity induced by AVA prevents inhalational anthrax. *Microbes Infect.* 2007;9(12-13):1478-1483. doi:10.1016/j.micinf.2007.08.002 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2117355/>

⁴⁰⁴ Gilkeson GS, Ruiz P, Howell D, Lefkowitz JB, Pisetsky DS. Induction of immune-mediated glomerulonephritis in normal mice immunized with bacterial DNA. *Clin Immunol Immunopathol.* 1993 Sep;68(3):283-92. doi: 10.1006/clin.1993.1129. PMID: 8370182. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8370182/>

Gilkeson GS, Phippen AM, Pisetsky DS. Induction of cross-reactive anti-dsDNA antibodies in preautoimmune NZB/NZW mice by immunization with bacterial DNA. *J Clin Invest.* 1995 Mar;95(3):1398-402. doi: 10.1172/JCI117793. PMID: 7883986; PMCID: PMC441482. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC441482/pdf/jcinvest00491-0478.pdf>

Steinberg AD, Krieg AM, Gourley MF, Klinman DM. Theoretical and experimental approaches to generalized autoimmunity. *Immunol Rev.* 1990 Dec;118:129-63. doi: 10.1111/j.1600-065x.1990.tb00815.x. PMID: 2079325. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2079325/>

⁴⁰⁵ Klinman DM. Polyclonal B cell activation in lupus-prone mice precedes and predicts the development of autoimmune disease. *J Clin Invest.* 1990;86(4):1249-1254. doi:10.1172/JCI114831 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC296855/pdf/jcinvest00076-0241.pdf>

Linker-Israeli M, Deans RJ, Wallace DJ, Prehn J, Ozeri-Chen T, Klinenberg JR. Elevated levels of endogenous IL-6 in systemic lupus erythematosus. A putative role in pathogenesis. *J Immunol.* 1991 Jul 1;147(1):117-23. PMID: 2051017. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2051017/>

Per le malattie autoimmuni organo-specifiche, che sono tipicamente promosse da una risposta Th1-simile suscitata dai DNA CpG, è stato studiato un modello di encefalomyelite allergica sperimentale dipendente da IL-12 (che imita la sclerosi multipla).

Gli animali trattati con DNA CpG e poi sottoposti a stimolazione con auto-antigeni hanno sviluppato cellule effettrici Th1 autoreattive che hanno causato la malattia, mentre i topi a cui è stata iniettata solo l'auto-antigene sono rimasti liberi dalla malattia ⁴⁰⁶.

In un modello di mimetismo molecolare, il DNA CpG somministrato in concomitanza con l'antigene derivato da *Chlamydia* ha promosso l'induzione della miocardite autoimmune ⁴⁰⁷. I CpG ODN hanno anche aumentato la suscettibilità dei topi ad interventi che possono indurre l'artrite ⁴⁰⁸. Questi risultati indicano che i motivi CpG possono promuovere lo sviluppo di reazioni autoimmuni deleterie in determinate circostanze.

Lo shock tossico può essere indotto esponendo ripetutamente l'ospite ad agenti che inducono il TNF- α , come il lipopolisaccaride e la d-galattosamina ⁴⁰⁹. In questo contesto, è stato osservato shock tossico in studi murini che prevedevano la somministrazione di CpG ODN in associazione a dosi subletali di lipopolisaccaride o ad animali pre-sensibilizzati con d-galattosamina. ⁴¹⁰

Negli studi clinici è stato rilevato un aumento della frequenza e/o della gravità degli eventi avversi locali e sintomi sistemici (inclusi sintomi simil-influenzali) da vaccini adiuvati con CpG.

Krieg AM.

CpG DNA: a pathogenic factor in systemic lupus erythematosus?

J Clin Immunol. 1995 Nov;15(6):284-92. doi: 10.1007/BF01541318. PMID: 8576314.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8576314/>

⁴⁰⁶ Segal BM, Klinman DM, Shevach EM.

Microbial products induce autoimmune disease by an IL-12-dependent pathway.

J Immunol. 1997 Jun 1;158(11):5087-90. PMID: 9164922.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9164922/>

Segal BM, Chang JT, Shevach EM.

CpG oligonucleotides are potent adjuvants for the activation of autoreactive encephalitogenic T cells in vivo.

J Immunol. 2000 Jun 1;164(11):5683-8. doi: 10.4049/jimmunol.164.11.5683. PMID: 10820244.

<https://www.jimmunol.org/content/164/11/5683.long>

⁴⁰⁷ Bachmaier K, Neu N, de la Maza LM, Pal S, Hessel A, Penninger JM.

Chlamydia infections and heart disease linked through antigenic mimicry.

Science. 1999 Feb 26;283(5406):1335-9. doi: 10.1126/science.283.5406.1335. PMID: 10037605.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10037605/>

⁴⁰⁸ Zeuner RA, Verthelyi D, Gursel M, Ishii KJ, Klinman DM.

Influence of stimulatory and suppressive DNA motifs on host susceptibility to inflammatory arthritis.

Arthritis Rheum. 2003 Jun;48(6):1701-7. doi: 10.1002/art.11035. PMID: 12794839.

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/art.11035>

⁴⁰⁹ Opal SM.

Endotoxins and other sepsis triggers.

Contrib Nephrol. 2010;167:14-24. doi: 10.1159/000315915. Epub 2010 Jun 1. PMID: 20519895.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20519895/>

⁴¹⁰ Sparwasser T, Miethke T, Lipford G, Borschert K, Häcker H, Heeg K, Wagner H. Bacterial DNA causes septic shock.

Nature. 1997 Mar 27;386(6623):336-7. doi: 10.1038/386336a0. PMID: 9121548.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9121548/>

Cowdery JS, Chace JH, Yi AK, Krieg AM.

Bacterial DNA induces NK cells to produce IFN-gamma in vivo and increases the toxicity of lipopolysaccharides.

J Immunol. 1996 Jun 15;156(12):4570-5. PMID: 8648098.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8648098/>

Hartmann G, Krug A, Waller-Fontaine K, Endres S.

Oligodeoxynucleotides enhance lipopolysaccharide-stimulated synthesis of tumor necrosis factor: dependence on phosphorothioate modification and reversal by heparin.

Mol Med. 1996;2(4):429-438.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2230162/pdf/molmed00040-0039.pdf>

In particolare, in un campione di soggetti vaccinati con CpG ODN più PPV-23, il 75,6% ha sviluppato eventi avversi classificati di intensità moderata-grave. Al contrario, i sintomi simil-influenzali erano meno frequenti tra coloro che avevano ricevuto solo PPV-23.

È possibile che l'aumentata reattogenicità riscontrata con il vaccino adiuvato rifletta la sinergia tra CpG ODN e le PAMPs della parete cellulare batterica presenti nel vaccino PPV-23.⁴¹¹

AS04

I sali di alluminio sono stati utilizzati come piattaforme per la scoperta di nuovi adiuvanti, costituiti da vari agonisti del recettore Toll-like (TLR) adsorbiti su di essi.

Uno di questi, noto come sistema adiuvante 04 (AS04), è stato utilizzato nei vaccini HPV e HBV.

Tra questi, il Cervarix, un vaccino bivalente contro il Papillomavirus umano, è il primo vaccino adiuvato con AS04 approvato dalla FDA nel 2009.

AS04 è preparato da 3'-O-monofosforil-lipide A (MPL) e un sale di alluminio.

MPL è un lipopolisaccaride (LPS) detossificato che è stato segnalato come un agonista specifico del TLR4⁴¹². Tuttavia, le proprietà di segnalazione dell'MPL attraverso l'attivazione del TLR4 non sono esattamente le stesse dell'LPS.

La differenza potrebbe essere dovuta all'assenza dell'1-fosfato nella molecola MPL⁴¹³.

È stato dimostrato che l'AS04, confrontato con un adiuvante contenente solo sale di alluminio, è in grado di indurre nei vaccini HPV una risposta immunitaria efficace a lungo termine⁴¹⁴.

Gli studi hanno trovato una rapida produzione di citochine e il reclutamento di varie cellule immunitarie nei muscoli e nel drenaggio dei linfonodi nel sito di iniezione entro 3-6 h quando adiuvato con MPL o AS04.

È dimostrato che l'MPL è il componente principale del vaccino che ha mediato la risposta immunitaria precoce. Sebbene i sali di alluminio non abbiano sinergizzato con MPL, la loro presenza ha prolungato la risposta immunitaria a causa della funzione dell'effetto depot.

Inoltre, uno studio recente indica che i livelli di IFN-gamma, un marker di risposta polarizzata Th1, erano più alti quando gli antigeni HPV-16 e HPV-18 VLP erano adiuvati con AS04 rispetto al solo idrossido di alluminio. Questi risultati indicano che AS04 è più efficiente nell'indurre l'amplificazione e la differenziazione dei linfociti T CD4⁺ e nel promuovere una risposta polarizzata Th1.⁴¹⁵

⁴¹¹ Sen G, Khan AQ, Chen Q, Snapper CM.

In vivo humoral immune responses to isolated pneumococcal polysaccharides are dependent on the presence of associated TLR ligands. *J Immunol.* 2005 Sep 1;175(5):3084-91. doi: 10.4049/jimmunol.175.5.3084. PMID: 16116197. <https://www.jimmunol.org/content/175/5/3084.long>

⁴¹² Garçon N, Chomez P, Van Mechelen M.

GlaxoSmithKline Adjuvant Systems in vaccines: concepts, achievements and perspectives. *Expert Rev Vaccines.* 2007 Oct;6(5):723-39. doi: 10.1586/14760584.6.5.723. PMID: 17931153. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17931153/>

Garçon N, Morel S, Didierlaurent A, Descamps D, Wettendorff M, Van Mechelen M.

Development of an AS04-adjuvanted HPV vaccine with the adjuvant system approach. *BioDrugs.* 2011 Aug 1;25(4):217-26. doi: 10.2165/11591760-000000000-00000. PMID: 21815697. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21815697/>

⁴¹³ Park BS, Song DH, Kim HM, Choi BS, Lee H, Lee JO.

The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature.* 2009 Apr 30;458(7242):1191-5. doi: 10.1038/nature07830. Epub 2009 Mar 1. PMID: 19252480. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19252480/>

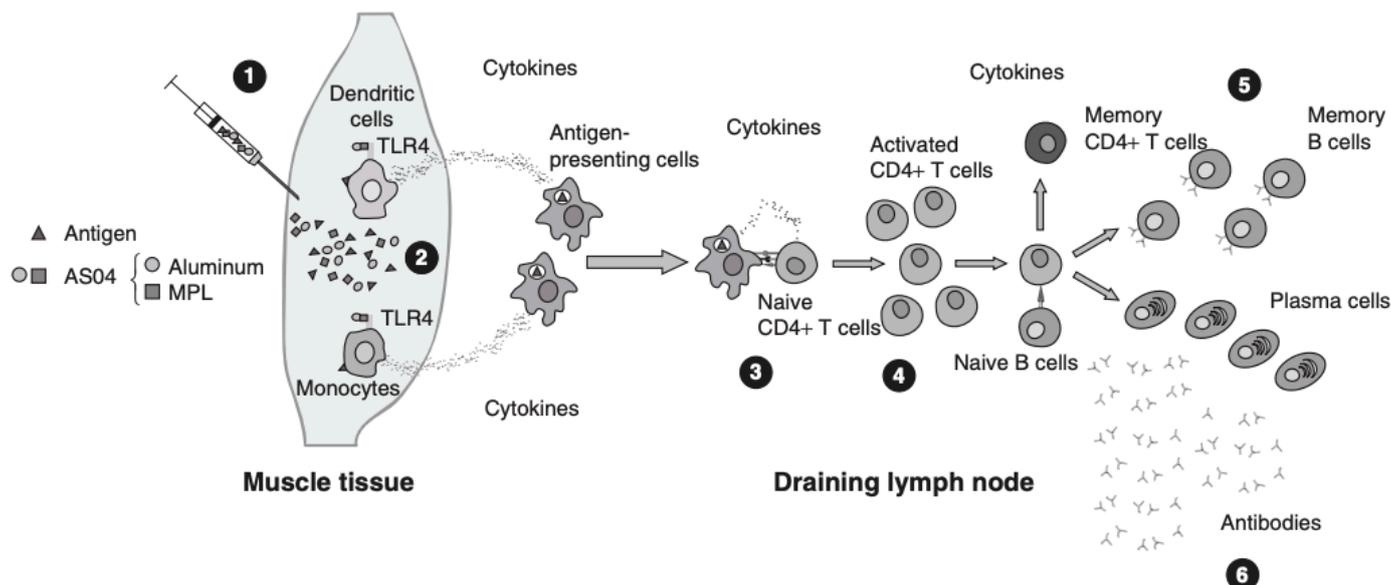
Park BS, Lee JO.

Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp Mol Med.* 2013;45(12):e66. Published 2013 Dec 6. doi:10.1038/emm.2013.97 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3880462/>

⁴¹⁴ Giannini SL et al

Enhanced humoral and memory B cellular immunity using HPV16/18 L1 VLP vaccine formulated with the MPL/aluminium salt combination (AS04) compared to aluminium salt only. *Vaccine.* 2006 Aug 14;24(33-34):5937-49. doi: 10.1016/j.vaccine.2006.06.005. Epub 2006 Jun 19. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16828940/>

⁴¹⁵ Del Giudice G, Rappuoli R, Didierlaurent AM.



<https://sci-hub.se/10.1016/j.vaccine.2019.04.055>

Meccanismo d'azione dell'adiuvante AS04. **Fase (1):** il vaccino viene iniettato nel muscolo. AS04 contiene sali di alluminio e monofosforil lipide A (MPL), un agonista del recettore 4 (TLR4) Toll-like. Le cellule che esprimono TLR4 nel muscolo, come le cellule dendritiche o monociti residenti o reclutati, vengono attivate e inducono una risposta locale e transitoria. Questa risposta è principalmente guidata da MPL. AS04 consente il reclutamento e l'attivazione rapidi di monociti e cellule dendritiche. **Fase (2):** AS04 e particelle simili a virus co-localizzano. **Fase (3):** I monociti attivati e le cellule dendritiche, caricate con l'antigene, migrano verso il linfonodo drenante. AS04 consente una migliore attivazione di quelle cellule che presentano l'antigene, ad es. una maggiore espressione di molecole co-stimolatorie, che si traduce in una maggiore capacità di presentare l'antigene alle cellule T CD4+. **Fase (4):** La generazione di cellule T CD4+ più e/o potenziate porta a una migliore differenziazione delle cellule B. **Fase (5):** AS04 aumenta la frequenza delle cellule B di memoria specifiche dell'antigene. **Fase (6):** elevati livelli di anticorpi vengono rilasciati nella circolazione.

ADVAX

Advax prodotto da Vaxine (Australia) è una particella di polisaccaride microcristallino composta da **delta inulina**⁴¹⁶ ed è stato recentemente testato con successo in diversi studi sull'uomo, inclusi studi sui vaccini per prevenire l'influenza stagionale e pandemica, l'epatite B e le reazioni iperallergiche al veleno di insetti⁴¹⁷.

Struttura della delta inulina. Schema di una singola catena polimerica di inulina composta da più unità di fruttosio con un glucosio terminale (A). Una singola particella di inulina delta ripresa mediante microscopia elettronica a scansione di frattura da congelamento (B). Particelle fluorescenti di delta inulina endocitate da monociti umani dopo co-cultura notturna (C).

Correlates of adjuvanticity: A review on adjuvants in licensed vaccines.

Semin Immunol. 2018 Oct;39:14-21. doi: 10.1016/j.smim.2018.05.001. Epub 2018 May 23. PMID: 29801750.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044532318300514?via%3Dihub>

Didierlaurent AM et al

AS04, an aluminum salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity.

J Immunol. 2009 Nov 15;183(10):6186-97. doi: 10.4049/jimmunol.0901474. Epub 2009 Oct 28

<https://www.jimmunol.org/content/183/10/6186.long>

⁴¹⁶ Petrovsky N, Cooper PD.

Advax™, a novel microcrystalline polysaccharide particle engineered from delta inulin, provides robust adjuvant potency together with tolerability and safety.

Vaccine. 2015 Nov 4;33(44):5920-6. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.09.030. Epub 2015 Sep 25.

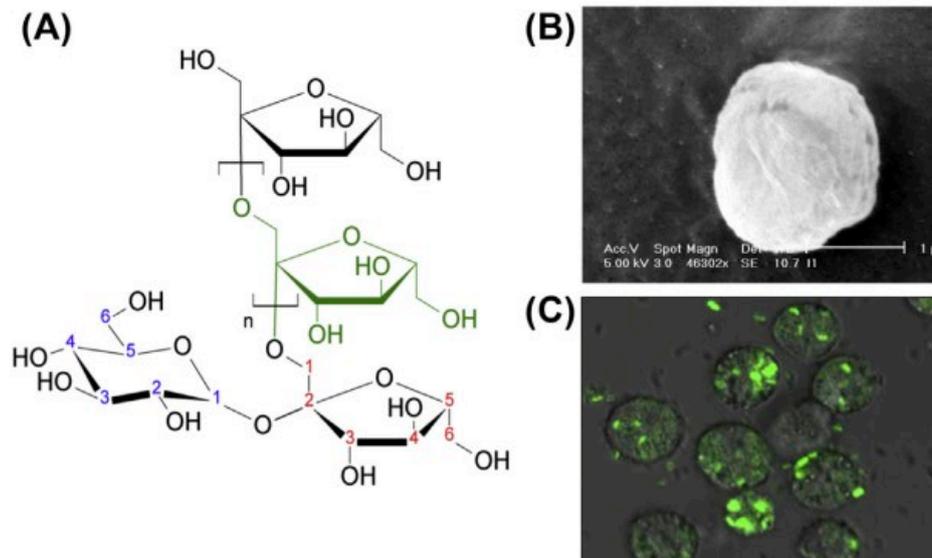
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26407920/>

⁴¹⁷ Heddle R, Smith A, Woodman R, Hissaria P, Petrovsky N.

Randomized controlled trial demonstrating the benefits of delta inulin adjuvanted immunotherapy in patients with bee venom allergy.

J Allergy Clin Immunol. 2019;144(2):504-513.e16. doi:10.1016/j.jaci.2019.03.035

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7112352/>



<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128040195000104>

Rispetto ai controlli, l'adiuvante Advax⁴¹⁸ sembra migliorare la risposta degli anticorpi e dei linfociti T, ed è sicuro e ben tollerato⁴¹⁹.

Advax non induce la produzione di citochine infiammatorie, fattore che lo distingue da altri adiuvanti. Sebbene il suo meccanismo d'azione rimanga oggetto di intensi studi in corso, si ipotizza che agisca modulando la funzione delle cellule presentanti l'antigene in modo non infiammatorio, migliorando così la co-stimolazione e l'attivazione delle cellule T helper antigene-specifiche, che a loro volta innescano l'espansione delle cellule B della memoria e delle cellule T CD8.⁴²⁰

Come già visto, i vaccini contro il coronavirus presentano un problema di sicurezza peculiare, in quanto gli individui immunizzati quando infettati dal virus possono sviluppare una patologia eosinofila polmonare molto grave, un problema che è ulteriormente aggravato dalla formulazione di vaccini SARS-CoV con adiuvanti a base di allume.

Per superare questa reazione avversa inaccettabile, sono state testate delle formulazioni della proteina spike SARS-CoV in vaccini a virus intero inattivati e a subunità con nuovi adiuvanti polisaccaridici a base di delta

⁴¹⁸ Hayashi M, Aoshi T, Haseda Y, et al.
Advax, a Delta Inulin Microparticle, Potentiates In-built Adjuvant Property of Co-administered Vaccines.
EBioMedicine. 2017;15:127-136. doi:10.1016/j.ebiom.2016.11.015
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5233800/>

Petrovsky N, Cooper PD.
Advax™, a novel microcrystalline polysaccharide particle engineered from delta inulin, provides robust adjuvant potency together with tolerability and safety.
Vaccine. 2015 Nov 4;33(44):5920-6. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.09.030. Epub 2015 Sep 25.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4639457/>

⁴¹⁹ Gordon D, Kelley P, Heinzl S, Cooper P, Petrovsky N.
Immunogenicity and safety of Advax™, a novel polysaccharide adjuvant based on delta inulin, when formulated with hepatitis B surface antigen: a randomized controlled Phase 1 study.
Vaccine. 2014;32(48):6469-6477. doi:10.1016/j.vaccine.2014.09.034
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4253909/>

Skwarczynski M.
Inulin: A New Adjuvant With Unknown Mode of Action.
EBioMedicine. 2017;15:8-9. doi:10.1016/j.ebiom.2016.11.019
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5233799/>

⁴²⁰ N. Petroski,
Chapter 10 - Advax Adjuvant: A Potent and Safe Immunopotentiator Composed of Delta Inulin,
Editor(s): Virgil E.J.C. Schijns, Derek T. O'Hagan, Immunopotentiators in Modern Vaccines (Second Edition), Academic Press, 2017, Pages 199-210,
ISBN 9780128040195, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804019-5.00010-4>.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128040195000104>

inulina, e ne è risultato che questo adiuvante aumenta i titoli degli anticorpi neutralizzanti e la protezione contro la malattia clinica, ma allo stesso tempo protegge anche dallo sviluppo dell'immunopatologia eosinofila polmonare nei challenge test.

Inoltre hanno mostrato che l'immunità raggiunta con gli adiuvanti delta inulina è di lunga durata, superando così la naturale tendenza all'immunità al coronavirus in rapida diminuzione.⁴²¹

ASPETTI REGOLATORI PER L'AUTORIZZAZIONE DI NUOVI ADIUVANTI

Le agenzie regolatorie (FDA ed EMA) definiscono gli adiuvanti come uno dei materiali costitutivi del vaccino, quindi, a meno che l'adiuvante non abbia un'indicazione "autonoma", di solito gli adiuvanti non vengono valutati e approvati di per sé ma piuttosto come parte di una formulazione di vaccino.

Le linee guida affermano che *"un adiuvante non deve essere introdotto in un prodotto a meno che non vi siano prove soddisfacenti che non influisce negativamente sulla sicurezza o sulla potenza del prodotto"*.⁴²²

Sebbene non sia necessario dimostrare la sicurezza dell'adiuvante somministrato da solo, la sicurezza di una formulazione vaccinale adiuvata deve essere dimostrata con studi adeguati e ben controllati.

L'OMS ha pubblicato una linea guida nel 2013 e ha descritto le informazioni non cliniche, di qualità, farmacologiche, tossicologiche e di altro tipo necessarie per supportare l'avvio di studi clinici con un vaccino combinato con un nuovo adiuvante⁴²³.

Oltre ad appropriati studi sulla sicurezza, per supportare l'approvazione la linea guida pone l'accento sull'importanza di dimostrare la necessità dell'uso di un adiuvante con un meccanismo d'azione (MOA) definito in modelli animali in vitro umani e ben definiti.⁴²⁴

TOSSICOLOGIA DEGLI ADIUVANTI

Sebbene gli adiuvanti siano aggiunti a molti vaccini per i loro effetti immunostimolatori, possono potenzialmente indurre contemporaneamente una reattogenicità indesiderata, con manifestazioni fisiche della risposta immunomodulante e/o infiammatoria che si verificano entro 72 ore dalla vaccinazione.⁴²⁵

⁴²¹ Honda-Okubo Y, Barnard D, Ong CH, Peng BH, Tseng CT, Petrovsky N.

Severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus vaccines formulated with delta inulin adjuvants provide enhanced protection while ameliorating lung eosinophilic immunopathology.

J Virol. 2015;89(6):2995-3007. doi:10.1128/JVI.02980-14

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4337527/>

McPherson C, Chubet R, Holtz K, Honda-Okubo Y, Barnard D, Cox M, Petrovsky N. Development of a SARS Coronavirus Vaccine from Recombinant Spike Protein Plus Delta Inulin Adjuvant.

Methods Mol Biol. 2016;1403:269-84. doi: 10.1007/978-1-4939-3387-7_14. PMID: 27076136; PMCID: PMC7139448.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7139448/>

⁴²² Guidance for industry for the evaluation of combination vaccines for preventable diseases: production, testing and clinical studies

<https://www.fda.gov/media/77191/download>

GUIDELINE ON ADJUVANTS IN VACCINES FOR HUMAN USE

https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-adjuvants-vaccines-human-use-see-also-explanatory-note_en.pdf

⁴²³ Guidelines on the nonclinical evaluation of vaccine adjuvants and adjuvanted vaccines

https://www.who.int/biologicals/areas/vaccines/TRS_987_Annex2.pdf?ua=1

https://www.who.int/biologicals/areas/vaccines/ADJUVANTS_Post_ECBS_edited_clean_Guidelines_NCE_Adjuvant_Final_17122013_WEB.pdf?ua=1

⁴²⁴ Nanishi E, Dowling DJ, Levy O.

Toward precision adjuvants: optimizing science and safety.

Curr Opin Pediatr. 2020;32(1):125-138. doi:10.1097/MOP.0000000000000868

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6970548/>

⁴²⁵ Hervé C, Laupèze B, Del Giudice G, Didierlaurent AM, Tavares Da Silva F.

The how's and what's of vaccine reactogenicity.

NPJ Vaccines. 2019;4:39. Published 2019 Sep 24. doi:10.1038/s41541-019-0132-6

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6760227/>

La reattività può essere suddivisa in locale e sistemica a seconda della sede dei sintomi.

La **reattogenicità locale** comprende eritema, gonfiore, dolore, dolorabilità o indurimento nel sito di iniezione, mentre la **reattogenicità sistemica**, spesso denominata sintomi "simil-influenzali", include brividi, febbre, affaticamento, nausea, artrite, mialgia e mal di testa.

La reattogenicità è quindi riferita alle reazioni infiammatorie acute dopo la vaccinazione, mentre il termine "**sicurezza**" si riferisce a tutti gli eventi avversi attribuibili alla vaccinazione che potrebbero essere potenzialmente causati, innescati o peggiorati dopo la somministrazione del vaccino.

Oltre ai sintomi sopra descritti come reattogenicità, la sicurezza include eventi avversi come le reazioni anafilattiche dopo la somministrazione di un vaccino adiuvato e il potenziale rischio del vaccino adiuvato di indurre o peggiorare malattie autoimmuni⁴²⁶ e altre patologie a lungo termine che non si possono riscontrare nelle fasi cliniche prima dell'immissione in commercio.

La fase clinica di post-marketing è quindi di fondamentale importanza per la segnalazione di nuove reazioni avverse, che possono avvenire nella popolazione costituita da individui eterogenei dal punto di vista genetico, delle malattie già presenti, età, genere ect...

Tuttavia, la sorveglianza passiva, effettuata con la segnalazione da parte del vaccinato o dell'operatore sanitario alle autorità competenti di un sospetto danno da vaccino, porta ad un risultato notevolmente sottostimato dell'incidenza e della tipologia di danni realmente insorti nel medio-lungo termine.⁴²⁷

Dal punto di vista del meccanismo d'induzione della reattogenicità, gli stessi eventi infiammatori con rilascio di citochine, già visti e necessari per innescare forti risposte immunitarie acquisite antigene-specifiche, possono portare anche allo sviluppo di segni e sintomi di infiammazione al sito di iniezione (dolore, arrossamento e gonfiore) nell'individuo vaccinato.

Mediatori e prodotti dell'infiammazione in circolo possono influenzare altri sistemi del corpo causando effetti collaterali sistemici (come febbre, affaticamento e mal di testa). Ne segue che per mantenere la reattogenicità a livelli clinicamente accettabili è necessario bilanciare gli effetti benefici e quelli dannosi di questi eventi infiammatori.

Batista-Duharte A, Martínez DT, Carlos IZ.

Efficacy and safety of immunological adjuvants. Where is the cut-off?

Biomed Pharmacother. 2018 Sep;105:616-624. doi: 10.1016/j.biopha.2018.06.026. Epub 2018 Jun 9. PMID: 29894962.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29894962/>

⁴²⁶ Guimarães LE, Baker B, Perricone C, Shoenfeld Y.

Vaccines, adjuvants and autoimmunity.

Pharmacol Res. 2015 Oct;100:190-209. doi: 10.1016/j.phrs.2015.08.003. Epub 2015 Aug 12.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7129276/>

Ruiz JT, Luján L, Blank M, Shoenfeld Y.

Adjuvants- and vaccines-induced autoimmunity: animal models.

Immunol Res. 2017 Feb;65(1):55-65. doi: 10.1007/s12026-016-8819-5. PMID: 27417999.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27417999/>

Vaccines and Autoimmunity

Editor(s): Yehuda Shoenfeld, Nancy Agmon-Levin, Lucija Tomljenovic

First published:15 May 2015 Print ISBN:9781118663431 | Online ISBN:9781118663721 | DOI:10.1002/9781118663721 2015 Wiley-Blackwell

⁴²⁷ AUDIZIONI DDL 363 E DDL 770 IN MATERIA DI PREVENZIONE VACCINALE Seduta del 17 gennaio 2019

<http://www.paolobellavite.it/files/190117Senato-Bellavite-Depositata.pdf>

Bellavite P.

Causality assessment of adverse events following immunization: the problem of multifactorial pathology.

F1000Res. 2020 Mar 9;9:170. doi: 10.12688/f1000research.22600.2.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7111503/>

Meccanismi biologici della reattogenicità

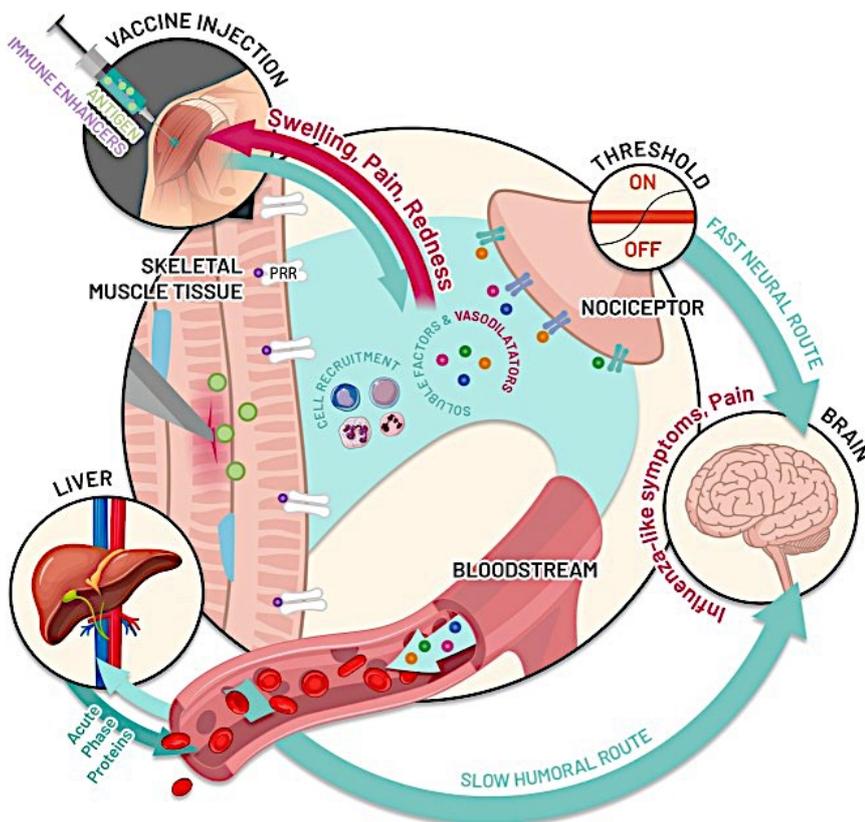
Tutti i vaccini condividono la capacità di attivare i PRR che porteranno alla produzione di diversi mediatori. I PRR sono espressi dalle cellule immunitarie, inclusi monociti, macrofagi, mastociti e cellule dendritiche e cellule stromali residenti, come anche i cheratinociti e le cellule del muscolo scheletrico.

Le cellule residenti, in particolare macrofagi e mastociti, sono cellule bersaglio chiave che iniziano la risposta entro pochi minuti dalla vaccinazione, rilasciando citochine pro-infiammatorie, chemochine, effettori della cascata del complemento (C3a e C5a) e vasodilatatori, comprese le ammine vasoattive e la bradichinina.

I vasodilatatori e il gradiente delle chemochine promuovono il reclutamento cellulare dal sangue, ma portano anche allo sviluppo di arrossamento e gonfiore.

I neutrofili, i monociti e i linfociti che affluiscono dal sangue aderiscono alle pareti dei vasi e si accumulano nel sito di lesione tramite stravaso.

Queste cellule immunitarie possono contribuire alla sensibilizzazione nocicettiva periferica rilasciando fattori solubili, come citochine, prostaglandine o ATP, e interagendo direttamente con i nocicettori (neuroni sensoriali che rispondono a stimoli potenzialmente dannosi) per causare dolore se viene raggiunta la soglia del dolore. La sensazione di dolore viene trasmessa attraverso neuroni mielinizzati a conduzione rapida (percorso neurale veloce).



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6760227/>

Collegamento ipotizzato tra la risposta immunitaria innata indotta dalla vaccinazione e la reattogenicità. Dopo la vaccinazione, l'infiammazione è innescata dall'attivazione immunitaria innata dei recettori di riconoscimento del pattern (PRR) inclusi i recettori Toll-like (TLR) che riconoscono e legano gli antigeni (cerchio verde nel muscolo scheletrico) e potenziali potenziatori immunitari (cerchio viola nel muscolo scheletrico) presenti nella formulazione del vaccino. Cellule immunitarie residenti, mastociti, monociti e macrofagi si attivano entro pochi minuti dall'iniezione e rilasciano fattori solubili (citochine proinfiammatorie, chemochine, effettori della cascata del complemento) e vasodilatatori, che consentono il reclutamento cellulare dal sangue ma portano anche allo sviluppo di arrossamenti e sintomi di gonfiore. Queste cellule immunitarie di recente reclutamento, composte principalmente da neutrofili, monociti e linfociti T nati nel sangue, contribuiscono anche alla sensazione di dolore rilasciando fattori solubili, come citochine, prostaglandine o ATP, che possono interagire direttamente con i recettori sensoriali locali chiamati nocicettori e causare dolore attraverso il percorso neurale veloce se viene raggiunta la soglia. Una volta prodotte, le citochine agiscono sia localmente in modo autocrino che paracrino e possono agire sistemicamente su organi distanti, portando alla produzione di proteina C-reattiva e di altre proteine di fase acuta da parte del fegato. Diverse vie di segnalazione del sistema immunitario al cervello possono propagare una risposta infiammatoria al sistema nervoso centrale dopo l'attivazione periferica del sistema immunitario innato (via umorale lenta), portando allo sviluppo di comportamenti febbrili e di malattia

Nella seguente tabella sono riportati i meccanismi più rilevanti coinvolti nell'immunotossicità degli adiuvanti.

Mechanisms	Consequence	Clinical manifestations	Adjuvant examples
Associated with local reactions			
Direct cytolytic	Direct lytic effects on cells in the inoculation site. Damage-associated molecular patterns (DAMPs) release from injured cells.	Local irritation and inflammation	Alum Saponins
Depot effect and slow degradation	Excessive recruitment of immune cells and Th1-biased response	Long lasting local inflammation, granuloma (delayed-type hypersensitivity)	Gels Emulsions
Inflammation-associated oncogenesis	Tumorigenesis	Tumors in the inoculation site	Alum
Associated with local and (or) systemic reactions			
Profuse release of inflammatory cytokine/chemokines	Excessive stimulation and/or suboptimal downregulation of innate immune system	Local inflammation, acute phase response Vascular leak syndrome Aplastic-like bone marrow	Multiple Cytokines pATREx
Disturbs in hepatic cytochrome P450 expression/activity mediated. Changes in drug transporters	Changes in pharmacokinetics (including metabolism) and pharmacodynamics of drugs mediated by cytokines	Toxicity of some drugs administered during or shortly after vaccination	Freund's adjuvants Alum LPS Alum
Off-target effect	Expression of innate immune receptors by cell types not involved in the immune response	Inflammation in non-immune tissues. Autoimmune/inflammatory syndrome associated to adjuvants?	Alum
Failure in the contraction of adaptive immune response	Homeostatic disturbances in several immune mechanisms	Hypersensitivity reactions and autoimmune disorders	Freund's adjuvants, Alum. Regulatory T cells modulators
Loss of peripheral immunotolerance	Immune response against own tissues	Autoimmune process	Freund's adjuvants Alum Alum
Excessive Th2-biased response	Excessive stimulation of IgE response and allergy mediators	Immediate-type hypersensitivity reactions	Alum
Formation and deposition of immune complex (IC)	Local or systemic inflammatory reactions mediated by IC	Arthus reactions, vasculitis	Alum

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29894962/>

Inflammatione locale transitoria ⁴²⁸

Immediatamente dopo il primo contatto della formulazione adiuvante con il tessuto, può verificarsi un'irritazione chimica dovuta al pH non fisiologico, osmolarità o citotossicità diretta ⁴²⁹

Adiuvanti come allume, saponine (ad es. Quil A e frazioni di saponina QS21); complessi immunostimolatori (ISCOM); Iscomatrix) e alcune emulsioni, producono citolisi diretta nel sito di inoculo associata a congestione dolorosa locale immediata e infiammazione focale. ⁴³⁰

I risultati di un recente studio hanno mostrato che l'effetto irritante diretto degli adiuvanti citotossici rilevato in vitro è direttamente associato a gravi reazioni locali nel sito di inoculo in vivo. ⁴³¹

⁴²⁸ Batista-Duarte A, Martínez DT, Carlos IZ.

Efficacy and safety of immunological adjuvants.

Where is the cut-off? Biomed Pharmacother. 2018 Sep;105:616-624. doi: 10.1016/j.biopha.2018.06.026. Epub 2018 Jun 9.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29894962/>

⁴²⁹ Gupta RK, Relyveld EH, Lindblad EB, Bizzini B, Ben-Efraim S, Gupta CK.

Adjuvants--a balance between toxicity and adjuvanticity.

Vaccine. 1993;11(3):293-306. doi: 10.1016/0264-410x(93)90190-9. PMID: 8447157.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8447157/>

Goto N, Kato H, Maeyama J, Shibano M, Saito T, Yamaguchi J, Yoshihara S.

Local tissue irritating effects and adjuvant activities of calcium phosphate and aluminium hydroxide with different physical properties.

Vaccine. 1997 Aug-Sep;15(12-13):1364-71. doi: 10.1016/s0264-410x(97)00054-6. PMID: 9302746.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9302746/>

⁴³⁰ Waite DC, Jacobson EW, Ennis FA, Edelman R, White B, Kammer R, Anderson C, Kensil CR.

Three double-blind, randomized trials evaluating the safety and tolerance of different formulations of the saponin adjuvant QS-21.

Vaccine. 2001 Jul 16;19(28-29):3957-67. doi: 10.1016/s0264-410x(01)00142-6. PMID: 11427271.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11427271/>

⁴³¹ Waite DC, Jacobson EW, Ennis FA, Edelman R, White B, Kammer R, Anderson C, Kensil CR.

Per questo motivo, gli adiuvanti citotossici sono particolarmente controindicati per la vaccinazione mucosale. La citotossicità delle emulsioni contenenti sali minerali è dovuta alla presenza di idrocarburi a catena corta con effetto detergente, che sciolgono il doppio strato lipidico della membrana cellulare.

Gli oli minerali sono una miscela di idrocarburi con catene di carbonio di diversa lunghezza. Le catene corte inducono reazioni locali, mentre le catene più lunghe (> C14) sono più sicure, ma meno efficienti come adiuvanti.

Gli emulsionanti utilizzati nelle emulsioni acqua/olio, come il mannide monooleato, possono produrre effetti citotossici attraverso la scomposizione enzimatica delle catene lipidiche native che rilasciano acidi grassi tossici ⁴³².

Altri noti adiuvanti citotossici sono le saponine sopra citate che interagiscono con le membrane cellulari portando alla lisi cellulare. ⁴³³

L'attività superficiale responsabile delle proprietà schiumogene, così come alcune altre funzioni biologiche, inclusa l'attività emolitica delle saponine, sono attribuite alla loro [natura anfifilica](#), che risulta dalla presenza di una frazione idrofila dello zucchero e di una genina idrofobica (chiamata sapogenina).

Questa struttura facilita la complessazione con il colesterolo della membrana cellulare, la quale porta alla formazione dei pori e alla permeabilizzazione cellulare. ⁴³⁴

Gli adiuvanti che causano citotossicità possono attivare la risposta immunitaria innata attraverso le molecole rilasciate dalle cellule danneggiate (DAMP). Alcuni dei DAMPs più noti includono il gruppo 1 (HMGB1) ad alta mobilità con proteine associate alla cromatina, le proteine da shock termico (HSP) e i metaboliti delle purine, come l'ATP e l'acido urico.

Inoltre, ci sono anche DAMPs localizzati extracellulari generati dopo la proteolisi della matrice da enzimi rilasciati dalle cellule morenti che includono frammenti di matrice, come lo ialuronano, l'eparan-solfato e il biglicano. ⁴³⁵

Gli adiuvanti che provocano il rilascio di DAMP sono noti come **adiuvanti di tipo DAMP**. ⁴³⁶ Agiscono su monociti, macrofagi o granulociti per indurre citochine che generano un ambiente immunostimolante locale, portando infine all'attivazione delle cellule dendritiche.

In particolare, l'allume produce un effetto citotossico diretto e il DNA, l'acido urico e le altre molecole intracellulari rilasciate dalle cellule morenti mediano l'azione adiuvante dell'allume attraverso la famiglia dei recettori pro-infiammatori, cioè la via dell'inflammasoma contenente il dominio pryin-3 (NLRP3). ⁴³⁷

Three double-blind, randomized trials evaluating the safety and tolerance of different formulations of the saponin adjuvant QS-21. *Vaccine*. 2001 Jul 16;19(28-29):3957-67. doi: 10.1016/s0264-410x(01)00142-6. PMID: 11427271. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11427271/>

⁴³² Gupta RK, Relyveld EH, Lindblad EB, Bizzini B, Ben-Efraim S, Gupta CK. Adjuvants--a balance between toxicity and adjuvanticity. *Vaccine*. 1993;11(3):293-306. doi: 10.1016/0264-410x(93)90190-9. PMID: 8447157. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8447157/>

⁴³³ Sun HX, Xie Y, Ye YP. Advances in saponin-based adjuvants. *Vaccine*. 2009 Mar 13;27(12):1787-96. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.01.091. Epub 2009 Feb 7. PMID: 19208455. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19208455/>

⁴³⁴ Podolak I, Galanty A, Sobolewska D. Saponins as cytotoxic agents: a review. *Phytochem Rev*. 2010;9(3):425-474. doi:10.1007/s11101-010-9183-z <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2928447/>

⁴³⁵ Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(12):826-837. doi:10.1038/nri2873 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3114424/>

⁴³⁶ Powell BS, Andrianov AK, Fusco PC. Polyionic vaccine adjuvants: another look at aluminum salts and polyelectrolytes. *Clin Exp Vaccine Res*. 2015;4(1):23-45. doi:10.7774/cevr.2015.4.1.23 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4313107/>

⁴³⁷ He P, Zou Y, Hu Z. Advances in aluminum hydroxide-based adjuvant research and its mechanism.

Vale la pena notare che il SARS-CoV-2 potrebbe attivare direttamente l'inflammasoma NLRP3 con conseguente attività adiuvante endogena in grado di indurre una risposta immunitaria adattativa contro il virus, e i pazienti con una forma immunitaria ridotta possono dimostrare un'attività dell'inflammasoma disregolata con una conseguente forma grave di COVID-19 con danni ai tessuti e una tempesta di citochine.⁴³⁸

Un altro importante gruppo di adiuvanti, denominati **adiuvanti di tipo PAMP**, contengono nella propria composizione pattern molecolari associati a patogeni e possono interagire direttamente con i recettori di riconoscimento dei pattern (PRR) nelle cellule dendritiche per la loro attivazione.⁴³⁹

A causa dell'attivazione delle cellule dendritiche, vengono rilasciate citochine pro-infiammatorie, tra cui l'interleuchina-1 (IL-1), il fattore di necrosi tumorale (TNF) - α , IL-6 e chemochine a motivo C-X-C che reclutano neutrofili, come CXCL1, CXCL2, CXCL5 e CXCL8 che promuovono l'uscita dei neutrofili dal sistema vascolare e la migrazione nel tessuto.⁴⁴⁰

Se la risposta neutrofila iniziale è insufficiente per eliminare l'inoculo, una seconda cascata di segnali chemiotattici viene stimolata a reclutare ulteriori cellule infiammatorie rilasciando chemochine a motivo C-C come CCL3, CCL4, CCL8 e CCL20.

In questo modo, i neutrofili, i monociti e i macrofagi collaborano per rimuovere entità estranee⁴⁴¹. Contemporaneamente, vengono indotte modifiche strutturali e funzionali sui vasi linfatici drenanti locali, per consentire il traffico di cellule dendritiche che trasportano antigeni verso i linfonodi regionali.⁴⁴²

Questi primi eventi si verificano durante le prime 24-72 ore dopo l'inoculazione e sono accompagnati da una reazione infiammatoria locale transitoria caratterizzata da arrossamento, lieve dolore e gonfiore. È l'evento avverso più frequente dopo la vaccinazione.⁴⁴³ Una volta che lo stimolo infiammatorio è stato eliminato, la risposta infiammatoria in corso deve essere risolta per prevenire un danno tissutale eccessivo.

L'assorbimento dei neutrofili apoptotici da parte dei macrofagi (efferocitosi) promuove la segnalazione antinfiammatoria caratterizzata da un'elevata produzione di IL-10, del fattore di crescita trasformante (TGF) - β e da una bassa produzione di IL-12p40.

Hum Vaccin Immunother. 2015;11(2):477-488. doi:10.1080/21645515.2014.1004026
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4514166/>

⁴³⁸ van den Berg DF, Te Velde AA.
Severe COVID-19: NLRP3 Inflammasome Dysregulated.
Front Immunol. 2020 Jun 26;11:1580. doi: 10.3389/fimmu.2020.01580.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7332883/>

⁴³⁹ Olafsdottir T, Lindqvist M, Harandi AM.
Molecular signatures of vaccine adjuvants.
Vaccine. 2015 Sep 29;33(40):5302-7. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.04.099. Epub 2015 May 16.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X15005964?via%3Dihub>

⁴⁴⁰ Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ.
Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease.
Biochim Biophys Acta. 2014 Nov;1843(11):2563-2582. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.05.014. Epub 2014 Jun 2.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488914001967?via%3Dihub>

⁴⁴¹ Soehnlein O, Lindbom L.
Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation.
Nat Rev Immunol. 2010 Jun;10(6):427-39. doi: 10.1038/nri2779.
<https://www.nature.com/articles/nri2779>

⁴⁴² Swartz MA, Hubbell JA, Reddy ST.
Lymphatic drainage function and its immunological implications: from dendritic cell homing to vaccine design.
Semin Immunol. 2008 Apr;20(2):147-56. doi: 10.1016/j.smim.2007.11.007. Epub 2008 Jan 16.
https://core.ac.uk/reader/147939644?utm_source=linkout

Neeland MR, Elhay MJ, Powell DR, Rossello FJ, Meeusen ENT, de Veer MJ.
Transcriptional profile in afferent lymph cells following vaccination with liposomes incorporating CpG.
Immunology. 2015 Mar;144(3):518-529. doi: 10.1111/imm.12401.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4557688/>

⁴⁴³ Batista-Duarte A, Portuondo D, Carlos IZ, Pérez O.
An approach to local immunotoxicity induced by adjuvanted vaccines.
Int Immunopharmacol. 2013 Nov;17(3):526-36. doi: 10.1016/j.intimp.2013.07.025. Epub 2013 Aug 20.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23968848/>

Questi macrofagi sopprimono la risposta infiammatoria locale diminuendo la produzione di citochine proinfiammatorie e specie reattive dell'ossigeno (ROS) e portando a risoluzione dell'infiammazione con il ripristino dei tessuti.⁴⁴⁴

Reazioni acute non frequenti nel sito di inoculo

La reazione di Arthus:

è una reazione di ipersensibilità locale di tipo III, che comporta la deposizione di immunocomplessi antigene/anticorpo (IC) nelle pareti dei vasi sanguigni, provocando vasculite con grave reazione infiammatoria locale.

Questa reazione può iniziare 2-8 ore dopo l'iniezione dell'antigene e verificarsi in presenza di livelli elevati di anticorpi preformati in una persona precedentemente vaccinata.

La deposizione di IC innesca un'infiammazione dipendente dal recettore Fc-gamma, in cui i macrofagi riconoscono l'IC e rilasciano il fattore inibitorio della migrazione (MIF) che danneggia il tessuto circostante.⁴⁴⁵

La somministrazione ripetuta dello stesso adiuvante in diversi vaccini potrebbe indurre alti livelli di anticorpi diretti verso l'adiuvante stesso, portando alla possibilità di indurre una reazione di Arthus.⁴⁴⁶

Tuttavia, ad eccezione dello squalene, la maggior parte degli adiuvanti non stimola risposte anticorpali contro se stessi⁴⁴⁷.

La reazione di Arthus è stata segnalata dopo la somministrazione ripetuta di vaccini quali l'antiepatiche B ricombinante e le anatossine difterite/tetano.⁴⁴⁸

Reazioni di ipersensibilità locale di tipo 1:

gli adiuvanti a base di alluminio stimolano un profilo Th2 e quindi possono potenzialmente indurre una risposta mediata dalle IgE, in particolare in soggetti geneticamente predisposti.⁴⁴⁹

⁴⁴⁴ Greenlee-Wacker MC.

Clearance of apoptotic neutrophils and resolution of inflammation. *Immunol Rev.* 2016 Sep;273(1):357-70. doi: 10.1111/imr.12453. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5000862/>

Elliott MR, Koster KM, Murphy PS.

Efferocytosis Signaling in the Regulation of Macrophage Inflammatory Responses. *J Immunol.* 2017;198(4):1387-1394. doi:10.4049/jimmunol.1601520 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5301545/>

⁴⁴⁵ Paiva CN, Arras RH, Magalhães ES, Alves LS, Lessa LP, Silva MH, Ejzemberg R, Canetti C, Bozza MT.

Migration inhibitory factor (MIF) released by macrophages upon recognition of immune complexes is critical to inflammation in Arthus reaction. *J Leukoc Biol.* 2009 May;85(5):855-61. doi: 10.1189/jlb.0108009. Epub 2009 Feb 2. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19188484/>

⁴⁴⁶ Peng B, Wei M, Zhu FC, Li JX.

The vaccines-associated Arthus reaction. *Hum Vaccin Immunother.* 2019;15(11):2769-2777. doi:10.1080/21645515.2019.1602435 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6930064/>

⁴⁴⁷ Asa PB, Wilson RB, Garry RF.

Antibodies to squalene in recipients of anthrax vaccine. *Exp Mol Pathol.* 2002 Aug;73(1):19-27. doi: 10.1006/exmp.2002.2429. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12127050/>

⁴⁴⁸ Froehlich H, Verma R.

Arthus reaction to recombinant hepatitis B virus vaccine. *Clin Infect Dis.* 2001 Sep 15;33(6):906-8. doi: 10.1086/322585. Epub 2001 Aug 21. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11512098/>

Ponvert C.

Les réactions d'hypersensibilité allergique et non allergique aux vaccins contenant des anatossines [Allergic and non-allergic hypersensitivity reactions to toxoid-containing vaccines]. *Arch Pediatr.* 2009 Apr;16(4):391-5. French. doi: 10.1016/j.arcped.2009.01.002. Epub 2009 Feb 27. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19250809/>

⁴⁴⁹ Terhune TD, Deth RC.

How aluminum adjuvants could promote and enhance non-target IgE synthesis in a genetically-vulnerable sub-population. *J Immunotoxicol.* 2013 Apr-Jun;10(2):210-22. doi: 10.3109/1547691X.2012.708366. Epub 2012 Sep 11. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22967010/>

Il richiamo orticarioide (RU), noto anche come reazione di richiamo a farmaco fisso, è una risposta localizzata che si verifica nel sito della precedente iniezione di antigene dopo la riesposizione a quell'antigene in un sito remoto e si manifesta con gonfiore immediato, orticaria e prurito intenso.⁴⁵⁰

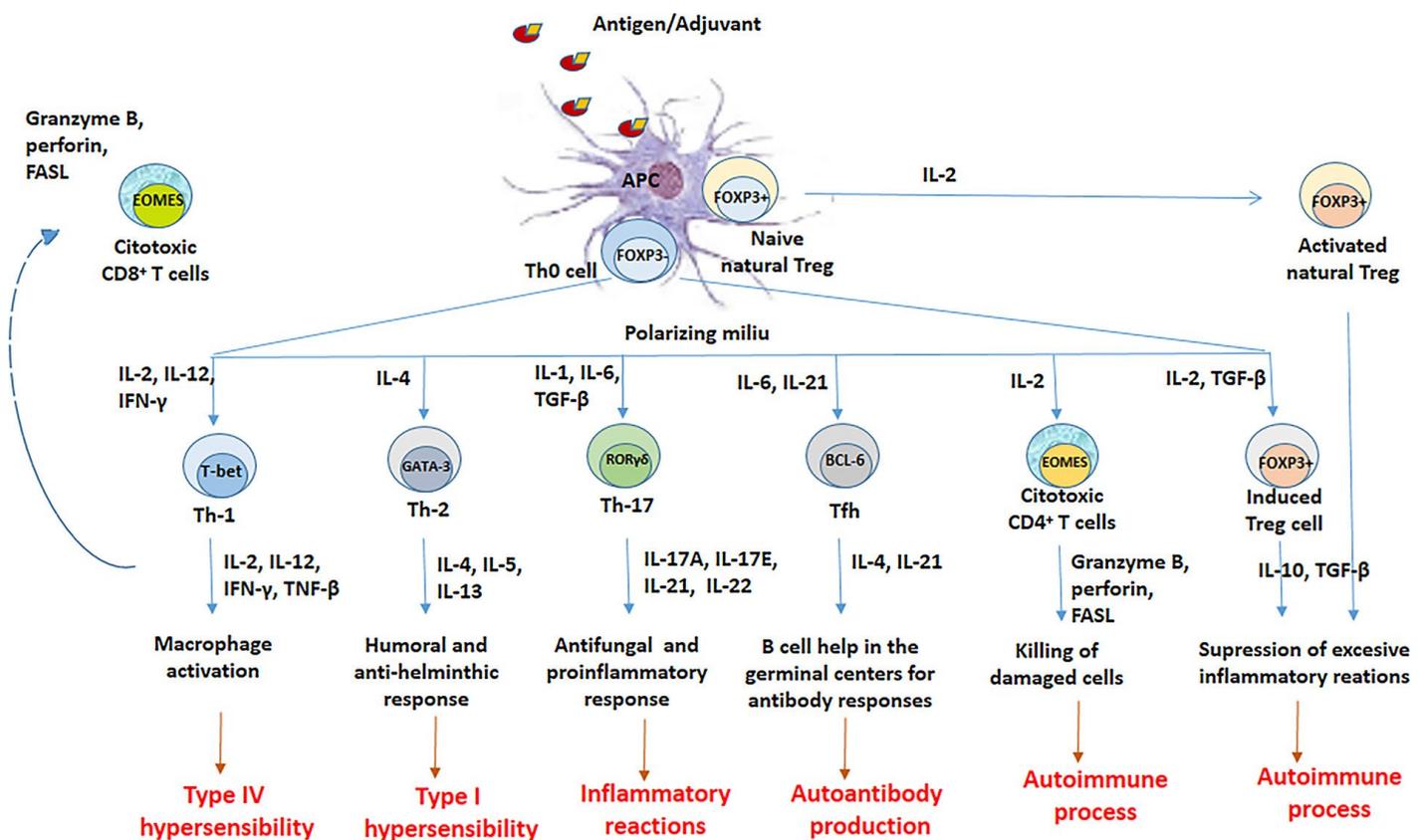
Questa reazione è stata osservata in associazione con vaccini a base di peptidi che includono allume o saponina QS-21.⁴⁵¹

La circolazione dell'antigene non legato in eccesso e il successivo cross-linking con IgE antigene-specifiche, che si legano ai mastociti cutanei precedentemente depositati in vecchi siti di immunizzazione con il successivo rilascio di istamina, è un possibile meccanismo coinvolto nell'RU.⁴⁵²

Sindrome di Nicolau (NiS):

La NiS è una rara reazione locale che può verificarsi dopo l'iniezione intramuscolare del vaccino, per inoculazione intravascolare o perivascolare accidentale, che causa vasospasmo secondario alla puntura dell'ago, embolizzazione del materiale iniettato o pressione del materiale iniettato intorno al vaso.

La NiS è caratterizzata da un'improvvisa comparsa di gonfiore doloroso, seguito da eritema liveoide, macchie emorragiche circoscritte e infine necrosi dei tessuti [35].⁴⁵³



⁴⁵⁰ Karaayvaz M, Ozanguc N. Recall urticaria: a case report. *J Allergy Clin Immunol.* 1996 Jun;97(6):1419-20. doi: 10.1016/s0091-6749(96)70215-4. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8648043/>

⁴⁵¹ Rinn K, Schiffman K, Otero HO, Disis ML. Antigen-specific recall urticaria to a peptide-based vaccine. *J Allergy Clin Immunol.* 1999 Jul;104(1):240-2. doi: 10.1016/s0091-6749(99)70143-0. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10400869/>

⁴⁵² Batista-Duarte A, Portuondo D, Carlos IZ, Pérez O. An approach to local immunotoxicity induced by adjuvanted vaccines. *Int Immunopharmacol.* 2013 Nov;17(3):526-36. doi: 10.1016/j.intimp.2013.07.025. Epub 2013 Aug 20. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23968848/>

⁴⁵³ Kienast AK, Mentze D, Hoeger PH. Nicolau's syndrome induced by intramuscular vaccinations in children: report of seven patients and review of the literature. *Clin Exp Dermatol.* 2008 Aug;33(5):555-8. doi: 10.1111/j.1365-2230.2008.02861.x. Epub 2008 Jul 9. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18627396/>

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29894962/>

Polarizzazione delle cellule T CD4 + in linee cellulari funzionalmente distinte dopo stimolazione con antigene / adiuvante e reazioni di immunotossicità associate. Dopo l'interazione antigene / adiuvante con le cellule presentanti l'antigene (APC) e la presentazione ai linfociti T naive, le cellule Treg naturali vengono attivate mentre le cellule Th0 possono essere polarizzate in diverse cellule del sottoinsieme Th. La polarizzazione delle cellule T CD4 + è determinata dalla natura dell'antigene e dell'adiuvante, dal modo di somministrazione e dal background genetico. La polarizzazione immunitaria ottimizza la risposta immunitaria ma in condizioni non regolate, possono essere indotte diverse risposte immunotossiche (evidenziate in rosso)

Reazioni acute sistemiche

Risposta in fase acuta (APR)

La risposta in fase acuta (APR) è una sindrome transitoria che riassume diversi cambiamenti endocrini, metabolici e neurologici come conseguenza di una risposta infiammatoria.

L'APR viene avviata quando le citochine pro-infiammatorie sono prodotte in livelli sufficienti da raggiungere il flusso sanguigno, provocando effetti sistemici soprattutto sull'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, fegato e sistema emolinfatico.⁴⁵⁴

Durante l'APR si osservano sintomi simil-influenzali che di solito compaiono entro poche ore dalla vaccinazione e generalmente scompaiono senza complicazioni.

I sintomi simil-influenzali consistono tipicamente in febbre moderata di 38-39 ° C, in alcuni casi superiore a 40 ° C, brividi, affaticamento, mialgia, mal di testa e nausea.⁴⁵⁵

Le citochine IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , interferone (IFN) - β , IFN- γ , prostaglandina E2 (PGE2) e diverse chemochine, agiscono come pirogeni e provocano altre reazioni a distanza.⁴⁵⁶

Questi mediatori che si riversano nella circolazione sistemica, possono accedere al cervello attraverso sistemi di trasporto saturabili, ed entrano negli organi circumventricolari attraverso i capillari fenestrati, dove inducono la produzione di prostaglandine, come la PGE2, mediatore della febbre controllata a livello centrale.⁴⁵⁷

La suscettibilità genetica può influenzare l'entità dei sintomi di tipo influenzale.

Stanley et al. hanno identificato otto aplotipi nei geni delle IL1A, IL1B, IL1R1 e IL18, associati ad un aumento o una diminuzione del rischio di sviluppare la febbre dopo l'inoculazione del vaccino contro il vaiolo⁴⁵⁸, e recentemente, è stata scoperta una significativa associazione tra polimorfismi/aplotipi a singolo nucleotide nei geni IL18R1 e IL18 e il rilascio di citochine IFN- γ nella risposta immunitaria adattativa indotta dal vaccino contro il vaiolo.⁴⁵⁹

⁴⁵⁴ Batista-Duarte A, Portuondo D, Pérez O, Carlos IZ.

Systemic immunotoxicity reactions induced by adjuvanted vaccines.

Int Immunopharmacol. 2014 May;20(1):170-80. doi: 10.1016/j.intimp.2014.02.033. Epub 2014 Mar 6.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24607449/>

⁴⁵⁵ Christian LM, Porter K, Karlsson E, Schultz-Cherry S.

Proinflammatory cytokine responses correspond with subjective side effects after influenza virus vaccination.

Vaccine. 2015 Jun 26;33(29):3360-6. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.05.008. Epub 2015 May 28.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4467994/>

⁴⁵⁶ Talaat KR, Halsey NA, Cox AB, Coles CL, Durbin AP, Ramakrishnan A, Bream JH.

Rapid changes in serum cytokines and chemokines in response to inactivated influenza vaccination.

Influenza Other Respir Viruses. 2018 Mar;12(2):202-210. doi: 10.1111/irv.12509. Epub 2018 Jan 4.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5820426/>

⁴⁵⁷ Conti B, Tabarean I, Andrei C, Bartfai T.

Cytokines and fever.

Front Biosci. 2004 May 1;9:1433-49. doi: 10.2741/1341.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14977558/>

⁴⁵⁸ Stanley SL Jr, Frey SE, Taillon-Miller P, Guo J, Miller RD, Koboldt DC, Elashoff M, Christensen R, Saccone NL, Belshe RB.

The immunogenetics of smallpox vaccination.

J Infect Dis. 2007 Jul 15;196(2):212-9. doi: 10.1086/518794. Epub 2007 Jun 4

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17570108/>

⁴⁵⁹ Ovsyannikova IG, Haralambieva IH, Kennedy RB, O'Byrne MM, Pankratz VS, Poland GA.

Genetic variation in IL18R1 and IL18 genes and Interferon γ ELISPOT response to smallpox vaccination: an unexpected relationship.

J Infect Dis. 2013 Nov 1;208(9):1422-30. doi: 10.1093/infdis/jit341. Epub 2013 Jul 30.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3789570/>

L'APR si manifesta con la produzione di proteine della fase acuta e la modificazione del metabolismo dei farmaci nel fegato.⁴⁶⁰ Gli epatociti rispondono alle citochine proinfiammatorie, principalmente attraverso l'alterazione della trascrizione genica, per aumentare la produzione di proteine della fase acuta.

Molte di queste proteine come la proteina C-reattiva, il fibrinogeno, la proteina amiloide A sierica e l'albumina aumentano nel siero dopo l'immunizzazione e possono essere utilizzate come biomarcatori dell'APR post-vaccinale.⁴⁶¹

Un altro effetto dell'APR è l'inibizione degli isoenzimi epatici del citocromo p450 (CYP450) a causa dell'immunostimolazione, coinvolta nei disturbi del metabolismo e dell'eliminazione dei farmaci somministrati in concomitanza con l'aumento della tossicità.⁴⁶²

Le citochine come IL1, IL-2, IL-6, TNF, TGF- β e IFN sono coinvolte nella modulazione dell'espressione di diverse isoforme di CYP450.⁴⁶³

Prandota ha riportato una sottoregolazione delle isoforme del CYP450 attraverso una riduzione diretta dei livelli di mRNA, del contenuto proteico e dell'attività catalitica nei ratti trattati con l'adiuvante completo di Freund e ha suggerito che i polimorfismi degli enzimi che metabolizzano il farmaco e delle citochine possono influenzare l'epatotossicità indotta dal farmaco e la farmacocinetica del farmaco in soggetti geneticamente sensibili.⁴⁶⁴

È interessante notare che esistono farmaci come il paracetamolo, la cui tossicità in caso di sovradosaggio dipende dall'integrità del CYP450 epatico e l'infiammazione può aumentarne la tossicità.⁴⁶⁵

Un altro meccanismo che può essere coinvolto nella tossicità dei farmaci dopo la vaccinazione è la riduzione dell'espressione/attività del trasportatore di farmaci mediata dall'infiammazione. IL-1 β , TNF- α e IL-6 che

⁴⁶⁰ Gribble EJ, Sivakumar PV, Ponce RA, Hughes SD.
Toxicity as a result of immunostimulation by biologics.
Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2007 Apr;3(2):209-34. doi: 10.1517/17425255.3.2.209.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17428152/>

⁴⁶¹ Green MD.
Acute Phase Responses to Novel, Investigational Vaccines in Toxicology Studies: The Relationship Between C-Reactive Protein and Other Acute Phase Proteins.
Int J Toxicol. 2015 Sep-Oct;34(5):379-83. doi: 10.1177/1091581815598750. Epub 2015 Aug 12.
<https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/1091581815598750>

⁴⁶² Levine M, Jones MW, Gribble M.
Increased serum phenytoin concentration following influenza vaccination.
Clin Pharm. 1984 Sep-Oct;3(5):505-9.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6488730/>

Renton KW, Gray JD, Hall RI.
Decreased elimination of theophylline after influenza vaccination.
Can Med Assoc J. 1980 Aug 23;123(4):288-90. PMID: 7260771
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1704744/pdf/canmedaj01464-0042.pdf>

Pellegrino P, Carnovale C, Perrone V, Salvati D, Gentili M, Brusadelli T, Pozzi M, Antoniazzi S, Clementi E, Radice S.
On the possible interaction between vaccines and drugs.
Eur J Clin Pharmacol. 2014 Mar;70(3):369-71. doi: 10.1007/s00228-013-1616-3. Epub 2013 Dec 5.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24306497/>

⁴⁶³ Renton KW.
Alteration of drug biotransformation and elimination during infection and inflammation.
harmacol Ther. 2001 Nov-Dec;92(2-3):147-63. doi: 10.1016/s0163-7258(01)00165-6.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11916535/>

⁴⁶⁴ Prandota J.
Important role of proinflammatory cytokines/other endogenous substances in drug-induced hepatotoxicity: depression of drug metabolism during infections/inflammation states, and genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes/cytokines may markedly contribute to this pathology.
Am J Ther. 2005 May-Jun;12(3):254-61.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15891270/>

⁴⁶⁵ Jaeschke H, Ramachandran A.
Mechanisms and pathophysiological significance of sterile inflammation during acetaminophen hepatotoxicity. F
ood Chem Toxicol. 2020 Apr;138:111240. doi: 10.1016/j.fct.2020.111240. Epub 2020 Mar 4.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32145352/>

vengono rilasciati durante un processo infiammatorio acuto, alterano notevolmente l'espressione profilo dei trasportatori epatici nei roditori e nell'uomo.⁴⁶⁶

Reazioni sistemiche acute non frequenti

Sindrome da perdita vascolare (VLS):

è una delle principali tossicità dose-limitanti della terapia con citochine, inclusi IL-2, IL-12, il fattore stimolante la colonia granulocita-macrofagica (GM-CSF), IL-15 e altre citochine, utilizzate nell'immunoterapia contro il cancro.⁴⁶⁷

La VLS è una grave reazione avversa per l'uso delle citochine come adiuvanti nei vaccini. Questa reazione è caratterizzata da un aumento della permeabilità vascolare con conseguente edema tissutale, aumento di peso, oliguria, ipotensione, dispnea e insufficienza multiorgano.⁴⁶⁸

Sono stati proposti diversi meccanismi per la VLS che includono l'attivazione o il danneggiamento delle cellule endoteliali e dei leucociti, il rilascio di citochine e dei mediatori dell'infiammazione (p. es., IL-1, TNF- α , componenti della cascata del complemento), la citotossicità delle cellule killer attivate dai linfociti sulle cellule endoteliali vascolari, il rilascio di perforine e le alterazioni nelle interazioni cellula-cellula, nell'adesione della matrice cellulare e nella funzione del citoscheletro con conseguente disturbo dell'integrità vascolare.⁴⁶⁹

In un altro studio, è stato riportato che la vaccinazione terapeutica che induce anticorpi contro P277 (un frammento di 24 aa della molecola HSP60 con un'azione efficace sul diabete mellito insulino-dipendente) media il danno delle cellule endoteliali e induce la VLS.⁴⁷⁰

⁴⁶⁶ Fardel O, Le Vée M.

Regulation of human hepatic drug transporter expression by pro-inflammatory cytokines.
Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2009 Dec;5(12):1469-81. doi: 10.1517/17425250903304056.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19785515/>

Cressman AM, Petrovic V, Piquette-Miller M.

Inflammation-mediated changes in drug transporter expression/activity: implications for therapeutic drug response
Expert Rev Clin Pharmacol. 2012 Jan;5(1):69-89. doi: 10.1586/ecp.11.66.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22142160/>

⁴⁶⁷ R.G. Baluna,

Cytokine-induced vascular leak syndrome, in: R.V. House, J. Descotes (Eds.), Cytokines in human health: immunotoxicology, pathology, and therapeutic applications, Humana Press, 2007, pp. Totowa, NJ, 2007, pp. 205–231. Vaccine 30 (26) (2012) 3885–3890.
<https://www.springer.com/gp/book/9781588294678>

⁴⁶⁸ Batista-Duharte A, Portuondo D, Pérez O, Carlos IZ.

Systemic immunotoxicity reactions induced by adjuvanted vaccines.
Int Immunopharmacol. 2014 May;20(1):170-80. doi: 10.1016/j.intimp.2014.02.033. Epub 2014 Mar 6.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24607449/>

Damle NK, Doyle LV.

IL-2-activated human killer lymphocytes but not their secreted products mediate increase in albumin flux across cultured endothelial monolayers. Implications for vascular leak syndrome.
J Immunol. 1989 Apr 15;142(8):2660-9.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2522965/>

⁴⁶⁹ Li J, Zhang JK.

LHRH-PE40-Induced Vascular Leak Syndrome.
Toxicol Mech Methods. 2006;16(8):473-6. doi: 10.1080/15376520600735196
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20021022/>

Baluna R, Vitetta ES.

Vascular leak syndrome: a side effect of immunotherapy.
Immunopharmacology. 1997 Oct;37(2-3):117-32. doi: 10.1016/s0162-3109(97)00041-6.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9403331/>

⁴⁷⁰ Ma YJ, Lu Y, Hou J, Dong YK, Du MZ, Xing Y, Ge CY, Xu ML, Jin L, Cao RY, Li TM, Wu J, Liu JJ.

Vaccination of non-obese diabetic mice with a fragment of peptide P277 attenuates insulin-dependent diabetes mellitus.
Int Immunopharmacol. 2011 Sep;11(9):1298-302. doi: 10.1016/j.intimp.2011.04.012. Epub 2011 Apr 28.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21530685/>

Reazioni post-vaccinali ritardate

Le reazioni post-vaccinali ritardate sono quelle che durano più di 72 h. Alcune di esse possono comparire diverse settimane, mesi o anche anni dopo la vaccinazione e possono essere osservate nel sito di inoculo o a livello sistemico.

Reazioni ritardate nel sito di inoculo

Quando gli inoculi del vaccino non vengono rimossi rapidamente nelle prime 72 h, può verificarsi un'inflammatione cronica locale a causa di una [risposta da ipersensibilità di tipo ritardato \(DTH\)](#), specialmente in un individuo già sensibilizzato.

Diverse proprietà dell'adiuvante possono favorire un effetto depot, come una scadente biodegradabilità, un'alta viscosità e granulometria. Adjuvanti, come i sali di alluminio, le emulsioni oleose, i liposomi, le microsfele di polimeri biodegradabili e i vettori attenuati, inducono tutti la persistenza dell'antigene a lungo termine nel sito di somministrazione.⁴⁷¹

Lo sviluppo di una tipica reazione DTH prevede quattro fasi.⁴⁷²

- 1) *Iniziazione*: dopo la reazione infiammatoria iniziale, i macrofagi non sono in grado di eliminare l'inoculo, manifestando una fagocitosi incompleta e fusione dei macrofagi (cellule giganti).
- 2) *Accumulo*: le cellule T CD4⁺ vengono reclutate per attivare macrofagi, cellule B ed eosinofili.
- 3) *Fase effettrice*: le cellule Th1 secernono interferone- γ (IFN- γ) e TNF- β per attivare meccanismi microbicidi, come specie reattive dell'ossigeno e ossido nitrico nei macrofagi e per migliorare il reclutamento di cellule effettrici come le natural killer e le cellule T CD8⁺.

I cambiamenti istologici includono un'area localizzata di necrosi tissutale contenente materiale estraneo che si ritiene sia costituito da componenti adjuvanti o vaccinali.

La zona centrale di materiale estraneo e necrotico è delimitata da macrofagi e cellule giganti multinucleate, con una zona periferica di linfociti e un numero variabile di plasmacellule ed eosinofili.

Questa lesione viene spesso definita granuloma da corpo estraneo,

- 4) *Risoluzione*: quando i meccanismi precedentemente menzionati non riescono ad eliminare l'inoculo, inizia un processo per prevenire l'espansione del danno tissutale e il granuloma viene circondato dalla fibrosi. Citochine come TGF- β e IL-13, sono state implicate nella fibrosi granulomatosa, prodotta da una popolazione di cellule T residenti del granuloma.

Durante la fase di risoluzione dell'infezione, avviene il rimodellamento dei tessuti, diretto dalla risposta immunitaria innata⁴⁷³

⁴⁷¹ Petrovsky N.

Comparative Safety of Vaccine Adjuvants: A Summary of Current Evidence and Future Needs. Drug Saf. 2015 Nov;38(11):1059-74. doi: 10.1007/s40264-015-0350-4. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4615573/>

Batista-Duharte A, Portuondo D, Carlos IZ, Pérez O.

An approach to local immunotoxicity induced by adjuvanted vaccines. Int Immunopharmacol. 2013 Nov;17(3):526-36. Doi: 10.1016/j.intimp.2013.07.025. Epub 2013 Aug 20. PMID: 23968848. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23968848/>

⁴⁷² Schrijvers R, Gilissen L, Chiriac AM, Demoly P.

Pathogenesis and diagnosis of delayed-type drug hypersensitivity reactions, from bedside to bench and back. Clin Transl Allergy. 2015 Sep 3;5:31. doi: 10.1186/s13601-015-0073-8. PMID: 26339470; PMCID: PMC4558726. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4558726/>

Jeffrey K. Actor,

Chapter 8 - Immune Hypersensitivities, Editor(s): Jeffrey K. Actor, Introductory Immunology (Second Edition), Academic Press, 2019, Pages 103-110, ISBN 9780128165720, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816572-0.00008-5>. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128165720000085>

Co DO, Hogan LH, Il-Kim S, Sandor M.

T cell contributions to the different phases of granuloma formation. Immunol Lett. 2004 Mar 29;92(1-2):135-42. doi: 10.1016/j.imlet.2003.11.023. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15081537/>

⁴⁷³ Micera A, Balzamino BO, Di Zazzo A, Biamonte F, Sica G, Bonini S.

Toll-Like Receptors and Tissue Remodeling: The Pro/Cons Recent Findings.

Rare reazioni locali croniche

Miofascite macrofagica (MMF):

la MMF è una reazione istopatologica locale che è stata osservata nel muscolo deltoide umano ed è associata alla persistenza a lungo termine dell'idrossido di alluminio derivato dal vaccino all'interno del muscolo.

La lesione da MMF consiste in un'infiltrazione focale dell'epimisio, del perimisio e dell'endomisio perifascicolare da fogli ben circoscritti e coesivi di grandi cellule mononucleate della linea monocita/macrofago. Queste cellule sono solitamente mescolate con una popolazione linfocitica minore e aggregati di macrofagi contenenti spicole di idrossido di alluminio.⁴⁷⁴

Tumorigenesi:

una relazione causale tra infiammazione post-vaccinale e sviluppo di diversi tipi di sarcomi, istiocitomi e linfomi cutanei nei siti di iniezione è stata segnalata in associazione a vaccini veterinari contenenti allume in cani, furetti e gatti geneticamente predisposti.⁴⁷⁵

L'esatto meccanismo della tumorigenesi indotta dal vaccino è sconosciuto, ma si ipotizza che i fibroblasti o i miofibroblasti siano stimolati dall'infiammazione locale, innescando oncogeni inattivi.⁴⁷⁶

Nell'uomo sono stati documentati rari casi di pseudolinfoma cutaneo e sottocutaneo dopo immunizzazione con vaccino antiepatite adiuvato con allume.

Studi istopatologici hanno mostrato infiltrati follicolari linfocitici dermici e ipodermici con formazione di centri germinali.

J Cell Physiol. 2016 Mar;231(3):531-44. doi: 10.1002/jcp.25124. Epub 2015 Sep 1.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26248215/>

⁴⁷⁴ Gherardi RK, Crépeaux G, Authier FJ.

Myalgia and chronic fatigue syndrome following immunization: macrophagic myofasciitis and animal studies support linkage to aluminum adjuvant persistency and diffusion in the immune system.

Autoimmun Rev. 2019 Jul;18(7):691-705. doi: 10.1016/j.autrev.2019.05.006. Epub 2019 May 4.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31059838/>

Gherardi RK, Authier FJ.

Macrophagic myofasciitis: characterization and pathophysiology.

Lupus. 2012;21(2):184-189. doi:10.1177/0961203311429557

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3623725/>

Preusse C, Goebel HH, Pehl D, Rinnenthal JL, Kley RA, Allenbach Y, Heppner FL, Vorgerd M, Authier FJ, Gherardi R, Stenzel W. Th2-M2 immunity in lesions of muscular sarcoidosis and macrophagic myofasciitis.

Neuropathol Appl Neurobiol. 2015 Dec;41(7):952-63. doi: 10.1111/nan.12231. Epub 2015 May 19. PMID: 25711697.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25711697/>

⁴⁷⁵ Roccabianca P, Avallone G, Rodriguez A, Crippa L, Lepri E, Giudice C, Caniatti M, Moore PF, Affolter VK.

Cutaneous Lymphoma at Injection Sites: Pathological, Immunophenotypical, and Molecular Characterization in 17 Cats.

Vet Pathol. 2016 Jul;53(4):823-32. doi: 10.1177/0300985815623620. Epub 2016 Mar 1.

<https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/0300985815623620>

Porcellato I, Menchetti L, Brachelente C, Sforza M, Reginato A, Lepri E, Mechelli L.

Feline Injection-Site Sarcoma.

Vet Pathol. 2017 Mar;54(2):204-211. doi: 10.1177/0300985816677148. Epub 2016 Dec 22.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28005492/>

Munday JS, Stedman NL, Richey LJ.

Histology and immunohistochemistry of seven ferret vaccination-site fibrosarcomas.

Vet Pathol. 2003 May;40(3):288-93. doi: 10.1354/vp.40-3-288.

<https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1354/vp.40-3-288>

Vascellari M, Melchiotti E, Bozza MA, Mutinelli F.

Fibrosarcomas at presumed sites of injection in dogs: characteristics and comparison with non-vaccination site fibrosarcomas and feline post-vaccinal fibrosarcomas.

J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med. 2003 Aug;50(6):286-91. doi: 10.1046/j.1439-0442.2003.00544.x.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12887620/>

⁴⁷⁶ Colotta F, Allavena P, Sica A, Garianda C, Mantovani A.

Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability.

Carcinogenesis. 2009 Jul;30(7):1073-81. doi: 10.1093/carcin/bgp127. Epub 2009 May 25.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19468060/>

I follicoli erano composti da cellule B senza atipia, mentre le cellule T CD4⁺ erano predominanti alla periferia. L'analisi molecolare ha rivelato un pattern policlonale di sottoinsiemi di cellule B e T.

La colorazione istochimica in tutti i casi, e mediante microanalisi e studi ultrastrutturali in un caso, ha identificato depositi di alluminio.

Le manifestazioni associate includevano vitiligine e stanchezza cronica con mialgia in alcuni casi.⁴⁷⁷

Reazioni sistemiche ritardate

Reazioni sistemiche ritardate indotte da adiuvanti immunologici sono state osservate in condizioni sperimentali, mentre le reazioni autoimmuni sono considerate eventi avversi rari dei vaccini umani preventivi.

Induzione o peggioramento di malattie autoimmuni

L'induzione o il peggioramento delle malattie autoimmuni è uno dei migliori esempi di reazione immunotossica per effetto combinato di adiuvante/antigene. Tuttavia, va detto che ci sono esempi di autoimmunità sperimentale indotto da adiuvanti senza alcun antigene specifico per le articolazioni.⁴⁷⁸

Altri esempi clinici come la siliconosi, l'MMF, la sindrome della guerra del Golfo e fenomeni post-vaccinazione, che fanno parte della "sindrome autoimmune/infiammatoria indotta da adiuvanti" (ASIA), evidenziano il ruolo degli adiuvanti nei meccanismi di induzione o peggioramento di malattie autoimmuni.⁴⁷⁹

In generale, una formulazione di vaccino classica può contenere tutti gli elementi necessari per innescare *de novo* o peggiorare una malattia autoimmune già esistente in individui suscettibili.⁴⁸⁰

Gli antigeni criptici nel vaccino, possono contenere epitopi mimetici con strutture del self, mentre l'adiuvante co-somministrato stimola la sovraregolazione delle molecole co-stimolatorie e delle citochine, che possono promuovere l'attivazione policlonale di linfociti autoreattivi anergici specifici e resistenti, e riattivare così il loro potenziale di innescare reazioni autoimmuni.

Inoltre, un meccanismo di diffusione dell'epitopo può verificarsi a causa del continuo danno e rilascio di auto-peptidi durante il processo infiammatorio.⁴⁸¹

⁴⁷⁷ Maubec E, Pinquier L, Viguier M, Caux F, Amsler E, Aractingi S, Chafi H, Janin A, Cayuela JM, Dubertret L, Authier FJ, Bachelez H.

Vaccination-induced cutaneous pseudolymphoma.

J Am Acad Dermatol. 2005 Apr;52(4):623-9. doi: 10.1016/j.jaad.2004.12.021.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15793512/>

Cerroni L, Borroni RG, Massone C, Chott A, Kerl H.

Cutaneous B-cell pseudolymphoma at the site of vaccination.

Am J Dermatopathol. 2007 Dec;29(6):538-42. doi: 10.1097/DAD.0b013e3181591bea.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18032948/>

⁴⁷⁸ Whitehouse MW.

Adjuvant arthritis 50 years on: The impact of the 1956 article by C. M. Pearson, 'Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants'.

Inflamm Res. 2007 Apr;56(4):133-8. doi: 10.1007/s00011-006-6117-8.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17522809/>

Whiteley PE, Dalrymple SA.

Models of inflammation: adjuvant-induced arthritis in the rat.

Curr Protoc Pharmacol. 2001 Aug;Chapter 5:Unit5.5. doi: 10.1002/0471141755.ph0505s13.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21959761/>

⁴⁷⁹ Vaccines and Autoimmunity

Editor(s): Yehuda Shoenfeld, Nancy Agmon-Levin, Lucija Tomljenovic

First published:15 May 2015 Print ISBN:9781118663431 | Online ISBN:9781118663721 | DOI:10.1002/9781118663721 2015 Wiley-Blackwell

⁴⁸⁰ Segal Y, Shoenfeld Y.

Vaccine-induced autoimmunity: the role of molecular mimicry and immune crossreaction.

Cell Mol Immunol. 2018;15(6):586-594. doi:10.1038/cmi.2017.151

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6078966/>

⁴⁸¹ Pellegrino P, Clementi E, Radice S.

On vaccine's adjuvants and autoimmunity: Current evidence and future perspectives.

Autoimmun Rev. 2015 Oct;14(10):880-8. doi: 10.1016/j.autrev.2015.05.014. Epub 2015 May 29.

Occorre però fare una chiara distinzione tra autoimmunità e malattia autoimmune. Le reazioni autoimmuni sono presenti in molti processi immunologici normali e questi eventi raramente si sviluppano in malattie cliniche grazie ai meccanismi esistenti di regolazione immunitaria.

Tuttavia, ci sono numerose segnalazioni di sospette manifestazioni cliniche autoimmuni associate ad alcuni vaccini profilattici, molte delle quali ottenute dal sistema di segnalazione degli eventi avversi al vaccino (VAERS)⁴⁸²; diversi casi però non possono essere confermati dal punto di vista epidemiologico *, il che ha creato molto dibattito e disaccordi, tanto che nel 2015 un gruppo di esperti ha concluso che non ci sono prove convincenti a sostegno dell'associazione tra l'uso di adiuvanti vaccinali e i segnali di autoimmunità, però sono stati concordi sul fatto che i futuri biomarcatori correlati alle malattie autoimmuni potrebbero aiutare a fornire una migliore comprensione e gestione del rischio nella sottopopolazione suscettibile.⁴⁸³

- * E' importante notare che i dati epidemiologici che negano il nesso di causa provengono dal confronto tra due gruppi di popolazione vaccinata, e ad oggi non sono stati svolti studi appropriati a lungo termine con una farmacovigilanza attiva con un gruppo di controllo negativo di mai vaccinati. Data l'insorgenza nel medio-lungo termine, lo studio delle malattie autoimmuni non viene mai effettuato nel corso degli studi clinici svolti per ottenere l'autorizzazione all'immissione in commercio, e nella farmacovigilanza post-marketing la sottostima della segnalazione è tale da non permettere una valutazione corretta dell'incidenza delle reazioni avverse di tipo autoimmune.

Nel caso dei vaccini terapeutici, altre osservazioni comuni mostrano che il rischio potenziale di un evento autoimmune post-vaccinale è reale.

Uno degli esempi più evidenti è lo sviluppo della vitiligine (una reazione cutanea autoimmune) in pazienti che ricevono vaccini terapeutici contro il melanoma. Fortunatamente, la vitiligine è una reazione autolimitata ed è associata ad una buona prognosi in termini di efficacia terapeutica.⁴⁸⁴

Tuttavia, altre manifestazioni di autoimmunità sistemica sono state riportate durante l'immunoterapia antitumorale con adiuvante.⁴⁸⁵

⁴⁸² Orbach H, Agmon-Levin N, Zandman-Goddard G.

Vaccines and autoimmune diseases of the adult.
Discov Med. 2010 Feb;9(45):90-7. PMID: 20193633.

<https://www.discoverymedicine.com/Hedi-Orbach/2010/02/04/vaccines-and-autoimmune-diseases-of-the-adult/>

Geier DA, Geier MR.

Quadrivalent human papillomavirus vaccine and autoimmune adverse events: a case-control assessment of the vaccine adverse event reporting system (VAERS) database.

Immunol Res. 2017;65(1):46-54. doi:10.1007/s12026-016-8815-9

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5406441/>

Geier DA, Geier MR.

A case-control study of serious autoimmune adverse events following hepatitis B immunization.

Autoimmunity. 2005 Jun;38(4):295-301. doi: 10.1080/08916930500144484. PMID: 16206512.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16206512/>

⁴⁸³ van der Laan JW, Gould S, Tanir JY;

ILSI HESI Vaccines and Adjuvants Safety Project Committee. Safety of vaccine adjuvants: focus on autoimmunity.

Vaccine. 2015 Mar 24;33(13):1507-14. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.01.073. Epub 2015 Feb 7.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X15001309?via%3Dihub>

⁴⁸⁴ Teulings HE, Limpens J, Jansen SN, Zwinderman AH, Reitsma JB, Spuls PI, Luiten RM.

Vitiligo-like depigmentation in patients with stage III-IV melanoma receiving immunotherapy and its association with survival: a systematic review and meta-analysis.

J Clin Oncol. 2015 Mar 1;33(7):773-81. doi: 10.1200/JCO.2014.57.4756. Epub 2015 Jan 20.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25605840/>

⁴⁸⁵ Gogas H, et al

Prognostic significance of autoimmunity during treatment of melanoma with interferon.

N Engl J Med. 2006 Feb 16;354(7):709-18. doi: 10.1056/NEJMoa053007. PMID: 16481638.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16481638/>

Immunotossicità embrionale

La gravidanza è uno stato immunologico complesso in cui uno spostamento verso i Th2 protegge il feto ed è importante per una gravidanza di successo, mentre il profilo delle citochine Th1 durante la gravidanza può aumentare il rischio di aborti e difetti morfologici fetali.⁴⁸⁶

Inoltre, ci sono prove che suggeriscono che le citochine proinfiammatorie aumentano il rischio di esiti neonatali sfavorevoli, indipendentemente dall'effetto diretto sul travaglio pretermine.⁴⁸⁷

Le citochine, le cellule natural killer e le cellule T gamma/delta di origine materna sembra siano coinvolte in processi come il riconoscimento fetale, lo sviluppo placentare e la regolazione dell'espressione genica durante l'organogenesi.⁴⁸⁸

Gli studi hanno rivelato che l'iniezione di alte dosi di CpG ODN, adiuvante che induce forti risposte Th1, a topine C57BL/6 gravide ha determinato un marcato aumento del riassorbimento fetale e difetti cranio-facciali/degli arti, mentre dosi più basse avevano poco o nessun effetto. L'esame istologico ha mostrato necrosi cellulare delle placente con infiammazione mista e calcificazione nello strato di spongiofoblasto e la disregolazione dello sviluppo vascolare labirintico.⁴⁸⁹

Un altro studio ha dimostrato che il riassorbimento fetale e la nascita pretermine sono indotte rapidamente nei topi dopo l'iniezione intraperitoneale di CpG nei 10°-14° giorni gestazionali.

Al contrario, topi TLR9 -/- o topi che ricevevano la somministrazione orale dell'inibitore TLR9 cloroquina erano protetti da questi effetti.⁴⁹⁰

In teoria, un vaccino adiuvato somministrato nella fase iniziale della gravidanza potrebbe influenzare lo sviluppo embriofetale attraverso il tipo Th1 immunità.⁴⁹¹

⁴⁸⁶ Raghupathy R.

Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy.
Immunol Today. 1997 Oct;18(10):478-82. doi: 10.1016/s0167-5699(97)01127-4.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9357139/>

Makhseed M, Raghupathy R, Azizieh F, Omu A, Al-Shamali E, Ashkanani L.
Th1 and Th2 cytokine profiles in recurrent aborters with successful pregnancy and with subsequent abortions.
Hum Reprod. 2001 Oct;16(10):2219-26. doi: 10.1093/humrep/16.10.2219. PMID: 11574519.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11574519/>

⁴⁸⁷ Sykes L, MacIntyre DA, Yap XJ, Ponnampalam S, Teoh TG, Bennett PR.
Changes in the Th1:Th2 cytokine bias in pregnancy and the effects of the anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandin 15-deoxy-Δ(12,14)-prostaglandin J2.
Mediators Inflamm. 2012;2012:416739. doi: 10.1155/2012/416739. Epub 2012 May 29.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3368617/>

⁴⁸⁸ Szekeres-Bartho J.
Immunological relationship between the mother and the fetus.
Int Rev Immunol. 2002 Nov-Dec;21(6):471-95. doi: 10.1080/08830180215017.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12650238/>

⁴⁸⁹ Prater MR, Johnson VJ, Germolec DR, Luster MI, Holladay SD.
Maternal treatment with a high dose of CpG ODN during gestation alters fetal craniofacial and distal limb development in C57BL/6 mice.
Vaccine. 2006 Jan 16;24(3):263-71. doi: 10.1016/j.vaccine.2005.07.105. Epub 2005 Aug 22.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16143434/>

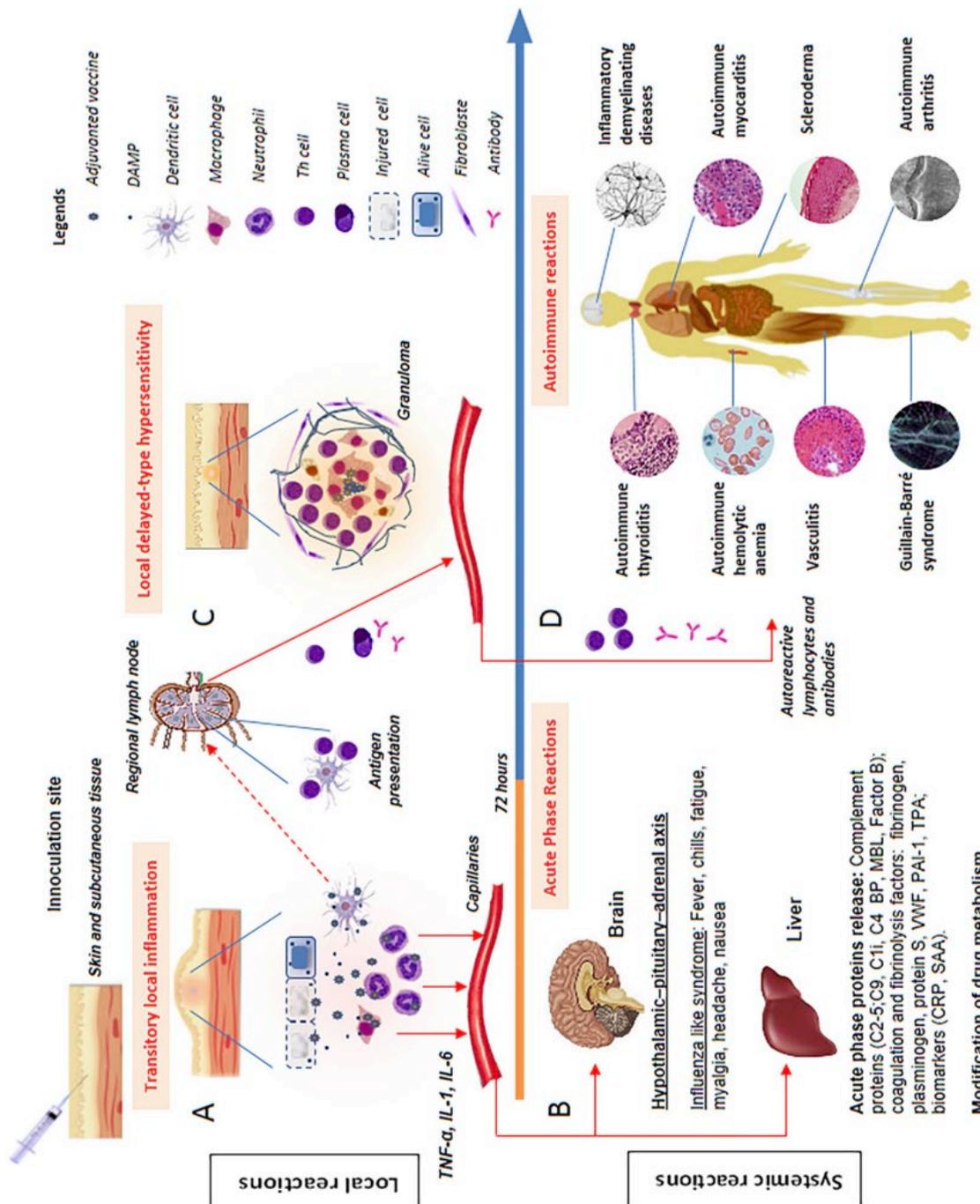
Thaxton JE, Romero R, Sharma S.
TLR9 activation coupled to IL-10 deficiency induces adverse pregnancy outcomes.
J Immunol. 2009;183(2):1144-1154. doi:10.4049/jimmunol.0900788
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2785500/>

⁴⁹⁰ Scharfe-Nugent A, Corr SC, Carpenter SB, Keogh L, Doyle B, Martin C, Fitzgerald KA, Daly S, O'Leary JJ, O'Neill LA.
TLR9 provokes inflammation in response to fetal DNA: mechanism for fetal loss in preterm birth and preeclampsia.
J Immunol. 2012 Jun 1;188(11):5706-12. doi: 10.4049/jimmunol.1103454. Epub 2012 Apr 27.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22544937/>

⁴⁹¹ Wang W, Sung N, Gilman-Sachs A, Kwak-Kim J.
T Helper (Th) Cell Profiles in Pregnancy and Recurrent Pregnancy Losses: Th1/Th2/Th9/Th17/Th22/Tfh Cells.
Front Immunol. 2020;11:2025. Published 2020 Aug 18. doi:10.3389/fimmu.2020.02025
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7461801/>

Una recente revisione degli eventi avversi dopo la vaccinazione per l'epatite B di donne in gravidanza segnalata al Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS) ha rivelato che tra 192 segnalazioni che descrivono un evento avverso, gli esiti specifici della gravidanza più comuni includevano aborto spontaneo in 23 segnalazioni, parto pretermine in 7 segnalazioni e interruzione elettiva in 5 relazioni.⁴⁹²

Nonostante i rapporti sopra descritti, ci sono poche informazioni disponibili sui danni causati allo sviluppo dall'immunosensibilità dovuta alla somministrazione di adiuvanti, quindi gli effetti teratogeni che possono derivare dall'esposizione agli adiuvanti del vaccino richiedono una particolare attenzione.



<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29894962/>

Panoramica delle reazioni immunotossiche indotte dagli adiuvanti.

A) Infiammazione locale transitoria e B) risposta in fase acuta, entrambe che si verificano durante le prime ore dopo la vaccinazione. C) Ipersensibilità locale di tipo ritardato e D) reazioni autoimmuni selezionate che si verificano dopo 72 ore dalla vaccinazione *. * Le reazioni autoimmuni dopo il vaccino profilattico umano sono considerate eventi avversi rari e la relazione di causalità in molti casi è ancora in discussione.

⁴⁹² Moro PL, Zheteyeva Y, Barash F, Lewis P, Cano M.

Assessing the safety of hepatitis B vaccination during pregnancy in the Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS), 1990-2016.

Vaccine. 2018 Jan 2;36(1):50-54. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.11.039. Epub 2017 Nov 27.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC626541/>