



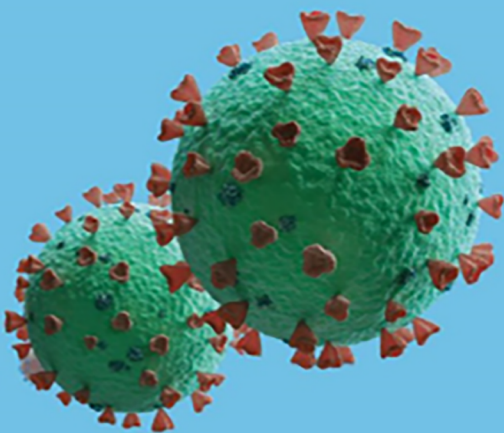
FEDERAZIONE
RINASCIMENTO
ITALIA

rinascimentoitalia.it

TOSSICOLOGIA DEI VACCINI COVID - PARTE 1

DR.SSA LORETTA BOLGAN

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



SOMMARIO

IL POTENZIAMENTO DELLA MALATTIA	4
MECCANISMO MOLECOLARE DELL'ADE.....	8
ADE tramite un'infezione potenziata	9
ADE tramite attivazione immunitaria potenziata.....	9
ADE mediato da C1q	15
ADE non canonico.....	19
Mastociti e ADE	20
IL POTENZIAMENTO DIPENDENTE DALL'ANTICORPO DA VACCINO.....	29
Valutazione del rischio di ADE per i vaccini anti-SARS-Cov-2	44
ANTICORPI E INFEZIONE VIRALE	48
Funzioni degli anticorpi di membrana e anticorpi solubili.....	48
Le classi di anticorpi.....	49
Immunoglobuline D.....	53
STUDIO DELL'ADE	54
Test sierologici per rilevare il SARS-Cov-2.....	54
Risposte anticorpali nei pazienti COVID-19.....	61
Reattività crociata e immunità eterologa	63
Test di neutralizzazione	66
TEST DI NEUTRALIZZAZIONE E COSTRUZIONE DEI VIRUS PSEUDOTIPIZZATI	73
Test ADE in vitro	78
Criticità e manipolazioni degli studi preclinici sull'ADE	79
LE CONFORMAZIONI DELLA SPIKE E ADE	80
Struttura della proteina S	80
Meccanismo d'azione della proteina S	85
Il sito di clivaggio della furina del SARS-Cov-2.....	89
NRP-1 e SARS-Cov-2.....	95
Le conformazioni "aperta" e "chiusa" della Spike	100
Epitopo ADE e vaccini a mRNA	103
SPIKE E FORMAZIONE DI SINCIZI.....	109
Sincizi e Trombosi.....	111
Sincizi e NeuroCovid	113
Sincizi e Tumori	115
Sincizi e linfopenia da COVID-19	117
Il potenziale ruolo dei sincizi nell'infezione da SARS-Cov-2.....	118
Fusione cellulare e danni cardiaci	121
Fusione cellulare e vaccini COVID-19	122
PLASMA CONVALESCENTE	125
ADE e plasma da convalescenti	131
Studi clinici italiani di efficacia del plasma da convalescenti.....	133
APPROFONDIMENTO	135
LA RISPOSTA ANTICORPALE NATURALE E VACCINALE.....	135
Generazione e caratteristiche di un anticorpo neutralizzante.....	139
Anticorpi neutralizzanti e SARS-Cov-2	144
NABs indotti da Infezioni naturali e loro ruolo protettivo	144
NABs indotti dalla vaccinazione.....	147
Confronto tra l'immunità naturale e vaccinale	147
Fattori che influenzano la produzione di NAb.....	149

IgM NATURALI	151
ANTICORPI MONOCLONALI	173
Produzione degli anticorpi monoclonali	173
Cellule CHO come produttori di mAb anti-SARS-CoV-2	178
Meccanismo d'azione e sicurezza degli anticorpi monoclonali	180
Rischi associati all'uso di anticorpi monoclonali contro il SARS-Cov-2	198
LA GLICOBIOLOGIA DELLE INFEZIONI VIRALI.....	203
Glicosilazione e sistema immunitario	223
Glicosilazione e malattie neurodegenerative.....	249
Glicosilazione e malattie da prioni.....	249
Altri fattori che inducono l'aggregazione della proteina amiloide	252
Malattie da prioni e spike del SARS-Cov-2 naturale	253
Malattie da prioni e spike del SARS-Cov-2 vaccinale.....	263
Associazione tra gruppo sanguigno e COVID-19.....	285
Stato del secretore e antigeni ABH (gene FUT2)	296
Fattore Rh (Rhesus Factor) e suscettibilità al SARS-Cov-2	297

IL POTENZIAMENTO DELLA MALATTIA

APPROFONDIMENTO

COVID-19 IL VACCINO COMPLICAZIONI RESPIRATORIE – IMMUNOPATOLOGIA

Termini chiave nel potenziamento della malattia ¹

ADE

Il potenziamento dipendente dall'anticorpo (ADE) può essere mediato dall'internalizzazione nelle cellule del sistema immunitario di un complesso virus-anticorpo associato al recettore Fc dell'anticorpo, determinando così una replicazione virale più estesa e il rilascio di citochine.

ERD

La malattia respiratoria potenziata (ERD) si manifesta con sintomi clinici più gravi dopo l'infezione da virus respiratorio, come il virus respiratorio sinciziale e il virus dell'influenza, a causa di precedenti risposte immunitarie. L'ERD di solito presenta un'infiltrazione monocitica peribronchiolare con un eccesso di eosinofili. L'ERD può verificarsi durante l'infezione da virus del sierotipo omotipico o eterotipico dopo la vaccinazione, l'infezione naturale o il trasferimento dell'immunità passiva materna.

VADE

Il potenziamento della malattia associata al vaccino (VADE) si sovrappone parzialmente all'ADE e all'ERD. Contrariamente all'ERD, il VADE riguarda solo la reazione associata al vaccino e, cosa più importante, non si limita al danno respiratorio. Ad esempio, l'infezione da virus della Dengue a sierotipo eterotipico può causare febbre emorragica da Dengue più grave negli individui vaccinati. Questo fenomeno è correlato al VADE, ma non include l'ERD. Il VADE può essere attribuito a meccanismi dipendenti dalle cellule T helper di tipo 2 e anticorpo-dipendenti.

Tutti i virus iniziano l'infezione aderendo alle cellule ospiti attraverso l'interazione tra le proteine virali e le molecole recettoriali/co-recettoriali sulle cellule bersaglio.

Come già approfondito nei documenti precedenti, ([Immunopatologia COVID-19](#) e [Complicazioni Polmonari Immunopatologia](#)) la risposta umorale dell'ospite è responsabile della generazione di anticorpi specifici per le proteine di superficie che inibiscono questa fase del ciclo di infezione, con conseguente neutralizzazione del virus; tuttavia, in alcuni casi, questi anticorpi possono paradossalmente favorire il processo infettivo nell'ambito di un fenomeno meglio noto come potenziamento anticorpo-dipendente (ADE). ²

¹ Su S, Du L, Jiang S.

Learning from the past: development of safe and effective COVID-19 vaccines. Nat Rev Microbiol. 2021;19(3):211-219. doi:10.1038/s41579-020-00462-y <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7566580/>

² Sánchez-Zuno GA, Matuz-Flores MG, González-Estevez G, et al.

A review: Antibody-dependent enhancement in COVID-19: The not so friendly side of antibodies. Int J Immunopathol Pharmacol. 2021;35:20587384211050199. doi:10.1177/20587384211050199 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8512237/>

Takada A, Kawaoka Y.

Antibody-dependent enhancement of viral infection: molecular mechanisms and in vivo implications. Rev Med Virol. 2003 Nov-Dec;13(6):387-98. doi: 10.1002/rmv.405. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14625886/>

Ajmeriya S, Kumar A, Karmakar S, Rana S, Singh H.

Neutralizing Antibodies and Antibody-Dependent Enhancement in COVID-19: A Perspective [published online ahead of print, 2022 Feb 4].

J Indian Inst Sci. 2022;1-17. doi:10.1007/s41745-021-00268-8
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8814804/>

Wang S, Wang J, Yu X, et al.

Antibody-dependent enhancement (ADE) of SARS-CoV-2 pseudoviral infection requires FcγRIIB and virus-antibody complex with bivalent interaction. *Commun Biol.* 2022;5(1):262. Published 2022 Mar 24. doi:10.1038/s42003-022-03207-0
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8948278/>

Boonnak K, Dambach KM, Donofrio GC, Tassaneeritthep B, Marovich MA.

Cell type specificity and host genetic polymorphisms influence antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J Virol.* 2011;85(4):1671-1683. doi:10.1128/JVI.00220-10
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3028884/>

Ricke DO.

Two Different Antibody-Dependent Enhancement (ADE) Risks for SARS-CoV-2 Antibodies. *Front Immunol.* 2021;12:640093. Published 2021 Feb 24. doi:10.3389/fimmu.2021.640093
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7943455/>

Maemura T, Kuroda M, Armbrust T, Yamayoshi S, Halfmann PJ, Kawaoka Y.

Antibody-Dependent Enhancement of SARS-CoV-2 Infection Is Mediated by the IgG Receptors FcγRIIA and FcγRIIIA but Does Not Contribute to Aberrant Cytokine Production by Macrophages. *mBio.* 2021 Oct 26;12(5):e0198721. doi: 10.1128/mBio.01987-21.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8546849/>

Cloutier M, Nandi M, Ihsan AU, Chamard HA, Ilangumaran S, Ramanathan S.

ADE and hyperinflammation in SARS-CoV2 infection- comparison with dengue hemorrhagic fever and feline infectious peritonitis. *Cytokine.* 2020;136:155256. doi:10.1016/j.cyto.2020.155256
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7439999/>

Coish JM, MacNeil AJ.

Out of the frying pan and into the fire? Due diligence warranted for ADE in COVID-19. *Microbes Infect.* 2020;22(9):405-406. doi:10.1016/j.micinf.2020.06.006
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7311339/>

Shukla AK, Misra S.

Antibody-dependent enhancement of virus infection and disease: implications in COVID-19. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 2022 Jan 7;33(1):13-16. doi: 10.1515/jbcpp-2021-0264.
<https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/jbcpp-2021-0264/html>

Liu L, Wei Q, Lin Q, et al.

Anti-spike IgG causes severe acute lung injury by skewing macrophage responses during acute SARS-CoV infection. *JCI Insight.* 2019;4(4):e123158. Published 2019 Feb 21. doi:10.1172/jci.insight.123158
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6478436/>

Peron JPS, Nakaya H.

Susceptibility of the Elderly to SARS-CoV-2 Infection: ACE-2 Overexpression, Shedding, and Antibody-dependent Enhancement (ADE). *Clinics (Sao Paulo).* 2020;75:e1912. doi: 10.6061/clinics/2020/e1912.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7213670/>

Okuya K, Hattori T, Saito T, et al.

Multiple Routes of Antibody-Dependent Enhancement of SARS-CoV-2 Infection. *Microbiol Spectr.* 2022;10(2):e0155321. doi:10.1128/spectrum.01553-21
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9045191/>

Farshadpour F, Taherkhani R.

Antibody-Dependent Enhancement and the Critical Pattern of COVID-19: Possibilities and Considerations. *Med Princ Pract.* 2021;30(5):422-429. doi:10.1159/000516693
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8339023/>

Clark NM, Janaka SK, Hartman W, et al.

Anti-SARS-CoV-2 IgG and IgA antibodies in COVID-19 convalescent plasma do not facilitate antibody-dependent enhance of viral infection. Preprint. *bioRxiv.* 2021;2021.09.14.460394. Published 2021 Sep 14. doi:10.1101/2021.09.14.460394
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8452094/>

Zheng J, Wang Y, Li K, Meyerholz DK, Allamargot C, Perlman S.

Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Induced Immune Activation and Death of Monocyte-Derived Human Macrophages and Dendritic Cells. *J Infect Dis.* 2021;223(5):785-795. doi:10.1093/infdis/jiaa753
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7799009/>

Bohländer F, Riehl D, Weißmüller S, Gutscher M, Schütttrumpf J, Faust S.

Immunomodulation: Immunoglobulin Preparations Suppress Hyperinflammation in a COVID-19 Model via FcγRIIA and FcαRI.

In sintesi, questo meccanismo coinvolge l'endocitosi dei complessi immunitari virus-anticorpo nelle cellule, attraverso l'interazione della regione Fc dell'anticorpo con i recettori Fc cellulari (FcR).

L'FcγRI (CD64) si lega con alta affinità alle IgG in forma monomeriche, mentre FcγRII (CD32) e FcγRIII (CD16) lo fanno con bassa affinità e sono attivati da immunocomplessi.³ Sebbene l'ADE sia principalmente mediato dagli anticorpi IgG, anche le IgM insieme al complemento e gli anticorpi IgA sono stati descritti come capaci di mediare l'ADE.⁴

Il fenomeno dell'ADE è un evento che si verifica per alcuni virus, dove anticorpi preesistenti non neutralizzanti o sub-neutralizzanti delle proteine di superficie virali che si sono generati durante una precedente infezione, possono intensificare il processo infiammatorio durante un'infezione secondaria con qualsiasi virus correlato all'antigene originale, favorendone l'ingresso nella cellula.⁵

Front Immunol. 2021;12:700429. Published 2021 Jun 10. doi:10.3389/fimmu.2021.700429
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8223875/>

Bastug, A., Bodur, H.

SARS-CoV-2 Infection and Antibody-Dependent Enhancement. In: Nayak, J., Naik, B., Abraham, A. (eds) Understanding COVID-19: The Role of Computational Intelligence.

Studies in Computational Intelligence, (2022) vol 963. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-74761-9_5
https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-74761-9_5

Antoine Danchin, Oriane Pagani-Azizi, Gabriel Turinici, Ghazlane Yahiaoui

COVID-19 adaptive humoral immunity models: weakly neutralizing versus antibody-disease enhancement scenarios

medRxiv 2020.10.21.20216713; doi:<https://doi.org/10.1101/2020.10.21.20216713>

<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.10.21.20216713v2.full.pdf>

Bahnan W, et al

Spike-Dependent Opsonization Indicates Both Dose-Dependent Inhibition of Phagocytosis and That Non-Neutralizing Antibodies Can Confer Protection to SARS-CoV-2.

Front Immunol. 2022 Jan 14;12:808932. doi: 10.3389/fimmu.2021.808932.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8796240/>

Bachmann MF, Mohsen MO, Zha L, Vogel M, Speiser DE.

SARS-CoV-2 structural features may explain limited neutralizing-antibody responses.

NPJ Vaccines. 2021 Jan 4;6(1):2. doi: 10.1038/s41541-020-00264-6.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7782831/>

Li D, et al

In vitro and in vivo functions of SARS-CoV-2 infection-enhancing and neutralizing antibodies.

Cell. 2021 Aug 5;184(16):4203-4219.e32. doi: 10.1016/j.cell.2021.06.021.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8232969/>

Jane M. Orient

Negative Evidence: Antibody-Dependent Enhancement

Journal of American Physicians and Surgeons Volume 27 Number 1 Spring 2022

<https://jpands.org/vol27no1/orient.pdf>

³ Cloutier M, Nandi M, Ihsan AU, Chamard HA, Ilangumaran S, Ramanathan S.

ADE and hyperinflammation in SARS-CoV2 infection- comparison with dengue hemorrhagic fever and feline infectious peritonitis.

Cytokine. 2020;136:155256. doi:10.1016/j.cyto.2020.155256

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7439999/>

⁴ Kulkarni R.

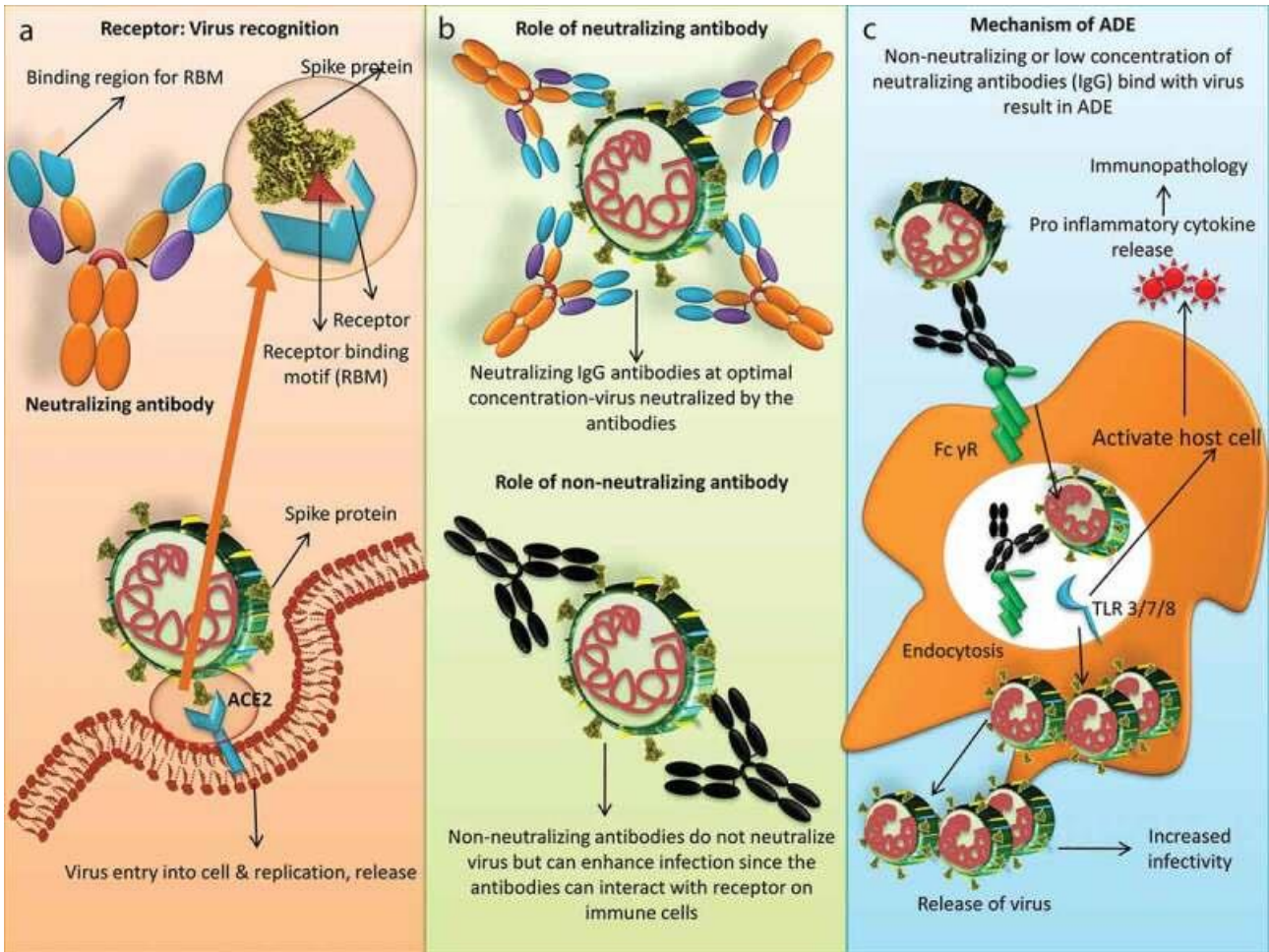
Antibody-dependent enhancement of viral infections. In: Bramhachari PV. (ed) Dynamics of Immune Activation in Viral Diseases. Singapore: Springer Singapore. (2020) pp. 9–41. ISBN 9789811510441.

⁵ Wen J, Cheng Y, Ling R, et al.

Antibody-dependent enhancement of coronavirus.

Int J Infect Dis. 2020;100:483-489. doi:10.1016/j.ijid.2020.09.015

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7483033/>



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7484565/>

Ruolo degli anticorpi neutralizzanti e non neutralizzanti nell'infezione virale e meccanismo dell'ADE nella SARS-CoV-2. **(a)** La proteina Spike di SARS-CoV-2 si lega al recettore dell'enzima di conversione dell'angiotensina 2 (ACE2) e inizia la replicazione. ACE2 riconosce il motivo di legame del recettore sulla proteina spike e lo stesso motivo di legame del recettore (RBM) è riconosciuto dagli anticorpi. **(b)** Gli anticorpi neutralizzanti alla concentrazione ottimale neutralizzano il virus mentre gli anticorpi non neutralizzanti possono aumentare l'infezione. **(c)** Meccanismo dell'ADE per il SARS-CoV-2. Il complesso virus-anticorpo (neutralizzante o non neutralizzante) si lega al recettore Fcγ sulle cellule immunitarie di superficie come monociti o macrofagi portando all'ingresso del virus senza l'uso del recettore ACE2. Ciò porta a una maggiore replicazione e rilascio dei virus. Il legame virus-anticorpo a FcγR può anche indurre una risposta proinfiammatoria. L'RNA virale negli endosomi segnala attraverso il recettore Toll-like 3 (TLR3), TLR7 o TLR8 attivando nella cellula ospite il rilascio di citochine proinfiammatorie che portano all'immunopatologia

L'ADE è stato descritto per la prima volta nel 1964 da Hawkes, il quale ha dimostrato una maggiore infettività *in vitro* di vari arbovirus come il virus dell'encefalite giapponese, il virus del Nilo occidentale, il virus dell'encefalite della Murray Valley e il virus Getah.⁶

Precedenti reports ipotizzavano già che anticorpi non neutralizzanti preesistenti fossero responsabili dell'aumento dell'infezione anche con vari virus umani e animali, inclusi il virus dengue (DENV), Zika (ZIKV), Ebola, dell'immunodeficienza umana (HIV), il parvovirus della malattia del visone delle Aleutine, il virus Coxsackie B, dell'anemia infettiva equina, della peritonite infettiva felina, della febbre emorragica delle scimmie, dell'artrite delle capre, della sindrome respiratoria e riproduttiva suina (PRRSV) e della peste suina africana.⁷

⁶ Karthik K, Senthilkumar TMA, Udhayavel S, Raj GD.

Role of antibody-dependent enhancement (ADE) in the virulence of SARS-CoV-2 and its mitigation strategies for the development of vaccines and immunotherapies to counter COVID-19.

Hum Vaccin Immunother. 2020;16(12):3055-3060. doi:10.1080/21645515.2020.1796425

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7484565/>

⁷ Khandia R, Munjal A, Dhama K, et al.

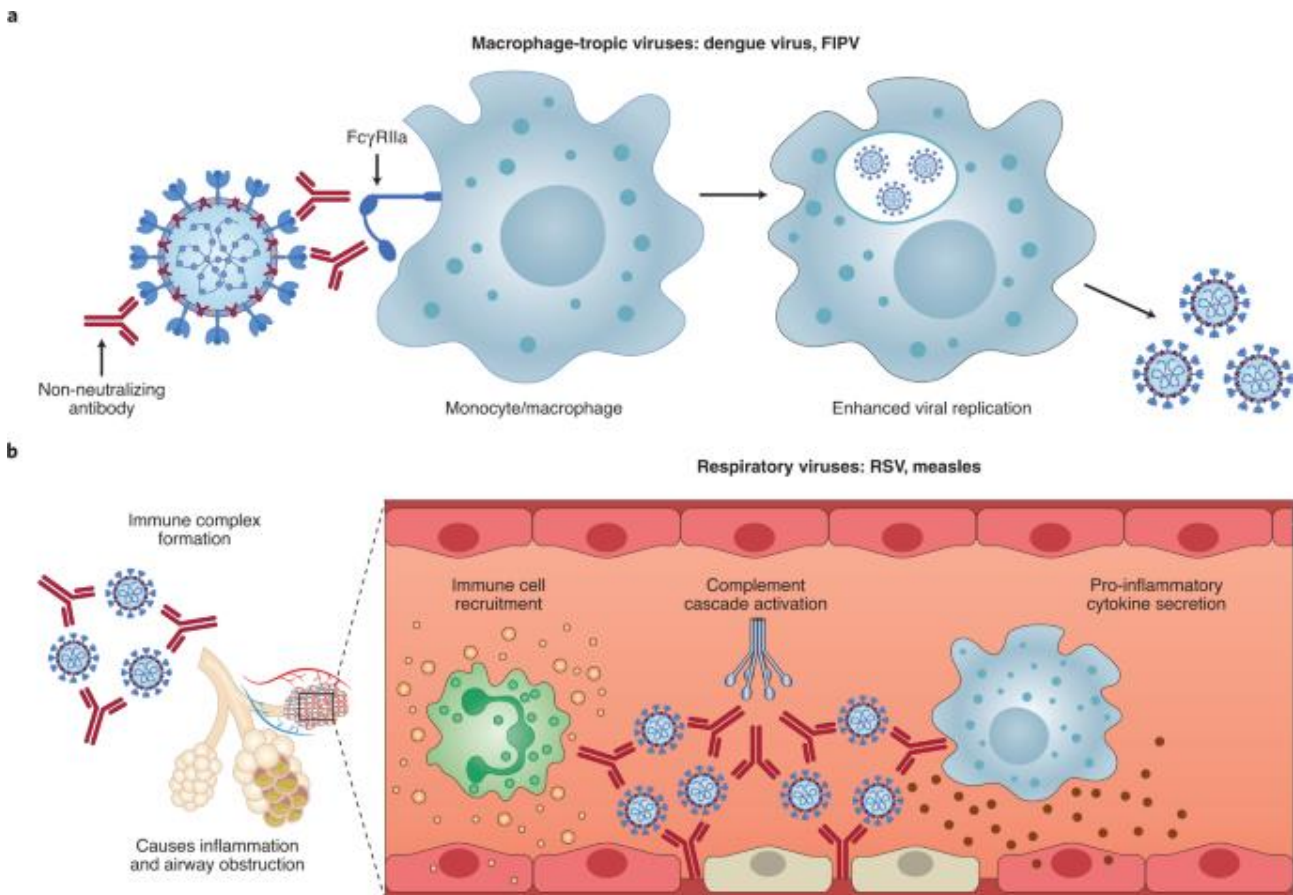
Modulation of Dengue/Zika Virus Pathogenicity by Antibody-Dependent Enhancement and Strategies to Protect Against Enhancement in Zika Virus Infection.

MECCANISMO MOLECOLARE DELL'ADE

È stato documentato che l'ADE si verifica attraverso due meccanismi distinti:

- 1- mediante un maggiore assorbimento del virus nelle cellule fagocitiche che esprimono il recettore Fc gamma IIa (FcγRIIa) con un aumento dell'infezione virale e della replicazione
- 2- mediante la formazione di immunocomplessi che causano una maggiore infiammazione e immunopatologia.

Sebbene questi meccanismi non si escludano a vicenda, la loro classificazione è stata proposta per comprendere il processo biologico a livello molecolare.⁸



Front Immunol. 2018;9:597. Published 2018 Apr 23. doi:10.3389/fimmu.2018.00597
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5925603/>

⁸ Lee WS, Wheatley AK, Kent SJ, DeKosky BJ. Antibody-dependent enhancement and SARS-CoV-2 vaccines and therapies. Nat Microbiol. 2020 Oct;5(10):1185-1191. doi: 10.1038/s41564-020-00789-5. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32908214/>

Hussman JP. Severe Clinical Worsening in COVID-19 and Potential Mechanisms of Immune-Enhanced Disease. Front Med (Lausanne). 2021;8:637642. Published 2021 Jun 22. doi:10.3389/fmed.2021.637642 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8258105/>

Xu L, Ma Z, Li Y, Pang Z, Xiao S. Antibody dependent enhancement: Unavoidable problems in vaccine development. Adv Immunol. 2021;151:99-133. doi:10.1016/bs.ai.2021.08.003 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8438590/>

<https://www.nature.com/articles/s41564-020-00789-5>

a) Per i virus macrofago-tropici come il virus dengue e l'FIPV, gli anticorpi non neutralizzanti o sub-neutralizzanti causano un aumento dell'infezione virale di monociti o macrofagi tramite l'endocitosi mediata da FcγRIIIa, con conseguente malattia più grave. **B)** Per i virus respiratori non macrofagici come RSV e morbillo, gli anticorpi non neutralizzanti possono formare immunocomplessi con antigeni virali all'interno dei tessuti delle vie aeree, con conseguente secrezione di citochine pro-infiammatorie, reclutamento di cellule immunitarie e attivazione della cascata del complemento all'interno del tessuto polmonare. L'infiammazione che ne deriva può portare all'ostruzione delle vie aeree e nei casi più gravi può causare la sindrome da distress respiratorio acuto. Gli studi di immunopatologia COVID-19 sono ancora in corso e gli ultimi dati disponibili suggeriscono che l'infezione dei macrofagi umani da SARS-CoV-2 è improduttiva. Le prove esistenti suggeriscono che la formazione di immunocomplessi, la deposizione del complemento e l'attivazione immunitaria locale presentano i meccanismi ADE più probabili nell'immunopatologia COVID-19.

ADE tramite un'infezione potenziata

Come già accennato, gli FcR sono espressi principalmente dalle cellule immunitarie e sono recettori per la porzione Fc di un anticorpo.

Nell'ADE mediato da un'infezione potenziata, gli anticorpi non neutralizzanti o sub-neutralizzanti si legano alla superficie virale formando un immunocomplesso che viene internalizzato dalle cellule portatrici del recettore Fc, inclusi monociti/macrofagi e cellule dendritiche, e inducono l'attivazione della cascata del segnale per la fagocitosi mediata da FcγR, la quale determina di conseguenza un aumento del carico virale e della gravità della malattia.⁹

È importante sottolineare che l'attivazione dei recettori Fc innesca una cascata del segnale che induce anche l'espressione del gene stimolato dall'IFN (ISG) con potenti effetti antivirali, e i virus devono sopprimere queste risposte antivirali nelle cellule bersaglio affinché si verifichi l'ADE, con meccanismi che verranno dettagliati in seguito.¹⁰

ADE tramite attivazione immunitaria potenziata

Il secondo meccanismo, recentemente descritto e meno studiato, attraverso il quale può verificarsi l'ADE, è ben rappresentato dai patogeni che causano infezioni respiratorie. In queste condizioni, le funzioni effettrici degli anticorpi mediate da Fc sono in grado di avviare una forte cascata immunitaria che si traduce in una grave patologia polmonare.⁸

Questo meccanismo può essere indotto anche quando i complessi virus-anticorpo-C1q si legano al recettore C1q presente sulle cellule e viene innescata la via classica del complemento che porta all'attivazione di C3 e alla successiva endocitosi.¹¹

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8512237/>

Fenomeno ADE. **(a)** Il meccanismo convenzionale di infezione da SARS-CoV 2 consiste nel legame della sua proteina S al recettore cellulare ACE2. Dopo l'unione del virus SARS-CoV-2 al recettore, si verifica un cambiamento conformazionale nella proteina S necessaria per la fusione dell'involucro virale con la membrana cellulare per la successiva endocitosi. Successivamente, SARS-CoV-2 rilascia il suo materiale genetico nella cellula ospite. L'RNA del genoma virale viene quindi tradotto in proteine necessarie per il successivo assemblaggio dei virioni nel RE e nel Golgi. Questi virioni vengono quindi trasportati attraverso le vescicole all'esterno della cellula mediante esocitosi. Il fenomeno ADE può essere classificato in due diversi meccanismi: ADE attraverso un potenziamento dell'infezione e ADE attraverso un potenziamento dell'attivazione immunitaria. **(b)** Nell'ADE a causa del potenziamento dell'infezione, gli anticorpi di natura non neutralizzante o sub-neutralizzante causano un'infezione virale attraverso l'endocitosi mediata da FcγRIIIa, determinando un fenotipo di malattia più grave. **(c)** Nell'ADE attraverso l'attivazione immunitaria potenziata, gli anticorpi non neutralizzanti possono formare immunocomplessi con antigeni virali all'interno dei tessuti delle vie aeree, con conseguente secrezione di citochine pro-infiammatorie, reclutamento di cellule immunitarie e attivazione della cascata del complemento all'interno del tessuto polmonare. ADE, potenziamento anticorpo-dipendente; ACE2, enzima di conversione dell'angiotensina 2; CR, recettore del complemento; ER, reticolo endoplasmatico;

⁹ Gan ES, Ting DH, Chan KR.

The mechanistic role of antibodies to dengue virus in protection and disease pathogenesis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2017 Feb;15(2):111-119. doi: 10.1080/14787210.2017.1254550. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27796143/>

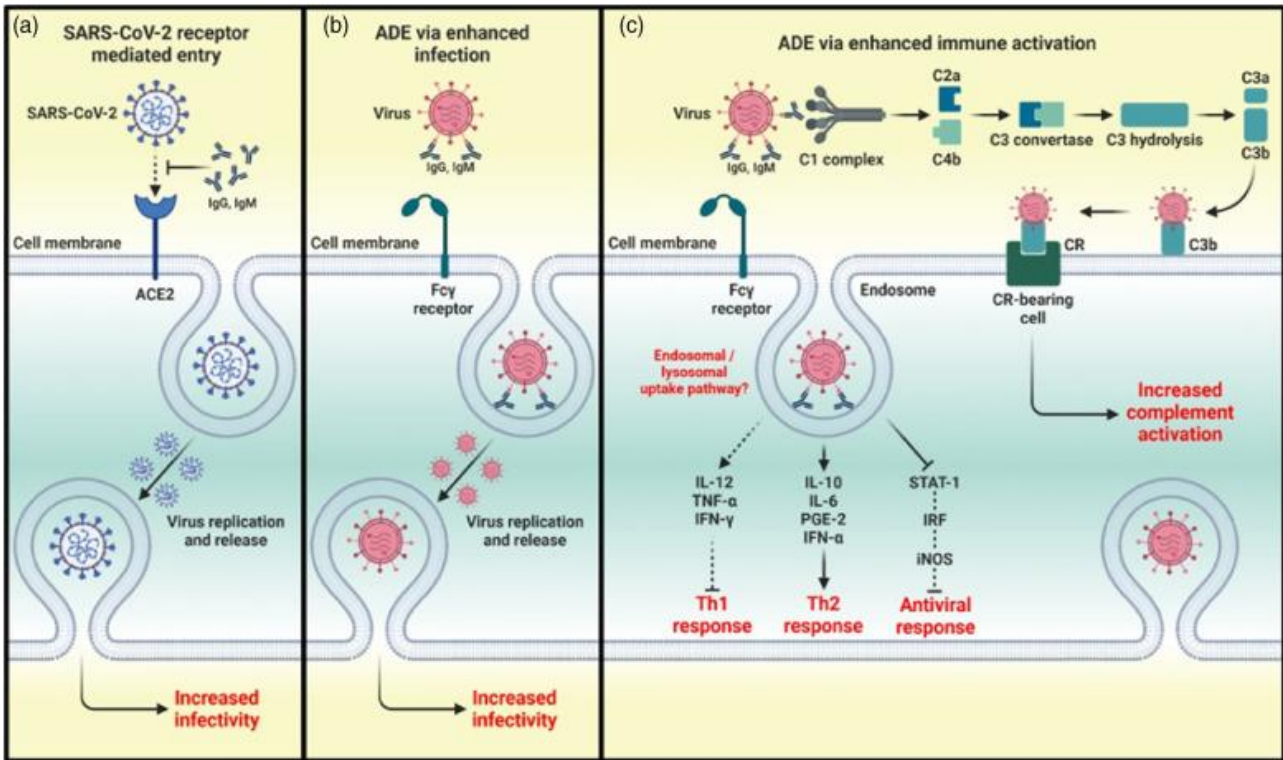
¹⁰ Langerak T, Mumtaz N, Tolk VI, et al.

The possible role of cross-reactive dengue virus antibodies in Zika virus pathogenesis. *PLoS Pathog.* 2019;15(4):e1007640. doi:10.1371/journal.ppat.1007640 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6472811/>

¹¹ Comas-Garcia M.

Packaging of Genomic RNA in Positive-Sense Single-Stranded RNA Viruses: A Complex Story. *Viruses.* 2019;11(3):253. Published 2019 Mar 13. doi:10.3390/v11030253 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6466141/>

FcγRIIIa, Fc γ recettore IIa; IFN-α, interferone α; IL, interleuchina; IRF, fattori regolatori dell'interferone; iNOS, ossido nitrico sintasi inducibile; PGE2, prostaglandina E2, RNA, acido ribonucleico; TNF-α, fattore di necrosi tumorale.



Anche per i coronavirus e virus della famiglia della SARS, quando si sviluppa l’ADE, gli anticorpi IgG virus-specifici formano complessi instabili con il virus, e dopo il legame ai recettori FcγRII espressi da alcune cellule immunitarie¹² facilitano l'infezione delle cellule stesse¹³. In particolare, è stato dimostrato per SARS-CoV-1 che gli anticorpi della proteina S specifici del virus possono facilitare l'ingresso del virus nelle cellule B¹⁴ e nei

¹² 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/>

¹³ Tirado SM, Yoon KJ. Antibody-dependent enhancement of virus infection and disease. *Viral Immunol.* 2003;16(1):69-86. doi: 10.1089/088282403763635465. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12725690/>

Yip MS, Leung NH, Cheung CY, et al. Antibody-dependent infection of human macrophages by severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Virology.* 2014;11:82. Published 2014 May 6. doi:10.1186/1743-422X-11-82 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4018502/>

Li L, Wo J, Shao J, et al. SARS-coronavirus replicates in mononuclear cells of peripheral blood (PBMCs) from SARS patients. *J Clin Virol.* 2003;28(3):239-244. doi:10.1016/s1386-6532(03)00195-1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7128964/>

Yilla M, Harcourt BH, Hickman CJ, et al. SARS-coronavirus replication in human peripheral monocytes/macrophages. *Virus Res.* 2005;107(1):93-101. doi:10.1016/j.virusres.2004.09.004 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7114182/>

¹⁴ Kam YW, Kien F, Roberts A, et al. Antibodies against trimeric S glycoprotein protect hamsters against SARS-CoV challenge despite their capacity to mediate FcγRIII-dependent entry into B cells in vitro. *Vaccine.* 2007;25(4):729-740. doi:10.1016/j.vaccine.2006.08.011

macrofagi¹⁵, mentre il SARS-Cov-2 può infettare cellule umane primarie T CD4⁺¹⁶ e altre cellule CD32⁺ (che includono monociti, macrofagi, alcuni tipi di cellule B e di cellule dendritiche).¹⁷

Secondo alcuni ricercatori, monociti e macrofagi svolgono un ruolo chiave nel processo infiammatorio acuto che si verifica in alcuni pazienti COVID-19¹⁸ e la preoccupazione per il potenziale coinvolgimento dell'ADE nella patogenesi di COVID-19 è stata evidenziata in varie ricerche¹⁹.

È plausibile che l'inizio della replicazione della SARS-CoV-2 nelle cellule immunitarie sia un passo fondamentale nello sviluppo della malattia e nella sua evoluzione da forma lieve a grave.²⁰

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7115629/>

¹⁵ Yip MS, Leung HL, Li PH, Cheung CY, Dutry I, Li D, Daëron M, Bruzzone R, Peiris JS, Jaume M. Antibody-dependent enhancement of SARS coronavirus infection and its role in the pathogenesis of SARS. *Hong Kong Med J.* 2016 Jun;22(3 Suppl 4):25-31. <https://www.hkmj.org/system/files/hkm1603sp4p25.pdf>

¹⁶ Banerjee A, Nasir JA, Budyłowski P, et al. Isolation, Sequence, Infectivity, and Replication Kinetics of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. *Emerg Infect Dis.* 2020;26(9):2054-2063. doi:10.3201/eid2609.201495 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7454076/>

¹⁷ Pontelli MC, Castro IA, Martins RB, et al. Infection of human lymphomononuclear cells by SARS-CoV-2. *bioRxiv*; 2020. DOI: 10.1101/2020.07.28.225912. <https://europepmc.org/article/ppr/ppr193957>

Junqueira C, et al
FcγR-mediated SARS-CoV-2 infection of monocytes activates inflammation. *Nature.* 2022 Apr 6. doi: 10.1038/s41586-022-04702-4. <https://www.nature.com/articles/s41586-022-04702-4>

Sefik E, et al
Inflammasome activation in infected macrophages drives COVID-19 pathology. *bioRxiv [Preprint]*. 2022 Apr 1:2021.09.27.461948. doi: 10.1101/2021.09.27.461948. Update in: *Nature.* 2022 Apr 28 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8491846/> <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.09.27.461948v2.full.pdf>

Junqueira C, Crespo A, Ranjbar S, et al.
SARS-CoV-2 infects blood monocytes to activate NLRP3 and AIM2 inflammasomes, pyroptosis and cytokine release. *Preprint. Res Sq.* 2021;rs.3.rs-153628. Published 2021 Aug 11. doi:10.21203/rs.3.rs-153628/v1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8366805/>

Mallapaty S.
What triggers severe COVID? Infected immune cells hold clues. *Nature.* 2022 Apr;604(7905):231. doi: 10.1038/d41586-022-00965-z. <https://www.nature.com/articles/d41586-022-00965-z>

¹⁸ Merad M, Martin JC.
Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. *Nat Rev Immunol.* 2020 Jun;20(6):355-362. doi: 10.1038/s41577-020-0331-4. Epub 2020 May 6. Erratum in: *Nat Rev Immunol.* 2020 Jun 2 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7201395/>

¹⁹ Tetro JA.
Is COVID-19 receiving ADE from other coronaviruses? *Microbes Infect.* 2020 Mar;22(2):72-73. doi: 10.1016/j.micinf.2020.02.006. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7102551/>

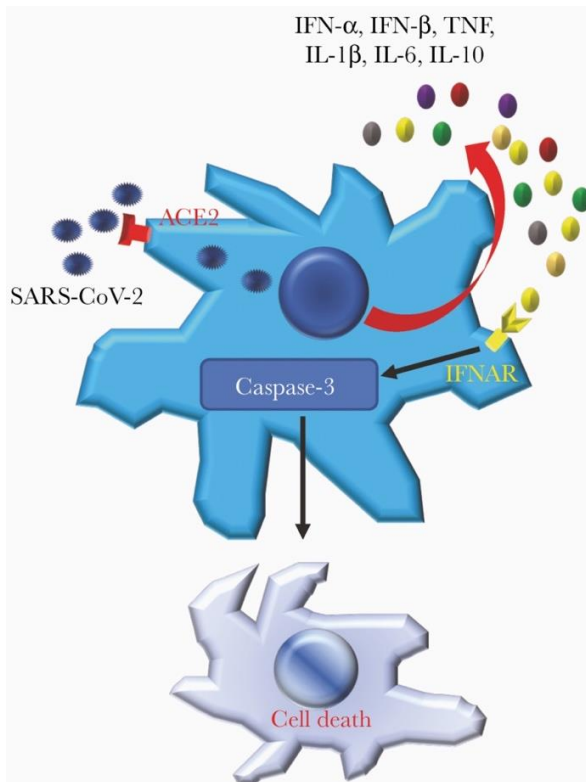
Iwasaki A, Yang Y.
The potential danger of suboptimal antibody responses in COVID-19. *Nat Rev Immunol.* 2020 Jun;20(6):339-341. doi: 10.1038/s41577-020-0321-6. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7187142/>

²⁰ Pontelli MC, et al
SARS-CoV-2 productively infects primary human immune system cells in vitro and in COVID-19 patients. *J Mol Cell Biol.* 2022 Apr 22:mjac021. doi: 10.1093/jmcb/mjac021. <https://academic.oup.com/jmcb/advance-article/doi/10.1093/jmcb/mjac021/6572370>

Nicole L. et al
SARS-CoV-2 infection of circulating immune cells is not responsible for virus dissemination in severe COVID-19 patients *bioRxiv* 2021.01.19.427282; doi: <https://doi.org/10.1101/2021.01.19.427282>

L'ADE può spiegare la disregolazione osservata del sistema immunitario, inclusa l'apoptosi in massa delle cellule immunitarie, nonché lo sviluppo della tempesta di citochine in alcuni pazienti.

La replicazione del SARS-CoV-2 nella cellula immunitaria può essere abortiva, cioè senza la produzione di virioni vitali (in grado di replicarsi).²¹ In questo caso l'infezione debole a basso titolo o non produttiva delle cellule immunitarie non è mediata da anticorpi e quindi non è associata ad ADE, ma dipende dal legame ACE2-proteina spike, il quale porta ugualmente alla morte in massa delle cellule immunitarie, alla cascata infiammatoria e infine alla tempesta di citochine.²²



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7799009/>

In questo studio, utilizzando macrofagi derivati da monociti circolanti umani (MDM) e cellule dendritiche derivate da monociti (MDDC), gli autori hanno dimostrato che SARS-CoV-2 infettava in maniera abortiva entrambi i tipi di cellule in maniera ACE2-dipendente. L'infezione abortiva ha indotto l'espressione di livelli più elevati di citochine e chemochine (interferone [IFN]-α, TNF, IL-6, IL-8, IL-10 e CXCL-10), portando alla morte cellulare mediata da IFN di tipo I. Rispetto a SARS-CoV, SARS-CoV-2 ha indotto livelli elevati della maggior parte delle citochine e delle chemochine e più morte cellulare. IFNAR: anti alpha/beta interferon receptor antibody

Nei monociti o i macrofagi che presentano il recettore Fc (CD32⁺), il virus internalizzato in un complesso stabile con gli anticorpi, non può sfuggire e di solito viene distrutto. L'eliminazione del virus promuove il recupero dell'ospite, come mostrato sul lato sinistro della figura seguente. Invece, nel caso dell'ADE, il virus si libera dal complesso meno stabile con l'anticorpo e avvia il ciclo replicativo all'interno della cellula immunitaria, come mostrato nel lato destro della figura.²³

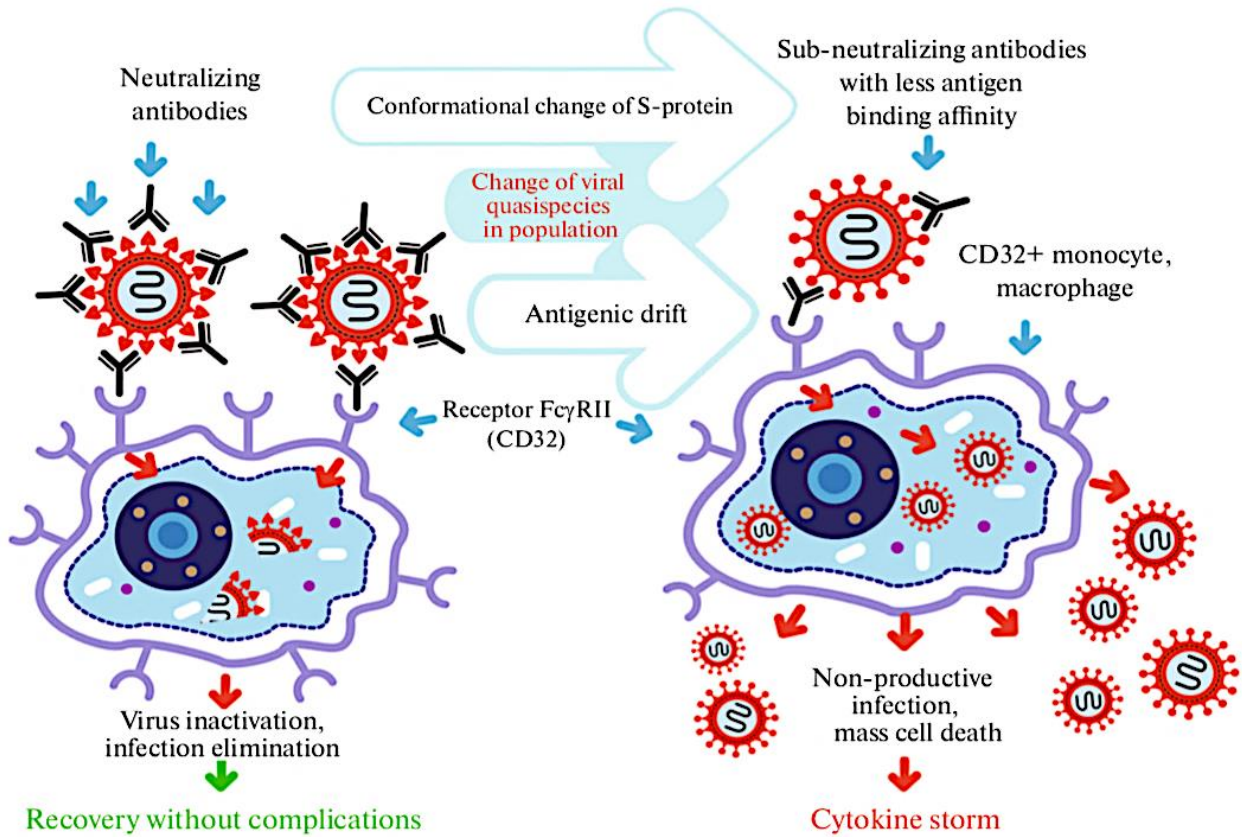
<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.01.19.427282v1.full.pdf>

Junqueira, C., Crespo, Â., Ranjbar, S. et al.
FcγR-mediated SARS-CoV-2 infection of monocytes activates inflammation.
Nature (2022). <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04702-4>
<https://www.nature.com/articles/s41586-022-04702-4>

²¹ Boumaza A, Gay L, Mezouar S, Bestion E, Diallo AB, Michel M, Desnues B, Raoult D, La Scola B, Halfon P, Vitte J, Olive D, Mege JL.
Monocytes and macrophages, targets of SARS-CoV-2: the clue for Covid-19 immunoparalysis.
J Infect Dis. 2021 Jan 25;jjab044. doi: 10.1093/infdis/jjab044.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7928817/pdf/jjab044.pdf>

²² Zheng J, Wang Y, Li K, Meyerholz DK, Allamargot C, Perlman S.
Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Induced Immune Activation and Death of Monocyte-Derived Human Macrophages and Dendritic Cells.
J Infect Dis. 2021 Mar 3;223(5):785-795. doi: 10.1093/infdis/jiaa753.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7799009/>

²³ Zaichuk TA, Nepochurenko YD, Adzhubey AA, Onikienko SB, Chereshev VA, Zainutdinov SS, Kochneva GV, Netesov SV, Matveeva OV.
The Challenges of Vaccine Development against Betacoronaviruses: Antibody Dependent Enhancement and Sendai Virus as a Possible Vaccine Vector.
Mol Biol. 2020 Sep 4;1-15. doi: 10.1134/S0026893320060151.



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7473411/>

Schema di potenziamento dell'infezione dipendente da anticorpi (ADE) per SARS-CoV-1. **A sinistra**, viene mostrato uno scenario della corretta risposta immunitaria, quando specifici anticorpi neutralizzanti e protettivi contribuiscono all'eliminazione del virus dall'organismo. Secondo questo scenario i virus vengono fagocitati come complessi antigene-anticorpo stabili e distrutti dai macrofagi o da altre cellule immunitarie. **Sulla destra** c'è uno scenario immunopatologico che si verifica quando l'antigene del virus cambia e, a causa di questo cambiamento, gli anticorpi IgG formano complessi imperfetti con il virus. Il complesso instabile anticorpo-virus si lega al recettore FcγRII delle cellule immunitarie e viene assorbito da queste cellule. Inoltre, all'interno della cellula, il virus lascia l'endosoma, già privo dell'anticorpo, e inizia il ciclo replicativo.

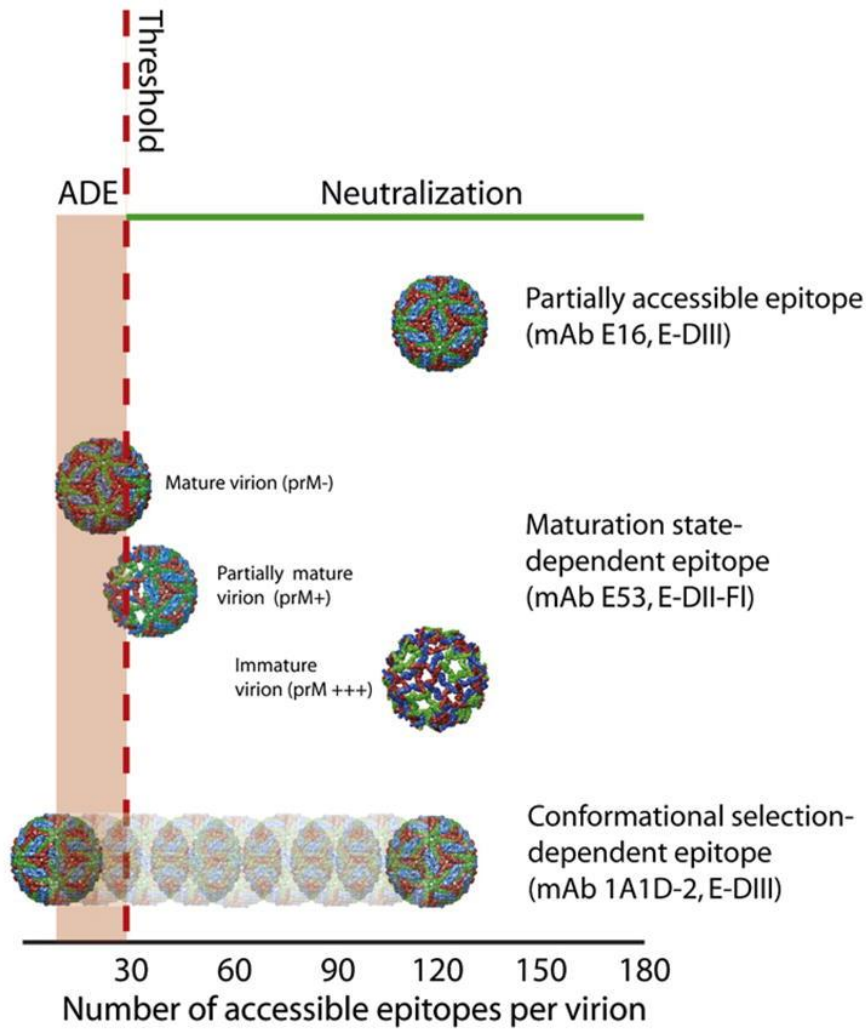
Nel modello di neutralizzazione "a eventi multipli" (*multiple-hit hypothesis*), il blocco del virus è correlato al numero di anticorpi che rivestono il virione, il quale è influenzato dalla concentrazione e dall'affinità dell'anticorpo.

Per una data concentrazione di anticorpo e uno specifico dominio di legame, la stechiometria del reclutamento degli anticorpi su un virione dipende dalla forza dell'interazione tra anticorpo e antigene. Secondo questa teoria, l'ADE è indotto quando la stechiometria è al di sotto della soglia di neutralizzazione. Pertanto, gli anticorpi ad affinità più elevata possono raggiungere la soglia a una concentrazione inferiore e mediare una risposta protettiva migliore.²⁴

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7473411/>

Nechipurenko YD, Anashkina AA, Matveeva OV.
Change of Antigenic Determinants of SARS-CoV-2 Virus S-Protein as a Possible Cause of Antibody-Dependent Enhancement of Virus Infection and Cytokine Storm.
Biophysics (Oxf). 2020;65(4):703-709. doi:10.1134/S0006350920040119
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7569100/>

²⁴ Pierson TC, Fremont DH, Kuhn RJ, Diamond MS.
Structural insights into the mechanisms of antibody-mediated neutralization of flavivirus infection: implications for vaccine development.
Cell Host Microbe. 2008;4(3):229-238. doi:10.1016/j.chom.2008.08.004
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2678546/>



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2678546/>

Un modello dei requisiti stechiometrici per la neutralizzazione dei flavivirus

La neutralizzazione dell'infezione da flavivirus è un fenomeno a effetto multiplo che richiede l'impegno del virione da parte dell'anticorpo con una stechiometria che supera una soglia (modellata come 30 mAbs sulla base di studi con mAbs WNV E-DIII-LR-specifici; linea tratteggiata rossa).²⁵ Se un singolo anticorpo può agganciarsi al virione con una stechiometria sufficiente a superare questa soglia dipende dalla sua affinità per gli antigeni virali e dal numero totale di epitopi accessibili sul virione medio (mostrato schematicamente sull'asse x). Gli epitopi che sono differenzialmente accessibili sui virioni in funzione dell'entità della maturazione del virione o della dinamica strutturale della particella virale si aggiungono alla complessità del modello (mostrato schematicamente per gli epitopi dipendenti dalla maturazione e quelli che legano le conformazioni selettive, rispettivamente). La neutralizzazione tramite determinanti altamente accessibili può essere ottenuta impegnandosi in un'occupazione relativamente bassa, mentre gli anticorpi che legano determinanti criptici devono legarne una frazione maggiore. Non tutti gli epitopi sembrano esistere nel virione medio a livelli che superano questa soglia. L'impegno del virione con una stechiometria al di sotto di questa soglia può supportare il potenziamento dell'infezione dipendente dall'anticorpo.

²⁵ Pierson TC, Xu Q, Nelson S, Oliphant T, Nybakken GE, Fremont DH, Diamond MS. The stoichiometry of antibody-mediated neutralization and enhancement of West Nile virus infection. Cell Host Microbe. 2007 Apr 19;1(2):135-45. doi: 10.1016/j.chom.2007.03.002. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2656919/>.

ADE mediato da C1q

Nel recente articolo di Okuya et al “*Multiple Routes of Antibody-Dependent Enhancement of SARS-CoV-2 Infection*”²⁶ è stato approfondito l’ADE mediato da C1q.

In particolare, sono stati testati 89 campioni di siero raccolti da pazienti affetti da COVID-19 acuti e convalescenti e il 62,9% è risultato positivo per IgG specifiche per SARS-CoV-2. L’ADE mediata da FcγR e/o C1q è stata rilevata nel 50% dei sieri IgG-positivi, mentre la maggior parte di essi ha mostrato attività neutralizzante in assenza di FcγR e C1q.

È importante sottolineare che gli anticorpi ADE sono stati trovati nel 41,4% dei pazienti acuti con COVID-19 (mediana 6; intervallo interquartile [IQR] 2,25–9 giorni dopo l’esordio), suggerendo la possibilità dell’ADE nel promuovere la replicazione del virus anche nella fase acuta dell’infezione primaria da SARS-CoV-2, inoltre l’ADE mediata da C1q tendeva ad essere più prevalente dell’ADE mediata da FcγR nei pazienti con sintomi lievi e moderati, rispetto ai sieri in fase convalescente.

Poiché C1q si lega in modo più efficiente alle IgM e alle IgG polimeriche simil-IgM rispetto agli anticorpi IgG monomerici²⁷, si è ritenuto che alcuni anticorpi IgM anti-S-specifici possano contribuire all’aggravamento della malattia *in vivo*, e in questo studio, non solo gli anticorpi IgG ma anche IgM sono stati riscontrati in alcuni dei pazienti acuti con COVID-19.

Studi precedenti hanno mostrato che gli epitopi riconosciuti dagli anticorpi ADE erano generalmente distinti da quelli per gli anticorpi neutralizzanti, sebbene alcuni anticorpi ADE mostrino attività neutralizzante ad alte concentrazioni²⁸.

È interessante notare che gli anticorpi ADE contro MERS-CoV, in grado di riconoscere un particolare epitopo sul sito di legame del recettore S trimerico, hanno stabilizzato il sito di legame del recettore e ciò ha innescato un cambiamento conformazionale di MERS-CoV S che ha portato a una maggiore infezione²⁹.

²⁶ Okuya K, Hattori T, Saito T, Takadate Y, Sasaki M, Furuyama W, Marzi A, Ohiro Y, Konno S, Hattori T, Takada A. Multiple Routes of Antibody-Dependent Enhancement of SARS-CoV-2 Infection. *Microbiol Spectr*. 2022 Apr 27;10(2):e0155321. doi: 10.1128/spectrum.01553-21. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9045191/>

²⁷ Smith RI, Coloma MJ, Morrison SL. Addition of a mu-tailpiece to IgG results in polymeric antibodies with enhanced effector functions including complement-mediated cytolysis by IgG4. *J Immunol*. 1995 Mar 1;154(5):2226-36. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7868896/>

Gadjeva MG, Rouseva MM, Zlatarova AS, Reid KB, Kishore U, Kojouharova MS. Interaction of human C1q with IgG and IgM: revisited. *Biochemistry*. 2008 Dec 9;47(49):13093-102. doi: 10.1021/bi801131h. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19006321/>

²⁸ Kuzmina NA, Younan P, Gilchuk P, Santos RI, Flyak AI, Ilinykh PA, Huang K, Lubaki NM, Ramanathan P, Crowe JE Jr, Bukreyev A. Antibody-Dependent Enhancement of Ebola Virus Infection by Human Antibodies Isolated from Survivors. *Cell Rep*. 2018 Aug 14;24(7):1802-1815.e5. doi: 10.1016/j.celrep.2018.07.035. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6697154/>.

Yamanaka A, Kotaki T, Konishi E. A mouse monoclonal antibody against dengue virus type 1 Mochizuki strain targeting envelope protein domain II and displaying strongly neutralizing but not enhancing activity. *J Virol*. 2013 Dec;87(23):12828-37. doi: 10.1128/JVI.01874-13. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3838163/>

Takada A, Ebihara H, Feldmann H, Geisbert TW, Kawaoka Y. Epitopes required for antibody-dependent enhancement of Ebola virus infection. *J Infect Dis*. 2007 Nov 15;196 Suppl 2:S347-56. doi: 10.1086/520581. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17940970/>

Zhou Y, et al. Enhancement versus neutralization by SARS-CoV-2 antibodies from a convalescent donor associates with distinct epitopes on the RBD. *Cell Rep*. 2021 Feb 2;34(5):108699. doi: 10.1016/j.celrep.2021.108699. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7802522/>

²⁹ Wan Y, Shang J, Sun S, Tai W, Chen J, Geng Q, He L, Chen Y, Wu J, Shi Z, Zhou Y, Du L, Li F. Molecular Mechanism for Antibody-Dependent Enhancement of Coronavirus Entry. *J Virol*. 2020 Feb 14;94(5):e02015-19. doi: 10.1128/JVI.02015-19.

Uno studio più recente ha dimostrato che alcuni anticorpi che riconoscono il dominio N-terminale del SARS-CoV-2 S inducono un cambiamento conformazionale del dominio di legame del recettore e potenziano l'infettività virale indipendentemente dalle vie ADE mediate da FcγR e C1q³⁰.

Tuttavia, gli autori ritengono che tali anticorpi ADE non siano prevalenti nell'infezione naturale da SARS-CoV-2 in quanto nessuno dei sieri testati nello studio aveva aumentato l'infettività virale in assenza di FcγR e C1q.

Metodica per lo studio dell'ADE:

Per studiare l'ADE FcγR-mediata, gli autori hanno stabilizzato cellule Vero E6 che esprimono FcγRIIa (cellule Vero E6/FcγRIIa) e confermato che un anticorpo ADE specifico per EBOV (ZGP12/1.1)³¹ aumentava effettivamente l'infettività del VSV pseudotipizzato con glicoproteina EBOV (GP) (VSV-EBOV) in questa linea cellulare (**Fig. A**).

Allo stesso modo, l'ADE mediato da C1q è stato confermato utilizzando cellule ZGP12/1.1 e cellule Vero E6 prive di FcγR³¹ (**Fig. B**). Questo anticorpo non ha mostrato né neutralizzazione né attività ADE in assenza di FcγR o C1q (**Fig. C**).

Utilizzando queste condizioni di analisi, gli autori hanno studiato le attività ADE mediate da FcγR e C1q nei campioni di siero raccolti per questo studio. Le cellule Vero E6/FcγRIIa sono state infettate con VSV-SARS-CoV-2³² miscelato con campioni di siero diluiti in serie (da 1:40 a 1:40960) per il test ADE mediato da FcγR.

Per il test ADE mediato da C1q, le cellule Vero E6 sono state infettate con il virus miscelato con campioni di siero diluiti in serie in presenza di C1q.

Come test di controllo ADE-negativo (cioè, condizione di neutralizzazione), le cellule Vero E6 sono state infettate con il virus miscelato con le diluizioni del siero in assenza di C1q.

<https://journals.asm.org/doi/10.1128/spectrum.01553-21>

Meccanismi ADE e convalida del test per ADE mediato da FcγR e C1q utilizzando VSV-EBOV e un anticorpo monoclonale specifico per la glicoproteina EBOV. I titoli infettivi di VSV-EBOV mescolati con le concentrazioni indicate di anticorpo monoclonale ZGP12/1.1 sono stati misurati in **(A)** cellule Vero E6/FcγRIIa, **(B)** cellule Vero E6 in presenza di C1q e **(C)** cellule Vero E6 in assenza di C1q. Il numero relativo di cellule infette è stato calcolato impostando il numero di cellule GFP-positivo in assenza dell'anticorpo al 100%. I punti e le barre di errore indicano rispettivamente le medie e le deviazioni standard dei pozzetti triplicati. I pannelli di destra mostrano gli schemi delle rispettive condizioni.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7022351/>

³⁰ Liu Y, et al

An infectivity-enhancing site on the SARS-CoV-2 spike protein targeted by antibodies. *Cell*. 2021 Jun 24;184(13):3452-3466.e18. doi: 10.1016/j.cell.2021.05.032. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8142859/>

³¹ Takada A, Ebihara H, Feldmann H, Geisbert TW, Kawaoka Y.

Epitopes required for antibody-dependent enhancement of Ebola virus infection. *J Infect Dis*. 2007 Nov 15;196 Suppl 2:S347-56. doi: 10.1086/520581. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17940970/>

³² Case JB, et al

Neutralizing Antibody and Soluble ACE2 Inhibition of a Replication-Competent VSV-SARS-CoV-2 and a Clinical Isolate of SARS-CoV-2. *Cell Host Microbe*. 2020 Sep 9;28(3):475-485.e5. doi: 10.1016/j.chom.2020.06.021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7332453/>.

Weisblum Y, et al

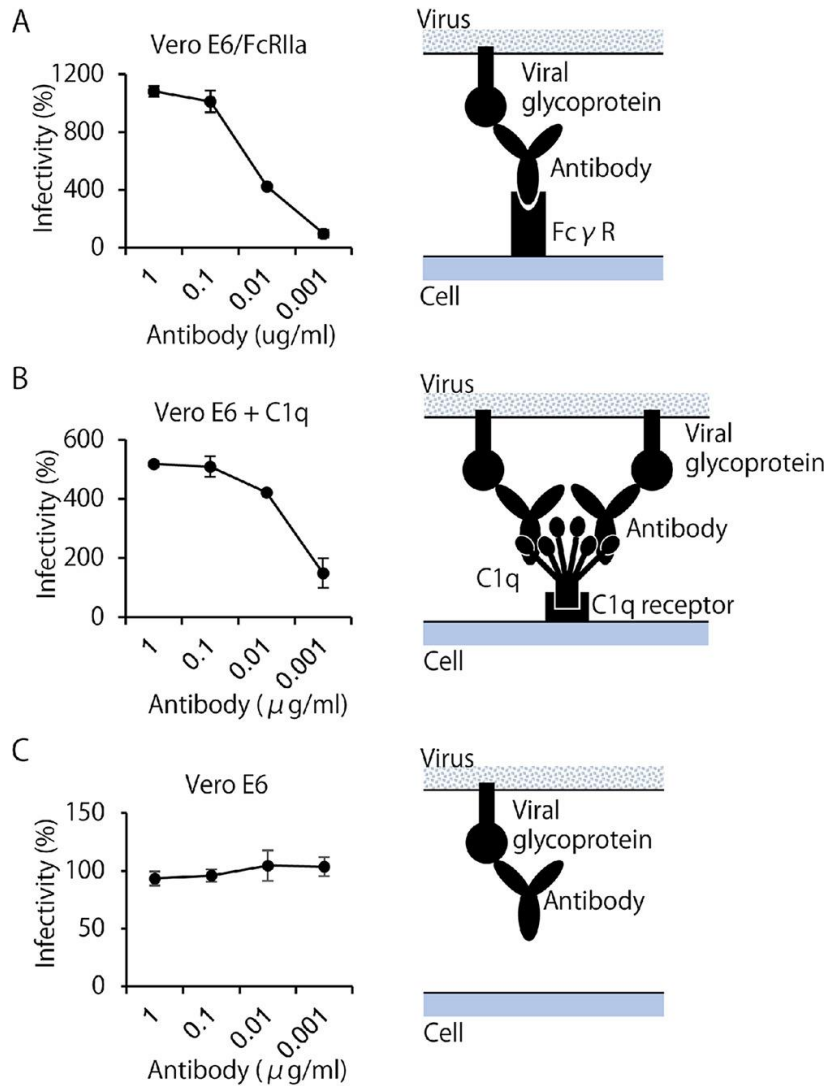
Escape from neutralizing antibodies by SARS-CoV-2 spike protein variants. *Elife*. 2020 Oct 28;9:e61312. doi: 10.7554/eLife.61312. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7723407/>

Millet JK, Tang T, Nathan L, Jaimes JA, Hsu HL, Daniel S, Whittaker GR.

Production of Pseudotyped Particles to Study Highly Pathogenic Coronaviruses in a Biosafety Level 2 Setting. *J Vis Exp*. 2019 Mar 1;(145):10.3791/59010. doi: 10.3791/59010. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6677141/>

Condor Capcha JM, Lambert G, Dykxhoorn DM, Salerno AG, Hare JM, Whitt MA, Pahwa S, Jayaweera DT, Shehadeh LA.

Generation of SARS-CoV-2 Spike Pseudotyped Virus for Viral Entry and Neutralization Assays: A 1-Week Protocol. *Front Cardiovasc Med*. 2021 Jan 15;7:618651. doi: 10.3389/fcvm.2020.618651. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7843445/>



Precedenti studi su altri virus hanno indicato che l'ADE è spesso osservato a concentrazioni subneutralizzanti di anticorpi ADE³³. I dati suggeriscono che l'attività neutralizzante è dominante quando i livelli complessivi di anticorpi specifici per SARS-CoV-2 sono elevati e il rischio di ADE può comparire in un periodo in cui gli anticorpi neutralizzanti sono ridotti al di sotto del livello di rilevamento.

E' stato studiato a questo scopo un possibile caso di ADE in un paziente con reinfezione da variante del SARS-CoV-2³⁴ che ha manifestato un'alta carica virale e una malattia più complicata rispetto alla prima infezione.

³³ Takada A, Kawaoka Y. Antibody-dependent enhancement of viral infection: molecular mechanisms and in vivo implications. *Rev Med Virol.* 2003 Nov-Dec;13(6):387-98. doi: 10.1002/rmv.405. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14625886/>

Yamanaka A, Kotaki T, Konishi E. A mouse monoclonal antibody against dengue virus type 1 Mochizuki strain targeting envelope protein domain II and displaying strongly neutralizing but not enhancing activity. *J Virol.* 2013 Dec;87(23):12828-37. doi: 10.1128/JVI.01874-13. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3838163/>

³⁴ Tillett RL, et al. Genomic evidence for reinfection with SARS-CoV-2: a case study. *Lancet Infect Dis.* 2021 Jan;21(1):52-58. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30764-7. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7550103/>

Sebbene tali studi suggeriscano una correlazione positiva tra la gravità della malattia e la risposta IgG, a supporto della produzione di anticorpi ADE³⁵, si può anche ipotizzare che sia semplicemente dovuta alla differenza nell'entità dell'infezione virale e la successiva risposta immunitaria, senza essere direttamente associata alla presenza di anticorpi ADE. È stato infatti riscontrato che le risposte anticorpali precoci elevate sono correlate con una maggiore gravità della malattia sia per la SARS³⁶ che per COVID-19³⁷. Quindi è importante distinguere tra questi diversi meccanismi di potenziamento della malattia per poter procedere al trattamento adeguato.

Li et al³⁸ hanno recentemente studiato le funzioni *in vitro* e *in vivo* degli anticorpi che potenziano e neutralizzano l'infezione da SARS-CoV-2. In particolare, hanno isolato anticorpi neutralizzanti (NAb) contro

³⁵ Gerhards C, Thiaucourt M, Kittel M, Becker C, Ast V, Hetjens M, Neumaier M, Haselmann V. Longitudinal assessment of anti-SARS-CoV-2 antibody dynamics and clinical features following convalescence from a COVID-19 infection. *Int J Infect Dis.* 2021 Jun;107:221-227. doi: 10.1016/j.ijid.2021.04.080. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8080496/>

Fill Malfertheiner S, Brandstetter S, Roth S, Harner S, Buntrock-Döpke H, Toncheva AA, Borchers N, Gruber R, Ambrosch A, Kabesch M, Häusler S. Immune response to SARS-CoV-2 in health care workers following a COVID-19 outbreak: A prospective longitudinal study. *J Clin Virol.* 2020 Sep;130:104575. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104575. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7406471/>

Crawford KHD, et al
Dynamics of Neutralizing Antibody Titers in the Months After Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection. *J Infect Dis.* 2021 Feb 3;223(2):197-205. doi: 10.1093/infdis/jiaa618. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7543487/>

Park JH, Cha MJ, Choi H, Kim MC, Chung JW, Lee KS, Jeong DG, Baek MS, Kim WY, Lim Y, Yoon SW, Choi SH. Relationship between SARS-CoV-2 antibody titer and the severity of COVID-19. *J Microbiol Immunol Infect.* 2022 May 5:S1684-1182(22)00059-7. doi: 10.1016/j.jmii.2022.04.005. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9069977/>

³⁶ Lee N, Chan PK, Ip M, Wong E, Ho J, Ho C, Cockram CS, Hui DS. Anti-SARS-CoV IgG response in relation to disease severity of severe acute respiratory syndrome. *J Clin Virol.* 2006 Feb;35(2):179-84. doi: 10.1016/j.jcv.2005.07.005. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7108264/>

³⁷ Liu X, Wang J, Xu X, Liao G, Chen Y, Hu CH. Patterns of IgG and IgM antibody response in COVID-19 patients. *Emerg Microbes Infect.* 2020 Dec;9(1):1269-1274. doi: 10.1080/22221751.2020.1773324. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7448841/>

Chen W, Zhang J, Qin X, Wang W, Xu M, Wang LF, Xu C, Tang S, Liu P, Zhang L, Liu X, Zhang Y, Yi C, Hu Z, Yi Y. SARS-CoV-2 neutralizing antibody levels are correlated with severity of COVID-19 pneumonia. *Biomed Pharmacother.* 2020 Oct;130:110629. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110629. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7425713/>

Young BE, Onet al Singapore 2019 Novel Coronavirus Outbreak Research team. Viral dynamics and immune correlates of COVID-19 disease severity. *Clin Infect Dis.* 2020 Aug 28:ciaa1280. doi: 10.1093/cid/ciaa1280. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7499509/>

Pujadas E, Chaudhry F, McBride R, Richter F, Zhao S, Wajnberg A, Nadkarni G, Glicksberg BS, Houldsworth J, Cordon-Cardo C. SARS-CoV-2 viral load predicts COVID-19 mortality. *Lancet Respir Med.* 2020 Sep;8(9):e70. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30354-4. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7836878/>

Luo YR, Chakraborty I, Yun C, Wu AHB, Lynch KL. Kinetics of SARS-CoV-2 Antibody Avidity Maturation and Association with Disease Severity [published online ahead of print, 2020 Sep 14]. *Clin Infect Dis.* 2020;ciao1389. doi:10.1093/cid/ciao1389 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7543300/pdf/ciao1389.pdf>

Fajnzylber J, et al
Massachusetts Consortium for Pathogen Readiness. SARS-CoV-2 viral load is associated with increased disease severity and mortality. *Nat Commun.* 2020 Oct 30;11(1):5493. doi: 10.1038/s41467-020-19057-5. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7603483/>

³⁸ Li D, et al
In vitro and in vivo functions of SARS-CoV-2 infection-enhancing and neutralizing antibodies.

il dominio di legame del recettore (RBD) o il dominio N-terminale (NTD) della spike virale da individui con SARS-CoV-2 acuto o convalescente o una storia di infezione da SARS-CoV.

Alcuni RBD NAbs hanno indotto il potenziamento dell'infezione virale *in vitro* mediato dal recettore Fc- γ (Fc γ R), mentre cinque anticorpi NTD non neutralizzanti hanno mediato il potenziamento dell'infezione *in vitro* indipendente da Fc γ R. Tre di 46 scimmie infuse con anticorpi potenzianti avevano punteggi di infiammazione polmonare più elevati rispetto ai controlli e una scimmia ha presentato edema alveolare ed elevate citochine infiammatorie da lavaggio broncoalveolare.

In sintesi, nonostante l'infezione potenziata da anticorpi *in vitro* non sia predittiva per un'infezione potenziata *in vivo*, nei macachi infusi con anticorpi SARS-CoV-2 è stato riscontrato un aumento dell'infiammazione polmonare a conferma di un meccanismo ADE.

ADE non canonico

Recentemente Liu et al.³⁹ hanno scoperto che gli anticorpi contro un sito specifico sull'NTD (N-terminal domain) della proteina spike SARS-CoV-2 aumentano direttamente il legame di ACE2 alla proteina spike, aumentando di conseguenza l'infettività SARS-CoV-2.

Sebbene l'ADE indotto dagli anticorpi potenzianti sia relativamente inferiore all'ADE mediato dal recettore Fc osservato in altri virus come il virus della Dengue, i recettori Fc non sono coinvolti in questo nuovo tipo di ADE.

Pertanto, gli anticorpi potenzianti potrebbero essere coinvolti nell'infezione da SARS-CoV-2 per un'ampia gamma di cellule che non esprimono i recettori Fc. Ciò suggerisce che una maggiore capacità di legame di ACE2 alla proteina spike, anche se piccola, svolge un ruolo importante nell'infezione da SARS-CoV-2.

L'RBD (Receptor-Binding Domain) della proteina spike è abbastanza flessibile e l'ACE2 si lega preferenzialmente alla conformazione aperta dell'RBD⁴⁰, come si approfondirà di seguito, suggerendo un ruolo vitale nell'infettività di SARS-CoV-2⁴¹.

Utilizzando un anticorpo specifico, gli autori hanno scoperto che gli anticorpi potenzianti inducevano la conformazione aperta dell'RBD al legame con l'NTD.

È interessante notare che le varianti B.1.1.7 (variante alfa) e B.1.135, che si approfondiranno nella sezione dedicata alle varianti, contengono rispettivamente la delezione H69-V70 e la mutazione D215G, molto vicine al sito di legame dell'anticorpo potenziante. Ciò suggerisce che le mutazioni attorno agli epitopi del sito potenziante sono in grado di influenzare l'infettività del SARS-CoV-2.

Cell. 2021 Aug 5;184(16):4203-4219.e32. doi: 10.1016/j.cell.2021.06.021.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8232969/>

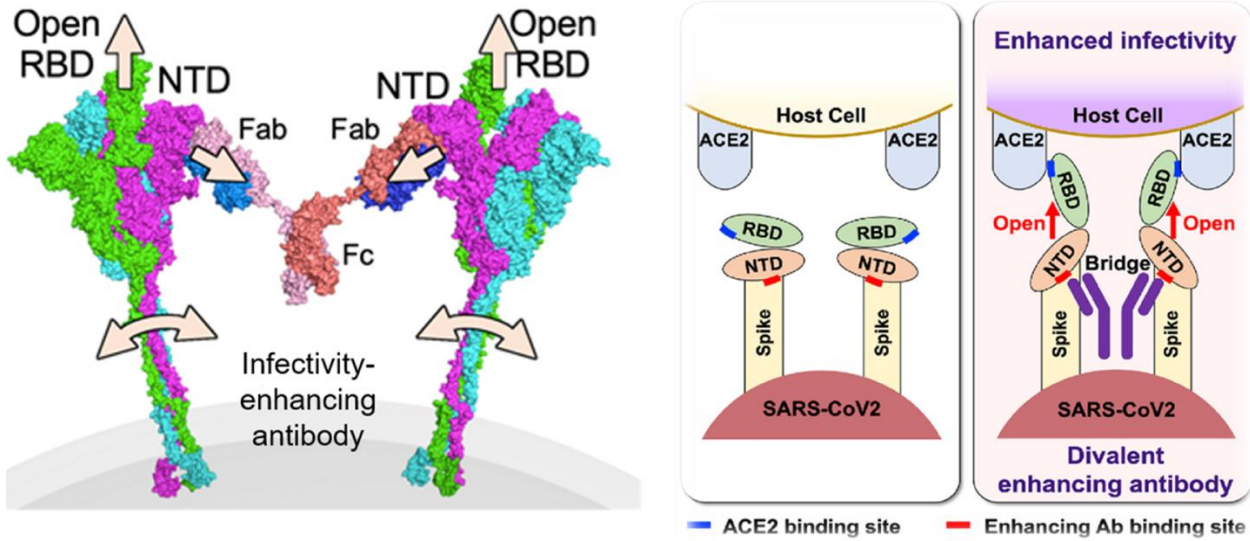
³⁹ Liu Y, Soh WT, Kishikawa JI, et al.
An infectivity-enhancing site on the SARS-CoV-2 spike protein targeted by antibodies.
Cell. 2021;184(13):3452-3466.e18. doi:10.1016/j.cell.2021.05.032
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8142859/>

Yafei Liu, Yukoh Nakazaki, Hisashi Arase,
Infectivity-enhancing antibodies against SARS-CoV-2,
Translational and Regulatory Sciences, 2022, Volume 4, Issue 1, Pages 1-4, <https://doi.org/10.33611/trs.2021-021>,
https://www.jstage.jst.go.jp/article/trs/4/1/4_2021-021/_article/-char/en

⁴⁰ Henderson R, Edwards RJ, Mansouri K, et al.
Controlling the SARS-CoV-2 spike glycoprotein conformation.
Nat Struct Mol Biol. 2020;27(10):925-933. doi:10.1038/s41594-020-0479-4
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8581954/>

Lu M, Uchil PD, Li W, et al.
Real-Time Conformational Dynamics of SARS-CoV-2 Spikes on Virus Particles.
Cell Host Microbe. 2020;28(6):880-891.e8. doi:10.1016/j.chom.2020.11.001
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7664471/>

⁴¹ Yurkovetskiy L, Wang X, Pascal KE, et al.
Structural and Functional Analysis of the D614G SARS-CoV-2 Spike Protein Variant.
Cell. 2020;183(3):739-751.e8. doi:10.1016/j.cell.2020.09.032
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7492024/>



https://www.jstage.jst.go.jp/article/trs/4/1/4_2021-021/_article

Meccanismo d'azione degli anticorpi anti-infettivi. Sebbene i frammenti Fab dell'anticorpo che migliora l'infettività si leghino alla proteina spike come anticorpi convenzionali, non si osserva alcun effetto di miglioramento dell'infettività. D'altra parte, poiché i frammenti F(ab')₂ mostrano un effetto di potenziamento dell'infettività, è stata rivelata una funzione completamente nuova. In questo caso, gli NTD reticolati con anticorpi inducono RBD aperti mediante l'estrazione, con conseguente aumento dell'infettività (modificato da Liu et al., Cell 2021). NTD, dominio N-terminale; RBD, dominio di legame del recettore; ACE2, enzima di conversione dell'angiotensina 2; SARS-CoV-2, sindrome respiratoria acuta grave coronavirus 2; Ab, anticorpo.

Mastociti e ADE

I mastociti sono cellule residenti nei tessuti, contenenti mediatori in grado di regolare sia la risposta immunitaria innata che quella adattativa ⁴².

L'arricchimento dei mastociti nelle interfacce ambientali consente a queste cellule di essere tra le prime a rispondere durante l'invasione dei patogeni, insieme alle cellule dendritiche e alle cellule epiteliali ⁴³.

Inoltre, sono tipicamente situati vicino a vasi sanguigni, linfatici e terminazioni nervose, consentendo loro di avere effetti a lungo raggio sulla risposta dell'ospite ai patogeni ⁴⁴, e quindi sono fondamentali per la sorveglianza immunitaria, provocando una reazione immediata agli agenti patogeni invasori e avviando una risposta immunitaria innata e adattativa appropriata. ⁴⁵

⁴² Galli SJ, Kalesnikoff J, Grimbaldston MA, Piliponsky AM, Williams CM, Tsai M. Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:749-86. doi: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141025. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15771585/>

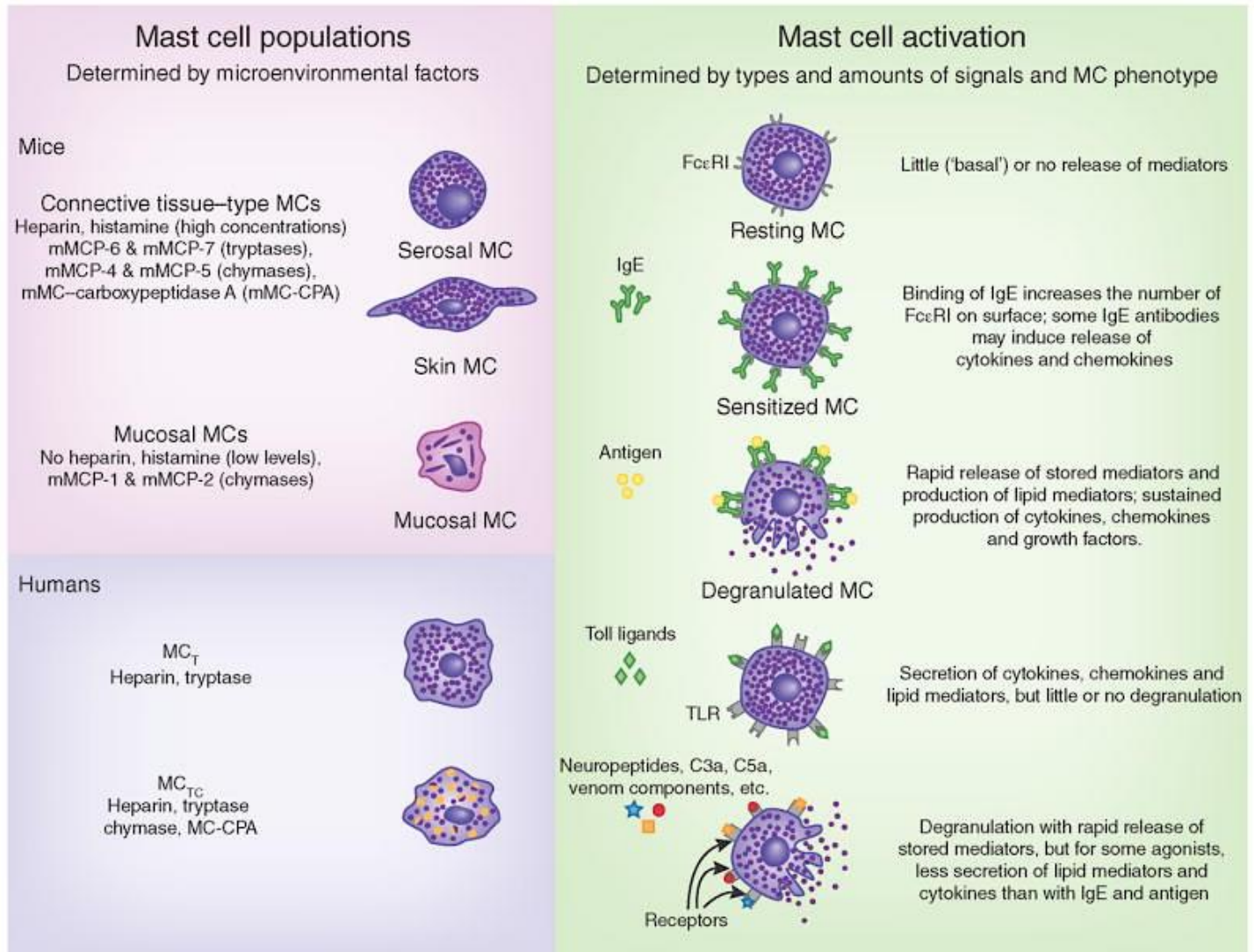
⁴³ Abraham SN, St John AL. Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. *Nat Rev Immunol.* 2010 Jun;10(6):440-52. doi: 10.1038/nri2782. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4469150/>

⁴⁴ Marshall JS, Jawdat DM. Mast cells in innate immunity. *J Allergy Clin Immunol.* 2004 Jul;114(1):21-7. doi: 10.1016/j.jaci.2004.04.045. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15241339/>

Katsoulis-Dimitriou K, Kotrba J, Voss M, Dudeck J, Dudeck A. Mast Cell Functions Linking Innate Sensing to Adaptive Immunity. *Cells.* 2020 Nov 25;9(12):2538. doi: 10.3390/cells9122538. <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/12/2538/htm>

⁴⁵ Graham AC, Temple RM, Obar JJ. Mast cells and influenza a virus: association with allergic responses and beyond. *Front Immunol.* 2015;6:238. Published 2015 May 18. doi:10.3389/fimmu.2015.00238 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4435071/>

I mastociti esprimono una vasta gamma di recettori di superficie cellulare che mediano la risposta innata e recettori citosolici che mediano le risposte immunitarie appropriate agli agenti infettivi.



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3412172/>

Popolazioni mastocitarie e pattern di attivazione funzionale. I mastociti (MC) nei topi o nell'uomo possono essere sottoclassificati (**a sinistra**) in popolazioni definite dalla posizione anatomica e/o dal contenuto del mediatore (come i proteoglicani (eparina verso condroitin solfati) o proteasi (triptasi, chimasi o MC-CPA)). Nelle risposte immunitarie IgE-associate ad allergeni o parassiti (**in alto a destra**), l'attivazione dei mastociti attraverso la reticolazione delle IgE legate ai recettori ad alta affinità per le IgE (FcεRI) sulla superficie cellulare da antigeni bi- o multivalenti provoca una rapida esocitosi di i granuli citoplasmatici (degranulazione) e la produzione di mediatori lipidici (come leucotrieni e prostaglandine) e la secrezione più sostenuta di molte citochine, chemochine e fattori di crescita. Sebbene molti di questi mediatori abbiano effetti proinfiammatori, altri possono avere effetti che sopprimono l'infiammazione o promuovono il rimodellamento o la riparazione dei tessuti. Segnali non dipendenti dalle IgE (**in basso a destra**) possono suscitare diversi modelli di rilascio del mediatore nelle popolazioni di mastociti che esprimono recettori appropriati per tali ligandi. I fattori microambientali possono influenzare il fenotipo dei mastociti che si sviluppano in condizioni basali in diversi siti anatomici (**a sinistra**), comprese quelle caratteristiche fenotipiche che consentono ai mastociti di rispondere a vari ligandi (come il modello di espressione dei recettori per quei ligandi) o a produrre mediatori diversi (**a destra**). I TLR sono esempi dei numerosi recettori di riconoscimento del pattern espressi da varie popolazioni di mastociti. MC_T, mastociti contenenti principalmente triptasi; MC_{TC}, mastociti contenenti sia triptasi che chimasi; C3a e C5a, anafilattossine del sistema del complemento.

Galli SJ, Borregaard N, Wynn TA.
Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils.
Nat Immunol. 2011 Oct 19;12(11):1035-44. doi: 10.1038/ni.2109.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3412172/>

In particolare, i mastociti esprimono vari recettori Fc inclusi FcεRI, FcγRI e FcγRIII⁴⁶, e sono anche in grado di rispondere attraverso un'ampia varietà di recettori di riconoscimento del pattern (PRR), inclusi i recettori toll-like (TLR), nod-like (NLR), del gene 1 inducibili dall'acido retinoico (RLR), e i recettori della lectina di tipo C (CLR), ciascuno dei quali svolge un ruolo essenziale nell'immunità innata, rilevando modelli molecolari conservati espressi dai patogeni⁴⁷.

I mastociti possono anche essere attivati attraverso il reclutamento dei recettori del complemento⁴⁸, CD48,⁴⁹ e integrine⁵⁰. Infine, possono rispondere ai patogeni indirettamente attraverso la via di segnalazione dell'IL-33⁵¹.

⁴⁶ Beaven MA, Metzger H.

Signal transduction by Fc receptors: the Fc epsilon RI case.
Immunol Today. 1993 May;14(5):222-6. doi: 10.1016/0167-5699(93)90167-j.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8517921/>

⁴⁷ Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, Karow M, Adams NC, Gale NW, Iwasaki A, Flavell RA.
Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Apr 13;101(15):5598-603. doi: 10.1073/pnas.0400937101. Epub 2004 Mar 19.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC397437/>

Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C.
Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA.
Science. 2004 Mar 5;303(5663):1529-31. doi: 10.1126/science.1093616. Epub 2004 Feb 19.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14976261/>

Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, Näslund TI, Liljeström P, Weber F, Reis e Sousa C.
RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates.
Science. 2006 Nov 10;314(5801):997-1001. doi: 10.1126/science.1132998. Epub 2006 Oct 12.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17038589/>

Kato H, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Uematsu S, Matsui K, Tsujimura T, Takeda K, Fujita T, Takeuchi O, Akira S.
Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response.
Immunity. 2005 Jul;23(1):19-28. doi: 10.1016/j.immuni.2005.04.010
<https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S1074-7613%2805%2900142-1>

Seth RB, Sun L, Ea CK, Chen ZI.
Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3.
Cell. 2005 Sep 9;122(5):669-82. doi: 10.1016/j.cell.2005.08.012.
<https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0092-8674%2805%2900816-0>

Kato H, et al
Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses.
Nature. 2006 May 4;441(7089):101-5. doi: 10.1038/nature04734. Epub 2006 Apr 9.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16625202/>

⁴⁸ Marshall JS, Jawdat DM.
Mast cells in innate immunity.
J Allergy Clin Immunol. 2004 Jul;114(1):21-7. doi: 10.1016/j.jaci.2004.04.045.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15241339/>

⁴⁹ Rocha-de-Souza CM, Berent-Maoz B, Mankuta D, Moses AE, Levi-Schaffer F.
Human mast cell activation by Staphylococcus aureus: interleukin-8 and tumor necrosis factor alpha release and the role of Toll-like receptor 2 and CD48 molecules.
Infect Immun. 2008 Oct;76(10):4489-97. doi: 10.1128/IAI.00270-08. Epub 2008 Jul 21.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2546849/>

Malaviya R, Ikeda T, Ross E, Abraham SN.
Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha.
Nature. 1996 May 2;381(6577):77-80. doi: 10.1038/381077a0.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8609993/>

⁵⁰ Edelson BT, Li Z, Pappan LK, Zutter MM.
Mast cell-mediated inflammatory responses require the alpha 2 beta 1 integrin.
Blood. 2004 Mar 15;103(6):2214-20. doi: 10.1182/blood-2003-08-2978. Epub 2003 Nov 26.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006497120500165?via%3Dihub>

⁵¹ Boyce JA.
Mast cells and eicosanoid mediators: a system of reciprocal paracrine and autocrine regulation.
Immunol Rev. 2007 Jun;217:168-85. doi: 10.1111/j.1600-065X.2007.00512.x.

Pertanto, i mastociti sono in grado di rispondere a un'ampia gamma di stimoli derivati o indotti da agenti patogeni, ma non rispondono in modo uniforme a tutti gli stimoli⁵².

Ad esempio, la segnalazione attraverso i TLR4 porta a una forte risposta pro-infiammatoria delle citochine, ma limitata degranolazione dei mastociti.

Al contrario, la segnalazione attraverso i TLR2 induce sia una risposta infiammatoria delle citochine che la degranolazione dei mastociti⁵³.

L'attivazione dei mastociti è quindi un regolatore importante per una risposta immunitaria appropriata, e l'attivazione aberrante o prolungata può provocare immunopatologia tissutale⁵⁴, come avviene nelle complicazioni dell'infezione acuta da SARS-Cov-2 e nelle sequele post-COVID.⁵⁵

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17498059/>

⁵² Rao KN, Brown MA.

Mast cells: multifaceted immune cells with diverse roles in health and disease.

Ann N Y Acad Sci. 2008 Nov;1143:83-104. doi: 10.1196/annals.1443.023.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19076346/>

Elieh Ali Komi D, Wöhrl S, Bielory L.

Mast Cell Biology at Molecular Level: a Comprehensive Review.

Clin Rev Allergy Immunol. 2020 Jun;58(3):342-365. doi: 10.1007/s12016-019-08769-2.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31828527/>

Valent P, et al

Mast cells as a unique hematopoietic lineage and cell system: From Paul Ehrlich's visions to precision medicine concepts. T

heranostics. 2020 Aug 29;10(23):10743-10768. doi: 10.7150/thno.46719. PMID: 32929378; PMCID: PMC7482799.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7482799/>

West PW, Bulfone-Paus S.

Mast cell tissue heterogeneity and specificity of immune cell recruitment.

Front Immunol. 2022 Jul 29;13:932090. doi: 10.3389/fimmu.2022.932090.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35967445/>

⁵³ Supajatura V, Ushio H, Nakao A, Okumura K, Ra C, Ogawa H.

Protective roles of mast cells against enterobacterial infection are mediated by Toll-like receptor 4.

J Immunol. 2001 Aug 15;167(4):2250-6. doi: 10.4049/jimmunol.167.4.2250

<https://www.jimmunol.org/content/167/4/2250.long>

⁵⁴ Noto CN, Hoft SG, DiPaolo RJ.

Mast Cells as Important Regulators in Autoimmunity and Cancer Development.

Front Cell Dev Biol. 2021 Oct 12;9:752350. doi: 10.3389/fcell.2021.752350.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8546116/>

Justiz Vaillant AA, Vashisht R, Zito PM.

Immediate Hypersensitivity Reactions. 2022 Jul 8. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan--.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513315/>

Toyoshima S, Okayama Y.

Neuro-allergology: Mast cell-nerve cross-talk.

Allergol Int. 2022 Jul;71(3):288-293. doi: 10.1016/j.alit.2022.04.002.

<https://doi.org/10.1016/j.alit.2022.04.002>

⁵⁵ Schaller T, Märkl B, Claus R, Sholl L, Hornick JL, Giannetti MP, Schweizer L, Mann M, Castells M.

Mast cells in lung damage of COVID-19 autopsies: A descriptive study.

Allergy. 2022 Jul;77(7):2237-2239. doi: 10.1111/all.15293.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9111237/>

Bot I.

The Mast Cell: A Novel Actor in Cardiac Microvessel Dysfunction.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2021 Apr;41(4):1337-1338. doi: 10.1161/ATVBAHA.121.316043

<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/ATVBAHA.121.316043>

Szukiewicz D, Wojdasiewicz P, Watroba M, Szewczyk G.

Mast Cell Activation Syndrome in COVID-19 and Female Reproductive Function: Theoretical Background vs. Accumulating Clinical Evidence.

J Immunol Res. 2022 Jun 22;2022:9534163. doi: 10.1155/2022/9534163.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9242765/>

Arun S, Storan A, Myers B.

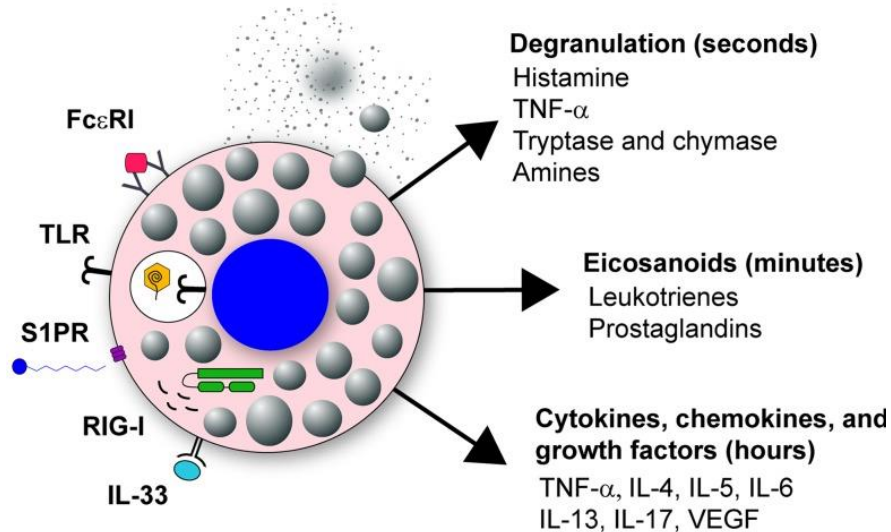
Mast cell activation syndrome and the link with long COVID.

I mastociti hanno due fasi distinte di attivazione: la degranulazione immediata, con conseguente rilascio di mediatori pre-sintetizzati, e la secrezione ritardata di mediatori secondari sintetizzati *de novo*.⁵⁶

La secrezione ritardata di molecole effettrici secondarie *de novo* può essere ulteriormente suddivisa in due classi:

- prostaglandine ed eicosanoidi rilasciati entro pochi minuti dall'attivazione,
- citochine, chemochine e fattori di crescita che vengono rilasciati entro poche ore dall'attivazione.

Insieme, queste secrezioni dei mastociti possono aumentare la permeabilità delle cellule epiteliali ed endoteliali e lo stato di attivazione, che insieme alle molecole chemiotattiche, provocano un aumento del reclutamento delle cellule infiammatorie nei tessuti infetti.



Attivazione dei mastociti in risposta all'infezione virale.

I mastociti sono classicamente noti per la loro risposta al cross-linking polivalente delle IgE nel recettore FcεR1, che è importante nell'immunità protettiva contro l'infezione da elminti e patologicamente associato alla malattia allergica.

Tuttavia, i mastociti sono anche importanti cellule sentinella dei tessuti per avviare la risposta infiammatoria ai patogeni. I mastociti possono riconoscere e rispondere ai virus attraverso vari recettori diversi. Questi recettori includono la segnalazione TLR, come il rilevamento TLR3 di dsRNA, il legame della sfingosina-1-fosfato (S1P) al suo recettore S1PR e il riconoscimento RIG-I di vRNA senza cappuccio. Il coinvolgimento di questi recettori provoca l'attivazione dei mastociti che porta alla degranulazione immediata, alla sintesi *de novo* di eicosanoidi entro pochi minuti dall'attivazione e alla sintesi *de novo* di numerose citochine, chemochine e fattori di crescita entro poche ore dall'attivazione.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4435071/>

Br J Hosp Med (Lond). 2022 Jul 2;83(7):1-10. doi: 10.12968/hmed.2022.0123. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35938771/>

Wechsler JB, Butuci M, Wong A, Kamboj AP, Youngblood BA. Mast cell activation is associated with post-acute COVID-19 syndrome. Allergy. 2022 Apr;77(4):1288-1291. doi: 10.1111/all.15188. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9299596/>

⁵⁶ Abraham SN, St John AL. Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. Nat Rev Immunol. 2010 Jun;10(6):440-52. doi: 10.1038/nri2782. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4469150/>

Sayed BA, Christy A, Quirion MR, Brown MA. The master switch: the role of mast cells in autoimmunity and tolerance. Annu Rev Immunol. 2008;26:705-39. doi: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090320. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18370925/>

Metz M, Maurer M. Mast cells--key effector cells in immune responses. Trends Immunol. 2007 May;28(5):234-41. doi: 10.1016/j.it.2007.03.003. Epub 2007 Apr 2. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17400512/>

Albert-Bayo M, Paracuellos I, González-Castro AM, Rodríguez-Urrutia A, Rodríguez-Lagunas MJ, Alonso-Cotner C, Santos J, Vicario M. Intestinal Mucosal Mast Cells: Key Modulators of Barrier Function and Homeostasis. Cells. 2019 Feb 8;8(2):135. doi: 10.3390/cells8020135. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6407111/>

ADE e sindrome infiammatoria multisistemica

L'attivazione dei mastociti mediata dagli anticorpi, può presentarsi in seguito a varie infezioni e vaccini⁵⁷, ed è stata studiata con maggior attenzione quale meccanismo immunopatologico per la MISC-C (sindrome infiammatoria multisistemica nel bambino) e MISC-A (sindrome infiammatoria multisistemica nell'adulto) come complicazione della COVID-19⁵⁸ e dei vaccini anti SARS-Cov-2⁵⁹.

⁵⁷ Ricke DO.

Two Different Antibody-Dependent Enhancement (ADE) Risks for SARS-CoV-2 Antibodies.
Front Immunol. 2021;12:640093. Published 2021 Feb 24. doi:10.3389/fimmu.2021.640093
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7943455/>

Tkaczyk C, Okayama Y, Woolhiser MR, Hagaman DD, Gilfillan AM, Metcalfe DD.
Activation of human mast cells through the high affinity IgG receptor.
Mol Immunol. 2002 Sep;38(16-18):1289-93. doi: 10.1016/s0161-5890(02)00077-9.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12217397/>

Tkaczyk C, Okayama Y, Woolhiser MR, Hagaman DD, Gilfillan AM, Metcalfe DD.
Activation of human mast cells through the high affinity IgG receptor.
Mol Immunol. 2002 Sep;38(16-18):1289-93. doi: 10.1016/s0161-5890(02)00077-9.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12217397/>

van Erp EA, van Kasteren PB, Guichelaar T, Ahout IML, de Haan CAM, Luytjes W, Ferwerda G, Wicht O.
In Vitro Enhancement of Respiratory Syncytial Virus Infection by Maternal Antibodies Does Not Explain Disease Severity in Infants.
J Virol. 2017 Oct 13;91(21):e00851-17. doi: 10.1128/JVI.00851-17.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5640862/>

Smatti MK, Al Thani AA, Yassine HM.
Viral-Induced Enhanced Disease Illness.
Front Microbiol. 2018 Dec 5;9:2991. doi: 10.3389/fmicb.2018.02991.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6290032/>

Jares Baglivo S, Polack FP.
The long road to protect infants against severe RSV lower respiratory tract illness.
F1000Res. 2019 May 2;8:F1000 Faculty Rev-610. doi: 10.12688/f1000research.18749.1.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6498742/>

Winarski KL, Tang J, Klenow L, Lee J, Coyle EM, Manischewitz J, Turner HL, Takeda K, Ward AB, Golding H, Khurana S.
Antibody-dependent enhancement of influenza disease promoted by increase in hemagglutinin stem flexibility and virus fusion kinetics.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2019 Jul 23;116(30):15194-15199. doi: 10.1073/pnas.1821317116.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6660725/>

Mamontov A, Losev I, Korzhevskii D, Guselnikova V, Polevshchikov A, Desheva Y.
Study of Antibody-Dependent Reactions of Mast Cells In Vitro and in a Model of Severe Influenza Infection in Mice.
Front Immunol. 2021 Jul 14;12:689436. doi: 10.3389/fimmu.2021.689436.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8317171/>

Desheva Y, Mamontov A, Petkova N, Karev V, Nazarov P.
Mast cell degranulation and histamine release during A/H5N1 influenza infection in influenza-sensitized mice.
Life Sci. 2020 Oct 1;258:118230. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118230.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7413848/>

⁵⁸ Vogel TP, et al

Multisystem inflammatory syndrome in children and adults (MIS-C/A): Case definition & guidelines for data collection, analysis, and presentation of immunization safety data.
Vaccine. 2021 May 21;39(22):3037-3049. doi: 10.1016/j.vaccine.2021.01.054.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7904456/>

Waseem M, Shariff MA, Tay ET, Mortel D, Savadkar S, Lee H, Kondamudi N, Liang T.
Multisystem Inflammatory Syndrome in Children.
J Emerg Med. 2022 Jan;62(1):28-37. doi: 10.1016/j.jemermed.2021.07.070.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8445772/>

Theoharides TC, Conti P.
COVID-19 and Multisystem Inflammatory Syndrome, or is it Mast Cell Activation Syndrome?
J Biol Regul Homeost Agents. 2020 Sep-Oct;34(5):1633-1636. doi: 10.23812/20-EDIT3.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33023287/>

⁵⁹ Nune A, Iyengar KP, Goddard C, Ahmed AE.

In particolare, la MIS-C sembra essere una sindrome clinica che condivide aspetti con altre condizioni infiammatorie, in cui grandi quantità di citochine causano la disfunzione di diversi organi, tra cui la malattia di Kawasaki, la sepsi, la sindrome da attivazione dei macrofagi e l'HLH secondario.⁶⁰

La sua azione sul letto vascolare è molto importante, in quanto causa ipotensione e fuoriuscita di liquidi e cellule del sistema immunitario nel polmone, nel cuore e in altri organi.⁶¹

Degno di nota è il coinvolgimento cardiaco con disfunzione miocardica, pericardite, disfunzione valvolare o anomalie coronariche⁶².

Multisystem inflammatory syndrome in an adult following the SARS-CoV-2 vaccine (MIS-V).
BMJ Case Rep. 2021 Jul 29;14(7):e243888. doi: 10.1136/bcr-2021-243888.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8323360/>

Wangu Z, Swartz H, Doherty M.
Multisystem inflammatory syndrome in children (MIS-C) possibly secondary to COVID-19 mRNA vaccination.
BMJ Case Rep. 2022 Mar 30;15(3):e247176. doi: 10.1136/bcr-2021-247176.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8968554/>

Stappers S, Ceuleers B, Van Brusselen D, Willems P, de Tavernier B, Verlinden A.
A case of multisystem inflammatory syndrome (MIS-A) in an adult woman 18 days after COVID-19 vaccination.
Acta Clin Belg. 2022 Aug;77(4):772-777. doi: 10.1080/17843286.2021.1977899.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34511054/>

Jain E, Donowitz JR, Aarons E, Marshall BC, Miller MP.
Multisystem Inflammatory Syndrome in Children after SARS-CoV-2 Vaccination.
Emerg Infect Dis. 2022 May;28(5):990-993. doi: 10.3201/eid2805.212418.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9045439/>

⁶⁰ Simon Junior H, Sakano TMS, Rodrigues RM, Eisenkraft AP, Carvalho VEL, Schwartsman C, Reis AGADC.
Multisystem inflammatory syndrome associated with COVID-19 from the pediatric emergency physician's point of view.
J Pediatr (Rio J). 2021 Mar-Apr;97(2):140-159. doi: 10.1016/j.jped.2020.08.004
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7486073/>

⁶¹ Mahase E.
Covid-19: concerns grow over inflammatory syndrome emerging in children.
BMJ. 2020 Apr 28;369:m1710. doi: 10.1136/bmj.m1710.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32345602/>

⁶² Wu EY, Campbell MJ.
Cardiac Manifestations of Multisystem Inflammatory Syndrome in Children (MIS-C) Following COVID-19.
Curr Cardiol Rep. 2021 Oct 1;23(11):168. doi: 10.1007/s11886-021-01602-3.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8486157/>

Sperotto F, Friedman KG, Son MBF, VanderPluym CJ, Newburger JW, Dionne A.
Cardiac manifestations in SARS-CoV-2-associated multisystem inflammatory syndrome in children: a comprehensive review and proposed clinical approach.
Eur J Pediatr. 2021 Feb;180(2):307-322. doi: 10.1007/s00431-020-03766-6.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7429125/>

Fialho I, Mateus C, Martins-Dos-Santos G, Pita J, Cabanelas N, Baptista SB, Roque D.
Recurrent Kounis syndrome - a life-threatening event after COVID-19 vaccine administration.
J Cardiol Cases. 2022 Jun;25(6):400-403. doi: 10.1016/j.jccase.2022.01.014.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8818380/>

Symptoms of MIS-C

- Fever
- Headache or mental status change
- Conjunctivitis
- Oral mucosa changes
- Sore throat
- Cough
- Abdominal pain
- Vomiting or diarrhea
- Rash
- Lymphadenitis
- Swollen extremities

Complications of MIS-C

- Myocarditis
- Coronary artery aneurysm
- Hypotension and hypoperfusion
- Serositis
- Acute respiratory distress syndrome and respiratory failure
- Acute kidney injury
- Hepatic failure

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8445772/>

Un modello proposto per spiegare la sindrome infiammatoria multisistemica nei bambini in neonati con anticorpi materni contro il SARS-CoV-2 prevede l'attivazione e la degranolazione dei mastociti mediante gli anticorpi contro il SARS-CoV-2 legati al recettore FcεR1, con un aumento dei livelli di istamina.⁶³

Il legame della proteina del nucleocapside del SARS-CoV-2 al promotore PTGS₂ potrebbe indurre il rilascio della prostaglandina E₂ (PGE₂) dai mastociti iperattivi come meccanismo alternativo che porta all'aumento dei livelli di istamina nei bambini più grandi e negli adulti.⁶⁴

⁶³ Graciano-Machuca O, Villegas-Rivera G, López-Pérez I, Macías-Barragán J, Sifuentes-Franco S. Multisystem Inflammatory Syndrome in Children (MIS-C) Following SARS-CoV-2 Infection: Role of Oxidative Stress. *Front Immunol.* 2021 Oct 19;12:723654. doi: 10.3389/fimmu.2021.723654. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8560690/>

Ricke DO. Hyperactivated Mast Cells Pathogenesis Hypothesis for COVID-19 Cutaneous Manifestations. *JID Innov.* 2021 Dec;1(4):100052. doi: 10.1016/j.xjidi.2021.100052. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8381631/>

Pérez-Gómez HR, Morfín-Otero R, González-Díaz E, Esparza-Ahumada S, León-Garnica G, Rodríguez-Noriega E. The Multifaceted Manifestations of Multisystem Inflammatory Syndrome during the SARS-CoV-2 Pandemic. *Pathogens.* 2022 May 8;11(5):556. doi: 10.3390/pathogens11050556. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9143280/>

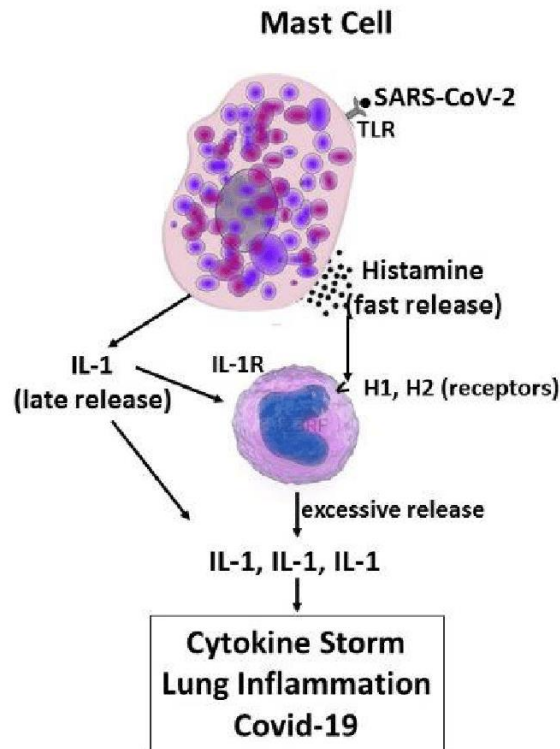
Theoharides TC, Conti P. COVID-19 and Multisystem Inflammatory Syndrome, or is it Mast Cell Activation Syndrome? *J Biol Regul Homeost Agents.* 2020 Sep-Oct;34(5):1633-1636. doi: 10.23812/20-EDIT3. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33023287/>

Consiglio CR, et al CACTUS Study Team, Landegren N, Palma P, Brodin P. The Immunology of Multisystem Inflammatory Syndrome in Children with COVID-19. *Cell.* 2020 Nov 12;183(4):968-981.e7. doi: 10.1016/j.cell.2020.09.016. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7474869/>

⁶⁴ Malone RW, et al COVID-19: Famotidine, Histamine, Mast Cells, and Mechanisms. *Front Pharmacol.* 2021 Mar 23;12:633680. doi: 10.3389/fphar.2021.633680. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8021898/>

Ricke DO. Hyperactivated Mast Cells Pathogenesis Hypothesis for COVID-19 Cutaneous Manifestations. *JID Innov.* 2021 Dec;1(4):100052. doi: 10.1016/j.xjidi.2021.100052. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8381631/>

Conti P, Caraffa A, Tetè G, Gallenga CE, Ross R, Kritas SK, Frydas I, Younes A, Di Emidio P, Ronconi G. Mast cells activated by SARS-CoV-2 release histamine which increases IL-1 levels causing cytokine storm and inflammatory reaction in COVID-19.



https://www.researchgate.net/publication/344315820_Mast_cells_activated_by_SARS-CoV-2_release_histamine_which_increases_IL-1_levels_causing_cytokine_storm_and_inflammatory_reaction_in_COVID-19

Si ritiene che i livelli aumentati di istamina impediscano il flusso sanguigno attraverso i capillari cardiaci per costrizione dei periciti, con un aumentato rischio di patologia cardiaca a causa della morte cellulare per anossia e aneurismi delle arterie coronarie, in conseguenza dell'aumento della pressione sanguigna.⁶⁵

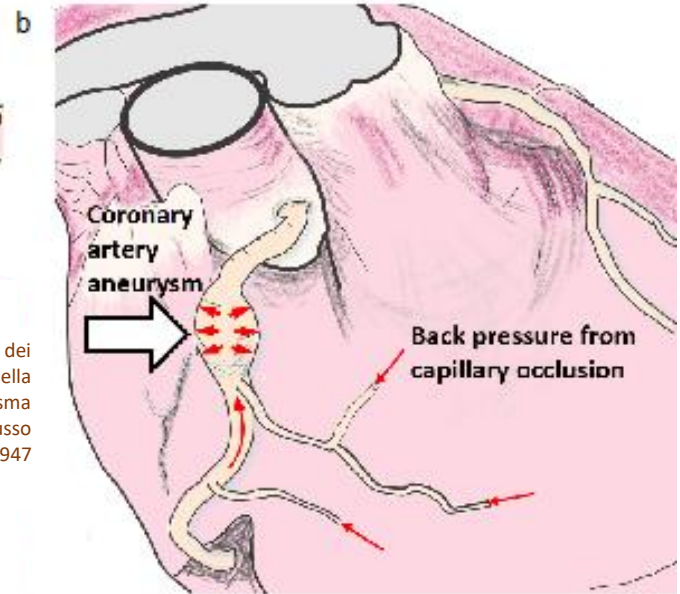
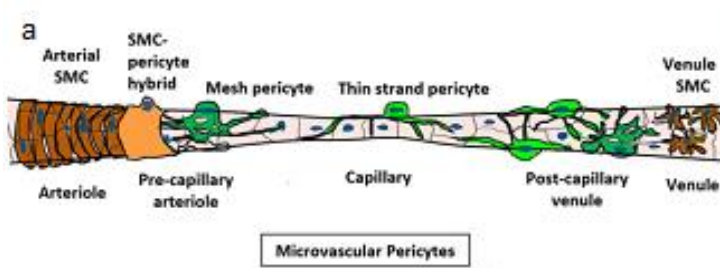
J Biol Regul Homeost Agents. 2020 Sep-Oct.;34(5):1629-1632. doi: 10.23812/20-2EDIT.
https://www.researchgate.net/publication/344315820_Mast_cells_activated_by_SARS-CoV-2_release_histamine_which_increases_IL-1_levels_causing_cytokine_storm_and_inflammatory_reaction_in_COVID-19

⁶⁵ Ricke DO, Gherlone N, Fremont-Smith P, Tisdall P, Fremont-Smith M. Kawasaki disease, multisystem inflammatory syndrome in children: antibody-induced mast cell activation hypothesis. J Pediatrics Pediatr Med. (2020) 4:1-7. 10.29245/2578-2940/2020/2.1157 <https://www.pediatricsresearchjournal.com/articles/kawasaki-disease-multisystem-inflammatory-syndrome-in-children-antibody-induced-mast-cell-activation-hypothesis.pdf>

Fremont-Smith M, Gherlone N, Smith N, Tisdall P, Ricke DO. Models for COVID-19 Early Cardiac Pathology Following SARS-CoV-2 Infection. Int J Infect Dis. 2021 Dec;113:331-335. doi: 10.1016/j.ijid.2021.09.052. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8473263/>

Etiology Models of Antibody Triggered Histamine Intolerance Inducing Kawasaki Disease and Multisystem Inflammatory Syndromes Diseases <https://doi.org/10.32388/52A6VH> <https://www.qeios.com/read/52A6VH/pdf>

Jiang L, Tang K, Levin M, Irfan O, Morris SK, Wilson K, Klein JD, Bhutta ZA. COVID-19 and multisystem inflammatory syndrome in children and adolescents. Lancet Infect Dis. 2020 Nov;20(11):e276-e288. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30651-4. Epub 2020 Aug 17. Erratum in: Lancet Infect Dis. 2022 Aug 5 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7431129/>



Modello di contropressione per aneurismi dell'arteria coronaria da clamping dei periciti capillari intra-miocardici post stimolazione con istamina. (a) Modello della regione microvascolare per l'occlusione delle cellule pericite (b) aneurisma dell'arteria coronaria causato dall'aumentata pressione dei capillari con flusso sanguigno impedito, (cf) COVID Digital Pathology Repository putativo COVID-1947 tessuti H&E del cuore dei pazienti con cellule effettrici contratte (freccie nere)

<https://www.pediatricsresearchjournal.com/articles/kawasaki-disease-multisystem-inflammatory-syndrome-in-children-antibody-induced-mast-cell-activation-hypothesis.html>

IL POTENZIAMENTO DIPENDENTE DALL'ANTICORPO DA VACCINO

La comprensione della struttura degli epitopi del SARS-CoV-2, in particolare all'interno della spike, ha fornito le informazioni essenziali per lo sviluppo di vaccini che dovrebbero favorire la produzione di anticorpi neutralizzanti piuttosto che anticorpi che potrebbero esacerbare la gravità dell'infezione con ADE.⁶⁶ In generale, è noto che i virus a RNA sono altamente suscettibili alle mutazioni casuali a causa della mancanza di attività di correzione delle bozze esonucleasiche delle RNA polimerasi RNA-dipendenti (RdRp) codificate dal virus,⁶⁷ con alcune eccezioni come i *Nidovirales* (a cui appartiene il genere Coronavirus). Per il SARS-CoV, è stata descritta un'attività esonucleasica con funzione di correzione delle bozze per nsp14 (ExoN) e una proteina nsp14 omologa che si trova anche nel SARS-CoV-2.⁶⁸ L'alto tasso di errore e la successiva rapida evoluzione delle popolazioni di virus, che potrebbero portare all'accumulo di mutazioni di amminoacidi, potrebbero influenzare la trasmissibilità del virus, il suo trofismo cellulare e anche la sua patogenicità.⁶⁹ Come si approfondirà nel capitolo dedicato alle varianti vaccino-

⁶⁶ Shrock E, Fujimura E, Kula T, et al. Viral epitope profiling of COVID-19 patients reveals cross-reactivity and correlates of severity. *Science*. 2020;370(6520):eabd4250. doi:10.1126/science.abd4250 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7857405/>

⁶⁷ Chen J, Wang R, Wang M, Wei GW. Mutations Strengthened SARS-CoV-2 Infectivity. *J Mol Biol*. 2020;432(19):5212-5226. doi:10.1016/j.jmb.2020.07.009 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7375973/>

⁶⁸ Pachetti M, Marini B, Benedetti F, et al. Emerging SARS-CoV-2 mutation hot spots include a novel RNA-dependent-RNA polymerase variant. *J Transl Med*. 2020;18(1):179. Published 2020 Apr 22. doi:10.1186/s12967-020-02344-6 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7174922/>

⁶⁹ Giovanetti M, Benedetti F, Campisi G, et al. Evolution patterns of SARS-CoV-2: Snapshot on its genome variants. *Biochem Biophys Res Commun*. 2021;538:88-91. doi:10.1016/j.bbrc.2020.10.102 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7836704/>

resistenti, la rapida selezione di mutanti indotta dalla vaccinazione può comportare un aumento del rischio di ADE per i vaccinati che contraggono successivamente l'infezione.

L'ADE rappresenta una reazione avversa particolarmente grave e potenzialmente fatale ancora in corso di approfondimento per l'infezione da SARS-Cov-2 e i suoi vaccini ⁷⁰, mentre è stata ampiamente studiata nel

⁷⁰ Lee, W.S., Wheatley, A.K., Kent, S.J. et al.

Antibody-dependent enhancement and SARS-CoV-2 vaccines and therapies.
Nat Microbiol 5, 1185–1191 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41564-020-00789-5>
<https://www.nature.com/articles/s41564-020-00789-5>

Arvin, A.M., Fink, K., Schmid, M.A. et al.

A perspective on potential antibody-dependent enhancement of SARS-CoV-2.
Nature 584, 353–363 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2538-8>
<https://www.nature.com/articles/s41586-020-2538-8>

Fan Wu, et al

Antibody-dependent enhancement (ADE) of SARS-CoV-2 infection in recovered COVID-19 patients: studies based on cellular and structural biology analysis
medRxiv 2020.10.08.20209114; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.10.08.20209114>
<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.10.08.20209114v1.full.pdf>

Wen J, Cheng Y, Ling R, Dai Y, Huang B, Huang W, Zhang S, Jiang Y.

Antibody-dependent enhancement of coronavirus.
Int J Infect Dis. 2020 Nov;100:483-489. doi: 10.1016/j.ijid.2020.09.015.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7483033/>

Fierz W, Walz B.

Antibody Dependent Enhancement Due to Original Antigenic Sin and the Development of SARS.
Front Immunol. 2020;11:1120. Published 2020 Jun 5. doi:10.3389/fimmu.2020.01120
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7291596/>

Wan Y, Shang J, Sun S, et al.

Molecular Mechanism for Antibody-Dependent Enhancement of Coronavirus Entry.
J Virol. 2020;94(5):e02015-19. Published 2020 Feb 14. doi:10.1128/JVI.02015-19
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7022351/>

de Alwis R, Chen S, Gan ES, Ooi EE.

Impact of immune enhancement on Covid-19 polyclonal hyperimmune globulin therapy and vaccine development.
EBioMedicine. 2020 May;55:102768. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102768
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7161485/>

Hotez PJ, Corry DB, Bottazzi ME.

COVID-19 vaccine design: the Janus face of immune enhancement.
Nat Rev Immunol. 2020 Jun;20(6):347-348. doi: 10.1038/s41577-020-0323-4.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7187801/>

Desheva, Yulia & Mamontov, Andrey & Nazarov, Peter

Contribution of antibody-dependent enhancement to the pathogenesis of coronavirus infections.
AIMS Allergy and Immunology.(2020).4. 50-59. 10.3934/Allergy.2020005.
https://www.researchgate.net/publication/344087225_Contribution_of_antibody-dependent_enhancement_to_the_pathogenesis_of_coronavirus_infections

Wang J and Zand MS.

The potential for antibody-dependent enhancement of SARS-CoV-2 infection: Translational implications for vaccine development.
Journal of Clinical and Translational Science, page 1 of 4. doi: 10.1017/cts.2020.39
<https://doi.org/10.1017/cts.2020.39>

Karthik K, Senthilkumar TMA, Udhayavel S, Raj GD.

Role of antibody-dependent enhancement (ADE) in the virulence of SARS-CoV-2 and its mitigation strategies for the development of vaccines and immunotherapies to counter COVID-19.
Hum Vaccin Immunother. 2020 Dec 1;16(12):3055-3060. doi: 10.1080/21645515.2020.1796425.
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21645515.2020.1796425>

Peron JPS, Nakaya H.

Susceptibility of the Elderly to SARS-CoV-2 Infection: ACE-2 Overexpression, Shedding, and Antibody-dependent Enhancement (ADE).
Clinics (Sao Paulo). 2020;75:e1912. doi:10.6061/clinics/2020/e1912
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7213670/>

Jennifer K DeMarco, MSc, William E Severson, PhD, Daniel R DeMarco, PhD, Jon Gabbard, PhD, Kenneth E Palmer, PhD,

Activation of Macrophages Enhances Susceptibility to SARS-CoV-2 Antibody-Dependent Enhancement and Promotes Damage to Downstream Epithelial Cells,
Open Forum Infectious Diseases, Volume 7, Issue Supplement_1, October 2020, Page S319, <https://doi.org/10.1093/ofid/ofaa439.701>
https://academic.oup.com/ofid/article/7/Supplement_1/S319/6057001

Garber K.
Coronavirus vaccine developers wary of errant antibodies.
Nat Biotechnol. 2020 Jun 5. doi: 10.1038/d41587-020-00016-w.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32641838/>

Cegolon L, Pichierri J, Mastrangelo G, et al.
Hypothesis to explain the severe form of COVID-19 in Northern Italy.
BMJ Glob Health. 2020;5(6):e002564. doi:10.1136/bmjgh-2020-002564
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7295427/>

Negro F.
Is antibody-dependent enhancement playing a role in COVID-19 pathogenesis?
Swiss Med Wkly. 2020 Apr 16;150:w20249. doi: 10.4414/sm.w.2020.20249.
<https://smw.ch/article/doi/smw.2020.20249>

Wan Y, Shang J, Sun S, Tai W, Chen J, Geng Q, He L, Chen Y, Wu J, Shi Z, Zhou Y, Du L, Li F.
Molecular Mechanism for Antibody-Dependent Enhancement of Coronavirus Entry.
J Virol. 2020 Feb 14;94(5):e02015-19. doi: 10.1128/JVI.02015-19.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7022351/>

Bournazos S, Gupta A, Ravetch JV.
The role of IgG Fc receptors in antibody-dependent enhancement.
Nat Rev Immunol. 2020 Oct;20(10):633-643. doi: 10.1038/s41577-020-00410-0.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32782358/>

Ulrich H, Pillat MM, Tárnok A.
Dengue Fever, COVID-19 (SARS-CoV-2), and Antibody-Dependent Enhancement (ADE): A Perspective.
Cytometry A. 2020 Jul;97(7):662-667. doi: 10.1002/cyto.a.24047.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7300451/>

Zhou Y, et al
Enhancement versus neutralization by SARS-CoV-2 antibodies from a convalescent donor associate with distinct epitopes on the RBD.
Cell Rep. 2021 Feb 2;34(5):108699. doi: 10.1016/j.celrep.2021.108699.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7802522/>

Zohar T, Alter G.
Dissecting antibody-mediated protection against SARS-CoV-2.
Nat Rev Immunol. 2020 Jul;20(7):392-394. doi: 10.1038/s41577-020-0359-5.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7278217/>

Mohamed Khosroshahi L, Rokni M, Mokhtari T, Noorbakhsh F.
Immunology, immunopathogenesis and immunotherapeutics of COVID-19; an overview.
Int Immunopharmacol. 2021;93:107364. doi:10.1016/j.intimp.2020.107364
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7784533/>

Yang L, Liu S, Liu J, et al.
COVID-19: immunopathogenesis and Immunotherapeutics.
Signal Transduct Target Ther. 2020;5(1):128. Published 2020 Jul 25. doi:10.1038/s41392-020-00243-2
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7381863/>

Ebrahimi N, Aslani S, Babaie F, et al.
Recent findings on the Coronavirus disease 2019 (COVID-19); immunopathogenesis and immunotherapeutics.
Int Immunopharmacol. 2020;89(Pt B):107082. doi:10.1016/j.intimp.2020.107082
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7547582/>

Seneff, S., & Nigh, G.
Worse Than the Disease? Reviewing Some Possible Unintended Consequences of the mRNA Vaccines Against COVID-19.
International Journal of Vaccine Theory, Practice, and Research, 2(1), 38–79. <https://doi.org/10.56098/ijvtpr.v2i1.23> (Original work published May 10, 2021)
<https://dpbh.nv.gov/uploadedFiles/dpbhngov/content/Boards/BOH/Meetings/2021/SENEFF~1.PDF>

Eroshenko, N., Gill, T., Keaveney, M.K. et al.
Implications of antibody-dependent enhancement of infection for SARS-CoV-2 countermeasures.
Nat Biotechnol 38, 789–791 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0577-1>
<https://www.nature.com/articles/s41587-020-0577-1>

meccanismo biologico perché è stata riscontrata nel corso degli studi preclinici con i vaccini contro il SARS-Cov-1 ⁷¹, la MERS ⁷², la Dengue ⁷³, lo Zika virus ⁷⁴, l'Ebola ⁷⁵, l'HIV ⁷⁶, l'influenza stagionale ⁷⁷,

⁷¹ Yip MS, Leung HL, Li PH, Cheung CY, Dutry I, Li D, Daëron M, Bruzzone R, Peiris JS, Jaume M. Antibody-dependent enhancement of SARS coronavirus infection and its role in the pathogenesis of SARS. *Hong Kong Med J.* 2016 Jun;22(3 Suppl 4):25-31. <https://www.hkmj.org/system/files/hkm1603sp4p25.pdf>

Jaume M, Yip MS, Kam YW, Cheung CY, Kien F, Roberts A, Li PH, Dutry I, Escriu N, Daeron M, Bruzzone R, Subbarao K, Peiris JS, Nal B, Altmeyer R. SARS CoV subunit vaccine: antibody-mediated neutralisation and enhancement. *Hong Kong Med J.* 2012 Feb;18 Suppl 2:31-6. <https://www.hkmj.org/system/files/hkm1202sp2p31.pdf>

Jaume M, Yip MS, Cheung CY, Leung HL, Li PH, Kien F, Dutry I, Callendret B, Escriu N, Altmeyer R, Nal B, Daëron M, Bruzzone R, Peiris JS. Anti-severe acute respiratory syndrome coronavirus spike antibodies trigger infection of human immune cells via a pH- and cysteine protease-independent FcγR pathway. *J Virol.* 2011 Oct;85(20):10582-97. doi: 10.1128/JVI.00671-11. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3187504/>

Wang SF, Tseng SP, Yen CH, Yang JY, Tsao CH, Shen CW, Chen KH, Liu FT, Liu WT, Chen YM, Huang JC. Antibody-dependent SARS coronavirus infection is mediated by antibodies against spike proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014 Aug 22;451(2):208-14. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.07.090. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7092860/>

⁷² Wan Y, Shang J, Sun S, Tai W, Chen J, Geng Q, He L, Chen Y, Wu J, Shi Z, Zhou Y, Du L, Li F. Molecular Mechanism for Antibody-Dependent Enhancement of Coronavirus Entry. *J Virol.* 2020 Feb 14;94(5):e02015-19. doi: 10.1128/JVI.02015-19. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7022351/>

⁷³ Wan Y, Shang J, Sun S, et al. Molecular Mechanism for Antibody-Dependent Enhancement of Coronavirus Entry. *J Virol.* 2020;94(5):e02015-19. Published 2020 Feb 14. doi:10.1128/JVI.02015-19 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7022351/>

Halstead SB. Dengue Antibody-Dependent Enhancement: Knowns and Unknowns. *Microbiol Spectr.* 2014 Dec;2(6). doi: 10.1128/microbiolspec.AID-0022-2014. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26104444/>

Halstead SB. Vaccine-Associated Enhanced Viral Disease: Implications for Viral Vaccine Development. *BioDrugs.* 2021 Sep;35(5):505-515. doi: 10.1007/s40259-021-00495-6. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8427162/>

⁷⁴ Marques ETA, Drexler JF. Complex Scenario of Homotypic and Heterotypic Zika Virus Immune Enhancement. *mBio.* 2019;10(5):e01849-19. Published 2019 Sep 3. doi:10.1128/mBio.01849-19 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6722417/>

⁷⁵ Kuzmina NA, Younan P, Gilchuk P, Santos RI, Flyak AI, Ilinykh PA, Huang K, Lubaki NM, Ramanathan P, Crowe JE Jr, Bukreyev A. Antibody-Dependent Enhancement of Ebola Virus Infection by Human Antibodies Isolated from Survivors. *Cell Rep.* 2018 Aug 14;24(7):1802-1815.e5. doi: 10.1016/j.celrep.2018.07.035. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6697154/>.

⁷⁶ Shmelkov E, Nadas A, Cardozo T. Could vaccination with AIDS VAX immunogens have resulted in antibody-dependent enhancement of HIV infection in human subjects? *Hum Vaccin Immunother.* 2014;10(10):3013-6. doi: 10.4161/21645515.2014.972148. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5443089/>

⁷⁷ Winarski KL, Tang J, Klenow L, Lee J, Coyle EM, Manischewitz J, Turner HL, Takeda K, Ward AB, Golding H, Khurana S. Antibody-dependent enhancement of influenza disease promoted by increase in hemagglutinin stem flexibility and virus fusion kinetics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019 Jul 23;116(30):15194-15199. doi: 10.1073/pnas.1821317116. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6660725/>

Mamontov A, Losev I, Korzhhevskii D, Guselnikova V, Polevshchikov A, Desheva Y. Study of Antibody-Dependent Reactions of Mast Cells In Vitro and in a Model of Severe Influenza Infection in Mice. *Front Immunol.* 2021 Jul 14;12:689436. doi: 10.3389/fimmu.2021.689436. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8317171/>

Ramakrishnan B, Viswanathan K, Tharakaraman K, Dančik V, Raman R, Babcock GJ, Shriver Z, Sasisekharan R.

il virus sinciziale respiratorio ⁷⁸, il morbillo ⁷⁹, nonché per infezioni batteriche.⁸⁰

Table 1 Key characteristics of antibody-dependent enhancement (ADE) infected by different viruses.

Virus	Main Host	Types of ADE	Clinical manifestations of ADE	Enhancing epitopes location	Impact of vaccine application
Dengue virus	Humans, Primate, Aedes	1.FcR mediated virus-antibody immune complexes infect monocytes, macrophages, and dendritic cells 2.Through FcR, LILR-B1 regulates the host's antiviral response, inhibits the innate response mediated by the TLR signaling pathway, disrupts the RIG-I/MDA-5 signal cascade, and induces IL-10 production	1. Increased susceptibility to other serotypes 2. Increased viral infection and association with severe dengue fever (DHF/DSS) 3. Infants born to dengue fever-immunized mothers, serious diseases that may be infected when maternal antibodies are reduced	prM protein, E protein DII-FL region	Vaccine raises the risk of ADE for DENV infection.Sero-negative dengue vaccinators are at increased risk of severe dengue, and WHO recommends vaccination only for sero-positive dengue
SRAS-CoV	Rhinolophus sinicus, Paguma larvatas, Humans	FcR-ADE(mainly mediated by FcγRII)	May be related to severe lymphopenia	Spike protein	Infection after immunization may cause severe acute lung injury (ALI)

A Structural and Mathematical Modeling Analysis of the Likelihood of Antibody-Dependent Enhancement in Influenza. Trends Microbiol. 2016 Dec;24(12):933-943. doi: 10.1016/j.tim.2016.09.003. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5526082/>

⁷⁸ Jamrozik E, Heriot G, Bull S, Parker M Oxford-Johns Hopkins Global Infectious Disease Ethics (GLIDE). Vaccine-enhanced disease: case studies and ethical implications for research and public health. Wellcome Open Res. 2021;6:154. Published 2021 Jun 16. doi:10.12688/wellcomeopenres.16849.1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8250497/>

⁷⁹ Banoun H. Measles and Antibody-Dependent Enhancement (ADE): History and Mechanisms. Explor Res Hypothesis Med. Published online: Apr 29, 2022. doi: 10.14218/ERHM.2022.00018. <https://www.xiahepublishing.com/2472-0712/ERHM-2022-00018>

Iankov ID, Pandey M, Harvey M, Griesmann GE, Federspiel MJ, Russell SJ. Immunoglobulin g antibody-mediated enhancement of measles virus infection can bypass the protective antiviral immune response. J Virol. 2006;80(17):8530-8540. doi:10.1128/JVI.00593-06 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1563851/>

Iankov ID, Penheiter AR, Griesmann GE, Carlson SK, Federspiel MJ, Galanis E. Neutralization capacity of measles virus H protein specific IgG determines the balance between antibody-enhanced infectivity and protection in microglial cells. Virus Res. 2013 Mar;172(1-2):15-23. doi: 10.1016/j.virusres.2012.12.002. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3612881/>

⁸⁰ Torres VVL, Coggon CF, Wells TJ. Antibody-Dependent Enhancement of Bacterial Disease: Prevalence, Mechanisms, and Treatment. Infect Immun. 2021 Mar 17;89(4):e00054-21. doi: 10.1128/IAI.00054-21. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8090947/>

Influenza virus	Humans,Pigs, Birds, Ferrets	FcR-ADE	Increased risk of a (H1N1) pdm09 disease	HA,NA	1.Trivalent inactivated influenza vaccine (TIV) in 2008-09 increased risk of a (H1N1) pdm09 disease 2. The vaccine may be associated with vaccine associated enhanced respiratory disease (VAERD)
Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome	Pigs	FcR-ADE (Including FcγRI,FcγRII,FcγRIII, FCεRI)	Promote virus infection and enhance clinical symptoms, Increase the level and duration of viremia	GP5,N Protein	Infected with prrsv after immunization with inactivated vaccine, clinical symptoms increased
Human immunodeficiency virus	Humans	1.FcR-ADE (Including FcγRI,FcγRII,FcγRIII, FCαR) , FcR promotes virus entry by enhancing adhesion to CD4 receptor 2.CR3, C1q complement mediated ADE	1.ADE and plasma viral load is positive correlation. ADE accelerates immunosuppression and disease progression 2.Enhancing antibodies is beneficial to the emergence of ADE susceptible mutants	N-terminal immune dominant domain of gp41, gp120	One of the factors affecting vaccine development,higher rates of infection/risk among vaccinees were observed in RV144 clinical trials, but have not been confirmed to be directly associated with ADE
West Nile virus	Horses, Humans,Birds	1.Fcγ receptor dependent ADE 2.CR3 dependent ADE	Increased viral infectivity	Domain I and domain II of the E protein	No vaccine has been marketed. Plasma samples of human WNV infection during rehabilitation can enhance ZIKV infection in vitro and in vivo
Respiratory syncytial virus	Humans	FcR mediate the uptake of viruses into monocytes, macrophages, and dendritic cells, leading to enhanced infection	ADE infection leads to activation of Th2 response and increased expression of TNF-α and IL-6, resulting in aggravated disease ADE infection of lung dendritic cells (DCs) can negatively regulate the function of DC cells, resulting in impaired T cell activation	Glycoproteins G and F	Formalin inactivated RSV vaccine recipients have increased disease and even led to death

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8438590/table/t0010/>

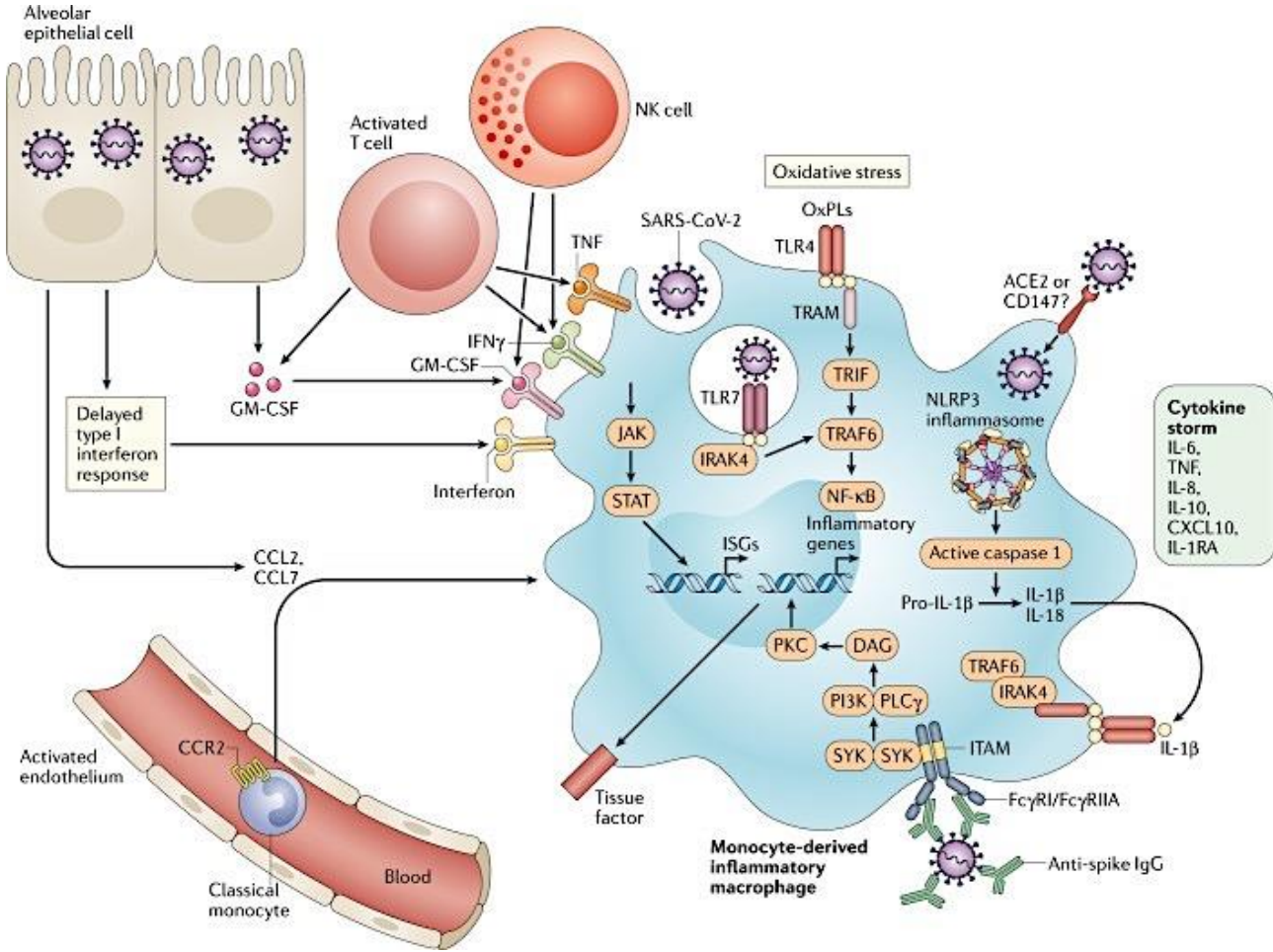
Il potenziamento dipendente dall'anticorpo in seguito alla vaccinazione può svilupparsi tramite più di un meccanismo molecolare, che verrà approfondito in seguito, ma si può riassumere adesso in questo modo: una parte dei vaccinati sono predisposti dalla vaccinazione proprio a manifestare le complicazioni gravi e fatali della malattia dalla quale si vogliono proteggere.

Quando il virus si lega ad anticorpi non neutralizzanti forma immunocomplessi che riescono ad entrare nelle cellule del sistema immunitario (macrofagi, mastociti ect) attraverso il legame con i recettori Fc (γ o ε), causando l'infezione delle cellule stesse, come già visto per l'ADE da infezione.

In particolare, quando il vaccinato s'infetta successivamente (oppure ha un'infezione asintomatica/cronica all'atto della vaccinazione) con una variante del SARS-Cov-2, il virus entra più agevolmente nei macrofagi attraverso il recettore Fc-γ e li infetta, e quindi anziché venire processato per essere presentato alle altre cellule del sistema immunitario, da un lato inibisce il segnale degli IFN di tipo I e dall'altro consente l'espressione pro-infiammatoria di IL-1, IL-6 e TNF-α, contribuendo alla sindrome della tempesta di citochine e al potenziamento fatale della malattia.

In questi casi lo sviluppo della malattia respiratoria acuta coincide con la sierconversione * IgG antivirale.

* La produzione di anticorpi specifici, rilevabili nel sangue, in risposta a infezione o a immunizzazione. Con sierconversione si intende nello specifico il cambiamento del risultato del test sierologico da negativo a positivo, indicando la presenza di anticorpi.



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7201395/>

Possibili vie che contribuiscono all'iperattivazione dei macrofagi derivati dai monociti e all'iperinfiammazione nella COVID-19.

Diversi meccanismi probabilmente contribuiscono all'iperattivazione dei macrofagi derivati dai monociti che si osserva nei pazienti con COVID-19.

La produzione ritardata di interferone di tipo I che porta a effetti citopatici potenziati e un maggiore rilevamento delle minacce microbiche promuove il rilascio potenziato di monociti chemioattrattivi da parte delle cellule epiteliali alveolari (e probabilmente anche da parte di macrofagi e cellule stromali), portando a un reclutamento prolungato di monociti del sangue nei polmoni. I monociti si differenziano in macrofagi pro-infiammatori attraverso l'attivazione del trasduttore del segnale Janus chinasi (JAK) e l'attivatore delle vie di trascrizione (STAT). Le cellule natural killer attivate (NK) e le cellule T promuovono ulteriormente il reclutamento e l'attivazione di macrofagi derivati da monociti attraverso la produzione del fattore stimolante le colonie granulociti-macrofagi (GM-CSF), fattore di necrosi tumorale (TNF) e interferone-γ (IFNγ). I fosfolipidi ossidati (OxPLs) si accumulano nei polmoni infetti e attivano i macrofagi derivati dai monociti attraverso la via del recettore Toll-like 4 (TLR4) –TRAF6 – NF-κB.

Il rilevamento del virus può innescare l'attivazione di TLR7 attraverso il riconoscimento dell'RNA a filamento singolo virale. È possibile che gli interferoni di tipo I inducano l'espressione dei recettori di ingresso del coronavirus 2 (SARS-CoV-2) della sindrome respiratoria acuta grave, consentendo al virus di accedere al citoplasma dei macrofagi e di attivare l'inflammasoma NLRP3, che porta alla secrezione di IL-1β maturo e / o IL-18. IL-1β può amplificare l'attivazione dei macrofagi derivati dai monociti in modo autocrino o paracrino, ma può anche ridurre la produzione di interferone di tipo I nei polmoni infetti. Il coinvolgimento dei recettori Fcγ (FcγRs) da parte degli immunocomplessi IgG della proteina anti-spike può contribuire all'aumento dell'attivazione infiammatoria dei macrofagi derivati dai monociti. I macrofagi derivati dai monociti attivati contribuiscono alla tempesta di citochine COVID-19 rilasciando enormi quantità di citochine pro-infiammatorie. CCL, CC-chemochina ligando; CXCL10, CXC-chemochina ligando 10; ISG, gene stimolato dall'interferone; ITAM, motivo di attivazione basato sulla tirosina degli immunorecettori; TRAM, molecola adattatore correlata a TRIF.

Molti dei virus associati all'ADE presentano un meccanismo di fusione tra l'involucro virale e la membrana cellulare,⁸¹ e per l'influenza A H1N1, gli anticorpi anti-HA2 cross-reattivi indotti dal vaccino in un modello suino promuovono la fusione delle membrane causando la malattia respiratoria potenziata associata al vaccino (VAERD)⁸².

Come già detto sopra, l'ADE è stato osservato in più modelli animali di SARS-CoV-1 e i tentativi di creare vaccini per SARS-CoV-1 hanno portato all'immunopatologia polmonare (infiltrazione eosinofila) nei challenge test in modelli murini e di primati non umani⁸³.

È stato osservato anche un aumento di epatiti in un modello di furetto con un vaccino ricombinante con vaccinia virus Ankara (rMVA) che esprime la proteina Spike del SARS-CoV-1; è noto infatti che il SARS-CoV

⁸¹ Smatti MK, Al Thani AA, Yassine HM. Viral-Induced Enhanced Disease Illness. *Front Microbiol.* 2018 Dec 5;9:2991. doi: 10.3389/fmicb.2018.02991. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6290032/>

⁸² Khurana S, Loving CL, Manischewitz J, King LR, Gauger PC, Henningson J, Vincent AL, Golding H. Vaccine-induced anti-HA2 antibodies promote virus fusion and enhance influenza virus respiratory disease. *Sci Transl Med.* 2013 Aug 28;5(200):200ra114. doi: 10.1126/scitranslmed.3006366. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23986398/>

⁸³ Tseng CT, Sbrana E, Iwata-Yoshikawa N, Newman PC, Garron T, Atmar RL, Peters CJ, Couch RB. Immunization with SARS coronavirus vaccines leads to pulmonary immunopathology on challenge with the SARS virus. *PLoS One.* 2012;7(4):e35421. doi: 10.1371/journal.pone.0035421. Epub 2012 Apr 20. Erratum in: *PLoS One.* 2012;7(8). doi:10.1371/annotation/2965cfae-b77d-4014-8b7b-236e01a35492. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3335060/>

Bolles M, Deming D, Long K, Agnihothram S, Whitmore A, Ferris M, Funkhouser W, Gralinski L, Tatura A, Heise M, Baric RS. 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 Dec;85(23):12201-15. doi: 10.1128/JVI.06048-11. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3209347/>

Wang Q, Zhang L, Kuwahara K, Li L, Liu Z, Li T, Zhu H, Liu J, Xu Y, Xie J, Morioka H, Sakaguchi N, Qin C, Liu G. Immunodominant SARS Coronavirus Epitopes in Humans Elicited both Enhancing and Neutralizing Effects on Infection in Non-human Primates. *ACS Infect Dis.* 2016 May 13;2(5):361-76. doi: 10.1021/acsinfecdis.6b00006. Epub 2016 Apr 11. Erratum in: *ACS Infect Dis.* 2020 May 8;6(5):1284-1285. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7075522/>

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/>

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/>

Jaume M, Yip MS, Kam YW, Cheung CY, Kien F, Roberts A, Li PH, Dutry I, Escriou N, Daeron M, Bruzzone R, Subbarao K, Peiris JS, Nal B, Altmeyer R. SARS CoV subunit vaccine: antibody-mediated neutralisation and enhancement. *Hong Kong Med J.* 2012 Feb;18 Suppl 2:31-6. <https://www.hkmj.org/system/files/hkm1202sp2p31.pdf>

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

Jaume M, Yip MS, Cheung CY, et al. Anti-severe acute respiratory syndrome coronavirus spike antibodies trigger infection of human immune cells via a pH- and cysteine protease-independent FcγR pathway. *J Virol.* 2011;85(20):10582-10597. doi:10.1128/JVI.00671-11 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3187504/>

può infettare gli epatociti e causare epatiti nell'uomo e questo studio ha riscontrato un aumento del danno epatico negli animali reinfezzati nel challenge test post-vaccinale.⁸⁴

Jaume et al.⁸⁵ sottolineano i possibili pericoli associati alle vaccinazioni contro la proteina Spike del SARS-CoV-1 a causa dell'infezione mediata dai recettori Fc delle cellule immunitarie, e ciò porta alla previsione che i vaccini contro il SARS-CoV-1⁸⁶, MERS-CoV⁸⁷ o vaccini anti SARS-CoV-2 hanno rischi più elevati di indurre l'ADE negli esseri umani in caso di reinfezione post-vaccinale,⁸⁸ indipendentemente dalla tecnologia del vaccino⁸⁹ o dal tipo di farmaco di precisione (es. anticorpo monoclonale) selezionato⁹⁰.

I vaccini COVID-19 possono indurre il potenziamento della malattia associata al vaccino (VADE), con la produzione di titoli non ottimali e non protettivi di anticorpi neutralizzanti o con l'induzione di una risposta pro-infiammatoria di tipo 2 dei T-helper.

In secondo luogo, potrebbe manifestarsi una malattia respiratoria potenziata (ERD), in cui i sintomi polmonari sono più gravi a causa dell'infiltrazione monocitica ed eosinofila peribronchiale.⁹¹

⁸⁴ Weingartl H, et al

Immunization with modified vaccinia virus Ankara-based recombinant vaccine against severe acute respiratory syndrome is associated with enhanced hepatitis in ferrets.

J Virol. 2004 Nov;78(22):12672-6. doi: 10.1128/JVI.78.22.12672-12676.2004.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC525089/>

⁸⁵ Jaume M,

Anti-severe acute respiratory syndrome coronavirus spike antibodies trigger infection of human immune cells via a pH- and cysteine protease-independent FcγR pathway.

J Virol. 2011 Oct;85(20):10582-97. doi: 10.1128/JVI.00671-11.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3187504/>

⁸⁶ Graham RL, Donaldson EF, Baric RS.

A decade after SARS: strategies for controlling emerging coronaviruses.

Nat Rev Microbiol. 2013;11(12):836-848. doi:10.1038/nrmicro3143

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5147543/>

⁸⁷ Agrawal AS, et al

Immunization with inactivated Middle East Respiratory Syndrome coronavirus vaccine leads to lung immunopathology on challenge with live virus.

Hum Vaccin Immunother. 2016 Sep;12(9):2351-6. doi: 10.1080/21645515.2016.1177688.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5027702/>

⁸⁸ Ricke DO.

Two Different Antibody-Dependent Enhancement (ADE) Risks for SARS-CoV-2 Antibodies.

Front Immunol. 2021;12:640093. Published 2021 Feb 24. doi:10.3389/fimmu.2021.640093

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7943455/>

⁸⁹ Rauch S, Jasny E, Schmidt KE, Petsch B.

New Vaccine Technologies to Combat Outbreak Situations.

Front Immunol. 2018;9:1963. Published 2018 Sep 19. doi:10.3389/fimmu.2018.01963

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6156540/>

Badgular KC, Badgular VC, Badgular SB.

Vaccine development against coronavirus (2003 to present): An overview, recent advances, current scenario, opportunities and challenges.

Diabetes Metab Syndr. 2020;14(5):1361-1376. doi:10.1016/j.dsx.2020.07.022

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7371592/>

⁹⁰ Wan Y, Shang J, Sun S, Tai W, Chen J, Geng Q, He L, Chen Y, Wu J, Shi Z, Zhou Y, Du L, Li F.

Molecular Mechanism for Antibody-Dependent Enhancement of Coronavirus Entry.

J Virol. 2020 Feb 14;94(5):e02015-19. doi: 10.1128/JVI.02015-19.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7022351/>

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/>

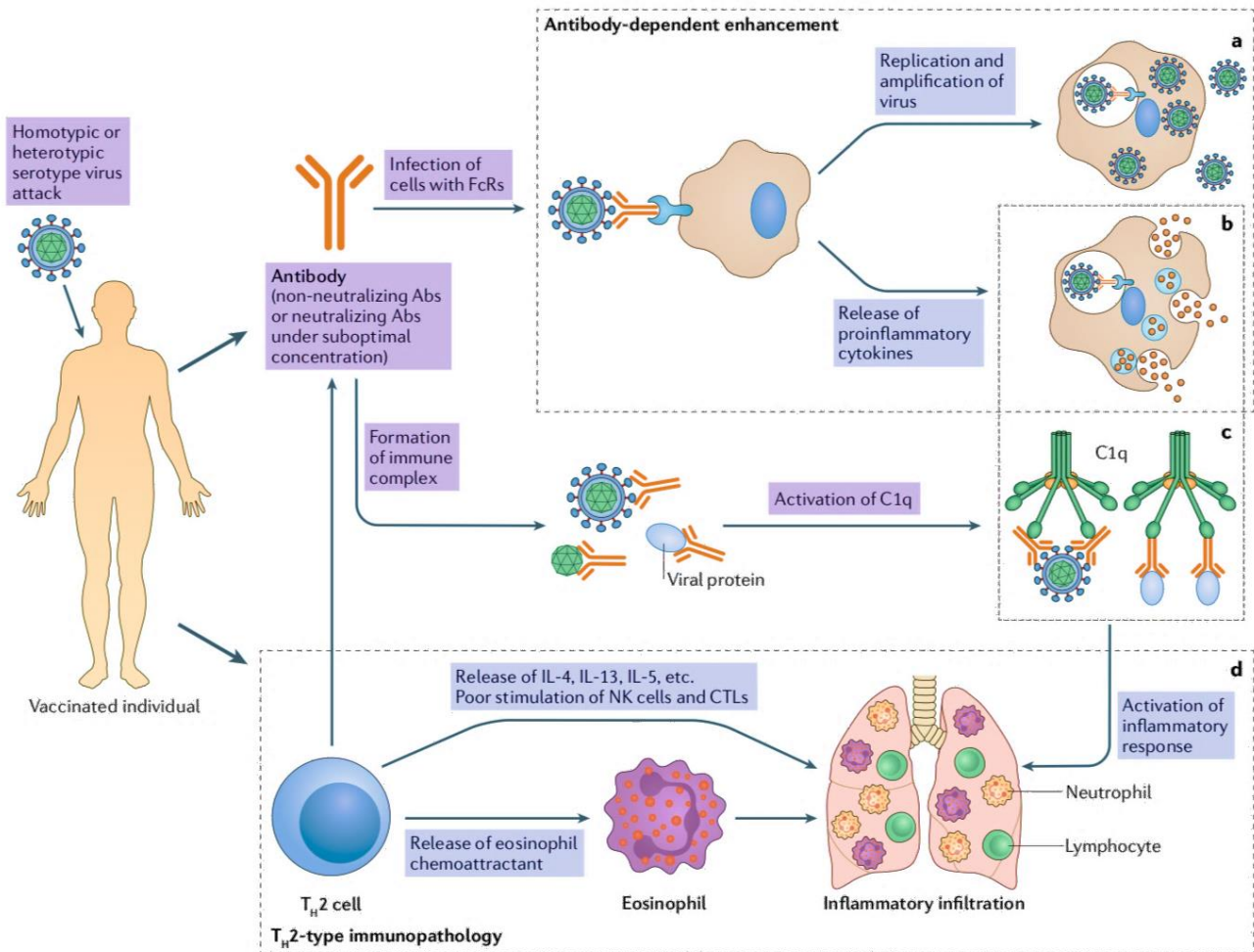
⁹¹ Halstead SB, Katzelnick L.

COVID-19 Vaccines: Should We Fear ADE?

J Infect Dis. 2020;222(12):1946-1950. doi:10.1093/infdis/jiaa518

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7454712/>

Infatti, studi con vaccini inattivati contro il SARS-CoV e vaccini contro il virus respiratorio sinciziale hanno riportato il VADE tramite una risposta cellulare Th2 e un'infiltrazione eosinofila polmonare, che può essere peggiorata nei vaccinati anziani.⁹²



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7566580/>

Meccanismi del potenziamento della malattia associata al vaccino.

La vaccinazione induce la risposta immunitaria umorale e cellulare negli individui immunizzati. In condizioni normali, quando il virus omologo entra in un corpo immunizzato, sarà neutralizzato o eliminato rispettivamente dagli anticorpi neutralizzanti indotti dal vaccino (Abs) o dalle cellule T specifiche. Nel contesto del potenziamento della malattia associata al vaccino, i vaccini inducono principalmente Abs non neutralizzanti o titoli bassi di Abs neutralizzanti (concentrazione subottimale) o risposte delle cellule T helper di tipo 2 (cellule TH2) -orientate. Quando questi individui vaccinati sono infettati da virus sierotipici omotipici o eterotipici, gli anticorpi riconosceranno immediatamente i virus e medieranno l'esacerbazione della malattia anticorpo-dipendente in due modi. In primo luogo, i complessi virus-anticorpo potrebbero entrare nelle cellule portatrici del recettore Fc (FcR), come le cellule dendritiche e i monociti, attraverso l'internalizzazione mediata da FcR, che è chiamata "potenziamento dipendente dall'anticorpo" (ADE). Per i virus con trofismo innato per le cellule portatrici di FcR, come il virus della dengue, l'ADE produrrà cariche virali più elevate rispetto alle condizioni senza anticorpi.

a) Dopo l'ingresso, il virus, indipendentemente dal fatto che si replica o non si replica, può attivare una risposta immunitaria dannosa, con conseguente rilascio di citochine proinfiammatorie.

b) A parte l'ADE, i complessi anticorpo-antigene possono stimolare la via del complemento attraverso l'attivazione della via C1q, rafforzando così ulteriormente le risposte infiammatorie

c) Il potenziamento della malattia associata al vaccino può anche comportare una risposta immunitaria Th2-orientata. Le cellule Th2 attivate contribuiscono all'attivazione della produzione di anticorpi. Tuttavia, rilasciano interleuchina-4 (IL-4), IL-13 e IL-5, nonché agenti chemiotattici eosinofili, con conseguente infiltrazione di eosinofili e produzione di citochine proinfiammatorie nel polmone.

d) Le cellule natural killer (NK) e i linfociti T citotossici CD8⁺ (CTL) sono scarsamente stimolati nelle risposte immunitarie orientate dalle cellule Th2. Il rilascio esagerato di citochine (parte b), l'attivazione della via del complemento (parte c) e l'eccessiva mobilitazione degli eosinofili contribuiscono all'infiltrazione del polmone da parte di eosinofili, neutrofili e linfociti e alla produzione di citochine infiammatorie (parte d), che porta a danno polmonare acuto o sindrome da distress respiratorio acuto.

⁹² Su S, Du L, Jiang S.

Learning from the past: development of safe and effective COVID-19 vaccines.

Nat Rev Microbiol. 2021;19(3):211-219. doi:10.1038/s41579-020-00462-y

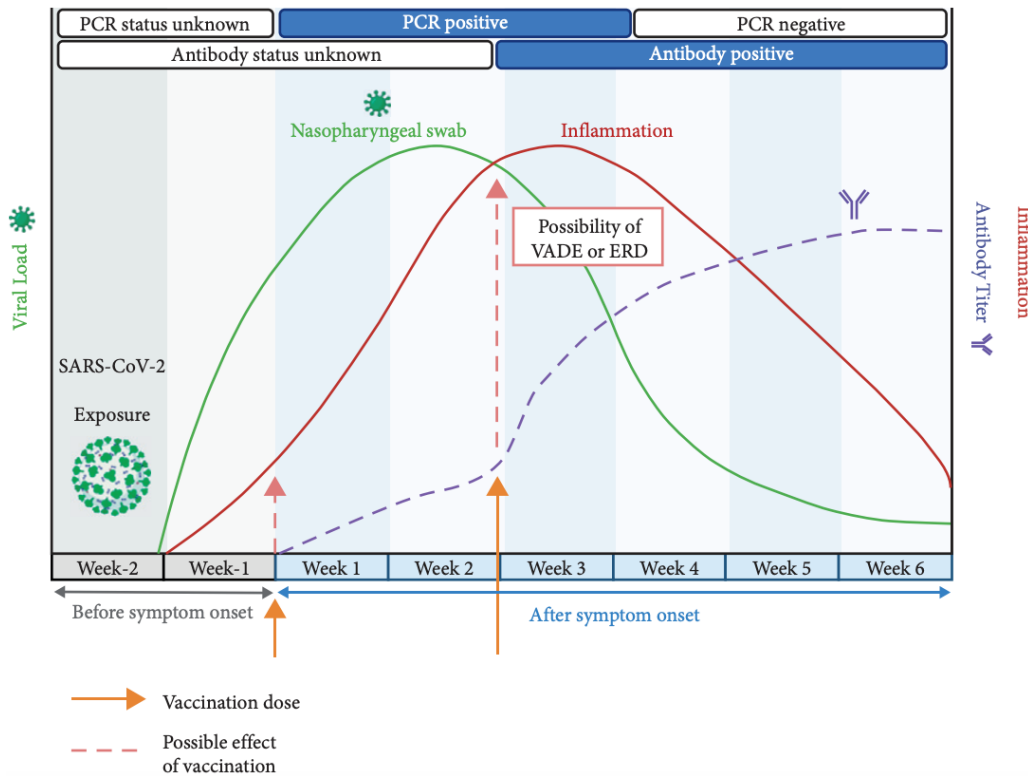
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7566580/>

Tunjungputri et al⁹³ hanno riportato due casi di pazienti ricoverati con polmonite COVID-19 confermata con una storia di vaccinazione recente con CoronaVac. Il primo paziente con un decorso relativamente più lieve della malattia aveva ricevuto due dosi di CoronaVac, mentre il secondo paziente con un decorso più progressivo della malattia aveva ricevuto solo una dose prima di sviluppare i sintomi ed essere ricoverato in ospedale e ciò ha portato all'ipotesi che la vaccinazione possa aver potenziato il processo infiammatorio e slatentizzato la malattia COVID-19 precedentemente asintomatica.

Gli autori suggeriscono quindi di valutare se i destinatari del vaccino sono infetti da SARS-CoV-2 anche in forma asintomatica, in quanto la somministrazione del vaccino può aggravare l'infiammazione e la progressione della malattia e consigliano, in caso di conferma d'infezione da SARS-Cov-2, di controllare il titolo anticorpale prima della vaccinazione in quanto gli anticorpi neutralizzanti mediano l'ADE se in concentrazioni subottimali.⁹⁴

Tuttavia, attualmente vi è una mancanza di conoscenza sui livelli dei titoli anticorpali di base e sul livello minimo di anticorpi neutralizzanti che conferirebbero protezione contro COVID-19.

Gli studi riportano che gli anticorpi neutralizzanti sono rilevabili a partire dal giorno 10 e raggiungono il picco alla 3^a settimana (IgG) e alla 4^a (IgM),⁹⁵ e nei pazienti dello studio caso-controllo citato, le vaccinazioni erano state eseguite a meno di 3 settimane dalla misurazione dei titoli anticorpali, rafforzando ulteriormente l'idea che gli anticorpi neutralizzanti non erano stati ancora formati in modo ottimale, ponendo il rischio di VADE o ERD.



⁹³ Tunjungputri RN, Tetraswi EN, Veronica M, Pandelaki J, Ibrahim F, Nelwan EJ. Vaccine-Associated Disease Enhancement (VADE): Considerations in Postvaccination COVID-19. Case Rep Med. 2021;2021:9673453. Published 2021 Oct 29. doi:10.1155/2021/9673453 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8570879/>

⁹⁴ Fan Wu, et al. Antibody-dependent enhancement (ADE) of SARS-CoV-2 infection in recovered COVID-19 patients: studies based on cellular and structural biology analysis medRxiv 2020.10.08.20209114; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.10.08.20209114> <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.10.08.20209114v1.full.pdf>

⁹⁵ Ni L et al. Detection of SARS-CoV-2-Specific Humoral and Cellular Immunity in COVID-19 Convalescent Individuals. Immunity. 2020 Jun 16;52(6):971-977.e3. doi: 10.1016/j.immuni.2020.04.023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7196424/>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8570879/pdf/CRIM2021-9673453.pdf>

Una sequenza temporale schematica degli eventi che mostra l'esposizione a SARS-CoV-2, lo stato della PCR, la somministrazione del vaccino, lo sviluppo di sintomi, infiammazione e possibilità di miglioramento della malattia associata al vaccino (VADE) e malattia respiratoria potenziata (ERD). Dopo l'esposizione a SARS-CoV-2, può verificarsi infiammazione (linea rossa) fino all'insorgenza dei sintomi. Durante questo periodo, la risposta infiammatoria può essere amplificata dalla presenza di VADE o ERD (freccia rosa) quando il paziente era già stato esposto a vaccinazioni (freccia arancione).

I vaccini con un alto rischio di indurre VADE o ERD includono i vaccini virali inattivati, come il CoronaVac, che potrebbero coinvolgere bersagli antigenici non neutralizzanti e/o la proteina S in conformazioni non neutralizzanti per anticorpi in grado di indurre una maggiore infiammazione.⁹⁶

In particolare, per quanto riguarda l'impatto del processo di produzione degli antigeni vaccinali nel rischio di ADE, è stato dimostrato che il trattamento con formaldeide della spike vaccinale porta alla reticolazione in questa proteina in modo tale che circa la metà dei trimeri si trova in una conformazione "RBD up", nota anche come conformazione di prefusione.

Bloccando la conformazione "up" con la formaldeide, i trimeri non sono più liberi di assumere entrambe le conformazioni, e quindi gli epitopi neutralizzanti dell'RBD avranno probabilmente un'immunogenicità inferiore a causa della loro esposizione ridotta nella metà dei trimeri.

Di conseguenza, i titoli anticorpali sviluppati contro il SARS-CoV-2 da un vaccino trattato con formaldeide possono essere sub-neutralizzanti verso i virus circolanti.

Inoltre, è stato riscontrato che l'epitopo della proteina spike responsabile dell'AED (vedi figure seguenti) osservato in uno studio preclinico sul vaccino SARS-CoV-1 inattivato con formaldeide⁹⁷, è presente anche in SARS-CoV-2.

La sequenza amminoacidica dell'epitopo ADE è LYQDVNC e si trova in S₅₉₇₋₆₀₃ nella proteina spike di SARS-CoV-1 e S₆₁₁₋₆₁₇ nella proteina spike del SARS-CoV-2.

Anche l'inattivazione con il beta-propiolattone ad alte concentrazioni del SARS-CoV-2 provoca aggregazione virale e modificazione chimica degli amminoacidi virali con la perdita di potenziale antigenico⁹⁸.

Infine, i vaccini proteici che utilizzano linee cellulari non umane per produrre la proteina di interesse, potrebbero generare proteine virali con modelli di glicosilazione diversi da quelli prodotti durante l'infezione naturale.

Grant et al. hanno scoperto che i glicani ricoprono circa il 40% della superficie della proteina spike del SARS-CoV-2, come si approfondirà nella sezione dedicata alla Glicobiologia delle infezioni virali, con implicazioni per il legame al complesso dell'antigene leucocitario umano (HLA) e le conseguenti risposte immunitarie antigene-specifiche.⁹⁹

⁹⁶ Lee WS, Wheatley AK, Kent SJ, DeKosky BJ.

Antibody-dependent enhancement and SARS-CoV-2 vaccines and therapies. *Nat Microbiol.* 2020 Oct;5(10):1185-1191. doi: 10.1038/s41564-020-00789-5. <https://www.nature.com/articles/s41564-020-00789-5>

⁹⁷ Wang Q, Zhang L, Kuwahara K, Li L, Liu Z, Li T, Zhu H, Liu J, Xu Y, Xie J, Morioka H, Sakaguchi N, Qin C, Liu G.

Immunodominant SARS Coronavirus Epitopes in Humans Elicited both Enhancing and Neutralizing Effects on Infection in Non-human Primates. *ACS Infect Dis.* 2016 May 13;2(5):361-76. doi: 10.1021/acsinfecdis.6b00006. Epub 2016 Apr 11. Erratum in: *ACS Infect Dis.* 2020 May 8;6(5):1284-1285. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7075522/>

⁹⁸ Gupta D, Parthasarathy H, Sah V, et al.

Inactivation of SARS-CoV-2 by β -propiolactone causes aggregation of viral particles and loss of antigenic potential. *Virus Res.* 2021;305:198555. doi:10.1016/j.virusres.2021.198555 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8416322/>

⁹⁹ Grant OC, Montgomery D, Ito K, Woods RJ.

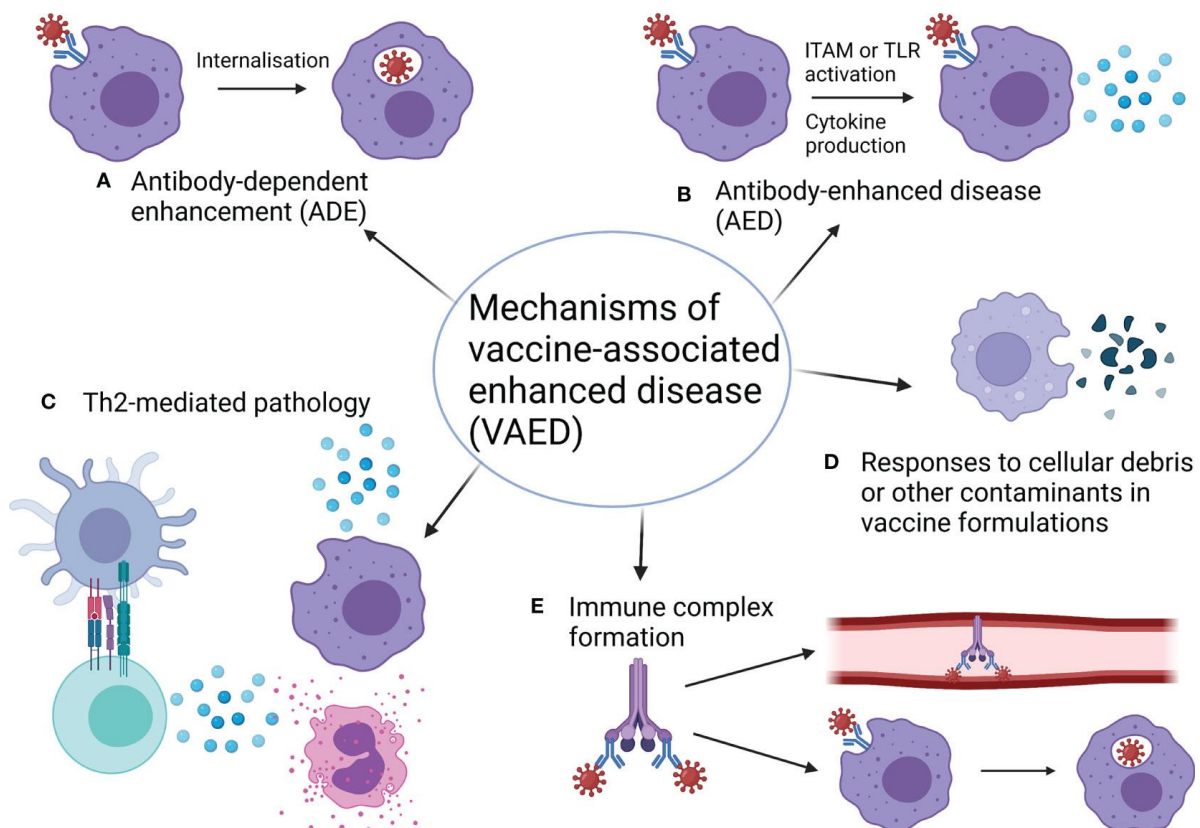
Analysis of the SARS-CoV-2 spike protein glycan shield reveals implications for immune recognition. *Sci Rep.* 2020 Sep 14;10(1):14991. doi: 10.1038/s41598-020-71748-7. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7490396/>

Molti antigeni del vaccino antinfluenzale sono prodotti nelle uova di gallina fecondate, ed è stato riscontrato che un sito di glicosilazione nell'influenza H3N2 altera il legame degli anticorpi in modo tale che vengono indotte risposte neutralizzanti deboli sia nei furetti che nell'uomo.¹⁰⁰

Poiché i modelli di glicosilazione differenziale tra antigeni vaccinali e antigeni wild-type possono indurre anticorpi debolmente neutralizzanti in risposta a particolari epitopi, questa è un'altra preoccupazione teorica per il VAED, qualora l'agente patogeno in questione risulti in grado di facilitare l'ADE o l'AED.¹⁰¹

In alcuni studi si distingue tra ADE e AED per chiarire meglio il meccanismo biologico. In questi casi, il potenziamento anticorpo-dipendente (ADE) si verifica quando gli anticorpi aumentano la capacità di un virus di infettare le cellule.

La malattia potenziata dagli anticorpi (AED) si verifica quando gli anticorpi esacerbano l'infiammazione, con conseguente patologia.



<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.882972/full>

Meccanismi della malattia potenziata associata al vaccino. **(A)** Il potenziamento anticorpo-dipendente (ADE) si verifica quando gli anticorpi aumentano la capacità di un virus di infettare le cellule (vedere anche la Figura 2 di seguito). **(B)** La malattia potenziata dagli anticorpi (AED) si verifica quando gli anticorpi esacerbano l'infiammazione, con conseguente patologia (vedere anche la Figura 2). **(C)** Le risposte Th2 distorte possono essere patologiche per alcune infezioni e quindi i vaccini che inducono risposte Th2 in questo caso possono causare patologie. Solitamente la patologia Th2 è associata all'infiltrazione di eosinofili. **(D)** I componenti delle formulazioni del vaccino come l'albumina sierica bovina (BSA) e i detriti cellulari possono mediare le risposte cellulari patologiche a questi componenti quando vengono incontrati di nuovo come contaminanti nel materiale di prova. Sebbene questi componenti vengano normalmente rimossi durante la preparazione del vaccino, alcuni studi preclinici non hanno incluso fasi di lavaggio e centrifugazione appropriate per facilitare ciò. **(E)** Gli immunocomplessi tra proteine virali, anticorpi e/o complemento possono portare a un accumulo di depositi nei vasi sanguigni e negli organi o facilitare una maggiore captazione del virus attraverso le cellule mieloidi, causando l'ADE.

¹⁰⁰ Zost SJ, Parkhouse K, Gumina ME, et al.

Contemporary H3N2 influenza viruses have a glycosylation site that alters binding of antibodies elicited by egg-adapted vaccine strains.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2017;114(47):12578-12583. doi:10.1073/pnas.1712377114

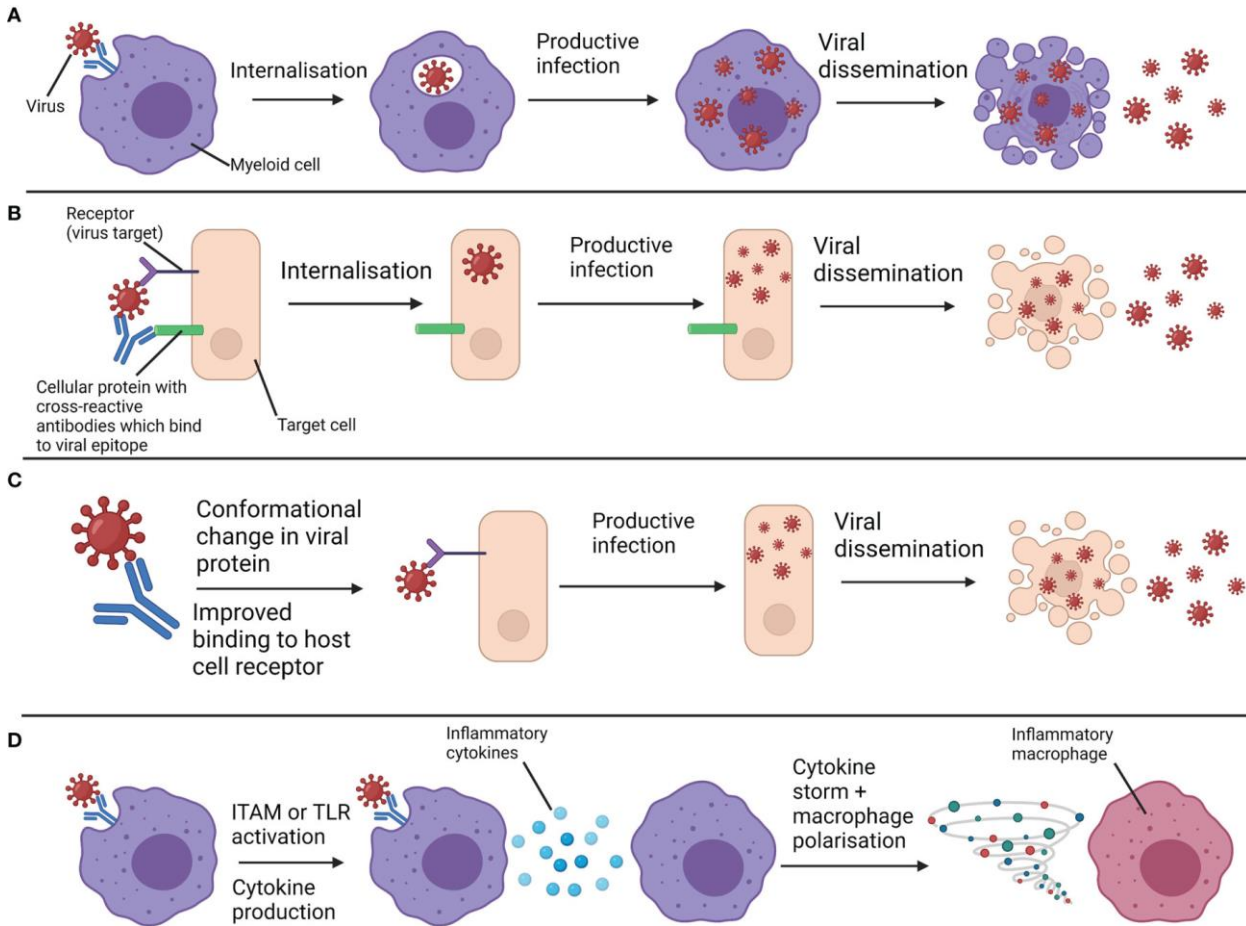
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5703309/>

¹⁰¹ Gartlan C, Tipton T, Salguero FJ, Sattentau Q, Gorringer A, Carroll MW.

Vaccine-Associated Enhanced Disease and Pathogenic Human Coronaviruses.

Front Immunol. 2022;13:882972. doi:10.3389/fimmu.2022.882972

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9014240/>



<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.882972/full>

Panoramica del potenziamento anticorpo-dipendente (ADE) e della malattia potenziata dagli anticorpi (AED). (A) Gli anticorpi non neutralizzanti o le concentrazioni di anticorpi sub-neutralizzanti si legano ai virus e interagiscono con i recettori Fc sulle cellule mieloidi. Ciò facilita l'interiorizzazione dei virus. I virus che possono infettare in modo produttivo le cellule mieloidi possono proliferare e diffondersi dopo il loro assorbimento, migliorando l'infezione. Questa è una forma di ADE. (B) Gli anticorpi cross-reattivi si legano sia al virus che ai componenti della cellula ospite, portando i virus a stretto contatto con il loro recettore. Seguono l'assorbimento mediato dai recettori e l'aumento dell'infezione. Questa è un'altra forma di ADE. (C) Gli anticorpi contro un particolare epitopo determinano un cambiamento conformazionale in una proteina virale che migliora l'infezione attraverso un migliore legame con il recettore della cellula ospite. Questa è un'altra forma di ADE. (D) Gli anticorpi legati al virus interagiscono con i recettori Fc sulle cellule mieloidi e attivano i motivi di attivazione a base di tirosina degli immunorecettori (ITAM) associati a questi recettori, o facilitano l'assorbimento virale e la successiva attivazione dei recettori a pedaggio endosomiale (TLR). Attraverso uno di questi meccanismi, vengono prodotte citochine e chemochine infiammatorie, esacerbando l'infiammazione in misura patologica e polarizzando le cellule mieloidi verso fenotipi più infiammatori. Queste sono forme di ADE. L'infezione produttiva delle cellule mieloidi non è richiesta per questo meccanismo.

Un report preliminare del dr. Farshi, ha riportato gli esiti dell'infezione da SARS CoV-2 in 33 scimmie verdi africane vaccinate e 200 cavie con vaccini a mRNA contro il SARS CoV-2: due di queste scimmie e 9 topi hanno manifestato una tempesta di citochine (aumento di IL-6) con immunopatologia polmonare (ARDS).¹⁰² Il dr. Farshi osserva che le aziende di vaccini di solito cercano di ottenere la massima immunità nei polmoni delle persone vaccinate, perché il polmone è l'organo più critico per la forma grave della COVID-19. Tuttavia, questo approccio non considera che la COVID-19 grave-fatale è indotta dalla tempesta di citochine, portando ad un errore negli studi sugli effetti dei vaccini noto come "bias del velivolo sopravvissuto" per

¹⁰² Cytokine Storm Response to COVID-19 Vaccinations

Esmaeil F, J Cytokine Biol 2020, 6:

<https://www.omicsonline.org/open-access-pdfs/cytokine-storm-response-to-covid19-vaccinations.pdf>

Khan WH, Hashmi Z, Goel A, Ahmad R, Gupta K, Khan N, Alam I, Ahmed F, Ansari MA. COVID-19 Pandemic and Vaccines Update on Challenges and Resolutions.

Front Cell Infect Microbiol. 2021 Sep 10;11:690621. doi: 10.3389/fcimb.2021.690621.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8461057/>

un'analogia con gli aerei militari, in cui lo studio dei danni si concentra sui sopravvissuti alla forma grave (in questo caso il danno polmonare) e non sulla causa dei decessi (tempesta di citochine).

Se si valuta invece la sindrome da tempesta di citochine in seguito al challenge test, i risultati indicano un'incidenza significativa (circa il 6% per le scimmie e 4.5% per le cavie), che estrapolati sulla popolazione mondiale, di cui oltre il 65% vaccinata con almeno una dose,¹⁰³ portano ad un numero stimato delle forme gravi-fatali per potenziamento della malattia estremamente allarmante).

A conferma di questa preoccupazione, è stato riportato su Science (agosto 2021) che il 60% dei pazienti israeliani gravemente malati di COVID-19 è stato vaccinato con il vaccino BNT162b2, e ciò potrebbe essere considerato una forma potenziale di ADE. Allo stesso modo, il 70% dei nuovi casi israeliani di COVID-19 è stato segnalato, almeno una volta, nelle persone vaccinate, a conferma che la guarigione da una precedente infezione da SARS-Cov-2 è più protettiva contro l'infezione dalle varianti rispetto alla vaccinazione.¹⁰⁴

È stato inoltre descritto un caso controllo che ha presentato una risposta immunologica anormale al vaccino BNT162b2 quale potenziale causa predisponente per una mortalità accelerata indotta dall'infezione da SARS CoV-2.¹⁰⁵

Ulteriori studi pubblicati più recentemente che indagano sul meccanismo biologico dell'ADE supportano l'aumento del rischio di ADE nei vaccinati in seguito a infezione da SARS-Cov-2.¹⁰⁶

Approfondimento

Dott. Mauro Mantovani¹⁰⁷

Sistema Immunitario e Linfociti T **Video**

I linfociti T e l'immunità eterologa e della memoria verso SARS -Cov-2 **Video**

A.D.E. e Sistema immunitario **Video**

Covid-19, fenomeno ADE e proteina SPIKE **Video**

La memoria immunologica **ppt**

Vaccini Covid-19 e Immunità **ppt**

¹⁰³ Hannah Ritchie, et al (2020) - "Coronavirus Pandemic (COVID-19)". Published online at OurWorldInData.org. Retrieved from: <https://ourworldindata.org/coronavirus> [Online Resource] <https://ourworldindata.org/covid-vaccinations>

¹⁰⁴ A grim warning from Israel: vaccination blunts, but does not defeat delta
16 AUG 2021 Science doi: 10.1126/science.abl9630
<https://www.science.org/content/article/grim-warning-israel-vaccination-blunts-does-not-defeat-delta>

Mizrahi B, Lotan R, Kalkstein N, Peretz A, Perez G, Ben-Tov A, Chodick G, Gazit S, Patalon T.
Correlation of SARS-CoV-2-breakthrough infections to time-from-vaccine.
Nat Commun. 2021 Nov 4;12(1):6379. doi: 10.1038/s41467-021-26672-3.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8569006/>

¹⁰⁵ Hansen T, Titze U, Kulamadayil-Heidenreich NSA, Glombitza S, Tebbe JJ, Röcken C, Schulz B, Weise M, Wilkens L.
First case of postmortem study in a patient vaccinated against SARS-CoV-2.
Int J Infect Dis. 2021 Jun;107:172-175. doi: 10.1016/j.ijid.2021.04.053.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8051011/>

¹⁰⁶ Danchin A, Pagani-Azizi O, Turinici G, Yahiaoui G.
COVID-19 Adaptive Humoral Immunity Models: Weakly Neutralizing Versus Antibody-Disease Enhancement Scenarios.
Acta Biotheor. 2022 Aug 13;70(4):23. doi: 10.1007/s10441-022-09447-1.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35962852/>

Hirschbühl K, et al
High viral loads: what drives fatal cases of COVID-19 in vaccinees? - an autopsy study.
Mod Pathol. 2022 Aug;35(8):1013-1021. doi: 10.1038/s41379-022-01069-9.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8974809/>

¹⁰⁷ Istituto di Medicina Biologica <https://www.imbio.it/>

Valutazione del rischio di ADE per i vaccini anti-SARS-Cov-2

L'uso del concetto di ADE per denotare una maggiore gravità della malattia deve essere rigorosamente differenziato dall'ADE dell'infezione, cioè dal legame, assorbimento e replicazione del virus, dal rilascio di citochine o altre attività di anticorpi rilevati *in vitro*.¹⁰⁸

Il primo principio per assegnare il potenziale di ADE è che un effetto anticorpo-dipendente *in vitro* non rappresenta o predice l'ADE come malattia senza la prova di un ruolo dell'anticorpo nella patogenesi di un esito clinico più grave.

Un secondo principio è che i modelli animali per la valutazione degli anticorpi policlonali umani o degli anticorpi monoclonali (mAbs) dovrebbero essere valutati con cautela, perché gli FcR reclutati dalle IgG sono specie specifici, così come l'attivazione del complemento.

Gli anticorpi possono avere proprietà molto diverse negli animali, che non sono predittive di quelle nell'ospite umano, perché le funzioni effettrici degli anticorpi sono modificate dalle diverse interazioni specie-specifiche tra l'anticorpo e le cellule immunitarie. Gli animali possono anche sviluppare anticorpi contro un anticorpo terapeutico che ne limitano l'efficacia o causano immunopatologia.

Inoltre, la patogenesi di un ceppo di virus in un modello animale non riflette pienamente l'infezione umana perché la maggior parte dei virus è altamente specie specifica. Queste differenze possono supportare in maniera errata gli effetti protettivi o immunopatologici dei vaccini e degli anticorpi.

Un terzo principio è che la natura della risposta anticorpale dipende dalla forma della proteina virale riconosciuta dal sistema immunitario, determinando così quali epitopi vengono presentati. Gli anticorpi protettivi e non protettivi possono essere indotti da diverse forme della stessa proteina.

Un quarto principio è che i meccanismi di patogenesi nell'ospite umano differiscono sostanzialmente tra i virus, o anche tra i ceppi di un particolare virus. Pertanto, i risultati relativi agli effetti degli anticorpi passivi o dell'immunità indotta dal vaccino non possono essere estrapolati con sicurezza da un patogeno virale a un altro.

Nella tabella seguente sono riassunte le Informazioni fornite e i limiti degli approcci per la valutazione della protezione mediata da anticorpi contro il SARS-CoV-2 e il rischio di potenziamento della malattia anticorpo-dipendente.

¹⁰⁸ Arvin AM, et al

A perspective on potential antibody-dependent enhancement of SARS-CoV-2.
Nature. 2020 Aug;584(7821):353-363. doi: 10.1038/s41586-020-2538-8.
<https://www.nature.com/articles/s41586-020-2538-8.pdf>

Test modality	Information provided	Limitations
In vitro: cell culture Infect relevant human cells with or without antibodies	Virus neutralization Virus uptake, productive infection or cytokines	Cell lines lack primary cell receptor characteristics Primary human cells are difficult to culture and have donor variability • Receptor expression must be maintained
In vivo: animal models Infection of animals with or without antibody or vaccine intervention	Protection against or increase of viral replication or disease	Lack of disease models of human illness Lack of models predictive of enhanced disease in humans Viral replication as a proxy of disease requires clinical validation Need to assess T cells for contribution to pathology or reducing ADE With human mAbs: • Differential engagement of animal FcγRs • Different expression patterns of FcγRs in humans and animals • Potential generation of anti-human antibodies
Human: clinical and epidemiological studies	Correlations of outcomes with • Previous HCoV infection • Treatment with plasma from convalescent patients • Kinetics of adaptive immune responses	No markers to differentiate severe disease from enhanced disease Limited knowledge of antibody or T cell epitope specificities during natural SARS-CoV-2 or other HCoV infection, and of outcomes of infection with new coronaviruses

<https://www.nature.com/articles/s41586-020-2538-8.pdf>

Oltre ai limiti presentati sopra dello studio nei modelli animali per la valutazione del rischio di ADE, va fatto notare che negli studi preclinici dei vaccini contro il SARS-Cov-2 sono stati prevalentemente utilizzati primati non umani, che non manifestano le complicazioni gravi/fatali del Covid-19¹⁰⁹, e il challenge test è stato effettuato con il virus infettivo che presenta la stessa sequenza (o molto simile) di riferimento della spike dei costrutti vaccinali attualmente in commercio, e quindi non consente di valutare correttamente né l'efficacia né il rischio di ADE in caso d'infezione con varianti vaccinoresistenti.¹¹⁰

Va ricordato che, nonostante dal punto di vista dei sintomi l'ADE da vaccino non è distinguibile dall'ADE da COVID-19, è noto da evidenze con altri vaccini che inducono il potenziamento della malattia, che l'ADE da vaccino si presenta con una caratteristica immunopatologia polmonare con infiltrazione di eosinofili e quindi è possibile fare una diagnosi differenziale dei due processi patologici.¹¹¹

¹⁰⁹ Kanduc D.

Lack of Molecular Mimicry between Nonhuman Primates and Infectious Pathogens: The Possible Genetic Bases. *Glob Med Genet.* 2021;8(1):32-37. doi:10.1055/s-0041-1724106 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7964256/>

Kanduc D.

Lack of Molecular Mimicry between Nonhuman Primates and Infectious Pathogens: The Possible Genetic Bases. *Glob Med Genet.* 2021 Mar;8(1):32-37. doi: 10.1055/s-0041-1724106. Epub 2021 Feb 19. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7499017/>

¹¹⁰ COVID-19 il vaccino aggiornamento pag.93

¹¹¹ Complicazioni respiratorie – immunopatologia pag. 47

Ad oggi sono disponibili solo alcuni studi molto parziali *in vitro* e *in vivo*¹¹² che ne suggeriscono il rischio sull'uomo. Nonostante già a marzo 2020 sia stata posta la questione all'attenzione dell'EMA da parte della Coalition for Epidemic Preparedness Innovations (CEPI) e la Brighton Collaboration (BC) Safety Platform for Emergency vACCines (SPEAC)¹¹³ non sono ad oggi disponibili risultati utili da parte delle agenzie regolatorie. Se per l'ADE da vaccino i produttori non hanno ancora pubblicato studi affidabili, per quanto riguarda la COVID-19 gli studi finora disponibili suggeriscono che le complicazioni gravi/fatali associate all'infezione da SARS-Cov-2 siano una conseguenza dell'ADE.

L'ADE spiega perché sono a maggior rischio gli anziani rispetto ai bambini (purché non presentino anticorpi materni contro il SARS-Cov-2, perché in tal caso possono essere suscettibili di ADE in caso di infezione¹¹⁴) e gli adulti sani, in quanto possiedono una quantità maggiore di anticorpi non neutralizzanti provenienti da infezioni da coronavirus o da vaccinazioni (ad es. antinfluenzali) meno recenti, e presentano un sistema immunitario poco efficiente nel combattere le infezioni.

Ne segue che il Sars-Cov-2, per la sua capacità di formare quasispecie, può concretamente essere responsabile del fenomeno del potenziamento della malattia nei vaccinati, che andava necessariamente indagato ed escluso prima di procedere con la sperimentazione sull'uomo.¹¹⁵

Cardozo et al. nell'articolo "*Informed consent disclosure to vaccine trial subjects of risk of COVID-19 vaccines worsening clinical disease*"¹¹⁶ sottolineano che i dati attuali sui vaccini COVID-19 sono limitati ma non rivelano prove di ADE della malattia: gli studi sui primati non umani del vaccino mRNA-1273 di Moderna hanno mostrato un'eccellente protezione senza immunopatologia rilevabile *¹¹⁷.

* vedi Criticità degli studi preclinici per un approfondimento sugli errori metodologici a pag 79

¹¹² Dapeng Li, et al

The functions of SARS-CoV-2 neutralizing and infection-enhancing antibodies in vitro and in mice and nonhuman primates
bioRxiv 2020.12.31.424729; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.12.31.424729>
<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.12.31.424729v1.full>

Zhou Y, Liu Z, Li S, et al.

Enhancement versus neutralization by SARS-CoV-2 antibodies from a convalescent donor associates with distinct epitopes on the RBD.
Cell Rep. 2021;34(5):108699. doi:10.1016/j.celrep.2021.108699
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7802522/>

Fan Wu, et al

Antibody-dependent enhancement (ADE) of SARS-CoV-2 infection in recovered COVID-19 patients: studies based on cellular and structural biology analysis
medRxiv 2020.10.08.20209114; doi:<https://doi.org/10.1101/2020.10.08.20209114>
<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.10.08.20209114v1>

¹¹³ Lambert PH, Ambrosino DM, Andersen SR, et al.

Consensus summary report for CEPI/BC March 12-13, 2020 meeting: Assessment of risk of disease enhancement with COVID-19 vaccines.
Vaccine. 2020;38(31):4783-4791. doi:10.1016/j.vaccine.2020.05.064
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7247514/>

¹¹⁴ Ricke DO.

Two Different Antibody-Dependent Enhancement (ADE) Risks for SARS-CoV-2 Antibodies.
Front Immunol. 2021 Feb 24;12:640093. doi: 10.3389/fimmu.2021.640093.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7943455/>

¹¹⁵ Su S, Du L, Jiang S.

Learning from the past: development of safe and effective COVID-19 vaccines.
Nat Rev Microbiol. 2021;19(3):211-219. doi:10.1038/s41579-020-00462-y
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7566580/>

¹¹⁶ Cardozo T, Veazey R.

Informed consent disclosure to vaccine trial subjects of risk of COVID-19 vaccines worsening clinical disease [published online ahead of print, 2020 Oct 28]. Int J Clin Pract. 2020;e13795. doi:10.1111/ijcp.13795
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7645850/pdf/IJCP-9999-e13795.pdf>

¹¹⁷ Corbett KS, Flynn B, Foulds KE, et al.

Evaluation of the mRNA-1273 Vaccine against SARS-CoV-2 in Nonhuman Primates.
N Engl J Med. 2020;383(16):1544-1555. doi:10.1056/NEJMoa2024671
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7449230/>

Gli studi di fase 1 di diversi vaccini non hanno riportato alcuna immunopatologia nei soggetti a cui erano stati somministrati i vaccini candidati, anche se è improbabile che questi soggetti si fossero infettati con virus circolanti.¹¹⁸

Gli autori evidenziano però che tutti gli studi preclinici fino ad oggi sono stati eseguiti con il virus Wuhan-Hu-1 o ceppi strettamente correlati, mentre il mutante D614G era la forma circolante più diffusa e diverse osservazioni suggeriscono che questa forma alternativa possa essere distinta dal punto di vista antigenico dal ceppo originale di Wuhan, non tanto nella composizione, ma nella conformazione della spike virale e nell'esposizione degli epitopi di neutralizzazione.

Allo stesso modo, le sperimentazioni cliniche di fase 1 e 2 dei vaccini candidati sono state progettate solo per verificare l'immunogenicità (cioè la formazione di anticorpi vaccinali) come endpoint di efficacia e non per valutare l'effetto dell'esposizione dei soggetti al virus circolante dopo la vaccinazione, che è quando si prevede che si verifichi l'ADE/immunopatologia.

Pertanto, l'assenza di prove di ADE nei dati sulla sperimentazione dei vaccini COVID-19 fino ad ora, non esime i ricercatori dall'informare del rischio del potenziamento della malattia ai partecipanti agli studi clinici del vaccino, in quanto rappresenta un rischio realistico e non teorico per i soggetti.

I moduli per il consenso informato delle sperimentazioni sul vaccino COVID-19 non sono disponibili al pubblico per ragioni di privacy. Inoltre, variano da un sito clinico all'altro e i moduli di consenso del campione su cui si basano non devono essere divulgati fino al termine della sperimentazione, o neppure dopo.

Tuttavia, questi moduli di consenso sono solitamente identici nel contenuto alla sezione "Rischi per i partecipanti" dei protocolli di prova, che sono stati rilasciati pubblicamente da Pfizer, Moderna e Johnson & Johnson per i loro studi sul vaccino COVID-19 (¹¹⁹ e Supplemento).

Poiché questi tre vaccini sono rappresentativi della diversità dei vaccini in fase di test, è molto probabile che il modulo di consenso desunto da questi protocolli sia simile o identico a quelli di tutti gli studi sui vaccini attualmente in corso.

Tutti e tre i protocolli citano il rischio di potenziamento della malattia da parte del vaccino, ma tutti e tre elencano questo rischio per ultimo o penultimo nell'elenco dei rischi, dopo i rischi del vettore Ad26-Cov2, i vettori dell'adenovirus in generale, i rischi della vaccinazione in generale, rischi per la gravidanza e il controllo delle nascite (che si dice siano "sconosciuti"), rischi di prelievi di sangue e rischi derivanti dalla raccolta di campioni di tamponi nasali (per il vaccino J&J), dopo allergia, svenimento, reazione di iniezione nel sito locale, reazioni avverse sistemiche generali e anomalie di laboratorio per il vaccino Moderna, e dopo reazioni di iniezione nel sito locale ed eventi avversi sistemici generali per il vaccino Pfizer.

Inoltre, sia Moderna che J&J definiscono "teorico" il rischio di potenziamento della malattia provocato dal vaccino.

Infine, citando il rischio, Pfizer e Moderna citano prove precedenti del potenziamento della malattia provocato dal vaccino contro l'RSV e la Dengue, così come il coronavirus felino (Pfizer) e il morbillo (Moderna), tuttavia, la SARS e la MERS non sono menzionate. J&J discute di SARS e MERS, ma sostiene che il potenziamento della malattia indotta dal vaccino è dovuto agli anticorpi non neutralizzanti e alle risposte cellulari Th2 sbilanciate e che la vaccinazione Ad26 non mostra questo profilo.

Gli autori evidenziano quindi che nel complesso, i protocolli di prova di Pfizer, Moderna e J&J forniti ai partecipanti degli studi clinici sul vaccino COVID-19, se confrontati con la documentazione sul potenziamento della malattia dipendente da anticorpi presentata nella loro discussione e ampiamente disponibile a qualsiasi professionista esperto nel campo, non permettono al partecipante di comprendere che la somministrazione del vaccino può portare ad una malattia lieve, fino ad una malattia grave e duratura o addirittura alla morte.

¹¹⁸ Mulligan, M.J., Lyke, K.E., Kitchin, N. et al.
Phase I/II study of COVID-19 RNA vaccine BNT162b1 in adults.
Nature 586, 589–593 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2639-4>
<https://www.nature.com/articles/s41586-020-2639-4>

¹¹⁹ McNamara D.
Three Major COVID Vaccine Developers Release Detailed Trial Protocols.
<https://www.medscape.com/viewarticle/937845>

La divulgazione del rischio specifico di potenziamento della malattia derivante dalla vaccinazione richiede un modulo di consenso informato specifico, separato e una dimostrazione della comprensione del paziente al fine di soddisfare gli standard di etica medica.

Il processo di consenso informato per gli studi sul vaccino COVID-19 in corso non sembra soddisfare questo standard. Sebbene l'emergenza sanitaria globale COVID-19 giustifichi sperimentazioni vaccinali accelerate di candidati con responsabilità note, tale accelerazione non giustifica la mancanza di un'attenzione aggiuntiva necessaria per rafforzare le procedure di consenso informato specifiche per i rischi del vaccino COVID-19.

Analoghe considerazioni sono riportate riguardo il consenso informato del vaccino "Astrazeneca" nel documento *Covid-19 il vaccino* da pag. 87

Approfondimento

ANTICORPI E INFEZIONE VIRALE

Gli anticorpi sono molecole molto stabili grazie alla loro struttura, che si basa sulla ripetizione di un'unità globulare compatta, ripiegata su sé stessa, lunga circa 110 amminoacidi, chiamata "dominio immunoglobulinico".

Tale dominio è presente in molte molecole del sistema immunitario, quali il TCR (cell receptor, recettore per l'antigene dei linfociti T) e le molecole del complesso maggiore di istocompatibilità MHC (Major histocompatibility complex), in molecole di adesione, quali ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1) e VCAM-1 (Vascular adhesion molecule-1), e in molte altre proteine, spesso coinvolte nell'interazione cellula-cellula.

Si parla quindi di "superfamiglia delle immunoglobuline", per indicare l'insieme delle proteine che contengono almeno un dominio immunoglobulinico.

Funzioni degli anticorpi di membrana e anticorpi solubili

Gli anticorpi espressi sulla membrana dei linfociti B funzionano da recettori cellulari per l'antigene. L'estremità carbossi-terminale delle catene H termina con un dominio transmembrana e una piccola coda intracellulare, cui si associano con legame non covalente molecole coinvolte nella trasmissione all'interno della cellula del segnale generato dal legame con l'antigene.

Quando due o più anticorpi di membrana interagiscono con l'antigene, si genera un segnale di attivazione nei linfociti B, il quale, insieme a segnali accessori forniti dai linfociti T CD4 helper, induce la proliferazione e il differenziamento dei linfociti B.

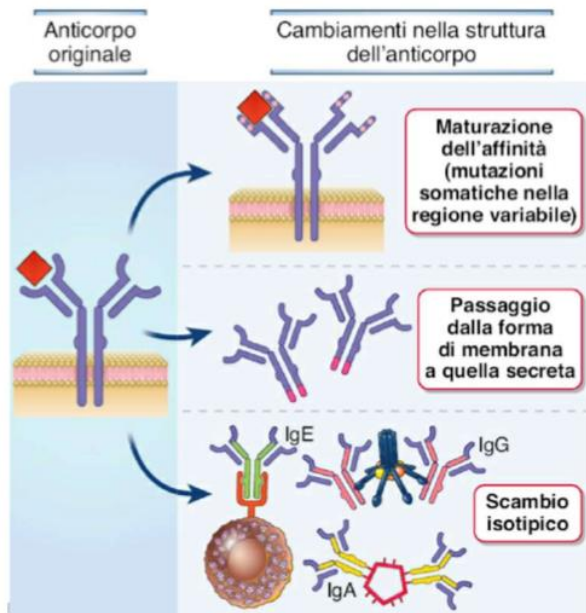
Questo meccanismo di attivazione selettiva dei linfociti B che hanno incontrato l'antigene, è essenziale per l'induzione della risposta anticorpale specifica, detta anche "risposta umorale".

Dal differenziamento terminale dei linfociti B attivati dall'antigene si originano le plasmacellule, che secernono anticorpi solubili contenenti le stesse regioni variabili dell'anticorpo espresso in membrana dal linfocita B precursore.

Le immunoglobuline secrete nel siero e nei liquidi biologici dalle plasmacellule, hanno la funzione di legare una molteplicità di antigeni grazie alla diversità delle regioni variabili, e di attivare un numero limitato di funzioni effettrici, mediante pochi tipi di regioni costanti. Gli anticorpi possono legare antigeni solubili, per esempio tossine, e neutralizzarli per impedire che svolgano la loro funzione di danno all'ospite.¹²⁰

¹²⁰ Anticorpi e meccanismi genetici della diversità anticorpale

<https://www.biologyonline.com/dictionary/immunoglobulin>



L'anticorpo originale espresso in membrana è solo il prototipo per una serie di processi volti a fornire risposte umorali sempre più efficaci.

- **Maturazione dell'affinità:** mutazioni nella regione variabile (indicate dai punti gialli) affinano la specificità del sito di legame per l'antigene, senza modificare le funzioni effettrici che dipendono dalla regione costante.
- **Anticorpi secreti:** gli anticorpi espressi sulla superficie cellulare possiedono un dominio transmembrana che li ancorano nel doppio strato lipidico. Da questi, si passa alla produzione di anticorpi in forma secreta, che tuttavia hanno lo stesso sito di legame per l'antigene. Gli anticorpi secreti possono o non possono mostrare mutazioni nella regione variabile (cioè la secrezione degli anticorpi può avvenire sia prima che dopo la maturazione dell'affinità).
- **Scambio isotipico:** questo processo modifica la regione costante (come indicato dal cambiamento del colore al verde al giallo o al rosa) senza cambiare l'affinità di legame per l'antigene. Lo scambio isotipico si osserva sia negli anticorpi di membrana sia in quelli secreti.

https://pls.scienze.unipd.it/biologia-biotecnologie/wp-content/uploads/sites/5/2020/10/Immunologia-PL2020_compressed.pdf

Le classi di anticorpi

Più classi di anticorpi (cioè IgM, IgA, IgG e IgE) sono coinvolti nelle risposte immunitarie alle infezioni virali (Figura sotto).¹²¹ Queste classi sono caratterizzate dalle loro proprietà biofisiche intrinseche, funzioni, distribuzioni tissutali ed emivite.

Insieme alle IgD¹²², le immunoglobuline **IgM** sono normalmente le prime ad essere espresse durante lo sviluppo naïve delle cellule B, comprendendo la maggior parte degli anticorpi prodotti tra l'attivazione delle cellule B e il cambio di classe (switching class).

Le IgM rappresentano circa il 10% di tutti gli anticorpi nel siero e dimostrano un'affinità relativamente bassa rispetto alle IgG, a causa della limitata maturazione dell'affinità attraverso le mutazioni somatiche.

¹²¹ Galipeau Y, Greig M, Liu G, Driedger M, Langlois MA. Humoral Responses and Serological Assays in SARS-CoV-2 Infections. *Front Immunol.* 2020 Dec 18;11:610688. doi: 10.3389/fimmu.2020.610688. PMID: 33391281; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7775512/>

Sun Y, Huang T, Hammarström L, Zhao Y. The Immunoglobulins: New Insights, Implications, and Applications. *Annu Rev Anim Biosci.* 2020 Feb 15;8:145-169. doi: 10.1146/annurev-animal-021419-083720. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31846352/>

Lezione anticorpi
<https://didattica-2000.archived.uniroma2.it/immunotlb/deposito/Anticorpi.pdf>
https://pls.scienze.unipd.it/biologia-biotecnologie/wp-content/uploads/sites/5/2020/10/Immunologia-PL2020_compressed.pdf
http://amsacta.unibo.it/3067/40/13_anticorpi_I_ed_ebook.pdf
<https://www.biopills.net/anticorpi/>
<https://it.wikipedia.org/wiki/Anticorpo>

¹²² Gutzeit C, Chen K, Cerutti A. The enigmatic function of IgD: some answers at last. *Eur J Immunol.* 2018;48(7):1101-1113. doi:10.1002/eji.201646547 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6033660/>

Sheir, Donia. Role of IgD in prevention and treatment of SARS CoV-2 infection "The Hidden Soldier". *Microbial Biosystems.* (2020). 5. 108-114. 10.21608/mb.2020.33453.1019. https://www.researchgate.net/publication/342857337_Role_of_IgD_in_prevention_and_treatment_of_SARS_CoV-2_infection_The_Hidden_Soldier

Tuttavia, gli anticorpi IgM dimostrano un'elevata avidità per l'antigene bersaglio perché formano pentameri che utilizzano interazioni multimeriche con l'antigene bersaglio per facilitare la neutralizzazione, e si trovano principalmente in circolazione dove possono facilitare l'opsonizzazione dell'antigene.¹²³

Studi recenti hanno anche rivelato diversi ruoli delle IgM secretorie nella mucosa del tratto gastrointestinale e respiratorio, che verranno approfonditi in seguito.¹²⁴

Le immunoglobuline umane **IgA**, che possono essere ulteriormente suddivise nelle sottoclassi IgA1 e IgA2¹²⁵, generalmente superano i livelli di IgM nel siero e sono significativamente più presenti nelle superfici mucose e nelle secrezioni (es. saliva, latte materno, ecc.), dove sono centrali per l'immunità delle mucose.

Le immunoglobuline IgA formano dimeri al momento della secrezione, il che contribuisce alla loro maggiore avidità. Sebbene gli anticorpi IgA non fissino il complemento in modo efficace come le IgM, gli anticorpi IgA secreti dalle plasmacellule nel tratto respiratorio svolgono un ruolo chiave nell'immunità della mucosa attraverso la neutralizzazione del patogeno, un processo che facilita l'aggregazione e previene l'infezione iniziale delle cellule ospiti, conferendo così un'immunità sterilizzante a un agente patogeno.¹²⁶

Gli anticorpi **IgG** iniziano ad apparire più tardi nella risposta immunitaria perché subiscono una maturazione dell'affinità attraverso mutazioni somatiche che determinano un'elevata affinità per l'antigene bersaglio e una maggiore capacità di neutralizzare i patogeni¹²⁷.

Oltre al loro ruolo nella neutralizzazione dell'antigene, gli anticorpi IgG hanno anche altri ruoli di fondamentale importanza, in particolare le funzioni effettrici mediate da Fc, come le attivazioni cellulari e la citotossicità cellulare anticorpo-dipendente (ADCC).¹²⁸

Le immunoglobuline IgG sono monomeriche e rappresentano circa il 75% di tutti gli anticorpi nel siero.

Sono associate a un'immunità duratura, data la loro lunga emivita nel sangue e l'associazione con cellule B di memoria differenziate¹²⁹.

¹²³ Boes M. Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Mol Immunol.* 2000 Dec;37(18):1141-9. doi: 10.1016/s0161-5890(01)00025-6. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11451419/>

¹²⁴ Planchais C, Mouquet H. Easy pan-detection of human IgA immunoglobulins. *J Immunol Methods.* 2020 Sep-Oct;484-485:112833. doi: 10.1016/j.jim.2020.112833 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32771390/>

¹²⁵ Breedveld A, van Egmond M. IgA and FcαRI: Pathological Roles and Therapeutic Opportunities. *Front Immunol.* 2019;10:553. doi:10.3389/fimmu.2019.00553 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6448004/>

van Gool MMJ, van Egmond M. IgA and FcαRI: Versatile Players in Homeostasis, Infection, and Autoimmunity. *Immunotargets Ther.* 2021;9:351-372. Published 2021 Jan 5. doi:10.2147/ITT.S266242 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7801909/>

¹²⁶ Freiherst J, Ogra PL. Mucosal immunity and viral infections. *Ann Med.* 2001 Apr;33(3):172-7. doi: 10.3109/07853890109002074. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11370770/>

¹²⁷ Zan H, Casali P. Immunoglobulin Somatic Hypermutation and Class-Switch DNA Recombination. In: Mackay IR, Rose NR, Diamond B, Davidson A, editors. *Encyclopedia of Medical Immunology: Autoimmune Diseases.* New York, NY: Springer New York; (2014). 10.1007/978-0-387-84828-0_556

¹²⁸ Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol.* 2014;5:520. Published 2014 Oct 20. doi:10.3389/fimmu.2014.00520 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4202688/>

Lu LL, Suscovich TJ, Fortune SM, Alter G. Beyond binding: antibody effector functions in infectious diseases. *Nat Rev Immunol.* 2018;18(1):46-61. doi:10.1038/nri.2017.106 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6369690/>

¹²⁹ Schroeder HW Jr, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(2 Suppl 2):S41-S52. doi:10.1016/j.jaci.2009.09.046 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3670108/>

Le IgG possono anche legare C1q, attivando la via classica del complemento del sistema immunitario innato¹³⁰.

Gli anticorpi IgG possono essere suddivisi in più sottotipi (cioè, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), ciascuno con ruoli leggermente diversi nell'immunità umorale. Ad esempio, IgG1, IgG3 e occasionalmente IgG4 (a seguito di esposizione ripetuta) sono secrete in risposta ad antigeni proteici, mentre IgG2 risponde quasi esclusivamente ad antigeni polisaccaridi.¹³¹

Dato che diversi patogeni provocano differenti rapporti di sottotipi di IgG, questi possono essere usati come profili caratteristici per monitorare l'efficacia dei vaccini (intesa come produzione di anticorpi vaccinali) per quanto riguarda i correlati di protezione¹³².

Infine, gli anticorpi IgE mediano prevalentemente le reazioni allergiche e le risposte immunitarie contro le infezioni parassitarie, e costituiscono meno dello 0,01% di tutti gli anticorpi totali.

Gli anticorpi IgE sono monomerici e dimostrano una forte affinità per i recettori FcεRI espressi su numerose cellule immunitarie innate (ad es. mastociti, basofili, eosinofili), consentendo la generazione di una risposta infiammatoria generalizzata attraverso l'attivazione innata del sistema immunitario.¹³³

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6369690/>

Funzioni effettrici degli anticorpi.

Gli anticorpi sono in grado di spiegare una pletera di funzioni effettrici nel corso di un'infezione. Questi includono ma non sono limitati a quanto segue: **a** | La neutralizzazione diretta di tossine o microrganismi. **b** | La neutralizzazione dei fattori di virulenza microbica, come quelli coinvolti nel quorum sensing e nella formazione di biofilm. **c** | L'intrappolamento di agenti patogeni nelle mucine. **d** | L'attivazione del complemento per guidare la clearance o distruzione dei fagociti, generare chemioattrattivi o anafilatossine come C3a e C5a o opsonine frammento del complemento come C3b o indurre la lisi attraverso il complesso di attacco della membrana. **e** | L'attivazione di opsonofagocitosi neutrofila, burst ossidativi, produzione di enzimi litici e chemioattrattivi, o la formazione di trappole extracellulari neutrofili (NET) di cromatina e proteine antimicrobiche. **f** | L'induzione dell'opsonofagocitosi dei macrofagi, dei burst ossidativi o del rilascio di peptidi antimicrobici. **g** | L'attivazione della degranolazione delle cellule natural killer (NK) per uccidere le cellule infette. **h** | Il miglioramento dell'assorbimento, dell'elaborazione e della presentazione dell'antigene da parte delle cellule dendritiche (DC) alle cellule T. **i** | La presentazione degli antigeni da parte delle cellule dendritiche follicolari (FDC) ai linfociti B. **j** | La degranolazione di mastociti, basofili ed eosinofili per rilasciare sostanze vasoattive, chemioattrattivi e citochine di tipo T helper 2 (T_H2) nel contesto di allergeni o infezioni parassitarie. Fc, frammento cristallizzabile; MBL, lectina legante il mannosio; pMHC, complesso peptide-MHC.

¹³⁰ Holers VM.

Complement and its receptors: new insights into human disease. *Annu Rev Immunol.* 2014;32:433-59. doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120154. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24499275/>

¹³¹ Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T.

IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol.* 2014;5:520. Published 2014 Oct 20. doi:10.3389/fimmu.2014.00520 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4202688/>

¹³² I correlati immunologici di protezione indotti dalle vaccinazioni

Soininen A, Seppälä I, Nieminen T, Eskola J, Käyhty H.

IgG subclass distribution of antibodies after vaccination of adults with pneumococcal conjugate vaccines. *Vaccine.* 1999 Apr 9;17(15-16):1889-97. doi: 10.1016/s0264-410x(98)00475-7. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10217586/>

Isa MB, Martínez L, Giordano M, Passetto C, de Wolff MC, Nates S.

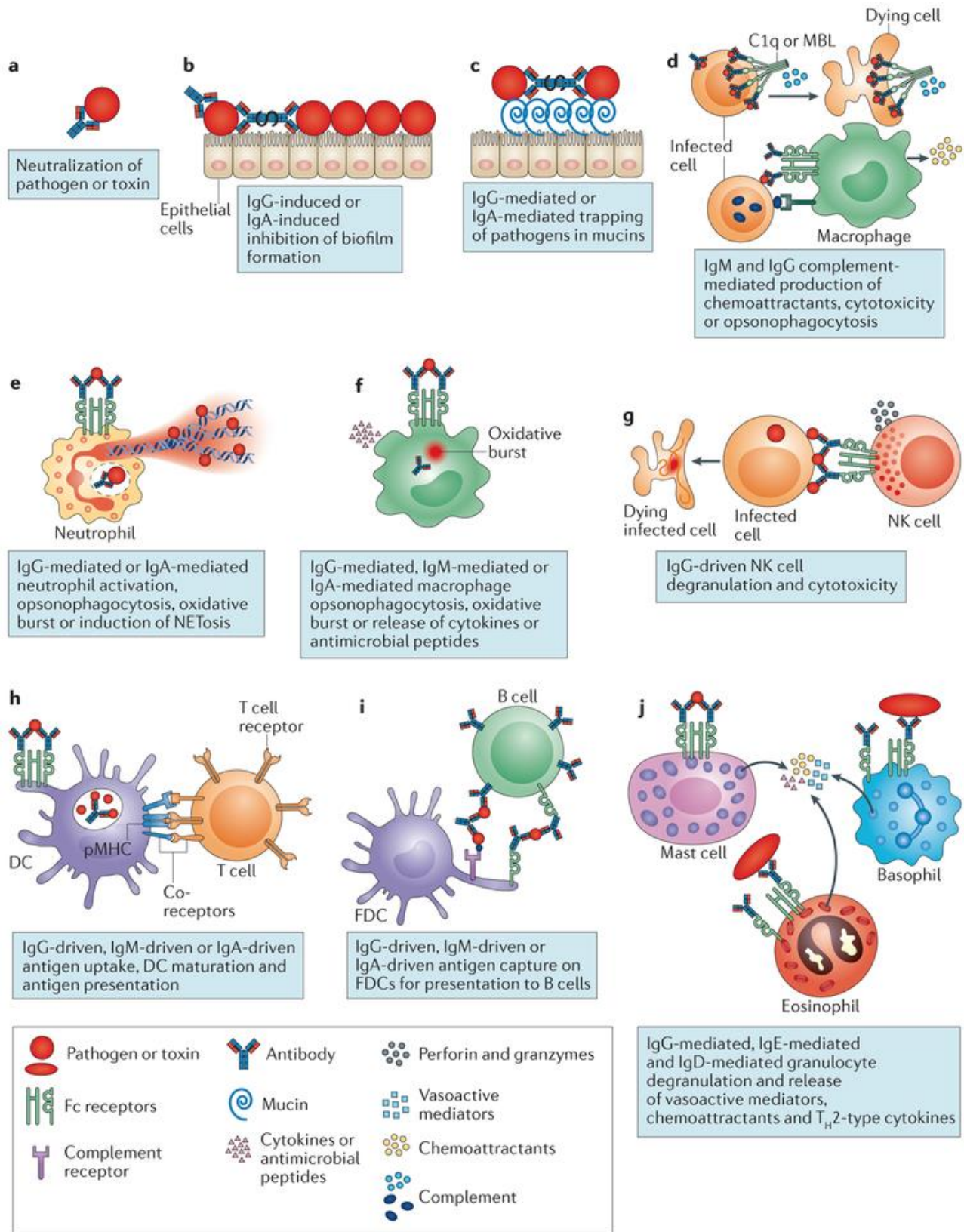
Comparison of immunoglobulin G subclass profiles induced by measles virus in vaccinated and naturally infected individuals. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002;9(3):693-697. doi:10.1128/cdli.9.3.693-697.2002 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC119984/>

¹³³ Amarasekera M.

Immunoglobulin E in health and disease. *Asia Pac Allergy.* 2011;1(1):12-15. doi:10.5415/apallergy.2011.1.1.12 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3206235/>

Lu LL, Suscovich TJ, Fortune SM, Alter G.

Beyond binding: antibody effector functions in infectious diseases. *Nat Rev Immunol.* 2018 Jan;18(1):46-61. doi: 10.1038/nri.2017.106. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6369690/>



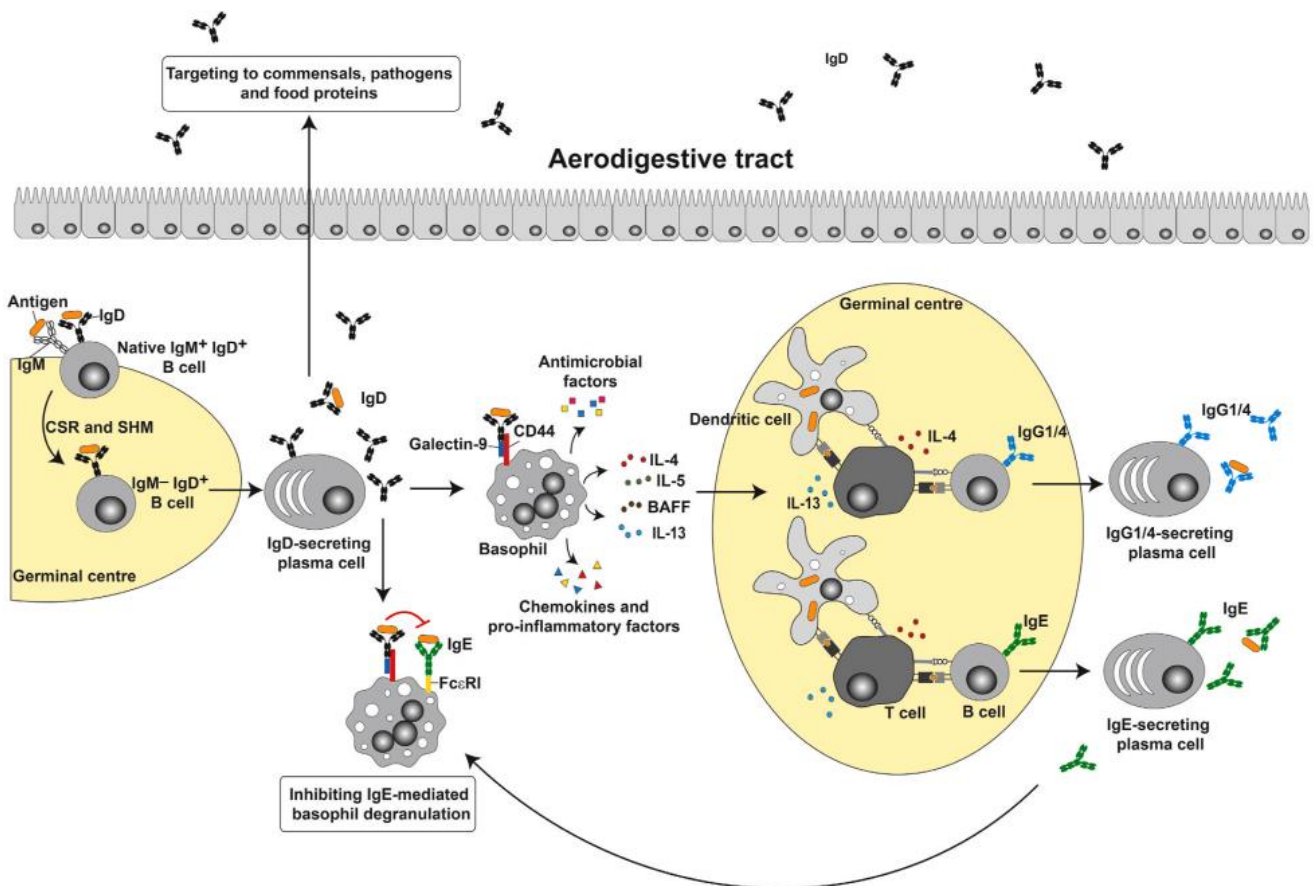
Immunoglobuline D

L'immunoglobulina D (IgD) è rimasta una misteriosa classe di anticorpi per quasi mezzo secolo. Inizialmente si pensava che l'IgD fosse un isotipo Ig recentemente evoluto, espresso solo da alcune specie di mammiferi, ma recenti scoperte in pesci e anfibi dimostrano che l'IgD era presente nell'antenato di tutti i vertebrati mascellari e ha importanti funzioni immunologiche.

La struttura delle IgD è stata molto dinamica nel corso dell'evoluzione. I mammiferi possono esprimere IgD attraverso lo splicing alternativo e la ricombinazione del cambio di classe (CSR).

Il cambio di classe da IgM a IgD attivo dipendente dalle cellule e indipendente dai linfociti T, avviene in un sottoinsieme unico di cellule B umane della mucosa aerodigestiva superiore, che fornisce uno strato di protezione della mucosa verso molti agenti patogeni e i loro fattori di virulenza.

Le IgD circolanti possono legarsi alle cellule mieloidi, come i basofili, e indurre fattori antimicrobici, infiammatori e stimolanti le cellule B, contribuendo alla sorveglianza immunitaria ma anche all'infiammazione e al danno tissutale quando questo percorso è iperattivato in condizioni patologiche. Ricerche recenti mostrano che l'IgD è un importante immunomodulatore che orchestra un sistema di sorveglianza ancestrale all'interfaccia tra immunità e infiammazione.¹³⁴



<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34237381/>

La funzione di sIgD nella mucosa aerodigestiva. Negli organi linfoepiteliali della mucosa aerodigestiva, le cellule FO B (IgD+ IgM+) entrano in un programma GC sottoponendosi a CSR da IgM a IgD e SHM esteso. I linfociti B risultanti (IgD+ IgM-) si differenziano ulteriormente in plasmacellule che secernono IgD, che rilasciano IgD localmente o colonizzano i distretti della mucosa distale (ad es. ghiandole lacrimali, salivari e mammarie, nonché

¹³⁴ Chen K, Cerutti A. New insights into the enigma of immunoglobulin D. Immunol Rev. 2010;237(1):160-179. doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00929.x <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3048779/>

Wan Z, Zhao Y, Sun Y. Immunoglobulin D and its encoding genes: An updated review. Dev Comp Immunol. 2021 Nov;124:104198. doi: 10.1016/j.dci.2021.104198. Epub 2021 Jul 5. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34237381/>

l'orecchio medio) attraverso la circolazione generale (non mostrata in questa figura). L'IgD secreta da queste cellule si lega agli antigeni della mucosa locale, inclusi il microbiota, i patogeni e i loro prodotti, nonché gli antigeni alimentari. sIgD si lega anche ai basofili (e ai mastociti) tramite un recettore composto da galectina-9 e CD44. Quando ingaggiate dall'antigene, le IgD legate ai basofili induce il rilascio di basofili di chemochine, fattori antimicrobici e pro-infiammatori, nonché di IL-4, IL-5 e IL-13, che facilita la generazione di cellule follicolari Th2 che secernono IL-4 e IL-13. Queste cellule T GC migliorano quindi la produzione di cellule B dell'iniziale IgG1 antigene-specifica (nei topi) o IgG4 (negli esseri umani) e IgE. Inoltre, la reticolazione delle IgD da parte degli antigeni vincola anche la degranolazione dei basofili IgEmediata.

STUDIO DELL'ADE

Test sierologici per rilevare il SARS-Cov-2

I test sierologici sono progettati per rilevare la presenza di anticorpi IgG contro un determinato agente patogeno, in questo caso il SARS-CoV-2.

Un risultato positivo del test sierologico è indicativo di un'esposizione passata a uno o più epitopi antigenici dell'agente patogeno e pertanto non è un indicatore di un'infezione attiva. Inoltre, se l'agente patogeno di interesse condivide sequenze di epitopi antigenici con le proteine di altri microbi o anche con quelle degli antigeni del vaccino, un test può essere un falso positivo.

Nel corso di un'infezione naturale da SARS-CoV-2, i livelli di RNA virale diminuiscono rapidamente durante la seconda settimana, fino a diventare non rilevabili¹³⁵ e il dosaggio degli anticorpi diventa quindi la modalità primaria e più accurata per rilevare un'infezione risolta di recente o pregressa.

I test sierologici sono fondamentali anche per l'individuazione di infezioni asintomatiche e precedentemente non diagnosticate nella popolazione.

I test sierologici usati più comunemente includono i test immunologici a flusso laterale (LFIA), i test immunoenzimatici (ELISA) e i test immunologici a chemiluminescenza (CLIA) (Tabella 1).¹³⁶

A seconda del test utilizzato, possono rilevare IgM, IgA, IgG o anticorpi totali¹³⁷. Inoltre, i test variano negli anticorpi specifici che rilevano; questi includono anticorpi contro il RBD, la proteina del nucleocapside (N), la proteina spike (S) o le proteine del nucleocapside e la spike (NS).¹³⁸

¹³⁵ Wölfel R, et al

Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019.

Nature. 2020 May;581(7809):465-469. doi: 10.1038/s41586-020-2196-x. Epub 2020 Apr 1. Erratum in: Nature. 2020 Dec;588(7839):E35.

<https://www.nature.com/articles/s41586-020-2196-x>

Wang Y, Zhang L, Sang L, et al.

Kinetics of viral load and antibody response in relation to COVID-19 severity.

J Clin Invest. 2020;130(10):5235-5244. doi:10.1172/JCI138759

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7524490/>

Borremans B, Gamble A, Prager KC, et al.

Quantifying antibody kinetics and RNA detection during early-phase SARS-CoV-2 infection by time since symptom onset.

Elife. 2020;9:e60122. Published 2020 Sep 7. doi:10.7554/eLife.60122

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7508557/>

¹³⁶ <http://omero.farm.unipi.it/matdidFarm/9/Capitolo%204-Immunodosaggi.pdf>

¹³⁷ Mekonnen D, Mengist HM, Derbie A, Nibret E, Munshea A, He H, Li B, Jin T.

Diagnostic accuracy of serological tests and kinetics of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 antibody: A systematic review and meta-analysis.

Rev Med Virol. 2021 May;31(3):e2181. doi: 10.1002/rmv.2181.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33152146/>

Woof JM, Mestecky J.

Mucosal immunoglobulins.

Immunol Rev. 2005 Aug;206:64-82. doi: 10.1111/j.0105-2896.2005.00290.x.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16048542/>

¹³⁸ Ong DSY, Fragkou PC, Schweitzer VA, et al.

How to interpret and use COVID-19 serology and immunology tests.

Clin Microbiol Infect. 2021;27(7):981-986. doi:10.1016/j.cmi.2021.05.001

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8106522/>

Kevadiya BD, Machhi J, Herskovitz J, et al.

Diagnostics for SARS-CoV-2 infections.

Nat Mater. 2021;20(5):593-605. doi:10.1038/s41563-020-00906-z

La qualità e l'utilità di un test sierologico è valutata principalmente dal suo grado di sensibilità e specificità.¹³⁹ La *sensibilità* descrive la capacità di un test sierologico di fornire un risultato positivo da campioni che contengono anticorpi contro il SARS-CoV-2 ("veri positivi"). Pertanto, un test altamente sensibile ha una frequenza molto bassa di falsi negativi.

La *specificità* invece descrive la capacità di un test di fornire un risultato negativo quando un campione non contiene anticorpi contro il SARS-CoV-2. In questo caso, un test sierologico SARS-CoV-2 ad alta specificità deve portare a pochi falsi positivi, compresi quelli risultanti dalla reattività crociata a uno qualsiasi degli altri sei coronavirus umani.¹⁴⁰

I test sierologici che analizzano le IgM, che naturalmente hanno un'affinità per l'antigene virale inferiore rispetto alle IgG, avranno un rischio maggiore di produrre falsi positivi e pertanto dovrebbero richiedere una soglia di specificità più elevata.

Le soglie dei test per specificità e sensibilità sono valori arbitrari stabiliti sperimentalmente, e differiscono tra i tipi di test sierologici e le metodiche di analisi.

Le soglie per il SARS-CoV-2 sono determinate principalmente sulla base dei risultati dei test di campioni di controllo negativi raccolti prima della pandemia, nonché di campioni di controllo positivi che sono stati confermati da un test diagnostico clinico RT-PCR certificato (cioè validato contro il sequenziamento).¹⁴¹ Attualmente, non esistono standard di riferimento internazionali per definire la sensibilità e la specificità del test sierologico, il che rende molto difficile confrontare i diversi test sierologici e saggi senza effettuare un confronto sperimentale diretto.

Studi recenti hanno cercato di confrontare più kit di test¹⁴² ma, sebbene ciò rappresenti un progresso, ciò che alla fine è emerso è la necessità di predisporre un insieme ben caratterizzato di sieri standard che

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8264308/>

¹³⁹ Brouwer PJM, Caniels TG, van der Straten K, et al. Potent neutralizing antibodies from COVID-19 patients define multiple targets of vulnerability. *Science*. 2020;369(6504):643-650. doi:10.1126/science.abc5902 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7299281/>

¹⁴⁰ FDA. EUA Authorized Serology Test Performance. FDA (2020). Available at: <https://www.fda.gov/medical-devices/emergency-situations-medical-devices/eua-authorized-serology-test-performance>.

Cheng MP, Yansouni CP, Basta NE, et al. Serodiagnostics for Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus 2 : A Narrative Review. *Ann Intern Med*. 2020;173(6):450-460. doi:10.7326/M20-2854 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7281623/>

¹⁴¹ GISAID. Genomic epidemiology of novel coronavirus - Available at: <https://nextstrain.org/ncov/gisaid/global/6m>

¹⁴² Haselmann V, Kittel M, Gerhards C, et al. Comparison of test performance of commercial anti-SARS-CoV-2 immunoassays in serum and plasma samples. *Clin Chim Acta*. 2020;510:73-78. doi:10.1016/j.cca.2020.07.007 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7343640/>

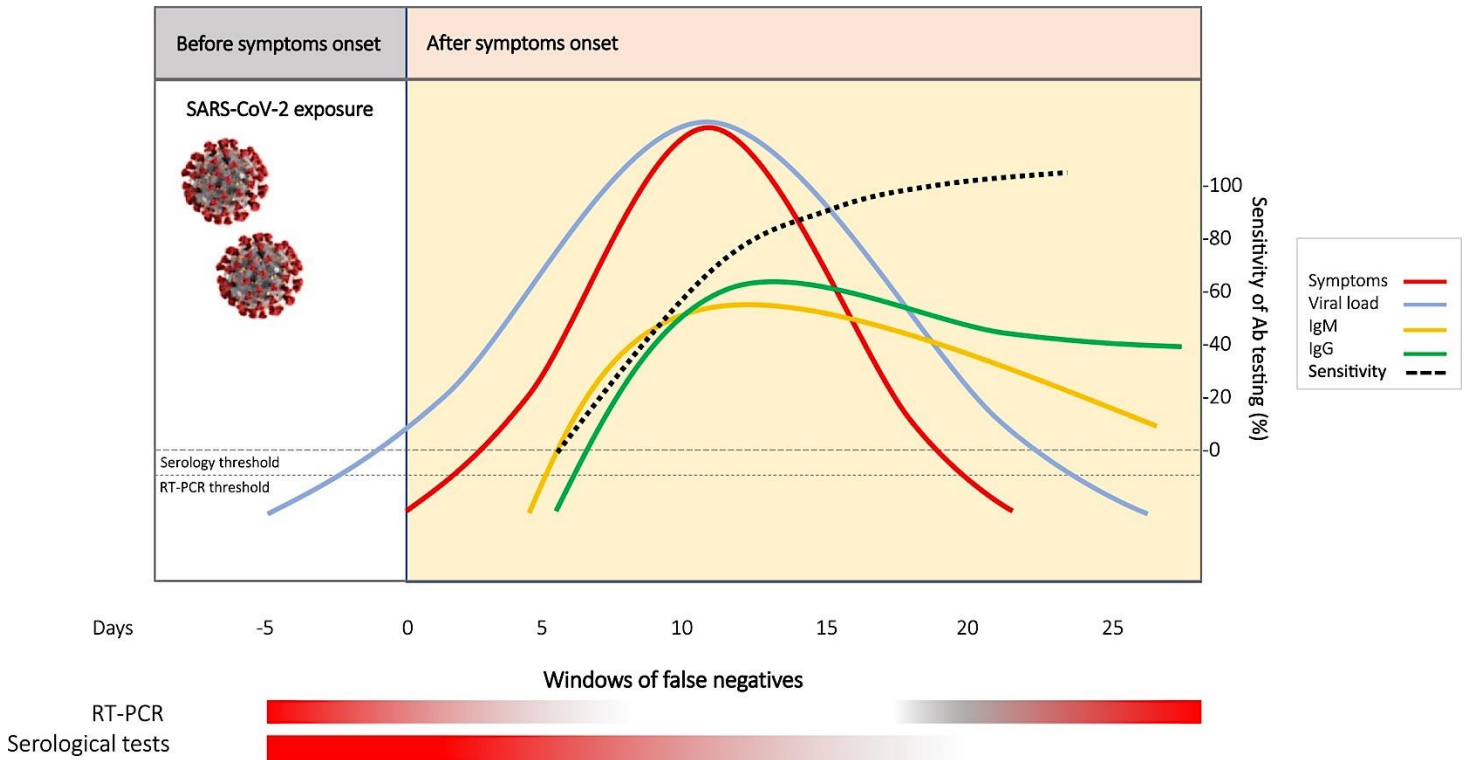
Theel ES. Performance Characteristics of High-Throughput Serologic Assays for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 with Food and Drug Administration Emergency Use Authorization: A Review. *Clin Lab Med*. 2022;42(1):15-29. doi:10.1016/j.cl.2021.10.006 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8563341/>

Wilkins D, Aksyuk AA, Ruzin A, et al. Validation and performance of a multiplex serology assay to quantify antibody responses following SARS-CoV-2 infection or vaccination. *Clin Transl Immunology*. 2022;11(4):e1385. Published 2022 Apr 26. doi:10.1002/cti2.1385 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9040421/>

Choi HW, Jeon CH, Won EJ, Kang SJ, Lee SY, Kee SJ. Performance of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Serological Diagnostic Tests and Antibody Kinetics in Coronavirus Disease 2019 Patients. *Front Microbiol*. 2022;13:881038. Published 2022 Apr 14. doi:10.3389/fmicb.2022.881038 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9048255/>

potrebbero essere testati rispetto a qualsiasi kit di test sierologico approvato, per consentire di confrontare la sensibilità e la specificità di questi kit.¹⁴³

Altre variabili che richiedono la standardizzazione per i test sierologici e il confronto dei kit, includono la durata della PSO (post-symptom onset, fine dei sintomi) per la raccolta dei campioni dai pazienti, in quanto la sensibilità e la specificità dei test commerciali possono variare a seconda del momento in cui il campione viene raccolto¹⁴⁴ e dal metodo con cui i campioni vengono talvolta inattivati per la sicurezza del laboratorio.¹⁴⁵



¹⁴³ Adams ER, Ainsworth M, Anand R, et al. Antibody testing for COVID-19: A report from the National COVID Scientific Advisory Panel. Wellcome Open Res. 2020;5:139. Published 2020 Jun 11. doi:10.12688/wellcomeopenres.15927.1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7941096/>

¹⁴⁴ Ortiz AT, Torrente FF, Twigg A, et al. The Influence of Time on the Sensitivity of SARS-CoV-2 Serological Testing. Preprint. Res Sq. 2022;rs.3.rs-1286644. Published 2022 Feb 17. doi:10.21203/rs.3.rs-1286644/v1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8863153/>

Muecksch F, Wise H, Batchelor B, et al. Longitudinal analysis of clinical serology assay performance and neutralising antibody levels in COVID19 convalescents. Preprint. medRxiv. 2020;2020.08.05.20169128. Published 2020 Aug 6. doi:10.1101/2020.08.05.20169128 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7418752/>

La Marca A, Capuzzo M, Paglia T, Roli L, Trenti T, Nelson SM. Testing for SARS-CoV-2 (COVID-19): a systematic review and clinical guide to molecular and serological in-vitro diagnostic assays. Reprod Biomed Online. 2020;41(3):483-499. doi:10.1016/j.rbmo.2020.06.001 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7293848/>

¹⁴⁵ Cheng MP, Yansouni CP, Basta NE, et al. Serodiagnostics for Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus 2 : A Narrative Review. Ann Intern Med. 2020;173(6):450-460. doi:10.7326/M20-2854 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7281623/>

Hu X, An T, Situ B, et al. Heat inactivation of serum interferes with the immunoanalysis of antibodies to SARS-CoV-2. J Clin Lab Anal. 2020;34(9):e23411. doi:10.1002/jcla.23411 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7361150/>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7293848/>

La relazione temporale tra carica virale, sintomi e positività ai test diagnostici. L'esordio dei sintomi (giorno 0) è di solito 5 giorni dopo l'infezione (giorno -5). In questa fase iniziale corrispondente alla finestra o al periodo asintomatico, la carica virale potrebbe essere inferiore alla soglia della RT-PCR e il test potrebbe dare risultati falsi negativi. Lo stesso vale alla fine della malattia, quando il paziente si sta riprendendo. La sierconversione può essere generalmente rilevabile tra 5-7 giorni e 14 giorni dopo l'insorgenza dei sintomi; pertanto, nella prima fase della malattia, è più probabile che i test sierologici diano risultati falsi negativi. La linea nera tratteggiata nel grafico illustra la sensibilità del test chemiluminescente come derivato dalla scheda tecnica di un test commerciale (Abbott Diagnostics, USA). Ig, immunoglobuline; RT-PCR, trascrizione inversa-PCR; SARS-CoV-2, sindrome respiratoria acuta grave coronavirus 2.

Le soglie di sensibilità e specificità sono importanti anche per considerazioni epidemiologiche uniche per determinate situazioni e ambienti.

Queste soglie possono essere modificate per consentire una maggiore sensibilità del test a scapito della specificità, o il contrario, per cui la specificità è favorita a scapito della sensibilità.

Ad esempio, in una regione con un'elevata sieroprevalenza di SARS-CoV-2, la sensibilità può essere prioritaria rispetto alla specificità per garantire che la maggior parte dei casi positivi venga identificata.

Viceversa, se la prevalenza * ¹⁴⁶ in una data regione è molto bassa, allora una maggiore specificità e una sensibilità relativamente inferiore sarebbero favorite in modo che un minor numero di pazienti possa dare risultati falsi positivi pur rilevando la maggior parte dei veri positivi.

È essenziale avere il corretto equilibrio tra sensibilità e specificità, poiché le implicazioni epidemiologiche di falsi negativi o falsi positivi sproporzionati possono essere profonde. Un test con troppi falsi positivi manterrà le persone isolate più a lungo del necessario, creando tensioni sociali ed economiche altrimenti evitabili.

Un test con troppi falsi negativi comporterà una sottovalutazione della prevalenza della malattia, che può portare a un allentamento prematuro della sorveglianza della malattia e a ondate di infezioni risorgenti poiché i pazienti identificati erroneamente come falsi negativi continuano inconsapevolmente a trasmettere la malattia. ¹⁴⁷

* *La prevalenza prende in considerazione i casi esistenti, mentre l'incidenza si riferisce ai casi nuovi.*

<https://www.nature.com/articles/s41563-020-00906-z/>

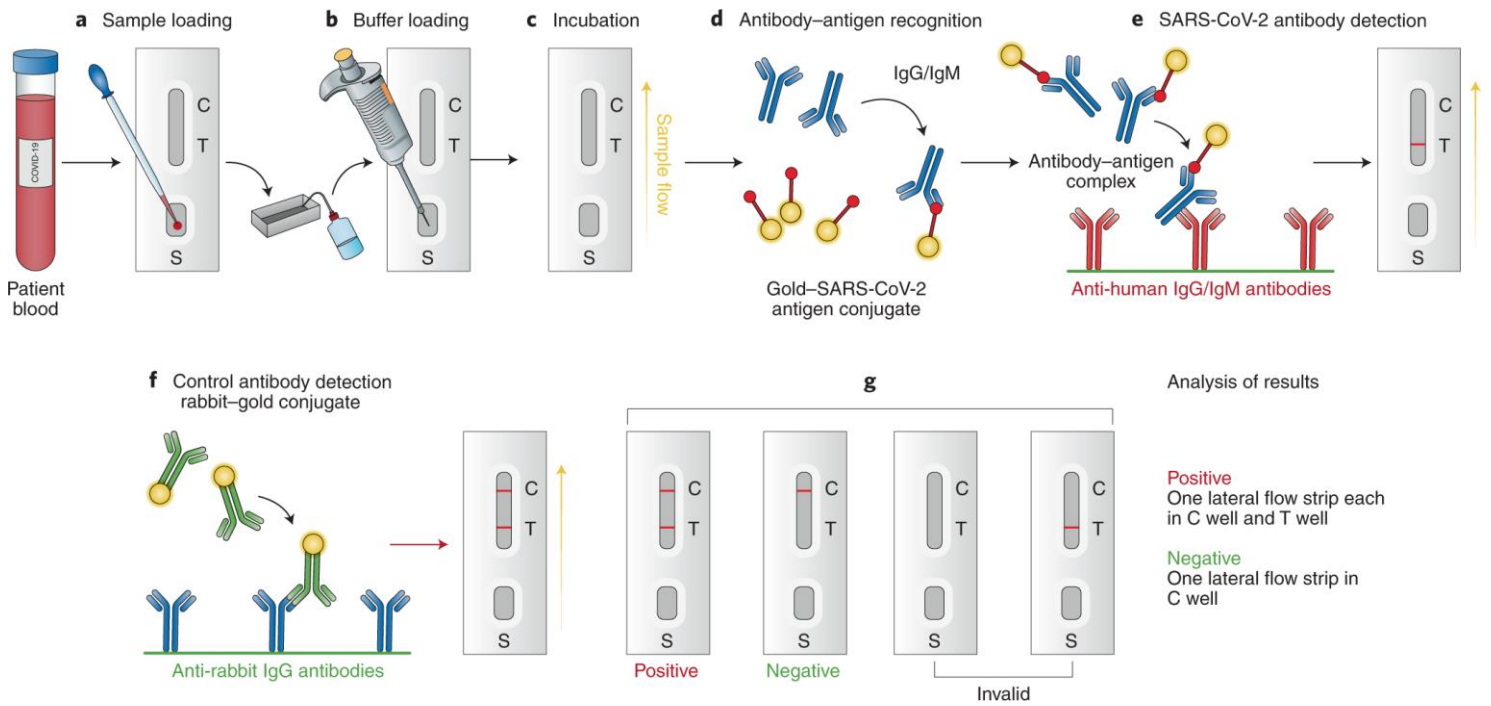
I test immunitari comunemente usati contengono antigeni ricombinanti specifici per SARS-CoV-2 immobilizzati su membrane di nitrocellulosa. Anticorpi IgM e IgG anti-umani di topo coniugati con perline di lattice colorate vengono immobilizzati su tamponi coniugati. Il campione di prova entra in contatto con la membrana all'interno del test. Gli anticorpi colorati formano complessi coniugati di lattice con anticorpi antivirali umani. Questo complesso immobilizzato sulla membrana viene catturato dall'antigene ricombinante specifico per SARS-CoV-2. Se nel campione sono presenti IgG/IgM specifiche per SARS-CoV-2, ciò porta a una banda colorata, che indica un risultato positivo del test. Il complesso viene catturato sulla membrana dall'anticorpo di capra anti-topo, formando una linea di controllo rossa. Nella finestra di test viene visualizzata una linea di controllo incorporata. L'assenza di una banda colorata dimostra un risultato negativo. a-e, Il flusso di lavoro inizia con il siero del paziente aggiunto al pozzetto di flusso del campione (S) (a), il tampone salino viene aggiunto goccia a goccia (b) e il campione incubato (c) fino al riconoscimento dell'anticorpo-antigene (d) e SARS- Rilevazione dell'anticorpo CoV-2 (e). f, L'anticorpo di coniglio-oro mostra nel pozzetto di controllo (C). g, Una banda positiva del test (T) indica la presenza di anticorpi COVID-19 e i risultati senza una banda C positiva non sono validi. In particolare, questo test descrive una risposta post-immune e può mostrare risultati negativi per gli individui che sono stati recentemente infettati. Può anche rilevare il virus in persone precedentemente infette ma asintomatiche.

¹⁴⁶ https://www.quadernodiepidemiologia.it/epi/freq/inc_pre.htm

<https://toolbox.eupati.eu/resources/concetti-epidemiologici-incidenza-e-prevalenza/?lang=it>

¹⁴⁷ Bryant JE, et al

Serology for SARS-CoV-2: Apprehensions, opportunities, and the path forward. *Sci Immunol.* 2020 May 19;5(47):eabc6347. doi: 10.1126/sciimmunol.abc6347. <https://www.science.org/doi/10.1126/sciimmunol.abc6347>



Test sierologico e origine dei falsi positivi

Oltre ai falsi positivi dovuti alla cross-reattività con coronavirus umani e anticorpi preesistenti ¹⁴⁸, il test sierologico può portare a falsi positivi anche a causa della presenza di anticorpi autoimmuni crossreattivi.¹⁴⁹ Le preoccupazioni diagnostiche derivano dal fatto che, a causa dell'ipergamma-globulinemia policlonale, i pazienti con malattie immuno-mediate e in particolare quelli con condizioni autoimmuni possono produrre risultati falsi positivi per SARS-CoV2-IgG e IgM.

Il test di rilevamento degli anticorpi specifici del virus per SARS-CoV-IgG e IgM ha già mostrato risultati falsi positivi in pazienti con le seguenti malattie autoimmuni: lupus eritematoso sistemico, sindrome di Sjogren, sclerosi sistemica, malattia mista del tessuto connettivo e artrite reumatoide.¹⁵⁰

In particolare è stato riscontrato che campioni di pazienti affetti da artrite reumatoide con alti livelli di fattore reumatoide (RF) di isotipo IgM e IgG hanno prodotto un segnale falso positivo in diversi saggi.

Poiché l'RF si lega alle parti costanti delle IgG, ciò potrebbe far precipitare altri anticorpi presenti nel test immunologico in modo non specifico. Questi segnali positivi non specifici potrebbero non solo fornire false indicazioni di immunità protettiva al SARS-CoV-2 per un individuo con RF, ma potrebbero anche fornire un quadro errato della proporzione della popolazione esposta all'infezione durante screening più ampi, soprattutto se le diagnosi o lo stato RF della popolazione da cui sono stati raccolti i campioni non è noto.

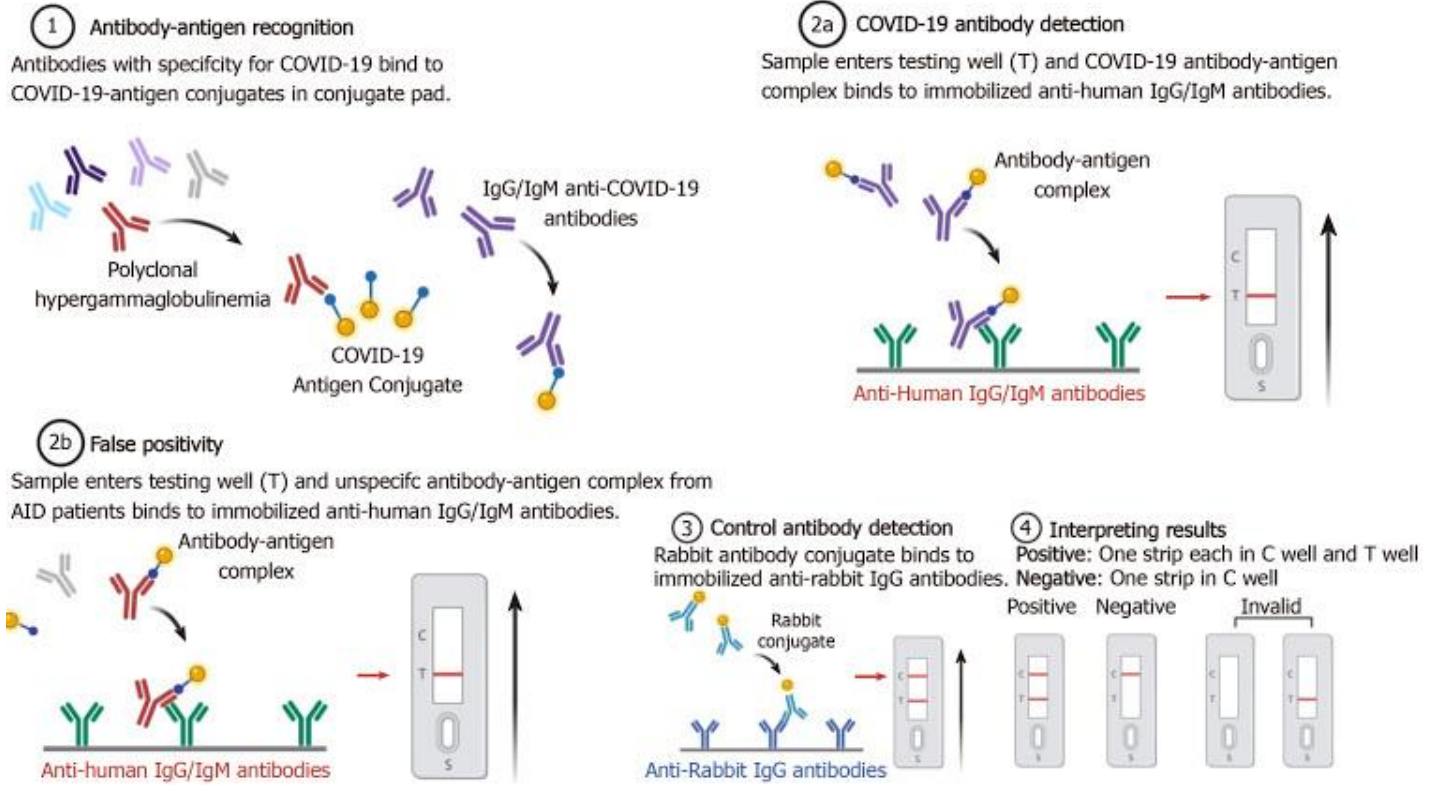
¹⁴⁸ Latiano A, Tavano F, Panza A, et al. False-positive results of SARS-CoV-2 IgM/IgG antibody tests in sera stored before the 2020 pandemic in Italy. *Int J Infect Dis.* 2021;104:159-163. doi:10.1016/j.ijid.2020.12.067 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7834192/>

¹⁴⁹ Georgiev T, Angelov AK. Complexities of diagnosis and management of COVID-19 in autoimmune diseases: Potential benefits and detriments of immunosuppression. *World J Clin Cases.* 2020;8(17):3669-3678. doi:10.12998/wjcc.v8.i17.3669 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7479565/>

¹⁵⁰ Wang Y, Sun S, Shen H, Jiang L, Zhang M, Xiao D, Liu Y, Ma X, Zhang Y, Guo N, Jia T. Cross-reaction of SARS-CoV antigen with autoantibodies in autoimmune diseases. *Cell Mol Immunol.* 2004 Aug;1(4):304-7. PMID: 16225774. <http://www.cmi.ustc.edu.cn/1/4/304.pdf>

Kharlamova et al ¹⁵¹ hanno riscontrato che la maggior parte dei falsi segnali positivi era rilevata nei saggi IgM, come notato da altri ¹⁵², in linea con la bassa affinità degli anticorpi IgM, rispetto al cambio di classe IgG e la maggiore affinità degli anticorpi maturi.

Il siero di pazienti con SLE (lupus eritematoso sistemico) ha un'elevata abbondanza di autoanticorpi, inclusi RF, ANA e anticorpi contro il dsDNA ¹⁵³ e, sebbene il LES sia una malattia meno diffusa dell'AR (artrite reumatoide), i campioni di siero di questi pazienti hanno contribuito in maniera significativa ai segnali falsi positivi nello studio.



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7479565/>

Test di rilevamento degli anticorpi virali e ipotetico caso di cross-reattività falsi positivi in pazienti con malattie autoimmuni e ipergammaglobulinemia policlonale correlata

¹⁵¹ Kharlamova N, et al
False Positive Results in SARS-CoV-2 Serological Tests for Samples From Patients With Chronic Inflammatory Diseases.
Front Immunol. 2021 May 3;12:666114. doi: 10.3389/fimmu.2021.666114.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8126683/>

¹⁵² Whitman JD, Hiatt J, Mowery CT, et al.
Evaluation of SARS-CoV-2 serology assays reveals a range of test performance.
Nat Biotechnol. 2020;38(10):1174-1183. doi:10.1038/s41587-020-0659-0
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7740072/>

Latiano A, Tavano F, Panza A, et al.
False-positive results of SARS-CoV-2 IgM/IgG antibody tests in sera stored before the 2020 pandemic in Italy.
Int J Infect Dis. 2021;104:159-163. doi:10.1016/j.ijid.2020.12.067
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7834192/>

¹⁵³ Dema B, Charles N.
Autoantibodies in SLE: Specificities, Isotypes and Receptors.
Antibodies (Basel). 2016;5(1):2. Published 2016 Jan 4. doi:10.3390/antib5010002
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6698872/>

Per gli studi sulla sieroprevalenza, la specificità del test è fondamentale,¹⁵⁴ e ciò riguarda in particolare l'Africa subsahariana, dove la prevalenza di COVID-19 è bassa rispetto ad altri continenti¹⁵⁵ e l'endemicità della malaria da *P. falciparum* è elevata.¹⁵⁶

In un tale contesto, da una revisione pubblicata da Vanroye et al¹⁵⁷, la maggior parte dei prodotti RDT (Rapid Diagnostic Tests) valutati risulterebbe in un numero elevato di risultati falsi positivi, probabilmente superiore al numero dei veri positivi, a causa della cross-reattività con *P. falciparum*.

Da notare, anche il *P. vivax*, più diffuso dal punto di vista geografico, era associato a reattività crociata, mentre le linee guida dell'OMS menzionavano di testare la reattività crociata solo per *P. falciparum* e *P. ovale*¹⁵⁸.

Un impatto simile è prevedibile nelle aree endemiche di Schistosomiasi e Dengue.¹⁵⁹

Sebbene non sia stato un obiettivo dello studio (e non valutato sistematicamente), gli autori¹¹⁹ hanno osservato carenze nelle istruzioni per l'uso dei prodotti (senza menzionare l'antigene di rilevamento per 11 su 13 prodotti), nella produzione (contaminazione batterica della fiala del tampone, errori di assemblaggio ed etichettatura della confezione) e nelle prestazioni (controllo e linee del test deboli).

Queste carenze sono state notate anche in precedenza e possono essere causate dall'elevata domanda dei clienti e dall'insufficiente supervisione normativa che però possono compromettere seriamente la fruibilità dei prodotti sul mercato.¹⁶⁰

¹⁵⁴ Mulchandani R, Jones HE, Taylor-Phillips S, et al.

Accuracy of UK Rapid Test Consortium (UK-RTC) "AbC-19 Rapid Test" for detection of previous SARS-CoV-2 infection in key workers: test accuracy study.

BMJ. 2020;371:m4262. Published 2020 Nov 11. doi:10.1136/bmj.m4262

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7656121/>

European Centre for Disease Prevention and Control. Considerations for the use of antibody tests for SARS-CoV-2 – first update. 10 February 2022. Stockholm: ECDC; 2022.

<https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Considerations-for-the-use-of-antibody-tests-for-SARS-CoV2-first-update.pdf>

¹⁵⁵ World Health Organization WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard

¹⁵⁶ Gatton ML, Ciketic S, Barnwell JW, et al.

An assessment of false positive rates for malaria rapid diagnostic tests caused by non-Plasmodium infectious agents and immunological factors.

PLoS One. 2018;13(5):e0197395. Published 2018 May 14. doi:10.1371/journal.pone.0197395

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5951549/>

World malaria report 2019

¹⁵⁷ Vanroye F, Bossche DVD, Brosius I, Tack B, Esbroeck MV, Jacobs J.

COVID-19 Antibody Detecting Rapid Diagnostic Tests Show High Cross-Reactivity When Challenged with Pre-Pandemic Malaria, Schistosomiasis and Dengue Samples.

Diagnostics (Basel). 2021 Jun 25;11(7):1163. doi: 10.3390/diagnostics11071163.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8305106/>

¹⁵⁸ Coronavirus disease (COVID-19) Pandemic — Emergency Use Listing Procedure (EUL) open for IVDs

COVID-19 Target product profiles for priority diagnostics to support response to the COVID-19 pandemic v.1.0

¹⁵⁹ Yek C, Nam VS, Leang R, et al.

The Pandemic Experience in Southeast Asia: Interface Between SARS-CoV-2, Malaria, and Dengue.

Front Trop Dis. 2021;2:788590. doi:10.3389/ftid.2021.788590

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8975143/>

¹⁶⁰ West R, Kobokovich A, Connell N, Gronvall GK.

COVID-19 Antibody Tests: A Valuable Public Health Tool with Limited Relevance to Individuals.

Trends Microbiol. 2021;29(3):214-223. doi:10.1016/j.tim.2020.11.002

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7836413/>

Morshed M, Sekirov I, McLennan M, et al.

Comparative Analysis of Capillary vs Venous Blood for Serologic Detection of SARS-CoV-2 Antibodies by RPOC Lateral Flow Tests.

Open Forum Infect Dis. 2021;8(3):ofab043. Published 2021 Jan 28. doi:10.1093/ofid/ofab043

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7928643/>

Pallett SJC, Jones R, Pallett MA, et al.

Characterising differential antibody response is integral to future SARS-CoV-2 serostudies.

J Infect. 2020;81(6):e28-e30. doi:10.1016/j.jinf.2020.07.029

Inoltre, l'interferenza con autoanticorpi, anticorpi eterotropi e alloanticorpi (anticorpi da tessuto allogenico) può portare a falsi positivi in donne in gravidanza, pazienti con malattie autoimmuni, trapianti e trasfusioni di sangue.¹⁶¹

Per comprendere ulteriormente i fattori di interferenza endogena dell'ELISA sulla rilevazione del SARS-CoV-2 IgM e IgG sierici, il test è stato utilizzato in sieri di 200 pazienti senza infezione da COVID-19, incluso il gruppo positivo al fattore reumatoide (RF), agli anticorpi antinucleari (ANA), il gruppo delle donne in gravidanza e senior normale, con 50 campioni in ciascun gruppo e 100 controlli normali.¹⁶²

Il livello di SARS-CoV-2 IgG nelle donne in gravidanza era significativamente superiore a quello del gruppo di controllo normale ($p = 0,000$), ma non vi era alcuna differenza significativa tra gli altri gruppi.

I livelli di SARS-CoV-2 IgM nel gruppo di donne in gravidanza, normale anziano, ANA positivo ed RF positivo erano significativamente superiori a quelli del gruppo di controllo normale ($p < 0,05$), con tassi di falsi positivi significativamente più elevati in questi gruppi ($p = 0,036$, $p = 0,004$, $p = 0,000$, rispetto al gruppo di controllo normale). L'RF sierico ha causato un falso positivo per SARS-CoV-2 IgM in modo dipendente dalla concentrazione, soprattutto quando la sua concentrazione era superiore a 110,25 IU/L.

Risposte anticorpali nei pazienti COVID-19

Le sottoclassi di IgG modulano le risposte immunitarie tramite l'impegno di diversi FcR,¹⁶³ e l'espressione ectopica di FcγRIIIa e FcγRIIb, ma non di FcγRI o FcγRIIIa, ha dimostrato di essere in grado di indurre l'ADE dell'infezione da SARS-CoV¹⁶⁴.

I polimorfismi allelici in FcγRIIIa sono associati alla patologia della SARS e gli individui con un'isoforma di FcγRIIIa che si lega sia a IgG1 che a IgG2 sviluppano una malattia più grave rispetto agli individui con l'FcγRIIIa che si lega solo ad IgG2.¹⁶⁵

Inoltre, recenti studi sulle risposte anticorpali in pazienti con COVID-19 hanno associato titoli più elevati di IgM e IgG anti-N in tutti i momenti successivi alla comparsa dei sintomi, con un esito peggiore della malattia¹⁶⁶.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7392850/>

¹⁶¹ Rifkin SB, Owens LE, Greenwald JL.

Factors associated with false-positive results from fingerstick OraQuick ADVANCE rapid HIV 1/2 antibody test.

J Int Assoc Physicians AIDS Care (Chic). 2012 Nov-Dec;11(6):356-60. doi: 10.1177/1545109712454194

<https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1545109712454194>

Reported Causes of False-positive EIA and Immunoblot Tests for HIV Antibody

¹⁶² Liu W, Long X, Wan K, et al.

The endogenous factors affecting the detection of serum SARS-CoV-2 IgG/IgM antibodies by ELISA.

J Med Virol. 2022;94(5):1976-1982. doi:10.1002/jmv.27557

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9015225/>

¹⁶³ Galipeau Y, Greig M, Liu G, Driedger M, Langlois MA.

Humoral Responses and Serological Assays in SARS-CoV-2 Infections.

Front Immunol. 2020;11:610688. Published 2020 Dec 18. doi:10.3389/fimmu.2020.610688

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7775512/>

¹⁶⁴ Jaume M, Yip MS, Cheung CY, et al.

Anti-severe acute respiratory syndrome coronavirus spike antibodies trigger infection of human immune cells via a pH- and cysteine protease-independent FcγR pathway.

J Virol. 2011;85(20):10582-10597. doi:10.1128/JVI.00671-11

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3187504/>

¹⁶⁵ Yuan FF, Tanner J, Chan PK, et al.

Influence of FcγRIIIA and MBL polymorphisms on severe acute respiratory syndrome.

Tissue Antigens. 2005;66(4):291-296. doi:10.1111/j.1399-0039.2005.00476.x

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7190181/>

¹⁶⁶ Wenting Tan, et al

Viral Kinetics and Antibody Responses in Patients with COVID-19

medRxiv 2020.03.24.20042382; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.24.20042382>

<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.03.24.20042382v1.full.pdf>

In particolare, titoli più elevati di IgG e IgM anti-S e anti-N sono correlati a quadri clinici più severi e all'età avanzata ¹⁶⁷, suggerendo effetti potenzialmente dannosi degli anticorpi in alcuni pazienti.

Tuttavia, il 70% dei pazienti che si sono ripresi dalla COVID-19 lieve aveva anticorpi neutralizzanti misurabili che persistevano anche dopo la visita di controllo ¹⁶⁸. Pertanto, le conoscenze che si possono acquisire dallo studio delle caratteristiche degli anticorpi correlate al recupero anziché al peggioramento della malattia sono indispensabili per individuare il tipo di anticorpi da valutare per il rischio di ADE durante la malattia e in seguito alla vaccinazione. ¹⁶⁹

Dagli studi svolti con i vaccini contro il SARS-CoV-1 si è visto che i vaccini che esprimevano la proteina N non fornivano protezione, e al contrario aumentavano la polmonite indotta da infezione con una maggiore infiltrazione polmonare di eosinofili e risposte alterate delle cellule T_H 2, ¹⁷⁰ con l'induzione dell'ERD.

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.610688/full>

Panoramica delle caratteristiche dell'isotipo dell'anticorpo e una sequenza temporale approssimativa dall'infezione da SARS-CoV-2 alla possibile immunità. Ciascun isotipo dell'anticorpo è rappresentato con la sua forma tipica e la catena pesante associata. È inclusa anche una breve descrizione della loro funzione principale, nonché una rappresentazione delle citochine sovregolate e sottoregolate necessarie per ogni cambio di classe. Viene mostrata la sequenza temporale approssimativa dell'aspetto e la successiva diminuzione di ciascun isotipo in relazione all'RNA virale. Le curve e i valori si basano su recenti studi sierologici discussi in questa recensione. Poiché è disponibile una letteratura limitata sull'implicazione delle IgE nella patogenesi e nell'immunità mediata da anticorpi a SARS-CoV-2, in quanto tale la rappresentazione della sequenza temporale delle IgE è puramente ipotetica.

¹⁶⁷ Jiang, Hw., Li, Y., Zhang, Hn. et al.

SARS-CoV-2 proteome microarray for global profiling of COVID-19 specific IgG and IgM responses.

Nat Commun 11, 3581 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17488-8>

<https://www.nature.com/articles/s41467-020-17488-8>

Fan Wu, et al

Antibody-dependent enhancement (ADE) of SARS-CoV-2 infection in recovered COVID-19 patients: studies based on cellular and structural biology analysis

medRxiv 2020.10.08.20209114; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.10.08.20209114>

<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.10.08.20209114v1.full.pdf>

¹⁶⁸ Fan Wu, et al

Neutralizing antibody responses to SARS-CoV-2 in a COVID-19 recovered patient cohort and their implications

medRxiv 2020.03.30.20047365; doi:<https://doi.org/10.1101/2020.03.30.20047365>

<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.03.30.20047365v2.full.pdf>

¹⁶⁹ Zheng J, Deng Y, Zhao Z, et al.

Characterization of SARS-CoV-2-specific humoral immunity and its potential applications and therapeutic prospects.

Cell Mol Immunol. 2022;19(2):150-157. doi:10.1038/s41423-021-00774-w

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8513558/>

¹⁷⁰ 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/>

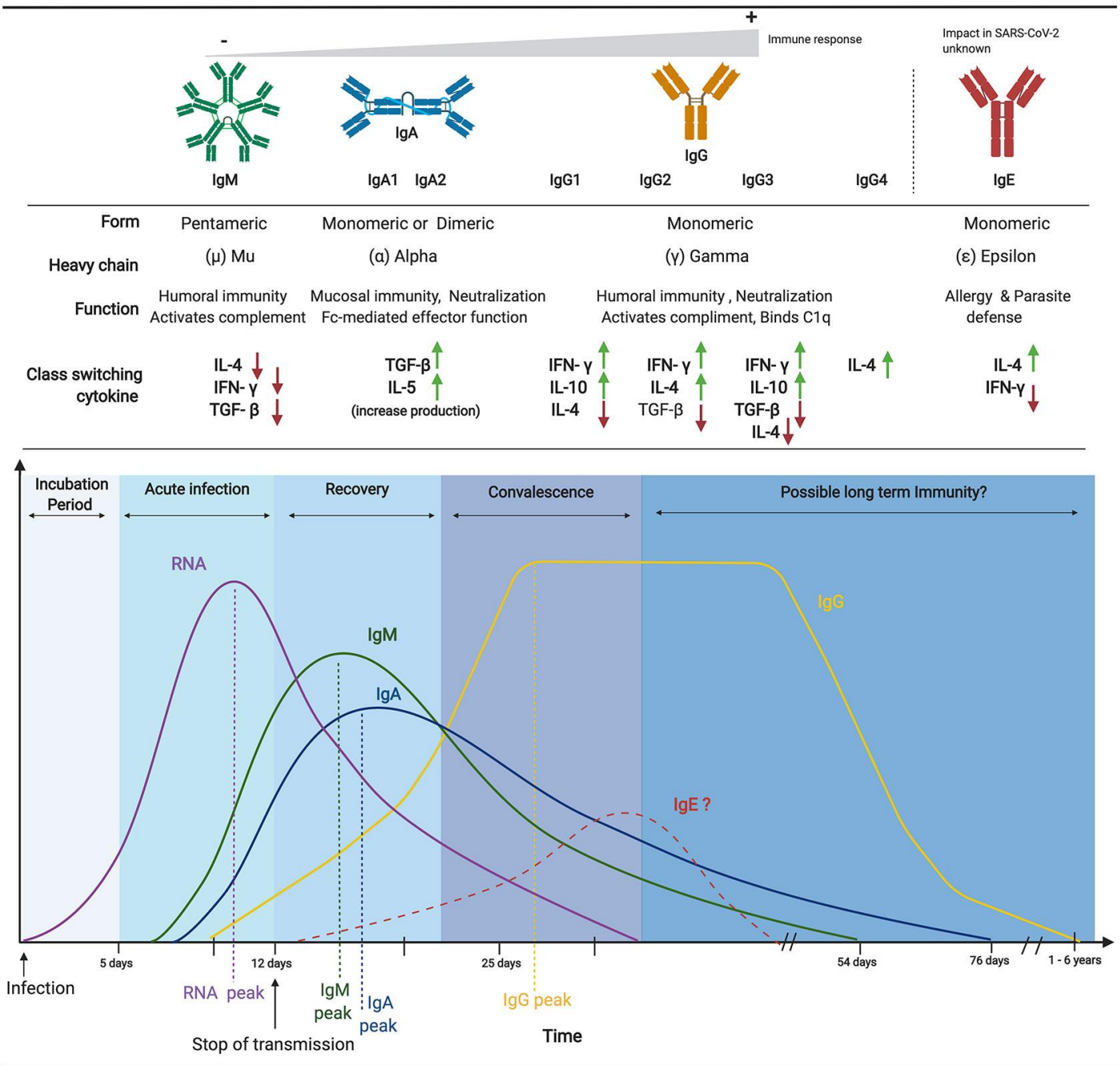
Yasui F, et al

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.

<https://www.jimmunol.org/content/181/9/6337.long>

Antibody overview and timeline in Sars-CoV-2 infection



Reattività crociata e immunità eterologa

La reattività crociata degli anticorpi endemici di coronavirus contro il SARS-CoV-2 è di potenziale rilevanza clinica.

L'ipotesi del peccato antigenico originale suggerisce che l'immunità preesistente si traduce nella riattivazione di una risposta a un ceppo precedente, in contrapposizione alla formazione di una risposta diretta contro il ceppo attuale, e ciò può ridurre la formazione di anticorpi neutralizzanti, smorzando così l'effettiva eliminazione del nuovo virus.

Studi pionieristici sulle risposte all'influenza, basati su epidemiologia, modellizzazione e profilazione del repertorio anticorpale, suggeriscono che gli anticorpi generati dall'esposizione infantile all'influenza sono "programmati" ed esercitano un effetto importante sulla natura della risposta anticorpale provocata dalle

successive esposizioni nell'uomo ¹⁷¹. È stato quindi suggerito che questo fenomeno possa esistere anche nell'infezione da SARS-CoV-2. ¹⁷²

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8546681/>

L'impatto dell'OAS sull'efficacia della risposta immunitaria. L'OAS è influenzata non solo dalla temporalità di un'esposizione antigenica ma anche dalla "raccolta" di antigeni associati all'esposizione. (A) L'esposizione agli hCoV (virus correlati come HCoV-OC43, HCoV-HKU1, HCoV-NL63 e HCoV-HKU1) prepara il sistema immunitario agli antigeni blu, viola e verde. Ciò si tradurrà in cellule B di memoria a lunga vita con specificità rispettivamente per questi antigeni. La riesposizione agli hCoV si tradurrà in una robusta risposta anticorpale a ciascuno di questi antigeni. SARS-CoV-2 esprime lo stesso

¹⁷¹ Stamper CT, Wilson PC.

What Are the Primary Limitations in B-Cell Affinity Maturation, and How Much Affinity Maturation Can We Drive with Vaccination? Is Affinity Maturation a Self-Defeating Process for Eliciting Broad Protection?.

Cold Spring Harb Perspect Biol. 2018;10(5):a028803. Published 2018 May 1. doi:10.1101/cshperspect.a028803

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5899041/>

Anderson EM, Goodwin EC, Verma A, et al.

Seasonal human coronavirus antibodies are boosted upon SARS-CoV-2 infection but not associated with protection.

Cell. 2021;184(7):1858-1864.e10. doi:10.1016/j.cell.2021.02.010

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7871851/>

Kissler SM, Tedijanto C, Goldstein E, Grad YH, Lipsitch M.

Projecting the transmission dynamics of SARS-CoV-2 through the postpandemic period.

Science. 2020;368(6493):860-868. doi:10.1126/science.abb5793

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7164482/>

Gostic KM, Ambrose M, Worobey M, Lloyd-Smith JO.

Potent protection against H5N1 and H7N9 influenza via childhood hemagglutinin imprinting.

Science. 2016;354(6313):722-726. doi:10.1126/science.aag1322

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5134739/>

Yewdell JW, Santos JJS.

Original Antigenic Sin: How Original? How Sinful?

Cold Spring Harb Perspect Med. 2021 May 3;11(5):a038786. doi: 10.1101/cshperspect.a038786.

<http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/content/11/5/a038786.full>

¹⁷² Brown EL, Essigmann HT.

Original Antigenic Sin: the Downside of Immunological Memory and Implications for COVID-19.

mSphere. 2021;6(2):e00056-21. Published 2021 Mar 10. doi:10.1128/mSphere.00056-21

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8546681/>

Roncati L, Palmieri B.

What about the original antigenic sin of the humans versus SARS-CoV-2?

Med Hypotheses. 2020;142:109824. doi:10.1016/j.mehy.2020.109824

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7204740/>

Reina J.

Possible effect of the "original antigenic sin" in vaccination against new variants of SARS-CoV-2.

Rev Clin Esp (Barc). 2022;222(2):91-92. doi:10.1016/j.rceng.2021.05.005

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8437764/>

Noori M, Nejadghaderi SA, Rezaei N.

"Original antigenic sin": A potential threat beyond the development of booster vaccination against novel SARS-CoV-2 variants [published online ahead of print, 2021 May 3].

Infect Control Hosp Epidemiol. 2021;1-2. doi:10.1017/ice.2021.199

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8144803/>

Fierz W, Walz B.

Antibody Dependent Enhancement Due to Original Antigenic Sin and the Development of SARS.

Front Immunol. 2020;11:1120. Published 2020 Jun 5. doi:10.3389/fimmu.2020.01120

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7291596/>

Kohler H, Nara P.

A Novel Hypothesis for Original Antigenic Sin in the Severe Disease of SARS-CoV-2 Infection.

Monoclon Antib Immunodiagn Immunother. 2020 Aug;39(4):107-111. doi: 10.1089/mab.2020.0029.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32762609/>

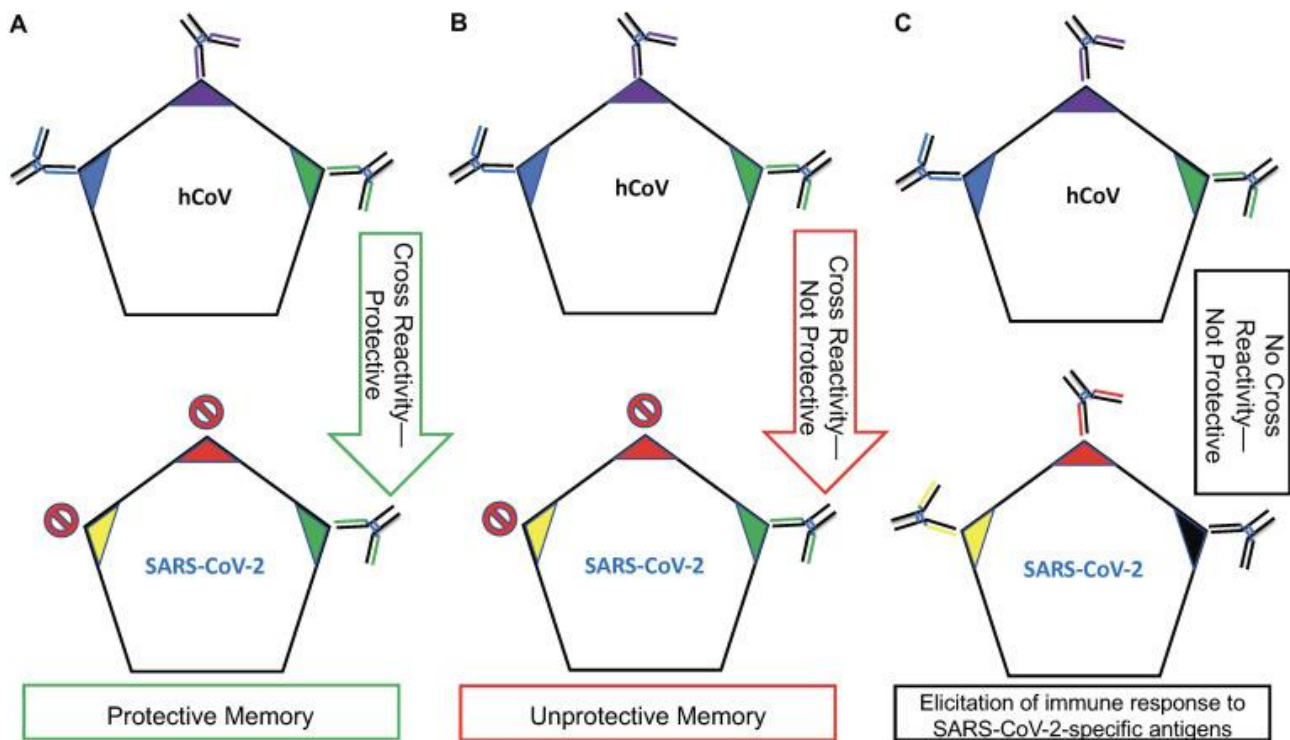
Petráš M, Králová Lesná I.

SARS-CoV-2 vaccination in the context of original antigenic sin.

Hum Vaccin Immunother. 2022;18(1):1949953. doi:10.1080/21645515.2021.1949953

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8290366/>

antigene hCoV Green e due nuovi antigeni, giallo e rosso. La risposta di memoria anti-cellule B verdi prevverrà o limiterà in modo significativo la capacità dei linfociti B naive con specificità agli antigeni gialli e rossi di svilupparsi. In questo scenario, l'anticorpo anti-verde è protettivo; quindi, mentre l'OAS ha impedito/diminuito l'elicitazione di anticorpi con specificità agli antigeni giallo e rosso, la risposta di memoria dell'antigene anti-verde conferisce un certo livello di protezione contro un'infezione da SARS-CoV-2. **(B)** Questo scenario è identico a quello descritto per il pannello A con l'eccezione che la risposta anti-verde suscitata contro hCoV non è neutralizzante per SARS-CoV-2. In questo esempio, la risposta della memoria al verde non è protettiva mentre allo stesso tempo inibisce/interferisce con la capacità di creare una nuova risposta agli antigeni giallo e rosso che potrebbero potenzialmente fornire protezione. **(C)** Questo scenario descrive due esposizioni separate. Poiché nessun antigene è condiviso tra hCoV e SARS-CoV-2, la risposta anti-SARS-CoV-2 sarà un'esposizione primaria, non influenzata positivamente o negativamente dalla precedente esposizione agli hCoV.



Sebbene gli anticorpi cross-reattivi non siano neutralizzanti, la neutralizzazione non è però l'unico meccanismo mediante il quale gli anticorpi conferiscono protezione.

Infatti, gli anticorpi cross-reattivi potrebbero interagire con i recettori per la regione Fc degli anticorpi presenti sulla superficie delle cellule immunitarie innate e promuovere attività della funzione effettrice protettiva, inclusa la fagocitosi cellulare anticorpo-dipendente e la citotossicità cellulare anticorpo-dipendente ¹⁷³.

A tal fine, è stato studiato un sottogruppo di anticorpi monoclonali isolati da pazienti affetti da SARS-CoV, crossreattivi con SARS-CoV-2 ma non neutralizzanti, ed è risultato che sono stati in grado di conferire protezione in un modello murino ¹⁷⁴.

Inoltre, gli anticorpi che attaccano il coronavirus umano OC43 sono stati riattivati in modo robusto in risposta all'infezione da SARS-CoV-2 ma non alla vaccinazione con spike stabilizzata, per cui si ritiene che il

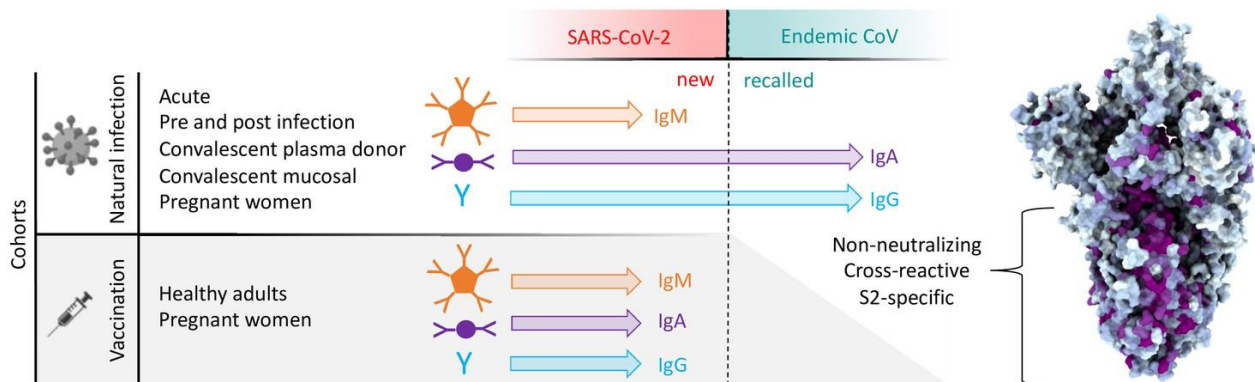
¹⁷³ Fox JM, Roy V, Gunn BM, et al. Optimal therapeutic activity of monoclonal antibodies against chikungunya virus requires Fc-FcγR interaction on monocytes. *Sci Immunol.* 2019;4(32):eaav5062. doi:10.1126/sciimmunol.aav5062 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6698136/>

Earnest JT, Basore K, Roy V, et al. Neutralizing antibodies against Mayaro virus require Fc effector functions for protective activity. *J Exp Med.* 2019;216(10):2282-2301. doi:10.1084/jem.20190736 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6781005/>

¹⁷⁴ Shiakolas AR, Kramer KJ, Wrapp D, et al. Cross-reactive coronavirus antibodies with diverse epitope specificities and Fc effector functions. *Cell Rep Med.* 2021;2(6):100313. doi:10.1016/j.xcrm.2021.100313 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8139315/>

sottodominio S2 della proteina spike (cioè epitopi dell'RBD non sovrapposti) sia probabilmente responsabile dell'attivazione dominata dalla risposta IgG.¹⁷⁵

Un ulteriore approfondimento sulla differenza tra la risposta immunitaria naturale e vaccinale sarà disponibile in successivi documenti.



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8562549/>

Le risposte dell'anticorpo alla SARS-CoV-2 e alle proteine della spike di CoV endemiche sono state misurate in diverse coorti. Mentre gli anticorpi contro SARS-CoV-2 sono stati indotti in tutti gli isotipi, solo le risposte IgA e IgG al CoV endemico sono state potenziate in modo robusto e solo tra individui infettati naturalmente ma non vaccinati. Queste risposte richiamate e cross-reattive al CoV endemico riconoscevano principalmente il dominio S2 meglio conservato e non erano neutralizzanti. Sebbene non siano note altre attività antivirali di anticorpi S2-specifici ampiamente cross-reattivi, la diversa antigenicità dell'infezione naturale e della vaccinazione con spike di pre-fusione stabilizzato ha potenziali implicazioni per l'ampiezza e il livello di protezione offerti da ciascuno.

Test di neutralizzazione

Per valutare le interazioni virus-anticorpo vengono utilizzati più test sierologici (test di inibizione dell'emoagglutinazione, test di fissazione del complemento, test degli anticorpi fluorescenti, ecc.).¹⁷⁶ Tuttavia, solo pochi test, come il test di neutralizzazione con riduzione delle placche (PRNT Plaque Reduction Neutralization Test), misurano la neutralizzazione del virus durante il processo di attacco virale e l'ingresso nelle cellule ospiti.¹⁷⁷

¹⁷⁵ Crowley AR, Natarajan H, Hederman AP, et al.

Boosting of Cross-Reactive Antibodies to Endemic Coronaviruses by SARS-CoV-2 Infection but not Vaccination with Stabilized Spike. Preprint. medRxiv. 2021;2021.10.27.21265574. Published 2021 Oct 28. doi:10.1101/2021.10.27.21265574 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8562549/>

Li D, et al

In vitro and in vivo functions of SARS-CoV-2 infection-enhancing and neutralizing antibodies. Cell. 2021 Aug 5;184(16):4203-4219.e32. doi: 10.1016/j.cell.2021.06.021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8232969/>

Zhou Y, et al

Enhancement versus neutralization by SARS-CoV-2 antibodies from a convalescent donor, associates with distinct epitopes on the RBD. Cell Rep. 2021 Feb 2;34(5):108699. doi: 10.1016/j.celrep.2021.108699. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7802522/>

¹⁷⁶ Morales-Núñez JJ, Muñoz-Valle JF, Torres-Hernández PC, Hernández-Bello J.

Overview of Neutralizing Antibodies and Their Potential in COVID-19. Vaccines (Basel). 2021 Nov 23;9(12):1376. doi: 10.3390/vaccines9121376. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8706198/>

¹⁷⁷ Mendoza EJ, Manguiat K, Wood H, Drebot M.

Two Detailed Plaque Assay Protocols for the Quantification of Infectious SARS-CoV-2. Curr Protoc Microbiol. 2020 Jun;57(1):ecpmc105. doi: 10.1002/cpmc.105. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7300432/>

Roehrig JT, Hombach J, Barrett AD.

Guidelines for Plaque-Reduction Neutralization Testing of Human Antibodies to Dengue Viruses. Viral Immunol. 2008 Jun;21(2):123-32. doi: 10.1089/vim.2008.0007. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18476771/>

Il PRNT consente di misurare gli effetti degli anticorpi sull'infettività virale, inoculando su piastra il virus con cellule sensibili, come mostrato nella Figura A, pertanto, è considerato il gold standard per valutare la capacità di neutralizzazione degli anticorpi contro il SARS-CoV-2.

Le cellule vengono coltivate in mezzi semisolidi che limitano la diffusione del virus; ogni virus che avvia l'infezione produce un'area localizzata dell'infezione, nota come placca, che può essere visualizzata e contata. Dopo il conteggio delle placche, è possibile determinare la riduzione percentuale dell'infettività totale del virus.¹⁷⁸

Questo test presenta un notevole svantaggio, in quanto di solito viene eseguito con virus vivi (contagiosi), ed è necessario lavorare in un laboratorio di livello di biosicurezza 3 (BSL-3) con persone molto qualificate ed esperte.¹⁷⁹

Laboratori: livelli di biosicurezza, descrizione, agenti patogeni lavorati

[Classificazione degli agenti patogeni in gruppi di rischio](#)

[Classificazione degli agenti infettivi in relazione alla sicurezza biologica](#)

[Rischio biologico](#)

Classificazione Art. 268 – D. Lgs.vo n. 81/2008

- a) agente biologico del gruppo 1: un agente che presenta poche probabilità di causare malattie in soggetti umani;
- b) agente biologico del gruppo 2: un agente che può causare malattie in soggetti umani e costituire un rischio per i lavoratori; è poco probabile che si propaga nella comunità; sono di norma disponibili efficaci misure profilattiche o terapeutiche;
- c) agente biologico del gruppo 3: un agente che può causare malattie gravi in soggetti umani e costituisce un serio rischio per i lavoratori; l'agente biologico può propagarsi nella comunità, ma di norma sono disponibili efficaci misure profilattiche o terapeutiche;
- d) agente biologico del gruppo 4: un agente biologico che può provocare malattie gravi in soggetti umani e costituisce un serio rischio per i lavoratori e può presentare un elevato rischio di propagazione nella comunità; non sono disponibili, di norma, efficaci misure profilattiche o terapeutiche.

¹⁷⁸ Abe KT, et al

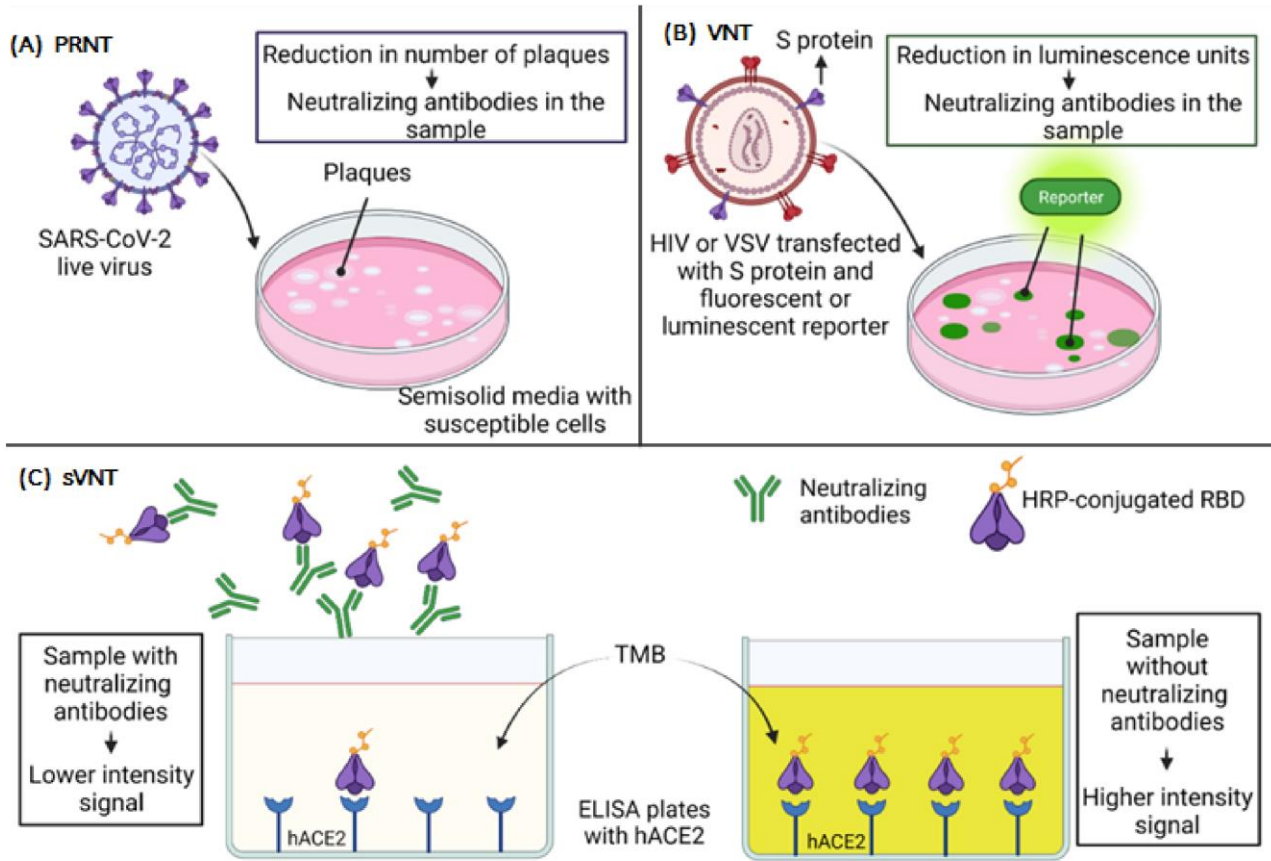
A simple protein-based surrogate neutralization assay for SARS-CoV-2. JCI Insight. 2020 Oct 2;5(19):e142362. doi: 10.1172/jci.insight.142362. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7566699/>

¹⁷⁹ Perera RA et al

Serological assays for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), March 2020. Euro Surveill. 2020 Apr;25(16):2000421. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.16.2000421. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7189648/>

Okba NMA, et al

Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease Patients. Emerg Infect Dis. 2020 Jul;26(7):1478-1488. doi: 10.3201/eid2607.200841. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7323511/>



<https://www.mdpi.com/2076-393X/9/12/1376/htm>

Saggi di neutralizzazione. **(A)** In un test PRNT, le cellule suscettibili all'infezione vengono coltivate in mezzi semisolidi e vengono infettate dal virus vivo SARS-CoV-2. I mezzi semisolidi consentono di localizzare l'infezione e di visualizzarla come placche. Le placche vengono contate e una riduzione del numero di placche significa che nel campione sono presenti anticorpi neutralizzanti. **(B)** VNT è simile a un PRNT, ma invece di un virus vivo, un virus simil-HIV o VSV viene trasfettato con la proteina S di SARS-CoV-2 e un reporter luminescente. Le unità di luminescenza sono siti di infezione e una riduzione delle unità di luminescenza significa che sono presenti anticorpi neutralizzanti. **(C)** L'sVNT utilizza un hACE2 immobilizzato in piastre ELISA e un RBD coniugato con HRP; se nel campione sono presenti anticorpi neutralizzanti, l'RBD coniugato con HRP non si legherà a hACE2 e non ci sarà segnale o un segnale a bassa intensità. PRNT, test di neutralizzazione con riduzione delle placche; VNT, test di neutralizzazione del virus; sVNT, test di neutralizzazione del virus surrogato; HIV, virus dell'immunodeficienza umana; VSV, virus della stomatite vescicolare; hACE2, enzima di conversione dell'angiotensina umana 2; HRP, perossidasi di rafano; RBD, dominio di legame del recettore; TMB, tetrametilbenzidina.

I test di neutralizzazione del virus (VNT – fig. B) possono essere eseguiti anche con vettori virali pseudotipizzati con la proteina S del SARS-CoV-2,¹⁸⁰ come si approfondirà in seguito.

Questa tecnica non richiede un laboratorio BSL-3; tuttavia, richiede laboratori specializzati ed è una procedura molto complicata e dispendiosa in termini di tempo,¹⁸¹

¹⁸⁰ Crawford KHD, et al

Protocol and Reagents for Pseudotyping Lentiviral Particles with SARS-CoV-2 Spike Protein for Neutralization Assays.

Viruses. 2020 May 6;12(5):513. doi: 10.3390/v12050513.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7291041/>

Ferrara F, Temperton N.

Pseudotype Neutralization Assays: From Laboratory Bench to Data Analysis.

Methods Protoc. 2018 Jan 22;1(1):8. doi: 10.3390/mps1010008.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6526431/>

Septisetyani EP, Prasetyaningrum PW, Anam K, Santoso A.

SARS-CoV-2 Antibody Neutralization Assay Platforms Based on Epitopes Sources: Live Virus, Pseudovirus, and Recombinant S Glycoprotein RBD.

Immune Netw. 2021 Nov 23;21(6):e39. doi: 10.4110/in.2021.21.e39.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8733193/>

¹⁸¹ Crawford KHD, et al

Protocol and Reagents for Pseudotyping Lentiviral Particles with SARS-CoV-2 Spike Protein for Neutralization Assays.

Viruses. 2020 May 6;12(5):513. doi: 10.3390/v12050513.

Poiché la proteina SARS-CoV-2 S è necessaria affinché il virus entri in una cellula, è possibile trasferire cellule specifiche in grado di produrre ed esprimere particelle lentivirali pseudotipiche da utilizzare per infettare le cellule sensibili che esprimono il recettore ACE2.¹⁸²

Tale pseudotipizzazione può essere ottenuta con particelle lentivirali derivate dal virus dell'immunodeficienza umana (HIV)¹⁸³ e dal virus della stomatite vescicolare (VSV)¹⁸⁴, le quali permettono di misurare l'ingresso nelle cellule mediato dalla spike con reporter fluorescenti o luciferasi, impiegati per valutare la capacità neutralizzante degli anticorpi umani.

Rispetto ai test con virus vivi (live virus assay), i test di neutralizzazione basati su pseudovirus (PBNA) sono meno laboriosi, poiché i dati sono ottenuti attraverso la lettura luminescente.

Al contrario, i live virus assay richiedono la lettura manuale dei risultati al microscopio¹⁸⁵ e la neutralizzazione

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7291041/>

Ferrara F, Temperton N.

Pseudotype Neutralization Assays: From Laboratory Bench to Data Analysis.

Methods Protoc. 2018 Jan 22;1(1):8. doi: 10.3390/mps1010008.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6526431/>

¹⁸² Wang S, et al

Antibody-dependent enhancement (ADE) of SARS-CoV-2 pseudoviral infection requires FcγRIIB and virus-antibody complex with bivalent interaction.

Commun Biol. 2022 Mar 24;5(1):262. doi: 10.1038/s42003-022-03207-0.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8948278/>

Chmielewska AM, Czarnota A, Bieńkowska-Szewczyk K, Grzyb K.

Immune response against SARS-CoV-2 variants: the role of neutralization assays.

NPJ Vaccines. 2021 Nov 29;6(1):142. doi: 10.1038/s41541-021-00404-6.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8630184/>

Fan Wu, et al

Antibody-dependent enhancement (ADE) of SARS-CoV-2 infection in recovered COVID-19 patients: studies based on cellular and structural biology analysis

medRxiv 2020.10.08.20209114; doi:<https://doi.org/10.1101/2020.10.08.20209114>

<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.10.08.20209114v1.full>

Renn A, Fu Y, Hu X, Hall MD, Simeonov A.

Fruitful Neutralizing Antibody Pipeline Brings Hope To Defeat SARS-Cov-2.

Trends Pharmacol Sci. 2020 Nov;41(11):815-829. doi: 10.1016/j.tips.2020.07.004.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7572790/>

¹⁸³ Ou X, Liu Y, Lei X, Li P, Mi D, Ren L, Guo L, Guo R, Chen T, Hu J, Xiang Z, Mu Z, Chen X, Chen J, Hu K, Jin Q, Wang J, Qian Z.

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. Erratum in: Nat Commun. 2021 Apr 1;12(1):2144.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7100515/>

Chen X, et al

Human monoclonal antibodies block the binding of SARS-CoV-2 spike protein to angiotensin converting enzyme 2 receptor.

Cell Mol Immunol. 2020 Jun;17(6):647-649. doi: 10.1038/s41423-020-0426-7.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7167496/>

¹⁸⁴ Xiong HL, et al

Robust neutralization assay based on SARS-CoV-2 S-protein-bearing vesicular stomatitis virus (VSV) pseudovirus and ACE2-overexpressing BHK21 cells.

Emerg Microbes Infect. 2020 Dec;9(1):2105-2113. doi: 10.1080/22221751.2020.1815589.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7534347/>

Hoffmann M, Ket al

SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor.

Cell. 2020 Apr 16;181(2):271-280.e8. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.052.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7102627/>

¹⁸⁵ Nie J, Li Q, Wu J, Zhao C, Hao H, Liu H, Zhang L, Nie L, Qin H, Wang M, Lu Q, Li X, Sun Q, Liu J, Fan C, Huang W, Xu M, Wang Y.

Establishment and validation of a pseudovirus neutralization assay for SARS-CoV-2.

Emerg Microbes Infect. 2020 Dec;9(1):680-686. doi: 10.1080/22221751.2020.1743767.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7144318/>

viene misurata come riduzione della luminescenza in unità relative di luce (RLU).¹⁸⁶

Un altro approccio consiste nel valutare la neutralizzazione mediante la replicazione del VSV ricombinante (rVSVs).¹⁸⁷ Rispetto agli pseudotipi, i VSV ricombinanti che codificano per la proteina S sono più facili da produrre. Gli rVSV sono stati precedentemente utilizzati con altri virus letali e con SARS-CoV e MERS-CoV. In questo caso, il gene della glicoproteina nativa del genoma del VSV viene sostituito con il gene che codifica per la proteina S. Il genoma del VSV è anche modificato per esprimere una proteina fluorescente verde (GFP) che funge da reporter, consentendo la valutazione dell'infezione.¹⁸⁸

Un ulteriore test per la neutralizzazione è l'Immuno-CovTM sviluppato da Vandergaast et al.¹⁸⁹, in cui un VSV viene modificato per esprimere la proteina S, ma viene utilizzato un sistema di luciferasi a "dual split protein" (DSP) per quantificare la neutralizzazione del virus.

Il sistema DSP utilizza una proteina fluorescente verde (GFP) splittata chimerica e una luciferasi di Renilla (RL) splittata.¹⁹⁰ La fusione tra due linee cellulari che esprimono parti complementari del sistema reporter consente di misurare la fusione cellulare indotta dal virus su piastra a 96 pozzetti.

Septisetyani EP, Prasetyaningrum PW, Anam K, Santoso A.
SARS-CoV-2 Antibody Neutralization Assay Platforms Based on Epitopes Sources: Live Virus, Pseudovirus, and Recombinant S Glycoprotein RBD.
Immune Netw. 2021 Nov 23;21(6):e39. doi: 10.4110/in.2021.21.e39.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8733193/>

¹⁸⁶ Chen Q, Nie J, Huang W, Jiao Y, Li L, Zhang T, Zhao J, Wu H, Wang Y.
Development and optimization of a sensitive pseudovirus-based assay for HIV-1 neutralizing antibodies detection using A3R5 cells.
Hum Vaccin Immunother. 2018 Jan 2;14(1):199-208. doi: 10.1080/21645515.2017.1373922.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5791569/>

¹⁸⁷ Case JB, et al
Neutralizing Antibody and Soluble ACE2 Inhibition of a Replication-Competent VSV-SARS-CoV-2 and a Clinical Isolate of SARS-CoV-2.
Cell Host Microbe. 2020 Sep 9;28(3):475-485.e5. doi: 10.1016/j.chom.2020.06.021.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7332453/>

Dieterle ME, et al
A Replication-Competent Vesicular Stomatitis Virus for Studies of SARS-CoV-2 Spike-Mediated Cell Entry and Its Inhibition.
Cell Host Microbe. 2020 Sep 9;28(3):486-496.e6. doi: 10.1016/j.chom.2020.06.020.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7332447/>

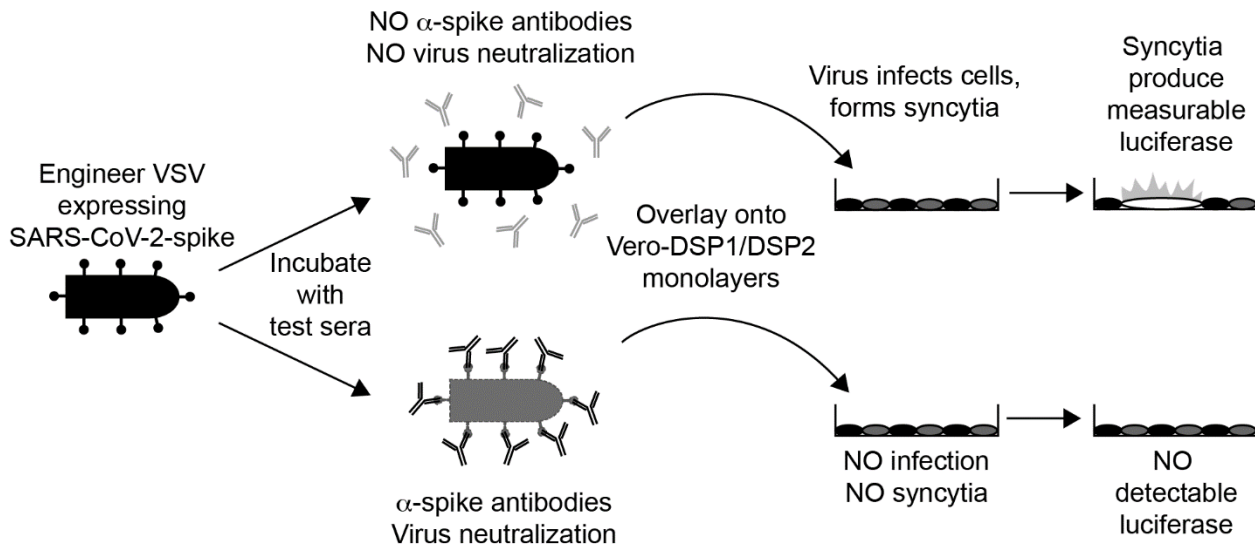
Li H, Zhao C, Zhang Y, Yuan F, Zhang Q, Shi X, Zhang L, Qin C, Zheng A.
Establishment of replication-competent vesicular stomatitis virus-based recombinant viruses suitable for SARS-CoV-2 entry and neutralization assays.
Emerg Microbes Infect. 2020 Dec;9(1):2269-2277. doi: 10.1080/22221751.2020.1830715.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7594855/>

¹⁸⁸ Case JB, et al
Neutralizing Antibody and Soluble ACE2 Inhibition of a Replication-Competent VSV-SARS-CoV-2 and a Clinical Isolate of SARS-CoV-2.
Cell Host Microbe. 2020 Sep 9;28(3):475-485.e5. doi: 10.1016/j.chom.2020.06.021.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7332453/>

¹⁸⁹ Vandergaast R, et al
Development and validation of IMMUNO-COVTM: a high-throughput clinical assay for detecting antibodies that neutralize SARS-CoV-2.
bioRxiv [Preprint]. 2020 May 27:2020.05.26.117549. doi: 10.1101/2020.05.26.117549.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7302210/>

Vandergaast R, et al
IMMUNO-COV v2.0: Development and Validation of a High-Throughput Clinical Assay for Measuring SARS-CoV-2-Neutralizing Antibody Titers.
mSphere. 2021 Jun 30;6(3):e0017021. doi: 10.1128/mSphere.00170-21
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8265629/>

¹⁹⁰ Nakane S, Matsuda Z.
Dual Split Protein (DSP) Assay to Monitor Cell-Cell Membrane Fusion.
Methods Mol Biol. 2015;1313:229-36. doi: 10.1007/978-1-4939-2703-6_17
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25947669/>



<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.05.26.117549v1.full.pdf>

Panoramica del test IMMUNO-COVTM. Un picco di SARS-CoV-2 che esprime VSV (VSV-SARSCoV-2-S-Δ19CT) viene incubato con campioni di sieri di prova. In assenza di anticorpi neutralizzanti SARS-CoV-2 (**in alto**) il virus mantiene l'infettività e infetta i monostrati Vero-DSP1/DSP2. Se il campione di prova contiene anticorpi neutralizzanti SARS-CoV-2 (**in basso**), gli anticorpi si legano alla proteina spike che causa neutralizzazione del virus bloccando l'ingresso delle cellule. VSV-SARS-CoV-2-S- Δ19CT induce la formazione di sincizi nei monostrati VeroDSP1/DSP2, che ricostituisce un reporter di luciferasi completamente funzionale che viene utilizzato per quantificare la formazione di sincizi indotta da virus. Un segnale di luciferasi elevato significa che il campione del test non ha neutralizzato il virus, mentre la luciferasi ridotta indica la presenza di anticorpi neutralizzanti SARS-CoV-2 nel test campione.

Infine, è stato sviluppato un innovativo test di neutralizzazione del virus surrogato (sVNT), basato sul principio del blocco del test di immunoassorbimento enzimatico (ELISA) che imita l'interazione virus-cellula per rilevare la presenza di NAb (anticorpi neutralizzanti) in un campione.

In questo caso, la proteina ACE2 umana (hACE2) viene immobilizzata nella piastra e per il rilevamento viene utilizzato un RBD coniugato con perossidasi di rafano (HRP).

Nel caso in cui ci sia un'elevata presenza di NAb, ci sarà un'intensità del segnale inferiore. Al contrario, se non ci sono NAb, l'RBD coniugato con HRP si lega all'hACE2 e il segnale sarà più alto ¹⁹¹.

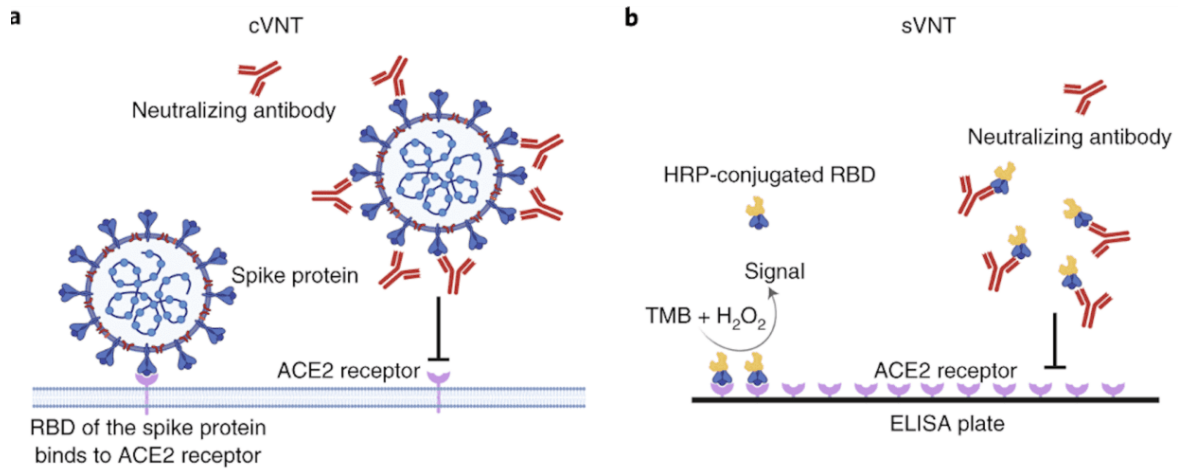
Questo test è il primo del suo genere ad essere approvato dall'FDA per uso diagnostico e potrebbe essere una strategia alla portata della maggior parte dei laboratori clinici.

¹⁹¹ Meyer B, Reimerink J, Torriani G, Brouwer F, Godeke GJ, Yerly S, Hoogerwerf M, Vuilleumier N, Kaiser L, Eckerle I, Reusken C. Validation and clinical evaluation of a SARS-CoV-2 surrogate virus neutralisation test (sVNT). *Emerg Microbes Infect.* 2020 Dec;9(1):2394-2403. doi: 10.1080/22221751.2020.1835448 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7605318/>

Tan CW, Chia WN, Qin X, Liu P, Chen MI, Tiu C, Hu Z, Chen VC, Young BE, Sia WR, Tan YJ, Foo R, Yi Y, Lye DC, Anderson DE, Wang LF. A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blockage of ACE2-spike protein-protein interaction. *Nat Biotechnol.* 2020 Sep;38(9):1073-1078. doi: 10.1038/s41587-020-0631-z. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32704169/> <https://clpmag.com/uncategorized/study-new-covid-19-serological-test-fast-effective/>

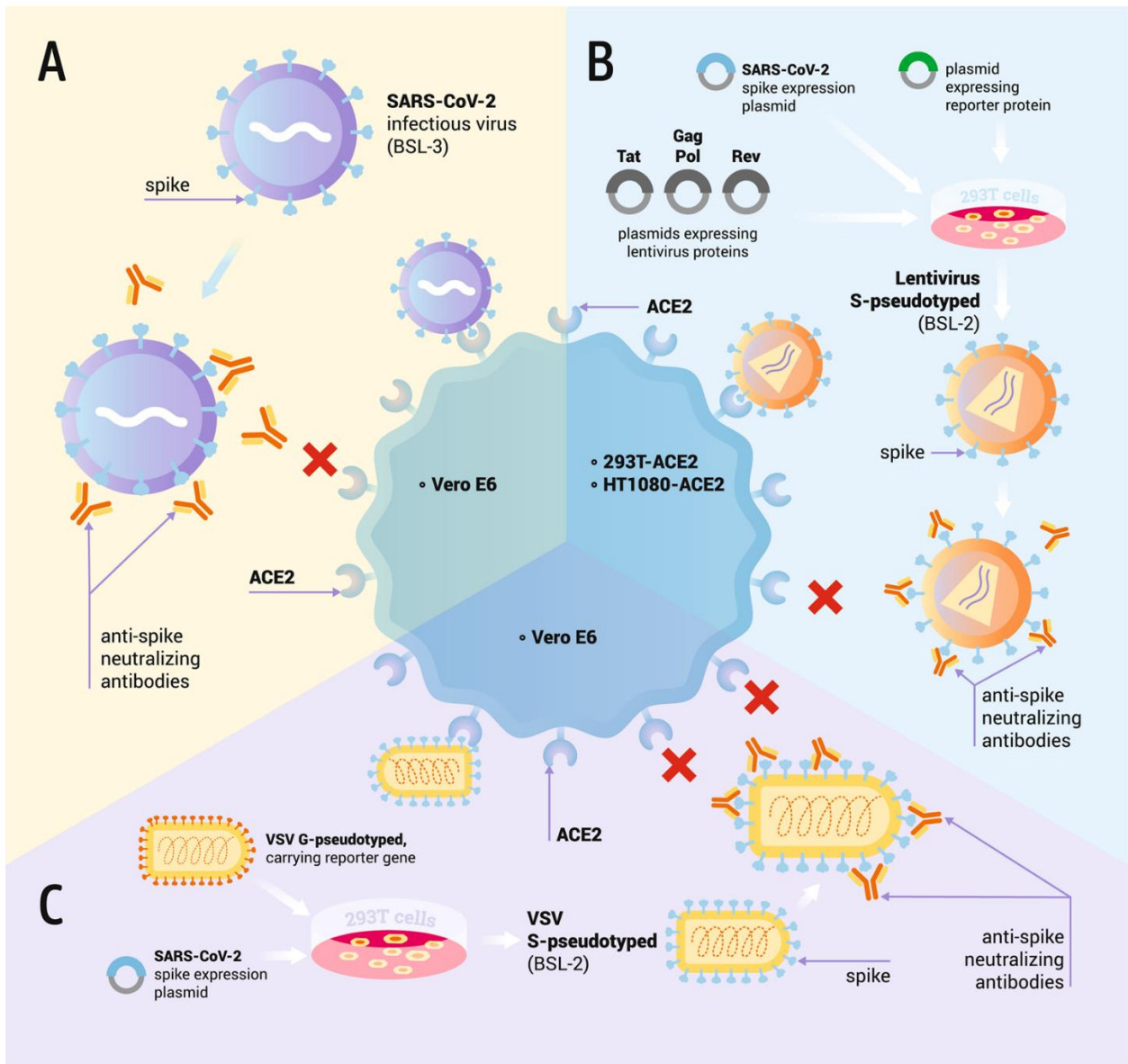
Sholukh AM, et al. Evaluation of Cell-Based and Surrogate SARS-CoV-2 Neutralization Assays. *J Clin Microbiol.* 2021 Sep 20;59(10):e0052721. doi: 10.1128/JCM.00527-21. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8451402/>

Oguntuyo KY, et al. Quantifying Absolute Neutralization Titers against SARS-CoV-2 by a Standardized Virus Neutralization Assay Allows for Cross-Cohort Comparisons of COVID-19 Sera. *mBio.* 2021 Feb 16;12(1):e02492-20. doi: 10.1128/mBio.02492-20. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8545089/>



<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32704169/>

Principio e validazione iniziale del SARS-CoV-2 sVNT. **a**, Il meccanismo di cVNT. Gli anticorpi neutralizzanti anti-SARS-CoV-2 impediscono alla proteina spike SARS-CoV-2 di legarsi alle proteine del recettore hACE2 sulla superficie della cellula ospite. **b**, nel test sVNT, gli anticorpi neutralizzanti anti-SARS-CoV-2 bloccano la proteina RBD coniugata con HRP dal legarsi alla proteina hACE2 pre-rivestita su una piastra ELISA



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8630184/>

Esempi degli approcci utilizzati per testare la neutralizzazione SARS-CoV-2 mediata da anticorpi.

A) SARS-CoV-2 amplificato da coltura cellulare infetta le cellule che esprimono il recettore ACE2, ad esempio Vero E6. Quando incubati con sieri, gli anticorpi neutralizzanti si legano alla superficie del virus e bloccano l'interazione tra la proteina spike (S) del virus e il recettore ACE2, inibendo l'ingresso del virus. **B)** Le cellule 293T vengono trasfettate con plasmidi che codificano per proteine lentivirali strutturali e non strutturali e per la proteina spike e reporter SARS-CoV-2. Il vettore di lentivirus pseudotipato spike prodotto entra nelle cellule che sovraesprimono ACE2 (ad esempio, 293-ACE2 o HT1080-ACE2). L'interazione Spike-ACE2 può essere bloccata neutralizzando gli anticorpi che legano il picco SARS-CoV-2. L'espressione della proteina reporter consente la misurazione del tasso di infezione. **C)** Le cellule 293T vengono trasfettate con un plasmide che codifica per il picco SARS-CoV-2, seguito dall'infezione con VSV pseudotipato G che trasporta un gene reporter nel locus della sequenza della proteina G. Le cellule producono particelle VSV pseudotipiche che possono entrare nelle cellule che esprimono ACE2, ad esempio Vero E6. Lo pseudovirus con il gene G eliminato è in grado di eseguire solo un singolo ciclo di infezione. L'ingresso delle cellule può essere inibito da anticorpi neutralizzanti SARS-CoV-2 che legano la punta. L'espressione della proteina reporter consente la misurazione del tasso di infezione.

Per una maggiore comprensione dell'argomento si riporta il seguente approfondimento.

TEST DI NEUTRALIZZAZIONE E COSTRUZIONE DEI VIRUS PSEUDOTIPIZZATI

Uno *Pseudovirus Neutralization Assay* (noto anche come test di neutralizzazione dei virus pseudotipizzati o test di neutralizzazione basato su pseudotipi) è un metodo di laboratorio utilizzato per studiare l'effetto di anticorpi o farmaci per neutralizzare la capacità dei virus di entrare nelle cellule e quindi prevenire l'infezione.

192

Gli pseudotipi o particelle pseudotipizzate sono virus chimerici costituiti da un nucleo virale (tipicamente un vettore lentivirale) circondato da un involucro lipidico con le glicoproteine di superficie di un altro virus (il virus di interesse). Gli pseudovirus hanno una struttura conformazionale delle proteine di superficie che ricorda da vicino quella del virus nativo di interesse e hanno la stessa capacità di entrare nelle cellule utilizzando gli stessi meccanismi e recettori del virus di interesse, ma sono molto più sicuri da gestire rispetto al virus da cui hanno avuto origine, in quanto utilizzando un vettore che non può replicarsi non sono patogeni. Ciò consente di maneggiarli in sicurezza nei laboratori di livello di biosicurezza (BSL) 2, che in genere lavorano con agenti che rappresentano un rischio moderato per la salute dell'uomo. Questo è un grande vantaggio, poiché virus patogeni come SARS-CoV-2 richiedono laboratori BSL-3, molto meno comuni dei BSL-2.

Nel caso di SARS-CoV-2, lo pseudovirus deve esprimere la glicoproteina S, che media l'ingresso nelle cellule ospiti legandosi all'enzima di conversione dell'angiotensina 2 umana (ACE2). Oltre alle glicoproteine di superficie del virus di interesse, il virus pseudotipizzato contiene il gene di una luciferasi o di una proteina fluorescente, che viene espresso solo dopo essere entrato nella cellula. Più pseudovirus entrano nelle cellule, più luciferasi o proteina fluorescente viene espressa e maggiore è l'intensità della luce o della fluorescenza emessa. (fig.1)

Il test di neutralizzazione dello pseudovirus prevede l'incubazione delle cellule e dello pseudovirus in presenza di diverse concentrazioni di un anticorpo di interesse e la misura dell'emissione di luce utilizzando un luminometro a piastra o un lettore multimodale quando si usa la luciferasi, oppure un fluorimetro nel caso si usi una proteina fluorescente come marcatore.

Se l'anticorpo è efficace nel neutralizzare le glicoproteine di superficie e nel bloccare l'ingresso nelle cellule, verrà misurata una significativa riduzione dell'emissione di luce o di fluorescenza. L'effetto dell'anticorpo viene visualizzato utilizzando una delle concentrazioni inibitorie (IC_{50} , IC_{80} o altre). (fig.2)¹⁹³

¹⁹² Pseudovirus neutralization assay nella ricerca sulla SARS-COV-2

<https://www.berthold.com/it-it/bioanalitica/soluzioni-ricerca-sars-cov-2-covid-19/pseudovirus-neutralization-assay-nella-ricerca-sulla-sars-cov-2/>

Millet JK, Tang T, Nathan L, Jaimes JA, Hsu HL, Daniel S, Whittaker GR.

Production of Pseudotyped Particles to Study Highly Pathogenic Coronaviruses in a Biosafety Level 2 Setting.

J Vis Exp. 2019 Mar 1;(145):10.3791/59010. doi: 10.3791/59010.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6677141/>

Condor Capcha JM, Lambert G, Dykxhoorn DM, Salerno AG, Hare JM, Whitt MA, Pahwa S, Jayaweera DT, Shehadeh LA.

Generation of SARS-CoV-2 Spike Pseudotyped Virus for Viral Entry and Neutralization Assays: A 1-Week Protocol.

Front Cardiovasc Med. 2021 Jan 15;7:618651. doi: 10.3389/fcvm.2020.618651.

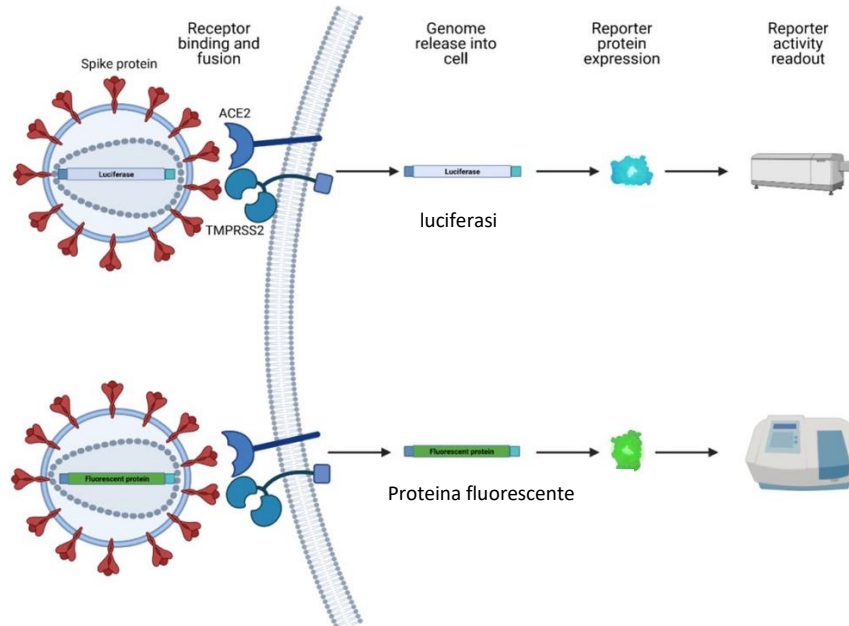
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7843445/>

¹⁹³ Neerukonda SN, Vassell R, Herrup R, Liu S, Wang T, Takeda K, Yang Y, Lin TL, Wang W, Weiss CD.

Establishment of a well-characterized SARS-CoV-2 lentiviral pseudovirus neutralization assay using 293T cells with stable expression of ACE2 and TMPRSS2.

PLoS One. 2021 Mar 10;16(3):e0248348. doi: 10.1371/journal.pone.0248348.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7946320/>



<https://www.technologynetworks.com/immunology/articles/leveraging-pseudoviruses-in-the-face-of-the-covid-19-pandemic-347021>

Figura 1: Gli pseudovirus che esprimono la glicoproteina SARS-CoV-2 S legano il recettore ACE2 sulla superficie delle cellule ospiti dove la proteasi TMPRSS2 scinde S con conseguente cambiamento conformazionale e fusione delle membrane delle cellule virali e ospiti. Alla fusione, il genoma viene rilasciato nel citoplasma cellulare e viene espresso il reporter codificato dal genoma, la cui attività viene quantificata per mezzo di uno strumento.

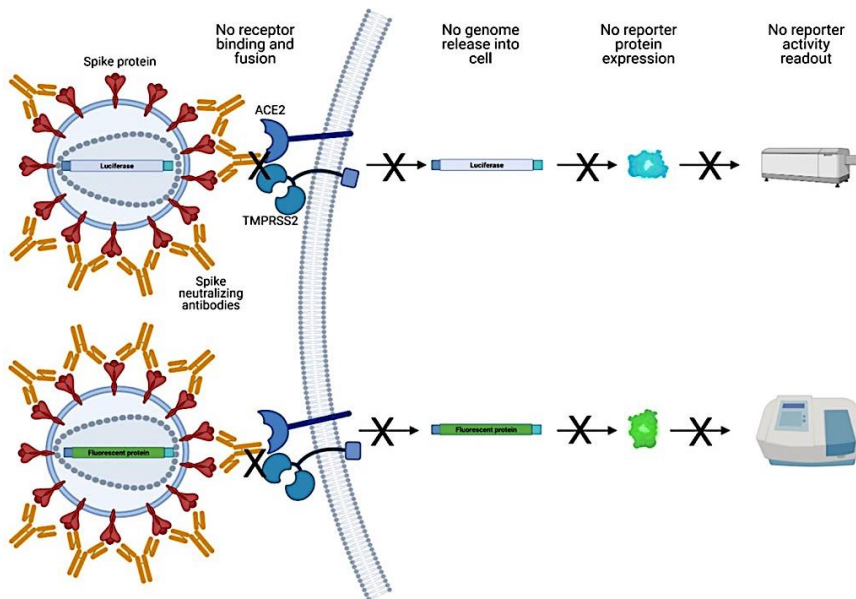


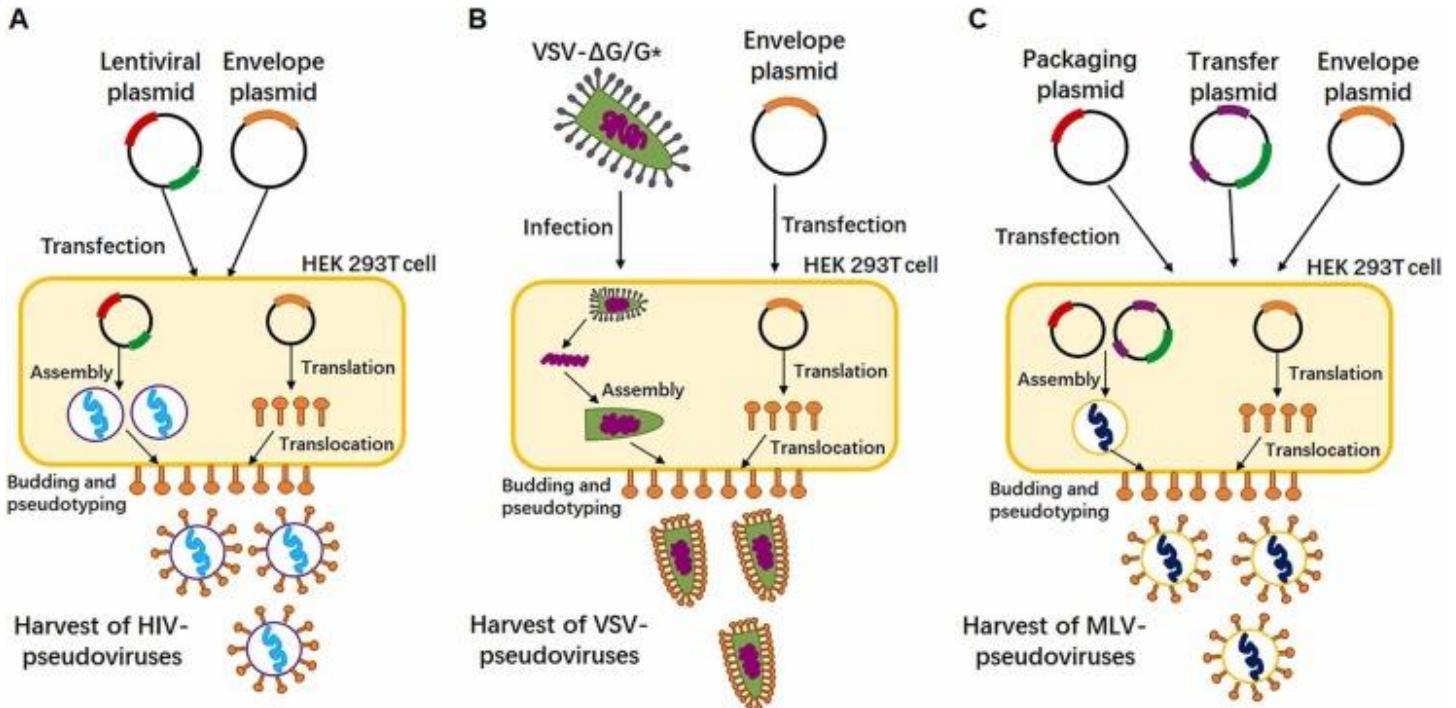
Figura 2: Saggio di neutralizzazione che impiega pseudovirus che esprimono la glicoproteina SARS-CoV-2 S. Gli anticorpi neutralizzanti che attaccano la glicoproteina S impediscono il legame al recettore ACE2 e, quindi, le successive fasi di fusione, rilascio del genoma ed espressione genica reporter.

Nath Neerukonda S, Vassell R, Weiss CD.
Neutralizing Antibodies Targeting the Conserved Stem Region of Influenza Hemagglutinin.
Vaccines (Basel). 2020 Jul 12;8(3):382. doi: 10.3390/vaccines8030382.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7563823/>

Millet JK, Whittaker GR.
Murine Leukemia Virus (MLV)-based Coronavirus Spike-pseudotyped Particle Production and Infection.
Bio Protoc. 2016 Dec 5;6(23):e2035. doi: 10.21769/BioProtoc.2035.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5181643/>

Wang P, et al
Antibody resistance of SARS-CoV-2 variants B.1.351 and B.1.1.7.
Nature. 2021 May;593(7857):130-135. doi: 10.1038/s41586-021-03398-2.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33684923/>

Costruzione degli pseudovirus



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8848573/>

Il diagramma schematico dell'acquisizione di diversi virus pseudotipati basati su diversi sistemi di assemblaggio. **(A)** Le cellule T HEK 293 sono state trasfettate con un plasmide codificante la spina dorsale lentivirale e una proteina dell'involucro che esprime il plasmide. Le cellule trasfettate hanno prodotto pseudovirus ricombinati e queste particelle virali potrebbero essere secrete nell'ambiente extracellulare prima della raccolta. **(B)** Le cellule HEK 293 T sono state inizialmente trasfettate con un plasmide di espressione della proteina dell'involucro, ventiquattro ore dopo la trasfezione, le cellule sono state infettate con VSV* ΔG che codifica la luciferasi della lucciola o GFP. Le particelle pseudotipiche sono state raccolte 20 h dopo l'inoculazione. **(C)** Le cellule T HEK 293 sono state co-trasfettate con un plasmide codificante per la proteina dell'involucro, un plasmide di confezionamento MLV Gag-Pol e il vettore di trasferimento MLV che codifica per un reporter della luciferasi. Le cellule trasfettate hanno prodotto particelle MLV pseudotipiche come i sistemi HIV. La barra rossa nel plasmide rappresenta elementi di confezionamento come gag e pol; la barra verde nel plasmide rappresenta i geni reporter, come GFP e Luciferase; la barra arancione nel plasmide rappresenta il gene della proteina dell'involucro; la barra viola nel plasmide rappresenta i segnali di confezionamento, 3'LTR e 5'LTR.

Piattaforma VSV

Per creare pseudovirus utilizzando una piattaforma VSV, inizialmente deve essere prodotto uno pseudovirus VSVΔG-G*trasfettando due plasmidi, uno codificante per il genoma centrale del VSV privo della glicoproteina nativa e contenente il gene reporter (VSVΔG), e l'altro codificante per la glicoproteina dell'involucro VSV (G*), in cellule HEK293T suscettibili di trasfezione.

Questo porta alla produzione di pseudovirus VSVΔG-G* che possono quindi essere utilizzati per infettare le cellule HEK293T precedentemente trasfettate con un plasmide che esprime la glicoproteina SARS-CoV-2 S.

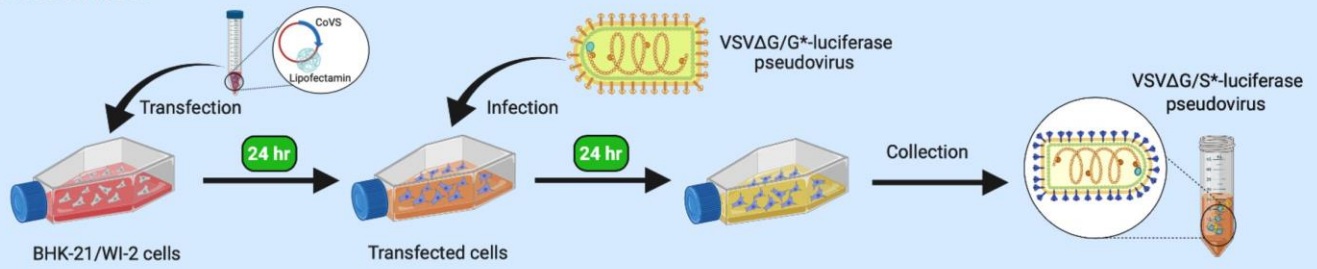
Il genoma dello pseudovirus VSVΔG-G* contiene tutti i componenti principali necessari per la replicazione e un gene reporter, ma manca della glicoproteina dell'involucro richiesta per l'assemblaggio e la gemmazione degli pseudovirus.

La glicoproteina spike espressa separatamente sulla membrana plasmatica facilita così l'assemblaggio e la gemmazione del VSVΔG-S pseudovirus. Qualsiasi trasferimento di G* dallo pseudovirus VSVΔG-G* utilizzato per l'infezione, viene impedito dall'aggiunta di un anticorpo neutralizzante diretto contro G*.

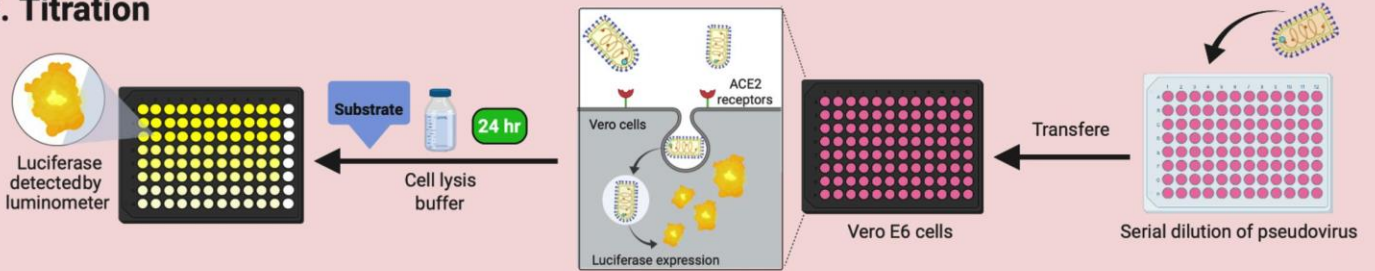
Gli pseudovirus VSVΔG-S possono quindi essere utilizzati direttamente per l'infezione delle cellule HEK293T che esprimono il recettore ACE2 (HEK293T-ACE2) o cellule Vero che consentono il legame e l'ingresso di S.¹⁹⁴

¹⁹⁴ Zettl F, Meister TL, Vollmer T, Fischer B, Steinmann J, Krawczyk A, V'kovski P, Todt D, Steinmann E, Pfaender S, Zimmer G. Rapid Quantification of SARS-CoV-2-Neutralizing Antibodies Using Propagation-Defective Vesicular Stomatitis Virus Pseudotypes. Vaccines (Basel). 2020 Jul 15;8(3):386. doi: 10.3390/vaccines8030386. PMID: 32679691; PMCID: PMC7563800. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7563800/>

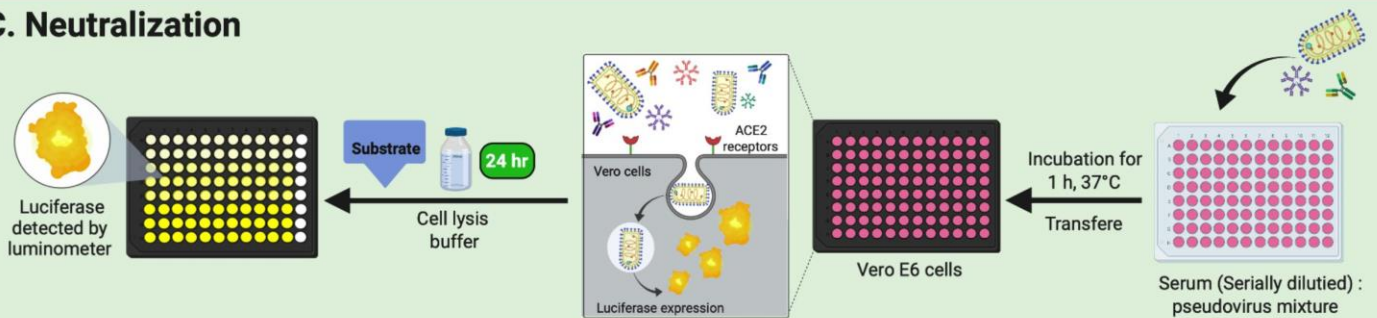
A. Generation



B. Titration



C. Neutralization



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7498578/>

Panoramica grafica dei protocolli 1, 2 e 3. **(A)** Protocollo 1: generazione di pseudovirus VSV che portano la proteina CoV S. **(B)** Protocollo 2: saggio di titolazione degli pseudovirus VSV generati. **(C)** Protocollo 3: saggio di neutralizzazione per determinare i titoli di nAb specifici per CoV nei campioni di siero. VSV, virus della stomatite vescicolare; CoV, coronavirus; nAb, anticorpo neutralizzante.

Zhao MM, Yang WL, Yang FY, Zhang L, Huang WJ, Hou W, Fan CF, Jin RH, Feng YM, Wang YC, Yang JK.

Cathepsin L plays a key role in SARS-CoV-2 infection in humans and humanized mice and is a promising target for new drug development.

Signal Transduct Target Ther. 2021 Mar 27;6(1):134. doi: 10.1038/s41392-021-00558-8.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7997800/>

Salazar-García M, Acosta-Contreras S, Rodríguez-Martínez G, Cruz-Rangel A, Flores-Alanis A, Patiño-López G, Luna-Pineda VM.

Pseudotyped Vesicular Stomatitis Virus-Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus-2 Spike for the Study of Variants, Vaccines, and Therapeutics Against Coronavirus Disease 2019.

Front Microbiol. 2022 Jan 14;12:817200. doi: 10.3389/fmicb.2021.817200.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8795712/>

Tani H, et al

Evaluation of SARS-CoV-2 neutralizing antibodies using a vesicular stomatitis virus possessing SARS-CoV-2 spike protein.

Virol J. 2021 Jan 12;18(1):16. doi: 10.1186/s12985-021-01490-7.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7801864/>

Almahboub SA, Algaissi A, Alfaleh MA, ElAssouli MZ, Hashem AM.

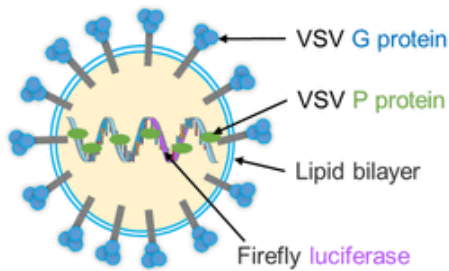
Evaluation of Neutralizing Antibodies Against Highly Pathogenic Coronaviruses: A Detailed Protocol for a Rapid Evaluation of Neutralizing Antibodies Using Vesicular Stomatitis Virus Pseudovirus-Based Assay.

Front Microbiol. 2020 Sep 4;11:2020. doi: 10.3389/fmicb.2020.02020.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7498578/>

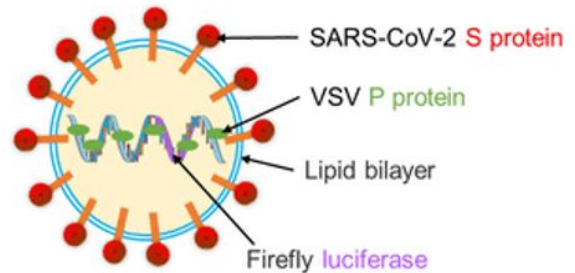
A

G*ΔG-VSV Pseudovirus



B

SARS-CoV-2 Pseudovirus



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7997800/>

Diagramma schematico della struttura dello pseudovirus.

(A) Lo pseudovirus G*ΔG-VSV è stato generato utilizzando un VSV ricombinante in cui il gene della glicoproteina (VSV-G) è stato eliminato e sostituito con geni che codificano per la luciferasi della lucciola. Quando VSV-G viene espresso transitoriamente in cellule infettate da questi ricombinanti, vengono prodotte particelle di pseudotipo VSV.

(B) I virioni VSV non selezionano in maniera specifica il tipo di proteina di membrana che può essere incorporata nell'involucro virale e le particelle VSV possono gemmare in assenza di proteina G. Lo pseudovirus SARS-CoV-2 è stato generato incorporando la proteina SARS-CoV-2 S nel VSV ricombinante sopra indicato.

Piattaforma del Virus della leucemia murina (MLV) e HIV

Le piattaforme MLV e HIV impiegano tre plasmidi per la trasfezione nelle cellule HEK293T:¹⁹⁵

- Un plasmide codificante per geni MLV/HIV core, gag e pol, ma privo del gene env della glicoproteina dell'involucro di MLV/HIV
- Un plasmide vettore di trasferimento che codifica la luciferasi della lucciola o il gene reporter della proteina fluorescente verde (GFP), il segnale di assemblaggio Ψ-RNA insieme a regioni LTR (long terminal repeat) fiancheggiati in 5' e 3'
- Un plasmide codificante per la glicoproteina dell'involucro di interesse, in questo caso la SARS-CoV-2 S.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7291041/>

Approccio generale alla pseudotipizzazione lentivirale. Le cellule 293T vengono trasfettate con un plasmide che codifica per una spina dorsale lentivirale (genoma) che esprime una proteina marcatore, un plasmide che esprime Spike e plasmidi che esprimono le altre proteine dell'HIV necessarie per la formazione del virione (Tat, Gag-Pol e Rev). Le cellule trasfettate producono particelle lentivirali con Spike sulla loro superficie. Queste particelle virali possono infettare le cellule che esprimono il recettore ACE2.

¹⁹⁵ Zheng Y, Larragoite ET, Williams ESCP, Lama J, Cisneros I, Delgado JC, Slev P, Rychert J, Innis EA, Coiras M, Rondina MT, Spivak AM, Planelles V.

Neutralization assay with SARS-CoV-1 and SARS-CoV-2 spike pseudotyped murine leukemia virions.

Virology. 2021 Jan 4;18(1):1. doi: 10.1186/s12985-020-01472-1.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7780907/>

Crawford KHD, et al

Protocol and Reagents for Pseudotyping Lentiviral Particles with SARS-CoV-2 Spike Protein for Neutralization Assays.

Viruses. 2020 May 6;12(5):513. doi: 10.3390/v12050513.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7291041/>

Schmidt F, et al

Measuring SARS-CoV-2 neutralizing antibody activity using pseudotyped and chimeric viruses.

bioRxiv [Preprint]. 2020 Jun 9:2020.06.08.140871. doi: 10.1101/2020.06.08.140871. Update in: *J Exp Med*. 2020 Nov 2;217(11):

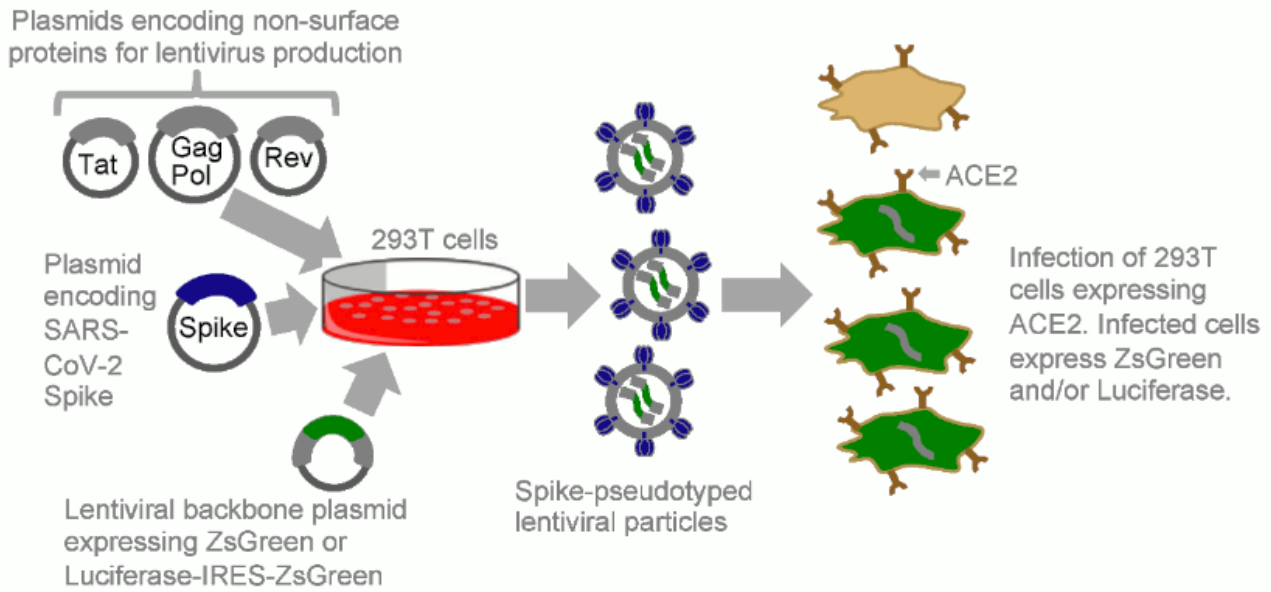
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7302213/>

Schmidt F, et al

Measuring SARS-CoV-2 neutralizing antibody activity using pseudotyped and chimeric viruses.

J Exp Med. 2020 Nov 2;217(11):e20201181. doi: 10.1084/jem.20201181.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7372514/>



Test ADE in vitro

Il test ADE consiste nella pre-incubazione di una diluizione seriale di siero/anticorpo predisposta su piastra con una concentrazione fissa di virus. Tale miscela viene poi incubata con le cellule effettrici che portano il recettore Fc e le cellule con il recettore ACE2 come controllo.

L'ADE viene misurato confrontando la percentuale di cellule infette a diverse concentrazioni sieriche con controlli non trattati/non potenzianti.¹⁹⁶

Di seguito un esempio del test ADE basato su rSARS-CoV-2 Spike Luciferasi pseudotipizzata:

Cellule effettrici:

cellule che portano il recettore Fc (cellule Raji, cellule K562, cellule B primarie ecc.)

Cellule 293T/ACE2 (cellule 293T con sovraespressione ACE2) come controllo positivo del sistema

Metodo di rilevamento

Il SARS-CoV-2 contagioso o il SARS-CoV-2 pseudotipizzato infetta le cellule effettrici dopo l'incubazione con la diluizione seriale dell'anticorpo o del siero del test.

L'ADE viene misurato confrontando la percentuale di cellule infette a diverse concentrazioni sieriche/anticorpali con controlli non trattati/non potenzianti.

Nel test ADE basato su virus vivo (BLS3), l'infezione viene quantificata mediante immunocolorazione e analisi di citometria a flusso.

¹⁹⁶ Shuang Wang, et al

An antibody-dependent enhancement (ADE) activity eliminated neutralizing antibody with potent prophylactic and therapeutic efficacy against SARS-CoV-2 in rhesus monkeys

bioRxiv 2020.07.26.222257; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.07.26.222257>

<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.07.26.222257v1>

Yip MS, Cheung CY, Li PH, Bruzzone R, Peiris JSM, Jaime M.

Investigation of Antibody-Dependent Enhancement (ADE) of SARS coronavirus infection and its role in pathogenesis of SARS.

BMC Proc. 2011 Jan 10;5(Suppl 1):P80. PMID:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3019510/>

Luan N, Li T, Wang Y, Cao H, Yin X, Lin K, Liu C.

Th2-Oriented Immune Serum After SARS-CoV-2 Vaccination Does Not Enhance Infection In Vitro.

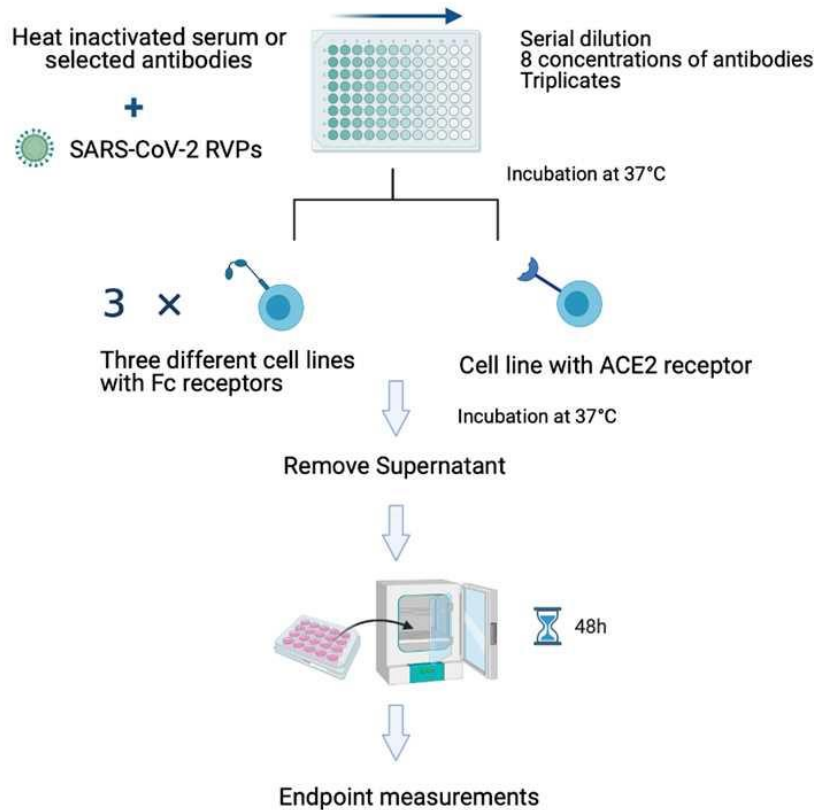
Front Immunol. 2022 Apr 8;13:882856. doi: 10.3389/fimmu.2022.882856.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9024142/>

Nel test ADE basato su particelle virali (RVP) Reporter (ad es.: GFP o Luciferasi), l'infezione è quantificata mediante analisi di citometria a flusso o sistema di test della luciferasi.

I controlli non trattati e non infetti sono inclusi in ciascuna piastra per controllare la variabilità del dosaggio tra le piastre. Il saggio può essere controllato internamente utilizzando concentrazioni note di anticorpi purificati potenzianti e isotipici.

Il test è ottimizzato in un formato su piastra da 96 pozzetti per ridurre il volume del materiale di prova richiesto, che a sua volta consente test di neutralizzazione paralleli e/o repliche/ripetizioni multiple per una maggiore robustezza.



<https://www.creative-diagnostics.com/sars-cov-2-ade-assay.htm>

Criticità e manipolazioni degli studi preclinici sull’ADE

Lo studio preclinico dell’ADE è un requisito fondamentale per la sicurezza richiesto dalle agenzie regolatorie alle aziende farmaceutiche, già in fase di autorizzazione fast-track.¹⁹⁷

La prima azienda che ha effettuato lo studio preclinico è stata Astrazeneca, come discusso nel documento “[COVID-19 Il Vaccino](#)” nell’aggiornamento da pag 93:

van Doremalen N, et al
 ChAdOx1 nCoV-19 vaccination prevents SARS-CoV-2 pneumonia in rhesus macaques.
 bioRxiv [Preprint]. 2020 May 13:2020.05.13.093195. doi: 10.1101/2020.05.13.093195. Update in: Nature. 2020 Jul 30
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7241103/>

¹⁹⁷ https://www.ema.europa.eu/en/documents/other/consideration-core-requirements-rmps-covid-19-vaccines_en.pdf

<https://epi.tghn.org/articles/consensus-considerations-assessment-risk-disease-enhancement-covid-19-vaccines/>

<https://www.chop.edu/centers-programs/vaccine-education-center/vaccine-safety/antibody-dependent-enhancement-and-vaccines>

Analizzando nel dettaglio i risultati di questo studio, dal confronto della sequenza della proteina Spike utilizzata per la produzione dell'antigene vaccinale ([YP_009724390.1](#)) e il virus infettivo (nCoV-WA1-2020 ([MN985325.1](#))) inoculato per il challenge test si può dimostrare che la sovrapposizione è del 100%. Ne segue che questo studio non consente di valutare il rischio di ADE nei vaccinati, contrariamente a quanto affermato nel titolo e nell'abstract.

Uguualmente, nello studio preclinico per il vaccino Pfizer:

DiPiazza AT, et al

COVID-19 vaccine mRNA-1273 elicits a protective immune profile in mice that is not associated with vaccine-enhanced disease upon SARS-CoV-2 challenge.

Immunity. 2021 Jul 2;51(7):1074-7613(21)00262-4. doi: 10.1016/j.immuni.2021.06.018.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8249710/>

dal confronto tra le sequenze del costrutto vaccinale (Wuhan-Hu-1) e il virus utilizzato per il challenge test e per studiare il potenziamento della malattia si può notare che, anche questa volta, la sequenza è la stessa: [comparazione-Pfizer](#)

LE CONFORMAZIONI DELLA SPIKE E ADE

Struttura della proteina S ¹⁹⁸

Con una dimensione di 180–200 kDa, la proteina S è costituita da un N-terminale extracellulare, un dominio transmembrana (TM) ancorato nella membrana virale e un breve segmento C-terminale intracellulare.¹⁹⁹

La proteina S normalmente esiste in una conformazione metastabile a prefusione; una volta che il virus interagisce con la cellula ospite, si verifica un ampio riarrangiamento strutturale della proteina S, che consente al virus di fondersi con la membrana della cellula ospite.

Le clave (spike) sono rivestite con molecole di polisaccaridi per camuffarle ed eludere la sorveglianza del sistema immunitario dell'ospite durante l'ingresso.²⁰⁰

La lunghezza totale di SARS-CoV-2 S è 1273 aa ed è costituita da un peptide segnale (aminoacidi 1–13) situato all'N-terminale, la subunità S1 (14–685 residui) e la subunità S2 (686–1273 residui); le ultime due regioni sono responsabili rispettivamente del legame del recettore e della fusione con la membrana.

Nella subunità S1, c'è un dominio N-terminale (14–305 residui) e un dominio di legame del recettore (RBD, 319–541 residui).

Il peptide di fusione (FP) (788–806 residui), la sequenza ripetuta dell'eptapeptide 1 (HR1) (912–984 residui), HR2 (1163–1213 residui), il dominio TM (1213–1237 residui) e il dominio del citoplasma (1237–1273 residui) costituiscono la subunità S2.²⁰¹

¹⁹⁸ Huang, Y., Yang, C., Xu, Xf. et al.

Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19.

Acta Pharmacol Sin 41, 1141–1149 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41401-020-0485-4>

<https://www.nature.com/articles/s41401-020-0485-4.pdf>

¹⁹⁹ Bosch BJ, van der Zee R, de Haan CA, Rottier PJ.

The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex.

J Virol. 2003 Aug;77(16):8801-11. doi: 10.1128/jvi.77.16.8801-8811.2003.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC167208/>

²⁰⁰ Watanabe Y, Allen JD, Wrapp D, McLellan JS, Crispin M.

Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike.

Science. 2020 Jul 17;369(6501):330-333. doi: 10.1126/science.abb9983.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7199903/>

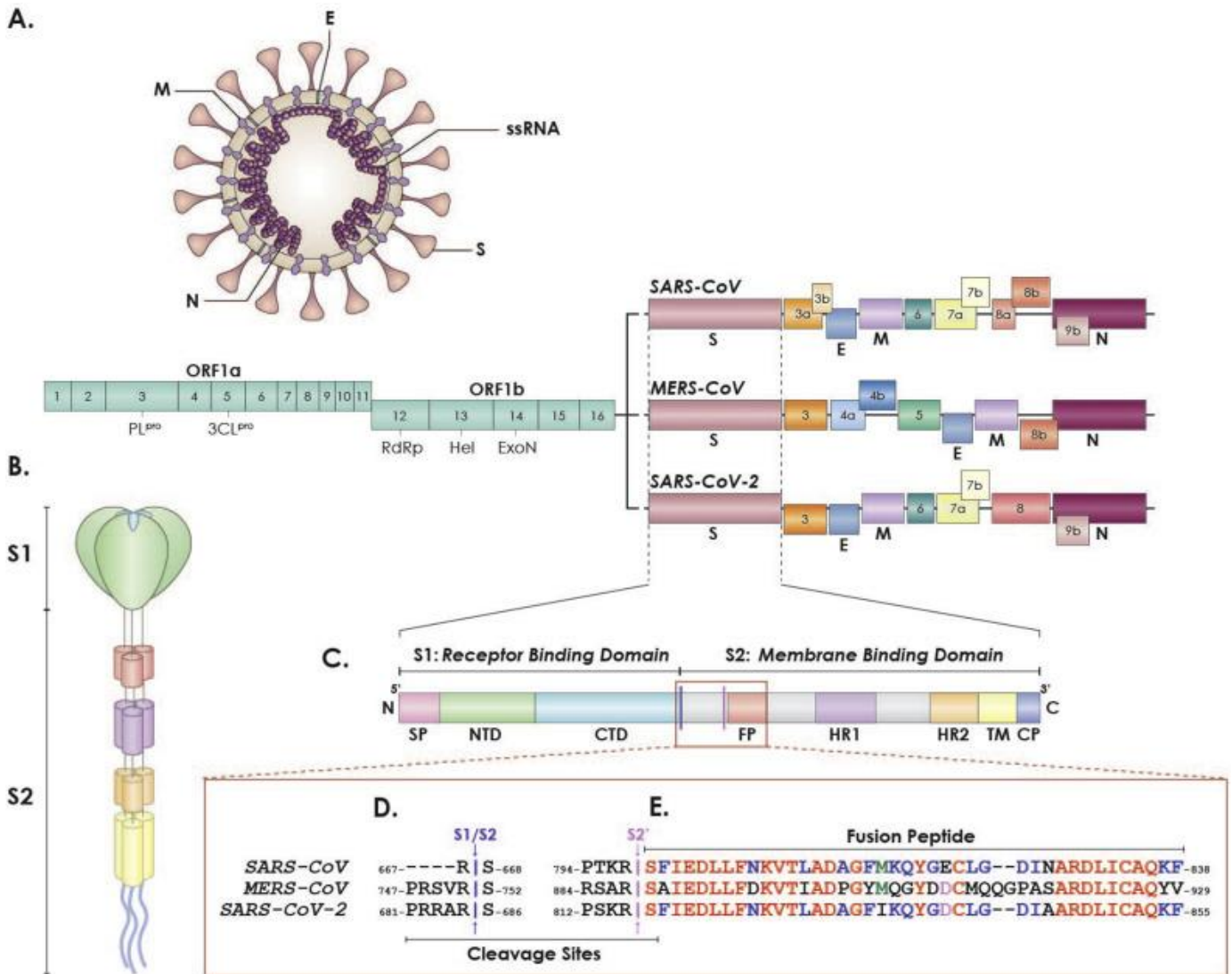
²⁰¹ Xia S, Zhu Y, Liu M, Lan Q, Xu W, Wu Y, Ying T, Liu S, Shi Z, Jiang S, Lu L.

Fusion mechanism of 2019-nCoV and fusion inhibitors targeting HR1 domain in spike protein.

Cell Mol Immunol. 2020 Jul;17(7):765-767. doi: 10.1038/s41423-020-0374-2.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7075278/>

I trimeri della proteina S formano visivamente un caratteristico alone bulboso a forma di corona che circonda la particella virale.
 Sulla base della struttura dei monomeri della proteina S del coronavirus, le subunità S1 e S2 formano la testa bulbosa e la regione del gambo.²⁰²

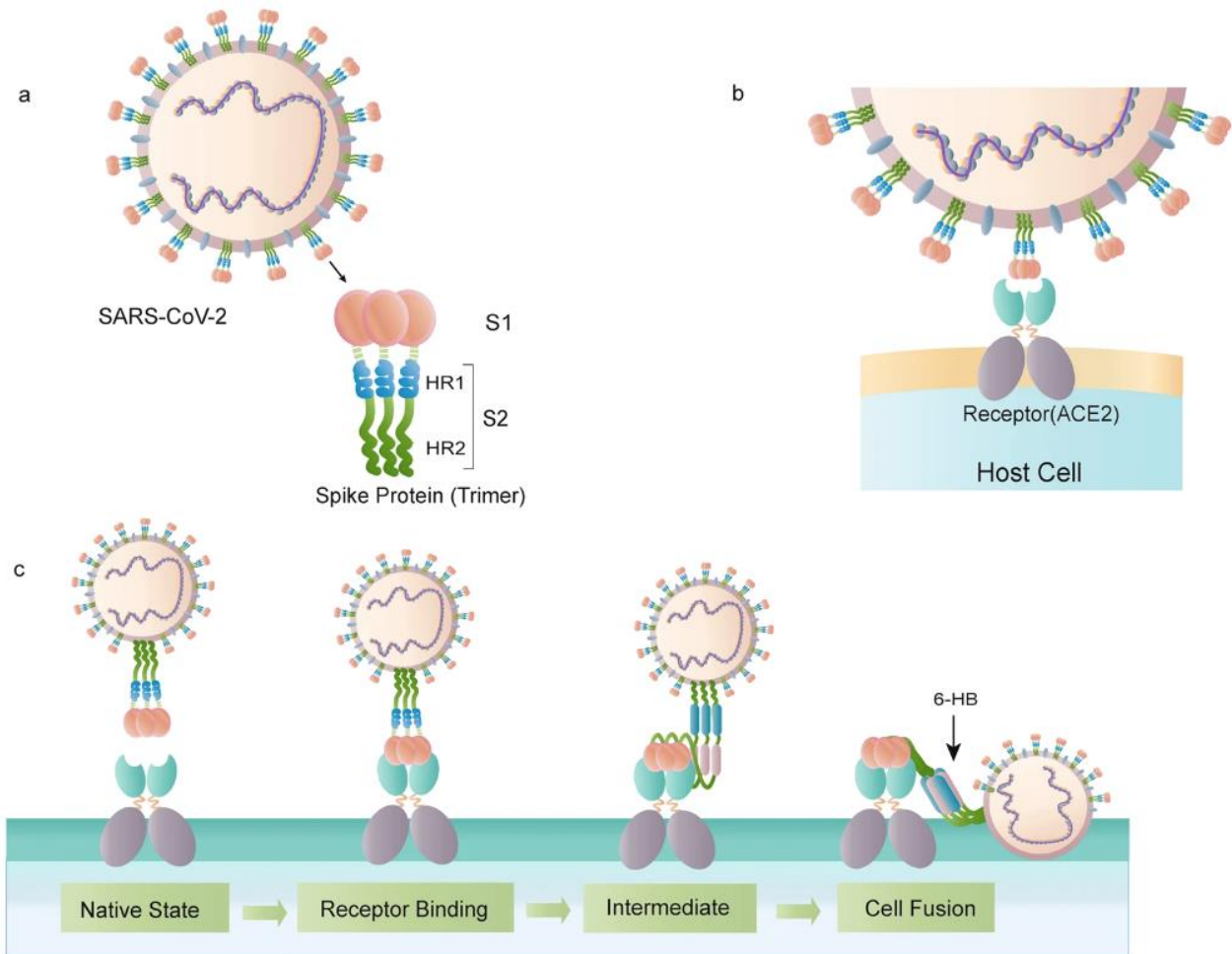


<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7194977/>
 Proteina della spike di coronavirus (S). **A.** Figura della particella CoV (in alto) e genoma virale CoV completo (in basso). I CoV hanno un involucro lipidico con tre proteine transmembrana strutturali: spike (S), membrana (M) e involucro (E). L'interno del virus contiene il genoma virale incapsulato dalla proteina nucleocapside (N). Il genoma a filamento singolo di CoV codifica per 16 proteine non strutturali, tra cui la proteasi simile alla papaina (PLpro), la proteasi simile a 3C (3CLpro), l'RNA polimerasi RNA-dipendente (RdRp), l'elicasi (Hel) e l'esonucleasi (ExoN). Gli RNA subgenomici codificano per quattro proteine strutturali: spike (S; rosa scuro), involucro (E; blu scuro), membrana (M; viola) e nucleocapside (N; magenta) e un certo numero di proteine accessorie. **B.** Figura del trimero proteico CoV S. **C.** Il gene CoV S che denota i componenti funzionali della proteina. La proteina CoV S è composta dalle due subunità: S1 e S2, che comprendono i principali componenti funzionali: SP (peptide segnale, rosa); NTD (dominio N-terminale; verde), CTD (dominio C-terminale; azzurro), FP (peptide di fusione; rosso), HR1 (ripetizione eptade 1; viola), HR2 (ripetizione eptade 2; arancione), TM (transmembrana; giallo) e CP (citoplasmatico; blu scuro). La proteina S ha due siti di scissione indicati con frecce viola scuro (S1/S2) e rosa (S2'). **D.** Allineamento della sequenza del sito di clivaggio S1/S2 (freccia viola scuro) e del sito di clivaggio S2' (rosa) tra MERS-CoV, SARS-CoV e SARS-CoV-2. **E.** All'interno del genoma, viene evidenziato il peptide di fusione, che denota le sequenze di MERS-CoV FP e SARS-CoV FP. Il rosso indica i residui conservati tra le sequenze MERS-CoV, SARS-CoV e SARS-CoV-2 FP; il blu indica i residui conservati SARS-CoV e SARS-CoV-2 FP; il verde indica i residui conservati SARS-CoV e MERS-CoV FP; il viola indica i residui conservati di MERS-CoV e SARS-CoV-2. La sequenza del peptide di fusione di SARS-CoV-2 è stata determinata eseguendo un allineamento a coppie con MUSCLE tramite Geneious (versione 2020.0.5). La sequenza di aminoacidi delle

²⁰² Tang T, Bidon M, Jaimes JA, Whittaker GR, Daniel S. Coronavirus membrane fusion mechanism offers a potential target for antiviral development. *Antiviral Res.* 2020;178:104792. doi:10.1016/j.antiviral.2020.104792 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7194977/>

proteine spike è stata ottenuta da NCBI Genbank sulla base di quanto segue: SARS-CoV-2 (MN908947.3), MERS-CoV (AFS88936.1), SARS-CoV (AAP13441.1).

La struttura della proteina S trimerica del SARS-CoV-2 è stata determinata mediante microscopia crioelettronica a livello atomico, rivelando diverse conformazioni del dominio S RBD negli stati aperti e chiusi e le sue funzioni corrispondenti, come si approfondirà in seguito.²⁰³



<https://www.nature.com/articles/s41401-020-0485-4>

a) La struttura schematica della proteina S. b) La proteina S si lega al recettore ACE2. c) Il processo di legame e fusione virus-cellula mediato dalla proteina S.

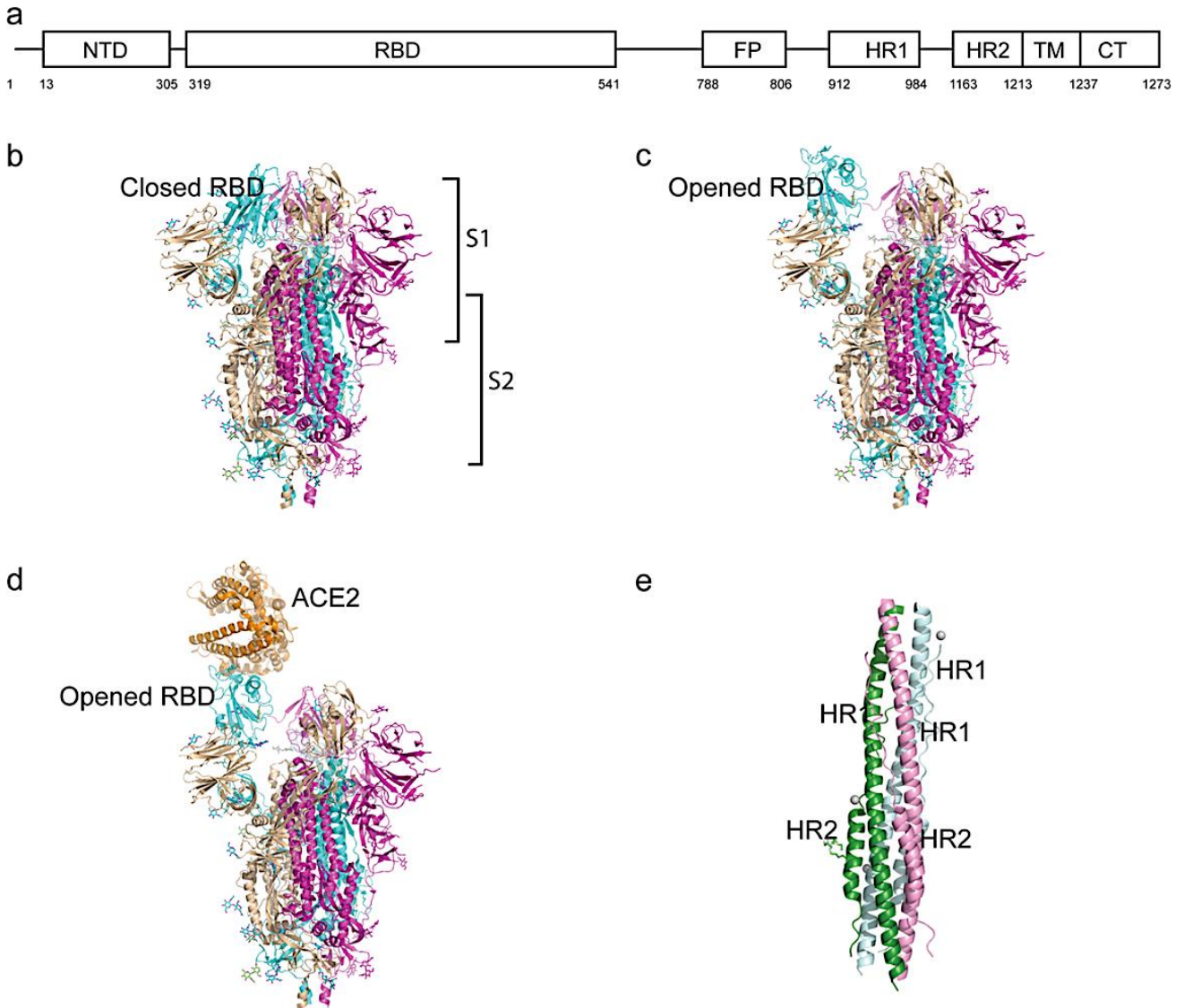
Struttura della subunità S1

Il legame delle particelle virali ai recettori cellulari sulla superficie della cellula ospite è l'inizio dell'infezione virale, pertanto il riconoscimento del recettore è un importante determinante dell'ingresso virale e un bersaglio per la progettazione di farmaci. In particolare, l'RBD situato nella subunità S1 si lega al recettore cellulare ACE2 nella regione dell'aminopeptidasi N.²⁰⁴

²⁰³ Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh CL, Abiona O, Graham BS, McLellan JS. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*. 2020 Mar 13;367(6483):1260-1263. doi: 10.1126/science.abb2507. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7164637/>

Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veerler 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/>

²⁰⁴ Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh CL, Abiona O, Graham BS, McLellan JS. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*. 2020 Mar 13;367(6483):1260-1263. doi: 10.1126/science.abb2507.



<https://www.nature.com/articles/s41401-020-0485-4>

a) rappresentazione schematica della spike del SARS-CoV-2. **b–c)** La proteina S RBD è in posizione chiusa e aperta. **d)** La proteina S si lega all'ACE2 con RBD aperto nella subunità S1. **e)** La struttura a sei eliche formata da HR1 e HR2 della subunità S2

La regione RBD è un obiettivo critico per gli anticorpi neutralizzanti (nAbs), ma nonostante SARS-CoV-2 e SARS-CoV RBD siano per il ~73%–76% simili nella sequenza, studi con anticorpi monoclonali specifici contro

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7164637/>

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. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32225176/>

Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veerler D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*. 2020 Apr 16;181(2):281-292.e6. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.058. Epub 2020 Mar 9. Erratum in: *Cell*. 2020 Dec 10;183(6):1735. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7102599/>

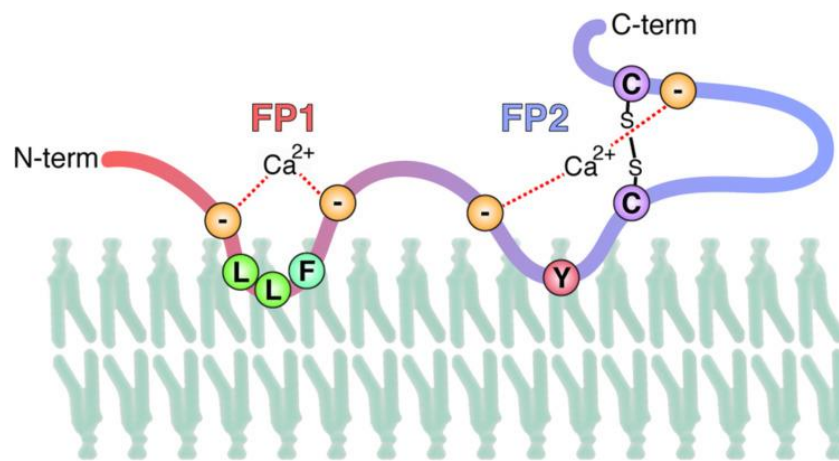
Wang Q, Zhang Y, Wu L, Niu S, Song C, Zhang Z, Lu G, Qiao C, Hu Y, Yuen KY, Wang Q, Zhou H, Yan J, Qi J. Structural and Functional Basis of SARS-CoV-2 Entry by Using Human ACE2. *Cell*. 2020 May 14;181(4):894-904.e9. doi: 10.1016/j.cell.2020.03.045. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7144619/>

l'RBD S1 suggeriscono che potrebbe non essere un bersaglio farmacologico ideale a causa dell'eccessiva mutabilità.²⁰⁵

Struttura della subunità S2

La subunità S2, composta da un dominio FP (fusion peptide), HR1, HR2 (HR: heptad repeats), TM (transmembrane domain) e CP (cytoplasmic domain), è responsabile della fusione e dell'ingresso virale.

FP è un breve segmento di 15-20 aminoacidi conservati della famiglia virale, composto principalmente da residui idrofobici, come la glicina (G) o l'alanina (A), che si ancorano alla membrana bersaglio quando la proteina S adotta la conformazione a pre-tornante. È stato dimostrato che FP svolge un ruolo essenziale nella mediazione della fusione della membrana, interrompendo e collegando i doppi strati lipidici della membrana della cellula ospite.²⁰⁶



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7112017/>

Modello previsto della regione del peptide di fusione CoV, insieme alla sua interazione con il doppio strato lipidico. Vengono mostrati i residui caricati negativamente e idrofobici conservati e una posizione proposta per gli ioni Ca^{2+} .

HR1 e HR2 sono composti da un eptapeptide ripetitivo: HPPHCPC, dove H è un residuo idrofobico o tradizionalmente voluminoso, P è un residuo polare o idrofilo e C è un altro residuo carico.²⁰⁷

HR1 e HR2 formano il fascio a sei elicoidali (6-HB) (Fig. e, pag. 67), essenziale per la fusione virale e la funzione di ingresso della subunità S2.²⁰⁸

²⁰⁵ Xia S, Yan L, Xu W, et al.

A pan-coronavirus fusion inhibitor targeting the HR1 domain of human coronavirus spike.

Sci Adv. 2019;5(4):eaav4580. Published 2019 Apr 10. doi:10.1126/sciadv.aav4580

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6457931/>

²⁰⁶ Millet JK, Whittaker GR.

Physiological and molecular triggers for SARS-CoV membrane fusion and entry into host cells.

Virology. 2018 Apr;517:3-8. doi: 10.1016/j.virol.2017.12.015.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7112017/>

²⁰⁷ Chambers P, Pringle CR, Easton AJ.

Heptad repeat sequences are located adjacent to hydrophobic regions in several types of virus fusion glycoproteins.

J Gen Virol. 1990 Dec;71 (Pt 12):3075-80. doi: 10.1099/0022-1317-71-12-3075.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2177097/>

²⁰⁸ Xia S, Zhu Y, Liu M, Lan Q, Xu W, Wu Y, Ying T, Liu S, Shi Z, Jiang S, Lu L.

Fusion mechanism of 2019-nCoV and fusion inhibitors targeting HR1 domain in spike protein.

Cell Mol Immunol. 2020 Jul;17(7):765-767. doi: 10.1038/s41423-020-0374-2

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7075278/>

HR1 si trova al C-terminale di un FP idrofobico e HR2 si trova al N-terminale del dominio TM.²⁰⁹ Il dominio TM a valle ancora la proteina S alla membrana virale e la subunità S2 termina in una coda CT.²¹⁰

L'RBD si lega ad ACE2 ed S2 cambia conformazione inserendo FP nella membrana cellulare bersaglio, esponendo la bobina a spirale del dominio HR1 e innescando l'interazione tra il dominio HR2 e il trimero HR1 per formare 6-HB, il quale porta così l'involucro virale e membrana cellulare in prossimità per la fusione virale e l'ingresso, come si approfondirà in seguito.²¹¹

HR1 forma un complesso omotrimerico in cui sono esposte tre scanalature idrofobiche altamente conservate sulla superficie che si legano ad HR2.

Il dominio HR2 forma sia un'elica rigida che un anello flessibile per interagire con il dominio HR1.

Nella conformazione a forcina di postfusione dei CoV, ci sono molte interazioni forti tra i domini HR1 e HR2 all'interno della regione elicoidale, che è denominata "regione del nucleo di fusione" (regioni HR1core e HR2core, rispettivamente).

Mentre il dominio S1 RBD, come già visto, fa parte di una regione altamente mutabile e non è un sito bersaglio ideale per lo sviluppo di inibitori antivirali ad ampio spettro²¹², la regione HR della subunità S2 gioca un ruolo essenziale nelle infezioni da HCoV ed è conservata tra gli HCoV, così come la modalità di interazione tra HR1 e HR2, e quindi l'eptapeptide ripetitivo (HR) ha suscitato il massimo interesse per lo studio di farmaci terapeutici.²¹³

Meccanismo d'azione della proteina S

La proteina Spike è una glicoproteina trimerica di classe I * transmembrana responsabile dell'ingresso virale, ed è presente in tutti i tipi di HCoV, così come in altri virus come HIV (HIV glycoprotein 160, Env), virus influenzale (emoagglutinina influenzale, HA), Paramixovirus (appartengono alla famiglia dei Paramyxoviridae) e virus parainfluenzali, il virus della parotite, il virus del morbillo e il virus respiratorio sinciziale umano) ed

²⁰⁹ Robson B.

Computers and viral diseases. Preliminary bioinformatics studies on the design of a synthetic vaccine and a preventative peptidomimetic antagonist against the SARS-CoV-2 (2019-nCoV, COVID-19) coronavirus.

Comput Biol Med. 2020 Apr;119:103670. doi: 10.1016/j.combiomed.2020.103670.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7094376/>

²¹⁰ Tang T, Bidon M, Jaimes JA, Whittaker GR, Daniel S.

Coronavirus membrane fusion mechanism offers a potential target for antiviral development.

Antiviral Res. 2020 Jun;178:104792. doi: 10.1016/j.antiviral.2020.104792.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7194977/>

²¹¹ Xia S, Xu W, Wang Q, Wang C, Hua C, Li W, Lu L, Jiang S.

Peptide-Based Membrane Fusion Inhibitors Targeting HCoV-229E Spike Protein HR1 and HR2 Domains.

International Journal of Molecular Sciences. 2018; 19(2):487. <https://doi.org/10.3390/ijms19020487>

<https://www.mdpi.com/1422-0067/19/2/487/htm>

Wang X, Xia S, Wang Q, Xu W, Li W, Lu L, Jiang S.

Broad-Spectrum Coronavirus Fusion Inhibitors to Combat COVID-19 and Other Emerging Coronavirus Diseases.

International Journal of Molecular Sciences. 2020; 21(11):3843. <https://doi.org/10.3390/ijms21113843>

<https://www.mdpi.com/1422-0067/21/11/3843/htm>

²¹² Lu G, Wang Q, Gao GF.

Bat-to-human: spike features determining 'host jump' of coronaviruses SARS-CoV, MERS-CoV, and beyond.

Trends Microbiol. 2015 Aug;23(8):468-78. doi: 10.1016/j.tim.2015.06.003.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7125587/>

²¹³ Liu S, Xiao G, Chen Y, He Y, Niu J, Escalante CR, Xiong H, Farmer J, Debnath AK, Tien P, Jiang S.

Interaction between heptad repeat 1 and 2 regions in spike protein of SARS-associated coronavirus: implications for virus fusogenic mechanism and identification of fusion inhibitors.

Lancet. 2004 Mar 20;363(9413):938-47. doi: 10.1016/S0140-6736(04)15788-7.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15043961/>

Ebola (glicoproteina del virus Ebola).²¹⁴ Simile ad altri coronavirus, la proteina S di SARS-CoV-2 media il riconoscimento del recettore, l'attacco cellulare e la fusione durante l'infezione virale.²¹⁵

** La proteina S è un trimero che segue un meccanismo di fusione definito di classe I: presenta, infatti, una conformazione pre-fusione metastabile e subisce un sostanziale riarrangiamento strutturale per fondere la membrana virale con la membrana della ospite. Lo stato di prefusione è definito "down" ed è quello di non accessibilità al recettore ACE. In esso uno dei tre domini RBD della subunità S1 è rivolto verso l'alto. Quando la subunità S1 si lega al recettore, effettua un movimento a cerniera, che espone o nasconde gli altri due RBD e fa assumere alla subunità S2 una conformazione post fusione ancor meno stabile. Questo stato è definito "up" perché la membrana virale può fondere con la cellula.*²¹⁶

Legame del recettore

Come già visto in precedenza, la proteina S si lega all'ACE2 attraverso la regione RBD della subunità S1, mediando l'attacco virale alle cellule ospiti sotto forma di trimero. Il SARS-CoV-2 S si lega all'ACE2 umano con una costante di dissociazione (KD) di 14,7 nM, mentre quella di SARS-CoV S è di 325,8 nM, indicando che SARS-CoV-2 S è più affine all'ACE2 del SARS-CoV S.²¹⁷

Fusione virale

Per fusione virale s'intende la fusione della membrana virale con la membrana della cellula ospite, e il conseguente rilascio del genoma virale nella cellula ospite.

La spike del SARS-Cov-2, come varie proteine spike di altri SARS-CoV, è tagliata da proteasi cellulari al confine tra le subunità S1 ed S2, generando due regioni separate che rimangono legate in modo non covalente nella cosiddetta "conformazione di prefusione".²¹⁸

²¹⁴ Weissenhorn W, Dessen A, Calder LJ, Harrison SC, Skehel JJ, Wiley DC. Structural basis for membrane fusion by enveloped viruses. Mol Membr Biol. 1999 Jan-Mar;16(1):3-9. doi: 10.1080/096876899294706. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10332732/>

²¹⁵ Gui M, Song W, Zhou H, Xu J, Chen S, Xiang Y, Wang X. Cryo-electron microscopy structures of the SARS-CoV spike glycoprotein reveal a prerequisite conformational state for receptor binding. Cell Res. 2017 Jan;27(1):119-129. doi: 10.1038/cr.2016.152. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5223232/>

Hulswit RJ, de Haan CA, Bosch BJ. Coronavirus Spike Protein and Tropism Changes. Adv Virus Res. 2016;96:29-57. doi: 10.1016/bs.aivir.2016.08.004. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7112277/>

Yan R, Zhang Y, Li Y, Xia L, Guo Y, Zhou Q. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. Science. 2020 Mar 27;367(6485):1444-1448. doi: 10.1126/science.abb2762 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7164635/>

²¹⁶ Vaccino Anti-Covid 19, focus sulle Spike Protein <https://www.microbiologiaitalia.it/immunologia/vaccino-anti-covid-19-focus-sulle-spike-protein/>

Zhang DY, Wang J, Dokholyan NV. Prefusion spike protein stabilization through computational mutagenesis. Proteins. 2021 Apr;89(4):399-408. DOI: 10.1002/prot.26025. <https://europepmc.org/article/MED/33231324>

²¹⁷ Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh CL, Abiona O, Graham BS, McLellan JS. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. Science. 2020 Mar 13;367(6483):1260-1263. doi: 10.1126/science.abb2507. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7164637/>

²¹⁸ Tortorici MA, Walls AC, Lang Y, Wang C, Li Z, Koerhuis D, Boons GJ, Bosch BJ, Rey FA, de Groot RJ, Veerles D. Structural basis for human coronavirus attachment to sialic acid receptors. Nat Struct Mol Biol. 2019 Jun;26(6):481-489. doi: 10.1038/s41594-019-0233-y. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6554059/>

<https://sibbm.zanichelli.it/italiano/2020/08/23/infezione-biologia-strutturale/>

Una delle proteasi cellulari coinvolta nell'ingresso della spike del SARS-CoV-2 nelle cellule ospiti è la serina proteasi transmembrana 2 (TMPRSS2, Transmembrane Serine Protease 2), che è richiesta anche per l'infezione da SARS-CoV. Infatti, l'inibizione di TMPRSS2 blocca l'ingresso di SARS-CoV e CoV-2 nelle cellule. È interessante il fatto che la CoV-2-S possieda un'inserzione di quattro amminoacidi (sito polibacico PRRAR) al confine tra S1 ed S2 rispetto alla proteina S di SARS-CoV, in cui è assente.²¹⁹

Questi quattro amminoacidi addizionali costituiscono il sito di taglio per una specifica proteasi umana chiamata furina. La presenza di questo sito di taglio peculiare per la furina in SARS-CoV-2-S, data l'espressione praticamente ubiquitaria delle proteasi simili alla furina, è responsabile del più ampio tropismo cellulare e tissutale del SARS-CoV-2 rispetto a SARS-CoV, come anche dell'incremento della sua trasmissibilità e patogenicità²²⁰.

È stato dimostrato di recente che, come la TMPRSS2, la furina sia essenziale per l'ingresso di CoV-2 nelle cellule ospiti. In particolare, l'ingresso del SARS-CoV-2 richiede la scissione sequenziale della glicoproteina spike nei siti di scissione S1/S2 e S2' per mediare la fusione della membrana.²²¹

Inoltre anche la catepsina D, una proteasi tipica dei lisosomi, è richiesta per un ingresso efficiente del CoV-2.

²¹⁹ Coutard B, Valle C, de Lamballerie X, Canard B, Seidah NG, Decroly E.

The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. *Antiviral Res.* 2020;176:104742. doi:10.1016/j.antiviral.2020.104742
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7114094/>

Rabaan AA, Al-Ahmed SH, Haque S, Sah R, Tiwari R, Malik YS, Dhama K, Yatoo MI, Bonilla-Aldana DK, Rodriguez-Morales AJ.

SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV: A comparative overview. *Infez Med.* 2020 Ahead Of Print Jun 1;28(2):174-184. PMID: 32275259.
https://www.infezmed.it/media/journal/Vol_28_2_2020_7.pdf

²²⁰ Anwarul Hasan, et al

A review on the cleavage priming of the spike protein on coronavirus by angiotensin-converting enzyme-2 and furin, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, (2021) 39:8, 3025-3033, DOI: 10.1080/07391102.2020.1754293
<https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1754293>

Millet JK, Whittaker GR.

Host cell proteases: Critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. *Virus Res.* 2015;202:120-134. doi:10.1016/j.virusres.2014.11.021
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4465284/>

²²¹ Peacock, T.P., Goldhill, D.H., Zhou, J. et al.

The furin cleavage site in the SARS-CoV-2 spike protein is required for transmission in ferrets. *Nat Microbiol* 6, 899–909 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41564-021-00908-w>
<https://www.nature.com/articles/s41564-021-00908-w>

Xia, S., Lan, Q., Su, S. et al.

The role of furin cleavage site in SARS-CoV-2 spike protein-mediated membrane fusion in the presence or absence of trypsin. *Sig Transduct Target Ther* 5, 92 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0184-0>
<https://www.nature.com/articles/s41392-020-0184-0>

Wu Y, Zhao S.

Furin cleavage sites naturally occur in coronaviruses [published online ahead of print, 2020 Dec 9]. *Stem Cell Res.* 2020;50:102115. doi:10.1016/j.scr.2020.102115
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7836551/>

Yujia Alina Chan, Shing Hei Zhan,

The Emergence of the Spike Furin Cleavage Site in SARS-CoV-2, *Molecular Biology and Evolution*, Volume 39, Issue 1, January 2022, msab327, <https://doi.org/10.1093/molbev/msab327>
<https://academic.oup.com/mbe/article/39/1/msab327/6426085>

Johnson BA, Xie X, Kalveram B, et al.

Furin Cleavage Site Is Key to SARS-CoV-2 Pathogenesis. Preprint. *bioRxiv.* 2020;2020.08.26.268854. Published 2020 Aug 26. doi:10.1101/2020.08.26.268854
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7457603/>

Whittaker GR.

SARS-CoV-2 spike and its adaptable furin cleavage site. *Lancet Microbe.* 2021;2(10):e488-e489. doi:10.1016/S2666-5247(21)00174-9
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8346238/>

È stato dimostrato che la variazione intorno al sito di scissione della glicoproteina dell'involucro virale gioca un ruolo nel trofismo e nella patogenesi cellulare.

Ad esempio, la patogenesi di alcuni CoV è stata precedentemente correlata alla presenza di un sito di scissione simile alla furina nella sequenza della proteina S. In particolare, l'inserimento di un sito di scissione simile nella proteina S del virus della bronchite infettiva (IBV) determina una maggiore patogenicità, sintomi neurali pronunciati e neurotropismo nei polli infetti.²²²

Allo stesso modo, nel caso del virus dell'influenza, le forme a bassa patogenicità contengono un unico residuo basico nel sito di scissione, che viene scisso dalle proteasi simili alla tripsina, e la distribuzione tissutale della proteasi attivante limita tipicamente le infezioni agli organi respiratori e/o intestinali²²³.

Al contrario, le forme altamente patogene dell'influenza hanno un sito di scissione simile alla furina su cui agiscono diverse proteasi cellulari, inclusa la furina, espresse in un'ampia varietà di tipi cellulari che consentono un allargamento del trofismo cellulare del virus²²⁴.

Inoltre l'inserimento di un motivo multibasico **RERRRKKR↓GL** nel sito di scissione dell'emoagglutinina HA dell'H5N1 potrebbe essere stato responsabile dell'ipervirulenza del virus durante l'epidemia di Hong Kong nel 1997.²²⁵

Questo motivo mostra l'Arginina in P1 e residui basici in P2 e P4, P6 e P8 e una Leucina alifatica in posizioni P2' (nomenclatura Schechter e Berger)²²⁶, tipico di una specificità di clivaggio simile alla furina.²²⁷

²²² Cheng J, Zhao Y, Xu G, et al.

The S2 Subunit of QX-type Infectious Bronchitis Coronavirus Spike Protein Is an Essential Determinant of Neurotropism. *Viruses*. 2019;11(10):972. Published 2019 Oct 22. doi:10.3390/v11100972 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6832359/>

²²³ Sun X, Tse LV, Ferguson AD, Whittaker GR.

Modifications to the hemagglutinin cleavage site control the virulence of a neurotropic H1N1 influenza virus. *J Virol*. 2010;84(17):8683-8690. doi:10.1128/JVI.00797-10 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2919019/>

²²⁴ Kido H, Okumura Y, Takahashi E, Pan HY, Wang S, Yao D, Yao M, Chida J, Yano M.

Role of host cellular proteases in the pathogenesis of influenza and influenza-induced multiple organ failure. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Jan;1824(1):186-94. doi: 10.1016/j.bbapap.2011.07.001. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.07.001>

²²⁵ Claas EC, Osterhaus AD, van Beek R, De Jong JC, Rimmelzwaan GF, Senne DA, Krauss S, Shortridge KF, Webster RG.

Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet*. 1998 Feb 14;351(9101):472-7. doi: 10.1016/S0140-6736(97)11212-0. Erratum in: *Lancet* 1998 Apr 25;351(9111):1292. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9482438/>

Kido H, Okumura Y, Takahashi E, Pan HY, Wang S, Yao D, Yao M, Chida J, Yano M.

Role of host cellular proteases in the pathogenesis of influenza and influenza-induced multiple organ failure. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Jan;1824(1):186-94. doi: 10.1016/j.bbapap.2011.07.001. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.07.001>

²²⁶ Schechter I, Berger A.

On the active site of proteases. 3. Mapping the active site of papain; specific peptide inhibitors of papain. *Biochem Biophys Res Commun*. 1968 Sep 6;32(5):898-902. doi: 10.1016/0006-291x(68)90326-4. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5682314/>

²²⁷ Braun E, Sauter D.

Furin-mediated protein processing in infectious diseases and cancer. *Clin Transl Immunology*. 2019;8(8):e1073. Published 2019 Aug 5. doi:10.1002/cti2.1073 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6682551/>

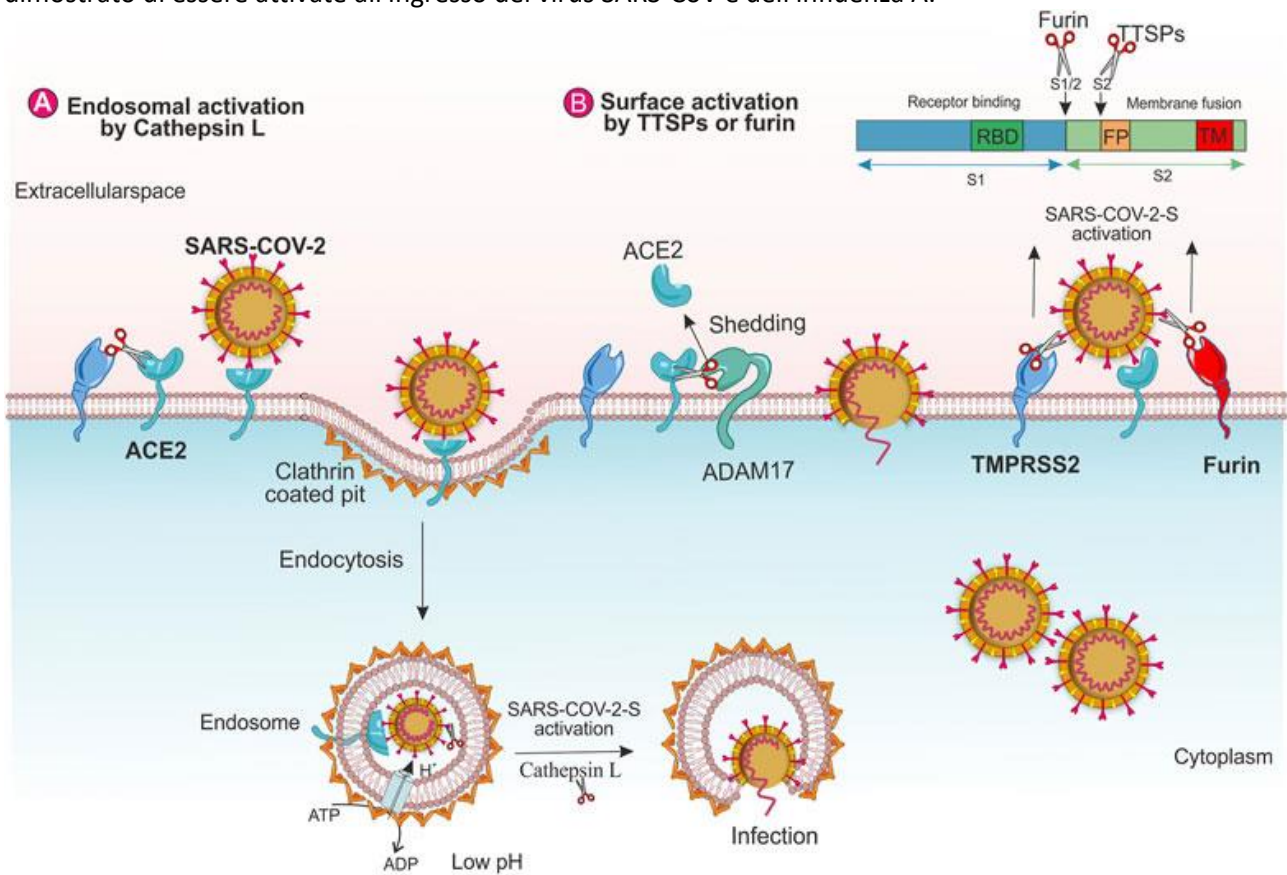
Izaguirre G.

The Proteolytic Regulation of Virus Cell Entry by Furin and Other Proprotein Convertases. *Viruses*. 2019;11(9):837. Published 2019 Sep 9. doi:10.3390/v11090837 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6784293/>

Seidah NG, Prat A.

The biology and therapeutic targeting of the proprotein convertases. *Nat Rev Drug Discov*. 2012 May;11(5):367-83. doi: 10.1038/nrd3699. <https://doi.org/10.1038/nrd3699>

Le proteasi delle cellule ospiti come TMPRSS2 sono essenziali per il priming della proteina S e hanno dimostrato di essere attivate all'ingresso del virus SARS-CoV e dell'influenza A.²²⁸



<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2021.725528/full>
 Il ruolo delle proteasi dell'ospite umano sull'ingresso di SARS-CoV-2. Ingresso del virus attraverso (A) via endosomiale e (B) TMPRSS2 e furina.

Approfondimento

Il sito di clivaggio della furina del SARS-Cov-2

Come già discusso, ci sono due eventi di scissione associati alla fusione della membrana mediata dalla spike, in cui il dominio S1 è il recettore di legame, mentre il dominio S2 contiene l'apparato per la fusione alla membrana.

Il primo è una scissione di innesco che si verifica all'interfaccia della regione S1/S2 per alcuni coronavirus, e la seconda è la scissione di attivazione obbligatoria che si verifica all'interno della regione S2 (S2').

La scissione di innesco converte generalmente la proteina spike in una forma competente per la fusione, consentendo alla spike di legarsi meglio ai recettori o di esporre i siti di scissione nascosti.

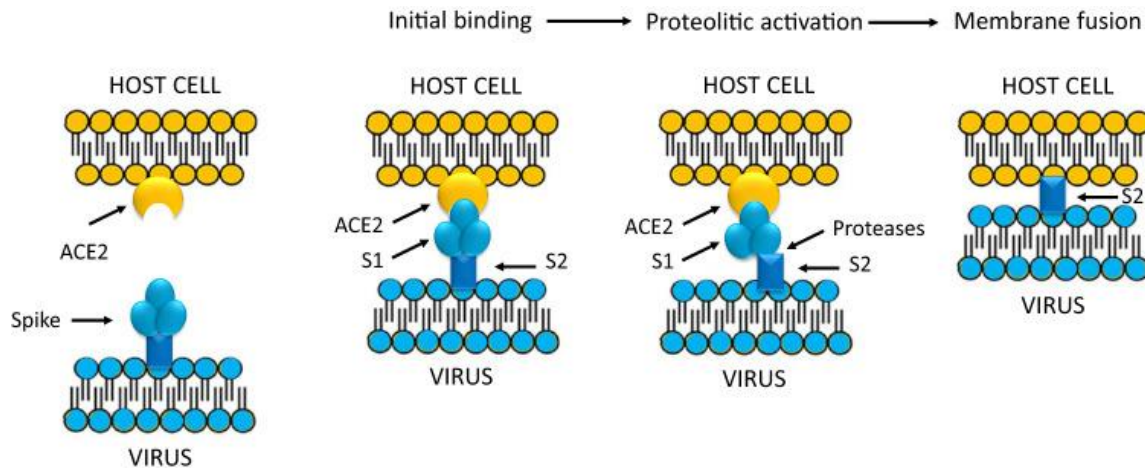
²²⁸ Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. 2020;181(2):271-280.e8. doi:10.1016/j.cell.2020.02.052 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7102627/>

Heurich A, Hofmann-Winkler H, Gierer S, Liepold T, Jahn O, Pöhlmann S. TMPRSS2 and ADAM17 cleave ACE2 differentially and only proteolysis by TMPRSS2 augments entry driven by the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein. *J Virol*. 2014;88(2):1293-1307. doi:10.1128/JVI.02202-13 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3911672/>

Limburg H, Harbig A, Bestle D, et al. TMPRSS2 Is the Major Activating Protease of Influenza A Virus in Primary Human Airway Cells and Influenza B Virus in Human Type II Pneumocytes. *J Virol*. 2019;93(21):e00649-19. Published 2019 Oct 15. doi:10.1128/JVI.00649-19 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6803253/>

La scissione di attivazione avvia una serie di cambiamenti conformazionali che consentono alla proteina S di agganciarsi alla membrana dell'ospite per la fusione delle membrane.²²⁹

** Si ricorda nuovamente che la conformazione dei prefusione è la conformazione della proteina virale di fusione che appare sull'involucro virale dopo l'innesco ma prima dell'attivazione della fusione, mentre la conformazione di postfusione è la conformazione della proteina/subunità di fusione dopo che la reazione di fusione è avvenuta.*



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7393809/>

Dopo il legame iniziale del recettore ACE2, la spike del SARS-CoV viene attivata proteoliticamente e scissa enzimaticamente a livello S1/S2. S1 che si dissocia da S2 e la subunità 2 troncata della proteina spike facilita la fusione delle membrane cellulari e virali.

Esiste una varietà di proteasi in grado di innescare e attivare le proteine spike dei coronavirus (CoV).

A seconda della proteasi disponibile (furina, tripsina, catepsina proteasi) il CoV può fondersi con la membrana plasmatica o con la membrana endosomiale.²³⁰

La famiglia di enzimi pro-proteina convertasi (PC) racchiude un gruppo di nove proteasi con una vasta gamma di attività sul substrato.²³¹

²²⁹ White JM, Whittaker GR.

Fusion of Enveloped Viruses in Endosomes.

Traffic. 2016 Jun;17(6):593-614. doi: 10.1111/tra.12389.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4866878/>

Zhu G, Zhu C, Zhu Y, Sun F.

Minireview of progress in the structural study of SARS-CoV-2 proteins.

Curr Res Microb Sci. 2020 Sep;1:53-61. doi: 10.1016/j.crmicr.2020.06.003.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7323663/>

Belouzard S, Millet JK, Licitra BN, Whittaker GR.

Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein.

Viruses. 2012 Jun;4(6):1011-33. doi: 10.3390/v4061011. Epub 2012 Jun 20.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3397359/>

Millet JK, Whittaker GR.

Host cell proteases: Critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis.

Virus Res. 2015 Apr 16;202:120-34. doi: 10.1016/j.virusres.2014.11.021. Epub 2014 Nov 22.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4465284/>

²³⁰ Heald-Sargent T, Gallagher T.

Ready, set, fuse! The coronavirus spike protein and acquisition of fusion competence.

Viruses. 2012 Apr;4(4):57-80. doi: 10.3390/v404057. Epub 2012 Apr 12.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3347323/>

²³¹ Jaimes JA, Millet JK, Whittaker GR.

Proteolytic Cleavage of the SARS-CoV-2 Spike Protein and the Role of the Novel S1/S2 Site.

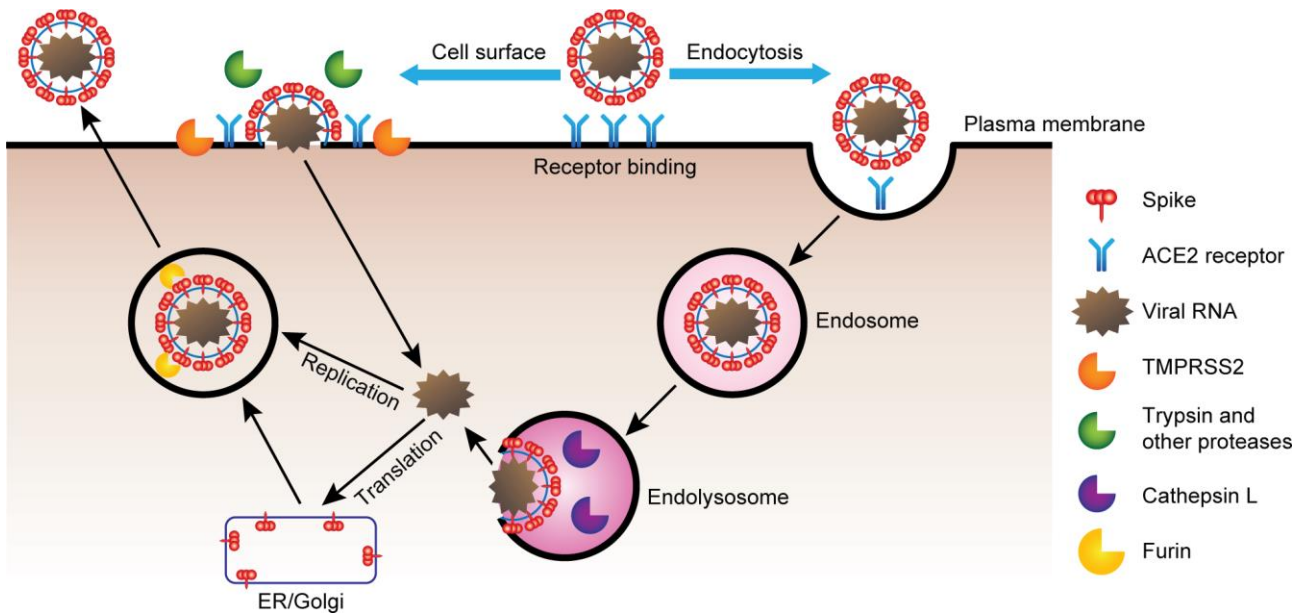
iScience. 2020 Jun 26;23(6):101212. doi: 10.1016/j.isci.2020.101212. Epub 2020 May 28

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7255728/>

In questo gruppo, la furina è un'endopeptidasi dibasica ed è espressa in maniera ubiquitaria nell'apparato del Golgi di tutte le cellule²³². La tripsina è una serina endopeptidasi che è comunemente espressa nelle cellule digestive e respiratorie ed è stata descritta per essere altamente attiva come enzima digestivo nell'intestino tenue.

Le cathepsine sono un gruppo eterogeneo di proteasi che si trovano tipicamente negli endosomi e nei lisosomi e sono coinvolte in numerosi processi di degradazione e di presentazione dell'antigene.

Infine, le serina-proteasi transmembrana di tipo II o TTSP, sono un altro gruppo di enzimi con diverse funzioni cellulari, che partecipano nell'attivazione virale. Questo gruppo include enzimi come la serina proteasi transmembrana 2 (TMPRSS2) e la matriptasi.²³³



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7888651/>
Meccanismi di ingresso di SARS-CoV-2.

La proteina virale del rivestimento virale si lega ad ACE2 e, in alcuni casi, forse NRP1, alle cellule reattive. La proteina spike virale viene elaborata da TMPRSS2 e da altre serina-proteasi che facilitano l'ingresso sulla superficie cellulare o endocitizzata negli endosomi dove la spike viene elaborata da CTSL nel lisosoma. L'RNA virale rilasciato dall'ingresso mediato da TMPRSS2 o dal rilascio dell'endosoma viene replicato come copie del genoma parziale e completo e tradotto nel pronto soccorso per formare nuovi virioni SARS-CoV-2. L'elaborazione della proteina spike da parte della furina avviene prima del rilascio di nuovi virus nell'ambiente extracellulare.

I risultati supportano le osservazioni che il sito S1/S2 del SARS-CoV-2 serve per espandere il tropismo virale alle cellule polmonari.²³⁴

²³² Thomas G.
Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease.
Nat Rev Mol Cell Biol. 2002;3(10):753-766. doi:10.1038/nrm934
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1964754/>

²³³ Jana Koch, Zina M Uckelely, Patricio Doldan, Megan Stanifer, Steeve Boulant, Pierre-Yves Lozach
Host Cell Proteases Drive Early or Late SARS-CoV-2 Penetration
bioRxiv 2020.12.22.423906; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.12.22.423906>
<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.12.22.423906v1.full.pdf>

Murgolo N, Therien AG, Howell B, et al.
SARS-CoV-2 tropism, entry, replication, and propagation: Considerations for drug discovery and development.
PLoS Pathog. 2021;17(2):e1009225. Published 2021 Feb 17. doi:10.1371/journal.ppat.1009225
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7888651/>

²³⁴ Hoffmann M, Kleine-Weber H, Pöhlmann S.
A Multibasic Cleavage Site in the Spike Protein of SARS-CoV-2 Is Essential for Infection of Human Lung Cells.
Mol Cell. 2020 May 21;78(4):779-784.e5. doi: 10.1016/j.molcel.2020.04.022.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7194065/>

Thomas P. Peacock, et al

Senza la pre-scissione in S1/S2, il SARS-CoV-2 verrebbe endocitato e, a causa della bassa espressione di catepsina L negli endosomi respiratori²³⁵ associata all'espressione di fattori di restrizione antivirali negli endosomi, il SARS-CoV-2 non infetterebbe efficacemente tramite l'endosoma respiratorio.

I primi studi sul SARS-CoV-2 hanno mostrato che la giunzione S1/S2 conteneva un inserto aggiuntivo, PRRA (R - arginina, A-alanina), che non era presente nel SARS-CoV o nei CoV antenati del pipistrello più vicini²³⁶. Questo inserto forma una sequenza P-R-R-A-R e, sebbene contenga il motivo minimo di riconoscimento della furina, R-X-X-R, è insolito e diverge dal motivo preferito e canonico R-X-K/R-R.

Rispetto al motivo canonico, i residui nella posizione P2 e P3 per il SARS-CoV-2 S1/S2 sono invertiti, con R nella posizione P3 invece della posizione P2 e una A nella posizione P2 invece della posizione P3.²³⁷

La presenza di un'arginina nella terza posizione P3 prima dell'FCS (sito di clivaggio della furina) ne aumenta di dieci volte l'efficienza²³⁸. Anche la sua presenza è rara e si verifica solo in 5 dei 132 FCS conosciuti.²³⁹

<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.10.04.325522v1.full.pdf>

Analisi del punteggio di scissione della furina dei siti di scissione CoV S1/S2. Le sequenze CoV S sono state analizzate utilizzando l'algoritmo di predizione della furina Prop1 1.0 e PiTou2 3.0, generando un punteggio con numeri verdi che indicano la scissione della furina prevista e numeri rossi che indicano l'assenza di scissione della furina prevista. Le linee viola indicano la posizione del sito di scissione S1/S2 previsto. I residui basici di arginina (R) e lisina (K) sono evidenziati in blu. I numeri di sequenza si riferiscono alla posizione degli amminoacidi all'interno della proteina spike.

* Per Bat-RmYN02, il numero di sequenza è stato determinato dall'allineamento S con SARS-CoV-2 S utilizzando Geneious. Sequenze corrispondenti alla regione S1/S2 di HCoV-HKU1 (AAT98580.1), SARS-CoV (AAT74874.1), SARS-CoV-2 (QHD43416.1), Bat-CoVRaTG13 (QHR63300.2), Bat-SL-CoVZC45 (AVP78031.1), Bat-SL-CoVZXC21 (AVP78042.1), MERS-CoV (AFS88936.1), BatCoV-HKU4 (YP_001039953.1), BatCoV-HKU5 (YP_001039962.1) e Influenza A/Chicken/Hong Kong/822.1/01/H5N1 (AF509026.2) sono stati ottenuti da GenBank. Le sequenze corrispondenti alle regioni S1 / S2 e S2 di RmYN02 (EPI_ISL_412977) sono state ottenute da GISAID.

The furin cleavage site of SARS-CoV-2 spike protein is a key determinant for transmission due to enhanced replication in airway cells
bioRxiv 2020.09.30.318311; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.09.30.318311>
<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.09.30.318311v1>

²³⁵ Park JE, Li K, Barlan A, Fehr AR, Perlman S, McCray PB Jr, Gallagher T.
Proteolytic processing of Middle East respiratory syndrome coronavirus spikes expands virus tropism.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 Oct 25;113(43):12262-12267. doi: 10.1073/pnas.1608147113.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5086990/>

²³⁶ Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh CL, Abiona O, Graham BS, McLellan JS.
Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation.
Science. 2020 Mar 13;367(6483):1260-1263. doi: 10.1126/science.abb2507.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7164637/>

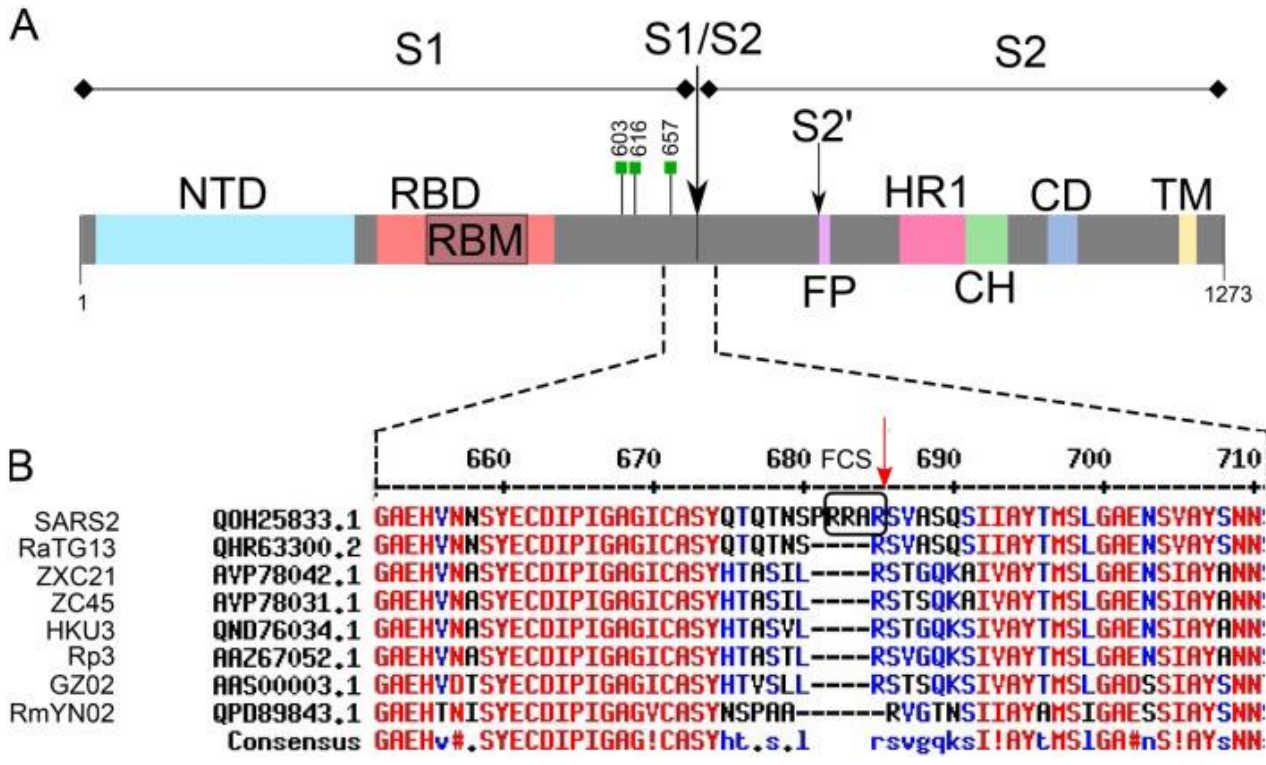
Jaimes JA, André NM, Chappie JS, Millet JK, Whittaker GR.
Phylogenetic Analysis and Structural Modeling of SARS-CoV-2 Spike Protein Reveals an Evolutionary Distinct and Proteolytically Sensitive Activation Loop.
J Mol Biol. 2020 May 1;432(10):3309-3325. doi: 10.1016/j.jmb.2020.04.009.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7166309/>

²³⁷ Henrich S, Lindberg I, Bode W, Than ME.
Proprotein convertase models based on the crystal structures of furin and kexin: explanation of their specificity.
J Mol Biol. 2005 Jan 14;345(2):211-27. doi: 10.1016/j.jmb.2004.10.050.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15571716/>

²³⁸ Henrich S, Cameron A, Bourenkov GP, Kiefersauer R, Huber R, Lindberg I, Bode W, Than ME.
The crystal structure of the proprotein processing proteinase furin explains its stringent specificity.
Nat Struct Biol. 2003 Jul;10(7):520-6. doi: 10.1038/nsb941. Erratum in: Nat Struct Biol. 2003 Aug;10(8):669.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12794637/>

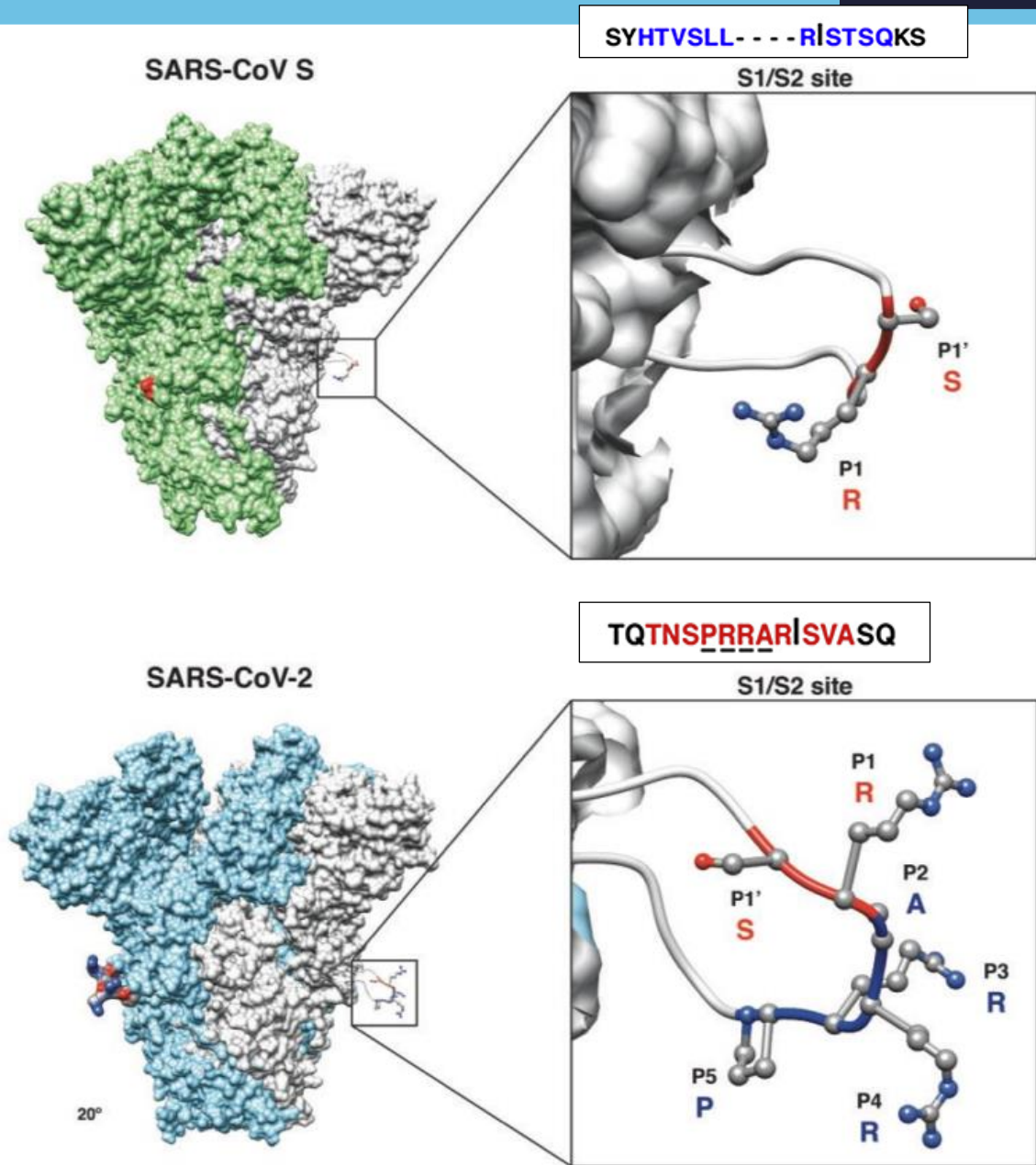
²³⁹ Lemmin T, Kalbermatter D, Harder D, Plattet P, Fotiadis D.
Structures and dynamics of the novel S1/S2 protease cleavage site loop of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein.
J Struct Biol X. 2020;4:100038. doi: 10.1016/j.yjsbx.2020.100038.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7534663/>

Virus	S1/S2 Sequence	Furin Score PiTou	Furin Score ProP
Betacoronavirus			
Lineage A			
HCoV-HKU1	747-YNSPSSSSSSRRKR SISASY-766	+14.634	0.918
Lineage B			
SARS-CoV	654-AGICASYHTVSLLR STSQKS-673	-5.167	0.123
SARS-CoV-2	672-ASYQTQTNSPRR SVASQS-691	+9.196	0.620
Bat-RmYN02*	667-GAGVCASYNSPAAR VGTNSI-686	-5.085	0.111
Bat-CoV RaTG13	668-AGICASYQTQTNSR SVASQS-687	-4.672	0.151
Bat-CoV ZC45	645-AGICASYHTASILR STSQKA-664	-5.333	0.153
Bat-CoV ZXC21	644-AGICASYHTASILR STGQKA-663	-5.333	0.170
Lineage C			
MERS-CoV	738-LPDTPSTLTPRSVR SVPGEM-757	+5.155	0.563
BatCoV-HKU4	736-GQSLCAVPPVSTFR SYSASQ-755	-5.14	0.229
BatCoV-HKU5	732-LCAIPPTTSSRVRR ATSGAS-751	+10.259	0.822
Influenza A			
H5N1	322-LRNTPQRERRRKR GLFGAI-341	+13.59	0.808



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7993900/>

SARS-CoV-2 proteina spike che mostra subunità e domini, nonché allineamenti di sequenza locale con altri betacoronavirus. **A)** Domini Spike: dominio N-terminale (NTD), dominio di legame del recettore (RBD), motivo di legame del recettore (RBM), peptide di fusione (FP), ripetizione di heptapad 1 (HR1), elica centrale (CH), dominio del connettore (CD), dominio transmembrana (TM), sito di scissione della furina multibasi (FCS) indicato da una scatola nera. I siti di scissione S1 ↓ S2 e S2' sono indicati dalle frecce. I riquadri verdi indicano la posizione dei residui N-glicosilati prossimalmente a FCS. **B)** Allineamenti MultAlin utilizzando il riferimento alla numerazione della sequenza della proteina spike SARS-CoV-2 (Corpet 1988) (<http://www.sacs.ucsf.edu/cgi-bin/multalin.py>). Definizione e numeri di adesione come segue: SARS2: SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1 (QOH25833.1); RaTG13 (QHR63300.2); ZXC21: bat-SL-CoVZXC21 (AVP78042.1); ZC45: bat-SL-CoVZC45 (AVP78031.1); HKU3: Bat SARS coronavirus HKU3 (QND76034.1); Rp3: Rp3 / 2004 (AAZ67052.1); GZ02: SARS coronavirus GZ02 (AAS00003.1); RmYN02: Bat coronavirus RmYN02 (QPD89843.1). Vengono mostrati gli indici di sequenza riferiti a SARS-CoV-2



<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.10.04.325522v1.full.pdf>

Modello strutturale previsto delle proteine SARS-CoV e SARS-CoV-2 S. (Riquadro) Vengono mostrati l'ingrandimento del sito S1 / S2 con residui R e S conservati (nastro rosso) e l'inserimento di quattro amminoacidi unici P-R-R-A per SARS-CoV-2 (nastro blu). Le P denotano la posizione di quell'amminoacido dal sito di scissione S1/S2, con P1-P5 che si riferisce agli amminoacidi prima del sito di scissione e P1 'che si riferisce agli amminoacidi dopo il sito di scissione.

Inoltre, il motivo "RRAR" crea un motivo C-terminale (CendR) con un sito di legame per i recettori di membrana della neuropilina (NRP1 e NRP2)²⁴⁰, che sono più ampiamente espressi rispetto ad ACE2.

È stato dimostrato che NRP1 può agire come una via alternativa per l'ingresso del virus, in particolare nelle cellule epiteliali olfattive della cavità nasale.

NRP1 richiede un substrato scisso dalla furina per facilitare l'ingresso del virus e l'espressione dell'mRNA di NRP1 è elevata nelle cellule infettate da SARS-CoV-2 nei pazienti COVID-19.²⁴¹

²⁴⁰ Teesalu T, Sugahara KN, Kotamraju VR, Ruoslahti E. C-end rule peptides mediate neuropilin-1-dependent cell, vascular, and tissue penetration. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(38):16157-16162. doi:10.1073/pnas.0908201106 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2752543/>

²⁴¹ Cantuti-Castelvetri L, Ojha R, Pedro LD, et al. Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity.

NRP-1 e SARS-Cov-2

NRP-1 è un recettore della superficie cellulare che svolge un ruolo essenziale nell'angiogenesi ²⁴², nella regolazione della permeabilità vascolare ²⁴³, nello sviluppo del sistema nervoso (guida assonale e formazione delle sinapsi del circuito GABA-ergico e vascolarizzazione della retina) ²⁴⁴ e nella formazione della sinapsi immunologica tra le cellule dendritiche e cellule T ²⁴⁵.

Science. 2020;370(6518):856-860. doi:10.1126/science.abd2985
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7857391/>

Daly JL, et al
Neuropilin-1 is a host factor for SARS-CoV-2 infection.
Science. 2020 Nov 13;370(6518):861-865. doi: 10.1126/science.abd3072.
<https://science.sciencemag.org/content/370/6518/861/tab-pdf>

²⁴² Plein A, Fantin A, Ruhrberg C.
Neuropilin regulation of angiogenesis, arteriogenesis, and vascular permeability.
Microcirculation. 2014 May;21(4):315-23. doi: 10.1111/micc.12124.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4230468/>

Guo HF, Vander Kooi CW.
Neuropilin Functions as an Essential Cell Surface Receptor.
J Biol Chem. 2015 Dec 4;290(49):29120-6. doi: 10.1074/jbc.R115.687327.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4705917/>

²⁴³ Becker PM, Waltenberger J, Yachechko R, Mirzapoiazova T, Sham JS, Lee CG, Elias JA, Verin AD.
Neuropilin-1 regulates vascular endothelial growth factor-mediated endothelial permeability.
Circ Res. 2005 Jun 24;96(12):1257-65. doi: 10.1161/01.RES.0000171756.13554.49.
<https://www.ahajournals.org/doi/epub/10.1161/01.RES.0000171756.13554.49>

Acevedo LM, Barillas S, Weis SM, Göthert JR, Cheresh DA.
Semaphorin 3A suppresses VEGF-mediated angiogenesis yet acts as a vascular permeability factor.
Blood. 2008 Mar 1;111(5):2674-80. doi: 10.1182/blood-2007-08-110205.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2254547/>

Mamluk R, Klagsbrun M, Detmar M, Bielenberg DR.
Soluble neuropilin targeted to the skin inhibits vascular permeability.
Angiogenesis. 2005;8(3):217-27. doi: 10.1007/s10456-005-9009-6.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16328161/>

²⁴⁴ Telley L, Cadilhac C, Cioni JM, Saywell J, Jahannault-Talignani C, Huettl RE, Sarrailh-Faivre C, Dayer A, Huber AB, Ango F.
Dual Function of NRP1 in Axon Guidance and Subcellular Target Recognition in Cerebellum.
Neuron. 2016 Sep 21;91(6):1276-1291. doi: 10.1016/j.neuron.2016.08.015.
[https://www.cell.com/neuron/pdfExtended/S0896-6273\(16\)30507-4](https://www.cell.com/neuron/pdfExtended/S0896-6273(16)30507-4)

Erskine L, François U, Denti L, et al.
VEGF-A and neuropilin 1 (NRP1) shape axon projections in the developing CNS via dual roles in neurons and blood vessels.
Development. 2017;144(13):2504-2516. doi:10.1242/dev.151621
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5536872/>

Ango F.
NRP1 and synapse formation.
Oncotarget. 2016 Dec 13;7(50):81975-81976. doi: 10.18632/oncotarget.13462.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5347665/>

²⁴⁵ Romeo PH, Lemarchandel V, Tordjman R.
Neuropilin-1 in the immune system. Adv Exp Med Biol. 2002;515:49-54. doi: 10.1007/978-1-4615-0119-0_4.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12613542/>

Mayi BS, Leibowitz JA, Woods AT, Ammon KA, Liu AE, Raja A.
The role of Neuropilin-1 in COVID-19.
PLoS Pathog. 2021 Jan 4;17(1):e1009153. doi: 10.1371/journal.ppat.1009153.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7781380/>

Roy S, Bag AK, Singh RK, Talmadge JE, Batra SK, Datta K.
Multifaceted Role of Neuropilins in the Immune System: Potential Targets for Immunotherapy.
Front Immunol. 2017 Oct 10;8:1228. doi: 10.3389/fimmu.2017.01228.

Tordjman R, Lepelletier Y, Lemarchandel V, Cambot M, Gaulard P, Hermine O, Roméo PH.

Il VEGF-A165 e altri ligandi di NRP-1 possiedono una sequenza CendR C-terminale che interagisce con il dominio b1 di NRP-1 e causa internalizzazione cellulare e perdite vascolari. Uno dei percorsi dello stravasamento vascolare mediato da VEGF coinvolge un percorso transcellulare attraverso un labirinto di condotti chiamati organelli vescicolo-vacuolari ²⁴⁶, ed è possibile che anche i peptidi CendR attivino questa via.

La scissione proteolitica delle proteine dell'involucro virale con l'esposizione di elementi CendR sembra essere un tema ricorrente nella diffusione tissutale e nell'infettività di molti virus, oltre al SARS-Cov-2 (alcuni esempi sono riportati nella Tabella S1).

L'edema vascolare patologico è associato a molti stati patologici, come quelli che si manifestano nelle infezioni da virus emorragico, sepsi e sindromi da stravasamento vascolare organo-specifica. ²⁴⁷

Table S1. Examples of viruses with surface CendR elements

Virus	Protein	Sequence [*: cleavage site]	Reference
Human cytomegalovirus	Envelope glycoprotein B (UL55)	LNITHRTRR*STSDN	(1)
Measles virus	Fusion protein	SVASSRRHKR*FAGVV	(2)
Tick-born encephalitis virus	PreM protein	KQEGSRTRR*SVLIP	(3)
Respiratory syncytial virus	Fusion protein	PATNNRARR*ELPRF	(4)
Influenza A virus (H5N1)	Hemagglutinin	PQRERRRKKR*GLFGA	(5)
HIV-1	Envelope precursor gp160	RRVVQREKR*AVGIG	(6)
Zaire ebolavirus	Virion spike glycoprotein precursor	LITGGRTR*REAIIV	(7)
Mumps virus	Fusion protein	PSSGSRRHKR*FAGIA	(8)
Yellow fever virus	PreM protein	CDSAGRSRR*SRRAI	(9)
Human herpesvirus 4	BALF4 (glycoprotein B)	AAVLRRRR*RDAGN	(10)
Human metapneumo-virus	Fusion glycoprotein precursor	QIENPRQSR*FVLGA	(11)
Human T-lymphotropic virus-2	Env propeptide	PPPATRRRR*AVPIA	(12)
Crimean-Congo hemorrhagic fever virus	Glycoprotein precursor	PSPTNRSKR*NLKME	(13)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2752543/> ²⁴⁸

A neuronal receptor, neuropilin-1, is essential for the initiation of the primary immune response. *Nat Immunol.* 2002 May;3(5):477-82. doi: 10.1038/ni789. Epub 2002 Apr 15. Erratum in: *Nat Immunol.* 2003 Apr;4(4):394. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11953749/>

²⁴⁶ Dvorak AM, Feng D. The vesiculo-vacuolar organelle (VVO). A new endothelial cell permeability organelle. *J Histochem Cytochem.* 2001 Apr;49(4):419-32. doi: 10.1177/002215540104900401. <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/002215540104900401>

Ono S, Egawa G, Kabashima K. Regulation of blood vascular permeability in the skin. *Inflamm Regen.* 2017 Jul 10;37:11. doi: 10.1186/s41232-017-0042-9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5725833/>

Dvorak AM, Feng D. The vesiculo-vacuolar organelle (VVO). A new endothelial cell permeability organelle. *J Histochem Cytochem.* 2001 Apr;49(4):419-32. doi: 10.1177/002215540104900401 <https://journals.sagepub.com/doi/epub/10.1177/002215540104900401>

Feng D, Nagy JA, Hipp J, Dvorak HF, Dvorak AM. Vesiculo-vacuolar organelles and the regulation of venule permeability to macromolecules by vascular permeability factor, histamine, and serotonin. *J Exp Med.* 1996 May 1;183(5):1981-6. doi: 10.1084/jem.183.5.1981. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2192559/pdf/je18351981.pdf>

²⁴⁷ Basu A, Chaturvedi UC. Vascular endothelium: the battlefield of dengue viruses. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008 Aug;53(3):287-99. doi: 10.1111/j.1574-695X.2008.00420.x. Epub 2008 Jul 3. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7110366/>

Weis SM. Vascular permeability in cardiovascular disease and cancer. *Curr Opin Hematol.* 2008 May;15(3):243-9. doi: 10.1097/MOH.0b013e3282f97d86. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18391792/>

²⁴⁸ Referenze riportate nella tabella

1. Vey M, et al. (1995) Proteolytic processing of human cytomegalovirus glycoprotein B (gpUL55) is mediated by the human endoprotease furin. *Virology* 206:746–749.
2. Varsanyi TM, Jornval IH, NorrbyE(1985) Isolation and characterization of the measles virus F1 polypeptide: comparison with other paramyxovirus fusion proteins. *Virology*147:110–117.

Studi preclinici hanno suggerito che la neuropilina-1 (NRP1) mostra un'elevata espressione nell'epitelio respiratorio e olfattivo, e può essere implicata nelle manifestazioni neurologiche della COVID-19 favorendo l'ingresso di SARS-CoV-2 nel cervello attraverso l'epitelio olfattivo.

Davies et al hanno dimostrato che l'NRP1 è espressa anche nel SNC, comprese le regioni legate all'olfatto come i tubercoli olfattivi e i giri paraolfattivi.²⁴⁹

La variabilità nell'espressione per età, razza o sesso può spiegare la diversa morbilità dell'infezione e l'associazione inversa tra anosmia e gravità; in caso di maggiore espressione potrebbe esserci un maggior rischio di alterata funzione olfattiva, ma anche una maggiore attivazione dei linfociti T regolatori che potrebbero sopprimere la tempesta di citochine.²⁵⁰

Dato che sia la proteina S che il VEGF-A, un agente pro-nocicettivo e angiogenico, impegnano l'NRP-1 in un dominio di legame comune, vale la pena esaminare il potenziale della proteina S di inibire la segnalazione di VEGF-A/NRP-1.

Dati i livelli più elevati di VEGF-A osservati nei pazienti COVID-19, erano attesi disturbi legati ad un aumento del dolore, invece è stato scoperto che la proteina S blocca la segnalazione di VEGF-A/NRP-1, che promuove la nocicezione, inducendo analgesia.²⁵¹ Questo meccanismo potrebbe favorire una presentazione asintomatica della malattia o di una mancata percezione dello stato di malattia.

3. Chambers TJ, et al. (1990) Evidence that the N-terminal domain of nonstructural protein NS3 from yellow fever virus is a serine protease responsible for site-specific cleavages in the viral polyprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:8898–8902.
4. González-Reyes L, et al. (2001) Cleavage of the human respiratory syncytial virus fusion protein at two distinct sites is required for activation of membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:9859–9864.
5. Steinhauer DA (1999) Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology* 258:1–20.
6. Moulard M, Decroly E (2000) Maturation of HIV envelope glycoprotein precursors by cellular endoproteases. *Biochim Biophys Acta* 1469:121–132.
7. Wool-Lewis RJ, Bates P (1999) Endoproteolytic processing of the ebola virus envelope glycoprotein: Cleavage is not required for function. *J Virol* 73:1419–1426.
8. Elango N, Varsanyi TM, Kövamees J, Norrby E (1989) The mumps virus fusion protein mRNA sequence and homology among the paramyxoviridae proteins. *J Gen Virol* 70:801–807.
9. Ruiz-Linares A, Cahour A, Després P, Girard M, Bouloy M (1989) Processing of yellow fever virus polyprotein: Role of cellular proteases in maturation of the structural proteins. *J Virol* 63:4199–4209.
10. Johansen E, et al. (2004) Proteins of purified Epstein-Barr virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:16286–16291.
11. Biacchesi S, et al. (2006) Modification of the trypsin-dependent cleavage activation site of the human metapneumovirus fusion protein to be trypsin independent does not increase replication or spread in rodents or nonhuman primates. *J Virol* 80:5798–5806.
12. Sjöberg M, Wallin M, Lindqvist B, Garoff H (2006) Furin cleavage potentiates the membrane fusion-controlling inter subunit disulfide bond isomerization activity of leukemia virus Env. *J Virol* 80:5540–5551.
13. Sanchez AJ, Vincent MJ, Erickson BR, Nichol ST (2006) Crimean-congo hemorrhagic fever virus glycoprotein precursor is cleaved by Furin-like and SKI-1 proteases to generate a novel 38-kilodalton glycoprotein. *J Virol* 80:514–525.

²⁴⁹ Davies J, Rande HS, Chatha K, et al.

Neuropilin-1 as a new potential SARS-CoV-2 infection mediator implicated in the neurologic features and central nervous system involvement of COVID-19.

Mol Med Rep. 2020;22(5):4221-4226. doi:10.3892/mmr.2020.11510

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33000221/>

Ludovico Cantuti-Castelvetri, et al

Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and provides a possible pathway into the central nervous system

bioRxiv 2020.06.07.137802; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.06.07.137802>

<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.06.07.137802v3>

Cantuti-Castelvetri L, et al

Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity.

Science. 2020 Nov 13;370(6518):856-860. doi: 10.1126/science.abd2985.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7857391/>

²⁵⁰ Hopkins C, Lechien JR, Saussez S.

More than ACE2? NRP1 may play a central role in the underlying pathophysiological mechanism of olfactory dysfunction in COVID-19 and its association with enhanced survival.

Med Hypotheses. 2021 Jan;146:110406. doi: 10.1016/j.mehy.2020.110406.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7678428/>

²⁵¹ Moutal A, Martin LF, Boinon L, et al.

SARS-CoV-2 spike protein co-opts VEGF-A/neuropilin-1 receptor signaling to induce analgesia.

Pain. 2021;162(1):243-252. doi:10.1097/j.pain.0000000000002097

Meccanismo della fusione virale

Dopo la scissione della proteina S, l'FP di SARS-CoV-2 viene esposto e innesca la fusione virale.²⁵² La distanza tra la membrana virale e la membrana della cellula ospite è ridotta e il dominio HR1 della proteina S è in prossimità della membrana della cellula ospite, mentre il dominio HR2 è più vicino al lato della membrana virale.

Quindi, HR2 si ripiega su HR1, i due domini HR formano una struttura a sei eliche in un formato antiparallelo del nucleo di fusione, la membrana virale viene tirata verso la membrana della cellula ospite e si lega strettamente ad essa finché le due membrane si fondono.²⁵³

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7737878/>

Jobe A, Vijayan R.

Neuropilins: C-end rule peptides and their association with nociception and COVID-19

[published online ahead of print, 2021 Mar 26]. *Comput Struct Biotechnol J*. 2021;10.1016/j.csbj.2021.03.025. doi:10.1016/j.csbj.2021.03.025

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7997051/>

Cantuti-Castelvetri L, Ojha R, Pedro LD, et al.

Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity.

Science. 2020;370(6518):856-860. doi:10.1126/science.abd2985

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7857391/>

Kyrou I, Randeve HS, Spandidos DA, Karteris E.

Not only ACE2-the quest for additional host cell mediators of SARS-CoV-2 infection: Neuropilin-1 (NRP1) as a novel SARS-CoV-2 host cell entry mediator implicated in COVID-19.

Signal Transduct Target Ther. 2021 Jan 18;6(1):21. doi: 10.1038/s41392-020-00460-9.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7812344/>

<https://www.asbmb.org/asbmb-today/science/110820/a-second-pathway-into-cells-for-sars-cov-2>

²⁵² Kawase M, Kataoka M, Shirato K, Matsuyama S.

Biochemical Analysis of Coronavirus Spike Glycoprotein Conformational Intermediates during Membrane Fusion.

J Virol. 2019;93(19):e00785-19. Published 2019 Sep 12. doi:10.1128/JVI.00785-19

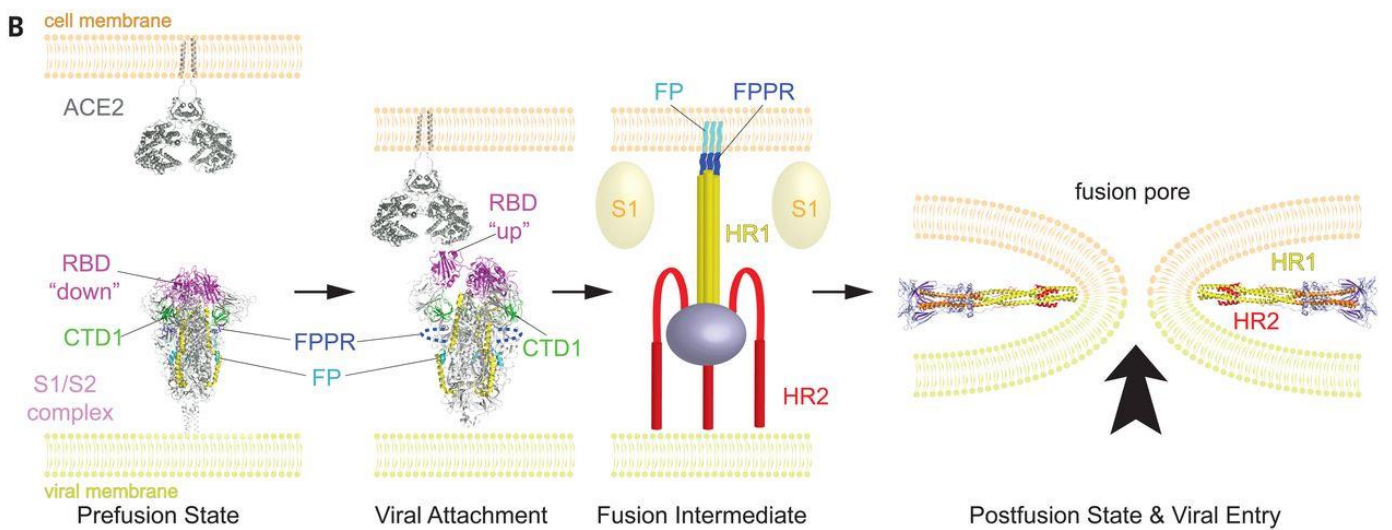
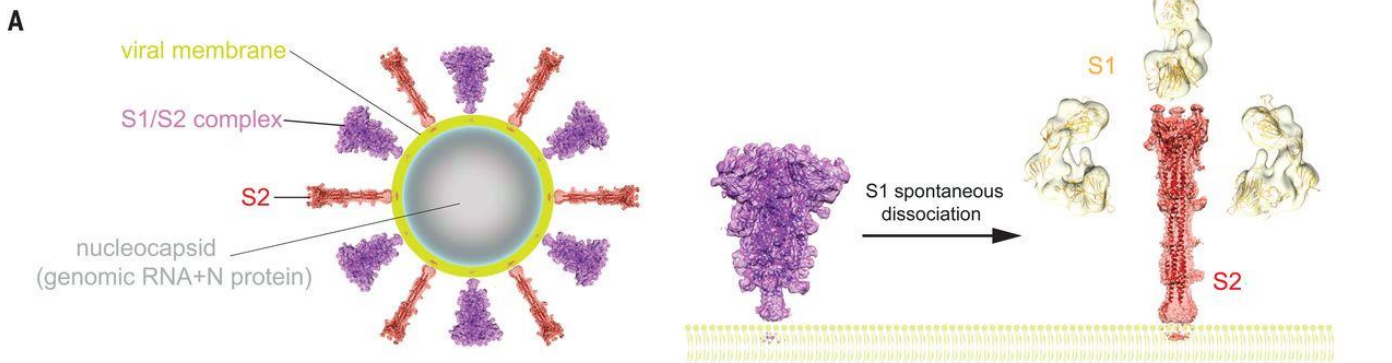
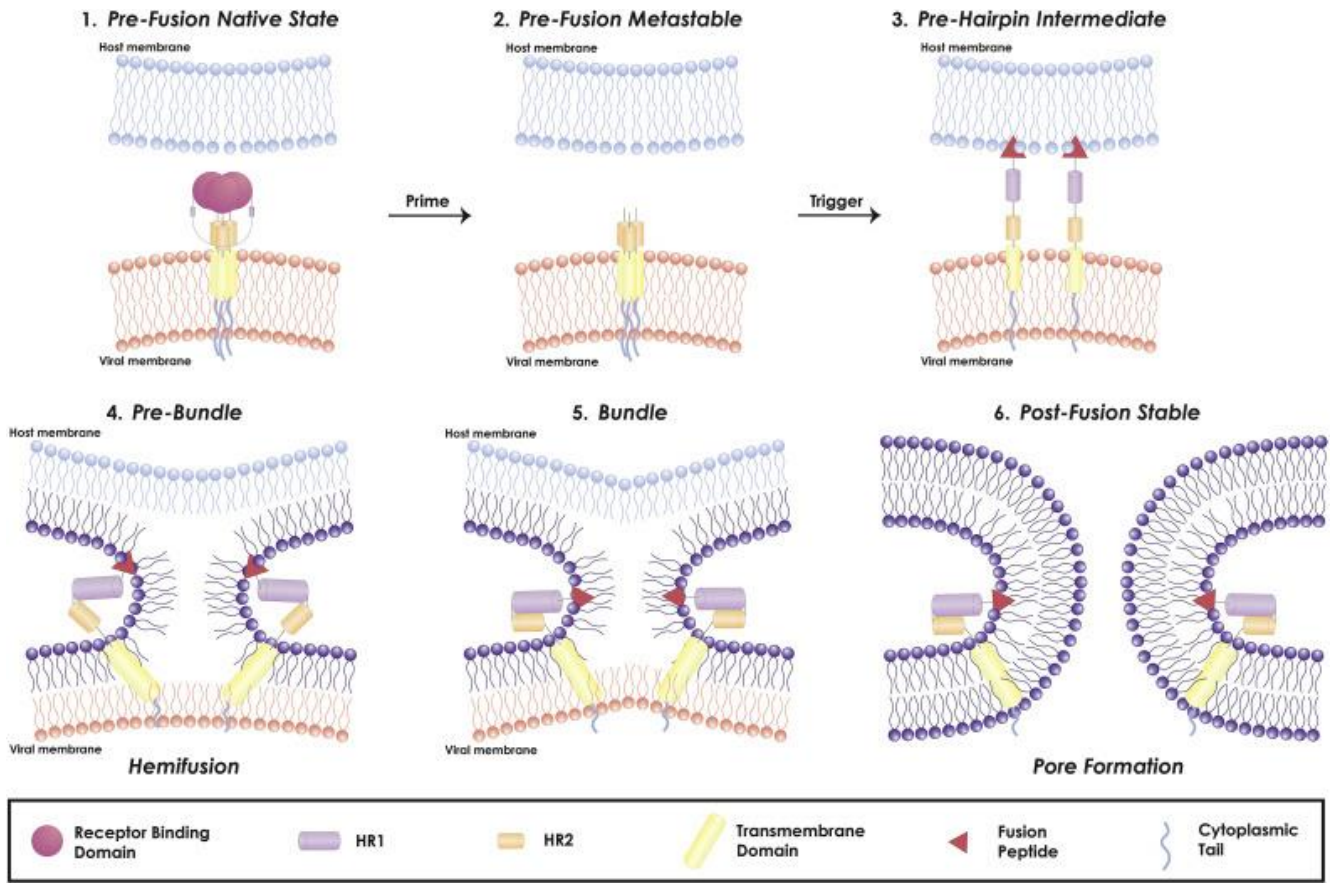
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6744234/>

²⁵³ Eckert DM, Kim PS.

Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition.

Annu Rev Biochem. 2001;70:777-810. doi: 10.1146/annurev.biochem.70.1.777.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11395423/>



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7464562/>

Un modello per riarrangiamenti strutturali della proteina SARS-Cov-2 S.

(A) Cambiamenti strutturali indipendenti da una cellula bersaglio. Sugeriamo che sia le spike di prefusione che di postfusione siano presenti sulla superficie del virione maturo e il rapporto tra di loro può variare (diagramma del virione). Le spike di postfusione sul virione sono formate da S2 dopo che S1 si dissocia in assenza di ACE2.

(B) Riarrangiamenti strutturali dipendenti da ACE2. La transizione strutturale dalla conformazione della prefusione alla conformazione postfusione che induce la fusione della membrana probabilmente procede per gradi come segue:

- 1) FPPR blocca l'RBD attraverso CTD1 nel trimero S della prefusione (questo studio), ma occasionalmente si ribalta dalla posizione e consente a un RBD di presentare la conformazione "su" (ID PDB: 6vyb).
- 2) Il legame di RBD con ACE2 (PDB ID: 6m17) crea un FPPR flessibile che consente l'esposizione del sito di scissione S2 immediatamente a monte del peptide di fusione adiacente (FP). La scissione nel sito S2, e forse anche nel sito S1 / S2, rilascia i vincoli strutturali sul peptide di fusione e avvia una cascata di eventi di ripiegamento in S2, probabilmente accompagnata dalla completa dissociazione di S1.
- 3) Formazione della bobina a spirale centrale a tre filamenti lunghi e ripiegamento dell'HR2.
- 4) Formazione della struttura di postfusione di S2 (questo studio) che unisce le due membrane, facilitando la formazione di un poro di fusione e l'ingresso virale.

Video

Viral Cell Entry of the SARS-CoV-2 virus Model of Membrane Fusion by SARS CoV-2 Spike Protein

Le conformazioni "aperta" e "chiusa" della Spike

La proteina S subisce diverse trasformazioni significative durante la maturazione e per la sua funzione, accompagnate da cambiamenti conformazionali. Questi cambiamenti in vari coronavirus sono stati oggetto di più di un decennio di ricerca ²⁵⁴.

Come già approfondito in precedenza, la proteina S del virus SARS-CoV-2 funziona come trimero e consiste di tre molecole identiche, che sono codificate dallo stesso gene. ²⁵⁵

La subunità S1 può essere in due conformazioni: *aperta* e *chiusa*, e di conseguenza il dominio RBD può essere in posizioni "su" o "giù".

È stato dimostrato che il dominio RBD della proteina S del virus SARS-CoV-2 è principalmente in posizione "giù" ²⁵⁶ e che la forma della proteina con conformazione chiusa è debolmente immunogenica ²⁵⁷.

²⁵⁴ Tripet B, Howard MW, Jobling M, Holmes RK, Holmes KV, Hodges RS. Structural characterization of the SARS-coronavirus spike S fusion protein core. J Biol Chem. 2004 May 14;279(20):20836-49. doi: 10.1074/jbc.M400759200. <https://jbc.org/retrieve/pii/S0021925820669368>

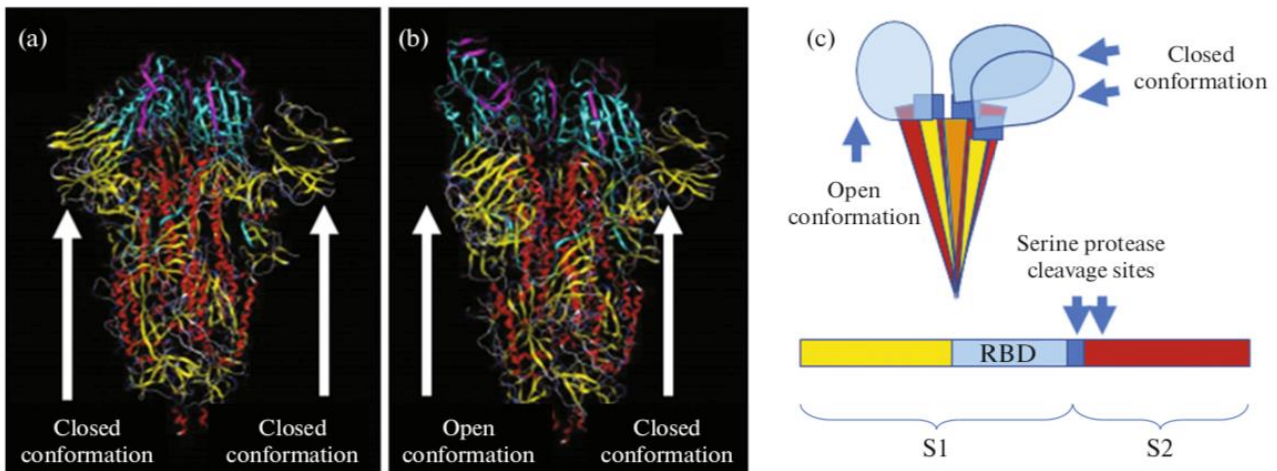
Walls AC, Tortorici MA, Snijder J, et al. Tectonic conformational changes of a coronavirus spike glycoprotein promote membrane fusion. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017;114(42):11157-11162. doi:10.1073/pnas.1708727114 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5651768/>

Li F, Berardi M, Li W, Farzan M, Dormitzer PR, Harrison SC. Conformational states of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein ectodomain. J Virol. 2006;80(14):6794-6800. doi:10.1128/JVI.02744-05 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1489032/>

²⁵⁵ Lan, J., Ge, J., Yu, J. et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. Nature 581, 215–220 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2180-5> <https://www.nature.com/articles/s41586-020-2180-5>

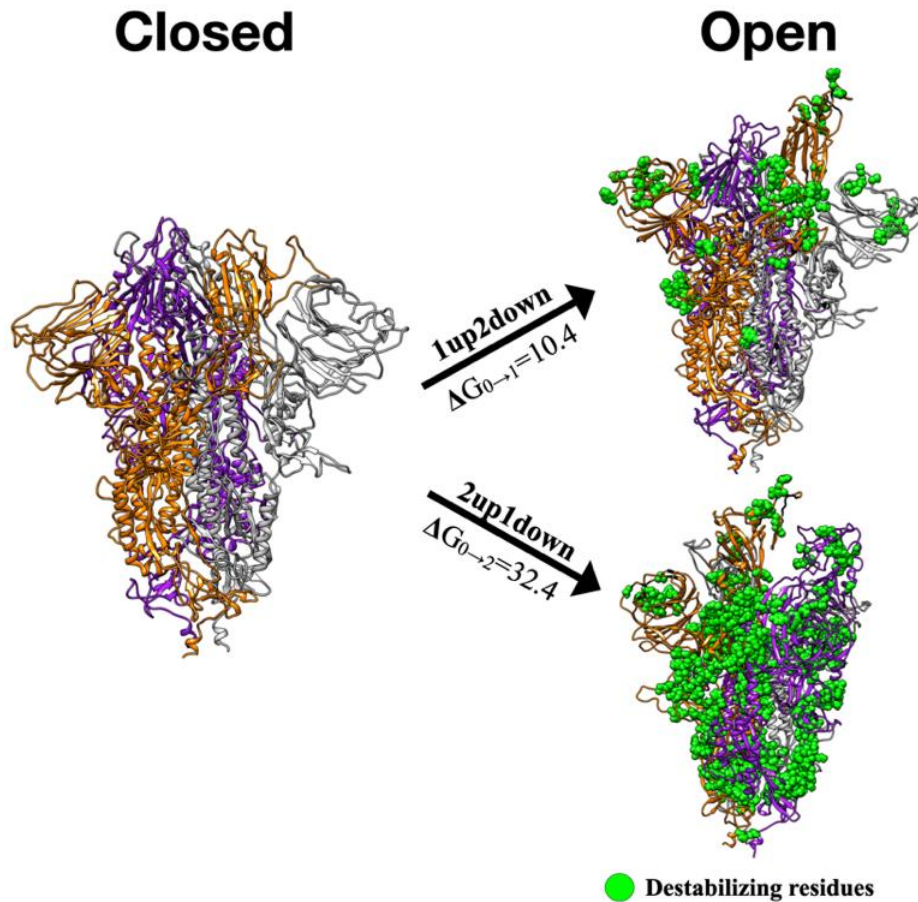
²⁵⁶ Shang J, Wan Y, Luo C, et al. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. Proc Natl Acad Sci U S A. 2020;117(21):11727-11734. doi:10.1073/pnas.2003138117 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7260975/>

²⁵⁷ Yong Jia, et al. Analysis of the mutation dynamics of SARS-CoV-2 reveals the spread history and emergence of RBD mutant with lower ACE2 binding affinity bioRxiv 2020.04.09.034942; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.09.034942> <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.04.09.034942v1.full.pdf>



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7473411/>

Conformazioni della proteina S nell'omotrimerico. (a) Tutte le subunità S sono in una conformazione chiusa. (b) Una subunità è in una conformazione aperta e una è in una conformazione chiusa. (c) Le conformazioni della proteina S nel trimerico e la struttura del dominio della proteina sono mostrate in maniera schematica. Il dominio di legame del recettore (RBD, blu), insieme al dominio N-terminale (giallo), fa parte della subunità S1. Nella subunità S1 (blu) c'è un sito di scissione proteolitica per la furina, e all'interno della subunità S2 (marrone) c'è un sito di scissione della proteasi TMPRSS2 ²⁵⁸



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7730245/>

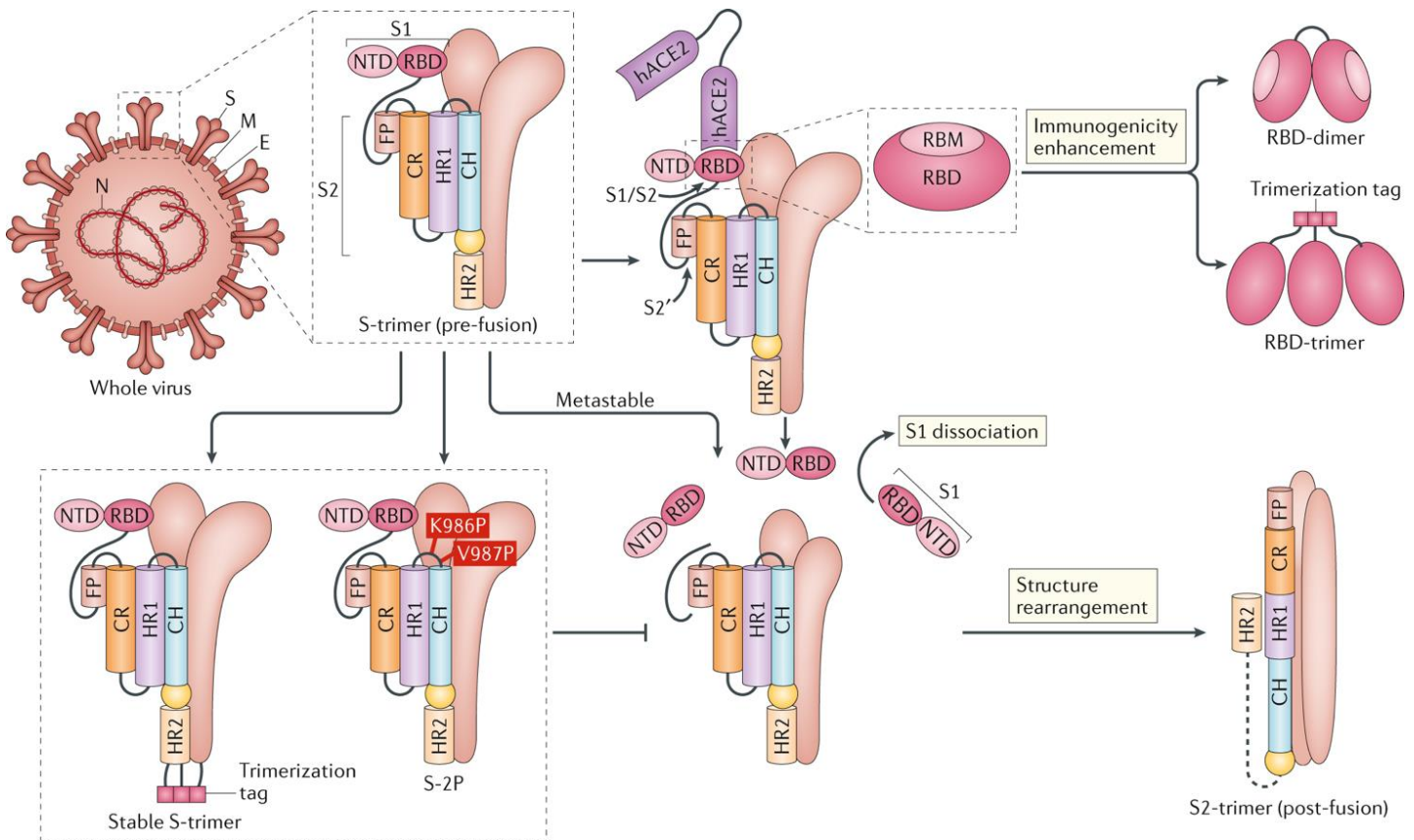
La transizione nella proteina S del SARS-Cov-2 si presenta al costo di una destabilizzazione di alcuni residui e un ΔG in energia

²⁵⁸ Hoffmann M, Kleine-Weber H, Pöhlmann S.

A Multibasic Cleavage Site in the Spike Protein of SARS-CoV-2 Is Essential for Infection of Human Lung Cells.

Mol Cell. 2020;78(4):779-784.e5. doi:10.1016/j.molcel.2020.04.022

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7194065/>



<https://www.nature.com/articles/s41577-020-00480-0/>

Il coronavirus della sindrome respiratoria acuta grave 2 (SARS-CoV-2) contiene quattro proteine di struttura principali: proteine spike (S), di membrana (M) e di involucro (E), che sono incorporate sulla superficie del virione e le proteine del nucleocapside (N), che lega l'RNA virale all'interno del virione. Viene mostrato il trimero della proteina S nella sua conformazione di pre-fusione. La proteina S comprende la subunità S1 (che include il dominio N-terminale (NTD) e il dominio di legame del recettore (RBD)) (anche il motivo di legame del recettore (RBM) all'interno del RBD è etichettato) e la subunità S2 (che include il peptide di fusione (FP), la regione di connessione (CR), la ripetizione heptad 1 (HR1), la ripetizione heptad (HR2) e l'elica centrale (CH)). La proteina SARS-CoV-2 S si lega al suo recettore ospite, l'enzima dimerico di conversione dell'angiotensina umana 2 (hACE2), tramite il RBD e dissocia le subunità S1.

La scissione in entrambi i siti S1 – S2 e S2 ' consente il riarrangiamento strutturale della subunità S2 necessaria per la fusione della membrana virus-ospite. Viene mostrato il trimero S2 nella sua disposizione post-fusione. L'RBD è un interessante bersaglio vaccinale. La generazione di un RBD-dimero o RBD-trimer ha dimostrato di aumentare l'immunogenicità dei vaccini a base di RBD. Un trimero S stabilizzato mostrato con un tag trimerico C-terminale è un bersaglio del vaccino. La proteina S pre-fusione è generalmente metastabile durante le preparazioni in vitro e tende a trasformarsi nella sua conformazione post-fusione. La mutazione di due residui (K986 e V987) in prolina stabilizza la proteina S (S-2P) e impedisce la modifica strutturale da pre-fusione a post-fusione.

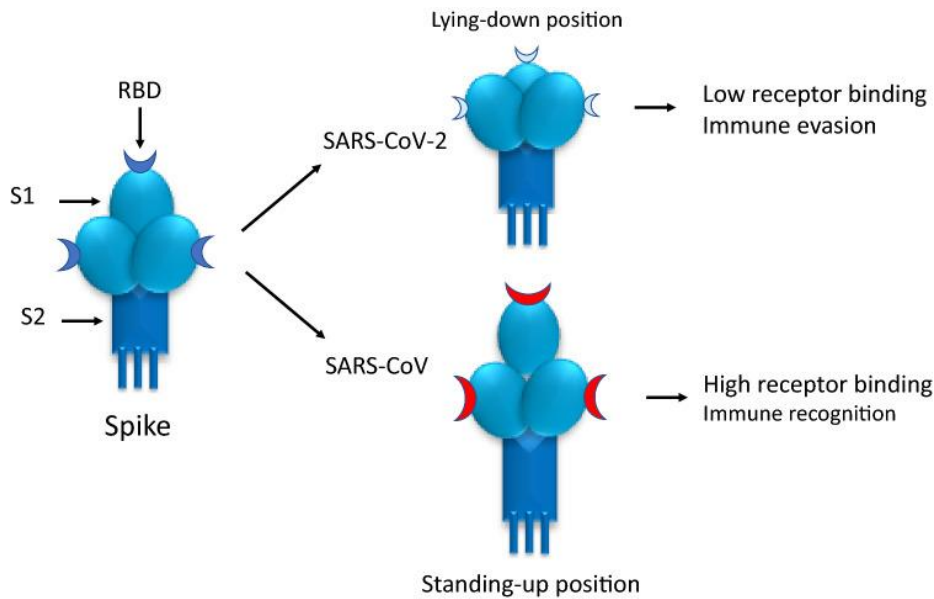
Dopo essersi avvicinato al recettore ACE2, il dominio RBD del SARS-CoV-2 si attiva e si lega al recettore. Questa interazione è caratterizzata da una costante di legame più alta rispetto al virus SARS-CoV-1, e si è visto che la conformazione aperta della proteina S è più caratteristica per il SARS-CoV-1 e quella chiusa per il SARS-CoV-2.²⁵⁹

²⁵⁹ Rossi GA, Sacco O, Mancino E, Cristiani L, Midulla F.

Differences and similarities between SARS-CoV and SARS-CoV-2: spike receptor-binding domain recognition and host cell infection with support of cellular serine proteases.

Infection. 2020 Oct;48(5):665-669. doi: 10.1007/s15010-020-01486-5.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7393809/>



Il dominio di legame al recettore (RBD) della proteina S può passare costantemente da una posizione "sdraiata" (giù o chiusa) a una "in piedi" (su o aperta). Nel SARS-CoV-2, l'RBD è principalmente nella posizione "sdraiata", uno stato associato non solo a un legame inefficace del recettore, ma anche all'evasione immunitaria. Nel SARS-CoV, l'RBD è per lo più in posizione "in piedi", uno stato associato non solo ad un elevato legame recettoriale efficace, ma anche al riconoscimento immunitario.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7393809/>

Pertanto, la subunità S1 della proteina S è in grado di riarrangiamenti conformazionali significativi e può esistere in almeno due stati conformazionali. Si noti che uno studio biofisico della proteina S del SARS-CoV-2 e un'analisi strutturale con una risoluzione di 3,5 Å hanno mostrato che più frequentemente due delle tre subunità S1 del trimero della proteina S sono nella conformazione chiusa e una è aperta.²⁶⁰

Se tutte e tre le catene del trimero sono equivalenti, sono possibili quattro diverse conformazioni per un trimero.

Epitopo ADE e vaccini a mRNA

Dopo la vaccinazione, una cellula può presentare la proteina S prodotta (o le sue subunità/frammenti peptidici) per mobilitare le risposte immunitarie o essere abolita dal sistema immunitario (ad esempio, dalle cellule T citotossiche).²⁶¹

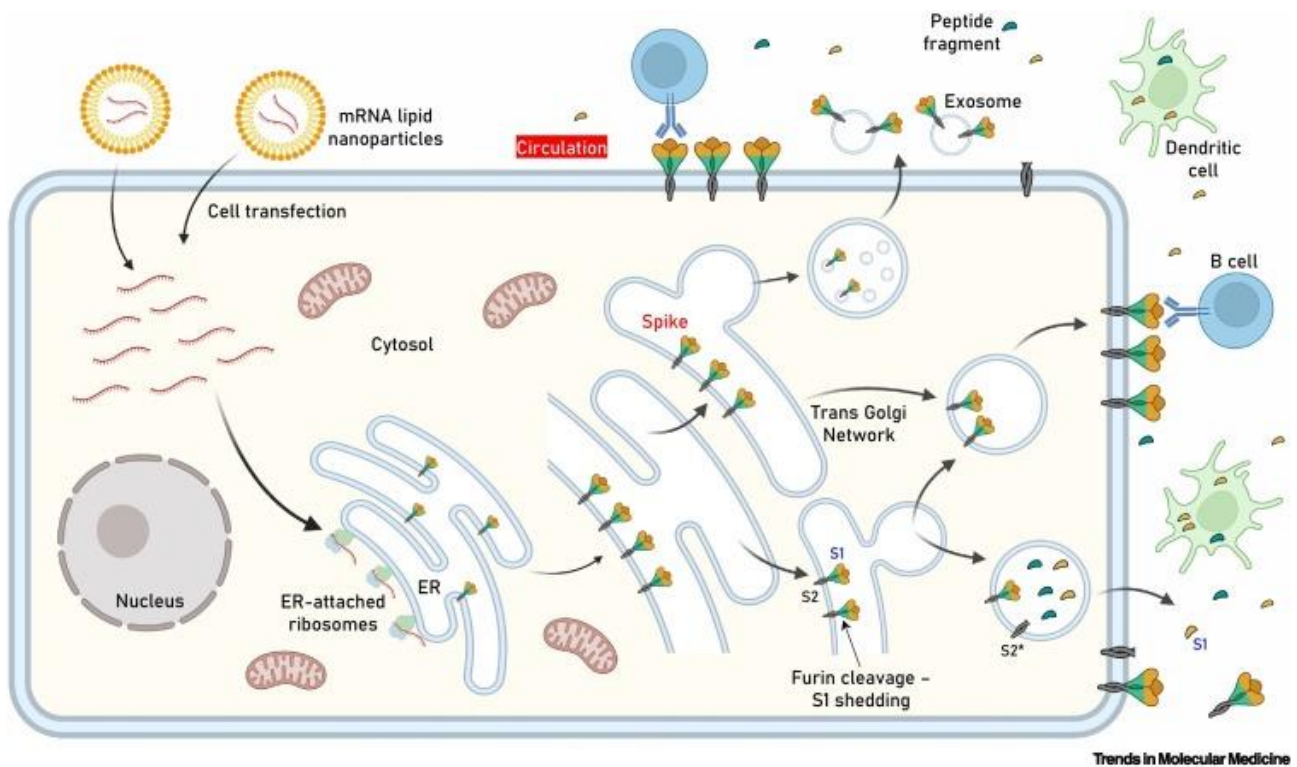
²⁶⁰ Kirchdoerfer RN, Wang N, Pallesen J, et al. Stabilized coronavirus spikes are resistant to conformational changes induced by receptor recognition or proteolysis published correction in Sci Rep. 2018 Dec 10;8(1):17823. Sci Rep. 2018;8(1):15701. Published 2018 Oct 24. doi:10.1038/s41598-018-34171-7 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6200764/>

Peters MH, Bastidas O, Kokron DS, Henze CE. Static all-atom energetic mappings of the SARS-Cov-2 spike protein and dynamic stability analysis of "Up" versus "Down" protomer states. PLoS One. 2020 Nov 10;15(11):e0241168. doi: 10.1371/journal.pone.0241168. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7654774/>

²⁶¹ Trougakos IP, Terpos E, Alexopoulos H, Politou M, Paraskevis D, Scorilas A, Kastiris E, Andreakos E, Dimopoulos MA. Adverse effects of COVID-19 mRNA vaccines: the spike hypothesis. Trends Mol Med. 2022 Jul;28(7):542-554. doi: 10.1016/j.molmed.2022.04.007. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9021367/>

Chaudhary N, Weissman D, Whitehead KA. mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation. Nat Rev Drug Discov. 2021 Nov;20(11):817-838. doi: 10.1038/s41573-021-00283-5. Epub 2021 Aug 25. Erratum in: Nat Rev Drug Discov. 2021 Sep 21 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8386155/>

Di conseguenza, i detriti prodotti, o anche la secrezione diretta (compreso lo “shedding”, dispersione) dell'antigene da parte delle cellule trasfettate, possono rilasciare nella circolazione grandi quantità della proteina S o delle sue subunità/frammenti peptidici,²⁶² come avviene anche durante l'infezione.²⁶³



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9021367/>

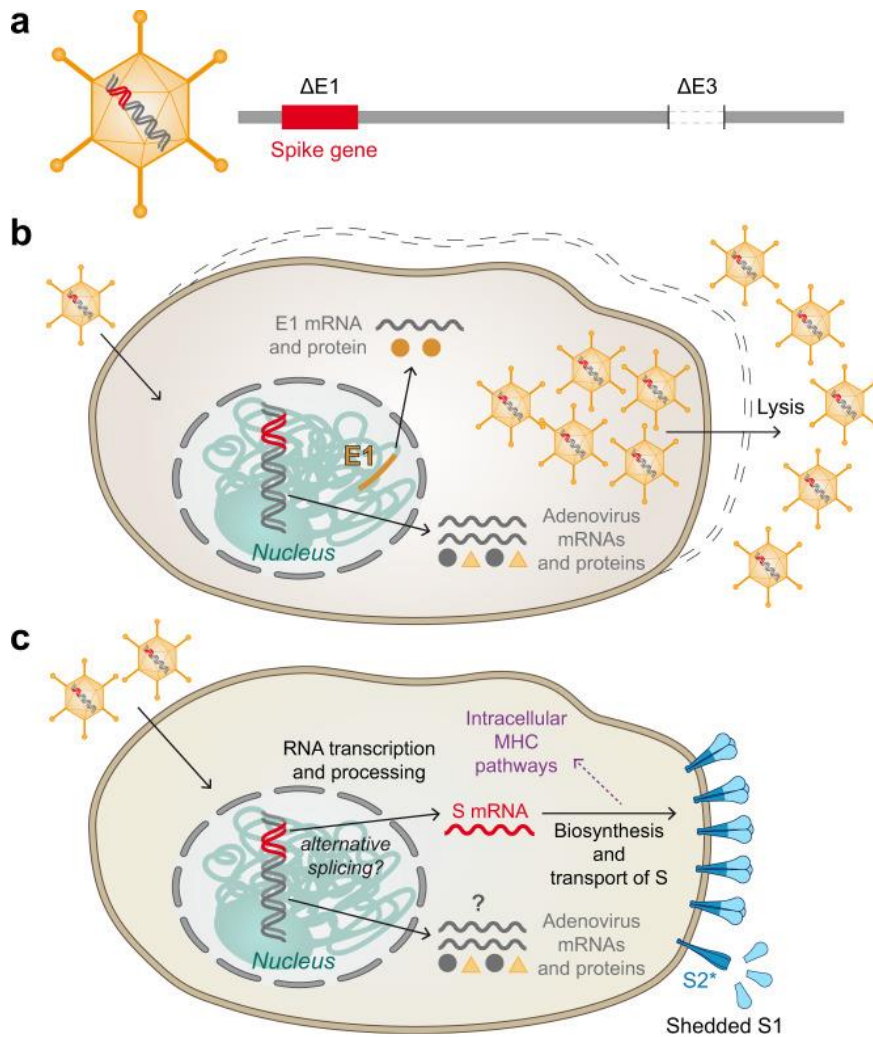
Figura chiave. Espressione dell'antigene-localizzazione dopo la trasfezione cellulare con nanoparticelle lipidiche (LNP) contenenti mRNA della proteina spike (S) utilizzate nei vaccini mRNA del SARS-CoV-2.

Dopo l'internalizzazione dell'LNP e il rilascio di mRNA, il peptide-segnale virale autentico (come nei vaccini Pfizer-BioNTech e Moderna) guida la produzione di antigene nel lume del reticolo endoplasmatico (ER) dove adotta la sua naturale localizzazione transmembrana tramite l'ancoraggio della subunità 2 (S2). Dopo l'ordinamento nella rete trans Golgi (TGN), la proteina S acquisisce la sua posizione finale nella membrana cellulare umana trasfettata, dove S1 è esposto allo spazio extracellulare (cioè può affrontare la circolazione). Sebbene l'entità dell'espressione dell'antigene per cellula rimanga sconosciuta, è ragionevole presumere che questo processo si traduca in una decorazione piuttosto estesa delle cellule trasfettate con la proteina S. La scissione proteolitica mediata dalla furina (come nelle cellule infettate da SARS-CoV-2) in assenza di un sito di scissione della furina S1/S2 mutato al TGN può provocare la dispersione dell'S1 scissa e la conversione di S2 nella sua struttura di postfusione (S2*). Lo smistamento e il traffico di antigeni possono anche indurre il rilascio di esosomi contenenti proteine S. Gli eventi mostrati si verificheranno nelle superfici apicali e/o basolaterali delle cellule polarizzate (ad esempio epiteliali). I costrutti Pfizer-BioNTech e Moderna non contengono un sito di scissione della furina S1/S2 mutato. Ulteriori ricerche chiariranno l'impatto delle subunità S1/S2 che stabilizzano la mutazione D614G (o altro) o di un sito di scissione della furina mutato nella distribuzione dell'antigene, l'immunogenicità del vaccino e gli eventi avversi indotti (AE). Vengono anche mostrate le cellule dendritiche (cellule presentanti l'antigene professionale, APC) che inghiottiscono gli antigeni circolanti e il legame mediato da anticorpi dei linfociti B agli antigeni ancorati alle cellule.

²⁶² Jackson CB, Farzan M, Chen B, Choe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. Nat Rev Mol Cell Biol. 2022 Jan;23(1):3-20. doi: 10.1038/s41580-021-00418-x. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8491763/>

Heinz FX, Stiasny K. Distinguishing features of current COVID-19 vaccines: knowns and unknowns of antigen presentation and modes of action. NPJ Vaccines. 2021 Aug 16;6(1):104. doi: 10.1038/s41541-021-00369-6. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8368295/>

²⁶³ Letarov AV, Babenko VV, Kulikov EE. Free SARS-CoV-2 Spike Protein S1 Particles May Play a Role in the Pathogenesis of COVID-19 Infection. Biochemistry (Mosc). 2021 Mar;86(3):257-261. doi: 10.1134/S0006297921030032. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7772528/>



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8368295/>
Principio dei vaccini vettoriali per adenovirus.

a) schema della particella vettore adenovirale non competente per la replicazione e del suo DNA. E1 ed E3: rispettivamente i primi geni 1 e 3 dell'adenovirus. **b)** Formazione di particelle di vaccino nella linea cellulare di produzione complementare E1 dal gene E1 cromosomicamente integrato. Rilascio di particelle vettoriali di nuova produzione attraverso la lisi cellulare. **c)** Espressione di spike nelle cellule degli individui vaccinati. In assenza di mutazioni stabilizzanti possono verificarsi più o meno spargimento di S1 e conversione di S2 nella sua struttura post-fusione (S2*).

In particolare, gli LNP (liposomi) contenenti mRNA dei vaccini anti-SARS-CoV-2 (Pfizer e Moderna) vengono iniettati nel muscolo deltoide ed esercitano un effetto sul tessuto muscolare stesso, sul sistema linfatico e sulla milza, ma possono anche localizzarsi nel fegato e in altri tessuti ²⁶⁴ da dove la proteina S o le sue subunità/frammenti peptidici possono entrare nella circolazione e distribuirsi in tutto il corpo.

²⁶⁴ https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/comirnaty-epar-public-assessment-report_en.pdf

https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/spikevax-previously-covid-19-vaccine-moderna-epar-public-assessment-report_en.pdf

Yang R, et al
A core-shell structured COVID-19 mRNA vaccine with favorable biodistribution pattern and promising immunity.
Signal Transduct Target Ther. 2021 May 31;6(1):213. doi: 10.1038/s41392-021-00634-z.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8165147/>

Pardi N, Tuyishime S, Muramatsu H, Kariko K, Mui BL, Tam YK, Madden TD, Hope MJ, Weissman D.
Expression kinetics of nucleoside-modified mRNA delivered in lipid nanoparticles to mice by various routes.
J Control Release. 2015 Nov 10;217:345-51. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.08.007.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4624045/>

Vale la pena ricordare che la localizzazione epatica degli LNP non è una proprietà generale, poiché modifiche specifiche nella loro chimica possono mantenere l'immunogenicità con un coinvolgimento minimo del fegato²⁶⁵. In linea con una plausibile distribuzione sistemica dell'antigene, è stato riscontrato che la proteina S circola nel plasma dei soggetti vaccinati con BNT162b2 o mRNA-1273 già il giorno 1 dopo la prima iniezione di vaccino.²⁶⁶

Secondo quanto riscontrato, la clearance dell'antigene è correlata alla produzione di immunoglobuline antigene-specifiche o può rimanere in circolo (ad es. negli esosomi) per periodi più lunghi²⁶⁷.

Pertanto, è probabile che vi sia un'ampia gamma di interazioni attese tra la proteina S/subunità/frammenti peptidici fluttuanti e l'ACE2 circolante nel sangue (o linfa) o l'ACE2 espresso dalle cellule di vari tessuti/organi²⁶⁸.

Questo effetto supporta il meccanismo del danno con i vaccini a vettore adenovirale, in quanto la proteina S prodotta ha una funzionalità simile alla spike nativa del virus (compresa la possibilità di rilasciare in circolo le subunità S1) e presenta una struttura stabilizzata di prefusione che favorisce il legame con i suoi recettori.²⁶⁹

Vervaeke P, Borgos SE, Sanders NN, Combes F.
Regulatory guidelines and preclinical tools to study the biodistribution of RNA therapeutics.
Adv Drug Deliv Rev. 2022 May;184:114236. doi: 10.1016/j.addr.2022.114236.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8957368/>

²⁶⁵ Hassett KJ, et al
Optimization of Lipid Nanoparticles for Intramuscular Administration of mRNA Vaccines.
Mol Ther Nucleic Acids. 2019 Apr 15;15:1-11. doi: 10.1016/j.omtn.2019.01.013.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6383180/>

²⁶⁶ Fertig TE, Chitoiu L, Marta DS, Ionescu VS, Cismasiu VB, Radu E, Angheluta G, Dobre M, Serbanescu A, Hinescu ME, Gherghiceanu M.
Vaccine mRNA Can Be Detected in Blood at 15 Days Post-Vaccination.
Biomedicine. 2022 Jun 28;10(7):1538. doi: 10.3390/biomedicine10071538.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9313234/>

Ogata AF, Cheng CA, Desjardins M, Senussi Y, Sherman AC, Powell M, Novack L, Von S, Li X, Baden LR, Walt DR.
Circulating Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Vaccine Antigen Detected in the Plasma of mRNA-1273 Vaccine Recipients.
Clin Infect Dis. 2022 Mar 1;74(4):715-718. doi: 10.1093/cid/ciab465.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8241425/>

Naasani I.
Establishing the Pharmacokinetics of Genetic Vaccines is Essential for Maximising their Safety and Efficacy.
Clin Pharmacokinet. 2022 Jul;61(7):921-927. doi: 10.1007/s40262-022-01149-8.
<https://link.springer.com/article/10.1007/s40262-022-01149-8>

Palmer, Michael and Sucharit Bhakdi. "The Pfizer mRNA vaccine: pharmacokinetics and toxicity." (2021).
<https://doctors4covidethics.org/wp-content/uploads/2021/07/Pfizer-pharmacokinetics-and-toxicity.pdf>

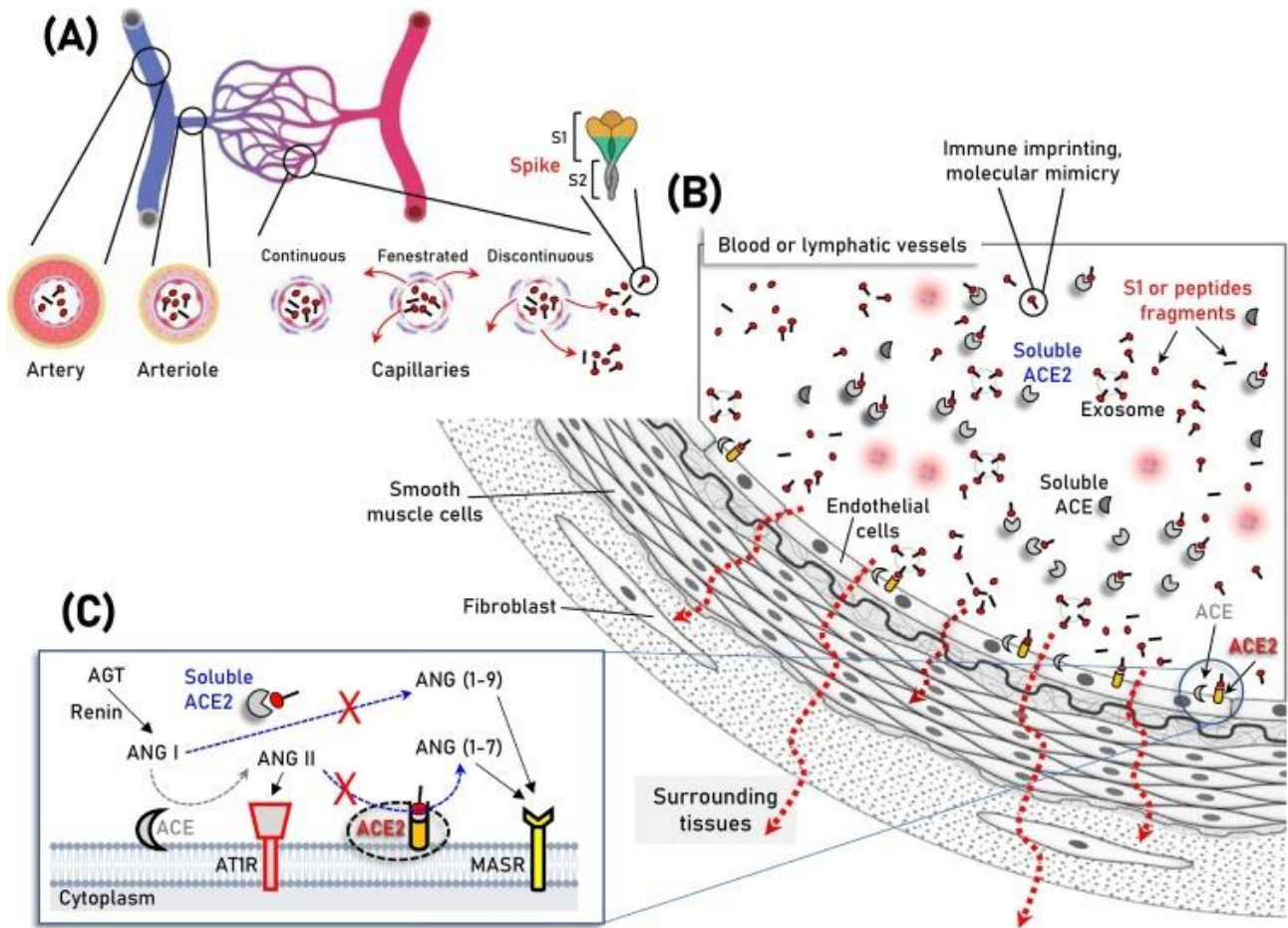
²⁶⁷ Bansal S, Perincheri S, Fleming T, Poulson C, Tiffany B, Bremner RM, Mohanakumar T.
Cutting Edge: Circulating Exosomes with COVID Spike Protein Are Induced by BNT162b2 (Pfizer-BioNTech) Vaccination prior to Development of Antibodies: A Novel Mechanism for Immune Activation by mRNA Vaccines.
J Immunol. 2021 Nov 15;207(10):2405-2410. doi: 10.4049/jimmunol.2100637.
<https://www.jimmunol.org/content/207/10/2405.long>

Cognetti JS, Miller BL.
Monitoring Serum Spike Protein with Disposable Photonic Biosensors Following SARS-CoV-2 Vaccination.
Sensors (Basel). 2021 Aug 31;21(17):5857. doi: 10.3390/s21175857.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8434114/>

²⁶⁸ Gkogkou E, Barnasas G, Vougas K, Trougakos IP.
Expression profiling meta-analysis of ACE2 and TMPRSS2, the putative anti-inflammatory receptor and priming protease of SARS-CoV-2 in human cells, and identification of putative modulators.
Redox Biol. 2020 Sep;36:101615. doi: 10.1016/j.redox.2020.101615.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7311357/>

Ziegler CGK, et al HCA Lung Biological Network. Electronic address: lung-network@humancellatlas.org; HCA Lung Biological Network.
SARS-CoV-2 Receptor ACE2 Is an Interferon-Stimulated Gene in Human Airway Epithelial Cells and Is Detected in Specific Cell Subsets across Tissues.
Cell. 2020 May 28;181(5):1016-1035.e19. doi: 10.1016/j.cell.2020.04.035.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7252096/>

²⁶⁹ Watanabe Y, et al



Schema dei componenti vascolari che mostrano i frammenti di proteina S/subunità/peptidi prodotti dalla vaccinazione nella circolazione, nonché l'enzima di conversione dell'angiotensina 2 (ACE2) legato alla membrana delle cellule solubili o endoteliali.

(A,B) Parallelamente all'attivazione del sistema immunitario, il legame della proteina S/subunità/ frammenti peptidici (B) circolanti all'ACE2 può verificarsi non solo nelle cellule endoteliali che esprimono ACE2, ma anche in più tipi di cellule del sistema vascolare e dei tessuti circostanti a causa della diffusione dell'antigene (ad es. in letti capillari fenestrati o discontinui) (A, frecce rosse). Queste serie di eventi molecolari sono improbabili per qualsiasi antigene correlato al SARS-CoV-2 in assenza di malattia da coronavirus grave 2019 (COVID-19), in cui il SARS-CoV-2 è contenuto nell'apparato respiratorio sistema. In (C) le due vie di contrasto del sistema renina-angiotensina (RAS), ovvero il braccio 'convenzionale', che coinvolge l'ACE che genera angiotensina II (ANG II) dall'angiotensina I (ANG I), e il braccio ACE2 che idrolizza Sono raffigurati ANG II per generare angiotensina (1-7) [ANG (1-7)] o ANG I per generare angiotensina (1-9) [ANG (1-9)]. Il legame ANG II e l'attivazione del recettore ANG II di tipo 1 (AT1R) promuove l'infiammazione, il rimodellamento fibrotico e la vasocostrizione, mentre i peptidi ANG (1-7) e ANG (1-9) che si legano al recettore MAS (MASR) attivano l'antifibrotico, vie antinfiammatorie e vasodilatazione. Vengono mostrati anche moduli aggiuntivi del RAS (cioè renina e angiotensinogeno, AGT). Abbreviazione: AT1R, recettore dell'angiotensina II tipo 1.

Nei vaccini a mRNA (Vaccini "Pfizer" e "Moderna") la mutazione dei residui della proteina S 986 e 987 in prolina, produce un antigene S stabilizzato nella conformazione di prefusione (P2 S)²⁷⁰.

Native-like SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein Expressed by ChAdOx1 nCoV-19/AZD1222 Vaccine. ACS Cent Sci. 2021 Apr 28;7(4):594-602. doi: 10.1021/acscentsci.1c00080. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8043200/>

²⁷⁰ Annette B. Vogel, et al
A prefusion SARS-CoV-2 spike RNA vaccine is highly immunogenic and prevents lung infection in non-human primates bioRxiv 2020.09.08.280818; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.09.08.280818> <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.09.08.280818v1.full.pdf>

Kirchdoerfer RN, Wang N, Pallesen J, Wrapp D, Turner HL, Cottrell CA, Corbett KS, Graham BS, McLellan JS, Ward AB. Stabilized coronavirus spikes are resistant to conformational changes induced by receptor recognition or proteolysis. Sci Rep. 2018 Oct 24;8(1):15701. doi: 10.1038/s41598-018-34171-7. Erratum in: Sci Rep. 2018 Dec 10;8(1):17823. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6200764/>

Pallesen J, et al
Immunogenicity and structures of a rationally designed prefusion MERS-CoV spike antigen.

In particolare, dopo l'espressione della sequenza codificante BNT162b2 nelle cellule, una parte delle molecole presentava un RBD nello stato "su" (accessibile per il legame del recettore), e due RBD "in giù" (conformazione chiusa) che rappresentava il 20,4% delle molecole trimeriche.

Il resto era nella conformazione tutto "giù" dell'RBD. L'RBD nella conformazione "su" era meno definito rispetto ad altre parti della struttura, suggerendo una flessibilità conformazionale e un equilibrio dinamico tra gli stati RBD "su" e RBD "giù" come proposto anche in altri studi ²⁷¹.

Le analisi di legame e strutturali hanno indicato che la sequenza dell'RNA BNT162b2 codifica per una proteina S P2 ricombinante che presenta il sito di legame ACE2 e altri epitopi in grado di legarsi agli anticorpi neutralizzanti del SARS-CoV-2.

La rigidità di questa conformazione (in gran parte chiusa e quindi favorente la formazione di anticorpi a bassa affinità per l'RBD) e la specificità della sequenza dell'antigene vaccinale (ottenuta per sintesi chimica dalla sequenza univoca di Wuhan-1) comportano la formazione di anticorpi mirati contro questo antigene i quali, in presenza di una quasispecie circolante, indurranno una selezione di mutanti che si legheranno debolmente agli anticorpi vaccinali, con conseguente maggior rischio di ADE.

Va inoltre considerato che, come già discusso nella monografia dedicata ai *vaccini a mRNA*, la trascrizione *in vitro* utilizzata per la produzione del costrutto vaccinale e la traduzione *in vivo* introducono mutazioni imprevedibili sia nell'mRNA che nella proteina finale, con la generazione di spike con sequenze aminoacidiche e conformazioni spaziali diverse da quella progettate.

Ciò potrebbe comportare una pressione selettiva con la formazione di varianti vaccinoresistenti e con un maggior potenziale d'induzione dell'ADE.

In uno studio pubblicato nel 2016 da Whang et al ²⁷² sugli epitopi della spike del SARS-Cov-1 in grado indurre la formazione di anticorpi potenzianti la malattia, hanno dimostrato sperimentalmente l'induzione dell'immunopatologia da ADE da vaccino inattivato sia *in vitro* che in un modello *in vivo* di primati non umani. Inoltre, hanno riscontrato l'associazione tra la formazione di anticorpi potenzianti la malattia e un epitopo, (epitopo-ADE) il peptide S₅₉₇₋₆₀₃ (597-LYQDVNC-603), il quale era in grado d'indurre anticorpi ADE sia *in vitro* che *in vivo* utilizzando un meccanismo dipendente dalla sequenza degli epitopi (ESD), con un alto livello di reattività sierologica (64%).

E' rilevante per la sicurezza dei vaccini notare che l'epitopo 611-617 che si trova nella regione a bastoncino della proteina spike del SARS-Cov-2 (riconosciuta dall'anticorpo 43-3-14), corrispondente al peptide 597-LYQDVNC-603 di SARS-Cov-1, e un epitopo ADE nell'NTD di SARS-Cov-2 (riconosciuto dall'anticorpo 1052), ²⁷³

Proc Natl Acad Sci U S A. 2017 Aug 29;114(35):E7348-E7357. doi: 10.1073/pnas.1707304114. Epub 2017 Aug 14.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5584442/>

Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh CL, Abiona O, Graham BS, McLellan JS.
Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation.
Science. 2020 Mar 13;367(6483):1260-1263. doi: 10.1126/science.abb2507. Epub 2020 Feb 19
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7164637/>

²⁷¹ Cai Y, Zhang J, Xiao T, et al.
Distinct conformational states of SARS-CoV-2 spike protein.
Science. 2020;369(6511):1586-1592. doi:10.1126/science.abd4251
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7464562/>

Henderson R, et al
Controlling the SARS-CoV-2 spike glycoprotein conformation.
Nat Struct Mol Biol. 2020 Oct;27(10):925-933. doi: 10.1038/s41594-020-0479-4. Epub 2020 Jul 22.
<https://www.nature.com/articles/s41594-020-0479-4>

²⁷² Wang Q, Zhang L, Kuwahara K, Li L, Liu Z, Li T, Zhu H, Liu J, Xu Y, Xie J, Morioka H, Sakaguchi N, Qin C, Liu G.
Immunodominant SARS Coronavirus Epitopes in Humans Elicited both Enhancing and Neutralizing Effects on Infection in Non-human Primates.
ACS Infect Dis. 2016 May 13;2(5):361-76. doi: 10.1021/acscinfecdis.6b00006. Epub 2016 Apr 11. Erratum in: ACS Infect Dis. 2020 May 8;6(5):1284-1285.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7075522/>

²⁷³ Li D, et al
In vitro and in vivo functions of SARS-CoV-2 infection-enhancing and neutralizing antibodies.
Cell. 2021 Aug 5;184(16):4203-4219.e32. doi: 10.1016/j.cell.2021.06.021.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8232969/>

sono entrambi presenti sulla proteina spike generata dai vaccini mRNA, poiché le formulazioni si basano ancora sul ceppo di Wuhan originale.²⁷⁴

SPIKE E FORMAZIONE DI SINCIZI

Yuri Lazebnik nel suo articolo *“Cell fusion as a link between the SARS-CoV-2 spike protein, COVID-19 complications, and vaccine side effects”*²⁷⁵ approfondisce la caratteristica formazione di sincizi nelle forme severe da COVID e le implicazioni sui vaccinati.

I sincizi sono il prodotto di fusione tra due o più cellule e sono stati riscontrati nei pazienti COVID con danno polmonare grave ed esteso come pneumociti sinciziali multinucleati infettati.²⁷⁶

²⁷⁴ Xia X.

Guérin P, Yahi N, Azzaz F, Chahinian H, Sabatier JM, Fantini J.

Structural Dynamics of the SARS-CoV-2 Spike Protein: A 2-Year Retrospective Analysis of SARS-CoV-2 Variants (from Alpha to Omicron) Reveals an Early Divergence between Conserved and Variable Epitopes.

Molecules. 2022 Jun 15;27(12):3851. doi: 10.3390/molecules27123851.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9230616/>

Detailed Dissection and Critical Evaluation of the Pfizer/BioNTech and Moderna mRNA Vaccines.

Vaccines (Basel). 2021 Jul 3;9(7):734. doi: 10.3390/vaccines9070734.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8310186/>

²⁷⁵ Lazebnik Y.

Cell fusion as a link between the SARS-CoV-2 spike protein, COVID-19 complications, and vaccine side effects.

Oncotarget. 2021 Dec 7;12(25):2476-2488. doi: 10.18632/oncotarget.28088.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8664391/>

²⁷⁶ Buchrieser J, et al

Syncytia formation by SARS-CoV-2-infected cells.

EMBO J. 2020 Dec 1;39(23):e106267. doi: 10.15252/embj.2020106267. Epub 2020 Nov 4. Erratum in: EMBO J. 2021 Feb 1;40(3):e107405. PMID: 33051876;

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7646020/>

Bussani R, Schneider E, Zentilin L, Collesi C, Ali H, Braga L, Volpe MC, Colliva A, Zanconati F, Berlot G, Silvestri F, Zacchigna S, Giacca M.

Persistence of viral RNA, pneumocyte syncytia and thrombosis are hallmarks of advanced COVID-19 pathology.

EBioMedicine. 2020 Nov;61:103104. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.103104.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7677597/>

Rajah MM, et al

SARS-CoV-2 Alpha, Beta, and Delta variants display enhanced Spike-mediated syncytia formation.

EMBO J. 2021 Dec 15;40(24):e108944. doi: 10.15252/embj.2021108944.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8646911/>

Wang H, Guo S, Yang H.

Rapid quantitative monitoring of SARS-CoV-2 spike protein-mediated syncytia formation using split NanoLuc.

J Med Virol. 2022 Aug 8. doi: 10.1002/jmv.28053.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35940856/>

Lin L, Li Q, Wang Y, Shi Y.

Syncytia formation during SARS-CoV-2 lung infection: a disastrous unity to eliminate lymphocytes.

Cell Death Differ. 2021 Jun;28(6):2019-2021. doi: 10.1038/s41418-021-00795-y.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8114657/>

Ren H, Ma C, Peng H, Zhang B, Zhou L, Su Y, Gao X, Huang H.

Micronucleus production, activation of DNA damage response and cGAS-STING signaling in syncytia induced by SARS-CoV-2 infection.

Biol Direct. 2021 Oct 21;16(1):20. doi: 10.1186/s13062-021-00305-7.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8530504/>

Asarnow D, et al

Structural insight into SARS-CoV-2 neutralizing antibodies and modulation of syncytia.

Cell. 2021 Jun 10;184(12):3192-3204.e16. doi: 10.1016/j.cell.2021.04.033.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8064868/>

Video Fusione cellulare

Nanolive imaging suggests that cell-cell fusion could play a key role in the SARS-CoV-2 infection process

<https://vimeo.com/528310356>

Definizioni

Fusione cellulare Processo di fusione di due o più cellule in una unendo le loro membrane plasmatiche.

Fusogeno Un agente, spesso una proteina come la spike del SARS-CoV-2, in grado di fondere le membrane cellulari. I fusogeni virali fondono l'involucro virale con la membrana plasmatica della cellula bersaglio e possono fondere tra loro le membrane plasmatiche delle cellule adiacenti.

Syncytium o sincizio (plural syncytia) Una cellula multinucleata prodotta dalla fusione di due o più cellule. Il termine deriva dal greco syn "insieme" e kytos "scatola, o cellula".

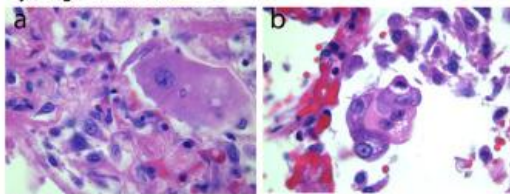
Heterokaryon Un sincizio prodotto da più di un tipo di cellula, ad esempio un pneumocita fuso con un progenitore epiteliale o un leucocita.

Homokaryon Un sincizio prodotto da cellule dello stesso tipo, come sarebbe il caso della fusione di due o più pneumociti.

Ibrido cellulare Progenie mononucleare di sincizi, prodotta una volta che un sincizio subisce la mitosi. Ad esempio, gli ibridomi sono realizzati fondendo i leucociti con le cellule del plasmacitoma per ottenere ibridi che producono anticorpi monoclonali.

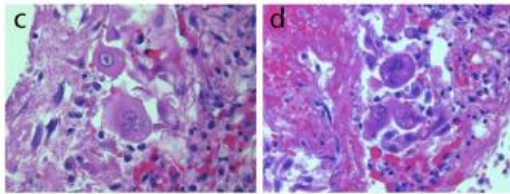
PS (fosfatidilserina) Il lipide di membrana anionico (a carica negativa) più abbondante. Nelle cellule vive, la PS viene attivamente spostata sul lato citoplasmatico della membrana plasmatica.

A Cytological abnormalities



Patient: 207.20
Staining: H&E

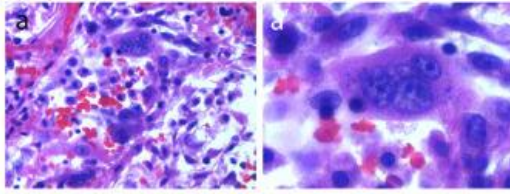
Patient: 291.20
Staining: H&E



Patient: 291.20
Staining: H&E

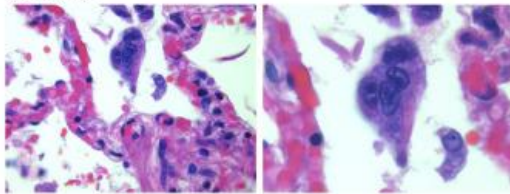
Patient: 291.20
Staining: H&E

C Syncytia



Patient: 207.20
Staining: H&E

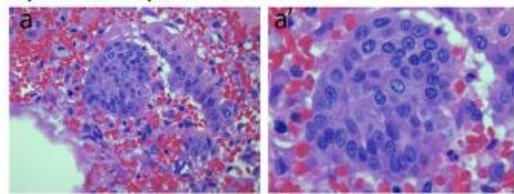
Patient: 210.20
Staining: H&E



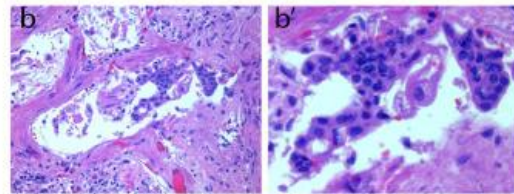
Patient: 210.20
Staining: H&E

Patient: 210.20
Staining: H&E

B Squamous metaplasia

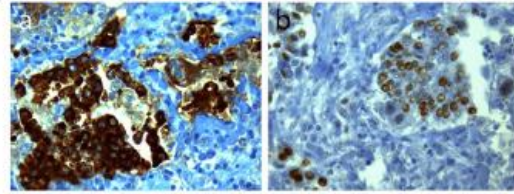


Patient: 210.20
Staining: H&E



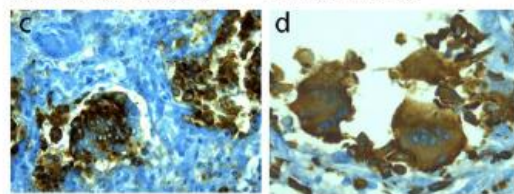
Patient: 314.20
Staining: H&E

D



Patient: 210.20
Staining: Surfactant A, Bluing

Patient: 210.20
Staining: TTF1, Bluing



Patient: 210.20
Staining: Napsin, Bluing

Patient: 308.20
Staining: CD163, Bluing

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7677597/>

Pneumociti anormali e sincizia cellulare nei polmoni COVID-19. A. Caratteristiche citologiche dei polmoni infetti da SARS-CoV-2. Una caratteristica coerente e tipica nei polmoni COVID-19 era la presenza di importanti anomalie citologiche, comprese cellule molto grandi con fenotipi dismorfici (a, x63; b, x40) che spesso mostravano bio-o multinucleazione (c, d, x40). B. Metaplasia squamosa (pseudosyncytia). Un reperto comune era la metaplasia dell'epitelio alveolare, con un marcato cambiamento nella morfologia dei pneumociti e la loro aggregazione per formare pseudosincizi (a, b, x20; a', b', x63). C. Sincizia. Oltre alla metaplasia squamosa, sono stati osservati veri elementi sinciziali in numerosi polmoni, che mostrano un ampio citoplasma e aggregazione nucleare (a, b, x20; a', b', x63). D. Origine degli elementi sinciziali. Le cellule giganti e multinucleate che formano la pseudo-sincizia o la vera sincizia hanno ottenuto un punteggio positivo per i marcatori di pneumociti Surfactant-A (a, x20), TTF1 (b, x20) e Napsin (c, x20), indicativi della loro origine epiteliale. I polmoni COVID-19 hanno anche mostrato la presenza più occasionale di sincizia CD163-positiva di origine istiocitica (d, x20). In AC, H&E: ematossilina ed eosina.

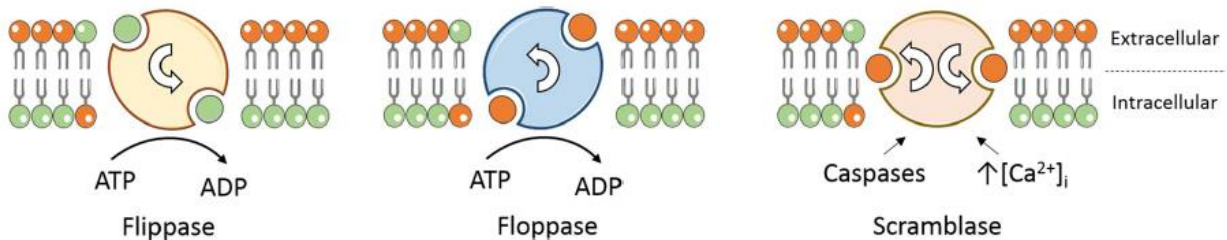
Questi sincizi sono stati attribuiti alla capacità della spike di fondere la membrana della cellula ospite con la membrana di una cellula adiacente se anche quest'ultima cellula ha un recettore per la spike.

Sincizi e Trombosi

Data la scoperta che la fusione cellulare indotta da spike è associata all'attivazione di TMEM16F²⁷⁷, una scramblase che esternalizza la fosfatidilserina (PS) *, l'autore propone che la PS esternalizzata dalla spike consenta la formazione della tenasi estrinseca, il fattore scatenante chiave della cascata di coagulazione del sangue durante le infezioni virali.

** Le scramblasi (dall'inglese "to scramble" che significa mescolare) sono proteine adibite allo spostamento dei fosfolipidi da un monostrato all'altro del doppio strato lipidico all'interno della membrana plasmatica di una cellula.*

Questa proteina, a differenza della flippasi non è selettiva nei confronti dei lipidi ma li "capovolge" dall'altro lato della membrana in maniera casuale e aspecifica. Essa pertanto fa sì che i fosfolipidi non vengano aggiunti solamente da un lato al momento della formazione o dell'espansione della membrana, ma anche dal lato opposto a contatto con l'ambiente extracellulare.²⁷⁸



https://www.researchgate.net/publication/317660741_Phosphatidylethanolamine_targeting_for_cell_death_imaging_in_early_treatment_response_evaluation_and_disease_diagnosis

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8664391/>

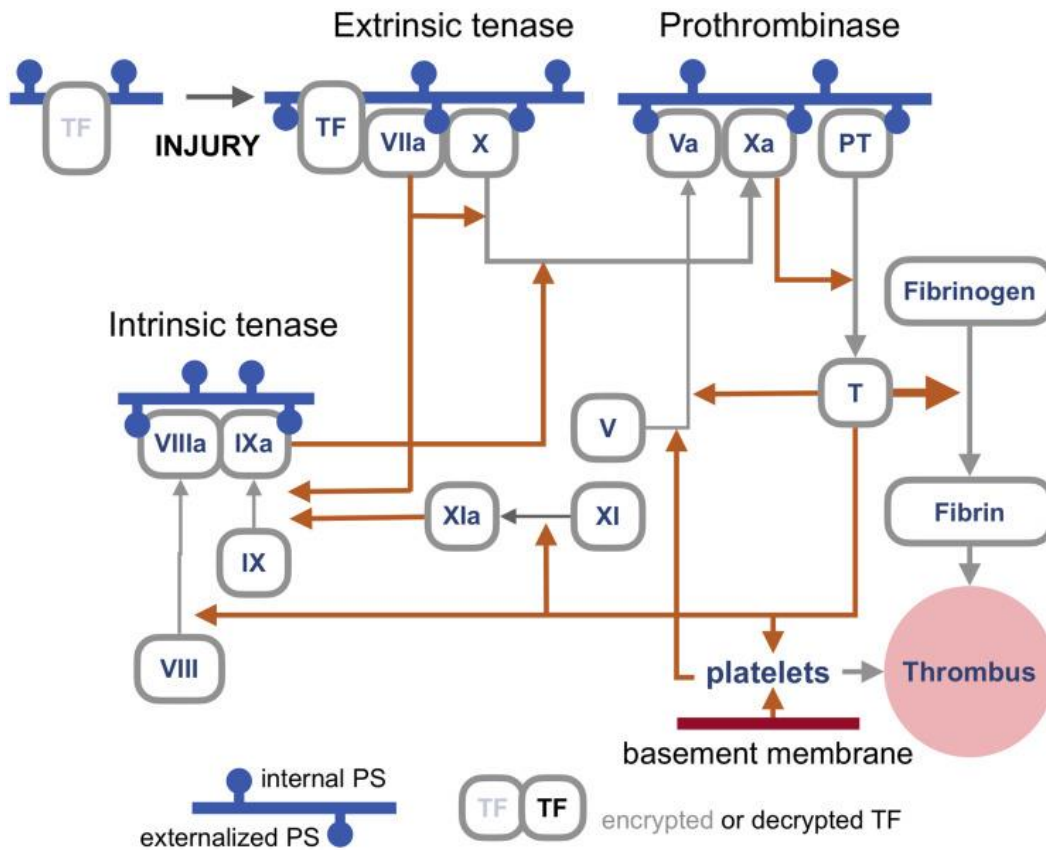
Uno schema della cascata della coagulazione del sangue.

La cascata della coagulazione del sangue è una rete di proteasi, loro precursori, cofattori, cellule, enzimi, feedback e feedforward la cui complessità e questioni ancora irrisolte rendono questo schema necessariamente rudimentale, con l'obiettivo principale di illustrare dove le proteine che richiedono il legame con il PS esternalizzato (fosfatidilserina) per l'attivazione sono nella rete. La maggior parte delle proteine coinvolte nella coagulazione sono chiamate fattori e sono etichettate con numeri romani, come il fattore X o FX (quindi gli enzimi che elaborano FX sono tenasi). Per semplicità, in questo fumetto la lettera F è omessa. I fattori attivati sono etichettati con una a, come in FXa. Le frecce arancioni rappresentano l'attività proteolitica, le frecce grigie mostrano una transizione tra le forme. Le linee orizzontali blu rappresentano una membrana cellulare con la superficie cellulare rivolta verso il basso. Di conseguenza, anche le capocchie di spillo del PS esternalizzato sono rivolte verso il basso. Si noti che la maggior parte dei PS viene

²⁷⁷ Braga L, et al
 Drugs that inhibit TMEM16 proteins block SARS-CoV-2 spike-induced syncytia.
 Nature. 2021 Jun;594(7861):88-93. doi: 10.1038/s41586-021-03491-6.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7611055/>

²⁷⁸ Elvas F, Stroobants S, Wyffels L.
 Phosphatidylethanolamine targeting for cell death imaging in early treatment response evaluation and disease diagnosis.
 Apoptosis. 2017 Aug;22(8):971-987. doi: 10.1007/s10495-017-1384-0.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28623512/>

attivamente ricollocata per affacciarsi al citoplasma a meno che la cellula non muoia o la distribuzione non sia randomizzata da scramblasi lipidiche. Come discusso nel testo, l'innescò primario della coagulazione indotta da infezioni virali è la tenasi estrinseca (in alto a sinistra), che è un complesso di TF (fattore tissutale) e FVIIa assemblato su PS esternalizzato in presenza di ioni calcio. Questa tenasi produce FXa per attivare abbastanza trombina per generare i componenti della tenasi intrinseca, che aumenta la produzione di FXa e, di conseguenza, di trombina, che genera abbastanza fibrina per formare un trombo, un intreccio di fibrina polimerizzata e reticolata con cellule del sangue intrappolate, principalmente piastrine, che è abbastanza grande e rigida da ostruire un vaso sanguigno. Nota che TF è crittografato e quindi non è in grado di attivare FVIIa, finché non viene decrittografato da PS esternalizzato



La spike del SARS-CoV-2 può anche fondere le cellule se il virus non è infettivo, o anche se la spike è incorporata nelle vescicole della membrana,²⁷⁹ come le vescicole extracellulari (esosomi) rilasciate dalle cellule infette.

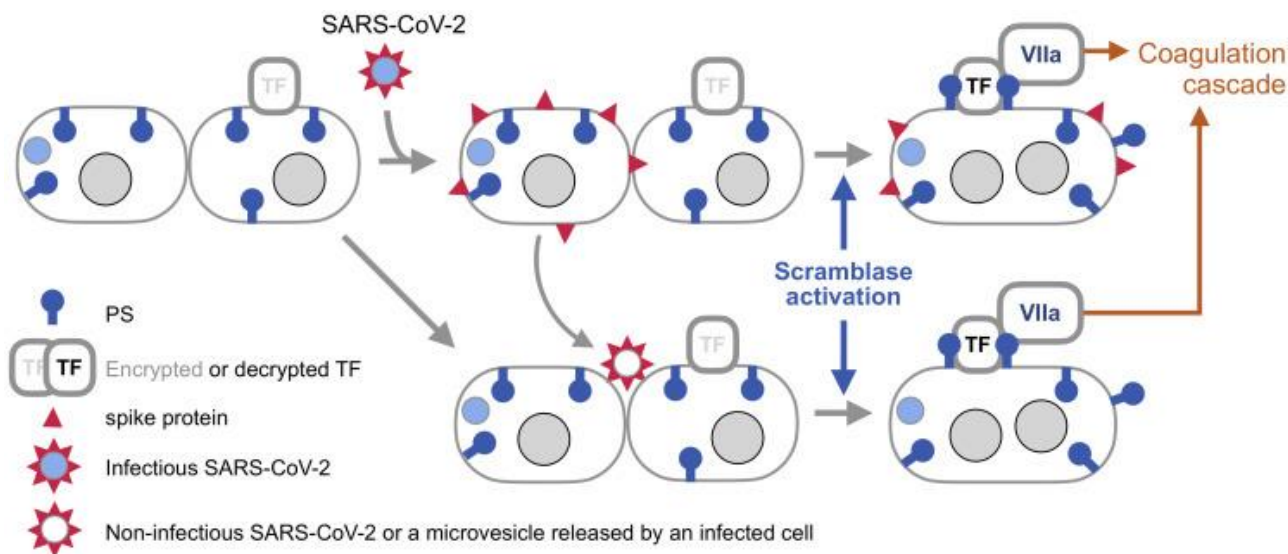
Questo meccanismo è noto come fusione dall'esterno²⁸⁰, in quanto la particella virale o una vescicola fornisce un ponte tra le membrane. Poiché in questo caso i sincizi prodotti da questo meccanismo non sono infettati da SARS-CoV-2, la loro origine potrebbe essere difficile da rintracciare. Ciò significa anche che le vescicole extracellulari prodotte nei pazienti con COVID-19²⁸¹ possono essere in grado di formare sincizi e quindi causare trombosi anche nei tessuti che non sono infettati dal virus.

²⁷⁹ Theuerkauf SA, Michels A, Riechert V, Maier TJ, Flory E, Cichutek K, Buchholz CJ. Quantitative assays reveal cell fusion at minimal levels of SARS-CoV-2 spike protein and fusion from without. *iScience*. 2021 Mar 19;24(3):102170. doi: 10.1016/j.isci.2021.102170. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7871100/>

²⁸⁰ Gallaher WR, Bratt MA. Temperature-dependent inhibition of fusion from without. *J Virol*. 1972 Jul;10(1):159-61. doi: 10.1128/JVI.10.1.159-161.1972. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC356440/pdf/jvirol00271-0169.pdf>

²⁸¹ Rosell A, Havervall S, von Meijenfeldt F, Hisada Y, Aguilera K, Grover SP, Lisman T, Mackman N, Thålin C. Patients With COVID-19 Have Elevated Levels of Circulating Extracellular Vesicle Tissue Factor Activity That Is Associated With Severity and Mortality- Brief Report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2021 Feb;41(2):878-882. doi: 10.1161/ATVBAHA.120.315547. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7837685/>

Si noti che il TF (Tissue Factor) è crittografato, il che significa che non è in grado di attivare FVIIa, fino a quando non viene decrittografato dalla PS esternalizzata.²⁸²



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8664391/>

I grandi sincizi prodotti dai fusogeni virali sono inclini a morire, almeno nei tessuti in coltura. Quindi, una seconda ipotesi d'induzione della trombosi mediata dalla fusione cellulare, suggerisce che il sincizio formato da cellule che rivestono un vaso sanguigno potrebbe contribuire alla trombosi semplicemente morendo, perché staccandosi scoprirebbe una macchia della membrana basale trombogena con un'area superficiale uguale a quella di molte cellule mononucleate.

Poiché anche una singola fibra di collagene da 20 micron, il componente principale della membrana basale, è sufficiente per innescare la coagulazione dipendente dalle piastrine,²⁸³ la placca esposta dal sincizio morente, composto da più di diverse cellule, potrebbe essere abbastanza grande da produrre un trombo per attivazione delle piastrine (Figura "Cascata della coagulazione", in basso a destra).

Dato che anche un solo trombo può causare problemi o addirittura la morte, il potenziale contributo del sincizio alla trombosi da COVID-19 mediante l'attivazione della tenasi o scoprendo una patch della membrana basale potrebbe essere clinicamente rilevante.

Il SARS-CoV-2 può essere in grado di attivare entrambi i meccanismi sia localmente, fondendo le cellule infette, sia da remoto tramite gli esosomi che trasportano la spike.

Sincizi e NeuroCovid

Un altro danno causato dalla formazione di sincizi riguarda le manifestazioni neurologiche delle complicazioni COVID, incluso il dolore²⁸⁴. Mentre è probabile che SARS-CoV-2 contribuisca a questi sintomi in più modi, il

²⁸² Grover SP, Mackman N. Tissue Factor: An Essential Mediator of Hemostasis and Trigger of Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018 Apr;38(4):709-725. doi: 10.1161/ATVBAHA.117.309846. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29437578/>

²⁸³ Zhu S, Tomaiuolo M, Diamond SL. Minimum wound size for clotting: flowing blood coagulates on a single collagen fiber presenting tissue factor and von Willebrand factor. *Integr Biol (Camb).* 2016 Aug 8;8(8):813-20. doi: 10.1039/c6ib00077k. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4980166/>

²⁸⁴ Solomon T. Neurological infection with SARS-CoV-2 - the story so far. *Nat Rev Neurol.* 2021 Feb;17(2):65-66. doi: 10.1038/s41582-020-00453-w. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7789883/>

cortocircuito delle reti neuronali mediante la fusione dei neuroni può spiegare non solo come emergono alcuni sintomi neurologici, ma anche perché durano dopo che l'infezione è stata eliminata.

Il fatto che la fusione dei neuroni possa causare problemi neurologici è stato considerato in altre malattie indotte da virus.

Negli animali, i gravi sintomi neurologici della pseudorabbia sono stati collegati alla capacità del virus della pseudorabbia di accoppiare elettricamente l'attività dei neuroni fondendo i loro assoni.²⁸⁵

Come tale accoppiamento possa anche contribuire alla perdita dell'olfatto, un sintomo comune di COVID-19, è possibile comprenderlo da esperimenti nel nematode *C. elegans* in cui la fusione di due neuroni chemiosensoriali funzionalmente diversi ha alterato la chemiopercezione.²⁸⁶

Nell'uomo, la fusione tra i neuroni e le cellule gliali che circondano i corpi neuronali, è stata proposta per spiegare l'origine e la persistenza del dolore neuropatico che può durare per mesi dopo la fase acuta dell'herpes zoster (fuoco di Sant'Antonio).²⁸⁷

Questa fusione è stata rilevata in un paziente affetto da fuoco di Sant'Antonio,²⁸⁸ confermata in un modello umano di xenotrapianto di questa malattia,²⁸⁹ e scoperta accidentalmente in un modello murino non correlato in cui i neuroni corticali erano stati infettati da un retrovirus pseudotipizzato con VSV-G, il fusogeno del virus della stomatite vescicolare²⁹⁰.

Se i fusogeni dei retrovirus endogeni umani (HERV), la cui espressione è stata associata a vari disturbi neurologici, siano in grado di funzionare come agenti patogeni di queste malattie fondendo le cellule, come è stato suggerito,²⁹¹ deve ancora essere confermato²⁹². Tuttavia, queste osservazioni significano che la

²⁸⁵ Granstedt AE, Bosse JB, Thiberge SY, Enquist LW.

In vivo imaging of alphaherpesvirus infection reveals synchronized activity dependent on axonal sorting of viral proteins.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Sep 10;110(37):E3516-25. doi: 10.1073/pnas.1311062110.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3773797/>

McCarthy KM, Tank DW, Enquist LW.

Pseudorabies virus infection alters neuronal activity and connectivity in vitro.

PLoS Pathog. 2009 Oct;5(10):e1000640. doi: 10.1371/journal.ppat.1000640.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2763221/>

²⁸⁶ Giordano-Santini R, Kaulich E, Galbraith KM, Ritchie FK, Wang W, Li Z, Hilliard MA.

Fusogen-mediated neuron-neuron fusion disrupts neural circuit connectivity and alters animal behavior.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2020 Sep 15;117(37):23054-23065. doi: 10.1073/pnas.1919063117.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7502713/>

²⁸⁷ Zerboni L, Sen N, Oliver SL, Arvin AM.

Molecular mechanisms of varicella zoster virus pathogenesis.

Nat Rev Microbiol. 2014 Mar;12(3):197-210. doi: 10.1038/nrmicro3215.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4066823/>

²⁸⁸ Esiri MM, Tomlinson AH.

Herpes Zoster. Demonstration of virus in trigeminal nerve and ganglion by immunofluorescence and electron microscopy.

J Neurol Sci. 1972;15(1):35-48. doi: 10.1016/0022-510x(72)90120-7.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4332851/>

²⁸⁹ Reichelt M, Zerboni L, Arvin AM.

Mechanisms of varicella-zoster virus neuropathogenesis in human dorsal root ganglia.

J Virol. 2008 Apr;82(8):3971-83. doi: 10.1128/JVI.02592-07.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2292995/>

²⁹⁰ Ackman JB, Siddiqi F, Walikonis RS, LoTurco JJ.

Fusion of microglia with pyramidal neurons after retroviral infection.

J Neurosci. 2006 Nov 1;26(44):11413-22. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3340-06.2006.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6674527/>

²⁹¹ Duelli D, Lazebnik Y.

Cell fusion: a hidden enemy?

Cancer Cell. 2003 May;3(5):445-8. doi: 10.1016/s1535-6108(03)00114-4.

[https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(03\)00114-4](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(03)00114-4)

²⁹² Geis FK, Goff SP.

Silencing and Transcriptional Regulation of Endogenous Retroviruses: An Overview.

Viruses. 2020 Aug 13;12(8):884. doi: 10.3390/v12080884.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7472088/>

fusione neuronale anormale indotta dalle proteine virali non è limitata a un particolare fusogeno o a determinati neuroni.

Nel caso del SARS-Cov-2, la spike è stata rilevata nel cervello di pazienti deceduti con COVID-19,²⁹³ e considerando l'efficienza con cui la spike fonde le cellule²⁷⁰ e quanto sono intricate le reti neuronali, la possibilità che la spike possa interromperle fondendo alcuni dei loro componenti non è trascurabile, come dimostrato anche in un recente studio negli organoidi cerebrali.²⁹⁴

Se la spike mantiene nel tempo questa attività nel cervello, non è difficile immaginare come le anastomosi neuronali create dalla fusione cellulare possano contribuire ai disturbi cognitivi associati alla COVID-19 e alle sue conseguenze a lungo termine.²⁷⁵

Infatti, tali cortocircuiti possono durare per qualche tempo dopo che l'infezione virale è finita, perché i meccanismi che possono ripararli "scollegando" i neuroni anastomizzati o sostituendoli possono essere inefficienti o inesistenti.

Sincizi e Tumori

Un'altra potenziale preoccupazione deriva da un modello di vecchia data secondo cui la fusione cellulare, in particolare la fusione indotta da virus, contribuisce allo sviluppo del cancro, alla progressione, alle metastasi, alla recidiva, alla dormienza e alla resistenza acquisita ai farmaci²⁹⁵. Questo modello è stato supportato da recenti rapporti di ibridi cellulari nei tumori umani,²⁹⁶ da osservazioni multiple in modelli animali²⁹⁷,

Giménez-Orenga K, Oltra E.
 Human Endogenous Retrovirus as Therapeutic Targets in Neurologic Disease.
 Pharmaceuticals (Basel). 2021 May 24;14(6):495. doi: 10.3390/ph14060495.
 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8225122/>

²⁹³ Song E, et al
 Neuroinvasion of SARS-CoV-2 in human and mouse brain.
 J Exp Med. 2021 Mar 1;218(3):e20202135. doi: 10.1084/jem.20202135.
 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7808299/>

²⁹⁴ Martinez-Marmol R, Giordano-Santini R, Kaulich E, Cho AN, Riyadh MA, Robinson E, Balistreri G, Meunier FA, Ke YD, Ittner LM, Hilliard MA.
 The SARS-CoV-2 spike (S) and the orthoreovirus p15 cause neuronal and glial fusion.
 bioRxiv. 2021; 2021.09.01.458544.
 <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.09.01.458544v1>.

²⁹⁵ Shabo I, Svanvik J, Lindström A, Lechertier T, Trabulo S, Hulit J, Sparey T, Pawelek J.
 Roles of cell fusion, hybridization and polyploid cell formation in cancer metastasis.
 World J Clin Oncol. 2020 Mar 24;11(3):121-135. doi: 10.5306/wjco.v11.i3.121.
 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7103524/>

Parris GE.
 Historical perspective of cell-cell fusion in cancer initiation and progression.
 Crit Rev Oncog. 2013;18(1-2):1-18. doi: 10.1615/critrevoncog.v18.i1-2.20.
 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23237550/>

Sieler M, Weiler J, Dittmar T.
 Cell-Cell Fusion and the Roads to Novel Properties of Tumor Hybrid Cells.
 Cells. 2021 Jun 11;10(6):1465. doi: 10.3390/cells10061465.
 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8230653/>

²⁹⁶ Gast CE, et al
 Cell fusion potentiates tumor heterogeneity and reveals circulating hybrid cells that correlate with stage and survival.
 Sci Adv. 2018 Sep 12;4(9):eaat7828. doi: 10.1126/sciadv.aat7828.
 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6135550/>

Laberge GS, Duvall E, Haedicke K, Pawelek J.
 Leukocyte-Cancer Cell Fusion-Genesis of a Deadly Journey.
 Cells. 2019 Feb 18;8(2):170. doi: 10.3390/cells8020170.
 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6406780/>

²⁹⁷ Pawelek JM, Chakraborty AK.
 Fusion of tumour cells with bone marrow-derived cells: a unifying explanation for metastasis.
 Nat Rev Cancer. 2008 May;8(5):377-86. doi: 10.1038/nrc2371.
 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6406780/>

da scoperte che le cellule umane possono essere rese cancerose attraverso la fusione cellulare,²⁹⁸ e confrontando l'evoluzione di tumori e ibridi cellulari ²⁹⁹.

Tuttavia, è ancora da determinare se eventuali ibridi neoplastici trovati nell'uomo siano prodotti da fusogeni virali, come è stato suggerito ³⁰⁰, ma per precauzione è importante monitorare costantemente l'incidenza e la progressione delle lesioni neoplastiche nei pazienti COVID-19.³⁰¹

Va tenuto presente che la fusione cellulare, oltre a produrre grandi sincizi di cellule giganti multinucleate, può produrre cellule binucleari o trinucleari, che sono spesso più abbondanti nei sistemi sperimentali rispetto ai grandi sincizi, ma potrebbero passare inosservate nei tessuti umani, o anche se notati, potrebbero non essere attribuiti alla fusione cellulare, perché distinguerli in modo affidabile dalle cellule binucleari prodotte da una mitosi fallita nei tessuti umani può essere difficile o impossibile con gli strumenti disponibili.³⁰²

Un sincizio, soprattutto se ha solo due o tre nuclei, può entrare in mitosi per produrre cellule figlie mononucleate. Queste mitosi sono comunemente multipolari e quindi sono inclini a produrre cellule aneuploidi con aberrazioni cromosomiche, aggiungendo un altro livello di caratteristiche anormali alla progenie della fusione cellulare ³⁰³.

Noubissi FK, Ogle BM.

Cancer Cell Fusion: Mechanisms Slowly Unravel.

Int J Mol Sci. 2016 Sep 21;17(9):1587. doi: 10.3390/ijms17091587.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5037852/>

²⁹⁸ Delespaul L, et al

Fusion-mediated chromosomal instability promotes aneuploidy patterns that resemble human tumors.

Oncogene. 2019 Aug;38(33):6083-6094. doi: 10.1038/s41388-019-0859-6.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31270395/>

Lartigue L, Merle C, Lagarde P, Delespaul L, Lesluyes T, Le Guellec S, Pérot G, Leroy L, Coindre JM, Chibon F.

Genome remodeling upon mesenchymal tumor cell fusion contributes to tumor progression and metastatic spread.

Oncogene. 2020 May;39(21):4198-4211. doi: 10.1038/s41388-020-1276-6.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32242148/>

²⁹⁹ Miroshnychenko D, Baratchart E, Ferrall-Fairbanks MC, Velde RV, Laurie MA, Bui MM, Tan AC, Altmock PM, Basanta D, Marusyk A.

Spontaneous cell fusions as a mechanism of parasexual recombination in tumour cell populations.

Nat Ecol Evol. 2021 Mar;5(3):379-391. doi: 10.1038/s41559-020-01367-y.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33462489/>

³⁰⁰ Duelli DM, Hearn S, Myers MP, Lazebnik Y.

A primate virus generates transformed human cells by fusion.

J Cell Biol. 2005 Nov 7;171(3):493-503. doi: 10.1083/jcb.200507069.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2171256/>

Parris GE.

The role of viruses in cell fusion and its importance to evolution, invasion and metastasis of cancer clones.

Med Hypotheses. 2005;64(5):1011-4. doi: 10.1016/j.mehy.2004.11.012.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15780502/>

Duelli D, Lazebnik Y.

Cell-to-cell fusion as a link between viruses and cancer.

Nat Rev Cancer. 2007 Dec;7(12):968-76. doi: 10.1038/nrc2272.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18034186/>

³⁰¹ Saini G, Aneja R.

Cancer as a prospective sequela of long COVID-19.

Bioessays. 2021 Jun;43(6):e2000331. doi: 10.1002/bies.202000331.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8206711/>

³⁰² Gast CE, et al

Cell fusion potentiates tumor heterogeneity and reveals circulating hybrid cells that correlate with stage and survival.

Sci Adv. 2018 Sep 12;4(9):eaat7828. doi: 10.1126/sciadv.aat7828.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6135550/>

³⁰³ Duelli DM, Padilla-Nash HM, Berman D, Murphy KM, Ried T, Lazebnik Y.

A virus causes cancer by inducing massive chromosomal instability through cell fusion.

Tali anomalie possono essere particolarmente significative per i pazienti COVID-19 con lesioni neoplastiche già presenti, perché le aberrazioni cromosomiche contribuiscono alla progressione del tumore³⁰⁴, così come le anomalie epigenetiche riscontrate nei prodotti della fusione cellulare.³⁰⁵

Sincizi e linfopenia da COVID-19

Zhang et al, nell'articolo "*SARS-CoV-2 spike protein dictates syncytium-mediated lymphocyte elimination*"³⁰⁶ riportano i risultati di una ricerca dedicata allo studio del meccanismo della formazione dei sincizi da parte della spike del SARS-CoV-2.

In particolare, i ricercatori hanno riscontrato che l'infezione da SARS-CoV-2 nelle cellule in coltura portava alla produzione di sincizi multinucleati, capaci di internalizzare facilmente più linee di linfociti e formare tipiche strutture cellula-dentro la-cellula. Queste strutture causavano la morte delle cellule internalizzate, contribuendo potenzialmente alla linfopenia e alla patogenesi nei pazienti COVID-19.

Il test di co-coltura *in vitro* ha mostrato che la linea cellulare Vero (ACE2⁺), dopo aver espresso la proteina spike SARS-CoV-2, potrebbe formare sincizi omologhi o fondersi con altre linee cellulari purché fosse presente il recettore ACE2.

È interessante notare che quando le cellule Vero sono state trasfettate con la proteina Spike da SARS-CoV-1, non è stata osservata alcuna formazione di sincizi. Pertanto, l'elemento chiave responsabile del sincizio mediato da SARS-CoV-2 è assente nella proteina spike di SARS-CoV-1.

Spinti da questa ipotesi, gli autori hanno confrontato la proteina della spike da SARS-CoV-2 e SARS-CoV1 e hanno scoperto che l'inserito di quattro aminoacidi (PRRA) della furina prima del sito di scissione S1/S2 presente solo nella spike del SARS-CoV-2 è responsabile della capacità di fondere le cellule.

Coerentemente, la proteina spike di SARS-CoV1 ha indotto efficacemente il sincizio una volta inserita la sequenza "PRRA" prima del sito di scissione S1/S2 del genoma del SARS-CoV-1.

Inoltre, la produzione del frammento di fusione S2 è innescata da un motivo bi-argininico contenente R682 e R685 e gli autori hanno dimostrato che la 6-D-Arg, un inibitore della furina, era in grado sopprimere significativamente l'elaborazione della glicoproteina S in S2 e di inibire la fusione della membrana.

Curr Biol. 2007 Mar 6;17(5):431-7. doi: 10.1016/j.cub.2007.01.049.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.01.049>

Godinho SA, Kwon M, Pellman D.
Centrosomes and cancer: how cancer cells divide with too many centrosomes.
Cancer Metastasis Rev. 2009 Jun;28(1-2):85-98. doi: 10.1007/s10555-008-9163-6.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19156503/>

³⁰⁴ Gemoll T, Auer G, Ried T, Habermann JK.
Genetic Instability and Disease Prognostication.
Recent Results Cancer Res. 2015;200:81-94. doi: 10.1007/978-3-319-20291-4_4.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7737009/>

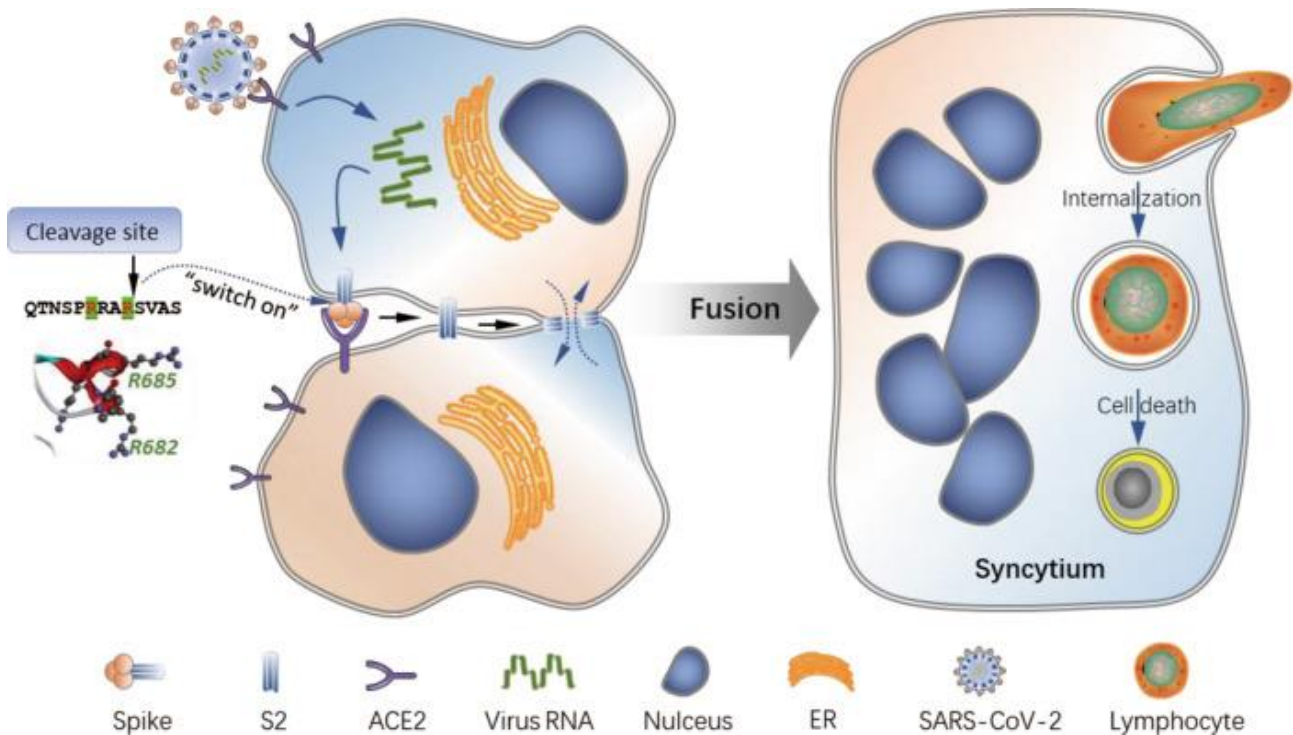
Baudoin NC, Bloomfield M.
Karyotype Aberrations in Action: The Evolution of Cancer Genomes and the Tumor Microenvironment.
Genes (Basel). 2021 Apr 12;12(4):558. doi: 10.3390/genes12040558.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8068843/>

³⁰⁵ Lazebnik Y.
The shock of being united and symphiliosis. Another lesson from plants?
Cell Cycle. 2014;13(15):2323-9. doi: 10.4161/cc.29704.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4128876/>

³⁰⁶ Zhang Z et al
SARS-CoV-2 spike protein dictates syncytium-mediated lymphocyte elimination.
Cell Death Differ. 2021 Sep;28(9):2765-2777. doi: 10.1038/s41418-021-00782-3.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8056997/>

Lin L, Li Q, Wang Y, Shi Y.
Syncytia formation during SARS-CoV-2 lung infection: a disastrous unity to eliminate lymphocytes.
Cell Death Differ. 2021 Jun;28(6):2019-2021. doi: 10.1038/s41418-021-00795-y.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8114657/>

Questi dati suggeriscono quindi che il blocco della scissione della glicoproteina di superficie, mediante strategie come il targeting del motivo bi-arginina, potrebbe servire come potenziale strategia per alleviare la patogenesi causata dal SARS-CoV-2 e di altri virus altamente contagiosi che contengono i motivi bi-argininici. Tra i farmaci testati, è stata identificata inaspettatamente l'idrossiclorochina come un potente inibitore dell'elaborazione della glicoproteina S e della fusione della membrana, nonché della formazione di sincizi, come ulteriore meccanismo antivirale per questa sostanza.



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8056997/>

Un modello di lavoro per la perdita di linfociti indotta da SARS-CoV-2 attraverso la formazione cellula-in-cellula mediata dal sincizio. L'infezione delle cellule che esprimono ACE2 da parte del virus SARS-CoV-2 porta all'espressione superficiale della glicoproteina della spike virale, che ospita un motivo bi-argininico necessario per l'elaborazione mediata dalla proteasi e controlla la fusione della membrana. L'impegno della proteina spike con il suo recettore ACE2 innesca la fusione della membrana, mediata dal dominio S2 della glicoproteina spike virale, tra le cellule vicine, portando alla produzione di un sincizio multinucleato. I sincizi sono in grado di prendere di mira i linfociti per l'internalizzazione e la morte mediata cellula in cellula, contribuendo plausibilmente alla linfopenia nei pazienti con COVID-19.

Il potenziale ruolo dei sincizi nell'infezione da SARS-Cov-2

È stato proposto, come già discusso, che la formazione di sincizi mediata da SARS-CoV-2 contribuisca alla patologia generale, tuttavia il suo contributo generale all'infezione virale rimangono da indagare.³⁰⁷

La formazione di pneumociti multinucleati anormali rappresenta una forma di effetto citopatico patologico che si distingue in maniera significativa dai sincizi fisiologici.

Durante la sinciziogenesi fisiologica, come nella formazione del trofoblasto placentare, il ciclo cellulare e l'espressione del fusogeno della sincitina-2 (SYN2) vengono arrestati nella fase G₀, per consentire una rigorosa regolazione del processo di fusione cellulare fisiologico.

L'espressione transitoria di SYN2 nelle cellule in qualsiasi altra fase (S,G₂,M) del ciclo determina la formazione di sincizi instabili e funzionalmente compromessi.³⁰⁸

³⁰⁷ Rajah MM, Bernier A, Buchrieser J, Schwartz O.

The Mechanism and Consequences of SARS-CoV-2 Spike-Mediated Fusion and Syncytia Formation.

J Mol Biol. 2022 Mar 30;434(6):167280. doi: 10.1016/j.jmb.2021.167280.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8485708/>

³⁰⁸ Lu X, Wang R, Zhu C, Wang H, Lin HY, Gu Y, Cross JC, Wang H.

Fine-Tuned and Cell-Cycle-Restricted Expression of Fusogenic Protein Syncytin-2 Maintains Functional Placental Syncytia.

Cell Rep. 2017 Oct 31;21(5):1150-1159. doi: 10.1016/j.celrep.2017.10.019. Erratum in: Cell Rep. 2018 Jun 26;23(13):3979.

In netto contrasto, la formazione di sincizi non regolata, indotta da agenti patogeni, nelle cellule che normalmente non si fondono, è patologica.

Le cellule sinciziali che si formano in modo innaturale sono suscettibili a un rapido effetto citopatico noto come "apoptosi sinciziale", dovuta alla capacità della proteina dell'involucro virale di innescare una via di segnalazione pro-apoptotica che porta alla cariogamia (fusione nucleare) e al danno al DNA.³⁰⁹

Anche i sincizi mediati da proteine SARS-CoV-2 S collassano e muoiono durante le fasi successive del processo, e di particolare interesse è l'osservazione che i nuclei all'interno di sincizi mediati da proteine S si raggruppano insieme.³¹⁰

La formazione di sincizi può anche avere conseguenze virologiche dirette piuttosto che innescare semplicemente un effetto citopatico generalizzato o una risposta immunitaria. Il sincizio può infatti consentire ai virus di diffondersi direttamente da cellula a cellula senza dover entrare nell'ambiente extracellulare.

Questa strategia protegge il virus dagli anticorpi neutralizzanti, dalle barriere fisiche come lo strato mucociliare, nonché dai componenti del sistema immunitario.

Molti virus respiratori come il morbillo, l'influenza, il virus sinciziale respiratorio, il virus della parainfluenza e il virus della metapolmonite umana sfruttano questo meccanismo di disseminazione.³¹¹

Recenti studi su colture cellulari suggeriscono che la diffusione da cellula a cellula di SARS-CoV-2 è una possibile via di diffusione e che oltre alla diffusione diretta da cellula a cellula, il sincizio può contribuire alla dose infettiva complessiva e alla disseminazione virale. Negli epiteli bronchiali primari ricostituiti, cellule multiciliate e cellule basali formano sincizi che vengono poi rilasciati nel lume apicale.

Inclusioni vescicolari contenenti particelle virali sono state rilevate all'interno dei sincizi rilasciati, suggerendo una potenziale replicazione virale continua.³¹²

Cellule singole e sinciziali infette che vengono rilasciate possono quindi diffondere l'infezione, come avviene anche per l'infezione di colture di cellule epiteliali dal tessuto respiratorio del macaco con il virus del morbillo.³¹³

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.019>

³⁰⁹ Nardacci R, Perfettini JL, Grieco L, Thieffry D, Kroemer G, Piacentini M.
Syncytial apoptosis signaling network induced by the HIV-1 envelope glycoprotein complex: an overview.
Cell Death Dis. 2015 Aug 6;6(8):e1846. doi: 10.1038/cddis.2015.204.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4558497/>

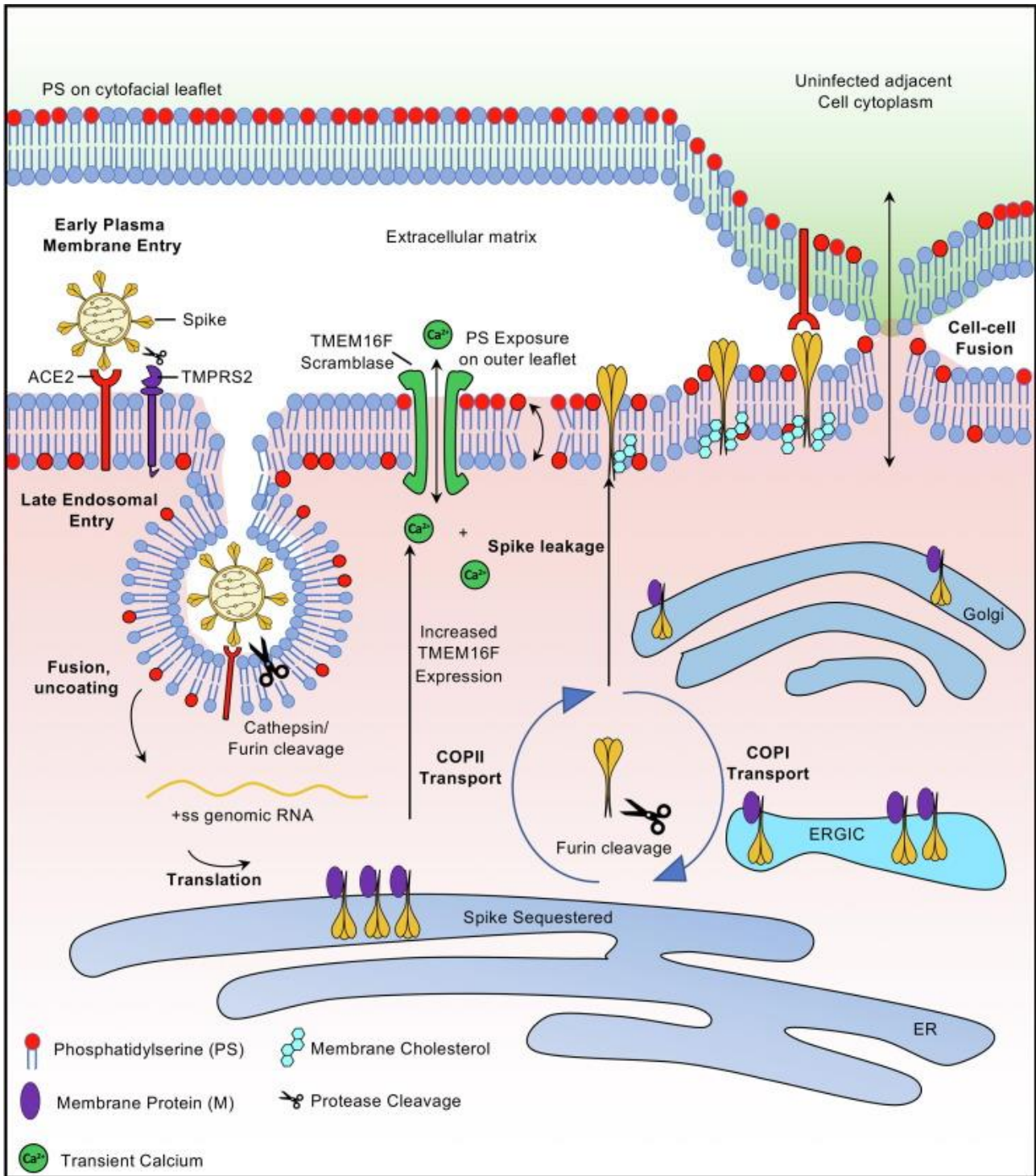
³¹⁰ Buchrieser J, et al
Syncytia formation by SARS-CoV-2-infected cells.
EMBO J. 2020 Dec 1;39(23):e106267. doi: 10.15252/embj.2020106267. Epub 2020 Nov 4. Erratum in: EMBO J. 2021 Feb 1;40(3):e107405.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7646020/>

Laurelle Jackson, et al COMMIT-KZN Team, Bernadett I. et al
SARS-CoV-2 cell-to-cell spread occurs rapidly and is insensitive to antibody neutralization
bioRxiv 2021.06.01.446516; doi: <https://doi.org/10.1101/2021.06.01.446516>
<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.06.01.446516v1.full.pdf>

³¹¹ Cifuentes-Muñoz N, Dutch RE, Cattaneo R.
Direct cell-to-cell transmission of respiratory viruses: The fast lanes.
PLoS Pathog. 2018 Jun 28;14(6):e1007015. doi: 10.1371/journal.ppat.1007015.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6023113/>

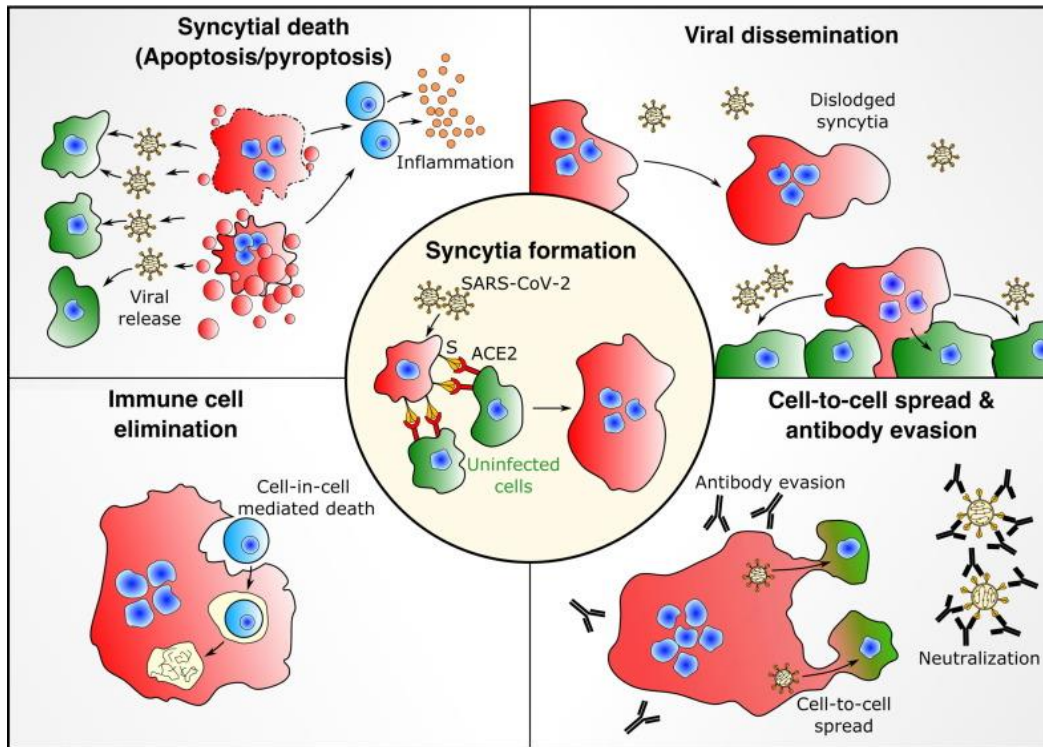
³¹² Beucher G, et al
Bronchial epithelia from adults and children: SARS-CoV-2 spread via syncytia formation and type III interferon infectivity restriction.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2022 Jul 12;119(28):e2202370119. doi: 10.1073/pnas.2202370119.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2202370119>
<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.05.28.446159v1.full.pdf>

³¹³ Lin WW, Tsay AJ, Lalime EN, Pekosz A, Griffin DE.
Primary differentiated respiratory epithelial cells respond to apical measles virus infection by shedding multinucleated giant cells.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2021 Mar 16;118(11):e2013264118. doi: 10.1073/pnas.2013264118.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7980467/>



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8485708/>

Rappresentazione schematica delle diverse attività della proteina spike (S) SARS-CoV-2 durante l'infezione e la formazione di sincizi. L'infezione virale inizia quando la proteina S sulla superficie del virione interagisce con il recettore ACE2. Durante l'ingresso anticipato, la proteina S viene elaborata dalla proteasi TMPRSS2 e la fusione avviene sulla membrana plasmatica (PM). La proteina S può anche fondersi con le membrane endosomiche durante l'ingresso tardivo, dopo essere stata innescata da cathepsine e furina. L'RNA genomico virale a singolo filamento (+ss) a senso positivo viene depositato nel citoplasma e tradotto. La replicazione e la trascrizione dell'RNA virale avvengono sulle membrane. Dopo essere stata trascritta, la proteina S viene traslocata e inserita nel reticolo endoplasmatico (ER) ed è generalmente sequestrata all'interno delle membrane intracellulari dalla proteina strutturale della membrana (M). L'espressione della proteina S porta a fluttuazioni del calcio intracellulare e all'aumentata espressione della scramblasi TMEM16F. TMEM16F espone la fosfatidilserina (PS) dal foglio citofacciale del PM al foglio esofacciale. La proteina S trascritta viene elaborata dalla furina e trasportata attraverso la rete ER-Golgi. Durante il trasporto COPI (retrogrado) e COPII (anterograde), può verificarsi una perdita della proteina S dalle vescicole (non mostrate nello schema semplificato). La proteina S viene quindi traslocata nel PM, dove si associa ai colesteroli e induce la formazione di sincizi interagendo con i recettori sulle cellule vicine non infette. La proteina S sequestrata è confezionata in virioni che germogliano nel compartimento intermedio Golgi o ER-Golgi (ERGIC) e i virioni escono dalla cellula tramite esocitosi deacidificata dipendente dal lisosoma (non mostrata). Le membrane ER, ERGIC e Golgi sono doppi strati che sono rappresentati come linee singole in questo schema.



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8485708/>

Le potenziali conseguenze della formazione di sincizi sulla patologia SARS-CoV-2. Centro: Le cellule infettate da SARS-CoV-2 esprimono la proteina spike in superficie e formano grandi sincizi multinucleati. In alto a sinistra: il processo di morte sinciziale tramite apoptosi o piroptosi può rilasciare virus per infettare le cellule vicine e/o innescare una risposta infiammatoria. In alto a destra: i sincizi infetti possono decollare per contribuire alla diffusione virale e alla dose infettiva complessiva. In basso a sinistra: le cellule sinciziali possono colpire i linfociti per la morte mediata cellula in cellula. In basso a destra: Syncytia può facilitare la diffusione del virus da cellula a cellula e proteggere il virus dagli anticorpi neutralizzanti.

Fusione cellulare e danni cardiaci

I virus possono causare miocarditi e cardiomiopatie, ma i meccanismi della malattia sono difficili da caratterizzare sperimentalmente.³¹⁴ Anche le complicanze cardiache frequentemente osservate nei pazienti COVID-19 sono attribuite a risposte aberranti dell'ospite all'infezione respiratoria acuta, ma la replicazione di SARS-CoV-2 è stata occasionalmente confermata nella biopsia endomiocardica e nel tessuto cardiaco dell'autopsia.

Mentre sono in fase di sviluppo modelli animali per studiare le infezioni cardiache da SARS-CoV-2, Navaratnarajah et al³¹⁵ hanno caratterizzato la diffusione del virus negli hiPSC-CM (human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes).

L'infezione di queste cellule altamente differenziate è stata inaspettatamente efficiente, con il virus che ha preso il controllo di quasi il 90% del trascrittoma cellulare.

³¹⁴ Yajima T, Knowlton KU.

Viral myocarditis: from the perspective of the virus.

Circulation. 2009 May 19;119(19):2615-24. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.766022.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19451363/>

Tschöpe C, et al

Myocarditis and inflammatory cardiomyopathy: current evidence and future directions.

Nat Rev Cardiol. 2021 Mar;18(3):169-193. doi: 10.1038/s41569-020-00435-x.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7548534/>

³¹⁵ Navaratnarajah CK, et al Wanek Family Program for HLHS-Stem Cell Pipeline.

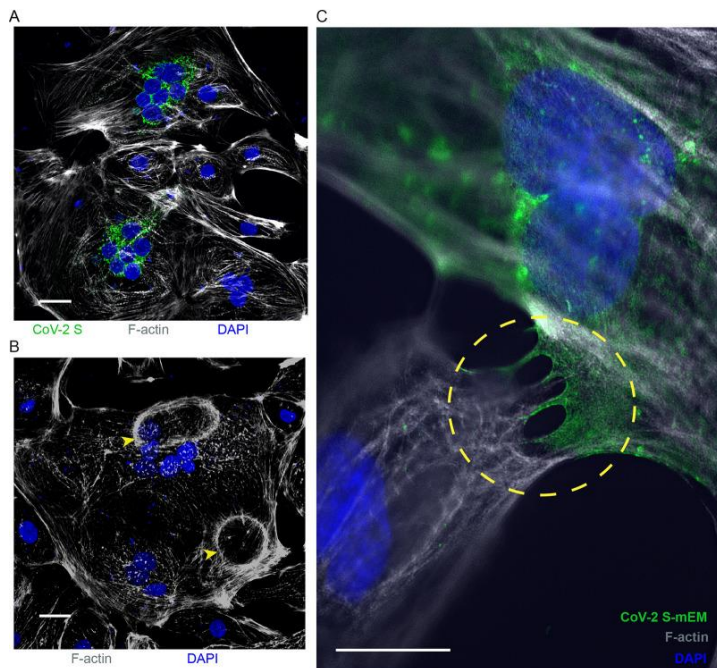
Highly Efficient SARS-CoV-2 Infection of Human Cardiomyocytes: Spike Protein-Mediated Cell Fusion and Its Inhibition.

J Virol. 2021 Nov 23;95(24):e0136821. doi: 10.1128/JVI.01368-21.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8610601/>

L'infezione da SARS-CoV-2 ha rimodellato le morfologie subcellulari ³¹⁶, le vescicole secretorie sono state riempite di progenie virale e le particelle di virus con la spike hanno ricoperto la superficie dei cardiomiociti. Lo studio ha anche documentato un effetto citopatico e la formazione di sincizi negli hiPSC-CM infetti, con disassemblaggio/frammentazione dei sarcomeri.

Nelle cellule 293T e Vero il sito multibasic e la concomitante presenza di TMPRSS2 promuovono questo processo ma non sono essenziali. ³¹⁷ Poiché i dati di laboratorio indicano che TMPRSS2 e TMPRSS13 non sono espressi nei cardiomiociti, è stato ipotizzato che un'altra proteasi può innescare la fusione in queste cellule. Le catepsine sono candidate in base ai dati trascrittomici degli hiPSC-CM, così come le proteasi che conferiscono competenza di fusione alle proteine spike di altri coronavirus. ³¹⁸



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8610601/>
La proteina della punta SARS-CoV-2 induce la sincizia in hiPSC-CMs. (A) IF microscopia confocale del picco SARS-CoV-2 (CoV-2 S) che esprimono hiPSC-CMs. Barra della scala, 50 µm. Le componenti virali e cellulari visualizzate sono indicate con il colore corrispondente sotto ogni pannello.

(B) Microscopia confocale IF di hiPSC-CM che esprime CoV-2 S con "cadaveri" del citoscheletro di actina enucleato (freccie gialle). (C) Microscopia confocale a superrisoluzione della localizzazione CoV-2 S-mEM su filopodia hiPSC-CM che contatta direttamente il sarcolemma di un hiPSC-CM adiacente (cerchio giallo). Barra della scala, 2 µm.

Fusione cellulare e vaccini COVID-19

Se la fusione cellulare indotta dall'espressione della spike contribuisce alle complicazioni della COVID-19, come suggerito da questo e precedenti rapporti³¹⁹, ci si dovrebbe aspettare che l'espressione della spike con altri mezzi, compresi quelli utilizzati dai vaccini, abbia effetti simili.

³¹⁶ Cortese M, et al
Integrative Imaging Reveals SARS-CoV-2-Induced Reshaping of Subcellular Morphologies.
Cell Host Microbe. 2020 Dec 9;28(6):853-866.e5. doi: 10.1016/j.chom.2020.11.003.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7670925/>

Snijder EJ, Limpens RWAL, de Wilde AH, de Jong AWM, Zevenhoven-Dobbe JC, Maier HJ, Faas FFGA, Koster AJ, Bárcena M.
A unifying structural and functional model of the coronavirus replication organelle: Tracking down RNA synthesis.
PLoS Biol. 2020 Jun 8;18(6):e3000715. doi: 10.1371/journal.pbio.3000715.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7302735/>

³¹⁷ Papa G, Mallery DL, Albecka A, Welch LG, Cattin-Ortolá J, Luptak J, Paul D, McMahon HT, Goodfellow IG, Carter A, Munro S, James LC.
Furin cleavage of SARS-CoV-2 Spike promotes but is not essential for infection and cell-cell fusion.
PLoS Pathog. 2021 Jan 25;17(1):e1009246. doi: 10.1371/journal.ppat.1009246.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7861537/>

³¹⁸ Heald-Sargent T, Gallagher T.
Ready, set, fuse! The coronavirus spike protein and acquisition of fusion competence.
Viruses. 2012 Apr;4(4):57-80. doi: 10.3390/v4040557.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3347323/>

Lamers MM, Mykytyn AZ, Breugem TI, Wang Y, Wu DC, Riesebosch S, van den Doel PB, Schipper D, Bestebroer T, Wu NC, Haagmans BL.
Human airway cells prevent SARS-CoV-2 multibasic cleavage site cell culture adaptation.
Elife. 2021 Apr 9;10:e66815. doi: 10.7554/eLife.66815.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8131099/>

³¹⁹ Buchrieser J, et al

Il caso del vaccino AstraZeneca è coerente con questa possibilità, in quanto una caratteristica di questo vaccino è l'alta incidenza di complicanze riportate³²⁰, inclusa una serie di complicanze trombotiche³²¹, attribuite agli anticorpi provocati dagli adenovirus contro il fattore piastrinico 4,³²² allo splicing alternativo dello spike,³²³ e al legame del vettore adenovirale o della spike alle piastrine.³²⁴ Se la fusione cellulare indotta da spike è patogena, il vaccino AstraZeneca risulta più pericoloso per questo meccanismo, perché è l'unico dei quattro vaccini che produce la spike nativa completamente fusogenica,³²⁵ con un vettore ottimizzato per esprimere livelli molto alti della proteina.³²⁶

Syncytia formation by SARS-CoV-2-infected cells.

EMBO J. 2020 Dec 1;39(23):e106267. doi: 10.15252/embj.2020106267. Epub 2020 Nov 4. Erratum in: EMBO J. 2021 Feb 1;40(3):e107405. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7646020/>

Bussani R, Schneider E, Zentilin L, Collesi C, Ali H, Braga L, Volpe MC, Colliva A, Zanconati F, Berlot G, Silvestri F, Zacchigna S, Giacca M. Persistence of viral RNA, pneumocyte syncytia and thrombosis are hallmarks of advanced COVID-19 pathology.

EBioMedicine. 2020 Nov;61:103104. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.103104. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7677597/>

³²⁰ Cari L, Fiore P, Naghavi Alhosseini M, Sava G, Nocentini G.

Blood clots and bleeding events following BNT162b2 and ChAdOx1 nCoV-19 vaccine: An analysis of European data.

J Autoimmun. 2021 Aug;122:102685. doi: 10.1016/j.jaut.2021.102685. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8220408/>

Kragholm K, et al

Thrombocytopenia after COVID-19 vaccination.

J Autoimmun. 2021 Sep;123:102712. doi: 10.1016/j.jaut.2021.102712. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8313538/>

³²¹ Østergaard SD, Schmidt M, Horváth-Puhó E, Thomsen RW, Sørensen HT.

Thromboembolism and the Oxford-AstraZeneca COVID-19 vaccine: side-effect or coincidence?

Lancet. 2021 Apr 17;397(10283):1441-1443. doi: 10.1016/S0140-6736(21)00762-5. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8009607/>

Pottegård A, et al

Arterial events, venous thromboembolism, thrombocytopenia, and bleeding after vaccination with Oxford-AstraZeneca ChAdOx1-S in Denmark and Norway: population based cohort study.

BMJ. 2021 May 5;373:n1114. doi: 10.1136/bmj.n1114. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8097496/>

³²² Greinacher A, Thiele T, Warkentin TE, Weisser K, Kyrle PA, Eichinger S.

Thrombotic Thrombocytopenia after ChAdOx1 nCoV-19 Vaccination.

N Engl J Med. 2021 Jun 3;384(22):2092-2101. doi: 10.1056/NEJMoa2104840. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8095372/>

Baker AT, Boyd RJ, Sarkar D, Vant J, Crespo AT, Waraich K, Truong CD, Bates E, Wilson E, Chan CK, Lipka-Lloyd M, Fromme P, Nagalo MB, et al.

The Structure of ChAdOx1/AZD-1222 Reveals Interactions with CAR and PF4 with Implications for Vaccine-induced Immune Thrombotic Thrombocytopenia.

bioRxiv. 2021; 2021.05.19.444882. 10.1101/2021.05.19.444882 <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.05.19.444882v2.full.pdf>

³²³ Kowarz E, Krutzke L, Külp M, Streb P, Larghero P, Reis J, Bracharz S, Engler T, Kochanek S, Marschalek R.

Vaccine-induced COVID-19 mimicry syndrome.

Elife. 2022 Jan 27;11:e74974. doi: 10.7554/eLife.74974. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8846585/>

³²⁴ Baker AT et al

ChAdOx1 interacts with CAR and PF4 with implications for thrombosis with thrombocytopenia syndrome.

Sci Adv. 2021 Dec 3;7(49):eabl8213. doi: 10.1126/sciadv.abl8213. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8635433/>

³²⁵ Watanabe Y, et al

Native-like SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein Expressed by ChAdOx1 nCoV-19/AZD1222 Vaccine.

ACS Cent Sci. 2021 Apr 28;7(4):594-602. doi: 10.1021/acscentsci.1c00080. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8043200/>

³²⁶ Almuqrin A, Davidson AD, Williamson MK, Lewis PA, Heesom KJ, Morris S, Gilbert SC, Matthews DA.

SARS-CoV-2 vaccine ChAdOx1 nCoV-19 infection of human cell lines reveals low levels of viral backbone gene transcription alongside very high levels of SARS-CoV-2 S glycoprotein gene transcription.

Genome Med. 2021 Mar 15;13(1):43. doi: 10.1186/s13073-021-00859-1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7958140/>

La spike utilizzata negli altri tre vaccini è stata resa meno fusogena, non intenzionalmente, stabilizzando la struttura mediante le due mutazioni della prolina che, come già visto, sopprimono un cambiamento conformazionale innescato dal legame con ACE2.³²⁷

Poiché questo cambiamento è coinvolto nell'attivazione della spike, la sua soppressione ha anche inibito la fusione cellulare in un test di coltura tissutale³²⁸.

Due ulteriori mutazioni introdotte nel vaccino Janssen hanno ridotto ulteriormente questa incidenza nello stesso test³¹⁸ alterando il sito riconosciuto dalla furina. Non è chiaro se queste ulteriori mutazioni rimangano altrettanto efficaci nel corpo umano, in quanto altre proteasi possono sostituire la furina e questa scissione potrebbe non essere necessaria³²⁹.

Tuttavia, poiché l'abbondanza di queste proteasi varia tra i tessuti umani, l'alterazione del sito della furina potrebbe influenzare sull'incidenza o sulla localizzazione di alcune complicanze. Nessuno degli sviluppatori dei vaccini ha invece mutato il sito S2, la cui scissione espone il peptide di fusione che penetra nella membrana bersaglio.³³⁰

³²⁷ Kirchdoerfer RN, Wang N, Pallesen J, Wrapp D, Turner HL, Cottrell CA, Corbett KS, Graham BS, McLellan JS, Ward AB. Stabilized coronavirus spikes are resistant to conformational changes induced by receptor recognition or proteolysis. *Sci Rep.* 2018 Oct 24;8(1):15701. doi: 10.1038/s41598-018-34171-7. Erratum in: *Sci Rep.* 2018 Dec 10;8(1):17823 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6200764/>

³²⁸ Bos R, et al
Ad26 vector-based COVID-19 vaccine encoding a prefusion-stabilized SARS-CoV-2 Spike immunogen induces potent humoral and cellular immune responses. *NPJ Vaccines.* 2020 Sep 28;5:91. doi: 10.1038/s41541-020-00243-x. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7522255/>

³²⁹ Xia S, Lan Q, Su S, Wang X, Xu W, Liu Z, Zhu Y, Wang Q, Lu L, Jiang S.
The role of furin cleavage site in SARS-CoV-2 spike protein-mediated membrane fusion in the presence or absence of trypsin. *Signal Transduct Target Ther.* 2020 Jun 12;5(1):92. doi: 10.1038/s41392-020-0184-0. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7289711/>

Hörnrich BF, Großkopf AK, Schlagowski S, Tenbusch M, Kleine-Weber H, Neipel F, Stahl-Hennig C, Hahn AS.
SARS-CoV-2 and SARS-CoV Spike-Mediated Cell-Cell Fusion Differ in Their Requirements for Receptor Expression and Proteolytic Activation. *J Virol.* 2021 Apr 12;95(9):e00002-21. doi: 10.1128/JVI.00002-21. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8104116/>

³³⁰ Koppiseti RK, Fulcher YG, Van Doren SR.
Fusion Peptide of SARS-CoV-2 Spike Rearranges into a Wedge Inserted in Bilayered Micelles. *J Am Chem Soc.* 2021 Aug 25;143(33):13205-13211. doi: 10.1021/jacs.1c05435. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8370118/>

PLASMA CONVALESCENTE

Più di 125 anni fa, è stato sviluppato il primo siero terapeutico da animali attivamente immunizzati contro la tossina difterica,³³¹ e Paul Ehrlich in seguito ha prodotto un articolo fondamentale che lega l'antisiero curativo agli anticorpi neutralizzanti.³³²

Oggi, l'immunizzazione passiva prevede l'infusione di mAbs antigene-specifici o anticorpi policlonali derivati da emoderivati non umani o umani.

Sebbene gli anticorpi policlonali raccolti da animali immunizzati siano la fonte primaria di antisieri, esiste il rischio di "malattia da siero" (serum sickness³³³), specialmente dopo esposizioni ripetute, poiché il ricevente può generare una risposta immunitaria contro anticorpi di origine non umana.

Questi rischi sono mitigati con l'uso di plasma convalescente da pazienti umani.

Con un attento screening (ad esempio, per valutare la presenza di agenti infettivi e per stabilire il titolo anticorpale e la capacità neutralizzante), la terapia con plasma convalescente (CPT) può essere efficace con rischi minimi per la sicurezza.³³⁴

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31161341/>

I meccanismi d'azione delle IVIG sui vari rami delle risposte autoimmuni e infiammatorie. Gli autoantigeni endocitati dalle cellule immunitarie innate come cellule dendritiche e macrofagi vengono presentati alle cellule T e B autoreattive portando alla proliferazione di cellule autoreattive e alla produzione di citochine infiammatorie e anticorpi autoreattivi. Le IVIG prendono di mira diversi compartimenti solubili e cellulari del sistema immunitario per esercitare i suoi effetti terapeutici su diverse malattie autoimmuni. L'IVIG neutralizza autoantigeni e superantigeni e inibisce l'attivazione di diverse cellule immunitarie innate come cellule dendritiche, macrofagi, monociti, granulociti e cellule NK. Per quanto riguarda la fase effettrice della risposta autoimmune, l'IVIG inibisce l'attivazione e la proliferazione dei linfociti T effettrici (Th1, Th17) e B migliorando l'espansione e la funzione dei linfociti T regolatori (Tregs). L'IVIG induce anche l'espressione di FcγRIIB inibitorio in un sottoinsieme di macrofagi e cellule B. Inoltre, l'IVIG satura i recettori Fc neonatali (FcRn), modula la rete delle citochine, induce l'apoptosi delle cellule immunitarie, neutralizza gli autoanticorpi patogeni mediante interazione anti-idiotipica, inibisce l'attivazione dei complementi e regola il repertorio delle cellule B. ADCC, citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente; Recettori FcγR, Fcγ; NK, cellula killer naturale

³³¹ Llewelyn MB, Hawkins RE, Russell SJ.

Discovery of antibodies.

BMJ. 1992 Nov 21;305(6864):1269-72. doi: 10.1136/bmj.305.6864.1269.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1883762/>

³³² Kaufmann SH.

Immunology's foundation: the 100-year anniversary of the Nobel Prize to Paul Ehrlich and Elie Metchnikoff.

Nat Immunol. 2008 Jul;9(7):705-12. doi: 10.1038/ni0708-705.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18563076/>

³³³ Rixe N, Tavarez MM.

Serum Sickness. [Updated 2022 May 2]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538312/>

³³⁴ Taylor PC, Adams AC, Hufford MM, de la Torre I, Winthrop K, Gottlieb RL.

Neutralizing monoclonal antibodies for treatment of COVID-19.

Nat Rev Immunol. 2021 Jun;21(6):382-393. doi: 10.1038/s41577-021-00542-x.

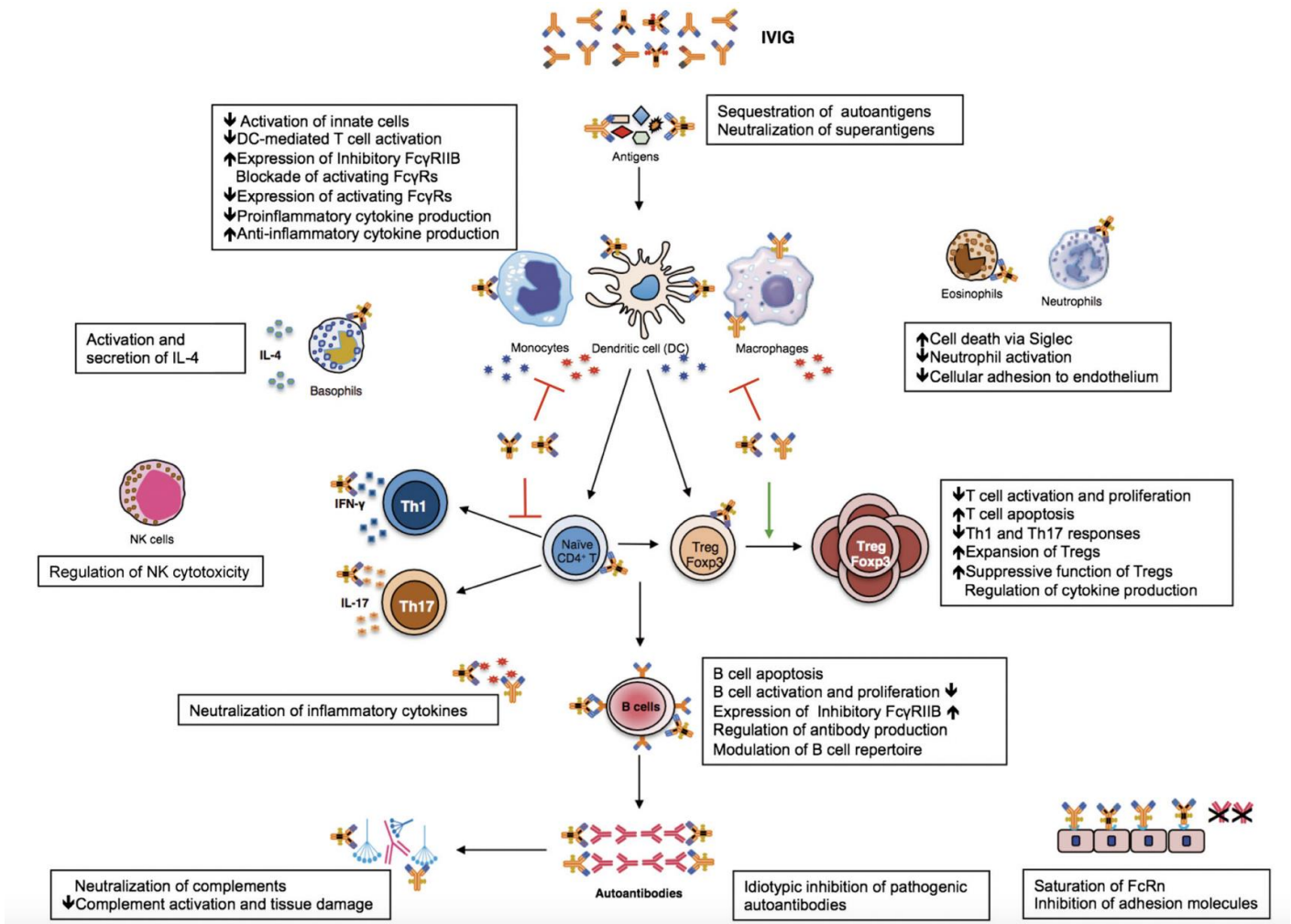
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8054133/>

Maddur MS, Lacroix-Desmazes S, Dimitrov JD, Kazatchkine MD, Bayry J, Kaveri SV.

Natural Antibodies: from First-Line Defense Against Pathogens to Perpetual Immune Homeostasis.

Clin Rev Allergy Immunol. 2020 Apr;58(2):213-228. doi: 10.1007/s12016-019-08746-9.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31161341/>



Il trattamento con plasma convalescente (CP) prevede la raccolta di plasma da pazienti in via di guarigione, cioè che hanno affrontato una malattia infettiva e sono stati curati con successo (noto come paziente convalescente), con l'intenzione di somministrarlo a pazienti riceventi che non hanno ancora sviluppato una risposta immunitaria adattativa efficace.³³⁵

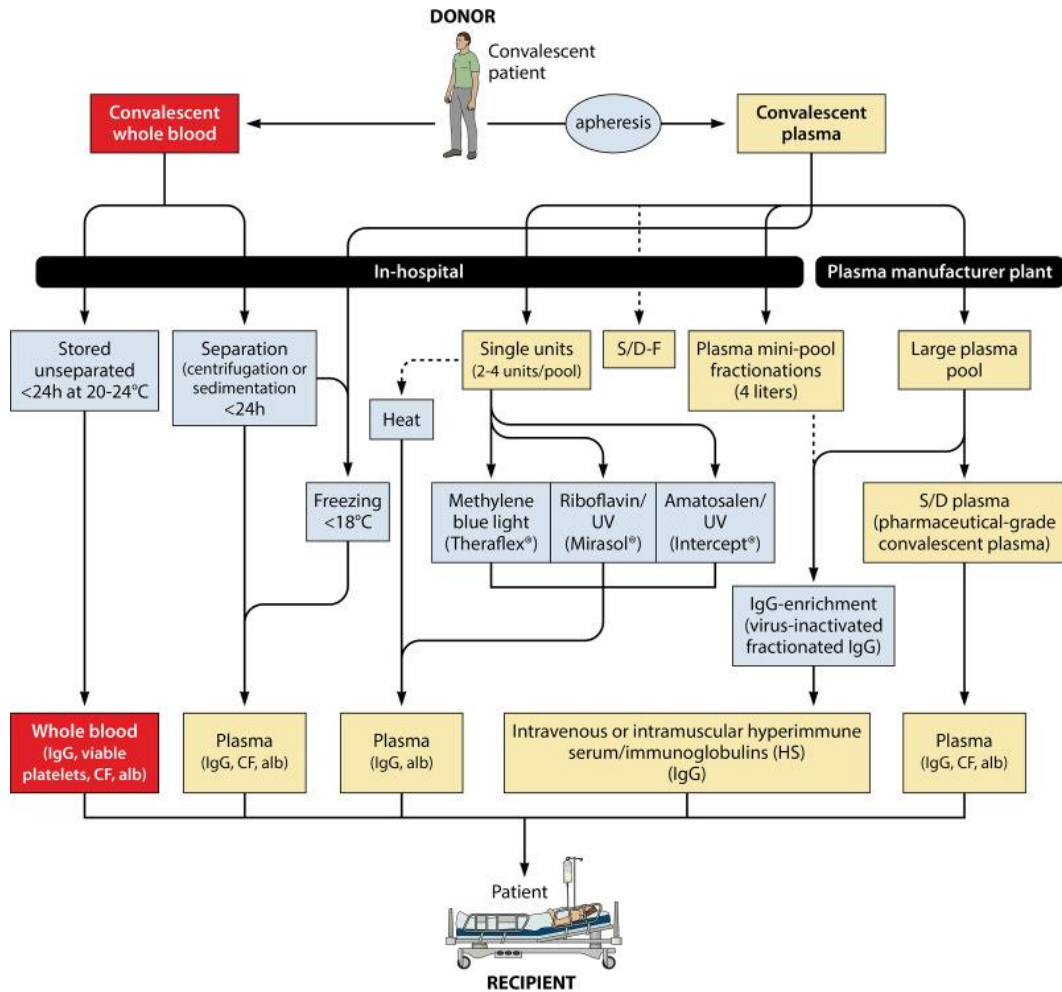
L'obiettivo principale di questo trattamento è ridurre la carica virale (viremia) nel ricevente mediante l'azione di neutralizzazione degli anticorpi prodotti dal donatore, che può verificarsi tra 10 e 14 giorni dopo l'infezione.³³⁶

³³⁵ Brown BL, McCullough J. Treatment for emerging viruses: Convalescent plasma and COVID-19. *Transfus Apher Sci.* 2020 Jun;59(3):102790. doi: 10.1016/j.transci.2020.102790. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7194745/>

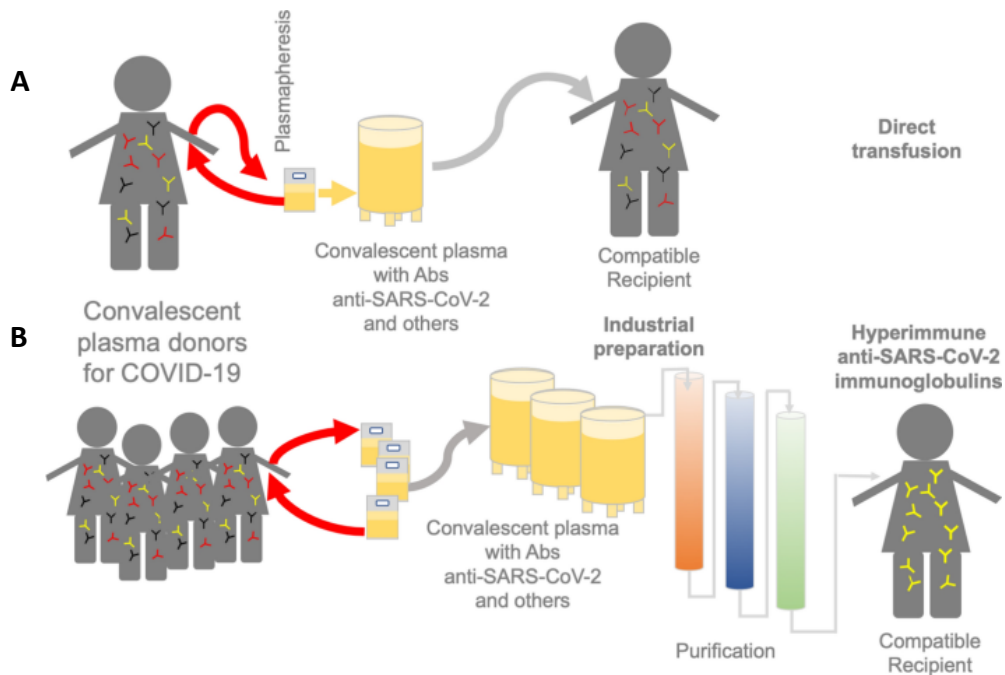
Luke TC, Kilbane EM, Jackson JL, Hoffman SL. Meta-analysis: convalescent blood products for Spanish influenza pneumonia: a future H5N1 treatment? *Ann Intern Med.* 2006 Oct 17;145(8):599-609. doi: 10.7326/0003-4819-145-8-200610170-00139 <https://www.acpjournals.org/doi/10.7326/0003-4819-145-8-200610170-00139>

³³⁶ Cheng Y, Wong R, Soo YO, Wong WS, Lee CK, Ng MH, Chan P, Wong KC, Leung CB, Cheng G. Use of convalescent plasma therapy in SARS patients in Hong Kong. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2005 Jan;24(1):44-6. doi: 10.1007/s10096-004-1271-9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7088355/>

Focosi D, Anderson AO, Tang JW, Tuccori M. Convalescent Plasma Therapy for COVID-19: State of the Art. *Clin Microbiol Rev.* 2020 Aug 12;33(4):e00072-20. doi: 10.1128/CMR.00072-20. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7430293/>



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7430293/>
 Riassunto dei possibili emoderivati convalescenti (CBP). Vedi testo dell'articolo per la spiegazione.



<https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-021-01576-5>
 Metodi di estrazione e somministrazione del Plasma Convalescente (CP). **A)** un donatore convalescente che ha sviluppato anticorpi dopo la guarigione dalla malattia potrebbe donare plasma (di solito attraverso la plasmafesi) che include anticorpi contro il SARS-CoV-2 per la trasfusione diretta e altri anticorpi (immunità passiva) a pazienti con sintomi gravi della malattia. **B)** il plasma da un gruppo di donatori potrebbe essere utilizzato per identificare

e purificare anticorpi specifici contro SARS-CoV-2, eliminando altri anticorpi e proteine, rendendo questo metodo un'alternativa per l'immunizzazione passiva.

Un fattore cruciale per il successo della terapia con CP è la selezione dei donatori, poiché uno dei principali problemi che sono stati identificati è la diversità delle varianti virali riscontrate nella popolazione e del titolo anticorpale neutralizzante in diversi campioni di plasma.³³⁷

Pertanto, è necessario assicurarsi che il plasma contenga una concentrazione adeguata di anticorpi neutralizzanti, determinare il titolo anticorpale e utilizzare un test di neutralizzazione *in vitro* con le varianti del virus. Inoltre, devono essere considerati i potenziali effetti collaterali della terapia con CP, in particolare l'incompatibilità sierica nei riceventi³³⁸.

Come già visto, la terapia CP è stata utilizzata per trattare i pazienti con infezione da SARS-CoV, MERS-CoV, influenza pandemica H1N1 2009 e affetti da malattia da EBOV³³⁹, ed è stato dimostrato che nella fase critica dell'infezione riduce la carica virale e il tasso di mortalità.³⁴⁰ Sulla base di questi risultati, il CP di pazienti con

³³⁷ Cunningham AC, Goh HP, Koh D.

Treatment of COVID-19: old tricks for new challenges.
Crit Care. 2020 Mar 16;24(1):91. doi: 10.1186/s13054-020-2818-6.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7076992/>

³³⁸ Li L, et al

Effect of convalescent plasma therapy on time to clinical improvement in patients with severe and life-threatening covid-19: a randomized clinical trial.
JAMA. 2020 Aug 4;324(5):460-470. doi: 10.1001/jama.2020.10044. Erratum in: JAMA. 2020 Aug 4;324(5):519.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7270883/>.

Salazar E, et al

Convalescent plasma anti-SARS-CoV-2 spike protein ectodomain and receptor-binding domain IgG correlate with virus neutralization.
J Clin Invest. 2020 Dec 1;130(12):6728-6738. doi: 10.1172/JCI141206.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7685744/>

Arabi YM, et al

Feasibility of Using Convalescent Plasma Immunotherapy for MERS-CoV Infection, Saudi Arabia.
Emerg Infect Dis. 2016 Sep;22(9):1554-61. doi: 10.3201/eid2209.151164.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4994343/>

Klein SL, et al

Sex, age, and hospitalization drive antibody responses in a COVID-19 convalescent plasma donor population.
J Clin Invest. 2020 Nov 2;130(11):6141-6150. doi: 10.1172/JCI142004.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7598041/>

Franchini M, Marano G, Velati C, Pati I, Pupella S, Maria Liumbruno G.
Operational protocol for donation of anti-COVID-19 convalescent plasma in Italy.
Vox Sang. 2021 Jan;116(1):136-137. doi: 10.1111/vox.12940.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7264735/>

³³⁹ Stockman LJ, Bellamy R, Garner P.

SARS: systematic review of treatment effects.
PLoS Med. 2006 Sep;3(9):e343. doi: 10.1371/journal.pmed.0030343.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1564166/>

Ko JH, et al

Challenges of convalescent plasma infusion therapy in Middle East respiratory coronavirus infection: a single centre experience.
Antivir Ther. 2018;23(7):617-622. doi: 10.3851/IMP3243.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29923831/>

Khalenkov A, He Y, Reed JL, Kreil TR, McVey J, Norton M, Scott J, Scott DE.

Characterization of source plasma from self-identified vaccinated or convalescent donors during the 2009 H1N1 pandemic.
Transfusion. 2018 May;58(5):1108-1116. doi: 10.1111/trf.14530.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29446442/>

Dean CL, Hooper JW, Dye JM, Zak SE, Koepsell SA, Corash L, Benjamin RJ, Kwilas S, Bonds S, Winkler AM, Kraft CS.

Characterization of Ebola convalescent plasma donor immune response and psoralen treated plasma in the United States.
Transfusion. 2020 May;60(5):1024-1031. doi: 10.1111/trf.15739.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32129478/>

³⁴⁰ Cheng Y, Wong R, Soo YO, Wong WS, Lee CK, Ng MH, Chan P, Wong KC, Leung CB, Cheng G.

Use of convalescent plasma therapy in SARS patients in Hong Kong.

infezione da SARS-CoV-2 è stato somministrato come terapia sperimentale in pazienti critici, insieme all'uso di immunoglobuline policlonali e derivati plasmatici isolati e purificati dal sangue dei sopravvissuti alla COVID-19 con risultati molto promettenti.³⁴¹

La somministrazione di CP nei pazienti porta ad un incremento dei titoli di IgG e IgM neutralizzanti,³⁴² una diminuzione della mortalità a breve termine nei pazienti con grave insufficienza respiratoria³⁴³, della

Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2005 Jan;24(1):44-6. doi: 10.1007/s10096-004-1271-9.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC708835/>

Mair-Jenkins J, Saavedra-Campos M, Baillie JK, Cleary P, Khaw FM, Lim WS, Makki S, Rooney KD, Nguyen-Van-Tam JS, Beck CR; Convalescent Plasma Study Group. The effectiveness of convalescent plasma and hyperimmune immunoglobulin for the treatment of severe acute respiratory infections of viral etiology: a systematic review and exploratory meta-analysis. J Infect Dis. 2015 Jan 1;211(1):80-90. doi: 10.1093/infdis/jiu396.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4264590/>

³⁴¹ Joyner MJ, et al
Early safety indicators of COVID-19 convalescent plasma in 5000 patients. J Clin Invest. 2020 Sep 1;130(9):4791-4797. doi: 10.1172/JCI140200
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7456238/>

Wu Y, Hong K, Ruan L, Yang X, Zhang J, Xu J, Pan S, Ren L, Chen L, Huang C, Shang Y. Patients with prolonged positivity of SARS-CoV-2 RNA benefit from convalescent plasma therapy: a retrospective study. Virol Sin. 2020 Dec;35(6):768-775. doi: 10.1007/s12250-020-00281-8.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7457444/>

Salazar E, et al
Treatment of Coronavirus Disease 2019 patients with convalescent plasma reveals a signal of significantly decreased mortality. Am J Pathol. 2020 Nov;190(11):2290-2303. doi: 10.1016/j.ajpath.2020.08.001.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7417901/>

Joyner MJ, et al
Effect of convalescent plasma on mortality among hospitalized patients with COVID-19: initial three-month experience. medRxiv [Preprint]. 2020 Aug 12:2020.08.12.20169359. doi: 10.1101/2020.08.12.20169359.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7430623/>

Lung T, Kazatchkine MD, Risch L, Risch M, Nydegger UE. A consideration of convalescent plasma and plasma derivatives in the care of Severely-ill patients with COVID-19. Transfus Apher Sci. 2020 Oct;59(5):102936. doi: 10.1016/j.transci.2020.102936.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7833822/>

Singh N, Pandey A
Blood Plasma from Survivors of COVID-19: A Novel and Next Frontier Approach to Fight against Pandemic Coronavirus. Int J Immunol Immunother (2020) 7:045. DOI: 10.23937/2378-3672/1410045
<https://www.clinmedjournals.org/articles/ijii/international-journal-of-immunology-and-immunotherapy-ijii-7-045.php?jid=ijii>

³⁴² Shen C, et al
Treatment of 5 critically ill patients with COVID-19 with convalescent plasma. JAMA. 2020 Apr 28;323(16):1582-1589. doi: 10.1001/jama.2020.4783.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7101507/>.

Zhang B, Liu S, Tan T, Huang W, Dong Y, Chen L, Chen Q, Zhang L, Zhong Q, Zhang X, Zou Y, Zhang S. Treatment with convalescent plasma for critically ill patients with Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection. Chest. 2020 Jul;158(1):e9-e13. doi: 10.1016/j.chest.2020.03.039.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7195335/>

Ye M, Fu D, Ren Y, Wang F, Wang D, Zhang F, Xia X, Lv T. Treatment with convalescent plasma for COVID-19 patients in Wuhan, China. J Med Virol. 2020 Oct;92(10):1890-1901. doi: 10.1002/jmv.25882.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7262027/>

Duan K, et al
Effectiveness of convalescent plasma therapy in severe COVID-19 patients. Proc Natl Acad Sci U S A. 2020 Apr 28;117(17):9490-9496. doi: 10.1073/pnas.2004168117.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7196837/>

³⁴³ Perotti C, et al
Mortality reduction in 46 severe Covid-19 patients treated with hyperimmune plasma. A proof-of-concept single arm multicenter trial. Haematologica. 2020 Dec 1;105(12):2834-2840. doi: 10.3324/haematol.2020.261784.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7716363/>.

mortalità ospedaliera e la riduzione della durata del ricovero in ospedale per i pazienti gravemente malati³⁴⁴. È stato riscontrato che il trattamento con CP è più efficiente quando viene somministrato a pazienti senza condizioni critiche o in pericolo di morte,³⁴⁵ ed è inoltre spesso accompagnato dall'integrazione di diversi farmaci, inclusi antivirali, antibiotici, antimicotici, corticosteroidi e anticoagulanti,³⁴⁶ a seconda delle esigenze del paziente, con conseguente maggiore variabilità nella risposta, e ciò rende più complesso lo studio dell'efficacia della terapia.

Linee guida per l'uso del Plasma da convalescenti COVID-19 (CCP) con tabella dei titoli anticorpali di riferimento

Convalescent Plasma

<https://www.idsociety.org/covid-19-real-time-learning-network/therapeutics-and-interventions/convalescent-plasma/>

³⁴⁴ Ibrahim D, Dulipsingh L, Zapatka L, Eadie R, Crowell R, Williams K, Wakefield DB, Cook L, Puff J, Hussain SA.

Factors associated with good patient outcomes following convalescent plasma in COVID-19: A Prospective Phase II Clinical Trial.

Infect Dis Ther. 2020 Dec;9(4):913-926. doi: 10.1007/s40121-020-00341-2.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7502154/>.

Libster R, et al Fundación INFANT–COVID-19 Group.

Early High-Titer Plasma Therapy to Prevent Severe Covid-19 in Older Adults.

N Engl J Med. 2021 Feb 18;384(7):610-618. doi: 10.1056/NEJMoa2033700.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7793608/>

³⁴⁵ Zeng QL, Yu ZJ, Gou JJ, Li GM, Ma SH, Zhang GF, Xu JH, Lin WB, Cui GL, Zhang MM, Li C, Wang ZS, Zhang ZH, Liu ZS.

Effect of convalescent plasma therapy on viral shedding and survival in patients with Coronavirus Disease 2019.

J Infect Dis. 2020 Jun 16;222(1):38-43. doi: 10.1093/infdis/jiaa228.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7197534/>

Xia X, et al

Improved clinical symptoms and mortality among patients with severe or critical COVID-19 after convalescent plasma transfusion.

Blood. 2020 Aug 6;136(6):755-759. doi: 10.1182/blood.2020007079.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7414593/>

Hartman WR, Hess AS, Connor JP.

Hospitalized COVID-19 patients treated with convalescent plasma in a mid-size city in the Midwest.

Transl Med Commun. 2020;5(1):17. doi: 10.1186/s41231-020-00068-9

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7549340/>

³⁴⁶ Hartman WR, Hess AS, Connor JP.

Hospitalized COVID-19 patients treated with convalescent plasma in a mid-size city in the Midwest.

Transl Med Commun. 2020;5(1):17. doi: 10.1186/s41231-020-00068-9.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7549340/>

Salazar E, et al

Convalescent plasma anti-SARS-CoV-2 spike protein ectodomain and receptor-binding domain IgG correlate with virus neutralization.

J Clin Invest. 2020 Dec 1;130(12):6728-6738. doi: 10.1172/JCI141206.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7685744/>

Abolghasemi H, et al

Clinical efficacy of convalescent plasma for treatment of COVID-19 infections: Results of a multicenter clinical study.

Transfus Apher Sci. 2020 Oct;59(5):102875. doi: 10.1016/j.transci.2020.102875.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7362821/>

Hegerova L, et al

Use of convalescent plasma in hospitalized patients with COVID-19: case series.

Blood. 2020 Aug 6;136(6):759-762. doi: 10.1182/blood.202006964.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7414587/>

Liu STH, et al

Convalescent plasma treatment of severe COVID-19: a propensity score-matched control study.

Nat Med. 2020 Nov;26(11):1708-1713. doi: 10.1038/s41591-020-1088-9.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32934372/>

Trasfusione di plasma da convalescenti di COVID-19

https://health.ec.europa.eu/blood-tissues-cells-and-organs/covid-19-convalescent-plasma-transfusion_it

An EU programme of COVID-19 convalescent plasma collection and transfusion Guidance on collection, testing, processing, storage, distribution and monitored use

https://health.ec.europa.eu/system/files/2021-03/guidance_plasma_covid19_en_0.pdf

COVID-19 Convalescent Plasma

<https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/therapies/anti-sars-cov-2-antibody-products/covid-19-convalescent-plasma/>

COVID-19: Convalescent plasma and hyperimmune globulin

<https://www.uptodate.com/contents/covid-19-convalescent-plasma-and-hyperimmune-globulin>

Recommendations for Investigational COVID-19 Convalescent Plasma

<https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/investigational-new-drug-applications-inds-cber-regulated-products/recommendations-investigational-covid-19-convalescent-plasma>

Tests Acceptable for Use in the Manufacture of COVID-19 Convalescent Plasma with High Titers of Anti-SARS-CoV-2 Antibodies			
Manufacturer (listed alphabetically)	Assay	Qualifying Result	Date of Listing under this EUA
Abbott	AdviseDx SARSCoV-2 IgG II (ARCHITECT and Alinity i)	≥ 1280 AU/mL	December 28, 2021
Diasorin	LIAISON SARS-CoV-2 TrimericS IgG	≥ 87 AU/mL	December 28, 2021
EUROIMMUN	Anti-SARS-CoV-2 S1 Curve ELISA (IgG)	>55 RU/mL	February 9, 2022
GenScript	cPass SARS-CoV-2 Neutralization Antibody Detection Kit	Inhibition ≥ 80%	December 28, 2021
Kantaro	COVID-SeroKlir, Kantaro Semi-Quantitative SARS-CoV-2 IgG Antibody Kit	Spike ELISA > 69 AU/mL	December 28, 2021
Ortho	VITROS Anti-SARS-CoV-2 IgG Quantitative Reagent Pack	>200 BAU/mL	December 28, 2021
Roche	Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S	> 210 U/mL	December 28, 2021

<https://www.fda.gov/media/141477/download>

Tabella dei test accettabili per l'uso nella produzione di plasma convalescente COVID-19 con titoli elevati di anticorpi anti-SARS-CoV-2

ADE e plasma da convalescenti

Lo studio di Okuya et al già citato³⁴⁷, ha rilevato la presenza di anticorpi neutralizzanti nella maggior parte dei sieri in fase di convalescenza testati raccolti a 28–73 giorni dopo l'insorgenza della malattia (mediana 47; IQR 38,5–50,5), mentre più della metà di essi mostrava FcγRIIIa- o C1q -attività ADE mediata.

³⁴⁷ Okuya K, Hattori T, Saito T, Takadate Y, Sasaki M, Furuyama W, Marzi A, Ohiro Y, Konno S, Hattori T, Takada A. Multiple Routes of Antibody-Dependent Enhancement of SARS-CoV-2 Infection. Microbiol Spectr. 2022 Apr 27;10(2):e0155321. doi: 10.1128/spectrum.01553-21. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9045191/>

Considerando la presenza di anticorpi che potenzialmente aggravano l'infezione da SARS-CoV-2, l'ADE potrebbe sollevare un potenziale problema per l'immunizzazione passiva con plasma convalescente COVID-19, nonché la sua utilità terapeutica contro le varianti SARS-CoV-2³⁴⁸.

Clark et al,³⁴⁹ per rispondere a questo importante quesito, hanno quantificato gli anticorpi anti-S degli isotipi IgG, IgA e IgM e analizzato i profili di neutralizzazione dei campioni di plasma da convalescenti COVID-19 (CCP).

Un test di infettività basato sullo pseudotipo retrovirale è stato adattato per studiare il titolo di neutralizzazione delle unità CCP nelle cellule che esprimono i recettori ACE2 da soli o in combinazione con FcαR o FcγRIIA.

I risultati hanno dimostrato che, mentre l'attività neutralizzante del CCP si correla meglio con titoli più elevati di anticorpi anti-S IgG, il titolo neutralizzante non veniva influenzato quando i recettori Fc erano presenti sulle cellule bersaglio. Queste osservazioni supportano l'assenza dell'ADE da parte degli isotipi IgG e IgA trovati nel CCP.

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2021.637642/full>

Potenziali meccanismi di infezione dei monociti e potenziamento immunitario nel COVID-19 grave. **(a)** L'infezione mediata dal recettore delle cellule bersaglio da parte del SARS-CoV-2 si ottiene legando il dominio di legame del recettore virale (RBD) con l'ACE2 legato alla membrana dell'ospite, che consente la scissione proteasomale da parte del TMPRSS2 della spike virale di membrana per consentire la fusione delle membrane virus-ospite; **(b)** Nel potenziamento anticorpo-dipendente (ADE), il legame del complesso virus-anticorpo a un recettore Fc gamma stabilizza la spike virale in un modo che imita la funzione del recettore virale, consentendo la scissione della membrana virale e la fusione delle membrane virus-ospite; **(c)** L'induzione di autoanticorpi può derivare dal mimetismo molecolare da parte di proteine virali aventi una sequenza simile alle proteine dell'ospite, anticorpi anti-idiotipi con reattività crociata ai recettori dell'ospite o rottura diretta della tolleranza immunologica, che può essere indotta dall'iperattivazione di TLR7 (non mostrato); **(d)** L'aumento della gravità della malattia può derivare da risposte immunitarie disadattative al virus SARS-CoV-2. L'infezione virale di monociti/macrofagi può contribuire alla patologia infiammatoria, attivando la segnalazione delle citochine a valle e le vie di differenziazione cellulare. Le risposte infiammatorie possono anche essere indotte dall'attivazione di recettori di riconoscimento del pattern, inclusi i recettori RIG-I-like (RLR), i recettori Toll-like (TLR) e i recettori della lectina di tipo C (CLR). I recettori espressi sulla membrana cellulare immunitaria mediano l'adesione delle glicoproteine della membrana virale, contribuendo potenzialmente all'infettività stabilizzando il virus sulla membrana della cellula ospite. L'attivazione dei recettori della via del complemento da parte delle glicoproteine virali o delle proteine bersaglio legate agli anticorpi può produrre danni ai tessuti inducendo citotossicità complemento-dipendente (CDC). La reticolazione dei recettori Fc gamma da parte degli immunocomplessi può indurre citotossicità cellulare anticorpo-dipendente (ADCC) e il rilascio di trappole extracellulari di neutrofili (non mostrate). L'elevata espressione di citochine e chemochine promuove il reclutamento cellulare, una maggiore permeabilità vascolare e danni infiammatori ai tessuti infetti

³⁴⁸ Volz E, et al

Transmission of SARS-CoV-2 Lineage B.1.1.7 in England: Insights from linking epidemiological and genetic data
Nature. 2021 May;593(7858):266-269. doi: 10.1038/s41586-021-03470-x.
<https://eprints.whiterose.ac.uk/175263/1/2020.12.30.20249034v2.full.pdf>

Tegally H, et al

Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa.
Nature. 2021 Apr;592(7854):438-443. doi: 10.1038/s41586-021-03402-9.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33690265/>

Lauring AS, Hodcroft EB.

Genetic Variants of SARS-CoV-2-What Do They Mean?
JAMA. 2021 Feb 9;325(6):529-531. doi: 10.1001/jama.2020.27124.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33404586/>

Faria NR, et al

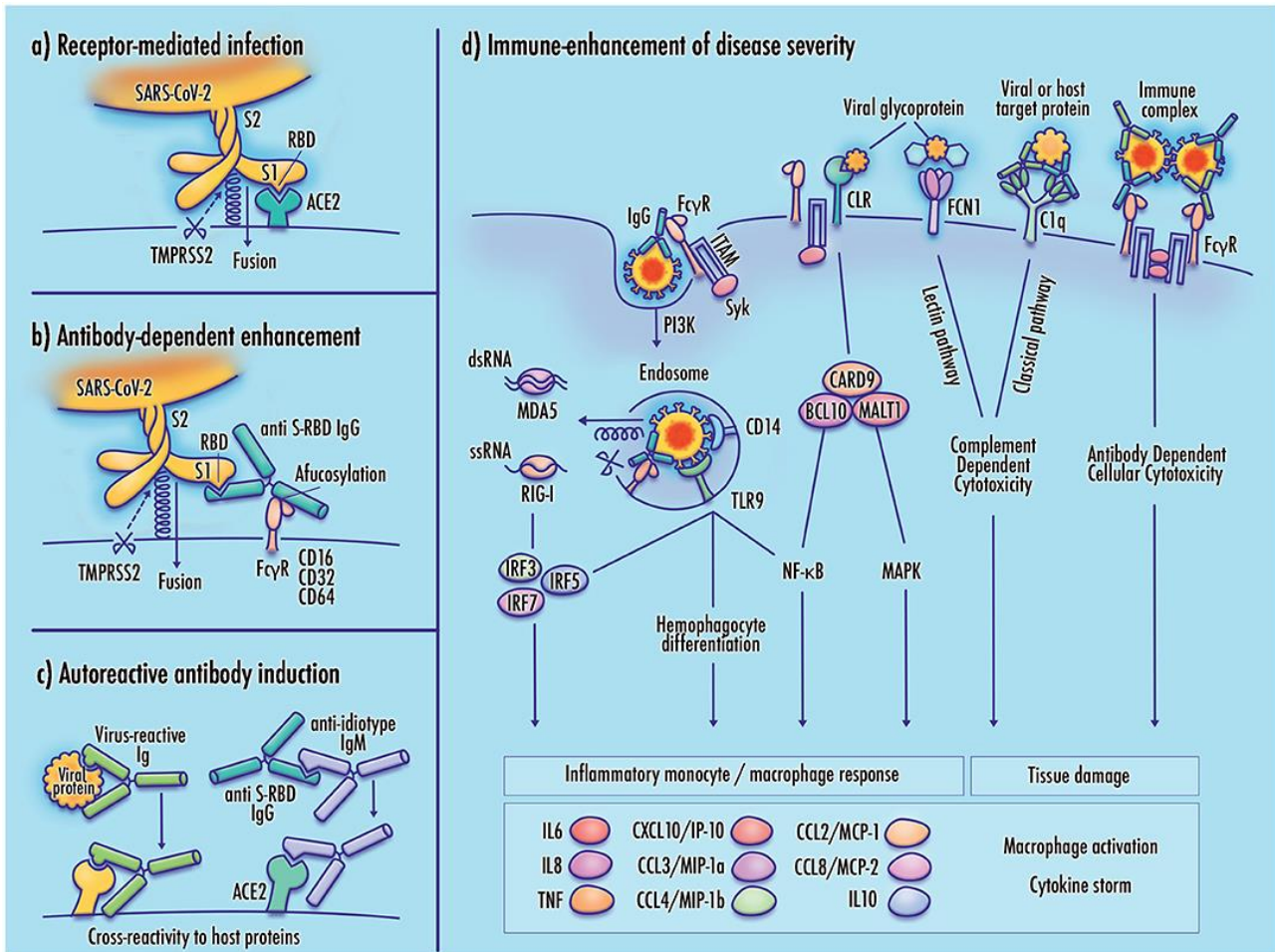
Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil.
Science. 2021 May 21;372(6544):815-821. doi: 10.1126/science.abh2644.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8139423/>

Lee WS, et al

Decay of Fc-dependent antibody functions after mild to moderate COVID-19.
Cell Rep Med. 2021 Jun 15;2(6):100296. doi: 10.1016/j.xcrm.2021.100296.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8106889/>

³⁴⁹ Clark NM, Janaka SK, Hartman W, Stramer S, Goodhue E, Weiss J, Evans DT, Connor JP.

Anti-SARS-CoV-2 IgG and IgA antibodies in COVID-19 convalescent plasma do not enhance viral infection.
PLoS One. 2022 Mar 8;17(3):e0257930. doi: 10.1371/journal.pone.0257930.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8903276/>



Studi clinici italiani di efficacia del plasma da convalescenti

Lo studio di coorte retrospettivo pubblicato a marzo 2022 di Franchini, Gligani e De Donno et al *“Convalescent Plasma for Hospitalized COVID-19 Patients: A Single-Center Experience”*³⁵⁰, riporta l'esperienza dell'ospedale cittadino di Mantova sull'uso compassionevole del CCP nei pazienti ricoverati per COVID-19 grave. Tra aprile 2020 e aprile 2021, 405 pazienti COVID-19 consecutivi hanno ricevuto 657 unità di CCP³⁵¹ con un titolo mediano di anticorpi neutralizzanti anti-SARS-CoV-2 (nAb)³⁵² di 160 (intervallo interquartile (IQR), 80–320).

³⁵⁰ Franchini M, et al
On behalf of convalescent plasma study group. convalescent plasma for hospitalized COVID-19 Patients: a single-center experience. Life (Basel). 2022 Mar 14;12(3):420. doi: 10.3390/life12030420. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8950373/>

³⁵¹ Franchini M., Marano G., Velati C., Pati I., Pupella S., Maria Liembruno G.
Operational protocol for donation of anti-COVID-19 convalescent plasma in Italy. Vox Sang. 2021;116:136–137. doi: 10.1111/vox.12940. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7264735/>

Accorsi P., Berti P., de Angelis V., De Silvestro G., Mascaretti L., Ostuni A.
Position paper on the preparation of immune plasma to be used in the treatment of patients with COVID-19. Transfus. Apher. Sci. 2020;59:102817. doi: 10.1016/j.transci.2020.102817. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7239775/>

³⁵² Perotti C., Del Fante C., Baldanti F., Franchini M., Percivalle E., Nepita E.V., Seminari E., De Silvestri A., Bruno R., Klersy C.
Plasma from donors recovered from the new Coronavirus 2019 as therapy for critical patients with COVID-19 (COVID-19 plasma study): A multicentre study protocol. Intern. Emerg. Med. 2020;15:819–824. doi: 10.1007/s11739-020-02384-2. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8849045/>

Il test di neutralizzazione SARS-CoV-2 per la titolazione degli anticorpi neutralizzanti è stato eseguito presso l'Unità di Virologia Molecolare dell'Azienda Ospedaliera Universitaria di Pavia ed è stato basato sulla determinazione dell'effetto citopatico.

Articoli di riferimento per la metodica:

- [Mortality reduction in 46 patients with severe COVID-19 treated with hyperimmune plasma. A proof-of-concept, single-arm, multicenter trial.](#)
- [Plasma from donors recovered from the new Coronavirus 2019 as therapy for critical patients with COVID-19 \(COVID-19 plasma study\): A multicentre study protocol.](#)

La loro età media era di 68 anni (IQR, 56-78 anni) e il 62% erano maschi. All'arruolamento, il 55% dei pazienti presentava un aumento dell'indice di massa corporea (BMI) e il 25,6% presentava almeno tre comorbidità. Il tasso di mortalità grezzo a 28 giorni era del 12,6% (51/405). La giovane età (<68 anni), la malattia lieve (ricovero in reparti a bassa intensità) e il trattamento precoce (<7 giorni dall'esordio dei sintomi) con titolo elevato di nAb (≥ 320) sono stati associati in modo indipendente con una risposta favorevole al trattamento con CCP.

Non sono stati registrati problemi di sicurezza, con un tasso di reazioni avverse correlate al CCP (tutte di lieve intensità) dell'1,3%. Altri studi sull'uso del plasma iperimmune per il trattamento della Covid-19 da parte del gruppo del Dr. De Donno hanno confermato la validità di questo approccio, anche in donne in gravidanza.³⁵³

Perotti C., Baldanti F., Bruno R., Del Fante C., Seminari E., Casari S., Percivale E., Glingani C., Musella V., Belliato V., et al.
Mortality reduction in 46 patients with severe COVID-19 treated with hyperimmune plasma. A proof-of-concept, single-arm, multicenter trial.
Haematologica. 2020;105:2834. doi: 10.3324/haematol.2020.261784.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8950373/>

Franchini M., Mengoli C., Caruso B., Petilino R., Ballotari A., Glingani C.
Measuring accuracy of the neutralizing activity of COVID-19 convalescent plasma.
Clin. Chem. Lab. Med. 2021;60:e4–e6. doi: 10.1515/cclm-2021-0810.
<https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/cclm-2021-0810/html>

Luther A. et al
Outcomes of convalescent plasma with defined high- versus lower-neutralizing antibody titers against SARS-CoV-2 among hospitalized patients: CoronaVirus Inactivating Plasma (CoVIP), double-blind phase 2 study
medRxiv 2022.04.29.22274387; doi: <https://doi.org/10.1101/2022.04.29.22274387>
<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2022.04.29.22274387v1.full.pdf>

Focosi D, Franchini M.
Clinical predictors of SARS-CoV-2 neutralizing antibody titers in COVID-19 convalescents: Implications for convalescent plasma donor recruitment.
Eur J Haematol. 2021 Jul;107(1):24-28. doi: 10.1111/ejh.13630.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8250676/>

Gilchuk P, et al
Standardized two-step testing of antibody activity in COVID-19 convalescent plasma.
iScience. 2022 Jan 21;25(1):103602. doi: 10.1016/j.isci.2021.103602.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8653399/>

³⁵³ Franchini M, Glingani C, Bellani A, Cicorella N, Amadini A, De Donno G, Casari S.
Early and persistent viral clearance in COVID-19 patients treated with convalescent plasma.
Transfus Clin Biol. 2021 Aug;28(3):309-310. doi: 10.1016/j.tracli.2021.04.003.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8055517/>

Franchini M, et al
Safety and Efficacy of Convalescent Plasma in Elderly COVID-19 Patients: The RESCUE Trial.
Mayo Clin Proc Innov Qual Outcomes. 2021 Apr;5(2):403-412. doi: 10.1016/j.mayocpiqo.2021.01.010
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7869678/>

Perotti C, et al
Covid-Plasma Task Force. Mortality reduction in 46 severe Covid-19 patients treated with hyperimmune plasma. A proof-of-concept single arm multicenter trial.
Haematologica. 2020 Dec 1;105(12):2834-2840. doi: 10.3324/haematol.2020.261784.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7716363/>

Ugualmente, lo studio randomizzato controllato di De Silvestro et al “*Outcome of SARS CoV-2 in patients treated with convalescent plasma: One-year of data from the Veneto region (Italy) Registry*”³⁵⁴ riporta che dei 1.517 pazienti trattati con CCP, 209 sono deceduti al follow-up di 30 giorni (14%).

La morte era significativamente associata a un'età più avanzata, un tempo di ricovero più lungo prima dell'infusione di PCC, un maggior numero di criteri di inclusione) e comorbidità associate.

Le condizioni significativamente associate con un'aumentata frequenza di morte erano $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200$ e tachipnea con $\text{RR} > 30$ all'ingresso, concomitante ipertensione arteriosa, malattie cardiovascolari, malattia renale cronica, dislipidemia e cancro.

Inoltre, i fattori che hanno portato a una prognosi sfavorevole sono stati una malattia potenzialmente fatale, il ricovero in unità di terapia intensiva, l'ossigenoterapia ad alto flusso o la ventilazione meccanica e un'area di consolidamento evidenziabile da una radiografia del torace.

Dall'analisi dei referti dei pazienti ospedalizzati, è stato effettuato un confronto della mortalità per fascia di età, rispetto alla serie di pazienti trattati con CCP.

La mortalità è stata complessivamente inferiore nei pazienti trattati con CCP (14% vs 25%), soprattutto nel gruppo dei pazienti anziani (23% vs 40%), con una forte significatività ($p < 0,001$).

Per quanto riguarda la sicurezza della somministrazione del CCP, sono stati registrati 16 eventi avversi su un totale di 3.937 TF (therapeutic fraction) trasfusi (0,4%).

APPROFONDIMENTO

LA RISPOSTA ANTICORPALE NATURALE E VACCINALE

La riduzione dell'infettività virale mediante il legame degli anticorpi alla superficie delle particelle virali (virioni) è chiamata neutralizzazione, e agisce bloccando la fase del ciclo di replicazione virale che precede la trascrizione o la sintesi codificata dal virus.³⁵⁵

Classicamente il termine veniva applicato solo ad anticorpi e frammenti di anticorpi, Fab e F(ab')₂, ma in seguito è stato esteso a frammenti ricombinanti a dominio singolo leganti l'antigene e nanocorpi naturali³⁵⁶.

Una risposta immunitaria ottimale contro i virus dipende da diverse funzioni degli anticorpi:

- (1) funzioni effettrici volte all'eliminazione delle cellule infette,
- (2) potenziamento della risposta dell'immunità antivirale endogena dell'ospite e

Grisolia G, et al

Convalescent plasma for coronavirus disease 2019 in pregnancy: a case report and review. *Am J Obstet Gynecol MFM*. 2020 Aug;2(3):100174. doi: 10.1016/j.ajogmf.2020.100174. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7332432/>

³⁵⁴ De Silvestro G, et al Veneto Hospitals.

Outcome of SARS CoV-2 inpatients treated with convalescent plasma: One-year of data from the Veneto region (Italy) Registry. *Eur J Intern Med*. 2022 Mar;97:42-49. doi: 10.1016/j.ejim.2021.12.023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8710400/>

³⁵⁵ Klasse PJ, Sattentau QJ.

Occupancy and mechanism in antibody-mediated neutralization of animal viruses. *J Gen Virol*. 2002 Sep;83(Pt 9):2091-2108. doi: 10.1099/0022-1317-83-9-2091. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12185262/>

³⁵⁶ <https://didattica-2000.archived.uniroma2.it/Immunotecnologia/deposito/LeScienze.pdf>

<https://www.proteogenix.science/it/produzione-di-anticorpi/phage-display-antibody-library-screening-services/produzione-anticorpi-vhh-dominio-singolo/>

https://en.wikipedia.org/wiki/Single-domain_antibody

(3) neutralizzazione del virus, prevenendo l'infezione iniziale e diffusione virale.³⁵⁷

Esistono numerosi meccanismi effettori degli anticorpi, come la citotossicità cellulare anticorpo-dipendente (ADCC), la fagocitosi cellulare anticorpo-dipendente (ADCP) e la citotossicità complemento-dipendente mediata da anticorpi (CDC), ciascuno diretto alla rimozione delle cellule infette.³⁵⁸

Nella figura seguente sono illustrati i meccanismi di neutralizzazione (Figura 2B) riferiti al blocco della fase iniziale del ciclo di replicazione virale (Fig. 2A).³⁵⁹

I virus con involucro entrano nella cellula ospite legandosi al recettore sulla superficie cellulare, mentre i virus senza involucro entrano attraverso la lisi della membrana cellulare o creando pori nella membrana.

La fusione del virus (senza involucro/con involucro) con la membrana della cellula ospite richiede particolari cambiamenti conformazionali nella proteina virale indotti da un basso pH negli endosomi.³⁶⁰

<https://www.mdpi.com/2076-393X/9/12/1376/htm>

Interazione di SARS-CoV-2 con i suoi recettori e meccanismi di neutralizzazione. **(A)** S1 contiene il dominio di legame del recettore (RBD) e si lega direttamente ad ACE2 per ottenere l'ingresso nelle cellule ospiti. **(B)** Meccanismi neutralizzanti: (1) NAb legati alla proteina legante il recettore (S) e bloccano la sua interazione con ACE2; (2) il virione stabilisce il contatto tra la sua proteina di legame e il recettore sulla superficie cellulare e i NAb bloccano le fasi successive, come il legame a un corecettore; (3) il virione sta per fondersi con la membrana cellulare, ma i NAb sono legati a proteine che non sono essenziali per il legame del recettore cellulare ma esercitano cambiamenti conformazionali che non consentono l'internalizzazione del

³⁵⁷ Dörner T, Radbruch A.

Antibodies and B cell memory in viral immunity. *Immunity*. 2007 Sep;27(3):384-92. doi: 10.1016/j.immuni.2007.09.002. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.09.002>

Hua CK, Ackerman ME.

Increasing the Clinical Potential and Applications of Anti-HIV Antibodies. *Front Immunol*. 2017 Nov 28;8:1655. doi: 10.3389/fimmu.2017.01655. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5712301/>

Murin CD, Wilson IA, Ward AB.

Antibody responses to viral infections: a structural perspective across three different enveloped viruses. *Nat Microbiol*. 2019 May;4(5):734-747. doi: 10.1038/s41564-019-0392-y. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6818971/>

³⁵⁸ van Erp EA, Luytjes W, Ferwerda G, van Kasteren PB.

Fc-Mediated Antibody Effector Functions During Respiratory Syncytial Virus Infection and Disease. *Front Immunol*. 2019 Mar 22;10:548. doi: 10.3389/fimmu.2019.00548. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6438959/>

Lu LL, Suscovich TJ, Fortune SM, Alter G.

Beyond binding: antibody effector functions in infectious diseases. *Nat Rev Immunol*. 2018 Jan;18(1):46-61. doi: 10.1038/nri.2017.106. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6369690/>

³⁵⁹ Klasse PJ.

Neutralization of Virus Infectivity by Antibodies: Old Problems in New Perspectives. *Adv Biol*. 2014;2014:157895. doi: 10.1155/2014/157895. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4835181/>.

Cheedarla, N.; Hanna, L.E.

Chapter 7-Functional and Protective Role of Neutralizing Antibodies (NAbs) Against Viral Infections. In *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry*; Buddolla, V., Ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2019; pp. 83–93. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816328-3.00007-6>

³⁶⁰ Ali MG, Zhang Z, Gao Q, Pan M, Rowan EG, Zhang J.

Recent advances in therapeutic applications of neutralizing antibodies for virus infections: an overview. *Immunol Res*. 2020 Dec;68(6):325-339. doi: 10.1007/s12026-020-09159-z. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7648849/>

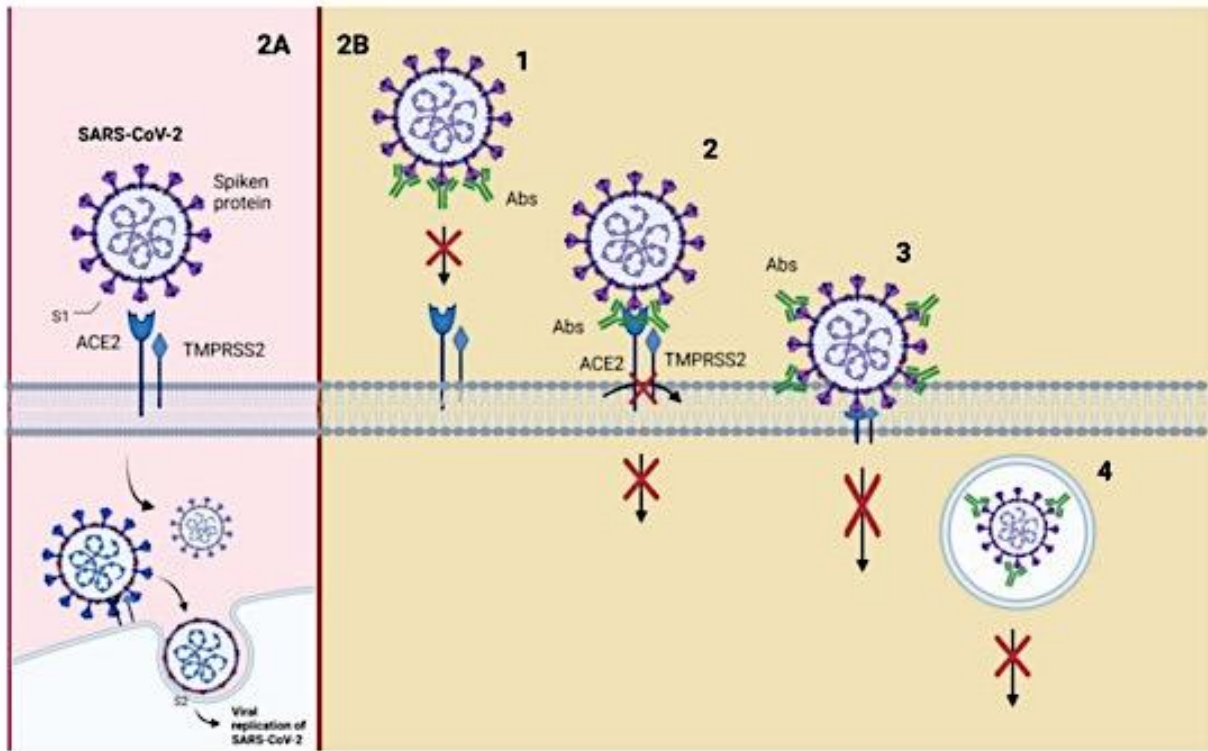
Dimitrov DS.

Virus entry: molecular mechanisms and biomedical applications. *Nat Rev Microbiol*. 2004 Feb;2(2):109-22. doi: 10.1038/nrmicro817. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7097642/>

Thorley JA, McKeating JA, Rappoport JZ.

Mechanisms of viral entry: sneaking in the front door. *Protoplasma*. 2010 Aug;244(1-4):15-24. doi: 10.1007/s00709-010-0152-6. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3038234/>

virus con la membrana cellulare; (4) I NAb impediscono al virione di fondere il suo involucro con la membrana vescicolare (endosoma) e iniziano la replicazione virale, e il legame dell'anticorpo al virus inibisce i cambiamenti conformazionali necessari per la fusione della membrana. Abbreviazioni: ACE2, enzima di conversione dell'angiotensina 2; TMPRSS2, proteasi della serina transmembrana 2.



La neutralizzazione può avvenire attraverso più meccanismi:

- (1) I NAb si legano alle proteine della superficie virale e bloccano la loro interazione con il recettore della cellula ospite e di conseguenza l'infezione;³⁶¹
- (2) I NAb si legano agli epitopi proteici virali che interagiscono con i co-recettori delle cellule ospiti fondamentali per l'infezione virale;³⁶²

³⁶¹ Zhou G, Zhao Q.
Perspectives on therapeutic neutralizing antibodies against the Novel Coronavirus SARS-CoV-2.
Int J Biol Sci. 2020 Mar 15;16(10):1718-1723. doi: 10.7150/ijbs.45123.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7098029/>

Zheng Q, et al
Viral neutralization by antibody-imposed physical disruption.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2019 Dec 9;116(52):26933-40. doi: 10.1073/pnas.1916028116.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6936700/>

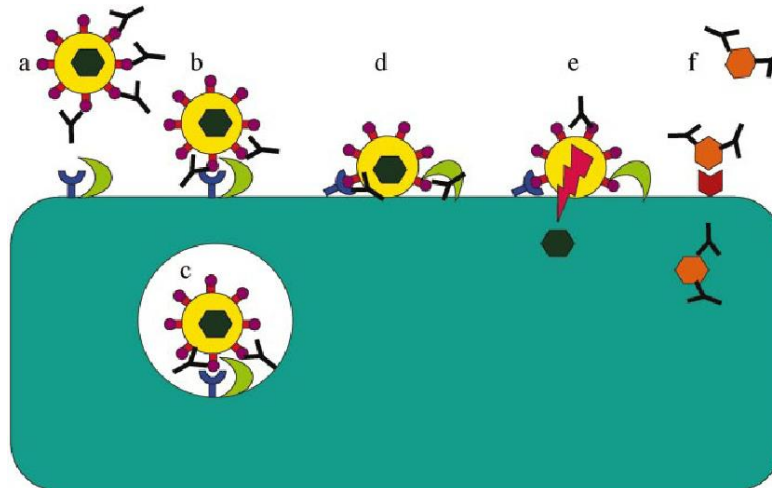
³⁶² Klasse PJ.
Neutralization of Virus Infectivity by Antibodies: Old Problems in New Perspectives.
Adv Biol. 2014;2014:157895. doi: 10.1155/2014/157895.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4835181/>

Klasse PJ, Bron R, Marsh M.
Mechanisms of enveloped virus entry into animal cells.
Adv Drug Deliv Rev. 1998 Oct 5;34(1):65-91. doi: 10.1016/s0169-409x(98)00002-7.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7125647/>

Reading SA, Dimmock NJ.
Neutralization of animal virus infectivity by antibody.
Arch Virol. 2007;152(6):1047-59. doi: 10.1007/s00705-006-0923-8.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17516034/>

(3) I NAb si legano ad epitopi virali non essenziali per il legame al recettore della cellula ospite ma sono necessari per i cambiamenti conformazionali indotti per la fusione della membrana.³⁶³

Questi meccanismi possono essere classificati come inibizione dell'ingresso del virus nelle cellule ospiti; altri meccanismi possono indurre l'inibizione post-legame. Alcuni virus infatti richiedono l'internalizzazione e una diminuzione del pH per innescare cambiamenti conformazionali ed eseguire la fusione della membrana virale.³⁶⁴



https://www.researchgate.net/figure/Mechanisms-of-virus-neutralization-by-Ab-a-Ab-binding-to-a-proportion-of-the_fig1_11202732

Meccanismi di neutralizzazione del virus da parte di Ab. **(a)** Il legame di Ab ad una parte delle strutture interattive del recettore sul virione può bloccare l'attacco del virus alla superficie delle cellule bersaglio. Nell'esempio schematico mostrato, gli Abs sono legati a spike proteiche su un virus con involucro, a cui viene quindi impedito di entrare in contatto con uno dei due recettori della superficie cellulare che utilizza per l'aggancio e l'ingresso. **(b)** È stato dimostrato che l'inibizione da parte di Ab delle interazioni tra la proteina dell'involucro virale e i recettori della superficie cellulare si verifica dopo che il virione si è attaccato legandosi tramite i recettori. Ad esempio, un recettore può fungere da punto di attacco e da innesco di cambiamenti conformazionali che consentono interazioni con un corecettore, che a sua volta media eventi successivi come la fusione della membrana. Un'interferenza da parte di Ab con uno qualsiasi di questi legami necessari in una catena di eventi che portano all'ingresso costituirebbe un meccanismo di neutralizzazione. **(c)** Per infettare, alcuni virus richiedono l'internalizzazione per endocitosi e l'abbassamento del pH nell'endosoma come fattore scatenante dei cambiamenti conformazionali nelle proteine virali. Vengono mostrati gli anticorpi che non hanno bloccato l'aggancio del virus ma hanno consentito l'internalizzazione. Il blocco delle interazioni necessarie tra le proteine virali e della membrana cellulare ritarderebbe o impedirebbe la penetrazione del nucleo virale nel citoplasma della cellula bersaglio. Il virione può quindi essere infine distrutto attraverso la degradazione lisosomiale. Tali effetti di Ab costituirebbero un meccanismo di neutralizzazione del virus. Inoltre, il dirottamento mediato da Ab dei virus che entrano in maniera preferenziale direttamente attraverso la superficie cellulare in un compartimento endosomiale meno permissivo può abrogare l'infettività. **(d)** L'intercalazione di Ab nell'interfaccia di fusione tra la membrana cellulare e l'involucro di un virus può bloccare la fusione sulla superficie cellulare, come illustrato, o in un endosoma. **(e)** È stato ipotizzato che anche un'occupazione molto bassa di anticorpi sul virione può causare cambiamenti globali o interni trasmettendo un segnale attraverso l'involucro virale o lo strato esterno. Questi ipotetici cambiamenti

³⁶³ Nelson CD, Palermo LM, Hafenstein SL, Parrish CR.

Different mechanisms of antibody-mediated neutralization of parvoviruses revealed using the Fab fragments of monoclonal antibodies.

Virology. 2007 May 10;361(2):283-93. doi: 10.1016/j.virol.2006.11.032.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1991280/>.

Xiao Y, Dong X, Chen YH.

Neutralizing antibodies mechanism of neutralization and protective activity against HIV-1.

Immunol Res. 2002;25(3):193-200. doi: 10.1385/IR:25:3:193.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12018459/>

Klasse PJ, Sattentau QJ.

Occupancy and mechanism in antibody-mediated neutralization of animal viruses.

J Gen Virol. 2002 Sep;83(Pt 9):2091-2108. doi: 10.1099/0022-1317-83-9-2091.

https://www.researchgate.net/publication/11202732_Occupancy_and_mechanism_in_antibody-mediated_neutralization_of_animal_viruses

³⁶⁴ Ali MG, Zhang Z, Gao Q, Pan M, Rowan EG, Zhang J.

Recent advances in therapeutic applications of neutralizing antibodies for virus infections: an overview.

Immunol Res. 2020 Dec;68(6):325-339. doi: 10.1007/s12026-020-09159-z.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7648849/>

Marsh M, Helenius A.

Virus entry: open sesame.

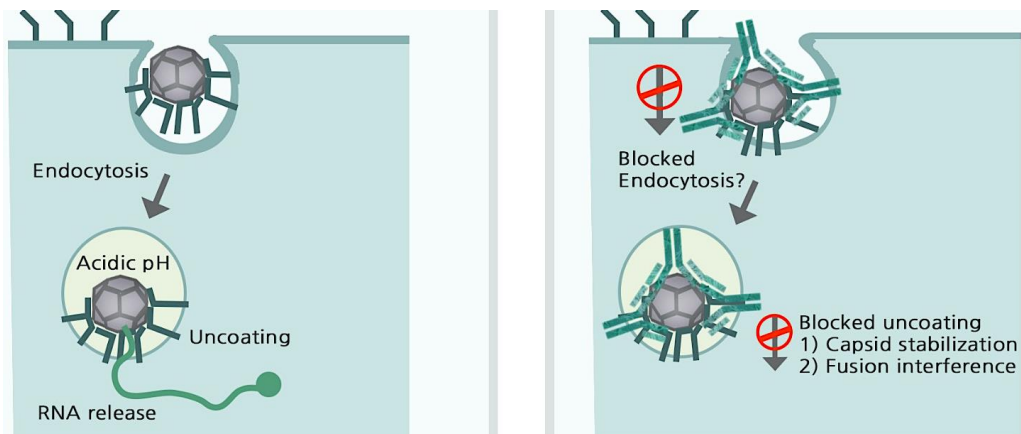
Cell. 2006 Feb 24;124(4):729-40. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.007.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7112260/>

permetterebbero al nucleo virale di entrare nel citoplasma ma comprometterebbero ulteriori passaggi replicativi. (f) La neutralizzazione dei virus nudi potrebbe potenzialmente differire da quella dei virus con involucro. Sebbene in diversi casi sia stato dimostrato che i virus nudi sono neutralizzati da un blocco dell'aggancio virale alle cellule bersaglio, come in (a), anche gli effetti conformazionali sull'intero virione mediante il legame Ab sono stati registrati come spostamenti pI [spostamento del pH isoelettrico: valore di pH al quale una molecola presenta carica elettrica netta nulla]. Viene mostrata la possibilità che il complesso Ab-virione entri nel citoplasma e che l'Ab blocchi ulteriori eventi replicativi.

Un quarto meccanismo di neutralizzazione può verificarsi una volta che il virus si trova all'interno degli endosomi e l'associazione degli anticorpi alle proteine di superficie virali inibisce i cambiamenti necessari per la fusione della membrana virale, provocandone la neutralizzazione.

Quest'ultimo meccanismo potrebbe prendere di mira particelle virali con involucro e nude, ed è noto come neutralizzazione post-internalizzazione.³⁶⁵



<https://bpsbioscience.com/sars-cov-2-antibody-detection>

Ad oggi, non è chiaro se tutti i meccanismi di neutralizzazione descritti avvengano in tutti i virus, ma molto probabilmente non è così; infatti, il meccanismo attivato dipenderà dal bersaglio della proteina virale, sia esso un virus con o senza involucro.

Generazione e caratteristiche di un anticorpo neutralizzante

Una caratteristica dell'immunità umorale è la produzione di anticorpi, la cui affinità per l'antigene si sviluppa durante la risposta immunitaria, processo noto come maturazione dell'affinità.³⁶⁶

La maturazione dell'affinità si basa sulla mutazione somatica dei geni germinali dell'immunoglobulina, un processo chiamato ipermutazione somatica (SHM), che consiste in mutazioni puntiformi eseguite dalla proteina citosina deaminasi indotta dall'attivazione (AID), in grado di indurre una maggiore affinità degli anticorpi o, viceversa, una diminuzione dell'affinità.³⁶⁷

³⁶⁵ Jiang S, Du L. Effect of Low-Pathogenic Human Coronavirus-Specific Antibodies on SARS-CoV-2. Trends Immunol. 2020 Oct;41(10):853-854. doi: 10.1016/j.it.2020.08.003 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7418642/>

Padilla-Quirarte HO, Lopez-Guerrero DV, Gutierrez-Xicotencatl L, Esquivel-Guadarrama F. Protective Antibodies Against Influenza Proteins. Front Immunol. 2019 Jul 18;10:1677. doi: 10.3389/fimmu.2019.01677. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6657620/>

³⁶⁶ Tas JM, Mesin L, Pasqual G, Targ S, Jacobsen JT, Mano YM, Chen CS, Weill JC, Reynaud CA, Browne EP, Meyer-Hermann M, Victora GD. Visualizing antibody affinity maturation in germinal centers. Science. 2016 Mar 4;351(6277):1048-54. doi: 10.1126/science.aad3439. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4938154/>

³⁶⁷ Pilzecker B, Jacobs H. Mutating for Good: DNA Damage Responses During Somatic Hypermutation. Front Immunol. 2019 Mar 12;10:438. doi: 10.3389/fimmu.2019.00438. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6423074/>

Teng G, Papavasiliou FN. Immunoglobulin somatic hypermutation.

Questo processo viene svolto nei centri germinali (GC), microstrutture specializzate formate nei tessuti linfoidei secondari in seguito a infezione o immunizzazione, che producono plasmacellule a vita lunga e cellule B di memoria e proteggono dalla reinfezione.³⁶⁸

I GC sono organizzati in due regioni, la zona oscura (DZ) e la zona chiara (LZ).³⁶⁹ Nella DZ sono presenti cellule B chiamate centroblasti ad alto tasso di proliferazione ed SHM.³⁷⁰

I centroblasti entrano nella LZ diventando centroцити, dove catturano ed elaborano gli antigeni presenti sulle cellule dendritiche follicolari (FDC)³⁷¹ e successivamente presentano peptidi antigenici alle cellule T follicolari helper (Tfh) per ricevere segnali critici di sopravvivenza ed essere sottoposti a selezione.³⁷²

Le FDC hanno la capacità di trattenere l'antigene nativo per svolgere il processo precedente, ed inoltre producono citochine che supportano la sopravvivenza delle cellule B selezionate.³⁷³

Nella LZ si verifica anche la ricombinazione a commutazione di classe (CSR), in cui la regione costante della catena pesante dell'anticorpo viene modificata, consentendo ai linfociti B di produrre anticorpi IgG, IgA o IgE.³⁷⁴

Annu Rev Genet. 2007;41:107-20. doi: 10.1146/annurev.genet.41.110306.130340.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17576170/>

³⁶⁸ Stebegg M, Kumar SD, Silva-Cayetano A, Fonseca VR, Linterman MA, Graca L.
Regulation of the Germinal Center Response.
Front Immunol. 2018 Oct 25;9:2469. doi: 10.3389/fimmu.2018.02469.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6209676/>

³⁶⁹ Oropallo MA, Cerutti A.
Germinal center reaction: antigen affinity and presentation explain it all.
Trends Immunol. 2014 Jul;35(7):287-9. doi: 10.1016/j.it.2014.06.001.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4174395/>

³⁷⁰ Pilzecker B, Jacobs H.
Mutating for Good: DNA Damage Responses During Somatic Hypermutation.
Front Immunol. 2019 Mar 12;10:438. doi: 10.3389/fimmu.2019.00438.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6423074/>

Nouri N, Kleinstein SH.
Somatic hypermutation analysis for improved identification of B cell clonal families from next-generation sequencing data.
PLoS Comput Biol. 2020 Jun 23;16(6):e1007977. doi: 10.1371/journal.pcbi.1007977.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7347241/>

³⁷¹ Mesin L, Ersching J, Victora GD.
Germinal Center B Cell Dynamics.
Immunity. 2016 Sep 20;45(3):471-482. doi: 10.1016/j.immuni.2016.09.001.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5123673/>

Stavnezer J, Guikema JE, Schrader CE.
Mechanism and regulation of class switch recombination.
Annu Rev Immunol. 2008;26:261-92. doi: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090248.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2707252/>

³⁷² Liechti T.
CD40 signaling-germinal center b cells go at their own pace.
Cytometry A. 2019 Apr;95(4):419-421. doi: 10.1002/cyto.a.23639.
<https://doi.org/10.1002/cyto.a.23639>

Zhang M, Srivastava G, Lu L.
The pre-B cell receptor and its function during B cell development.
Cell Mol Immunol. 2004 Apr;1(2):89-94. PMID: 16212894.
<http://www.cmi.ustc.edu.cn/1/2/89.pdf>

³⁷³ Papa I, Vinuesa CG.
Synaptic Interactions in Germinal Centers.
Front Immunol. 2018 Aug 13;9:1858. doi: 10.3389/fimmu.2018.01858.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6099157/>

³⁷⁴ Chen Z, Wang JH.
Signaling control of antibody isotype switching.
Adv Immunol. 2019;141:105-164. doi: 10.1016/bs.ai.2019.01.001.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7875453/>

Nella fase finale del processo nel centro germinale, i centrociti escono dal GC come cellule B di memoria o plasmacellule che secernono anticorpi ad alta affinità.³⁷⁵

In particolare, le plasmacellule risiedono nel midollo osseo e secernono in maniera costitutiva anticorpi, non possiedono recettori BCR, non si riattivano con la riesposizione antigenica e sono responsabili della produzione di anticorpi sierici per anni dopo l'infezione o la vaccinazione.³⁷⁶

Dall'altra parte, i linfociti B di memoria esprimono BCR ma non secernono anticorpi costitutivamente. Quando si incontrano nuovamente con l'antigene, possono riattivarsi e formare GC per produrre anticorpi con una maggiore affinità; inoltre, queste cellule possono dare origine a plasmacellule e risiedere in circolo o nel tessuto linfoide periferico.³⁷⁷

Approfondimento

Immunità umorale

Jhamnani RD, Nunes-Santos CJ, Bergerson J, Rosenzweig SD.
Class-Switch Recombination (CSR)/Hyper-IgM (HIGM) Syndromes and Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K) Defects.
Front Immunol. 2018 Sep 26;9:2172. doi: 10.3389/fimmu.2018.02172.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6168630/>

³⁷⁵ Ruth H Florese and Marjorie Robert-Guroff
Non-neutralizing antibodies and vaccine-induced protection against HIV
Future HIV Therapy 2007 1:3, 259-271
<https://doi.org/10.2217/17469600.1.3.259>

³⁷⁶ Brynjolfsson SF, Persson Berg L, Olsen Ekerhult T, Rimkute I, Wick M-J, Mårtensson I-L and Grimsholm O
Long-Lived Plasma Cells in Mice and Men.
Front. Immunol. (2018) 9:2673. doi: 10.3389/fimmu.2018.02673
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.02673/full>

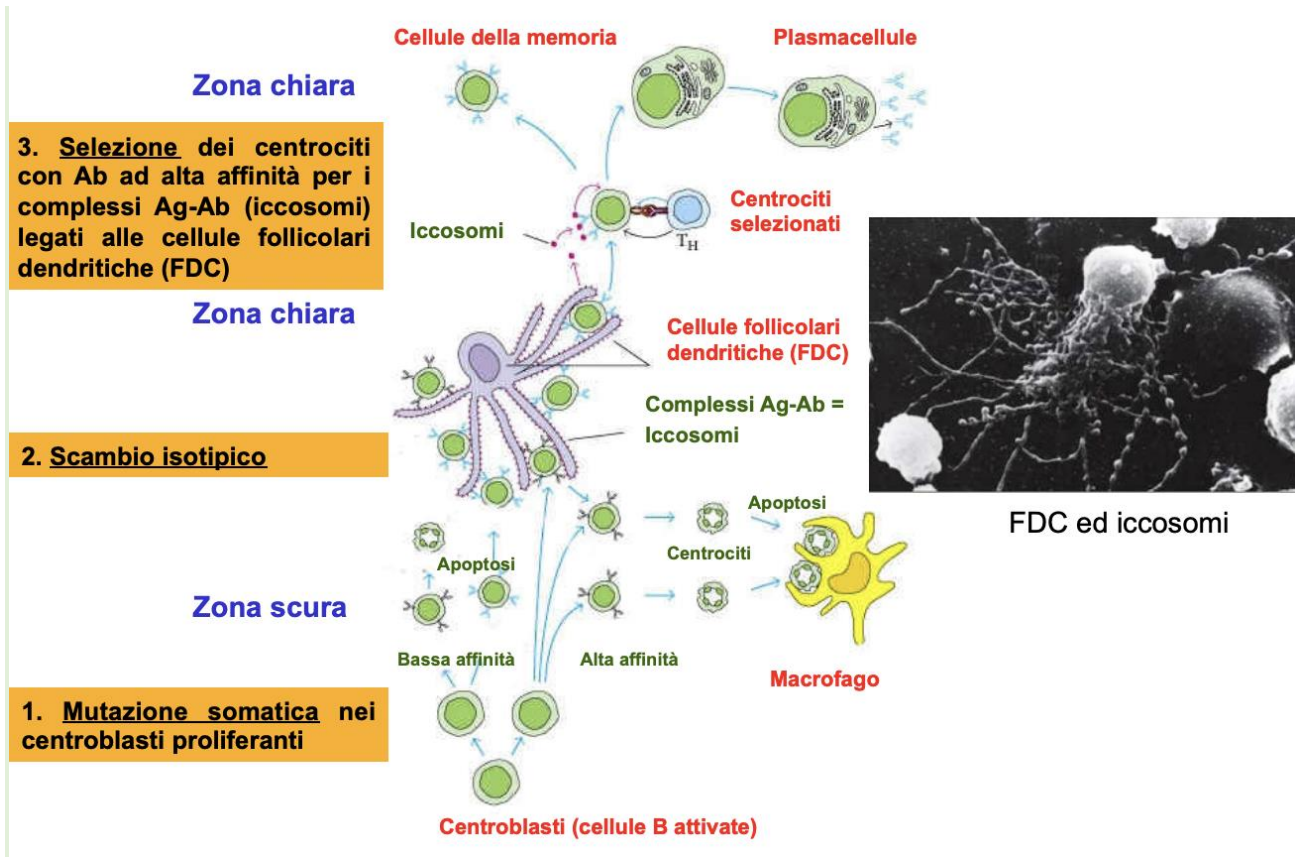
Lightman SM, Utley A, Lee KP.
Survival of Long-Lived Plasma Cells (LLPC): Piecing Together the Puzzle.
Front Immunol. 2019 May 3;10:965. doi: 10.3389/fimmu.2019.00965.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6510054/>

Slifka MK, Antia R, Whitmire JK, Ahmed R.
Humoral immunity due to long-lived plasma cells.
Immunity. 1998 Mar;8(3):363-72. doi: 10.1016/s1074-7613(00)80541-5
[https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80541-5](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80541-5)

³⁷⁷ Akkaya M, Kwak K, Pierce SK.
B cell memory: building two walls of protection against pathogens.
Nat Rev Immunol. 2020 Apr;20(4):229-238. doi: 10.1038/s41577-019-0244-2.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7223087/>

Weisel F, Shlomchik M.
Memory B Cells of Mice and Humans.
Annu Rev Immunol. 2017 Apr 26;35:255-284. doi: 10.1146/annurev-immunol-041015-055531.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28142324/>

Wong R, Bhattacharya D.
Basics of memory B-cell responses: lessons from and for the real world.
Immunology. 2019 Feb;156(2):120-129. doi: 10.1111/imm.13019.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6328991/>



Caratteristiche delle sottoclassi di immunoglobuline

Le sottoclassi IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 differiscono per le dimensioni della regione cerniera (la posizione dei legami disolfuro tra le catene e il peso molecolare), in particolare IgG3 ha un peso molecolare di 170 kDa, mentre gli altri sottotipi hanno un peso molecolare di 146 kDa.³⁷⁸

IgG1 e IgG3 sono solitamente prodotti in risposta alle proteine; IgG2 e IgG4 sono prodotti in risposta agli antigeni dei carboidrati; inoltre, l'IgG4 subisce un processo chiamato Fab-arm exchange (FAE), in cui vengono creati anticorpi bi-specifici e funzionalmente monovalenti.

Ciò contribuisce alle proprietà antinfiammatorie delle IgG4 e ne limita la capacità di formare immunocomplessi e attivare il complemento.³⁷⁹

Le sottoclassi differiscono anche nella loro capacità di attivare il complemento o legarsi e reagire con i recettori Fc nelle cellule fagocitiche.³⁸⁰

L'attivazione del complemento da parte di IgG1 e IgG3 è 40 volte superiore a quella di IgG2,³⁸¹ mentre la sottoclasse IgG4 non è in grado di attivare la via classica del complemento. Sulla base di ciò, IgG1 e IgG3 sono

³⁷⁸ Vukovic N, van Elsas A, Verbeek JS, Zaiss DMW. Isotype selection for antibody-based cancer therapy. Clin Exp Immunol. 2021 Mar;203(3):351-365. doi: 10.1111/cei.13545. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7874837/>

³⁷⁹ Davies AM, Sutton BJ. Human IgG4: a structural perspective. Immunol Rev. 2015 Nov;268(1):139-59. doi: 10.1111/imr.12349. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4670484/>

³⁸⁰ Demonbreun AR, Sancilio A, Velez MP, Ryan DT, Saber R, Vaught LA, Reiser NL, Hsieh RR, D'Aquila RT, Mustanski B, McNally EM, McDade TW. Comparison of IgG and neutralizing antibody responses after one or two doses of COVID-19 mRNA vaccine in previously infected and uninfected individuals. EClinicalMedicine. 2021 Aug;38:101018. doi: 10.1016/j.eclinm.2021.101018. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8276631/>

³⁸¹ Palm AE, Henry C. Remembrance of Things Past: Long-Term B Cell Memory After Infection and Vaccination.

le sottoclassi di IgG più legate all'attività NAb contro i virus con involucro, in quanto mirano principalmente ai peptidi derivati da proteine virali.

Per quanto riguarda SARS-CoV-2, Kallolimath et al. hanno evidenziato che le IgG3 manifestano una potenza di neutralizzazione fino a 50 volte superiore rispetto a quella delle altre sottoclassi di IgG.³⁸²

Le IgA nel siero sono principalmente monomeriche e comprendono circa il 90% di IgA1 e il 10% di IgA2.

In IgA2, generalmente non ci sono legami disolfuro a catena da leggera a pesante; piuttosto, c'è un ponte disolfuro tra le catene leggere quando si formano i dimeri.³⁸³

Un mediatore chiave della funzione effettrice di IgA è FcαRI, il quale può innescare diversi processi di eliminazione da parte di neutrofili, monociti, eosinofili e alcuni macrofagi e cellule dendritiche.³⁸⁴

L'IgA non attiva il classico percorso del complemento, pertanto una delle principali differenze tra IgG e IgA in termini di funzioni è la capacità di attivare il complemento.

Nel caso del SARS-CoV-2, Sterlin et al. hanno dimostrato che l'IgA1 domina la risposta dei NAb, raggiungendo i suoi valori massimi tre settimane dopo l'infezione; questa predominanza di sottoclasse può essere spiegata perché i polmoni (e gli altri tessuti danneggiati dal virus) sono costituiti principalmente da tessuto mucoso.

È stato proposto che la maggiore flessibilità e la cerniera più lunga in IgA1 rispetto alle IgG sarebbero più favorevoli per le interazioni tra le immunoglobuline e il trimero del SARS-CoV-2.³⁸⁵

Per quanto riguarda i livelli di IgM, è essenziale tenere conto del fatto che è la prima immunoglobulina ad apparire, ma le sue azioni sono più dirette alle funzioni effettrici mediate dalla sua struttura pentamerica in grado di attivare il complemento attraverso la via classica, mediante il legame di C1q alle regioni Fc di queste immunoglobuline.³⁸⁶ Tuttavia, l'IgM, attraverso il suo FcμR, come si approfondirà in seguito, ha un ruolo nello sviluppo, nella maturazione e nell'attivazione delle cellule B, nelle risposte immunitarie umorali, la difesa dell'ospite e la tolleranza immunologica.³⁸⁷

Front Immunol. 2019 Jul 31;10:1787. doi: 10.3389/fimmu.2019.01787.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6685390/>

³⁸² Kallolimath S, Sun L, Palt R, Stiasny K, Mayrhofer P, Gruber C, Kogelmann B, Chen Q, Steinkellner H. Highly active engineered IgG3 antibodies against SARS-CoV-2. Proc Natl Acad Sci U S A. 2021 Oct 1;118(42):e2107249118. doi: 10.1073/pnas.2107249118. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8545452/>

³⁸³ Corthésy B. Multi-faceted functions of secretory IgA at mucosal surfaces. Front Immunol. 2013 Jul 12;4:185. doi: 10.3389/fimmu.2013.00185. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3709412/>

³⁸⁴ Woof JM, Russell MW. Structure and function relationships in IgA. Mucosal Immunol. 2011 Nov;4(6):590-7. doi: 10.1038/mi.2011.39. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21937984/>

³⁸⁵ Sterlin D, et al. IgA dominates the early neutralizing antibody response to SARS-CoV-2. Sci Transl Med. 2021 Jan 20;13(577):eabd2223. doi: 10.1126/scitranslmed.abd2223. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7857408/>

³⁸⁶ Sharp TH, Boyle AL, Diebold CA, Kros A, Koster AJ, Gros P. Insights into IgM-mediated complement activation based on in situ structures of IgM-C1-C4b. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019 Jun 11;116(24):11900-11905. doi: 10.1073/pnas.1901841116. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6575175/>.

Daha NA, Banda NK, Roos A, Beurskens FJ, Bakker JM, Daha MR, Trouw LA. Complement activation by (auto-) antibodies. Mol Immunol. 2011 Aug;48(14):1656-65. doi: 10.1016/j.molimm.2011.04.024. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21757235/>

³⁸⁷ Liu J, Wang Y, Xiong E, Hong R, Lu Q, Ohno H, Wang JY. Role of the IgM Fc Receptor in Immunity and Tolerance. Front Immunol. 2019 Mar 22;10:529. doi: 10.3389/fimmu.2019.00529. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6438924/>

Anticorpi neutralizzanti e SARS-Cov-2

I NAbs indotti da vaccini o infezioni naturali svolgono ruoli cruciali nel controllo delle infezioni virali.³⁸⁸ Nell'infezione da SARS-CoV-2, gli epitopi che si legano ai NAbs si trovano prevalentemente nel dominio di legame del recettore (RBD) della proteina "S" virale.³⁸⁹

Lo sviluppo di vaccini contro SARS-CoV-2 si è mosso ad una velocità senza precedenti, tuttavia gli sviluppatori di vaccini non disponevano di un sistema omogeneo per misurare le risposte immunitarie dopo la vaccinazione, il che rendeva difficili i confronti dell'immunogenicità.

Iniziative come CEPI Global Centralized Laboratory Network sono state lanciate per l'armonizzazione della valutazione della risposta immunitaria tra i candidati al vaccino COVID-19.

Uno strumento chiave per questa armonizzazione è l'uso globale di uno standard internazionale per calibrare tutti i saggi su un'unità arbitraria; pertanto, è stato proposto che i risultati dell'immunogenicità debbano essere riportati come unità standard internazionale (IU/mL) per gli anticorpi neutralizzanti.³⁹⁰

Lo standard internazionale si basa sul plasma umano da pazienti convalescenti, liofilizzato in fiale, con un'unità assegnata di 250 UI/fiala per l'attività neutralizzante.³⁹¹

NAbs indotti da Infezioni naturali e loro ruolo protettivo

Nell'infezione naturale, la maggior parte dei pazienti infettati da SARS-CoV-2 sviluppa titoli variabili di NAbs tra i giorni 14 e 20 dopo l'infezione.³⁹²

Alcuni studi hanno dimostrato che la maggior parte dei pazienti presentava risposte anticorpali SARS-CoV-2 rilevabili fino a 13 mesi dopo l'infezione, dando la speranza che potesse durare anche più a lungo del previsto.³⁹³

Flacco et al in uno studio di coorte retrospettivo su 1.293.941 pazienti fino a febbraio 2022 hanno riscontrato che l'incidenza di reinfezione dopo 18-22 mesi dall'infezione primaria era del 6.7 ‰ suggerendo quindi che la protezione conferita dall'immunità naturale possa durare oltre i 12 mesi.³⁹⁴

³⁸⁸ Jiang S, Hillyer C, Du L.

Neutralizing Antibodies against SARS-CoV-2 and Other Human Coronaviruses.

Trends Immunol. 2020 May;41(5):355-359. doi: 10.1016/j.it.2020.03.007. Epub 2020 Apr 2. Erratum in: Trends Immunol. 2020 Apr 24

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7129017/>

³⁸⁹ Putcharoen O, et al

Early detection of neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 in COVID-19 patients in Thailand.

PLoS One. 2021 Feb 12;16(2):e0246864. doi: 10.1371/journal.pone.0246864.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7880427/>

³⁹⁰ Krammer F.

A correlate of protection for SARS-CoV-2 vaccines is urgently needed.

Nat Med. 2021 Jul;27(7):1147-1148. doi: 10.1038/s41591-021-01432-4.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34239135/>

³⁹¹ Kristiansen PA, Page M, Bernasconi V, Mattiuzzo G, Dull P, Makar K, Plotkin S, Knezevic I.

WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin.

Lancet. 2021 Apr 10;397(10282):1347-1348. doi: 10.1016/S0140-6736(21)00527-4.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7987302/>

³⁹² Lau EHY, Tsang OTY, Hui DSC, Kwan MYW, Chan WH, Chiu SS, Ko RLW, Chan KH, Cheng SMS, Perera RAPM, Cowling BJ, Poon LLM, Peiris M.

Neutralizing antibody titres in SARS-CoV-2 infections.

Nat Commun. 2021 Jan 4;12(1):63. doi: 10.1038/s41467-020-20247-4.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7782739/>

³⁹³ Altawalah H.

Antibody Responses to Natural SARS-CoV-2 Infection or after COVID-19 Vaccination.

Vaccines (Basel). 2021 Aug 16;9(8):910. doi: 10.3390/vaccines9080910.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8402626/>

³⁹⁴ Flacco ME, Soldato G, Acuti Martellucci C, Di Martino G, Carota R, Caponetti A, Manzoli L.

Risk of SARS-CoV-2 Reinfection 18 Months After Primary Infection: Population-Level Observational Study.

Front Public Health. 2022 May 2;10:884121. doi: 10.3389/fpubh.2022.884121.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9108359/>

Chemaitelly et al nel recente articolo “*Duration of immune protection of SARS-CoV-2 natural infection against reinfection in Qatar*”³⁹⁵ riportano un'efficacia dell'infezione primaria contro la reinfezione pre-Omicron dell'85,5% (IC 95%: 84,8-86,2%).

L'efficacia ha raggiunto il picco del 90,5% (IC 95%: 88,4-92,3%) nel 7° mese dopo l'infezione primaria, ed è scesa a circa il 70% entro il 16° mese. L'estrapolazione di questa tendenza calante utilizzando una curva di Gompertz ha suggerito un'efficacia del 50% al 22° mese e <10% al 32° mese.

L'efficacia dell'infezione primaria pre-Omicron contro la reinfezione di Omicron è stata del 38,1% (IC 95%: 36,3-39,8%) ed è diminuita con il tempo dall'infezione primaria. Una curva di Gompertz ha suggerito un'efficacia <10% entro il 15° mese.

L'efficacia dell'infezione primaria contro la reinfezione da COVID-19 grave, critica o fatale è stata del 97,3% (IC 95%: 94,9-98,6%), indipendentemente dalla variante dell'infezione primaria o della reinfezione e senza evidenza di diminuzione. Risultati simili sono stati trovati nelle analisi dei sottogruppi per quelli di età ≥50 anni.

Seow et al. hanno mostrato che la cinetica della risposta anticorpale neutralizzante è tipica di un'infezione virale acuta, con titoli anticorpali neutralizzanti in diminuzione osservati dopo un picco iniziale e che l'entità di questo picco dipende dalla gravità della malattia.³⁹⁶

Inoltre Beltran et al. hanno mostrato che titoli di neutralizzazione più elevati sono buoni predittori di sopravvivenza nei pazienti con COVID-19 grave e che i pazienti che si sono ripresi da una malattia grave hanno NABs più elevati rispetto ai pazienti con infezioni lievi o asintomatiche.³⁹⁷

Ciò può essere dovuto alla stimolazione prolungata del recettore dei linfociti B³⁹⁸ o all'elevata produzione di interferone di tipo I (IFN-I) nel corso di una malattia grave.

L'IFN-I svolge un ruolo fondamentale nelle prime fasi della risposta immunitaria virale e fa parte della risposta innata. Inoltre, induce l'attivazione delle cellule dendritiche e consente a queste cellule di presentare antigeni alle cellule T CD4⁺ e CD8⁺ naïve.³⁹⁹

Per quanto riguarda i pazienti ambulatoriali e asintomatici, Röltgen et al. hanno osservato che gli anticorpi SARS-CoV-2 diminuivano progressivamente dopo cinque mesi dall'infezione.⁴⁰⁰

³⁹⁵ Hiam Chemaitelly, et al

Duration of immune protection of SARS-CoV-2 natural infection against reinfection in Qatar
medRxiv 2022.07.06.22277306; doi:<https://doi.org/10.1101/2022.07.06.22277306>
<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2022.07.06.22277306v1.full>

³⁹⁶ Seow J, et al

Longitudinal observation and decline of neutralizing antibody responses in the three months following SARS-CoV-2 infection in humans.
Nat Microbiol. 2020 Dec;5(12):1598-1607. doi: 10.1038/s41564-020-00813-8.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7610833/>

³⁹⁷ Garcia-Beltran WF, et al

COVID-19-neutralizing antibodies predict disease severity and survival.
Cell. 2021 Jan 21;184(2):476-488.e11. doi: 10.1016/j.cell.2020.12.015.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7837114/>

Klein S, Cortese M, Winter SL, Wachsmuth-Melm M, Neufeldt CJ, Cerikan B, Stanifer ML, Boulant S, Bartenschlager R, Chlanda P.
SARS-CoV-2 structure and replication characterized by in situ cryo-electron tomography.
Nat Commun. 2020 Nov 18;11(1):5885. doi: 10.1038/s41467-020-19619-7.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7676268/>

³⁹⁸ Liu L, To KK, Chan KH, Wong YC, Zhou R, Kwan KY, Fong CH, Chen LL, Choi CY, Lu L, Tsang OT, Leung WS, To WK, Hung IF, Yuen KY, Chen Z.
High neutralizing antibody titer in intensive care unit patients with COVID-19.
Emerg Microbes Infect. 2020 Dec;9(1):1664-1670. doi: 10.1080/22221751.2020.1791738.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7473321/>

³⁹⁹ Schreiber G.

The Role of Type I Interferons in the Pathogenesis and Treatment of COVID-19.
Front Immunol. 2020 Sep 30;11:595739. doi: 10.3389/fimmu.2020.595739.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7561359/>

⁴⁰⁰ Röltgen K, et al

Defining the features and duration of antibody responses to SARS-CoV-2 infection associated with disease severity and outcome.
Sci Immunol. 2020 Dec 7;5(54):eabe0240. doi: 10.1126/sciimmunol.abe0240.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7857392/>

Dugan et al. in particolare hanno evidenziato che alcuni mesi dopo l'infezione c'era un cambiamento nella persistenza dei NABs contro la proteina S di SARS-CoV-2 e il tasso di questi NABs iniziava a diminuire, mentre c'era una transizione nella produzione di anticorpi verso bersagli virali non neutralizzanti, come NP e ORF8.⁴⁰¹ Tuttavia, altri autori hanno rilevato cellule B della memoria che producevano IgG contro la glicoproteina S ed RBD nel sangue dei pazienti COVID-19, e che quindi ci sono risposte della memoria dopo l'infezione naturale che hanno il potenziale per essere attivate e produrre rapidamente anticorpi neutralizzanti alla riesposizione al SARS-CoV-2.⁴⁰²

Lo studio "SIREN" in The Lancet ha indagato le relazioni tra la sieropositività nelle persone con precedente infezione da COVID-19 e il successivo rischio di sindrome respiratoria acuta grave dovuta all'infezione da SARS-CoV-2 nei successivi 7-12 mesi,⁴⁰³ dimostrando che l'infezione precedente ha ridotto del 93% il rischio di reinfezione sintomatica.

Un ampio studio di coorte pubblicato su JAMA Internal Medicine ha esaminato 3,2 milioni di pazienti statunitensi e ha mostrato che il rischio di infezione era significativamente inferiore (0,3%) nei pazienti sieropositivi rispetto a quelli sieronegativi (3%)⁴⁰⁴.

Ancora più importanti per la questione della durata dell'immunità sono i recenti studi che hanno dimostrato la presenza di cellule immunitarie di memoria a lunga vita in coloro che si sono ripresi dalla COVID-19.⁴⁰⁵

⁴⁰¹ Dugan HL, et al

Profiling B cell immunodominance after SARS-CoV-2 infection reveals antibody evolution to non-neutralizing viral targets. *Immunity*. 2021 Jun 8;54(6):1290-1303.e7. doi: 10.1016/j.immuni.2021.05.001. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8101792/>

⁴⁰² Rodda LB, et al

Functional SARS-CoV-2-Specific Immune Memory Persists after Mild COVID-19. *Cell*. 2021 Jan 7;184(1):169-183.e17. doi: 10.1016/j.cell.2020.11.029. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7682481/>

⁴⁰³ Hall VJ, et al Hopkins S; SIREN Study Group.

SARS-CoV-2 infection rates of antibody-positive compared with antibody-negative health-care workers in England: a large, multicentre, prospective cohort study (SIREN).

Lancet. 2021 Apr 17;397(10283):1459-1469. doi: 10.1016/S0140-6736(21)00675-9. Epub 2021 Apr 9. Erratum in: *Lancet*. 2021 May 8;397(10286):1710. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8040523/>

Block J.

Vaccinating people who have had covid-19: why doesn't natural immunity count in the US? *BMJ*. 2021 Sep 13;374:n2101. doi: 10.1136/bmj.n2101. Erratum in: *BMJ*. 2021 Sep 15;374:n2272. <https://www.bmj.com/content/374/bmj.n2101> <https://www.bmj.com/content/374/bmj.n2101/rr-0>

⁴⁰⁴ Harvey RA, et al

Association of SARS-CoV-2 Seropositive Antibody Test With Risk of Future Infection. *JAMA Intern Med*. 2021 May 1;181(5):672-679. doi: 10.1001/jamainternmed.2021.0366. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7905701/>

⁴⁰⁵ Clara Schnizer, et al the CoNAN study group

Persistent immunity after mild SARS CoV-2 infection - THE CoNAN-long term study - medRxiv 2022.07.05.22277237; doi: <https://doi.org/10.1101/2022.07.05.22277237> <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2022.07.05.22277237v1>

Turner JS, Kim W, Kalaidina E, Goss CW, Rauseo AM, Schmitz AJ, Hansen L, Haile A, Klebert MK, Pusic I, O'Halloran JA, Presti RM, Ellebedy AH. SARS-CoV-2 infection induces long-lived bone marrow plasma cells in humans. *Nature*. 2021 Jul;595(7867):421-425. doi: 10.1038/s41586-021-03647-4. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34030176/>

Wang Z, Yang X, Zhong J, Zhou Y, Tang Z, Zhou H, He J, Mei X, Tang Y, Lin B, Chen Z, McCluskey J, Yang J, Corbett AJ, Ran P. Exposure to SARS-CoV-2 generates T-cell memory in the absence of a detectable viral infection. *Nat Commun*. 2021 Mar 19;12(1):1724. doi: 10.1038/s41467-021-22036-z. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7979809/>

NAbs indotti dalla vaccinazione

Sebbene i NAb siano stati determinati per tutti i vaccini approvati, i test specifici sono variati e quindi non sono direttamente confrontabili. La maggior parte degli studi ha riportato una buona risposta umorale dopo alcuni giorni dalla vaccinazione, ma i NAb tendono a diminuire nel tempo.⁴⁰⁶

Song et al. hanno misurato la capacità di anticorpi preesistenti a causa di una precedente infezione da HCoV (SARS-CoV-1, MERS-CoV, HCoV-HKU1, HCoV-OC43, HCoV-NL63 e HCoV-229E) di neutralizzare il SARS-CoV-2. Lo studio ha mostrato che gli anticorpi preesistenti non reagiscono in modo incrociato con SARS-CoV-2 per neutralizzarli, ma le cellule B di memoria preesistenti possono reagire in modo incrociato e generare anticorpi contro il SARS-CoV-2 più rapidamente.⁴⁰⁷

Confronto tra l'immunità naturale e vaccinale

Di seguito si riporta un estratto dell'articolo "*Health-care workers recovered from natural SARS-CoV-2 infection should be exempt from mandatory vaccination edicts*"⁴⁰⁸, in cui si pongono alcune considerazioni sulla differenza tra immunità naturale e vaccinale. L'argomento sarà approfondito nel dettaglio in successivi documenti.

"Secondo l'etimologia, il vocabolo immune deriva dal latino *immunis*, che significa esente da pubblico servizio, non tassato, alleggerito.

Per estensione, il termine "immunità" significa esente da una particolare malattia infettiva, ma il termine rischia ora di essere equiparato all'esenzione dal lavoro a causa dei mandati vaccinali che sono stati implementati o proposti in alcuni paesi. Molti mandati di vaccinazione includono coloro che sono naturalmente immuni, il che costituisce un'ampia percentuale degli operatori sanitari in vista dell'esposizione al SARS-CoV-2 sul posto di lavoro.

Tuttavia, ci sono argomenti convincenti contro tali mandati unilaterali che meritano di essere ripresi dal punto di vista delle conoscenze accumulate sulle infezioni virali del tratto respiratorio e sull'immunità.

In primo luogo, è ben noto che per i virus a RNA a filamento singolo come l'influenza, l'immunità naturale dopo il recupero dall'infezione fornisce una protezione migliore rispetto alla vaccinazione, che deve essere ripetuta ogni anno a causa della diminuzione dell'immunità vaccinale.⁴⁰⁹

Lo stesso è stato dimostrato per SARS-CoV-2; in uno studio, gli individui esposti a un'infezione naturale avevano dieci volte meno probabilità di essere reinfeziti rispetto agli individui vaccinati senza infezione naturale (hazard ratio aggiustato 0,02, IC 95% 0,01–0,04 per infezione precedente vs 0,26, 0,24–0,28 per la vaccinazione).

⁴⁰⁶ Dolgin E.

COVID vaccine immunity is waning - how much does that matter?
Nature. 2021 Sep;597(7878):606-607. doi: 10.1038/d41586-021-02532-4.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34548661/>

Francesco Menegale, et al

Waning of SARS-CoV-2 vaccine-induced immunity: A systematic review and secondary data analysis
medRxiv 2022.07.04.22277225; doi: <https://doi.org/10.1101/2022.07.04.22277225>
<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2022.07.04.22277225v1.full>

⁴⁰⁷ Song G, et al

Cross-reactive serum and memory B-cell responses to spike protein in SARS-CoV-2 and endemic coronavirus infection.
Nat Commun. 2021 May 19;12(1):2938. doi: 10.1038/s41467-021-23074-3.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8134462/>

⁴⁰⁸ McGonagle DG.

Health-care workers recovered from natural SARS-CoV-2 infection should be exempt from mandatory vaccination edicts.
Lancet Rheumatol. 2022 Mar;4(3):e170. doi: 10.1016/S2665-9913(22)00038-8.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8820743/>

⁴⁰⁹ Krammer F.

The human antibody response to influenza A virus infection and vaccination.
Nat Rev Immunol. 2019 Jun;19(6):383-397. doi: 10.1038/s41577-019-0143-6.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30837674/>

Anche gli individui esposti a infezioni naturali avevano meno probabilità di essere ricoverati in ospedale con COVID-19.⁴¹⁰ [Studi effettuati in relazione all'infezione con la variante Delta hanno confermato questi risultati che saranno approfonditi nel documento sulle varianti vaccinali.⁴¹¹]

In secondo luogo, prima della pandemia di COVID-19, era un principio ben consolidato che, sebbene la vaccinazione sistemica contro i patogeni virali del tratto respiratorio protegga i vaccinati da infezioni gravi *, questi individui possono ancora trasmettere il virus a individui non vaccinati a causa della mancanza di immunità della mucosa.⁴¹²

* tale affermazione dell'autore è contestata dallo studio *"Influenza vaccine effectiveness in an Italian elderly population during the 2016-2017 season"*. Come si può notare l'efficacia della vaccinazione è stata praticamente nulla, con addirittura un aumento statisticamente significativo di ricoveri e decessi tra il gruppo dei vaccinati, rispetto ai non vaccinati, per i soggetti che hanno ricevuto il vaccino tetravalente. Infatti, la vaccinazione tetravalente è quella che presenta il rischio più alto, con un aumento medio del 47% (da 0% a ben 215%) di ricoveri per complicanze (influenza e polmoniti) e del 12% di decessi (dal 3% al 54%).⁴¹³

Pertanto, gli individui con immunità derivante da un'infezione naturale hanno probabilmente meno probabilità di trasmettere l'infezione a pazienti vulnerabili (che dovrebbero essere vaccinati essi stessi) rispetto a coloro che sono vaccinati ma non immuni naturalmente.

L'immunità a lungo termine nelle vie aeree superiori non può essere misurata direttamente e i livelli sierici di anticorpi non sono un surrogato dell'immunità delle mucose.⁴¹⁴

In terzo luogo, numerosi studi hanno dimostrato che la vaccinazione in individui con una precedente infezione naturale da SARS-CoV-2 induce la cosiddetta superimmunità (o immunità ibrida), ovvero una maggiore risposta anticorpale e dei linfociti T rispetto alla sola vaccinazione.⁴¹⁵

⁴¹⁰ Shrestha NK, Burke PC, Nowacki AS, Terpeluk P, Gordon SM. Necessity of COVID-19 Vaccination in Persons Who Have Already Had COVID-19. Clin Infect Dis. 2022 Jan 13:ciac022. doi: 10.1093/cid/ciac022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8807217/>

⁴¹¹ Gazit S, Shlezinger R, Perez G, Lotan R, Peretz A, Ben-Tov A, Herzal E, Alapi H, Cohen D, Muhsen K, Chodick G, Patalon T. SARS-CoV-2 Naturally Acquired Immunity vs. Vaccine-induced Immunity, Reinfections versus Breakthrough Infections: a Retrospective Cohort Study. Clin Infect Dis. 2022 Apr 5:ciac262. doi: 10.1093/cid/ciac262. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9047157/>

Sivan Gazit, Roei Shlezinger, Galit Perez, Roni Lotan, Asaf Peretz, Amir Ben-Tov, Dani Cohen, Khitam Muhsen, Gabriel Chodick, Tal Patalon Comparing SARS-CoV-2 natural immunity to vaccine-induced immunity: reinfections versus breakthrough infections medRxiv 2021.08.24.21262415; doi: <https://doi.org/10.1101/2021.08.24.21262415> <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2021.08.24.21262415v1>

⁴¹² Connell AR, Connell J, Leahy TR, Hassan J. Mumps Outbreaks in Vaccinated Populations-Is It Time to Re-assess the Clinical Efficacy of Vaccines? Front Immunol. 2020 Sep 18;11:2089. doi: 10.3389/fimmu.2020.02089. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7531022/>

⁴¹³ <https://www.onb.it/2018/11/02/vaccini-antinfluenzali-risposte-ed-efficacia-per-fasce-di-eta/>

Valent F, Gallo T. Influenza vaccine effectiveness in an Italian elderly population during the 2016-2017 season. Ann Ist Super Sanita. 2018 Jan-Mar;54(1):67-71. doi: 10.4415/ANN_18_01_13. https://www.iss.it/documents/20126/45616/ANN_18_01_13.pdf

⁴¹⁴ Pérez-Alós L, et al waning immunity after SARS-CoV-2 vaccination and influencing factors. Nat Commun. 2022 Mar 28;13(1):1614. doi: 10.1038/s41467-022-29225-4. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8960902/>

⁴¹⁵ Crotty S. Hybrid Immunity Science 25 Jun 2021 372, 6549, pp 1392-3 DOI: 10.1126/science.abj2258 <https://www.science.org/doi/full/10.1126/science.abj2258>

Questo concetto è spesso evocato a favore della vaccinazione, ma questo stato superimmunitario non ha correlati clinici comprovati a lungo termine, e un numero crescente di studi mostra benefici marginali, se non nulli, aggiuntivi della vaccinazione in individui con immunità naturale.

Attribuire risposte anticorpali sieriche più elevate negli individui vaccinati come superiorità rispetto all'infezione naturale è errato, poiché potrebbe essere trascorso molto tempo dall'infezione naturale con l'atteso calo dei livelli di anticorpi.

Inoltre, l'infezione naturale, con l'induzione di una forte immunità interferone-dipendente nelle vie aeree superiori, potrebbe portare a sintomi simil-influenzali correlati all'interferone, ma con una risposta innata delle citochine che impedisce un'aggressione della barriera mucosa sufficiente per la generazione di anticorpi clinicamente significativa.

La vaccinazione intramuscolare genera prontamente una risposta anticorpale, che è misurabile come anticorpi sierici, anche se transitoriamente, ma questo fenomeno non può essere utilizzato per affermare che i vaccini sono migliori delle infezioni naturali.⁴¹⁶

Fattori che influenzano la produzione di NAb

In una coorte giapponese, i farmaci immunosoppressori, l'età, i glucocorticoidi e il consumo di alcol sono stati identificati come fattori predittivi di titoli anticorpali più bassi dopo la vaccinazione, mentre la precedente infezione da SARS-CoV-2, il sesso femminile, il tempo tra due dosi di vaccino e i farmaci per l'allergia sono stati identificati come fattori predittivi di titoli anticorpali sierici più elevati.⁴¹⁷ Queste stesse associazioni per età e precedente infezione sono state riportate in un altro studio.⁴¹⁸

Yair Goldberg, Micha Mandel, Yinon M. Bar-On, Omri Bodenheimer, Laurence Freedman, Nachman Ash, Sharon Alroy-Preis, Amit Huppert, Ron Milo
Protection and waning of natural and hybrid COVID-19 immunity
medRxiv 2021.12.04.21267114; doi: <https://doi.org/10.1101/2021.12.04.21267114>
<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2021.12.04.21267114v1.full.pdf>

Pilz S, Theiler-Schwetz V, Trummer C, Krause R, Ioannidis JPA.
SARS-CoV-2 reinfections: Overview of efficacy and duration of natural and hybrid immunity.
Environ Res. 2022 Jun;209:112911. doi: [10.1016/j.envres.2022.112911](https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.112911).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8824301/>

Sette A, Crotty S.
Immunological memory to SARS-CoV-2 infection and COVID-19 vaccines.
Immunol Rev. 2022 Jun 22;10.1111/imr.13089. doi: [10.1111/imr.13089](https://doi.org/10.1111/imr.13089).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9349657/>

Bates TA, McBride SK, Leier HC, Guzman G, Lyski ZL, Schoen D, Winders B, Lee JY, Lee DX, Messer WB, Curlin ME, Tafesse FG.
Vaccination before or after SARS-CoV-2 infection leads to robust humoral response and antibodies that effectively neutralize variants.
Sci Immunol. 2022 Feb 18;7(68):eabn8014. doi: [10.1126/sciimmunol.abn8014](https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abn8014).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8939472/>

Castro Dopico X, Ols S, Loré K, Karlsson Hedestam GB.
Immunity to SARS-CoV-2 induced by infection or vaccination.
J Intern Med. 2022 Jan;291(1):32-50. doi: [10.1111/joim.13372](https://doi.org/10.1111/joim.13372).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8447342/>

⁴¹⁶ Milne G, Hames T, Scotton C, Gent N, Johnsen A, Anderson RM, Ward T.
Does infection with or vaccination against SARS-CoV-2 lead to lasting immunity?
Lancet Respir Med. 2021 Dec;9(12):1450-1466. doi: [10.1016/S2213-2600\(21\)00407-0](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(21)00407-0).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8530467/>

Misra A, Theel ES.
Immunity to SARS-CoV-2: What Do We Know and Should We Be Testing for It?
J Clin Microbiol. 2022 Jun 15;60(6):e0048221. doi: [10.1128/jcm.00482-21](https://doi.org/10.1128/jcm.00482-21).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9199399/>

⁴¹⁷ Kageyama T, et al
Antibody responses to BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine and their predictors among healthcare workers in a tertiary referral hospital in Japan.
Clin Microbiol Infect. 2021 Dec;27(12):1861.e1-1861.e5. doi: [10.1016/j.cmi.2021.07.042](https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.07.042).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8349446/>

⁴¹⁸ Ebinger JE, Fert-Bober J, Printsev I, Wu M, Sun N, Prostko JC, Frias EC, Stewart JL, Van Eyk JE, Braun JG, Cheng S, Sobhani K.
Antibody responses to the BNT162b2 mRNA vaccine in individuals previously infected with SARS-CoV-2.

Levin et al. hanno riferito che sei mesi dopo aver ricevuto la seconda dose, i titoli anticorpali neutralizzanti erano più bassi tra le persone di età pari o superiore a 65 anni rispetto a quelle di età compresa tra 18 e meno di 45 anni (rapporto delle medie, 0,58; intervallo di confidenza (CI) al 95%, da 0,48 a 0,70), sostanzialmente inferiore tra gli uomini rispetto alle donne (rapporto delle medie, 0,64; 95% (CI), da 0,55 a 0,75) e inferiore tra i partecipanti con immunosoppressione rispetto a quelli senza immunosoppressione (rapporto delle medie, 0,30; 95% CI, da 0,20 a 0,46).⁴¹⁹

Le comorbidità, come diabete, obesità, ipertensione, dermatite e sovrappeso, non sono state associate a sieronegatività o bassa produzione di anticorpi neutralizzanti ⁴²⁰, a differenza delle malattie renali ed epatiche. È possibile che questa scarsa risposta sia legata ad alterazioni del sistema immunitario nella malattia renale, poiché l'uremia è associata a uno stato di disfunzione immunitaria caratterizzato da immunodepressione.⁴²¹

Per quanto riguarda l'infezione naturale, Gozalbo-Rovira et al. hanno riportato deboli correlazioni tra livelli di anticorpi e biomarcatori infiammatori (ferritina, D-dimero, CRP, lattato deidrogenasi (LDH) e interleuchina-6).⁴²²

Queste correlazioni potrebbero essere spiegate dalla relazione tra l'entità della risposta anticorpale con l'iperattivazione del sistema immunitario nei pazienti con COVID-19 grave.

Si ritiene che la tempesta di citochine svolga un ruolo chiave nella progressione della malattia e quindi nella prognosi del COVID-19.⁴²³ Pertanto, i livelli di NAb nei pazienti guariti da COVID-19 sono positivamente collegati alla gravità della malattia.⁴²⁴

Nat Med. 2021 Jun;27(6):981-984. doi: 10.1038/s41591-021-01325-6.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8205849/>

⁴¹⁹ Levin EG, et al
Waning Immune Humoral Response to BNT162b2 Covid-19 Vaccine over 6 Months.
N Engl J Med. 2021 Dec 9;385(24):e84. doi: 10.1056/NEJMoa2114583.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8522797/>

⁴²⁰ Morales-Núñez JJ, et al
Neutralizing Antibodies Titers and Side Effects in Response to BNT162b2 Vaccine in Healthcare Workers with and without Prior SARS-CoV-2 Infection.
Vaccines (Basel). 2021 Jul 5;9(7):742. doi: 10.3390/vaccines9070742
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8310237/>

⁴²¹ Zimmermann P, Curtis N.
Factors That Influence the Immune Response to Vaccination.
Clin Microbiol Rev. 2019 Mar 13;32(2):e00084-18. doi: 10.1128/CMR.00084-18.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6431125/>

⁴²² Pang NY, Pang AS, Chow VT, Wang DY.
Understanding neutralising antibodies against SARS-CoV-2 and their implications in clinical practice.
Mil Med Res. 2021 Aug 31;8(1):47. doi: 10.1186/s40779-021-00342-3.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8405719/>

Gozalbo-Rovira R, et al
SARS-CoV-2 antibodies, serum inflammatory biomarkers and clinical severity of hospitalized COVID-19 patients.
J Clin Virol. 2020 Oct;131:104611. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104611.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7459327/>

⁴²³ Eroshenko N, Gill T, Keaveney MK, Church GM, Trevejo JM, Rajaniemi H.
Implications of antibody-dependent enhancement of infection for SARS-CoV-2 countermeasures.
Nat Biotechnol. 2020 Jul;38(7):789-791. doi: 10.1038/s41587-020-0577-1.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32504046/>

⁴²⁴ Chen W, Zhang J, Qin X, Wang W, Xu M, Wang LF, Xu C, Tang S, Liu P, Zhang L, Liu X, Zhang Y, Yi C, Hu Z, Yi Y.
SARS-CoV-2 neutralizing antibody levels are correlated with severity of COVID-19 pneumonia.
Biomed Pharmacother. 2020 Oct;130:110629. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110629.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7425713/>

IgM NATURALI

Gli anticorpi sono una parte vitale delle risorse del sistema immunitario adattativo per il riconoscimento e la risposta alle minacce esterne.

Tuttavia, in salute esistono alcuni tipi di anticorpi che invece riconoscono gli autoantigeni e questi contribuiscono al potenziamento delle funzioni innate primitive.

La rimozione delle cellule morenti è una delle responsabilità più essenziali del sistema immunitario, necessaria per prevenire l'infiammazione e l'autoimmunità incontrollate, ed è stato dimostrato che gli anticorpi IgM naturali che riconoscono le cellule apoptotiche migliorano la clearance (eliminazione) fagocitica delle cellule morte e morenti e sopprimono le vie di segnalazione immunitarie innate.⁴²⁵

⁴²⁵ Avrameas S, Alexopoulos H, Moutsopoulos HM.

Natural Autoantibodies: An Undersign Hero of the Immune System and Autoimmune Disorders-A Point of View. *Front Immunol.* 2018 Jun 12;9:1320. doi: 10.3389/fimmu.2018.01320. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6005843/>

Fereidan-Esfahani M, Nayfeh T, Warrington A, Howe CL, Rodriguez M. IgM Natural Autoantibodies in Physiology and the Treatment of Disease. *Methods Mol Biol.* 2019;1904:53-81. doi: 10.1007/978-1-4939-8958-4_3. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30539466/>

Ehrenstein MR, Notley CA. The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator. *Nat Rev Immunol.* 2010 Nov;10(11):778-86. doi: 10.1038/nri2849. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20948548/>

Grönwall C, Vas J, Silverman GJ. Protective Roles of Natural IgM Antibodies. *Front Immunol.* 2012 Apr 4;3:66. doi: 10.3389/fimmu.2012.00066. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3341951/>

Wang H, Coligan JE, Morse HC 3rd. Emerging Functions of Natural IgM and Its Fc Receptor FcμR in Immune Homeostasis. *Front Immunol.* 2016 Mar 15;7:99. doi: 10.3389/fimmu.2016.00099. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4791374/>

Kaveri SV, Silverman GJ, Bayry J. Natural IgM in immune equilibrium and harnessing their therapeutic potential. *J Immunol.* 2012 Feb 1;188(3):939-45. doi: 10.4049/jimmunol.1102107. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3266110/>

Panda S, Ding JL. Natural antibodies bridge innate and adaptive immunity. *J Immunol.* 2015 Jan 1;194(1):13-20. doi: 10.4049/jimmunol.1400844. <https://www.jimmunol.org/content/194/1/13.long>

Blandino R, Baumgarth N. Secreted IgM: New tricks for an old molecule. *J Leukoc Biol.* 2019 Nov;106(5):1021-1034. doi: 10.1002/JLB.3RI0519-161R. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6803036/>

Vas J, Grönwall C, Silverman GJ. Fundamental roles of the innate-like repertoire of natural antibodies in immune homeostasis. *Front Immunol.* 2013 Feb 5;4:4. doi: 10.3389/fimmu.2013.00004. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3564042/>

New JS, King RG, Kearney JF. Glycan Reactive Natural Antibodies and Viral Immunity. *Viral Immunol.* 2020 May;33(4):266-276. doi: 10.1089/vim.2019.0136. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7247037/>

Binder CJ, Silverman GJ. Natural antibodies and the autoimmunity of atherosclerosis. *Springer Semin Immunopathol.* 2005 Mar;26(4):385-404. doi: 10.1007/s00281-004-0185-z.

Le IgM esistono in due forme: legate alla membrana (mIgM) e secrete (sIgM), con le sIgM ulteriormente suddivise in IgM naturali e indotte dall'antigene ⁴²⁶.

Gli anticorpi "IgM naturali" rappresentano la maggior parte degli anticorpi IgM secreti presenti nel siero normale e si trovano anche nei compartimenti pleurico e peritoneale ⁴²⁷. Questa classe di anticorpi IgM è conservata dal punto di vista evolutivo in tutti i vertebrati mascellari ⁴²⁸, è prodotta spontaneamente da un sottoinsieme di cellule B e spesso si lega ad antigeni specifici in assenza di immunizzazione ⁴²⁹. Le IgM naturali sono codificate da segmenti genici variabili germinali non mutati, con specificità di legame polireattiva agli epitopi di antigeni self e non-self, e si trovano a frequenze più elevate nei neonati rispetto agli adulti, sia nell'uomo che nel topo ⁴³⁰.

<https://link.springer.com/article/10.1007/s00281-004-0185-z>

Holodick NE, Rodríguez-Zhurbenko N, Hernández AM.
Defining Natural Antibodies.
Front Immunol. 2017 Jul 26;8:872. doi: 10.3389/fimmu.2017.00872.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5526850/>

New JS, King RG, Kearney JF.
Manipulation of the glycan-specific natural antibody repertoire for immunotherapy.
Immunol Rev. 2016 Mar;270(1):32-50. doi: 10.1111/imr.12397.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4755354/>

New JS, King RG, Kearney JF.
Glycan Reactive Natural Antibodies and Viral Immunity.
Viral Immunol. 2020 May;33(4):266-276. doi: 10.1089/vim.2019.0136.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7247037/>

Khasbiullina NR, Bovin NV.
Hypotheses of the origin of natural antibodies: a glycobiologist's opinion.
Biochemistry (Mosc). 2015 Jul;80(7):820-35. doi: 10.1134/S0006297915070032.
<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/contents/v80/full/80070980.html>

⁴²⁶ Keyt BA, Baliga R, Sinclair AM, Carroll SF, Peterson MS.
Structure, Function, and Therapeutic Use of IgM Antibodies.
Antibodies (Basel). 2020 Oct 13;9(4):53. doi: 10.3390/antib9040053.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7709107/>

Ehrenstein MR, Notley CA.
The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator.
Nat Rev Immunol. 2010 Nov;10(11):778-86. doi: 10.1038/nri2849.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20948548/>

Michaud E, Mastrandrea C, Rochereau N, Paul S.
Human Secretory IgM: An Elusive Player in Mucosal Immunity.
Trends Immunol. 2020 Feb;41(2):141-156. doi: 10.1016/j.it.2019.12.005.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31928913/>

⁴²⁷ Boes M.
Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses.
Mol Immunol. 2000 Dec;37(18):1141-9. doi: 10.1016/s0161-5890(01)00025-6.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11451419/>

Holodick NE, Tumang JR, Rothstein TL.
Immunoglobulin secretion by B1 cells: differential intensity and IRF4-dependence of spontaneous IgM secretion by peritoneal and splenic B1 cells.
Eur J Immunol. 2010 Nov;40(11):3007-16. doi: 10.1002/eji.201040545.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3139744/>

⁴²⁸ Flajnik MF.
Comparative analyses of immunoglobulin genes: surprises and portents.
Nat Rev Immunol. 2002 Sep;2(9):688-98. doi: 10.1038/nri889.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12209137/>

⁴²⁹ Jayasekera JP, Moseman EA, Carroll MC.
Natural antibody and complement mediate neutralization of influenza virus in the absence of prior immunity.
J Virol. 2007 Apr;81(7):3487-94. doi: 10.1128/JVI.02128-06.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1866020/>

⁴³⁰ Chen ZJ, Wheeler CJ, Shi W, Wu AJ, Yarboro CH, Gallagher M, Notkins AL.

GC rispetto alle altre cellule B e possono essere residenti nei tessuti o si trovano in ricircolo negli organi linfoidi secondari.⁴³³

Gli MBC-M mostrano un carico di mutazione inferiore rispetto alle loro controparti di CSR (class switch recombination) e un'ampia reattività crociata, in particolare contro gli N-glicani conservati di batteri e retrovirus.

Nell'uomo esistono cellule B di memoria IgM non commutate e più abbondanti nei tessuti locali come GALT, polmone e SLO rispetto ai topi⁴³⁴. Gli MBC-M sono stati trovati anche nella circolazione sanguigna (identificati come IgM⁺IgD⁺CD27⁺) e mostrano una correlazione clonale con gli MBC-M specifici dell'intestino, IgM e IgA solo da plasmacellule, garantendo una CSR notevolmente più veloce e fornendo protezione alle infezioni trasmesse per via ematica, probabilmente attraverso la cross-reattività.⁴³⁵

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.595535/full>

Percorsi di sviluppo dell'immunoglobulina M (IgM) attraverso le cellule B1 e B2 B dal fegato fetale (FL) e dal midollo osseo (BM). Le cellule B1 sviluppano FL dove passano attraverso cellule pro-B, cellule pre-B, cellule B immature e cellule B naïve che esprimono IgM e CD5 che differenziano le cellule B1a e B1b, entrambe in grado di secernere IgM (A) naturali. Le cellule B2 si sviluppano dal comune progenitore linfoide di BM per diventare cellule B immature che migrano verso cellule B spleniche che secernono IgM. L'espressione di IgD differenzia le zone marginali rispetto ai linfociti B follicolari (B). Le cellule B follicolari dopo la stimolazione dell'antigene possono subire la maturazione del centro germinativo creando plasmacellule a vita lunga, cellule B di memoria, cambio di classe o rimanere plasmacellule (C) a vita breve non commutate.

Distinction of the memory B cell response to cognate antigen versus bystander inflammatory signals.

J Exp Med. 2009 Aug 31;206(9):2013-25. doi: 10.1084/jem.20090667.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2737154/>

Blink EJ, Light A, Kallies A, Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM.

Early appearance of germinal center-derived memory B cells and plasma cells in blood after primary immunization.

J Exp Med. 2005 Feb 21;201(4):545-54. doi: 10.1084/jem.20042060.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2213050/>

⁴³³ Burton BR, Tennant RK, Love J, Titball RW, Wraith DC, White HN.

Variant proteins stimulate more IgM⁺ GC B-cells revealing a mechanism of cross-reactive recognition by antibody memory.

Elife. 2018 May 1;7:e26832. doi: 10.7554/eLife.26832.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5959717/>

Weisel F, Shlomchik M.

Memory B Cells of Mice and Humans.

Annu Rev Immunol. 2017 Apr 26;35:255-284. doi: 10.1146/annurev-immunol-041015-055531.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28142324/>

Tarlinton D, Good-Jacobson K.

Diversity among memory B cells: origin, consequences, and utility.

Science. 2013 Sep 13;341(6151):1205-11. doi: 10.1126/science.1241146.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24031013/>

⁴³⁴ Magri G, et al

Human Secretory IgM Emerges from Plasma Cells Clonally Related to Gut Memory B Cells and Targets Highly Diverse Commensals.

Immunity. 2017 Jul 18;47(1):118-134.e8. doi: 10.1016/j.immuni.2017.06.013.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5519504/>

⁴³⁵ Seifert M, Przekopowicz M, Taudien S, Lollies A, Ronge V, Drees B, Lindemann M, Hillen U, Engler H, Singer BB, Küppers R.

Functional capacities of human IgM memory B cells in early inflammatory responses and secondary germinal center reactions.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Feb 10;112(6):E546-55. doi: 10.1073/pnas.1416276112.

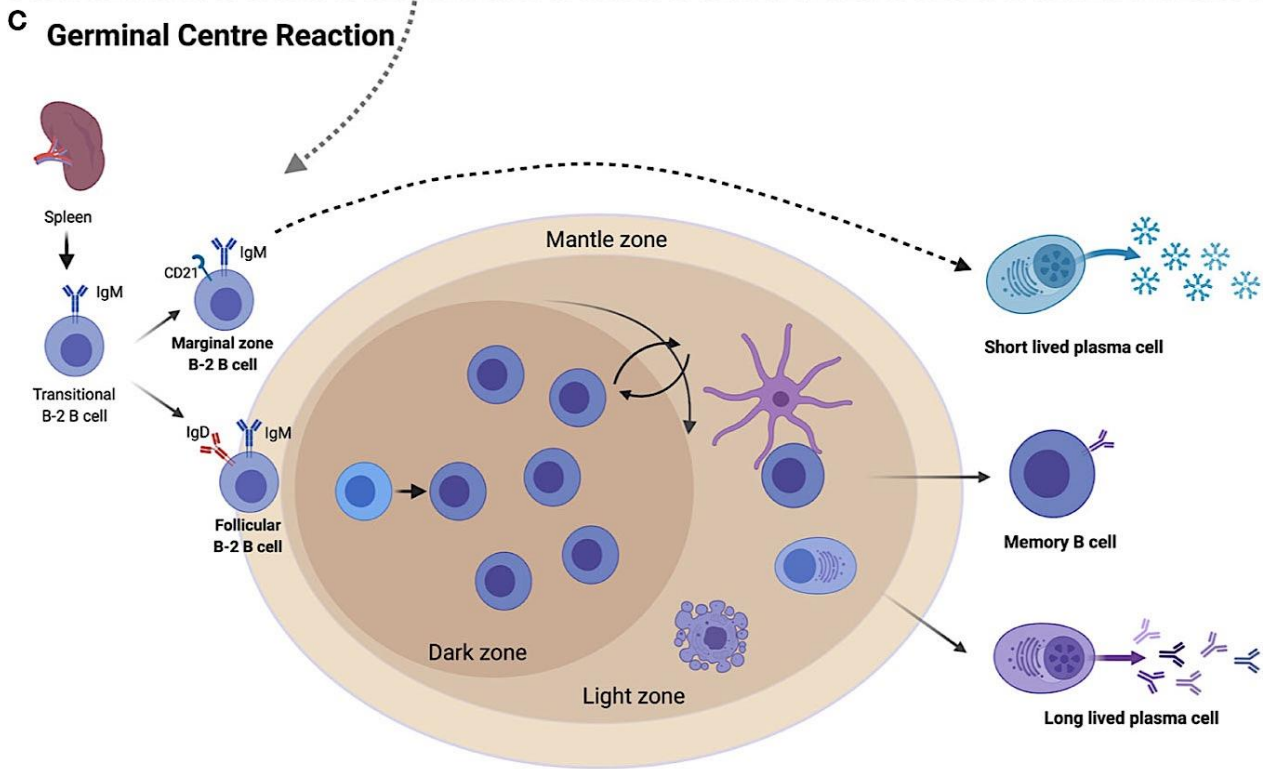
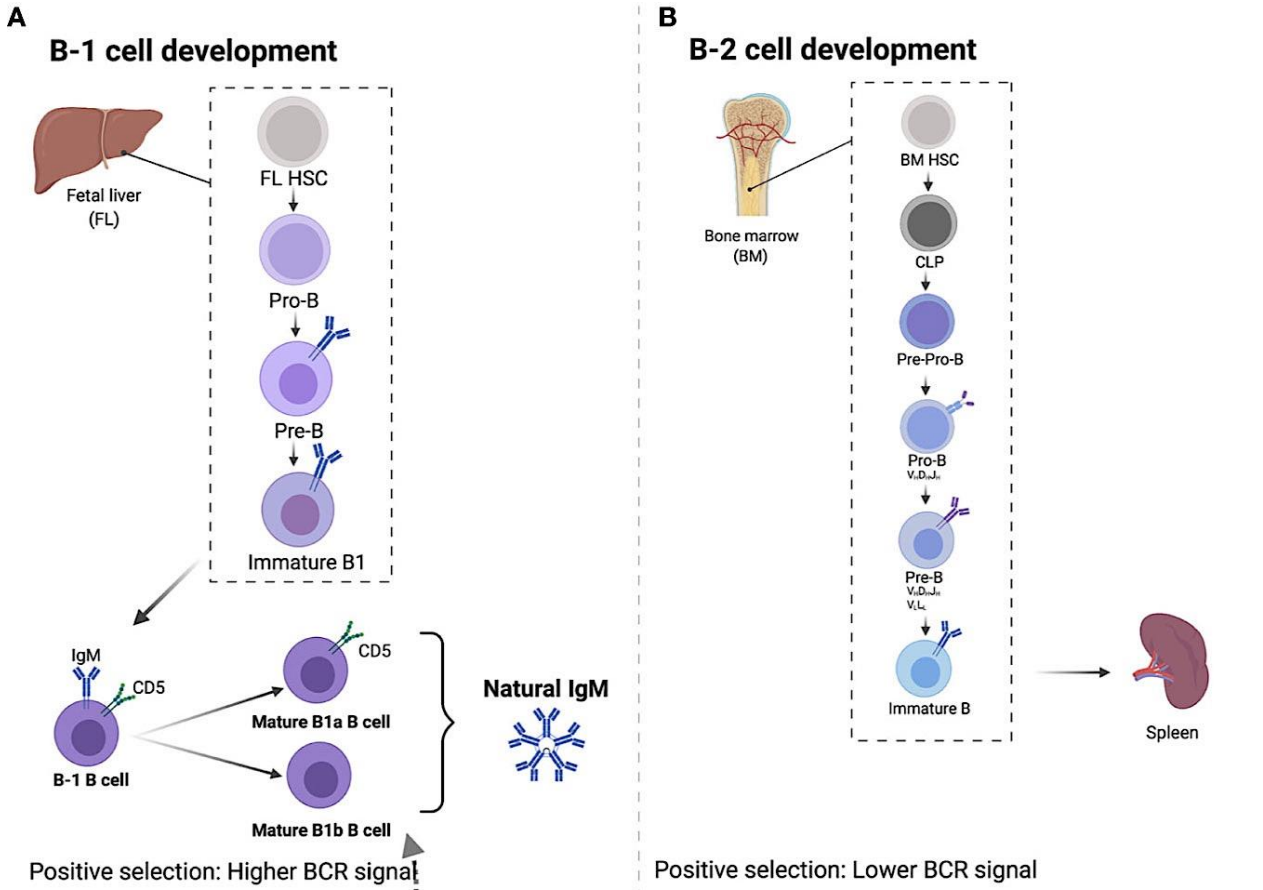
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4330750/>

Klein U, Rajewsky K, Küppers R.

Human immunoglobulin (Ig)M⁺IgD⁺ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells.

J Exp Med. 1998 Nov 2;188(9):1679-89. doi: 10.1084/jem.188.9.1679.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2212515/>



Cellule B e microbiota

Il microbiota colonizza i siti della mucosa subito dopo la nascita nell'uomo e gioca un ruolo chiave nell'omeostasi ⁴³⁶. Gli anticorpi dominanti trovati nei siti della mucosa sono le IgAs secretorie, che si legano e modellano il microbiota ⁴³⁷.

La maggior parte delle IgA da plasmacellule sono generate da cellule B di memoria che risiedono nella lamina propria (LP) dell'intestino ⁴³⁸. Oltre alle IgA, nuove prove collocano le IgM secrete come un attore chiave nel mantenimento dell'omeostasi locale nei siti della mucosa, come l'intestino e il polmone, e aiutano a plasmare il microbiota locale ⁴³⁹.

Diversi studi hanno riscontrato che le IgM, insieme alle IgA umane secrete nella mucosa intestinale umana rivestono il microbiota umano ⁴⁴⁰, potenziano il repertorio di legame delle IgA e in alcuni casi sono anche più potenti nel neutralizzare i batteri enterici da sole. In particolare, è stato scoperto che le IgM favoriscono specie batteriche benefiche per l'omeostasi intestinale sana, come *Firmicutes* (ad es. *Bacillus cereus*, *Lachnospiraceae spp.* e *Ruthenibacterium spp.*) e *Bacteroidetes* (*Bacteroides vulgatus*) ⁴⁴¹.

⁴³⁶ Belkaid Y, Hand TW.

Role of the microbiota in immunity and inflammation.
Cell. 2014 Mar 27;157(1):121-41. doi: 10.1016/j.cell.2014.03.011.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4056765/>

⁴³⁷ Macpherson AJ, McCoy KD, Johansen FE, Brandtzaeg P.
The immune geography of IgA induction and function.
Mucosal Immunol. 2008 Jan;1(1):11-22. doi: 10.1038/mi.2007.6.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19079156/>

Nakajima A, et al
IgA regulates the composition and metabolic function of gut microbiota by promoting symbiosis between bacteria.
J Exp Med. 2018 Aug 6;215(8):2019-2034. doi: 10.1084/jem.20180427.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6080902/>

⁴³⁸ Kubinak JL, Round JL.
Do antibodies select a healthy microbiota?
Nat Rev Immunol. 2016 Dec;16(12):767-774. doi: 10.1038/nri.2016.114.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9004535/>

⁴³⁹ Magri G, et al
Human Secretory IgM Emerges from Plasma Cells Clonally Related to Gut Memory B Cells and Targets Highly Diverse Commensals.
Immunity. 2017 Jul 18;47(1):118-134.e8. doi: 10.1016/j.immuni.2017.06.013.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5519504/>

Wesemann DR, Portuguese AJ, Meyers RM, Gallagher MP, Cluff-Jones K, Magee JM, Panchakshari RA, Rodig SJ, Kepler TB, Alt FW.
Microbial colonization influences early B-lineage development in the gut lamina propria.
Nature. 2013 Sep 5;501(7465):112-5. doi: 10.1038/nature12496.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3807868/>

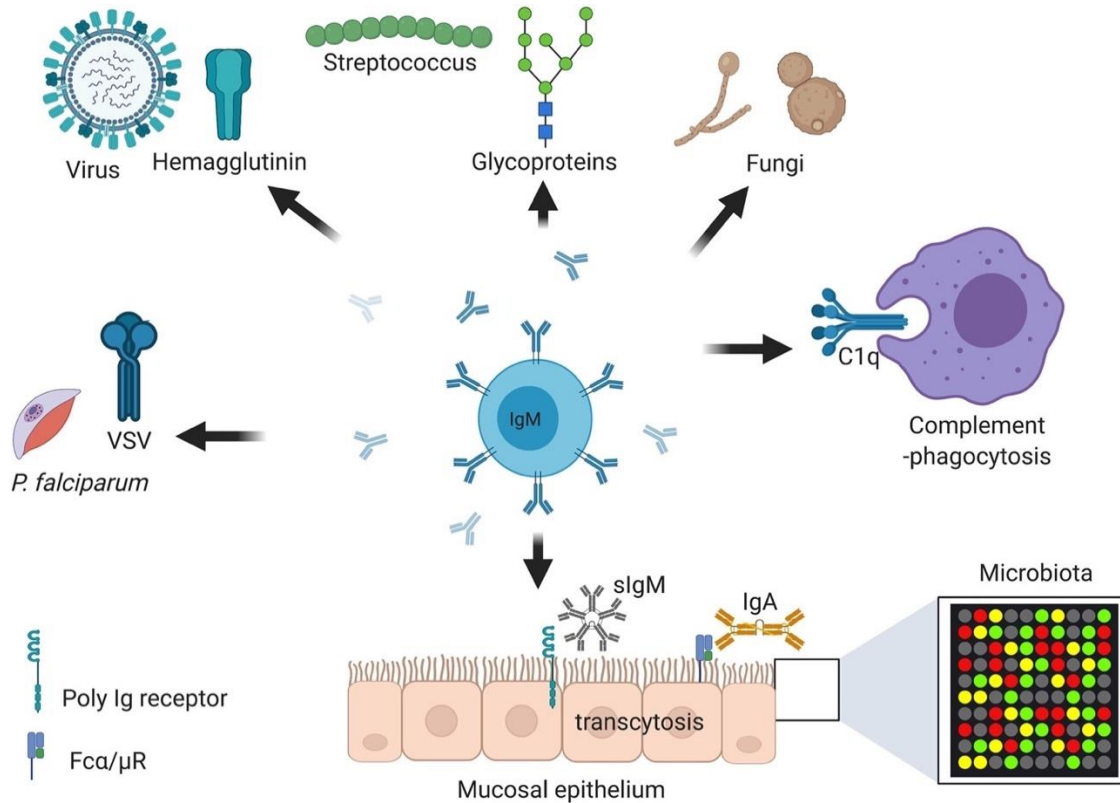
⁴⁴⁰ Longet S, Vonarburg C, Lötscher M, Miescher S, Zuercher A, Corthésy B.
Reconstituted human polyclonal plasma-derived secretory-like IgM and IgA maintain the barrier function of epithelial cells infected with an enteropathogen.
J Biol Chem. 2014 Aug 1;289(31):21617-26. doi: 10.1074/jbc.M114.549139.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4118121/>

Bioley G, Monnerat J, Lötscher M, Vonarburg C, Zuercher A, Corthésy B.
Plasma-Derived Polyreactive Secretory-Like IgA and IgM Opsonizing Salmonella enterica Typhimurium Reduces Invasion and Gut Tissue Inflammation through Agglutination.
Front Immunol. 2017 Aug 29;8:1043. doi: 10.3389/fimmu.2017.01043.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5581814/>

⁴⁴¹ Belkaid Y, Hand TW.
Role of the microbiota in immunity and inflammation.
Cell. 2014 Mar 27;157(1):121-41. doi: 10.1016/j.cell.2014.03.011.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4056765/>

Shen X, Miao J, Wan Q, Wang S, Li M, Pu F, Wang G, Qian W, Yu Q, Marotta F, He F.
Possible correlation between gut microbiota and immunity among healthy middle-aged and elderly people in southwest China.
Gut Pathog. 2018 Feb 9;10:4. doi: 10.1186/s13099-018-0231-3.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5806246/>

E' noto che l'età correla negativamente con la presenza di questi batteri, con conseguente disbiosi nella popolazione adulta, e quindi si ritiene che le IgM/MCB-M secrete si siano sviluppate per aiutare le IgA a preservare l'omeostasi del microbiota, interagendo direttamente con i batteri per promuovere la biodiversità del microbiota sano e possibilmente eliminare i batteri patogeni.



<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.595535/full>

L'immunoglobulina M (IgM) è fondamentale allo stadio stazionario e contro le infezioni e le malattie non trasmissibili. Le IgM secrete sono importanti sulle superfici mucose nel mantenimento di un microbiota sano insieme alle IgA secrete. Le IgM secrete insieme al recettore delle cellule IgM B sono importanti nell'iniziazione dell'immunità protettiva contro vari agenti patogeni respiratori tra cui specie di funghi, virus e batteri. Le IgM secrete sono essenziali nelle infezioni parassitarie, comprese quelle che causano la malaria e la malattia del sonno. Le IgM secrete svolgono un ruolo importante nella diagnosi di tumori e malattie autoimmuni come il lupus eritematoso sistemico (LES) e l'artrite reumatoide (RA). Le IgM secrete hanno un'elevata affinità per C1q, un componente del complemento che consente la degradazione dei patogeni rivestiti di anticorpi e dei detriti apoptotici.

È stato inoltre dimostrato che gli anticorpi IgM naturali svolgono un ruolo nel controllo dello sviluppo, della selezione e dell'induzione della tolleranza centrale delle cellule B per prevenire l'autoimmunità.

La rara condizione di carenza selettiva di IgM nell'uomo, associata a infezioni ricorrenti, è caratterizzata da un rischio maggiore di sviluppare malattie autoimmuni come l'artrite e il lupus eritematoso sistemico ⁴⁴².

In uno studio condotto da Nguyen et al. ⁴⁴³, è stato scoperto che topi con deficienza della catena μ secretoria (μ s^{-/-}) simulano il fenotipo di carenza selettiva di IgM osservato negli esseri umani.

Sebbene il fenotipo possa essere dovuto alla riduzione della clearance dell'autoantigene, questi topi knockout hanno mostrato un blocco nella differenziazione nella fase di sviluppo delle cellule pre/pro-B e una

⁴⁴² Louis AG, Gupta S. Primary selective IgM deficiency: an ignored immunodeficiency. Clin Rev Allergy Immunol. 2014 Apr;46(2):104-11. doi: 10.1007/s12016-013-8375-x. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23760686/>

⁴⁴³ Nguyen TT, Elsner RA, Baumgarth N. Natural IgM prevents autoimmunity by enforcing B cell central tolerance induction. J Immunol. 2015 Feb 15;194(4):1489-502. doi: 10.4049/jimmunol.1401880. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4324358/>

fuga dall'induzione della tolleranza centrale con conseguente accumulo di cellule autoanticorpi-secermenti, un fenotipo reversibile con la somministrazione di IgM policlonali. Pertanto, questi dati supportano che gli anticorpi IgM secreti naturali facilitano il normale sviluppo delle cellule B, che impone la selezione negativa delle cellule B autoreattive, anche se il meccanismo preciso non sia chiaro.

Glicosilazione degli IgM

Gli anticorpi sono glicoproteine con glicosilazione legata all'N, come si dettaglierà nell'approfondimento dedicato. Nel caso delle IgG, c'è la glicosilazione N-linked (legata all'azoto) in Asn 297, che influenza il legame ai recettori Fc-gamma e quindi ha un ruolo nella modulazione della citotossicità cellulare anticorpo-dipendente (ADCC).

È significativo che le IgM abbiano più siti di glicosilazione rispetto a quella delle IgG: mentre le catene pesanti di IgG hanno un unico sito di glicosilazione, le catene pesanti di IgM di primati umani e non umani mostrano cinque siti di glicosilazione N-linked⁴⁴⁴. Si ritiene che questi glicani facilitino la polimerizzazione e l'assemblaggio della struttura oligomerica IgM⁴⁴⁵, oltre a fornire alle IgM una maggiore solubilità e un'emivita *in vivo* più lunga⁴⁴⁶.

Recentemente Colucci et al. hanno dimostrato un ruolo anche per la sialilazione sulle IgM nella mediazione dell'internalizzazione nei linfociti T e nella soppressione immunitaria mediata da IgM⁴⁴⁷.

I siti aggiuntivi di glicosilazione aumentano la complessità degli anticorpi IgM, ed è interessante notare che i tre siti di Asn 171, Asn 332 e Asn 395 (nei domini 1, 2 e 3) mostrano porzioni di carboidrati complessi con terminazioni sialilate.

Inoltre, i siti terminali carbossilici in Asn 402 e Asn 563 (nei domini 3 e 4) contengono strutture ad alto contenuto di mannosio⁴³⁶, e questo modello di glicosilazione è coerente con il fatto che le regioni amminiche terminali delle IgM sono più accessibili agli enzimi di glicosilazione dell'apparato intracellulare del Golgi, mentre le regioni carbossiterminali (la struttura del "nucleo centrale") non sono completamente elaborate, forse a causa dell'impedimento sterico e della mancanza di accessibilità di questi glicani nella forma oligomerizzata delle IgM.

Il quarto sito di glicosilazione sulle IgM (Asn 402) è omologo al singolo sito sulle IgG, noto per avere un'accessibilità limitata e non mostra carboidrati complessi completamente sviluppati né in IgM né in IgG.

IgM naturali e immunità innata

Gli anticorpi IgM naturali, insieme alle cellule natural killer (NK), ai mastociti e dendritici e ai macrofagi fanno parte del sistema immunitario innato, la prima linea di difesa contro i microrganismi invasori e le cellule umane aberranti⁴⁴⁸.

⁴⁴⁴ Moh ES, Lin CH, Thaysen-Andersen M, Packer NH.

Site-Specific N-Glycosylation of Recombinant Pentameric and Hexameric Human IgM. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2016 Jul;27(7):1143-55. doi: 10.1007/s13361-016-1378-0. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27038031/>

⁴⁴⁵ Muraoka S, Shulman MJ.

Structural requirements for IgM assembly and cytolytic activity. Effects of mutations in the oligosaccharide acceptor site at Asn402. *J Immunol.* 1989 Jan 15;142(2):695-701. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2911015/>

⁴⁴⁶ Maiorella BL, Winkelhake J, Young J, Moyer B, Bauer R, Hora M, Andya J, Thomson J, Patel T, Parekh R.

Effect of culture conditions on IgM antibody structure, pharmacokinetics and activity. *Biotechnology (N Y).* 1993 Mar;11(3):387-92. doi: 10.1038/nbt0393-387. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7763441/>.

⁴⁴⁷ Colucci M, Stöckmann H, Butera A, Masotti A, Baldassarre A, Giorda E, Petrini S, Rudd PM, Sitia R, Emma F, Vivarelli M.

Sialylation of N-linked glycans influences the immunomodulatory effects of IgM on T cells. *J Immunol.* 2015 Jan 1;194(1):151-7. doi: 10.4049/jimmunol.1402025. <https://www.jimmunol.org/content/194/1/151.long>

⁴⁴⁸ Vollmers HP, Brändlein S.

Natural IgM antibodies: the orphaned molecules in immune surveillance. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006 Aug 7;58(5-6):755-65. doi: 10.1016/j.addr.2005.08.007. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16820243/>

Questa risposta comporta il legame a specifici motivi antigenici, come carboidrati specifici su glicoproteine o glicolipidi e strutture ripetitive come i lipopolisaccaridi, riconosciute da anticorpi IgM codificati da geni della linea germinale (cioè non mutati). In tal modo, questi anticorpi IgM naturali svolgono un ruolo importante nei meccanismi di difesa primaria, riconoscendo batteri e virus estranei o cellule umane mutate come le cellule tumorali.

Tipicamente, questi anticorpi IgM naturali utilizzano un legame a bassa affinità con una gamma di antigeni estranei simili, e la loro capacità di eliminare questi antigeni estranei è quindi amplificata dall'elevata avidità offerta dall'aver 10 (nel pentamero) o 12 (nell'esamero) siti di legame.

La potente capacità degli anticorpi IgM di fissare il complemento e opsonizzare le particelle, li rende particolarmente efficaci contro batteri e virus ⁴⁴⁹.

Gli anticorpi IgM differiscono anche dagli isotipi IgG riguardo i meccanismi effettori. Le IgG possono provocare citotossicità cellulare anticorpo-dipendente (ADCC), e citotossicità dipendente dal complemento (CDC) mediante l'azione delle cellule Natural Killer.

Al contrario, le IgM non si legano ai recettori Fc γ , e quindi non mostrano ADCC, ma hanno un'attività CDC molto potente.

La loro struttura esamerica o pentamerica consente un legame molto avido con il componente del complemento C1q, e quindi le IgM sono in grado di fissare il complemento meglio delle IgG ⁴⁵⁰.

Un recente lavoro di Sharp et al., ⁴⁵¹ con la microscopia crioelettronica su piastra di fase, ha fornito un modello dettagliato di come la fissazione del complemento comporta un grande cambiamento conformazionale del legame antigene- IgM.

La struttura planare o discoidale delle IgM libere cambia in una struttura "accovacciata" o "simile a un fiocco" quando le regioni Fab legano l'antigene su una superficie cellulare. Le regioni Fab leganti l'antigene si spostano fuori dal piano dell'anello formato da C μ 3, C μ 4 e cordiera a causa della flessibilità delle regioni C μ 2, l'equivalente delle regioni a cerniera delle IgG.

Ciò consente a molte o tutte le braccia Fab di entrare in contatto con gli antigeni su una superficie, sfruttando l'avidità delle IgM. Anche altri meccanismi effettori, come la fagocitosi cellulare anticorpo-dipendente, sono stati implicati nell'azione delle IgM ⁴⁵².

Keyt BA, Baliga R, Sinclair AM, Carroll SF, Peterson MS.
Structure, Function, and Therapeutic Use of IgM Antibodies.
Antibodies (Basel). 2020 Oct 13;9(4):53. doi: 10.3390/antib9040053.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7709107/>

⁴⁴⁹ Wibroe PP, Helvig SY, Moein Moghimi S.
The Role of Complement in Antibody Therapy for Infectious Diseases.
Microbiol Spectr. 2014 Apr;2(2). doi: 10.1128/microbiolspec.AID-0015-2014.
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.AID-0015-2014>

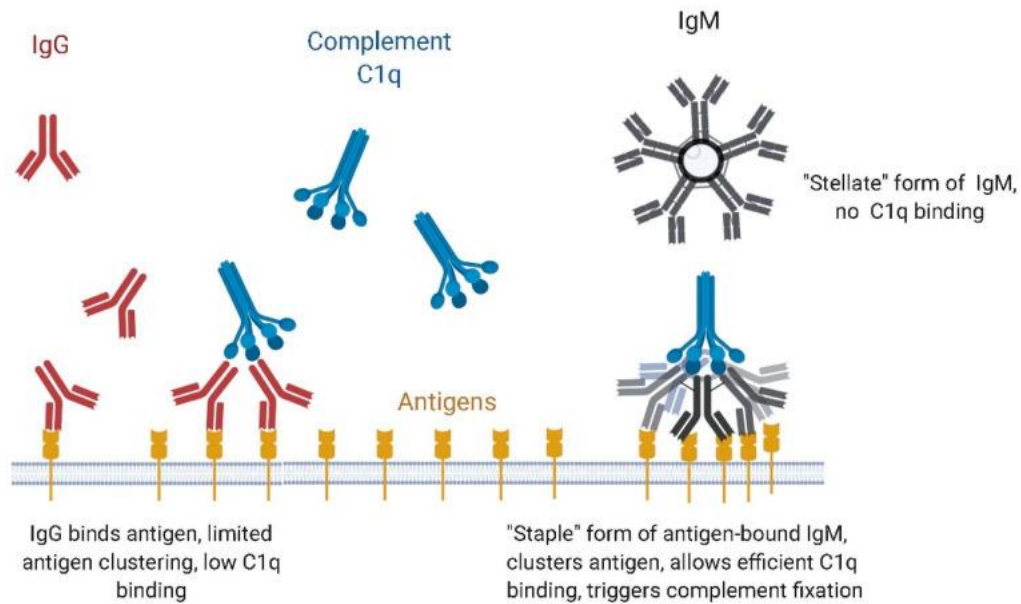
Strohl W.R., Strohl L.M.
Therapeutic Antibody Engineering. Woodhead Publishing; Sawston, UK: 2012. pp. 197–223
Parren PWHL, Lugovskoy AA.
Therapeutic antibody engineering: Current and future advances driving the strongest growth area in the pharmaceutical industry.
MAbs. 2013 Mar 1;5(2):175–7. doi: 10.4161/mabs.23654.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3893228/>

⁴⁵⁰ Klimovich VB.
IgM and its receptors: structural and functional aspects.
Biochemistry (Mosc). 2011 May;76(5):534-49. doi: 10.1134/S0006297911050038.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21639833/>

⁴⁵¹ Sharp TH, Boyle AL, Diebold CA, Kros A, Koster AJ, Gros P.
Insights into IgM-mediated complement activation based on in situ structures of IgM-C1-C4b.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2019 Jun 11;116(24):11900-11905. doi: 10.1073/pnas.1901841116.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6575175/>

⁴⁵² Shibuya A, et al
Fc alpha/mu receptor mediates endocytosis of IgM-coated microbes.
Nat Immunol. 2000 Nov;1(5):441-6. doi: 10.1038/80886.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11062505/>

Weinstein JR, Quan Y, Hanson JF, Colonna L, Iorga M, Honda S, Shibuya K, Shibuya A, Elkon KB, Möller T.



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7709107/>

Secondo dati più recenti, l'IgM è un pentamero asimmetrico che forma anche una tasca per una proteina effettrice, denominata "inibitore dell'apoptosi dei macrofagi" (AIM/CD5L), la cui emivita sierica è notevolmente potenziata grazie al legame con le IgM.⁴⁵³

Oltre alle funzioni effettrici dirette delle IgM e la sua funzione di trasporto dell'AIM, studi condotti da oltre 30 anni hanno dimostrato funzioni immunoregatorie dirette per le sIgM (IgM secrete).

Particolarmente interessanti sono gli effetti di potenziamento immunitario delle sIgM per indurre risposte IgG massime, e gli effetti di protezione immunitaria contro lo sviluppo di malattie autoimmuni mediate da anticorpi.⁴⁵⁴

IgM-Dependent Phagocytosis in Microglia Is Mediated by Complement Receptor 3, Not Fcα/μ Receptor. *J Immunol.* 2015 Dec 1;195(11):5309-17. doi: 10.4049/jimmunol.1401195. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4655136/>

⁴⁵³ Blandino R, Baumgarth N. Secreted IgM: New tricks for an old molecule. *J Leukoc Biol.* 2019 Nov;106(5):1021-1034. doi: 10.1002/JLB.3RI0519-161R. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6803036/>

Hiramoto E, Tsutsumi A, Suzuki R, Matsuoka S, Arai S, Kikkawa M, Miyazaki T. The IgM pentamer is an asymmetric pentagon with an open groove that binds the AIM protein. *Sci Adv.* 2018 Oct 10;4(10):eaau1199. doi: 10.1126/sciadv.aau1199. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6179379/>

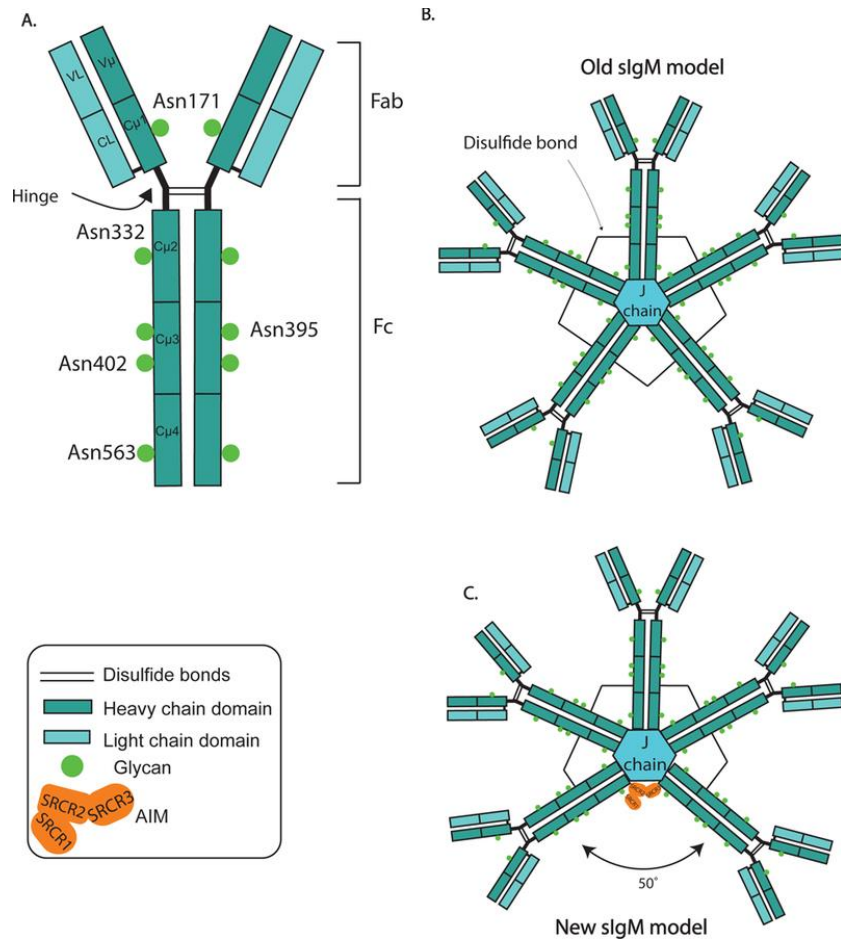
⁴⁵⁴ Baumgarth N, Herman OC, Jager GC, Brown LE, Herzenberg LA, Chen J. B-1 and B-2 cell-derived immunoglobulin M antibodies are nonredundant components of the protective response to influenza virus infection. *J Exp Med.* 2000 Jul 17;192(2):271-80. doi: 10.1084/jem.192.2.271. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2193249/>

Boes M, Esau C, Fischer MB, Schmidt T, Carroll M, Chen J. Enhanced B-1 cell development, but impaired IgG antibody responses in mice deficient in secreted IgM. *J Immunol.* 1998 May 15;160(10):4776-87. <https://www.jimmunol.org/content/160/10/4776.long>

Heyman B, Pilström L, Shulman MJ. Complement activation is required for IgM-mediated enhancement of the antibody response. *J Exp Med.* 1988 Jun 1;167(6):1999-2004. doi: 10.1084/jem.167.6.1999. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2189680/>

Nguyen TTT, Graf BA, Randall TD, Baumgarth N. sIgM-FcμR Interactions Regulate Early B Cell Activation and Plasma Cell Development after Influenza Virus Infection. *J Immunol.* 2017 Sep 1;199(5):1635-1646. doi: 10.4049/jimmunol.1700560. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5568459/>

I meccanismi con cui le sIgM regolano questi processi rimangono poco conosciuti, ma è noto che l'FcμR facilita l'interazione diretta delle sIgM con le cellule del sistema immunitario, in particolare le cellule B e T. I topi privi di FcμR mostrano anche risposte IgG ridotte dopo l'immunizzazione e l'infezione e sviluppano un aumento dei titoli di autoanticorpi circolanti.⁴⁵⁵

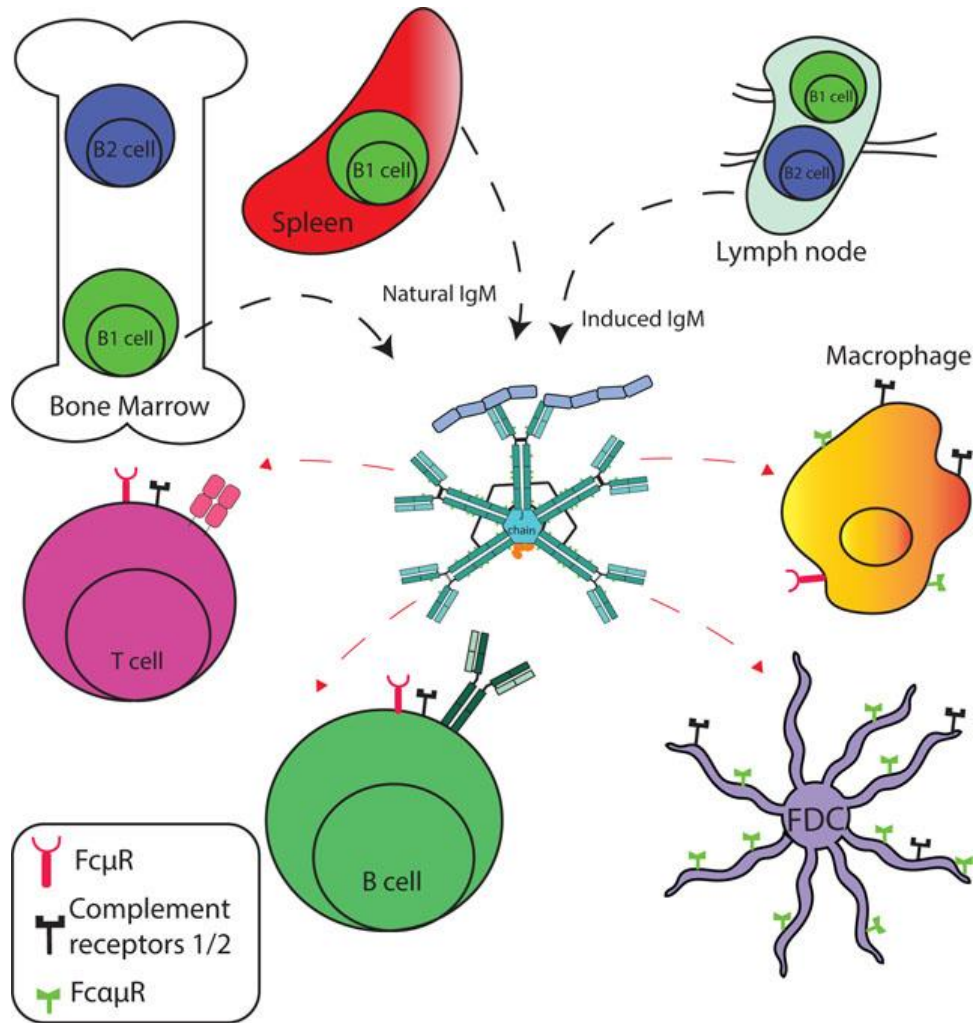


<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6803036/>
Una nuova struttura per sIgM.

(A) Schema di un monomero IgM che possiede due catene pesanti e leggere di immunoglobuline ciascuna. La regione Fab (frammento di legame dell'anticorpo) codifica i siti di legame dell'antigene e la regione Fc (frammento costante) ne regola la funzione. La catena pesante contiene cinque siti di glicosilazione, mentre non ci sono siti di glicosilazione codificati sulle catene leggere. **(B)** Si pensava che l'IgM secreta formasse un pentamero simmetrico in cui cinque monomeri sono uniti tra loro da una catena J e legami disolfuro. **(C)** Nuovi dati ora mostrano che l'IgM pentamerica è asimmetrica con un solco di 50 gradi che consente a una molecola AIM (inibitore dell'apoptosi dei macrofagi/CD5L) di legarsi, stabilizzando la loro emivita sierica.

⁴⁵⁵ Choi SC, Wang H, Tian L, Murakami Y, Shin DM, Borrego F, Morse HC 3rd, Coligan JE. Mouse IgM Fc receptor, FcμR, promotes B cell development and modulates antigen-driven immune responses. *J Immunol.* 2013 Feb 1;190(3):987-96. doi: 10.4049/jimmunol.1202227 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3552009/>

Nguyen TT, Kläsener K, Zürn C, Castillo PA, Brust-Mascher I, Imai DM, Bevins CL, Reardon C, Reth M, Baumgarth N. The IgM receptor FcμR limits tonic BCR signaling by regulating expression of the IgM BCR. *Nat Immunol.* 2017 Mar;18(3):321-333. doi: 10.1038/ni.3677. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5310993/>



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6803036/>

Recettori delle IgM

Negli individui sani, le IgM policlonali circolanti sono generalmente presenti ad una concentrazione di 1-2 mg/ml di sangue, con un'emivita di circa 5 giorni.⁴⁵⁶

I seguenti recettori sono stati riconosciuti come siti di legame per le IgM:

- (a) I recettori del complemento (CR), ampiamente espressi da diversi tipi cellulari.

Ad esempio, i linfociti B esprimono il recettore del complemento di superficie cellulare di tipo 1 (CR1/CD35) e il recettore del complemento di tipo 2 (CR2/CD21) che possono legarsi a complessi antigene-IgM con molecole di complemento attivate aggregate.⁴⁵⁷

- (b) I recettori Fcα/μ (Fcα/μR), proteine transmembrana di tipo I che legano sia gli isotipi IgA che IgM.⁴⁵⁸

⁴⁵⁶ Kaveri SV, Silverman GJ, Bayry J. Natural IgM in immune equilibrium and harnessing their therapeutic potential. *J Immunol.* 2012 Feb 1;188(3):939-45. doi: 10.4049/jimmunol.1102107. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3266110/>

⁴⁵⁷ Carroll MC. The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:545-68. doi: 10.1146/annurev.immunol.16.1.545. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9597141/>

⁴⁵⁸ Sakamoto N, Shibuya K, Shimizu Y, Yotsumoto K, Miyabayashi T, Sakano S, Tsuji T, Nakayama E, Nakauchi H, Shibuya A. A novel Fc receptor for IgA and IgM is expressed on both hematopoietic and non-hematopoietic tissues. *Eur J Immunol.* 2001 May;31(5):1310-6. doi: 10.1002/1521-4141(200105)31:5<1310::AID-IMMU1310>3.0.CO;2-N.

Questi recettori sono espressi in maniera costitutiva sui linfociti B della zona marginale, le cellule dendritiche follicolari, e il legame delle IgM a queste cellule può sopprimere la formazione del centro germinale, la maturazione dell'affinità e la generazione di cellule B di memoria in risposta al challenge dell'antigene T-cellula-indipendente.⁴⁵⁹

- (c) I recettori polimerici delle Ig (poli-IgR), espressi sulle cellule epiteliali che legano le IgA polimeriche e le IgM attraverso la catena J.

Questi recettori mediano il trasporto di Ig polimeriche contenenti catene J nei siti della mucosa.⁴⁶⁰

- (d) I recettori FAIM3/TOSO, inizialmente identificati come "Molecola inibitoria 3 dell'apoptosi di Fas" (FAIM3). Questi recettori Fc μ R sono stati recentemente riscoperti come un recettore Fc specifico per le IgM, l'unico che si lega esclusivamente alla porzione Fc delle IgM pentameriche con alta affinità⁴⁶¹ ed è presente su una varietà di tipi cellulari come macrofagi, cellule dendritiche e cellule T, con la massima espressione osservata nelle cellule B.⁴⁶²

Il legame delle IgM, in particolare delle IgM pentameriche, a questo recettore migliora la cooperazione delle cellule B e T e potenzia la citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente e l'attivazione del complemento.⁴⁶³

[https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200105\)31:5<1310::AID-IMMU1310>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200105)31:5<1310::AID-IMMU1310>3.0.CO;2-N)

⁴⁵⁹ Shibuya A, et al
Fc alpha/mu receptor mediates endocytosis of IgM-coated microbes.
Nat Immunol. 2000 Nov;1(5):441-6. doi: 10.1038/80886.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11062505/>

⁴⁶⁰ Kaetzel CS.
The polymeric immunoglobulin receptor: bridging innate and adaptive immune responses at mucosal surfaces.
Immunol Rev. 2005 Aug;206:83-99. doi: 10.1111/j.0105-2896.2005.00278.x.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16048543/>

Johansen FE, Pekna M, Norderhaug IN, Haneberg B, Hietala MA, Krajci P, Betsholtz C, Brandtzaeg P.
Absence of epithelial immunoglobulin A transport, with increased mucosal leakiness, in polymeric immunoglobulin receptor/secretory component-deficient mice.
J Exp Med. 1999 Oct 4;190(7):915-22. doi: 10.1084/jem.190.7.915.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2195652/>

⁴⁶¹ Kubagawa H, et al
Nomenclature of Toso, Fas apoptosis inhibitory molecule 3, and IgM FcR.
J Immunol. 2015 May 1;194(9):4055-7. doi: 10.4049/jimmunol.1500222.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500222>

⁴⁶² Kubagawa H, Kubagawa Y, Jones D, Nasti TH, Walter MR, Honjo K.
The old but new IgM Fc receptor (Fc μ R).
Curr Top Microbiol Immunol. 2014;382:3-28. doi: 10.1007/978-3-319-07911-0_1.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25116093/>

Kubagawa H, Oka S, Kubagawa Y, Torii I, Takayama E, Kang DW, Gartland GL, Bertoli LF, Mori H, Takatsu H, Kitamura T, Ohno H, Wang JY.
Identity of the elusive IgM Fc receptor (FcmuR) in humans.
J Exp Med. 2009 Nov 23;206(12):2779-93. doi: 10.1084/jem.20091107.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2806608/>

⁴⁶³ Shima H, Takatsu H, Fukuda S, Ohmae M, Hase K, Kubagawa H, Wang JY, Ohno H.
Identification of TOSO/FAIM3 as an Fc receptor for IgM.
Int Immunol. 2010 Mar;22(3):149-56. doi: 10.1093/intimm/dxp121.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20042454/>

Berland R, Wortis HH.
Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5.
Annu Rev Immunol. 2002;20:253-300. doi: 10.1146/annurev.immunol.20.100301.064833.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11861604/>

- (e) Le lectine simili alle immunoglobuline leganti l'acido sialico (Siglec) come SiglecG e CD22, espresse sulle membrane delle cellule B e leganti i residui di acido sialico sulle IgM, con conseguente inibizione della segnalazione del recettore delle cellule B (BCR) a valle.⁴⁶⁴

CD22, un co-recettore inibitorio sui linfociti B, svolge anche un ruolo come recettore per i glicocongiugati sulle IgM solubili attraverso il suo dominio di legame sialoproteico. L'assenza di Siglec-G o CD22 da sola non porta allo sviluppo di malattie autoimmuni, ma la mancanza di entrambi i recettori provoca una malattia simil-lupus spontanea nei topi,⁴⁶⁵ in quanto le cellule B diventano iperattive a causa dell'aumento del segnale BCR.⁴⁶⁶

Characteristic	NAbs	Conventional Abs
Sequence	Germline or near germline with few somatic mutations, no affinity maturation	Somatically mutated, affinity matured
Immunoglobulin subtype	Mainly IgM; also IgA and IgG	Mainly IgG; also IgM and IgA
Antigen	Bind to structurally diverse and unrelated antigens	Bind to a single antigen
Affinity, kDa	Low (10^{-4} to 10^{-7} M)	High (10^{-7} to 10^{-11} M)
No. of potentially allowed conformations of antigen-binding pocket	>1 (Conformational selection or induced fit hypothesis)	1 (Lock-and-key fit mechanism)
Half-life, approximate time, h	IgM, 8; IgG, 10; IgA, 8	IgM, 35 h; IgG, 280 h; IgA, 26 h

https://www.researchgate.net/publication/281976288_Naturally_Occurring_Monoclonal_Antibodies_and_Their_Therapeutic_Potential_for_Neurologic_Diseases

<https://jlb.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/JLB.3RI0519-161R>

Funzioni delle IgM secrete. **(1A)** Le cellule B spleniche della zona marginale catturano i complessi sIgM-antigene/complemento C3 e **(B)** migra nel follicolo delle cellule B dove trasferisce i complessi su CR1/2 espresso dalle FDC, dove **(C)** l'FDC presenta l'antigene alle cellule B germinali in supporto della produzione di anticorpi T-dipendente. **(2)** sIgM sostiene fortemente lo sviluppo della risposta IgG mediante processi aggiuntivi ma poco conosciuti. **(3)** Oposnizzazione dell'antigene da parte di sIgM tramite l'assorbimento mediato da C1q del complemento da parte dei macrofagi. Questo processo può anche essere mediato dalla lectina legante il mannosio (non mostrata). **(4)** Neutralizzazione degli agenti patogeni per bloccare l'ingresso di agenti patogeni o indurre aggregazioni di agenti patogeni. Le IgM naturali sono polireattive e riconoscono gli antigeni conservati, come la fosforilcolina presente nelle pareti cellulari di *Streptococcus pneumoniae*, nonché su cellule ospiti di mammiferi morte o morenti. **(5)** sIgM può reclutare componenti del complemento per avviare la classica via di attivazione del complemento, portando infine alla formazione del complesso di attacco della membrana che può provocare la lisi del patogeno. **(6)** Sebbene i meccanismi siano risolti in modo incompleto, sIgM previene la formazione di anticorpi autoimmuni attraverso molteplici meccanismi, compreso l'effetto dell'induzione della tolleranza centrale nel midollo osseo e attraverso la rimozione di DAMPS, come detriti cellulari morti e morenti. **(7)** L'assenza di sIgM provoca cambiamenti nell'uso del gene V che codifica per una maggiore auto-reattività

⁴⁶⁴ Peaker CJ, Neuberger MS.

Association of CD22 with the B cell antigen receptor. *Eur J Immunol.* 1993 Jun;23(6):1358-63. doi: 10.1002/eji.1830230626. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7684686/>

⁴⁶⁵ Müller J, Nitschke L.

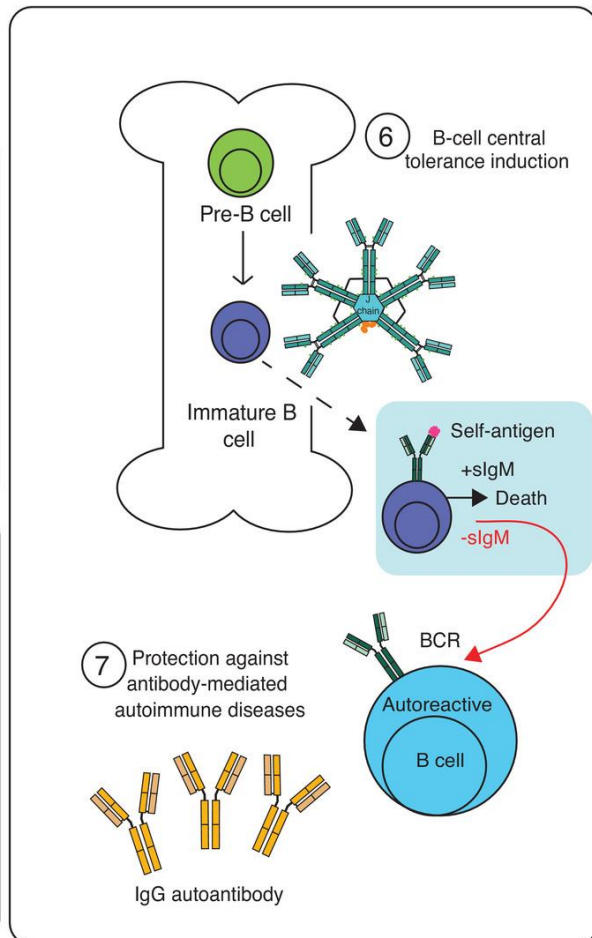
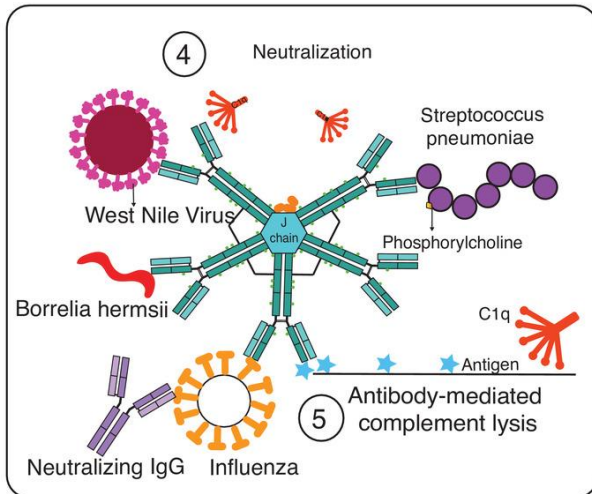
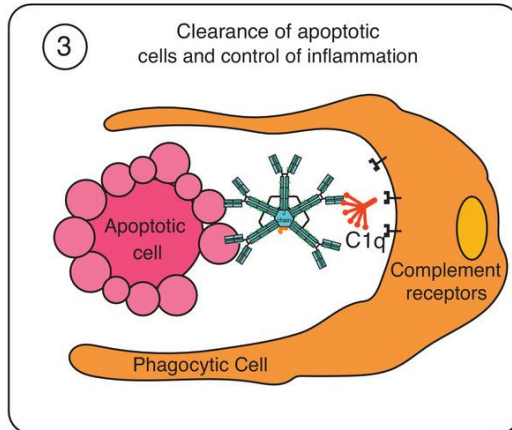
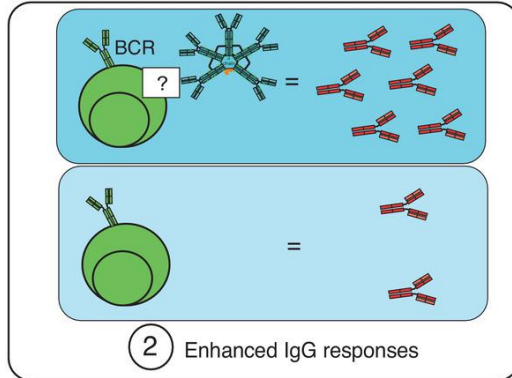
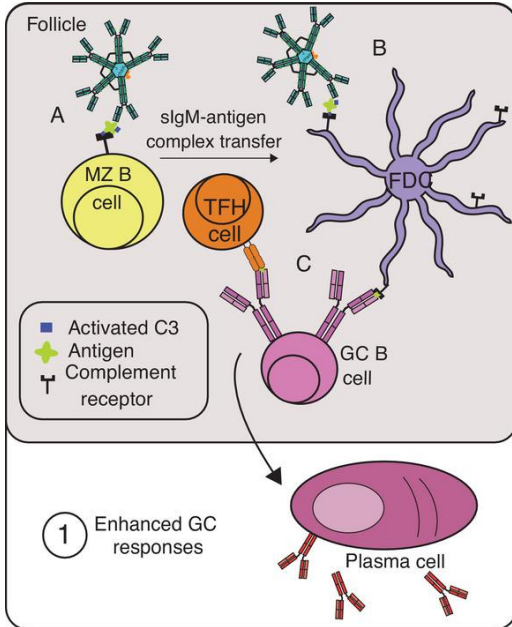
The role of CD22 and Siglec-G in B-cell tolerance and autoimmune disease. *Nat Rev Rheumatol.* 2014 Jul;10(7):422-8. doi: 10.1038/nrrheum.2014.54. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24763061/>

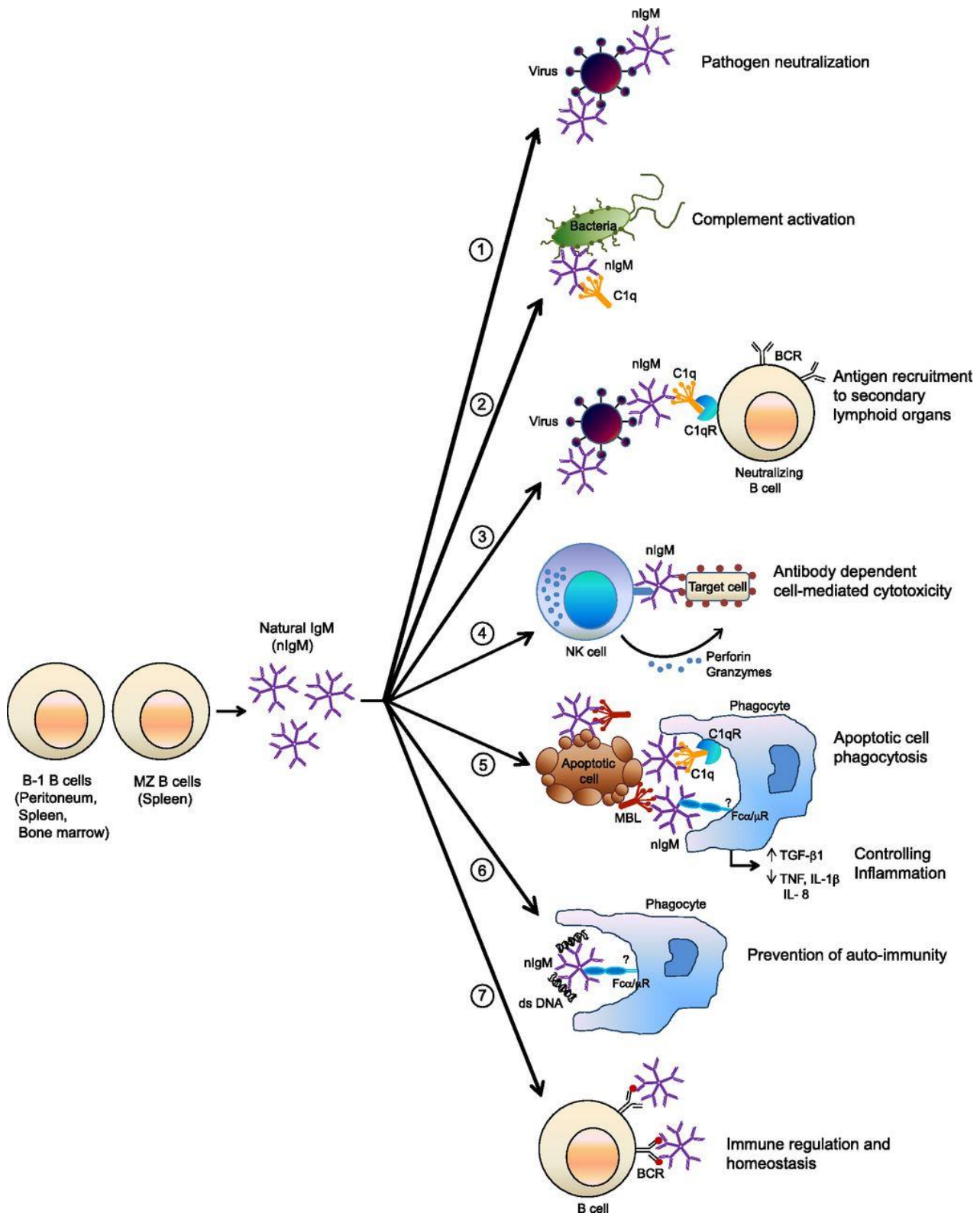
⁴⁶⁶ O'Keefe TL, Williams GT, Davies SL, Neuberger MS.

Hyperresponsive B cells in CD22-deficient mice. *Science.* 1996 Nov 1;274(5288):798-801. doi: 10.1126/science.274.5288.798. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8864124/>

Jellusova J, Nitschke L.

Regulation of B cell functions by the sialic acid-binding receptors siglec-G and CD22. *Front Immunol.* 2012 Jan 11;2:96. doi: 10.3389/fimmu.2011.00096. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3342095/>





<https://www.jimmunol.org/content/194/1/13>

Diversi ruoli delle IgM naturali (nIgM) nell'immunità. nIgM, prodotto dalle cellule B-1 nel peritoneo, nel midollo osseo e nelle cellule B MZ spleniche, svolge un ruolo cruciale in molti processi immunitari: **(1)** neutralizzazione diretta del patogeno; **(2)** attivazione del complemento classico in collaborazione con C1q; **(3)** reclutamento di Ag negli organi linfoidi secondari e innesco della successiva immunità adattativa TI; **(4)** Citotossicità cellulo-mediata Ab-dipendente: nIgM elimina le cellule bersaglio attraverso il rilascio di perforina e granzimi mediato da cellule NK; **(5)** fagocitosi cellulare apoptotica in collaborazione con C1q e MBL attraverso C1qR e Fcα/μR, che riduce l'infiammazione e ripristina l'omeostasi; **(6)** prevenzione dell'autoimmunità mediante clearance dei DAMP, come dsDNA; e **(7)** regolazione immunitaria e omeostasi dei linfociti B.

Ruoli delle IgM

È stato dimostrato che le IgM-NAA (Natural IgM Autoantibodies) svolgono diversi ruoli nel sistema immunitario, inclusa la protezione immediata dalle infezioni, la regolazione delle risposte dei linfociti B⁴⁶⁷, il controllo dello sviluppo dei linfociti B⁴⁶⁸, la selezione del repertorio dei linfociti B⁴⁶⁹, la soppressione delle risposte allergiche⁴⁷⁰ e la protezione contro il cancro⁴⁷¹ mediante i seguenti meccanismi:

(a) Forniscono la prima linea di difesa contro gli agenti patogeni:

mentre il braccio adattativo del sistema immunitario genera un'immunità specifica e a lungo termine agli agenti patogeni, le IgM-NAA fungono da risposta parallela, immediata e innata ai microbi invasori attraverso la neutralizzazione dei patogeni, l'attivazione della via classica del complemento, l'opsonizzazione dei patogeni, il potenziamento della fagocitosi e il trasporto di antigeni al tessuto linfoide.⁴⁷²

⁴⁶⁷ Lobo PI.

Role of Natural IgM Autoantibodies (IgM-NAA) and IgM Anti-Leukocyte Antibodies (IgM-ALA) in Regulating Inflammation. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2017;408:89-117. doi: 10.1007/82_2017_37. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28698955/>

Boes M, Esau C, Fischer MB, Schmidt T, Carroll M, Chen J.

Enhanced B-1 cell development, but impaired IgG antibody responses in mice deficient in secreted IgM. *J Immunol.* 1998 May 15;160(10):4776-87. <https://www.jimmunol.org/content/160/10/4776.long>

⁴⁶⁸ Nguyen TT, Elsner RA, Baumgarth N.

Natural IgM prevents autoimmunity by enforcing B cell central tolerance induction. *J Immunol.* 2015 Feb 15;194(4):1489-502. doi: 10.4049/jimmunol.1401880. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4324358/>

⁴⁶⁹ Freitas AA, Viale AC, Sundblad A, Heusser C, Coutinho A.

Normal serum immunoglobulins participate in the selection of peripheral B-cell repertoires. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Jul 1;88(13):5640-4. doi: 10.1073/pnas.88.13.5640. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC51933/>

⁴⁷⁰ Kearney JF, Patel P, Stefanov EK, King RG.

Natural antibody repertoires: development and functional role in inhibiting allergic airway disease. *Annu Rev Immunol.* 2015;33:475-504. doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120140. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25622195/>

Patel PS, Kearney JF.

Neonatal exposure to pneumococcal phosphorylcholine modulates the development of house dust mite allergy during adult life. *J Immunol.* 2015 Jun 15;194(12):5838-50. doi: 10.4049/jimmunol.1500251. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4456637/>

⁴⁷¹ Vollmers HP, Brändlein S.

Natural antibodies and cancer. *N Biotechnol.* 2009 Jun;25(5):294-8. doi: 10.1016/j.nbt.2009.03.016. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19442595/>

Madi A, Bransburg-Zabary S, Maayan-Metzger A, Dar G, Ben-Jacob E, Cohen IR.

Tumor-associated and disease-associated autoantibody repertoires in healthy colostrum and maternal and newborn cord sera. *J Immunol.* 2015 Jun 1;194(11):5272-81. doi: 10.4049/jimmunol.1402771. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4432729/>

⁴⁷² Heyman B.

Regulation of antibody responses via antibodies, complement, and Fc receptors. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:709-37. doi: 10.1146/annurev.immunol.18.1.709. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10837073/>

Heyman B, Pilström L, Shulman MJ.

Complement activation is required for IgM-mediated enhancement of the antibody response. *J Exp Med.* 1988 Jun 1;167(6):1999-2004. doi: 10.1084/jem.167.6.1999. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2189680/>

Ochsenbein AF, Fehr T, Lutz C, Suter M, Brombacher F, Hengartner H, Zinkernagel RM.

Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science.* 1999 Dec 10;286(5447):2156-9. doi: 10.1126/science.286.5447.2156. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10591647/>

(b) Danno forma alla successiva risposta immunitaria all'antigene:

la struttura pentamerica e la polireattività delle IgM forniscono la capacità di interagire direttamente con i patogeni. Le IgM-NAA possono legarsi simultaneamente a diverse strutture conservate, come acidi nucleici, fosfolipidi e carboidrati sullo stesso patogeno, promuovono il riconoscimento e la presentazione da parte delle APC, portando infine all'attivazione dell'immunità acquisita e delle risposte di memoria ⁴⁷³.

(c) Smaltiscono le cellule apoptotiche ⁴⁷⁴, proteine mal ripiegate e cellule alterate:

la rimozione sicura delle cellule morenti è un processo fondamentale necessario per tutta la vita di un organismo. La decorazione delle membrane della superficie cellulare morente con molecole immunitarie innate solubili come il complemento C1q e la lectina legante il mannosio, promuove il riconoscimento da parte delle cellule che avviano un processo di fagocitosi chiamato "efferocitosi" ⁴⁷⁵.

La deposizione IgM-dipendente di C1q ha un ruolo importante nel determinare l'efficienza della clearance delle cellule apoptotiche da parte dei macrofagi. Nell'individuo sano, le cellule apoptotiche non rappresentano una minaccia per l'ospite, perché l'efferocitosi garantisce una rapida ed efficiente eliminazione del cadavere cellulare da parte dei macrofagi e delle cellule dendritiche.

Difetti nell'efferocitosi, come postulato da Walport et al. ⁴⁷⁶ nell'ipotesi dello "smaltimento dei rifiuti", possono essere collegati a malattie autoimmuni. Un difetto nella clearance delle cellule apoptotiche può progredire in necrosi secondaria, che porta al rilascio di fattori patogeni come proteine da shock termico, proteina del gruppo 1 ad alta mobilità e altri componenti delle cellule morenti.

Zhou ZH, Zhang Y, Hu YF, Wahl LM, Cisar JO, Notkins AL.
The broad antibacterial activity of the natural antibody repertoire is due to polyreactive antibodies.
Cell Host Microbe. 2007 Mar 15;1(1):51-61. doi: 10.1016/j.chom.2007.01.002.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2212603/>

Stäger S, Alexander J, Kirby AC, Botto M, Rooijen NV, Smith DF, Brombacher F, Kaye PM.
Natural antibodies and complement are endogenous adjuvants for vaccine-induced CD8⁺ T-cell responses.
Nat Med. 2003 Oct;9(10):1287-92. doi: 10.1038/nm933.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14502281/>

Kohler H, Bayry J, Nicoletti A, Kaveri SV.
Natural autoantibodies as tools to predict the outcome of immune response?
Scand J Immunol. 2003 Sep;58(3):285-9. doi: 10.1046/j.1365-3083.2003.01314.x.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.2003.01314.x>

Jayasekera JP, Moseman EA, Carroll MC.
Natural antibody and complement mediate neutralization of influenza virus in the absence of prior immunity.
J Virol. 2007 Apr;81(7):3487-94. doi: 10.1128/JVI.02128-06.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1866020/>

⁴⁷³ Rapaka RR, Ricks DM, Alcorn JF, Chen K, Khader SA, Zheng M, Plevy S, Bengtén E, Kolls JK.
Conserved natural IgM antibodies mediate innate and adaptive immunity against the opportunistic fungus *Pneumocystis murina*.
J Exp Med. 2010 Dec 20;207(13):2907-19. doi: 10.1084/jem.20100034.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3005228/>

Fernandez Gonzalez S, Jayasekera JP, Carroll MC.
Complement and natural antibody are required in the long-term memory response to influenza virus.
Vaccine. 2008 Dec 30;26 Suppl 8:186-93. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.11.057.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19388171/>

⁴⁷⁴ Gong S, Ruprecht RM.
Immunoglobulin M: An Ancient Antiviral Weapon - Rediscovered.
Front Immunol. 2020 Aug 11;11:1943. doi: 10.3389/fimmu.2020.01943.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7432194/>

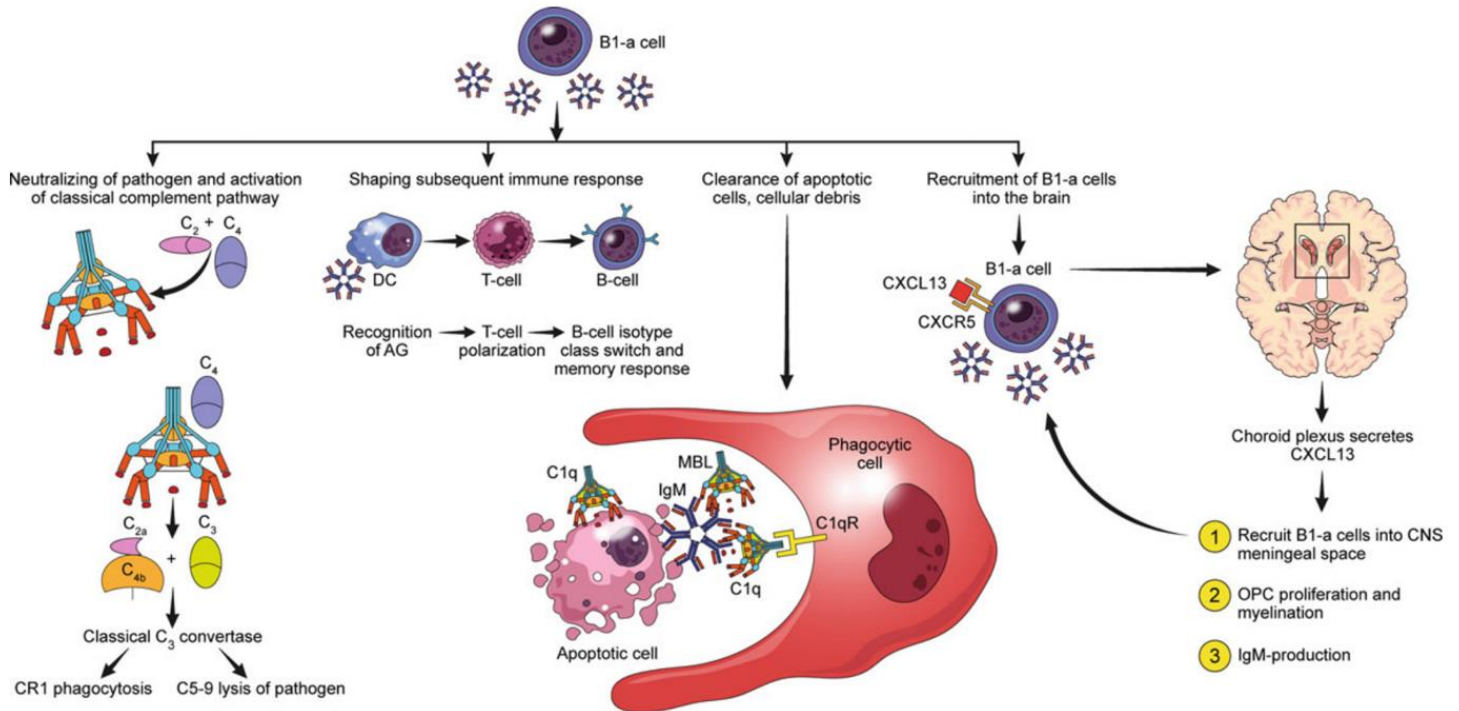
⁴⁷⁵ Henson PM.
Cell Removal: Efferocytosis.
Annu Rev Cell Dev Biol. 2017 Oct 6;33:127-144. doi: 10.1146/annurev-cellbio-111315-125315.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28613937/>

⁴⁷⁶ Manderson AP, Botto M, Walport MJ.
The role of complement in the development of systemic lupus erythematosus.
Annu Rev Immunol. 2004;22:431-56. doi: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104549.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15032584/>

Questi fattori, insieme ai nuovi autoantigeni rilasciati dalle cellule necrotiche, possono attivare le cellule B e T patogene, causare risposte infiammatorie e sviluppo di malattie autoimmuni in un individuo suscettibile ⁴⁷⁷.

(d) Reclutano cellule B-1a nel cervello in via di sviluppo:

le cellule nella cavità peritoneale e pleurica esprimono CXCL13 e il legame di questa chemochina al suo recettore (CXCR5) è un passaggio cruciale per l'induzione della produzione di IgM-NAA ⁴⁷⁸. CXCL13 viene secreta dal plesso corioide e recluta le cellule B-1a nello spazio meningeo che successivamente portano alla proliferazione, alla mielinizzazione e alla produzione nel cervello di IgM-NAA da parte delle cellule progenitrici degli oligodendrociti (OPC) ⁴⁷⁹.



<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30539466/>

Ruolo fisiologico degli autoanticorpi IgM naturali nel corpo: gli autoanticorpi IgM naturali possono agire come prima linea di difesa contro i microbi invasori neutralizzando il patogeno e attivando le vie del complemento. Le IgM naturali possono anche modellare la successiva risposta immunitaria a un agente patogeno influenzando la polarizzazione dei linfociti T e il cambio di classe dei linfociti B. Riconoscono le membrane cellulari apoptotiche, i detriti cellulari e le decorano con il sistema del complemento e la lectina legante il mannosio (MBL) per promuovere la clearance da parte dei fagociti come le cellule dendritiche (DC) e i macrofagi. Inoltre, le IgM naturali secrete dalle cellule B-1a nel sistema nervoso centrale portano alla proliferazione e alla mielinizzazione delle cellule progenitrici degli oligodendrociti

Uso terapeutico di preparazioni a base di IgM pentameriche policlonali

Come già discusso, le preparazioni terapeutiche di IgG policlonali, somministrate come immunoglobuline per via endovenosa (IVIG) o sottocutanea (SCIG), vengono purificate dal plasma di migliaia di donatori sani. Oltre

⁴⁷⁷ Kaveri SV, Silverman GJ, Bayry J. Natural IgM in immune equilibrium and harnessing their therapeutic potential. *J Immunol.* 2012 Feb 1;188(3):939-45. doi: 10.4049/jimmunol.1102107. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3266110/>

⁴⁷⁸ Ansel KM, Harris RB, Cyster JG. CXCL13 is required for B1 cell homing, natural antibody production, and body cavity immunity. *Immunity.* 2002 Jan;16(1):67-76. doi: 10.1016/s1074-7613(01)00257-6. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00257-6](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00257-6)

⁴⁷⁹ Tanabe S, Yamashita T. B-1a lymphocytes promote oligodendrogenesis during brain development. *Nat Neurosci.* 2018 Apr;21(4):506-516. doi: 10.1038/s41593-018-0106-4. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29507409/>

alla terapia sostitutiva per l'immunodeficienza umorale, le IVIG/SCIG sono sempre più utilizzate per il trattamento di un ampio spettro di malattie infiammatorie e autoimmuni con patogenesi eterogenea ⁴⁸⁰. Dopo l'introduzione della terapia sostitutiva per le immunodeficienze primarie nel 1952 ⁴⁸¹, la dimostrazione dei potenti effetti delle IVIG sulla porpora da trombocitopenia immunitaria (ITP) ⁴⁸² ha aperto le porte ad ampie applicazioni cliniche delle IVIG come farmaco immunomodulatore e antinfiammatorio. Dal 1981, l'IVIG è stata registrata per il trattamento della malattia di Kawasaki ⁴⁸³, la sindrome di Guillain-Barré, la poliradiculoneuropatia demielinizante infiammatoria cronica (CIDP) ⁴⁸⁴ e la neuropatia motoria multifocale (MMN), ⁴⁸⁵ oltre a molte altre indicazioni off-label ⁴⁸⁶. Per quanto riguarda la via di somministrazione, in generale la via sottocutanea ⁴⁸⁷ si è dimostrata conveniente, altrettanto efficace e alla fine più sicura delle IVIG ⁴⁸⁸.

⁴⁸⁰ Kazatchkine MD, Kaveri SV.

Immunomodulation of autoimmune and inflammatory diseases with intravenous immune globulin. *N Engl J Med*. 2001 Sep 6;345(10):747-55. doi: 10.1056/NEJMra993360. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11547745/>

Kerr J, Quinti I, Eibl M, Chapel H, Späth PJ, Sewell WA, Salama A, van Schaik IN, Kuijpers TW, Peter HH. Is dosing of therapeutic immunoglobulins optimal? A review of a three-decade long debate in europe. *Front Immunol*. 2014 Dec 12;5:629. doi: 10.3389/fimmu.2014.00629. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4263903/>

⁴⁸¹ Bruton OC.

Agammaglobulinemia. *Pediatrics*. 1952 Jun;9(6):722-8. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14929630/>

Pashangzadeh S, Yazdani R, Nazari F, Azizi G, Abolhassani H, Aghamohammadi A. Agammaglobulinemia: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Phenotype, Diagnosis, Prognosis and Management. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2020;20(9):1434-1447. doi: 10.2174/1871530320666200508114349. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32384040/>

⁴⁸² Imbach P, Barandun S, d'Apuzzo V, Baumgartner C, Hirt A, Morell A, Rossi E, Schöni M, Vest M, Wagner HP.

High-dose intravenous gammaglobulin for idiopathic thrombocytopenic purpura in childhood. *Lancet*. 1981 Jun 6;1(8232):1228-31. doi: 10.1016/s0140-6736(81)92400-4. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6112565/>

⁴⁸³ Newburger JW, Takahashi M, Burns JC, Beiser AS, Chung KJ, Duffy CE, Glode MP, Mason WH, Reddy V, Sanders SP, et al.

The treatment of Kawasaki syndrome with intravenous gamma globulin. *N Engl J Med*. 1986 Aug 7;315(6):341-7. doi: 10.1056/NEJM198608073150601. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2426590/>

⁴⁸⁴ Hughes RA, Donofrio P, Bril V, Dalakas MC, Deng C, Hanna K, Hartung HP, Latov N, Merkies IS, van Doorn PA; ICE Study Group.

Intravenous immune globulin (10% caprylate-chromatography purified) for the treatment of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (ICE study): a randomised placebo-controlled trial. *Lancet Neurol*. 2008 Feb;7(2):136-44. doi: 10.1016/S1474-4422(07)70329-0. Erratum in: *Lancet Neurol*. 2008 Sep;7(9):771. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18178525/>

⁴⁸⁵ European Federation of Neurological Societies; Peripheral Nerve Society, van Schaik IN, et al

European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society guideline on management of multifocal motor neuropathy. *Eur J Neurol*. 2006 Aug;13(8):802-8. doi: 10.1111/j.1468-1331.2006.01466.x. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16879289/>

⁴⁸⁶ Jolles S, Sewell WA, Misbah SA.

Clinical uses of intravenous immunoglobulin. *Clin Exp Immunol*. 2005 Oct;142(1):1-11. doi: 10.1111/j.1365-2249.2005.02834.x. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1809480/>

⁴⁸⁷ Berger M, Cupps TR, Fauci AS.

Immunoglobulin replacement therapy by slow subcutaneous infusion. *Ann Intern Med*. 1980 Jul;93(1):55-6. doi: 10.7326/0003-4819-93-1-55. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7396316/>

⁴⁸⁸ Haddad É, Barnes D, Kafal A.

Home therapy with subcutaneous immunoglobulins for patients with primary immunodeficiency diseases. *Transfus Apher Sci*. 2012 Jun;46(3):315-21. doi: 10.1016/j.transci.2012.03.022. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22503304/>

Ochs HD, Gupta S, Kiessling P, Nicolay U, Berger M;

Le uniche preparazioni iperimmuni nell'uso clinico non dirette contro i patogeni sono l'anti-Rhesus D (Rh(D)). Questi preparati prevengono la sensibilizzazione dell'Rh(D) delle madri Rh(D)-negative da parte del feto Rh(D)-positivo, per evitare il rischio di malattia emolitica del neonato nelle gravidanze successive ⁴⁸⁹.

L'anti-Rh(D) ha anche trovato applicazione per il trattamento della PTI ⁴⁹⁰.

Le preparazioni di immunoglobuline per uso umano che contengono quantità rilevanti di isotipi diversi dalle sIgG quali IgA e/o IgM più ampiamente utilizzate nella pratica clinica sono il [Pentaglobin](#), [Venimmun N](#) e [IgAbulin \(Tabella 1\)](#) ⁴⁹¹.

Pentaglobin e Venimmun N sono preparati per via endovenosa che trovano ad oggi applicazioni cliniche per la terapia di supporto di gravi infezioni batteriche in associazione alla terapia antibiotica, la terapia sostitutiva con immunoglobuline in pazienti immunosoppressi e in pazienti con grave sindrome da carenza secondaria di anticorpi .

Vi sono prove crescenti che suggeriscono che le IgM nella configurazione anticorpale naturale possono avere un potenziale antinfiammatorio, immunomodulatore e di sorveglianza del tumore che potrebbe essere rilevante in una varietà di condizioni cliniche. ⁴⁹²

Subcutaneous IgG Study Group. Safety and efficacy of self-administered subcutaneous immunoglobulin in patients with primary immunodeficiency diseases.

J Clin Immunol. 2006 May;26(3):265-73. doi: 10.1007/s10875-006-9021-7.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16783465/>

Samaan K, Levasseur MC, Decaluwe H, St-Cyr C, Chapdelaine H, Des Roches A, Haddad E.
 SCIg vs. IVIg: let's give patients the choice!
 J Clin Immunol. 2014 Aug;34(6):611-4. doi: 10.1007/s10875-014-0057-9.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24888599/>

Wasserman RL.
 Progress in gammaglobulin therapy for immunodeficiency: from subcutaneous to intravenous infusions and back again.
 J Clin Immunol. 2012 Dec;32(6):1153-64. doi: 10.1007/s10875-012-9740-x.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22828788/>

⁴⁸⁹ MacKenzie IZ, Bichler J, Mason GC, Lunan CB, Stewart P, Al-Azzawi F, De Bono M, Watson N, Andresen I.
 Efficacy and safety of a new, chromatographically purified rhesus (D) immunoglobulin.
 Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2004 Dec 1;117(2):154-61. doi: 10.1016/j.ejogrb.2004.03.009.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15541850/>

Pollack W, Gorman JG, Freda VJ, Ascari WQ, Allen AE, Baker WJ.
 Results of clinical trials of RhoGAM in women.
 Transfusion. 1968 May-Jun;8(3):151-3. doi: 10.1111/j.1537-2995.1968.tb04895.x.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4173363/>

⁴⁹⁰ Despotovic JM, Lambert MP, Herman JH, Gernsheimer TB, McCrae KR, Tarantino MD, Bussel JB.
 RhIG for the treatment of immune thrombocytopenia: consensus and controversy (CME).
 Transfusion. 2012 May;52(5):1126-36; quiz 1125. doi: 10.1111/j.1537-2995.2011.03384.x.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3427798/>

⁴⁹¹ Späth PJ, Schneider C, von Gunten S.
 Clinical Use and Therapeutic Potential of IVIG/SCIG, Plasma-Derived IgA or IgM, and Other Alternative Immunoglobulin Preparations.
 Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2017 Jun;65(3):215-231. doi: 10.1007/s00005-016-0422-x.
<https://link.springer.com/article/10.1007/s00005-016-0422-x>

⁴⁹² Devarapu SK, Mamidi S, Plöger F, Dill O, Blixt O, Kirschfink M, Schwartz-Albiez R.
 Cytotoxic activity against human neuroblastoma and melanoma cells mediated by IgM antibodies derived from peripheral blood of healthy donors.
 Int J Cancer. 2016 Jun 15;138(12):2963-73. doi: 10.1002/ijc.30025.
<https://doi.org/10.1002/ijc.30025>

Díaz-Zaragoza M, Hernández-Ávila R, Viedma-Rodríguez R, Arenas-Aranda D, Ostoa-Saloma P.
 Natural and adaptive IgM antibodies in the recognition of tumor-associated antigens of breast cancer (Review).
 Oncol Rep. 2015 Sep;34(3):1106-14. doi: 10.3892/or.2015.4095.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4530904/>

Gleissner CA, et al
 Low levels of natural IgM antibodies against phosphorylcholine are independently associated with vascular remodeling in patients with coronary artery disease.
 Clin Res Cardiol. 2015 Jan;104(1):13-22. doi: 10.1007/s00392-014-0750-y.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25103819/>

Pertanto, è ampiamente accettato che le preparazioni di immunoglobuline contenenti IgM policlonali possano contenere un alto potenziale di effetti immunomodulatori, antinfiammatori e omeostatici sui tessuti.⁴⁹³

In particolare è stato recentemente dimostrato che il trattamento di topi diabetici con IgM da donatori sani ha portato all'inversione della malattia⁴⁹⁴. Negli studi sull'uomo, il trasferimento passivo di IgM in pool da 2.500 donatori sani contenenti il 90% di IgM pure (IVIgM) ha soppresso *in vitro* le attività degli autoanticorpi IgG da pazienti con malattie autoimmuni. Inoltre, l'IVIgM ha dimostrato di avere un promettente effetto terapeutico nel miglioramento delle malattie infiammatorie, quali la miastenia grave e la sclerosi multipla in modelli sperimentali per la sua azione rimielinizzante.⁴⁹⁵

Grönwall C, Silverman GJ.

Natural IgM: beneficial autoantibodies for the control of inflammatory and autoimmune disease.
J Clin Immunol. 2014 Jul;34 Suppl 1(0 1):S12-21. doi: 10.1007/s10875-014-0025-4.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4354681/>

Nguyen TT, Elsner RA, Baumgarth N.

Natural IgM prevents autoimmunity by enforcing B cell central tolerance induction.
J Immunol. 2015 Feb 15;194(4):1489-502. doi: 10.4049/jimmunol.1401880.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4324358/>

Tsiantoulas D, et al

Circulating microparticles carry oxidation-specific epitopes and are recognized by natural IgM antibodies.
J Lipid Res. 2015 Feb;56(2):440-8. doi: 10.1194/jlr.P054569.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4306697/>

Villar LM, et al

Lipid-specific immunoglobulin M bands in cerebrospinal fluid are associated with a reduced risk of developing progressive multifocal leukoencephalopathy during treatment with natalizumab.
Ann Neurol. 2015 Mar;77(3):447-57. doi: 10.1002/ana.24345.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25581547/>

Wootla B, et al

Naturally Occurring Monoclonal Antibodies and Their Therapeutic Potential for Neurologic Diseases.
JAMA Neurol. 2015 Nov;72(11):1346-53. doi: 10.1001/jamaneurol.2015.2188.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26389734/>

⁴⁹³ Ehrenstein MR, Notley CA.

The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator.
Nat Rev Immunol. 2010 Nov;10(11):778-86. doi: 10.1038/nri2849.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20948548/>

Späth PJ, Schneider C, von Gunten S.

Clinical Use and Therapeutic Potential of IVIG/SCIG, Plasma-Derived IgA or IgM, and Other Alternative Immunoglobulin Preparations.
Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2017 Jun;65(3):215-231. doi: 10.1007/s00005-016-0422-x.
<https://link.springer.com/article/10.1007/s00005-016-0422-x>

⁴⁹⁴ Wilson CS, Hoopes EM, Falk AC, Moore DJ.

A human IgM enriched immunoglobulin preparation, Pentaglobin, reverses autoimmune diabetes without immune suppression in NOD mice.
Sci Rep. 2022 Jul 11;12(1):11731. doi: 10.1038/s41598-022-15676-8.
<https://www.nature.com/articles/s41598-022-15676-8>

⁴⁹⁵ Nguyen TT, Baumgarth N.

Natural IgM and the Development of B Cell-Mediated Autoimmune Diseases.
Crit Rev Immunol. 2016;36(2):163-177. doi: 10.1615/CritRevImmunol.2016018175.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5292326/>

Hurez V, Kazatchkine MD, Vassilev T, Ramanathan S, Pashov A, Basuyaux B, de Kozak Y, Bellon B, Kaveri SV.

Pooled normal human polyspecific IgM contains neutralizing anti-idiotypes to IgG autoantibodies of autoimmune patients and protects from experimental autoimmune disease.
Blood. 1997 Nov 15;90(10):4004-13.
<https://doi.org/10.1182/blood.V90.10.4004>

Rieben R, Roos A, Muizert Y, Tinguely C, Gerritsen AF, Daha MR.

Immunoglobulin M-enriched human intravenous immunoglobulin prevents complement activation in vitro and in vivo in a rat model of acute inflammation.
Blood. 1999 Feb 1;93(3):942-51.
<https://doi.org/10.1182/blood.V93.3.942>

Per quanto riguarda le avvertenze d'uso si rimanda alla scheda tecnica dei farmaci, mentre il meccanismo delle reazioni sarà dettagliato nel capitolo sotto dedicato agli anticorpi monoclonali.

ANTICORPI MONOCLONALI

Produzione degli anticorpi monoclonali

Gli anticorpi monoclonali sono anticorpi generati principalmente dai linfociti dei linfociti e, dato che queste cellule non possono propagarsi nella coltura cellulare per un lungo periodo di tempo, sono stati studiati diversi metodi utilizzati per produrli in linee cellulari stabili.⁴⁹⁶

Se la fonte di queste cellule sono linfociti murini, gli anticorpi monoclonali murini ottenuti vengono utilizzati principalmente per applicazioni immunodiagnostiche.⁴⁹⁷

Nel caso di utilizzo di cellule di origine umana, ottenute in particolare da pazienti convalescenti, come i pazienti con COVID-19, gli anticorpi monoclonali umani prodotti sono considerati anticorpi terapeutici mirati al SARS-CoV-2.⁴⁹⁸

Il metodo classico per la produzione degli anticorpi monoclonali di topo si basa sulla fusione cellulare delle cellule spleniche di topi immunizzati (ad esempio per immunizzazione con proteine SARS-CoV-2) e delle linee

Vassilev T, Yamamoto M, Aissaoui A, Bonnin E, Berrih-Aknin S, Kazatchkine MD, Kaveri SV.
Normal human immunoglobulin suppresses experimental myasthenia gravis in SCID mice.
Eur J Immunol. 1999 Aug;29(8):2436-42. doi: 10.1002/(SICI)1521-4141(199908)29:08<2436::AID-IMMU2436>3.0.CO;2-9.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199908\)29:08<2436::AID-IMMU2436>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199908)29:08<2436::AID-IMMU2436>3.0.CO;2-9)

Bieber AJ, Warrington A, Asakura K, Ciric B, Kaveri SV, Pease LR, Rodriguez M.
Human antibodies accelerate the rate of remyelination following lysolecithin-induced demyelination in mice.
Glia. 2002 Mar 1;37(3):241-9. doi: 10.1002/glia.10033.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11857682/>

Warrington AE, Asakura K, Bieber AJ, Ciric B, Van Keulen V, Kaveri SV, Kyle RA, Pease LR, Rodriguez M.
Human monoclonal antibodies reactive to oligodendrocytes promote remyelination in a model of multiple sclerosis.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Jun 6;97(12):6820-5. doi: 10.1073/pnas.97.12.6820
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC18751/>

⁴⁹⁶ de Moraes, Jane et al.
"Alternative Methods to Animal Use for Monoclonal Antibody Generation and Production".
Monoclonal Antibodies, edited by Nima Rezaei, IntechOpen, 2020. 10.5772/intechopen.95485.
<https://www.intechopen.com/chapters/74640>

Tabll AA, Shahein YE, Omran MM, Elnakib MM, Ragheb AA, Amer KE.
A review of monoclonal antibodies in COVID-19: Role in immunotherapy, vaccine development and viral detection.
Hum Antibodies. 2021;29(3):179-191. doi: 10.3233/HAB-200441.
<https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/mabs-manufacture-guideline-draft-for-1st-public-comment.pdf>

⁴⁹⁷ Tabll A, Abbas AT, El-Kafrawy S, Wahid A.
Monoclonal antibodies: Principles and applications of immunodiagnosis and immunotherapy for hepatitis C virus.
World J Hepatol. 2015 Oct 8;7(22):2369-83. doi: 10.4254/wjh.v7.i22.2369.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4598607/>

Abdel Malak CA, Abelhafez TH, Tabll AA, Mashaly MM, El Shenawy R, El-Abd YS, Shaker MH, El-Awady MK.
Neutralizing activity and safety of human monoclonal antibodies against hepatitis C virus.
Hum Antibodies. 2017;26(3):127-134. doi: 10.3233/HAB-170330.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29036810/>

⁴⁹⁸ Henderson JP.
What are protective antibody responses to pandemic SARS-CoV-2?
J Clin Invest. 2020 Dec 1;130(12):6232-6234. doi: 10.1172/JCI143466.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7685743/>

Valdez-Cruz NA, et al
Integrative overview of antibodies against SARS-CoV-2 and their possible applications in COVID-19 prophylaxis and treatment.
Microb Cell Fact. 2021 Apr 22;20(1):88. doi: 10.1186/s12934-021-01576-5.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8061467/>

cellulari di mieloma di topo, con mezzi di fusione come il polietilenglicole (PEG), e la successiva subclonazione cellulare (tecnica dell'ibridoma).⁴⁹⁹

Al contrario, la generazione di potenziali mAb umani ricombinanti terapeutici include la clonazione di cDNA codificanti per le regioni variabili della catena pesante umana IgG1 e le regioni costanti della catena leggera Ig kappa in plasmidi di espressione.

Entrambi i plasmidi contengono la sequenza segnale dell'interleuchina-2 per consentire un'efficiente secrezione degli anticorpi ricombinanti.

Gli anticorpi umani ricombinanti vengono quindi prodotti nelle cellule HEK-293T dopo la trasfezione con set di plasmidi di espressione delle catene pesanti e leggere IgG1 e purificati mediante cromatografia di affinità della proteina A⁵⁰⁰.

Da quando è stata introdotta la tecnica dell'ibridoma nel 1975 come approccio efficace per avere quantità sufficienti di mAbs puri, sono stati condotti studi terapeutici per neutralizzare gli epitopi di superficie virali, come in SARS-CoV⁵⁰¹ e MERS⁵⁰². Questi principi sono ora utilizzati per generare anticorpi monoclonali umani per neutralizzare il SARS-CoV-2.

La **tecnologia dell'ibridoma** dei topi è un processo in più fasi che sfrutta la capacità naturale dell'animale ospite di produrre mAb altamente specifici, ad alta affinità e completamente funzionali.

Implica lo sviluppo e l'ottimizzazione dell'antigene immunogenico specifico (Ag). Dopo l'ottimizzazione, un animale ospite viene immunizzato con l'Ag insieme all'adiuvante per diverse settimane.

I sieri di animali immunizzati vengono testati per la loro reattività e specificità all'antigene immunizzante mentre gli animali con alti titoli di anticorpi leganti vengono ulteriormente selezionati per l'isolamento degli splenociti. Le cellule della milza vengono fuse con le cellule immortalizzate del mieloma in presenza di agenti fusogeni come virus, sostanze chimiche e impulsi elettrici.

Le linee cellulari di fusione del mieloma più comuni sono X63-Ag 8.6539 e Sp2/0-Ag 1410, con origine dal topo BALB/c. Le cellule fuse vengono quindi selezionate su medium di ipoxantina-aminopterin-timidina (HAT). Le cellule del mieloma sono sensibili al mezzo HAT, in quanto mancano del gene dell'ipoxantina-guanina fosforibosiltransferasi (HGPRT) richiesto per la sintesi dei nucleotidi dalle vie *de novo* o di salvataggio, mentre le cellule B non fuse muoiono in quanto di breve durata. In questo processo, sopravvive solo l'ibrido (mieloma a cellule B), poiché ospita il gene funzionale HGPRT dalle cellule B.

Tuttavia, le cellule ibride mantengono le doppie proprietà, la proprietà di secernere gli anticorpi delle cellule B e la proprietà in continua crescita (immortalità) dalle cellule di mieloma.

⁴⁹⁹ Zhang C.

Hybridoma technology for the generation of monoclonal antibodies.
Methods Mol Biol. 2012;901:117-35. doi: 10.1007/978-1-61779-931-0_7.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22723097/>

Muhsin A, Rangel R, Vien L, Bover L.

Monoclonal Antibodies Generation: Updates and Protocols on Hybridoma Technology. Methods Mol Biol. 2022;2435:73-93. doi: 10.1007/978-1-0716-2014-4_6
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34993940/>

⁵⁰⁰ Wang C, Li W, Drabek D, Okba NMA, van Haperen R, Osterhaus ADME, van Kuppeveld FJM, Haagmans BL, Grosveld F, Bosch BJ.

A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection.
Nat Commun. 2020 May 4;11(1):2251. doi: 10.1038/s41467-020-16256-y. Erratum in: Nat Commun. 2020 May 14;11(1):2511.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7198537/>

Monoclonal Antibody Production

<https://www.moleculardevices.com/applications/monoclonal-antibody-production#gref>

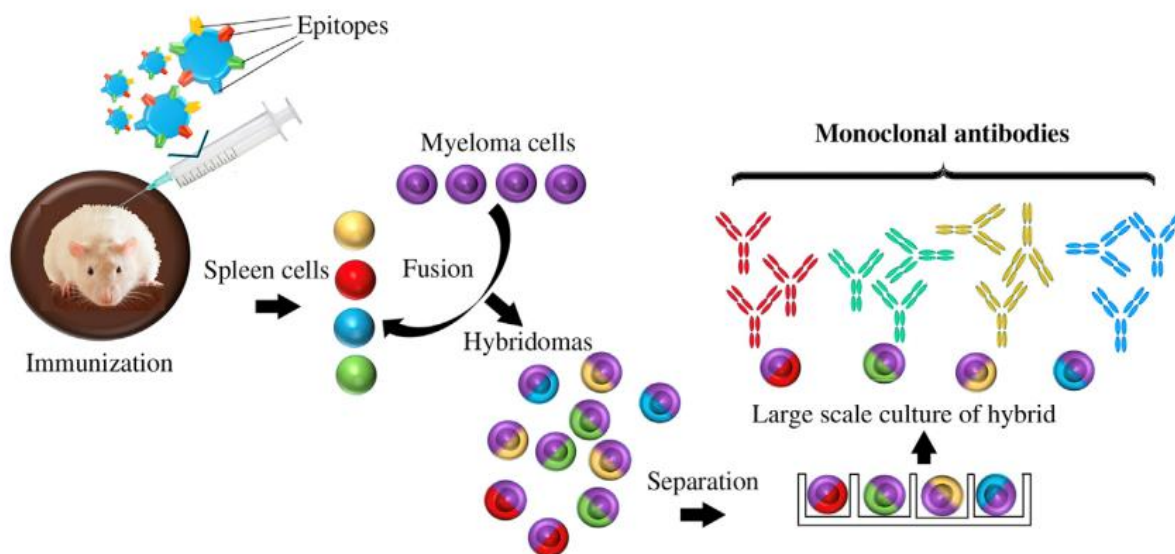
⁵⁰¹ Rockx B, Corti D, Donaldson E, Sheahan T, Stadler K, Lanzavecchia A, Baric R.

Structural basis for potent cross-neutralizing human monoclonal antibody protection against lethal human and zoonotic severe acute respiratory syndrome coronavirus challenge.
J Virol. 2008 Apr;82(7):3220-35. doi: 10.1128/JVI.02377-07.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2268459/>

⁵⁰² Goo J, Jeong Y, Park YS, Yang E, Jung DI, Rho S, Park U, Sung H, Park PG, Choi JA, Seo SH, Cho NH, Lee H, Lee JM, Kim JO, Song M.

Characterization of novel monoclonal antibodies against MERS-coronavirus spike protein.
Virus Res. 2020 Mar;278:197863. doi: 10.1016/j.virusres.2020.197863.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7114870/>

Le cellule fuse o ibride vengono quindi vagliate mediante il metodo della "clonazione a diluizione limitata" o con un mezzo selettivo semi solido per selezionare solo quegli ibridomi che producono anticorpi di specificità appropriata.⁵⁰³



<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804659-3.00016-6>

Tecnologia dell'ibridoma utilizzata per produrre mAb: generazione di mAb immunizzando animali da laboratorio con qualsiasi antigene bersaglio. Cellule di ibridoma generate dalla fusione tra cellule B di un animale immunizzato (generalmente un ratto, un topo, un coniglio o una scimmia) e le cellule di mieloma. Le cellule ibride vengono selezionate nel supporto HAT e, infine, vengono vagliate le cellule che secernono gli anticorpi desiderati.

I potenziali approcci per la produzione di anticorpi monoclonali contro il SARS-Cov-2 sono:

1. Uso della classica tecnologia dell'ibridoma per la produzione di anticorpi monoclonali contro gli specifici epitopi di superficie della proteina spike della SARS. Questo modello è stato realizzato da Wang et al.⁵⁰⁴ per generare l'anticorpo monoclonale umano 47D11. L'anticorpo ha mostrato la sua capacità neutralizzante contro gli epitopi comuni dei virus SARS-CoV e SARS-CoV-2 nella coltura di cellule Vero.

2. L'uso di cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC), da pazienti convalescenti con COVID-19, come fonte di linfociti a cellule B. Dalle cellule mononucleate del sangue periferico (PMBC), le cellule B CD22⁺ vengono separate mediante MACS (Magnetic-activated cell sorting) e immortalizzate mediante EBV⁵⁰⁵.

⁵⁰³ Parray HA, Shukla S, Samal S, Shrivastava T, Ahmed S, Sharma C, Kumar R. Hybridoma technology a versatile method for isolation of monoclonal antibodies, its applicability across species, limitations, advancement and future perspectives.

Int Immunopharmacol. 2020 Aug;85:106639. doi: 10.1016/j.intimp.2020.106639.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7255167/>

⁵⁰⁴ Wang C, Li W, Drabek D, Okba NMA, van Haperen R, Osterhaus ADME, van Kuppeveld FJM, Haagmans BL, Grosveld F, Bosch BJ.

A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection.

Nat Commun. 2020 May 4;11(1):2251. doi: 10.1038/s41467-020-16256-y. Erratum in: Nat Commun. 2020 May 14;11(1):2511.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7198537/>

<https://upbiotech.wordpress.com/2018/08/28/produzione-di-anticorpi-monoclonali/>

⁵⁰⁵ Fraussen J, Vrolix K, Martinez-Martinez P, Losen M, Meulemans E, De Baets MH, Stinissen P, Somers V.

A novel method for making human monoclonal antibodies.

J Autoimmun. 2010 Sep;35(2):130-4. doi: 10.1016/j.jaut.2010.05.001.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7126289/>

Tabll A, El Abd Y, El Din NG, El Shenawy R, Abdelhafez TH, El Awady M, El-Mohamady H, Viazov S.

Establishment of human clones producing neutralizing human monoclonal antibodies to the envelope E1/E2 protein of hepatitis C virus by EBV immortalization of immune CD22⁺ B cells.

Hum Antibodies. 2013;22(3-4):55-65. doi: 10.3233/HAB-140271.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24961863/>

3. L'uso di PBMC da pazienti convalescenti COVID-19, per la separazione di cellule B CD27⁺ e successiva procedura di fusione cellulare con linee cellulari umane. Questi approcci sono stati impiegati da Puligedda et al.⁵⁰⁶ per la produzione di mAb con una potente attività neutralizzante contro il poliovirus.

4. Utilizzo della tecnologia di Phage display⁵⁰⁷ (libreria Tomlinson I) per selezionare il dominio di legame del recettore (RBD) di SARS-CoV-2. Nei pazienti COVID-19⁵⁰⁸, sono stati identificati 3 tipi di anticorpi (scFv, scFv-Fc e IgG1) con un'elevata specificità di legame per l'RBD della glicoproteina della spike trimetrica. Un altro protocollo di Phage Display utilizza una libreria VHH Llama nativa e una libreria VHH Llama umanizzata sintetica⁵⁰⁹. L'approccio si basa sulla generazione di anticorpi bi- o tri-specifici che possono colpire diversi antigeni contemporaneamente per bloccare il sito di interazione S/ACE2.⁴⁹⁵

Una metodica alternativa all'ibridoma è rappresentata dalle librerie fagiche di esposizione o **phage display**, una strategia che permette di esibire un peptide o un polipeptide sulla superficie di un batteriofago. Di solito vengono selezionati vettori fagici M13, f1 o fd che hanno un rivestimento proteico esterno. Tutti i fagi sopraelencati sono filamentosi, non litici e in grado di incorporare DNA circolare a singolo filamento. Sebbene le famiglie di fagi che possono essere utilizzate sono diverse, in realtà quella che viene maggiormente utilizzata nella phage display è la famiglia M13. La scelta è dettata da motivi essenzialmente pratici. M13 è un fago che, a differenza degli altri, può essere facilmente purificato e manipolato. M13 per replicarsi deve infettare le cellule batteriche, tuttavia esso non induce la lisi del batterio ma una via lisogena che guida verso la produzione di particelle fagiche. Il genoma del fago inoltre, contiene le informazioni per codificare proteine coinvolte nella replicazione, proteine morfogenetiche e infine proteine strutturali. Per proteine strutturali si intendono quelle proteine che costituiscono l'involucro delle particelle fagiche. Queste ultime si distinguono in: proteine maggiori (pVIII), presenti in copie da cinque sulla superficie del Fago, e proteine minori (pIII e pVI) presenti in 2800 copie. M13 viene modificato geneticamente in maniera tale da esporre sulla sua superficie piccoli peptidi fusi insieme alle proteine pIII e pVIII. In questo modo, è possibile ottenere un ampio e diversificato gruppo di cloni fagici, ognuno dei quali esprime delle sequenze random. A questo punto la popolazione di diversi batteriofagi,

Esmailzadeh A, Elahi R.

Immunobiology and immunotherapy of COVID-19: A clinically updated overview. *J Cell Physiol.* 2021 Apr;236(4):2519-2543. doi: 10.1002/jcp.30076. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7675260/>

⁵⁰⁶ Puligedda RD, Vigdorovich V, Koujavskaia D, Kattala CD, Zhao JY, Al-Saleem FH, Chumakov K, Sather DN, Dessain SK. Human IgA Monoclonal Antibodies That Neutralize Poliovirus, Produced by Hybridomas and Recombinant Expression. *Antibodies (Basel).* 2020 Feb 28;9(1):5. doi: 10.3390/antib9010005. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7148538/>

⁵⁰⁷ Gülay Büyükköroğlu, Behiye Şenel, Chapter 16 - Engineering Monoclonal Antibodies: Production and Applications, Editor(s): Debmalya Barh, Vasco Azevedo, Omics Technologies and Bio-Engineering, Academic Press, 2018, Pages 353-389, ISBN 9780128046593, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804659-3.00016-6>. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128046593000166>

Anand T, Virmani N, Bera BC, Vaid RK, Vashisth M, Bardajaty P, Kumar A, Tripathi BN. Phage Display Technique as a Tool for Diagnosis and Antibody Selection for Coronaviruses. *Curr Microbiol.* 2021 Apr;78(4):1124-1134. doi: 10.1007/s00284-021-02398-9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7941128/>

⁵⁰⁸ Parray HA, et al Identification of an anti-SARS-CoV-2 receptor-binding domain-directed human monoclonal antibody from a naïve semisynthetic library. *J Biol Chem.* 2020 Sep 4;295(36):12814-12821. doi: 10.1074/jbc.AC120.014918. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7476711/>

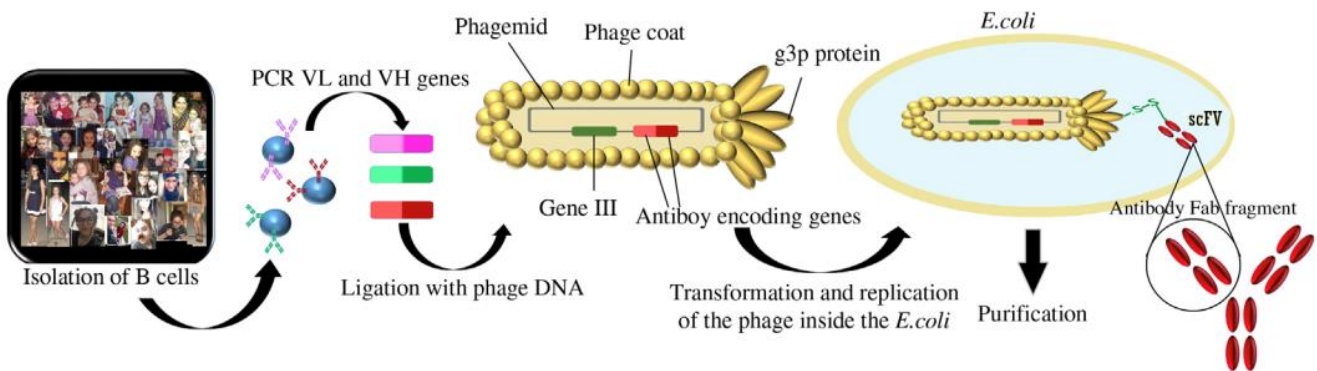
⁵⁰⁹ Dong J, Huang B, Jia Z, Wang B, Gallolu Kankanamalage S, Titong A, Liu Y. Development of multi-specific humanized llama antibodies blocking SARS-CoV-2/ACE2 interaction with high affinity and avidity. *Emerg Microbes Infect.* 2020 Dec;9(1):1034-1036. doi: 10.1080/22221751.2020.1768806. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8284970/>

ognuna con un fenotipo ben distinto viene esposta allo specifico target molecolare. Solo quei batteriofagi che presentano un'alta affinità per le molecole target rimangono ad esse legate (dopo i diversi step di lavaggio) e possono essere amplificati utilizzando *E. coli*.

I cloni così amplificati vengono sequenziati per risalire alla sequenza amminoacidica del peptide esposto sulla superficie del Fago e per confermare la specificità del peptide al target viene effettuato un test ELISA.

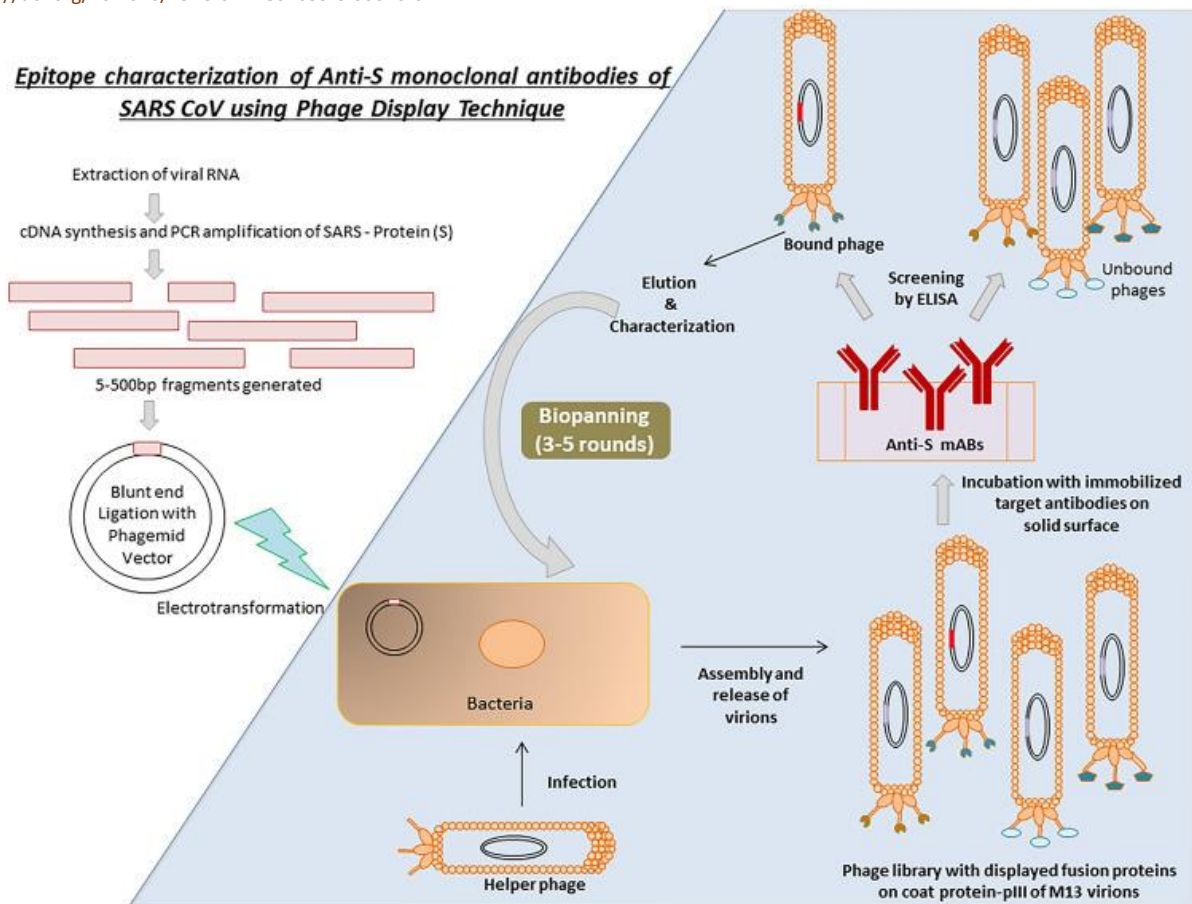
Le potenzialità del phage display sono principalmente due: 1) permette di stabilire una connessione diretta tra il fenotipo (il peptide esposto sulla superficie del fago) e il genotipo (la sequenza di DNA codificante per il peptide) all'interno della stessa particella virale e 2) La produzione di una vasta e diversificata libreria di peptidi che viene esposta sulla superficie del Fago.

Il primo anticorpo prodotto sfruttando questa tecnica è adalimumab utilizzato per il trattamento dell'artrite reumatoide e altre patologie infiammatorie. L'importanza di questa tecnica è stata univocamente riconosciuta dalla comunità scientifica, tanto che il premio Nobel per la Chimica nel 2018 è stato assegnato ai due pionieri dello sviluppo di questa tecnica: Smith e Winter.⁵¹⁰



<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804659-3.00016-6>

Epitope characterization of Anti-S monoclonal antibodies of SARS CoV using Phage Display Technique



⁵¹⁰ <https://upbiotech.wordpress.com/2019/05/15/phage-display/>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7941128/>

Un'illustrazione della tecnica di visualizzazione dei fagi per la caratterizzazione degli epitopi di anticorpi monoclonali che si legano alla proteina spike di MERS-CoV utilizzando la tecnica di visualizzazione dei fagi. L'intero RNA può essere estratto e il cDNA amplificato. Il gene che codifica per le proteine spike può essere amplificato dalla PCR. I segmenti genici possono essere ottenuti per frammentazione utilizzando enzimi di restrizione e segmenti clonati nel vettore fagemidico. La trasformazione dei fagemidi in *E. coli* e l'infezione con il fago helper possono portare alla produzione di fagi che mostrano proteine codificate dal segmento genomico clonato. La libreria di fagi così formata può essere sottoposta a screening utilizzando Anti-S-mAb mediante ELISA e il legame specifico dei fagi può essere selezionato mediante cicli ripetuti di biopanning (eluizione, amplificazione, legame e lavaggio). Il sequenziamento del DNA dei fagi legati porta alla mappatura degli epitopi

Cellule CHO come produttori di mAb anti-SARS-CoV-2

La natura tetramerică di una molecola IgG e la sua glicosilazione sono essenziali per il suo funzionamento, rendendola una proteina difficile da esprimere. In questo senso, le cellule di mammifero, come le cellule CHO (Chinese Hamster Ovary – ovario di criceto cinese), sono diventate una delle fabbriche cellulari più utilizzate per la produzione industriale di mAb ⁵¹¹.

Tuttavia, rispetto ai batteri e ai lieviti, i rendimenti e la produttività dei processi basati sulle cellule di mammifero sono bassi a causa della lenta crescita cellulare, della loro tendenza a subire l'apoptosi e della bassa capacità produttiva per cellula. ⁵¹²

Per questo motivo, lo sviluppo di cellule con caratteristiche produttive superiori è stato un obiettivo importante del settore e grazie all'ingegneria cellulare, i tempi per la creazione di linee cellulari produttive di mAb completamente umanizzati si sono ridotti drasticamente ad alcuni mesi, con un aumento della produttività (fino a 100 pg/cellula al giorno, che rappresentano titoli bioreattoriali di quasi 10 g/L), attualmente fondamentale per la produzione di mAb anti-SARS-CoV-2. ⁵¹³

⁵¹¹ Walsh G.

Biopharmaceutical benchmarks 2018.
Nat Biotechnol. 2018 Dec 6;36(12):1136-1145. doi: 10.1038/nbt.4305
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30520869/>

Jayapal, Karthik P., Katie F Wlaschin, W. -S. Hu and Miranda Gek Sim Yap.
"Recombinant protein therapeutics from CHO cells : 20 years and counting." Chemical Engineering Progress 103 (2007): 40-47.
<https://www.aische.org/sites/default/files/docs/pages/CHO.pdf>

Sharker SM, Rahman A.

A Review on the Current Methods of Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells Cultivation for the Production of Therapeutic Protein.
Curr Drug Discov Technol. 2021;18(3):354-364. doi: 10.2174/1570163817666200312102137
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32164511/>

⁵¹² Al-Rubeai M.

Antibody expression and production. Cell engineering, vol. 7; 2007.
<https://doi.org/10.1007/978-94-007-1257-7>
<https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download;jsessionid=75D6B4B5FC03D7B718EDD9A5011C2505?doi=10.1.1.472.1352&rep=rep1&type=pdf>

Bandaranayake AD, Almo SC.

Recent advances in mammalian protein production.
FEBS Lett. 2014 Jan 21;588(2):253-60. doi: 10.1016/j.febslet.2013.11.035.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3924552/>

⁵¹³ Kuo CC, Chiang AW, Shamie I, Samoudi M, Gutierrez JM, Lewis NE.

The emerging role of systems biology for engineering protein production in CHO cells.
Curr Opin Biotechnol. 2018 Jun;51:64-69. doi: 10.1016/j.copbio.2017.11.015.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5988649/>

Sarsaiya S, Shi J, Chen J.

Bioengineering tools for the production of pharmaceuticals: current perspective and future outlook.
Bioengineered. 2019 Dec;10(1):469-492. doi: 10.1080/21655979.2019.1682108.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6844412/>

Pérez-Rodríguez S, Ramírez-Lira MJ, Trujillo-Roldán MA, Valdez-Cruz NA.

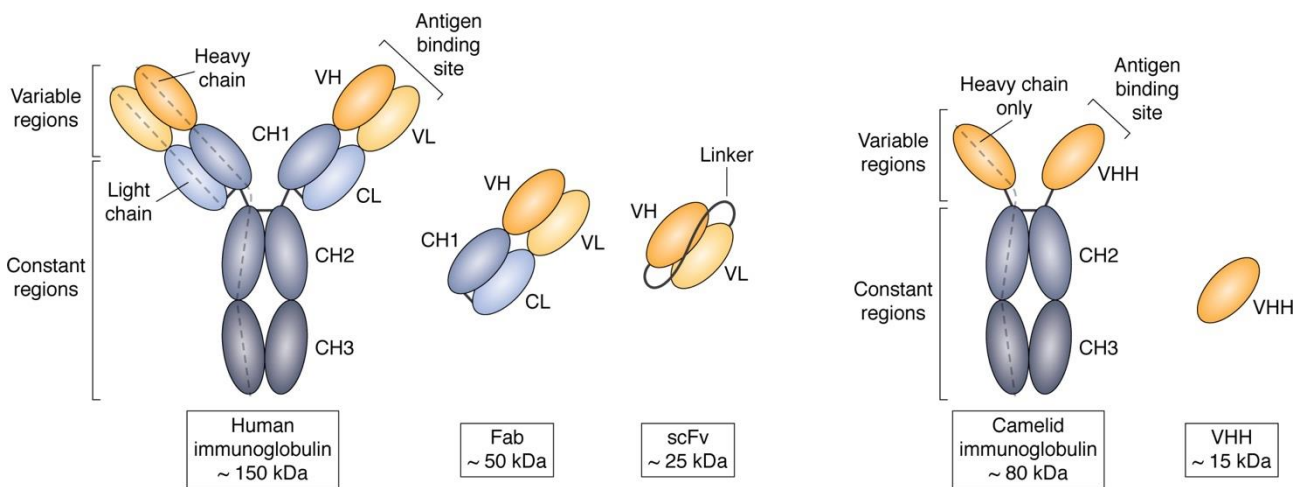
Nutrient supplementation strategy improves cell concentration and longevity, monoclonal antibody production and lactate metabolism of Chinese hamster ovary cells.
Bioengineered. 2020 Dec;11(1):463-471. doi: 10.1080/21655979.2020.1744266.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7161567/>

Golabgir A, Gutierrez JM, Hefzi H, Li S, Palsson BO, Herwig C, Lewis NE.

Quantitative feature extraction from the Chinese hamster ovary bioprocess bibliome using a novel meta-analysis workflow.

Nella ricerca di strumenti per fronteggiare la pandemia di COVID-19, la produzione di Nbs (nanobody) è diventata un'alternativa, in quanto le Nbs sono proteine più piccole e non glicosilate, possono essere prodotte in fabbriche cellulari come batteri o lieviti, a costi inferiori, con una scala di produzione più ampia ⁵¹⁴.

Un **anticorpo a dominio singolo (sdAb)**, noto anche come **nanocorpo (nanobody)**, è un frammento di anticorpo costituito da un singolo dominio di anticorpo monomero variabile. Come un intero anticorpo, è in grado di legarsi selettivamente a uno specifico antigene. Con un peso molecolare di soli 12-15 kDa, gli anticorpi a dominio singolo sono molto più piccoli degli anticorpi comuni (150-160 kDa) che sono composti da due catene proteiche pesanti e due catene leggere, e anche più piccoli dei frammenti Fab (~ 50 kDa, una catena leggera e mezza catena pesante) e frammenti variabili a catena singola (~ 25 kDa, due domini variabili, uno da una catena leggera e uno da una catena pesante). ⁵¹⁵



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7650250/>

Strutture di Igs e frammenti umani e camelidi. Le Igs umane convenzionali (cioè IgG) sono state troncate per fornire frammenti funzionali (Fab e scFv) che contengono regioni variabili dalle catene leggere e pesanti. Nel caso di scFv, è necessario un linker per facilitare l'abbinamento appropriato di regioni variabili a catena pesante e leggera. Un sottoinsieme di anticorpi dei camelidi è costituito solo dalle catene pesanti. L'espressione della regione variabile isolata dagli anticorpi della sola catena pesante fornisce anticorpi funzionali a dominio singolo (VHH/nanocorpi).

Inoltre, è possibile produrre VHH monomerici o multimerici senza implicare cambiamenti significativi nelle operazioni dell'unità di bioprocesso. Tuttavia, trattandosi di nuove molecole con caratteristiche strutturali

Biotechnol Adv. 2016 Sep-Oct;34(5):621-633. doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.02.011.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26948029/>

Kelley B.
 Industrialization of mAb production technology: the bioprocessing industry at a crossroads.
 MAbs. 2009 Sep-Oct;1(5):443-52. doi: 10.4161/mabs.1.5.9448.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2759494/>

Welch JT, Arden NS.
 Considering "clonality": A regulatory perspective on the importance of the clonal derivation of mammalian cell banks in biopharmaceutical development.
 Biologicals. 2019 Nov;62:16-21. doi: 10.1016/j.biologicals.2019.09.006.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31588011/>

⁵¹⁴ Wu Y, Jiang S, Ying T.
 Single-Domain Antibodies As Therapeutics against Human Viral Diseases.
 Front Immunol. 2017 Dec 13;8:1802. doi: 10.3389/fimmu.2017.01802.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5733491/>

⁵¹⁵ Cheloha RW, Harmand TJ, Wijne C, Schwartz TU, Ploegh HL.
 Exploring cellular biochemistry with nanobodies.
 J Biol Chem. 2020 Nov 6;295(45):15307-15327. doi: 10.1074/jbc.REV120.012960.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7650250/>

complesse e inedite, i test di qualità, sicurezza ed efficacia devono essere molto rigorosi e l'approvazione normativa potrebbe essere più lunga e intensa rispetto a quella di un mAb completo.⁵¹⁶

Le cellule CHO sono state create e considerate "immortali" alla fine degli anni '50⁵¹⁷ e presentano diversi vantaggi rispetto ad altri tipi di cellule per la produzione di mAb:

- (a) la capacità di eseguire complesse modifiche post-traslazionali (PTM), come glicosilazioni "simil-umane", elaborazione delle proteine (ad es, fosforilazione) e ripiegamento,
- (b) una robusta coltura cellulare in terreni chimicamente definiti e privi di siero che facilita lo scaling-up,

*Scaling-up: Incremento della produzione di un nuovo farmaco per far fronte ai fabbisogni degli ultimi stadi della sperimentazione clinica. È un aumento quantitativo che avviene appena prima della vera e propria produzione su scala industriale per il lancio sul mercato.*⁵¹⁸

- (c) un ospite sicuro con un alto tasso di approvazione normativa e
- (d) sistemi di trasfezione/selezione ottimizzati che consentono l'espressione stabile di geni eterologhi.⁵¹⁹

Meccanismo d'azione e sicurezza degli anticorpi monoclonali

Gli anticorpi monoclonali agiscono attraverso diversi meccanismi⁵²⁰.

- Quando la parte Fab di un anticorpo si lega all'antigene, ne blocca l'interazione con un ligando, mentre la segnalazione avviene quando il legame dell'anticorpo con un recettore fornisce un segnale agonista. Queste funzioni possono essere indipendenti dalla parte Fc della molecola (anche se le interazioni della parte Fc con altre molecole possono potenziare questi meccanismi).

Inoltre, l'anticorpo può esercitare azioni attraverso la sua regione Fc: queste includono la citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente, la citotossicità complemento-dipendente e la fagocitosi cellulare anticorpo-dipendente.

- Le regioni del dominio a catena pesante costante (C_H2 e C_H3) dell'Fc sull'immunoglobulina G (IgG) interagiscono con il recettore Fc neonatale (FcR) per influenzare il trasporto delle IgG attraverso le barriere cellulari e regolare i livelli circolanti dell'anticorpo, prolungandone l'emivita⁵²¹. Il reclutamento di questi

⁵¹⁶ Steeland S, Vandenbroucke RE, Libert C. Nanobodies as therapeutics: big opportunities for small antibodies. Drug Discov Today. 2016 Jul;21(7):1076-113. doi: 10.1016/j.drudis.2016.04.003. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27080147/>

⁵¹⁷ Wurm, Florian M., and Maria João Wurm. 2017. "Cloning of CHO Cells, Productivity and Genetic Stability—A Discussion" Processes 5, no. 2: 20. <https://doi.org/10.3390/pr502020> <https://www.mdpi.com/2227-9717/5/2/20/html>

⁵¹⁸ <https://www.molecularlab.it/principi/dizionario/definizione.asp?w=Scale-up>

Dalla chimica di laboratorio all'impianto industriale. la scienza dello scale-up Ferruccio Trifirò http://www.chim.it/sites/default/files/chimind/pdf/2018_2_4476_on.pdf

⁵¹⁹ Mead EJ, Chiverton LM, Smales CM, von der Haar T. Identification of the limitations on recombinant gene expression in CHO cell lines with varying luciferase production rates. Biotechnol Bioeng. 2009 Apr 15;102(6):1593-602. doi: 10.1002/bit.22201. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19090535/>

⁵²⁰ Lutterotti A, Martin R. Getting specific: monoclonal antibodies in multiple sclerosis. Lancet Neurol. 2008 Jun;7(6):538-47. doi: 10.1016/S1474-4422(08)70110-8. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18485317/>

⁵²¹ Yeung YA, Leabman MK, Marvin JS, Qiu J, Adams CW, Lien S, Starovasnik MA, Lowman HB. Engineering human IgG1 affinity to human neonatal Fc receptor: impact of affinity improvement on pharmacokinetics in primates. J Immunol. 2009 Jun 15;182(12):7663-71. doi: 10.4049/jimmunol.0804182. <https://www.jimmunol.org/content/182/12/7663.long>

effettori dipende dall'isotipo dell'anticorpo e dalla sua capacità di reclutare cellule del complemento o effettrici.

- L'IgG1 è la sottoclasse di Ig più comunemente utilizzata per innescare la morte cellulare e nei casi in cui la citotossicità non è desiderata, si usa più comunemente l'IgG4, la cui regione Fc è poco in grado di indurre citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente o citotossicità complemento-dipendente.
- È anche possibile modificare la regione Fc (ad esempio, rimuovendo i carboidrati) per ridurre ulteriormente il reclutamento del complemento o delle cellule effettrici. Omalizumab (Xolair; Genentech, Novartis) è un mAb umanizzato IgE-specifico per l'asma allergico grave, sviluppato per colpire le IgE libere e le IgE legate alla membrana, ma non per colpire le IgE legate ai FcR delle IgE sui mastociti e quindi per non innescare la degranolazione dei mastociti.⁵²²
- Nello sviluppo di mAb terapeutici, la scelta della sottoclasse IgG è importante, soprattutto in oncologia. In questo caso, le IgG1 hanno il massimo potenziale di citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente e sono quindi ideali per eliminare le cellule tumorali. Al contrario, le IgG3 sono raramente utilizzate per i mAb terapeutici, poiché la lunga regione della cerniera è soggetta a proteolisi e causa una minore emivita⁵²³.
- La glicosilazione della porzione Fc dei mAb IgG è essenziale per attivare alcune funzioni effettrici e l'ingegneria cellulare può essere utilizzata per generare glicoforme selezionate di anticorpi⁵²⁴.
- È interessante notare che le IgG4 possono avere il potenziale di attivare reazioni infiammatorie attraverso gli FcR⁵²⁵ e che le IgG4 possono presentare una dissociazione dinamica e uno scambio del braccio Fab⁵²⁶.

<https://www.nature.com/articles/nrd3003>

a) Struttura schematica di un anticorpo monoclonale di immunoglobuline G (IgG) (mAb). C'è stato un progressivo sviluppo da mAb murini, a mAb chimerici (con regioni murine variabili (V) innestate su regioni umane costanti (C)), a umanizzati (che consistono in uno scaffold Ig umano con solo le regioni determinanti la complementarità (CDR) essendo di origine murina), ai mAbs completamente umani di recente generazione. I CDR all'interno della regione Fab di un mAb si legano a bersagli specifici e causano antagonismo o segnalazione. La regione Fc di un mAb è composta dai domini cerniera e catena pesante costante (C_H2 e C_H3) e ha altre funzioni, come la fissazione del complemento o il legame ai recettori Fc. La nomenclatura degli mAb riflette il tipo di mAb; per esempio, 'xi' in rituximab indica che si tratta di un mAb chimerico. **b)** Le funzioni dei mAbs, che includono l'antagonismo e la segnalazione, sono controllate da specifiche CDR all'interno della regione Fab. Alcuni mAb possono legarsi in modo specifico a un ligando, ad esempio infliximab e omalizumab, o a un recettore, ad esempio natalizumab e daclizumab, e quindi prevenire la stimolazione. Al contrario, altri mAb possono indurre specificamente la trasduzione del segnale legandosi a un recettore. TGN1412 è un superagonista CD28 (CD28SA), il che significa che il legame al recettore dei linfociti T non è richiesta per l'attivazione dei linfociti T. Le funzioni dei mAbs controllati dalla regione Fc includono citotossicità complemento-dipendente (CDC), citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente (ADCC) e fagocitosi cellulare anticorpo-dipendente (non mostrata). Alcuni mAb possono lisare le cellule (ad esempio, cellule T o cellule B) attraverso l'attivazione del complemento, mentre altri mAb possono legarsi ai recettori Fc e mediare la lisi cellulare. Il legame neonatale del recettore Fc controlla il trasporto di IgG attraverso le barriere cellulari e influenza l'emivita di un mAb. CL, regione di luce costante; VH, regione pesante variabile; VL, regione leggera variabile

⁵²² Chang TW.

Developing antibodies for targeting immunoglobulin and membrane-bound immunoglobulin E. *Allergy Asthma Proc.* 2006 Mar-Apr;27(2 Suppl 1):S7-14. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16722326/>

⁵²³ Hassan MS, Abedi-Valuggerdi M, Lefranc G, Hammarström L, Smith CI.

Biological half-life of normal and truncated human IgG3 in scid mice. *Eur J Immunol.* 1991 May;21(5):1319-22. doi: 10.1002/eji.1830210534. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2037016/>

⁵²⁴ Jefferis R.

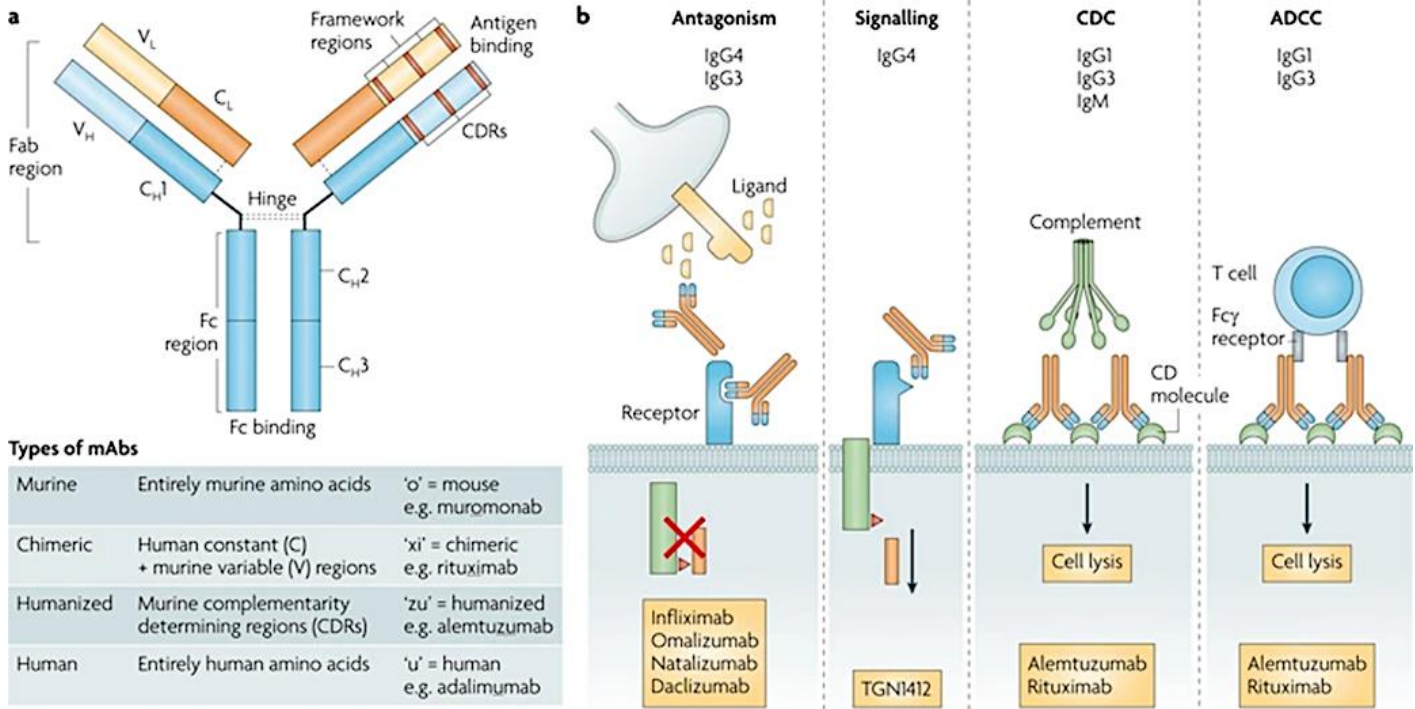
Recombinant antibody therapeutics: the impact of glycosylation on mechanisms of action. *Trends Pharmacol Sci.* 2009 Jul;30(7):356-62. doi: 10.1016/j.tips.2009.04.007. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19552968/>

⁵²⁵ Holland M, Hewins P, Goodall M, Adu D, Jefferis R, Savage CO.

Anti-neutrophil cytoplasm antibody IgG subclasses in Wegener's granulomatosis: a possible pathogenic role for the IgG4 subclass. *Clin Exp Immunol.* 2004 Oct;138(1):183-92. doi: 10.1111/j.1365-2249.2004.02566.x. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1809192/>

⁵²⁶ van der Neut Kofschoten M, et al

Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange. *Science.* 2007 Sep 14;317(5844):1554-7. doi: 10.1126/science.1144603. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17872445/>



Di seguito si discuteranno gli effetti avversi riscontrati con la terapia con mAb autorizzati (Tabella seguente), nonché esempi di effetti collaterali riscontrati durante gli studi clinici esplorativi con gli mAb.⁵²⁷ Particolarmente preoccupante è il fatto che alcuni dei gravi effetti avversi dei biologici riscontrati di recente non erano stati previsti dagli strumenti di screening preclinico attualmente disponibili⁵²⁸ e dai modelli animali⁵²⁹.

⁵²⁷ Tabrizi MA, Roskos LK. Preclinical and clinical safety of monoclonal antibodies. *Drug Discov Today*. 2007 Jul;12(13-14):540-7. doi: 10.1016/j.drudis.2007.05.010. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17631248/>

Descotes J. Immunotoxicity of monoclonal antibodies. *MAbs*. 2009 Mar-Apr;1(2):104-11. doi: 10.4161/mabs.1.2.7909. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2725414/>

Brennan FR, Kiessling A. Translational immunotoxicology of immunomodulatory monoclonal antibodies. *Drug Discov Today Technol*. 2016 Sep-Dec;21-22:85-93. doi: 10.1016/j.dtec.2016.08.002. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27978992/>

Brennan FR, Morton LD, Spindeldreher S, et al. Safety and immunotoxicity assessment of immunomodulatory monoclonal antibodies. *MAbs*. 2010;2(3):233-255. doi:10.4161/mabs.2.3.11782 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2881251/pdf/mabs0203_0233.pdf

⁵²⁸ Cavagnaro, J. A. (ed.) *Preclinical Safety Evaluation of Biopharmaceuticals: A Science Based Approach to Facilitating Clinical Trials* (Wiley, London, 2008).

Longstaff C, Whitton CM, Stebbings R, Gray E. How do we assure the quality of biological medicines? *Drug Discov Today*. 2009 Jan;14(1-2):50-5. doi: 10.1016/j.drudis.2008.09.010. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18951998/>

⁵²⁹ Loisel S, Ohresser M, Pallardy M, Daydé D, Berthou C, Cartron G, Watier H. Relevance, advantages and limitations of animal models used in the development of monoclonal antibodies for cancer treatment. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2007 Apr;62(1):34-42. doi: 10.1016/j.critrevonc.2006.11.010. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17197192/>

Chapman K, Pullen N, Graham M, Ragan I. Preclinical safety testing of monoclonal antibodies: the significance of species relevance.

Target	mAb	Type	FDA approval	Indications*	Selected side effects
Platelet glycoprotein IIb/IIIa	Abciximab (ReoPro; Centocor Ortho Biotech, Eli Lilly)	Chimeric antibody fragment: c7E3 Fab	1994	<ul style="list-style-type: none"> Prevention of ischaemic cardiac complications of percutaneous coronary interventions and unstable angina 	<ul style="list-style-type: none"> Hypersensitivity and immunogenicity Increased risk of bleeding Thrombocytopenia
Tumour necrosis factor- α	Adalimumab (Humira; Abbott)	Fully human	2002	<ul style="list-style-type: none"> Rheumatoid arthritis Ankylosing spondylitis Psoriasis Psoriatic arthritis Crohn's disease Ulcerative colitis 	<ul style="list-style-type: none"> Infusion reactions and immunogenicity Hypersensitivity reactions Immunosuppression and infections (tuberculosis) Anaemia, leukopenia and thrombocytopenia Worsening heart failure Malignancy, lymphoma and lymphoproliferative disorders Elevated liver transaminases Increased nuclear-specific antibodies
	Certolizumab (Cimzia; UCB)	Humanized pegylated	2008		
	Infliximab (Remicade; Centocor Ortho Biotech)	Chimeric	1998		
CD52 on mature B, T and natural killer cells	Alemtuzumab (Campath; Genzyme)	Humanized	2001	<ul style="list-style-type: none"> B cell chronic lymphocytic leukaemia Graft-versus-host disease Multiple myeloma Multiple sclerosis Vasculitis Behçet's disease 	<ul style="list-style-type: none"> Infusion reactions Hypersensitivity and immunogenicity CRS Tumour lysis syndrome Immunosuppression and opportunistic infections Cytopaenias: pancytopenia, lymphopenia and thrombocytopenia Autoimmune haemolytic anaemia Thyroid disorders Cardiotoxicity
Interleukin-2 receptor- α on activated lymphocytes	Basiliximab (Simulect; Novartis)	Chimeric	1998	<ul style="list-style-type: none"> Prophylaxis of renal transplant allograft rejection 	<ul style="list-style-type: none"> Severe acute hypersensitivity reactions CRS and immunogenicity Immunosuppression and infections Local skin reactions Warnings when combined with other immunosuppressives
	Daclizumab (Zenapax; Roche)	Humanized	1997 Discontinued in Europe		
Vascular endothelial growth factor	Bevacizumab (Avastin; Genentech)	Humanized	2004	<ul style="list-style-type: none"> Metastatic colorectal cancer Non-small-cell lung carcinoma Metastatic breast carcinoma Metastatic renal carcinoma 	<ul style="list-style-type: none"> Infusion reactions and immunogenicity Local complications at tumour site Arterial and venous thromboembolic events Haemorrhage Severe hypertension Cardiac failure Reversible posterior leukoencephalopathy syndrome Slower wound healing and GI perforation
	Ranibizumab (Lucentis; Genentech, Novartis)	Humanized (Fab fragment from bevacizumab)	2006	<ul style="list-style-type: none"> Injected intravitreally for neovascular (wet) age-related macular degeneration 	
Complement C5	Eculizumab (Soliris; Alexion)	Humanized	2007	<ul style="list-style-type: none"> Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria 	<ul style="list-style-type: none"> Meningococcal and <i>Neisseria</i> infection Intravascular haemolysis
CD11a	Efalizumab (Raptiva; Genentech)	Humanized	2003 Recently discontinued	<ul style="list-style-type: none"> No longer licensed for chronic plaque psoriasis 	<ul style="list-style-type: none"> First-dose reaction complex Immunosuppression Serious opportunistic infections PML Guillain-Barré syndrome, encephalitis, meningitis Immune haemolytic anaemia Immune thrombocytopenia
CD3 antigen on T cells	Muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3; Ortho Biotech)	Mouse	1986 (no European Medicines Authority authorization)	<ul style="list-style-type: none"> Acute resistant allograft rejection in renal, cardiac and hepatic transplant patients 	<ul style="list-style-type: none"> Severe acute infusion reactions Immunosuppression and infections Immunogenicity Cardiovascular side effects Hepatitis

<https://www.nature.com/articles/nrd3003>

Nat Rev Drug Discov. 2007 Feb;6(2):120-6. doi: 10.1038/nrd2242.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17268483/>

Reazioni immunitarie

I mAb, sono generalmente tollerati nell'uomo, tuttavia contengono elementi che possono essere riconosciuti dal ricevente come estranei e possono quindi causare l'attivazione di reazioni immunitarie e innate ⁵³⁰.

Le reazioni acute in seguito all'infusione di mAb possono essere causate da vari meccanismi, tra cui reazioni anafilattiche acute (IgE-mediate) e anafilattoidi contro il mAb, [malattia da siero](#), [sindrome da lisi tumorale](#) (TLS) e sindrome da rilascio di citochine (CRS).

Le manifestazioni cliniche possono variare da reazioni cutanee locali nel sito di iniezione, piressia e sindrome simil-influenzale, fino all'anafilassi acuta e alla sindrome da risposta infiammatoria sistemica, che possono essere fatali.

Le reazioni all'infusione si verificano comunemente dopo la somministrazione iniziale ⁵³¹ e possono combinare TLS, CRS e sindrome da risposta infiammatoria sistemica, come esemplificato da rituximab (Rituxan/MabThera; Genentech, Biogen Idec), un mAb chimerico specifico per CD20. ⁵³²

Infezioni

Le malattie infettive sono un effetto collaterale ben descritto di alcuni mAb e sono il riflesso di un'immunodeficienza acquisita, generalmente dovuta alla rimozione del ligando bersaglio di quel mAb.

In effetti, particolari tipi di infezioni illustrano la funzione protettiva del ligando bersaglio nel sistema immunitario normale e forniscono indicazioni sulla funzione di questa molecola per combattere particolari agenti patogeni.

Riattivazione della tubercolosi. La terapia diretta contro la citochina pro-infiammatoria TNF α ha contribuito notevolmente alla gestione dell'artrite reumatoide grave e di altre artriti ⁵³³.

⁵³⁰ Presta LG.

Engineering of therapeutic antibodies to minimize immunogenicity and optimize function. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006 Aug 7;58(5-6):640-56. doi: 10.1016/j.addr.2006.01.026. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16904789/>

⁵³¹ Chung CH.

Managing premedications and the risk for reactions to infusional monoclonal antibody therapy. *Oncologist.* 2008 Jun;13(6):725-32. doi: 10.1634/theoncologist.2008-0012. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2008-0012>

Klastersky J.

Adverse effects of the humanized antibodies used as cancer therapeutics. *Curr Opin Oncol.* 2006 Jul;18(4):316-20. doi: 10.1097/01.cco.0000228734.32261.62. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16721123/>

Kang SP, Saif MW.

Infusion-related and hypersensitivity reactions of monoclonal antibodies used to treat colorectal cancer--identification, prevention, and management. *J Support Oncol.* 2007 Oct;5(9):451-7. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18019853/>

Lenz HJ.

Management and preparedness for infusion and hypersensitivity reactions. *Oncologist.* 2007 May;12(5):601-9. doi: 10.1634/theoncologist.12-5-601. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.12-5-601>

⁵³² Coiffier B, et al

CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med.* 2002 Jan 24;346(4):235-42. doi: 10.1056/NEJMoa011795. PMID: 11807147. https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa011795?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20www.ncbi.nlm.nih.gov

⁵³³ Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PP.

Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther.* 2008 Feb;117(2):244-79. doi: 10.1016/j.pharmthera.2007.10.001 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18155297/>

Taylor PC, Feldmann M.

Anti-TNF biologic agents: still the therapy of choice for rheumatoid arthritis.

Tuttavia, la tendenza alla riattivazione della tubercolosi latente (presumibilmente a causa del ruolo chiave del TNF α nell'immunità al *Mycobacterium tuberculosis*) è un effetto collaterale grave e limitante⁵³⁴. In una meta-analisi, la terapia con mAb specifici per il TNF è stata associata a un aumento del rischio di infezioni gravi e tumori maligni.⁵³⁵

Leucoencefalopatia multifocale progressiva. La leucoencefalopatia multifocale progressiva (PML) è una malattia demielinizante rapidamente progressiva, spesso fatale, generalmente dovuta alla riattivazione di un'infezione latente nel sistema nervoso centrale con il virus del polioma John Cunningham (JCV). La maggior parte delle persone sane è sieropositiva per il JCV e la riattivazione del JCV può verificarsi dopo l'immunosoppressione⁵³⁶. La riattivazione è stata segnalata anche dopo l'uso di natalizumab per contrastare il traffico e l'adesione delle cellule T nella sclerosi multipla⁵³⁷.

Nat Rev Rheumatol. 2009 Oct;5(10):578-82. doi: 10.1038/nrrheum.2009.181.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19798034/>

Feldmann M, Maini SR.
 Role of cytokines in rheumatoid arthritis: an education in pathophysiology and therapeutics.
 Immunol Rev. 2008 Jun;223:7-19. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00626.x..
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18613827/>

Moss ML, Sklair-Tavron L, Nudelman R.
 Drug insight: tumor necrosis factor-converting enzyme as a pharmaceutical target for rheumatoid arthritis.
 Nat Clin Pract Rheumatol. 2008 Jun;4(6):300-9. doi: 10.1038/ncprheum0797.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18414459/>

⁵³⁴ Keane J.
 TNF-blocking agents and tuberculosis: new drugs illuminate an old topic.
 Rheumatology (Oxford). 2005 Jun;44(6):714-20. doi: 10.1093/rheumatology/keh567..
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15741198/>

Askling J, et al
 Risk and case characteristics of tuberculosis in rheumatoid arthritis associated with tumor necrosis factor antagonists in Sweden.
 Arthritis Rheum. 2005 Jul;52(7):1986-92. doi: 10.1002/art.21137.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/art.21137>

⁵³⁵ Bongartz T, Sutton AJ, Sweeting MJ, Buchan I, Matteson EL, Montori V.
 Anti-TNF antibody therapy in rheumatoid arthritis and the risk of serious infections and malignancies: systematic review and meta-analysis of rare harmful effects in randomized controlled trials.
 JAMA. 2006 May 17;295(19):2275-85. doi: 10.1001/jama.295.19.2275. Erratum in: JAMA. 2006 Jun 7;295(21):2482.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16705109/>

⁵³⁶ Major EO.
 Progressive multifocal leucoencephalopathy in patients on immunomodulatory therapies.
 Annu Rev Med. 2010;61:35-47. doi: 10.1146/annurev.med.080708.082655.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19719397/>

Carson KR, Focosi D, Major EO, Petrini M, Richey EA, West DP, Bennett CL.
 Monoclonal antibody-associated progressive multifocal leucoencephalopathy in patients treated with rituximab, natalizumab, and efalizumab: a Review from the Research on Adverse Drug Events and Reports (RADAR) Project.
 Lancet Oncol. 2009 Aug;10(8):816-24. doi: 10.1016/S1470-2045(09)70161-5.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19647202/>

⁵³⁷ Lutterotti A, Martin R.
 Getting specific: monoclonal antibodies in multiple sclerosis.
 Lancet Neurol. 2008 Jun;7(6):538-47. doi: 10.1016/S1474-4422(08)70110-8
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18485317/>

Ransohoff RM.
 Natalizumab for multiple sclerosis.
 N Engl J Med. 2007 Jun 21;356(25):2622-9. doi: 10.1056/NEJMct071462.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17582072/>

Lopez-Diego RS, Weiner HL.
 Novel therapeutic strategies for multiple sclerosis--a multifaceted adversary.
 Nat Rev Drug Discov. 2008 Nov;7(11):909-25. doi: 10.1038/nrd2358.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18974749/>

La PML che si verifica in pazienti con sclerosi multipla è notevole in quanto sono entrambe malattie demielinizzanti, ma con origini e caratteristiche patologiche molto diverse.⁵³⁸

Disturbi piastrinici e trombotici

La trombocitopenia immunitaria indotta da farmaci può essere causata da molti farmaci, compresi i mAb⁵³⁹. Una trombocitopenia acuta, grave e autolimitante può essere causata da infliximab (specifico per il TNF α), efalizumab (specifico per il CD11a) e rituximab (specifico per il CD20); tuttavia i meccanismi d'azione rimangono oscuri.

Malattie autoimmuni

I mAb hanno la capacità, attraverso le loro azioni immunomodulatorie, compresa l'immunosoppressione, di provocare diverse condizioni autoimmuni⁵⁴⁰, alcune delle quali sono descritte di seguito.

Sindromi simili al lupus e lupus correlato ai farmaci. L'uso di mAb specifici per il TNF per le malattie reumatiche è stato associato allo sviluppo di anticorpi antinucleo e anticorpi contro il DNA a doppio filamento, nonché a sindromi simili al lupus⁵⁴¹.

Sebbene lo sviluppo di autoanticorpi sia comune, lo sviluppo di manifestazioni muscolo-scheletriche e di sindromi simili al lupus è raro e spesso si attenua con l'interruzione della terapia⁵⁴². Altre complicanze autoimmuni comprendono vasculiti cutanee o sistemiche, nefriti e sindromi demielinizzanti.

Malattie della tiroide. L'alemtuzumab è un potente mAb immunosoppressivo utilizzato nella sclerosi multipla, ma può anche causare un'autoimmunità tiroidea anticorpo-mediata⁵⁴³, probabilmente mediata dalla linfopenia conseguente al trattamento.

In uno studio iniziale su 27 pazienti con sclerosi multipla, 9 pazienti hanno sviluppato autoanticorpi contro il recettore della tireotropina e un ipertiroidismo autoimmune che ha risposto al carbimazolo⁵⁴⁴.

Sadiq SA, Puccio LM, Brydon EW.
JCV detection in multiple sclerosis patients treated with natalizumab.
J Neurol. 2010 Jun;257(6):954-8. doi: 10.1007/s00415-009-5444-4.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20052484/>

⁵³⁸ Major EO.
Reemergence of PML in natalizumab-treated patients--new cases, same concerns.
N Engl J Med. 2009 Sep 10;361(11):1041-3. doi: 10.1056/NEJMp0906248.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19741226/>

⁵³⁹ Aster RH, Bougie DW.
Drug-induced immune thrombocytopenia.
N Engl J Med. 2007 Aug 9;357(6):580-7. doi: 10.1056/NEJMra066469.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17687133/>

⁵⁴⁰ Mongey AB, Hess EV.
Drug insight: autoimmune effects of medications-what's new?
Nat Clin Pract Rheumatol. 2008 Mar;4(3):136-44. doi: 10.1038/ncprheum0708.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18200008/>

⁵⁴¹ Ramos-Casals M, Brito-Zerón P, Muñoz S, Soria N, Galiana D, Bertolaccini L, Cuadrado MJ, Khamashta MA.
Autoimmune diseases induced by TNF-targeted therapies: analysis of 233 cases.
Medicine (Baltimore). 2007 Jul;86(4):242-251. doi: 10.1097/MD.0b013e3181441a68.
https://journals.lww.com/md-journal/Fulltext/2007/07000/Autoimmune_Diseases_Induced_by_TNF_Targeted.7.aspx

⁵⁴² Haraoui B, Keystone E.
Musculoskeletal manifestations and autoimmune diseases related to new biologic agents.
Curr Opin Rheumatol. 2006 Jan;18(1):96-100. doi: 10.1097/01.bor.0000198007.73320.6e.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16344625/>

⁵⁴³ CAMMS223 Trial Investigators, Coles AJ, Compston DA, Selmaj KW, Lake SL, Moran S, Margolin DH, Norris K, Tandon PK.
Alemtuzumab vs. interferon beta-1a in early multiple sclerosis.
N Engl J Med. 2008 Oct 23;359(17):1786-801. doi: 10.1056/NEJMoa0802670.
https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa0802670?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub_0www.ncbi.nlm.nih.gov

⁵⁴⁴ Coles AJ, Wing M, Smith S, Coraddu F, Greer S, Taylor C, Weetman A, Hale G, Chatterjee VK, Waldmann H, Compston A.

Questa malattia tiroidea associata ad autoanticorpi si è verificata anche in circa il 25% dei soggetti in uno studio più recente su 334 pazienti⁵³⁴, suggerendo una predisposizione a questo effetto avverso nei pazienti con sclerosi multipla⁵⁴⁵.

Un precedente trattamento con interferone- β in molti di questi soggetti potrebbe aver contribuito alle risposte autoimmuni.

Colite autoimmune. L'antigene 4 dei linfociti T citotossici (CTLA4) è un regolatore chiave delle risposte immunitarie adattative e i mAb CTLA4-specifici (ipilimumab e tremelimumab) agiscono come agenti immunomodulatori⁵⁴⁶.

È stato riscontrato che l'ipilimumab provoca la soppressione delle cellule T e delle cellule tumorali, ma anche un'enterocolite autoimmune che talvolta richiede la colectomia⁵⁴⁷.

Oltre alla colite, l'inibizione di CTLA4 causa una serie di altri eventi avversi immuno-correlati, come rash ed epatite. Questi eventi avversi immuno-correlati possono essere parte dell'azione del mAb nel causare la regressione del tumore e l'immunosoppressione nei pazienti con melanoma metastatico e tumore a cellule renali⁵⁴⁸.

Il cancro

Invece di un'eccessiva rimozione acuta di cellule maligne, alcuni mAb possono contribuire alla progressione del tumore in modo simile ad altri agenti immunosoppressivi.

L'associazione della terapia con mAb specifici per il TNF (influximab) con un aumento del rischio di malignità rimane controversa⁵⁴⁹.

Pulsed monoclonal antibody treatment and autoimmune thyroid disease in multiple sclerosis.

Lancet. 1999 Nov 13;354(9191):1691-5. doi: 10.1016/S0140-6736(99)02429-0.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10568572/>

⁵⁴⁵Hauser SL.

Multiple lessons for multiple sclerosis.

N Engl J Med. 2008 Oct 23;359(17):1838-41. doi: 10.1056/NEJMe0806738.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18946071/>

⁵⁴⁶Fong L, Small EJ.

Anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 antibody: the first in an emerging class of immunomodulatory antibodies for cancer treatment.

J Clin Oncol. 2008 Nov 10;26(32):5275-83. doi: 10.1200/JCO.2008.17.8954.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18838703/>

⁵⁴⁷Peggs KS, Quezada SA, Korman AJ, Allison JP.

Principles and use of anti-CTLA4 antibody in human cancer immunotherapy.

Curr Opin Immunol. 2006 Apr;18(2):206-13. doi: 10.1016/j.coi.2006.01.011.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16464564/>

Weber J.

Review: anti-CTLA-4 antibody ipilimumab: case studies of clinical response and immune-related adverse events.

Oncologist. 2007 Jul;12(7):864-72. doi: 10.1634/theoncologist.12-7-864.

<https://doi.org/10.1634/theoncologist.12-7-864>

⁵⁴⁸Kaufman HL, Wolchok JD.

Is tumor immunity the same thing as autoimmunity? Implications for cancer immunotherapy.

J Clin Oncol. 2006 May 20;24(15):2230-2. doi: 10.1200/JCO.2006.05.6952.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16710020/>

⁵⁴⁹Askling J, Bongartz T.

Malignancy and biologic therapy in rheumatoid arthritis.

Curr Opin Rheumatol. 2008 May;20(3):334-9. doi: 10.1097/BOR.0b013e3282f7c706.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18388527/>

Scott DL, Kingsley GH.

Tumor necrosis factor inhibitors for rheumatoid arthritis.

N Engl J Med. 2006 Aug 17;355(7):704-12. doi: 10.1056/NEJMct055183.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16914706/>

Dixon W, Silman A.

Is there an association between anti-TNF monoclonal antibody therapy in rheumatoid arthritis and risk of malignancy and serious infection?

Commentary on the meta-analysis by Bongartz et al.

Un mAb specifico per l'interleuchina-12/23 (IL-12/23) si è dimostrato efficace nella psoriasi a placche da moderata a grave⁵⁵⁰ e nella malattia di Crohn⁵⁵¹, e sono stati dimostrati effetti benefici nella sclerosi multipla⁵⁵². Tuttavia, esistono preoccupazioni sulla potenziale tumorigenicità, poiché l'IL-12 ha un ruolo nell'immunità tumorale promuovendo l'infiltrazione di cellule T citotossiche⁵⁵³.

La questione è complicata dall'IL-23, che si sospetta possa indurre processi pro-infiammatori favorevoli al tumore⁵⁵⁴. Anche la radioimmunoterapia con tositumomab (Bexxar; GlaxoSmithKline) e ibritumomab (Zevalin; Biogen Idec) marcati ha sollevato preoccupazioni per quanto riguarda le neoplasie⁵⁵⁵.

Dermatite

Un esempio ben noto di eventi avversi legati al bersaglio piuttosto che ai mAb riguarda il recettore 1 del fattore di crescita epidermico umano (EGFR; noto anche come HER1, ERBB1).

L'EGFR è un bersaglio promettente per molti tumori solidi. I mAb specifici per l'EGFR, cetuximab (un mAb chimerico) e panitumumab (Vectibix; Amgen, un mAb completamente umanizzato), sono terapie efficaci per il cancro coloretale metastatico refrattario⁵⁵⁶.

Questi mAb (insieme agli inibitori dell'EGFR a piccole molecole) causano comunemente un rash cutaneo sul viso e sulla parte superiore del tronco, anche se la dermatite può presentarsi come pelle secca, prurito ed eritema.⁵⁵⁷ L'eruzione cutanea è generalmente da lieve a moderata e si manifesta nei primi quindici giorni di terapia.

Arthritis Res Ther. 2006;8(5):111. doi: 10.1186/ar2026.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1779433/>

⁵⁵⁰ Krueger GG, Langley RG, Leonardi C, Yeilding N, Guzzo C, Wang Y, Dooley LT, Lebwohl M; CNTO 1275 Psoriasis Study Group. A human interleukin-12/23 monoclonal antibody for the treatment of psoriasis. *N Engl J Med*. 2007 Feb 8;356(6):580-92. doi: 10.1056/NEJMoa062382.
https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa062382?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub 0www.ncbi.nlm.nih.gov

⁵⁵¹ Sandborn WJ. Current directions in IBD therapy: what goals are feasible with biological modifiers? *Gastroenterology*. 2008 Nov;135(5):1442-7. doi: 10.1053/j.gastro.2008.09.053.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18848556/>

⁵⁵² Segal BM, Constantinescu CS, Raychaudhuri A, Kim L, Fidelus-Gort R, Kasper LH; Ustekinumab MS Investigators. Repeated subcutaneous injections of IL12/23 p40 neutralising antibody, ustekinumab, in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase II, double-blind, placebo-controlled, randomised, dose-ranging study. *Lancet Neurol*. 2008 Sep;7(9):796-804. doi: 10.1016/S1474-4422(08)70173-X.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18703004/>

⁵⁵³ Weiss JM, Subleski JJ, Wigginton JM, Wiltrott RH. Immunotherapy of cancer by IL-12-based cytokine combinations. *Expert Opin Biol Ther*. 2007 Nov;7(11):1705-21. doi: 10.1517/14712598.7.11.1705.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2430051/>

⁵⁵⁴ Langowski JL, Zhang X, Wu L, Mattson JD, Chen T, Smith K, Basham B, McClanahan T, Kastelein RA, Oft M. IL-23 promotes tumour incidence and growth. *Nature*. 2006 Jul 27;442(7101):461-5. doi: 10.1038/nature04808
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16688182/>

⁵⁵⁵ Knox SJ, Goris ML, Trisler K, Negrin R, Davis T, Liles TM, Grillo-López A, Chinn P, Varns C, Ning SC, Fowler S, Deb N, Becker M, Marquez C, Levy R. Yttrium-90-labeled anti-CD20 monoclonal antibody therapy of recurrent B-cell lymphoma. *Clin Cancer Res*. 1996 Mar;2(3):457-70.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9816191/>

⁵⁵⁶ Jean GW, Shah SR. Epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies for the treatment of metastatic colorectal cancer. *Pharmacotherapy*. 2008 Jun;28(6):742-54. doi: 10.1592/phco.28.6.742.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18503402/>

⁵⁵⁷ Pérez-Soler R, Saltz L. Cutaneous adverse effects with HER1/EGFR-targeted agents: is there a silver lining? *J Clin Oncol*. 2005 Aug 1;23(22):5235-46. doi: 10.1200/JCO.2005.00.6916.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16051966/>

Sebbene sia spesso descritta come simile all'acne, l'istologia delle lesioni è diversa da quella dell'acne; per esempio, i farmaci topici usati per l'acne tendono a peggiorare l'eruzione cutanea.

Si ritiene che la dermatite faccia parte dell'azione farmacodinamica di questo agente, poiché l'EGFR è una glicoproteina transmembrana ampiamente espressa sulle cellule epiteliali e vi è una correlazione tra la presenza dell'eruzione cutanea e una risposta positiva al farmaco.⁵⁵⁸

Cardiotossicità

Il trastuzumab (Herceptin; Genentech) è un mAb umanizzato diretto contro l'ERBB2 umano (noto anche come HER2/neu) ed è stato utilizzato con successo nelle donne con carcinoma mammario metastatico ERBB2-positivo⁵⁵⁹.

Tuttavia, un evento avverso inatteso nelle donne trattate con trastuzumab negli studi clinici è stata la cardiotossicità⁵⁶⁰. Gli effetti antitumorali e citotossici sono collegati agli effetti di trastuzumab sulla permeabilizzazione della membrana esterna mitocondriale (MOMP) e la disfunzione cardiaca causata dal trattamento si manifesta con una diminuzione asintomatica della frazione di eiezione del ventricolo sinistro che tende a essere reversibile.

Il bersaglio di trastuzumab, ERBB2, è una tirosin-chinasi recettoriale di membrana con un dominio extracellulare di legame al ligando e un dominio intracellulare di chinasi,⁵⁶¹ e la cardiotossicità del farmaco è un effetto on-target dovuto al blocco di tutte le segnalazioni a valle di ERBB2 che provoca MOMP, rilascio di citocromo c e attivazione delle caspasi, con conseguente apoptosi delle cellule muscolari cardiache, compromissione della contrattilità e della funzione ventricolare.⁵⁶²

⁵⁵⁸ Bianchini D, Jayanth A, Chua YJ, Cunningham D.

Epidermal growth factor receptor inhibitor-related skin toxicity: mechanisms, treatment, and its potential role as a predictive marker. *Clin Colorectal Cancer*. 2008 Jan;7(1):33-43. doi: 10.3816/CCC.2008.n.005. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18279575/>

Saif MW, Longo WL, Israel G.

Correlation between rash and a positive drug response associated with bevacizumab in a patient with advanced colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer*. 2008 Mar;7(2):144-8. doi: 10.3816/CCC.2008.n.020. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18501075/>

⁵⁵⁹ Hudis CA.

Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med*. 2007 Jul 5;357(1):39-51. doi: 10.1056/NEJMr043186. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17611206/>

⁵⁶⁰ Force T, Krause DS, Van Etten RA.

Molecular mechanisms of cardiotoxicity of tyrosine kinase inhibition. *Nat Rev Cancer*. 2007 May;7(5):332-44. doi: 10.1038/nrc2106. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17457301/>

Guglin M, Cutro R, Mishkin JD.

Trastuzumab-induced cardiomyopathy. *J Card Fail*. 2008 Jun;14(5):437-44. doi: 10.1016/j.cardfail.2008.02.002. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18514938/>

⁵⁶¹ Force T, Kerkelä R.

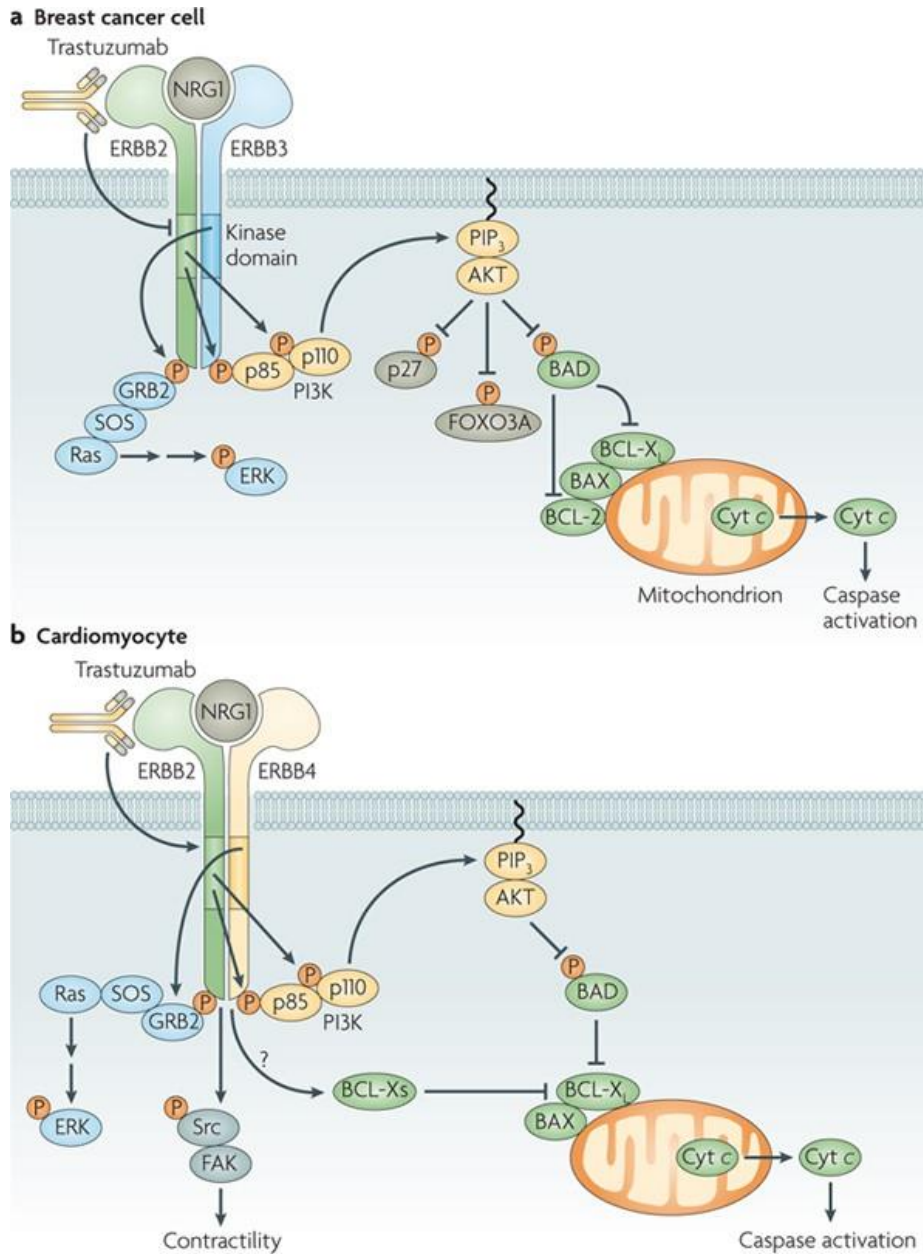
Cardiotoxicity of the new cancer therapeutics--mechanisms of, and approaches to, the problem. *Drug Discov Today*. 2008 Sep;13(17-18):778-84. doi: 10.1016/j.drudis.2008.05.011 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2735339/>

Chen MH, Kerkelä R, Force T.

Mechanisms of cardiac dysfunction associated with tyrosine kinase inhibitor cancer therapeutics. *Circulation*. 2008 Jul 1;118(1):84-95. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.776831. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2735334/>

⁵⁶² Kuramochi Y, Guo X, Sawyer DB.

Neuregulin activates erbB2-dependent src/FAK signaling and cytoskeletal remodeling in isolated adult rat cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2006 Aug;41(2):228-35. doi: 10.1016/j.yjmcc.2006.04.007. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1847613/>



Nature Reviews | Drug Discovery

<https://www.nature.com/articles/nrd3003>

a) La segnalazione oncogenica in una cellula di cancro al seno può essere mediata dai membri della famiglia del recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR). L'amplificazione del gene che codifica per ERBB2 (noto anche come HER2/neu) tirosina chinasi è cruciale per la progressione di alcune forme di cancro al seno umano. La chinasi ERBB2 – ERBB3 attiva quindi la via Ras – chinasi regolata dal segnale extracellulare (ERK) e la via del fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3K) – AKT. AKT ha un ruolo oncogenico centrale, in parte attraverso l'inibizione del linfoma a cellule B 2 (BCL-2) e l'antagonista della morte cellulare (BAD). Trastuzumab (Herceptin; Genentech) si lega al dominio extracellulare di ERBB2 e inibisce la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule di cancro al seno ERBB2-dipendenti. Trastuzumab inverte anche l'inibizione di BAD, che porta all'oligomerizzazione della proteina X associata a BCL-2 (BAX) sulla membrana mitocondriale, al rilascio del citocromo c (Cyt c) e all'attivazione della caspasi per causare l'apoptosi delle cellule tumorali. Oltre a inibire la segnalazione di ERBB2, trastuzumab potrebbe anche esercitare effetti attraverso la citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente (non mostrata). **b)** La segnalazione nei cardiomiociti attraverso gli eterodimeri ERBB2-ERBB4 è essenziale per la proliferazione dei cardiomiociti durante la crescita e lo sviluppo cardiaci e per la funzione contrattile nell'adulto. Sebbene molte delle stesse vie di segnalazione (come Ras-ERK e PI3K-AKT) siano attivate nei cardiomiociti e nelle cellule del cancro al seno, un aumento del rapporto tra BCL-X e BCL-XL indotto da anticorpi specifici per ERBB2 potrebbe innescare l'oligomerizzazione di BAX, depolarizzazione della membrana mitocondriale, deplezione di ATP e disfunzione contrattile. Inoltre, la citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente potrebbe contribuire alla cardiotoxicità del trastuzumab. Trastuzumab blocca anche l'attivazione mediata dalla neuregulina 1 (NRG1) di Src e della chinasi di adesione focale (FAK), e questo sembra peggiorare la disfunzione ventricolare sinistra. GRB2, proteina 2 legata al recettore del fattore di crescita; PIP₃, fosfatidilinositolo trifosfato.

La tempesta di citochine

Diversi mAb innescano il rilascio di una serie di citochine, causando una tempesta di citochine o CRS ⁵⁶³. La CRS è una caratteristica importante nel contesto della terapia con mAb CD3-specifici (muromonab) ⁵⁶⁴, CD52-specifici (alemtuzumab) ⁵⁶⁵ e CD20-specifici (rituximab) ⁵⁶⁶.

Nel 2006, quando il mAb completamente umanizzato TGN1412 - un superagonista del CD28 (CD28SA) - è stato somministrato per la prima volta a sei volontari maschi sani, ha scatenato un'immediata e grave tempesta di citochine ⁵⁶⁷.

Gli eventi clinici, di laboratorio e immunologici che hanno seguito la rapida infusione endovenosa di TGN1412 sono stati drammatici e sono stati suddivisi in quattro fasi ⁵⁶⁸. In *primo* luogo, una risposta infiammatoria sistemica consistente in alti livelli di citochine nel sangue, accompagnata da cefalea, mialgie, nausea, diarrea, eritema, vasodilatazione e ipotensione. In *secondo* luogo, infiltrati polmonari e lesioni polmonari, insufficienza renale e coagulazione intravascolare disseminata. *Terzo*, grave linfopenia e monocitopenia. *Quarto*, shock cardiovascolare prolungato e sindrome da distress respiratorio acuto.

⁵⁶³ Clark IA.

The advent of the cytokine storm.
Immunol Cell Biol. 2007 Jun;85(4):271-3. doi: 10.1038/sj.icb.7100062.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17551531/>

Wing M.

Monoclonal antibody first dose cytokine release syndromes-mechanisms and prediction.
J Immunotoxicol. 2008 Jan;5(1):11-5. doi: 10.1080/15476910801897433.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18382853/>

⁵⁶⁴ Plevy S, Salzberg B, Van Assche G, Regueiro M, Hommes D, Sandborn W, Hanauer S, Targan S, Mayer L, Mahadevan U, Frankel M, Lowder J.

A phase I study of visilizumab, a humanized anti-CD3 monoclonal antibody, in severe steroid-refractory ulcerative colitis.
Gastroenterology. 2007 Nov;133(5):1414-22. doi: 10.1053/j.gastro.2007.08.035.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17920064/>

⁵⁶⁵ Wing MG, Waldmann H, Isaacs J, Compston DA, Hale G.

Ex-vivo whole blood cultures for predicting cytokine-release syndrome: dependence on target antigen and antibody isotype.
Ther Immunol. 1995 Aug;2(4):183-90.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9358610/>

Wing MG, Moreau T, Greenwood J, Smith RM, Hale G, Isaacs J, Waldmann H, Lachmann PJ, Compston A.

Mechanism of first-dose cytokine-release syndrome by CAMPATH 1-H: involvement of CD16 (FcγRIII) and CD11a/CD18 (LFA-1) on NK cells.
J Clin Invest. 1996 Dec 15;98(12):2819-26. doi: 10.1172/JCI119110.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC507749/>

⁵⁶⁶ Winkler U, Jensen M, Manzke O, Schulz H, Diehl V, Engert A.

Cytokine-release syndrome in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia and high lymphocyte counts after treatment with an anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab, IDEC-C2B8).
Blood. 1999 Oct 1;94(7):2217-24.
https://doi.org/10.1182/blood.V94.7.2217.419k02_2217_2224

⁵⁶⁷ Ransohoff RM.

Natalizumab for multiple sclerosis.
N Engl J Med. 2007 Jun 21;356(25):2622-9. doi: 10.1056/NEJMct071462
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17582072/>

Suntharalingam G, Perry MR, Ward S, Brett SJ, Castello-Cortes A, Brunner MD, Panoskaltis N.

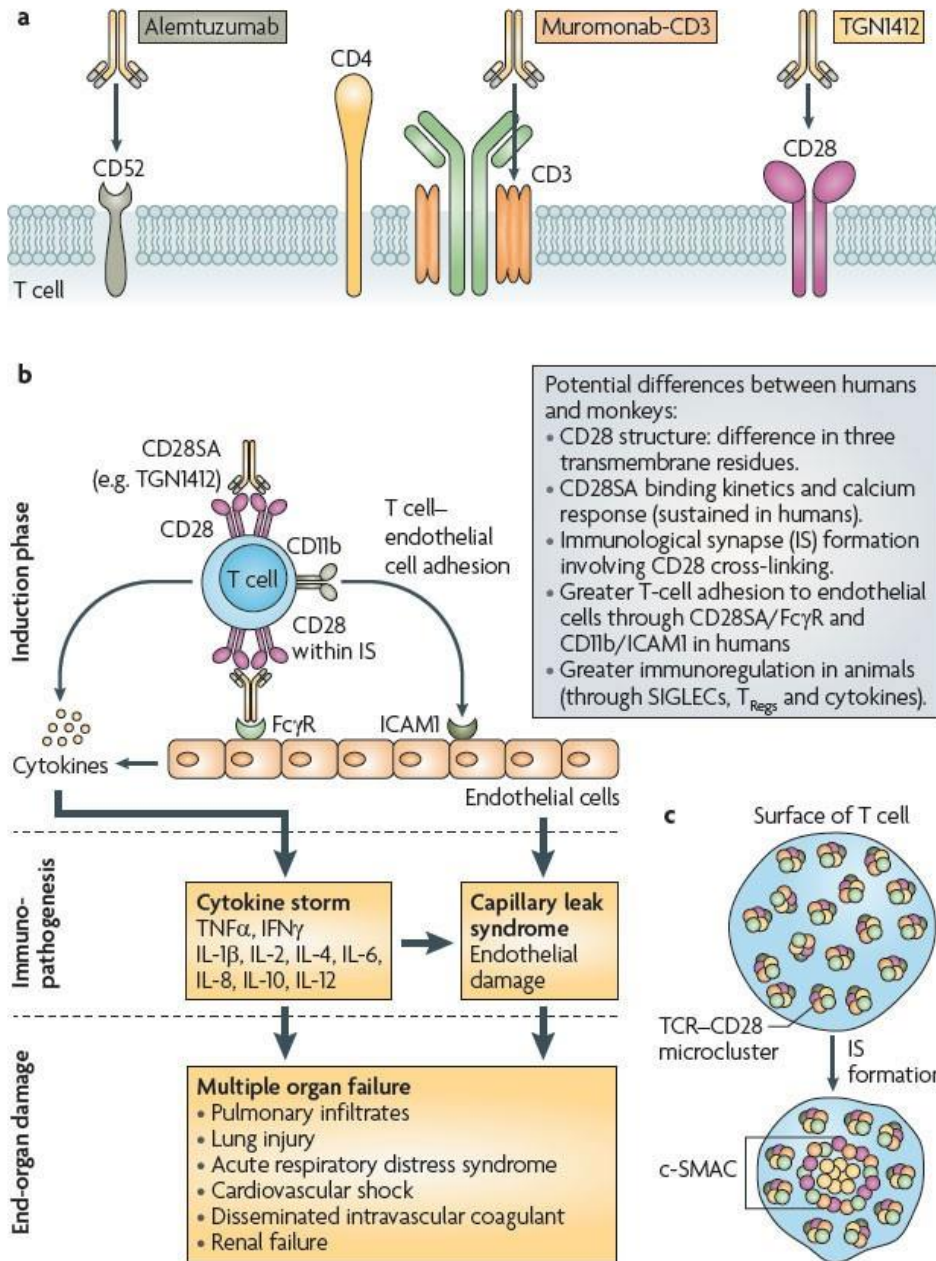
Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412.
N Engl J Med. 2006 Sep 7;355(10):1018-28. doi: 10.1056/NEJMoa063842.
https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa063842?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub_0www.ncbi.nlm.nih.gov

Kenter MJ, Cohen AF.

Establishing risk of human experimentation with drugs: lessons from TGN1412.
Lancet. 2006 Oct 14;368(9544):1387-91. doi: 10.1016/S0140-6736(06)69562-7.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17046471/>

⁵⁶⁸ Suntharalingam G, Perry MR, Ward S, Brett SJ, Castello-Cortes A, Brunner MD, Panoskaltis N.

Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412.
N Engl J Med. 2006 Sep 7;355(10):1018-28. doi: 10.1056/NEJMoa063842.
https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa063842?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub_0www.ncbi.nlm.nih.gov



<https://www.nature.com/articles/nrd3003>

a) I recettori di superficie sui linfociti T possono causare una tempesta di citochine quando attivati da anticorpi monoclonali terapeutici (mAb). Tre mAb che causano il rilascio di citochine per infusione nell'uomo sono alemtuzumab (Campath; Genzyme), muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3) e TGN1412. Alemtuzumab riconosce la molecola CD52 sui linfociti T e conferisce un'efficiente lisi complemento-dipendente dei linfociti. Muromonab prende di mira il CD3, una parte del complesso del recettore dei linfociti T (TCR). TGN1412 è un esempio di superagonista CD28 (CD28SA); cioè, una molecola co-stimolatrice che contribuisce all'attivazione di cellule T naive. **b)** TGN1412 può causare direttamente il rilascio di citochine, poiché il CD28 è espresso su una varietà di cellule nel normale sistema immunitario. TGN1412 è più potente sui linfociti T umani rispetto a quelli delle scimmie. Ciò è probabilmente dovuto al fatto che il CD28 umano ha tre diversi amminoacidi transmembrana, che potrebbero causare una risposta prolungata del calcio all'interno delle cellule T umane. Il cross-linking del CD28 umano può contribuire alla formazione di una sinapsi immunologica attivata (IS) sulla superficie dei linfociti T e il legame del CD28SA ai recettori Fcγ (FcγR) sulle cellule endoteliali e altri leucociti potrebbe causare un ulteriore rilascio di citochine. L'attivazione del CD28 può anche causare la sovraregolazione delle molecole di adesione come il CD11b sulla superficie dei linfociti T o altre cellule del sistema immunitario innato, che possono quindi legarsi alla molecola di adesione intracellulare 1 (ICAM1) sulle cellule endoteliali. I complessi linfociti T-endoteliali hanno la capacità di causare una produzione di citochine amplificata e danni endoteliali locali. Quindi, la tempesta di citochine e l'infiltrazione di neutrofili potrebbero mediare la sindrome da perdita capillare con conseguente insufficienza multiorgano. **c)** L'IS si forma in un processo dinamico sulla membrana plasmatica dei linfociti T, in cui i cinque componenti del microcluster TCR-CD28 si aggregano per formare un cluster centrale di attivazione supramolecolare (c-SMAC). Quest'ultimo è costituito da un nucleo di molecole TCR e CD3, circondato da un anello di molecole CD28 con associata protein chinasi Cθ, che provoca l'attivazione prolungata dei linfociti T.

Regolamenti

Esiste una serie di documenti guida che supportano le sperimentazioni cliniche first-in-human con i mAb⁵⁶⁹. Come risposta immediata al disastro del TGN1412, l'EMA ha pubblicato una linea guida per identificare e ridurre i rischi legati ai nuovi medicinali studiati nelle sperimentazioni cliniche first-in-human⁵⁷⁰. Inoltre, è disponibile una guida normativa dettagliata sulla valutazione della sicurezza preclinica dei farmaci⁵⁷¹ e dei biologici.⁵⁷²

Il microdosaggio è un metodo per studiare l'azione dei farmaci nell'uomo con dosi così basse da non provocare effetti sull'intero organismo, ma da avere risposte cellulari⁵⁷³. Uno studio di microdosaggio viene eseguito nelle prime fasi dello sviluppo di un farmaco, prima dell'inizio degli studi clinici di Fase I, e utilizza una dose pari a una piccola frazione della dose farmacologica prevista. L'EMA ha pubblicato un documento di sintesi sugli studi non clinici di sicurezza a sostegno delle sperimentazioni cliniche con una singola microdose.⁵⁷⁴

La linea guida EMA *"Guideline on development, production, characterisation and specification for monoclonal antibodies and related products"*⁵⁷⁵ descrive i controlli necessari da effettuare sul farmaco prima della commercializzazione. In particolare, per quanto riguarda il controllo delle impurezze e i contaminanti si riporta un estratto: "gli anticorpi monoclonali mostrano comunemente diverse fonti di eterogeneità (ad es. elaborazione della lisina C-terminale, piroglutammato N-terminale, deamidazione, ossidazione, isomerizzazione, frammentazione, mismatch del legame disolfuro, oligosaccaridi N-linked, glicazione), che portano a un profilo di purezza/impurità complesso comprendente diverse entità o varianti molecolari. Anche i multimeri e gli aggregati dovrebbero essere caratterizzati in modo appropriato utilizzando una combinazione di metodi.

La formazione di aggregati, particelle sub-visibili e visibili nel prodotto farmaceutico è importante e dovrebbe essere studiata e monitorata attentamente durante il rilascio dei lotti e durante gli studi di stabilità.

⁵⁶⁹ Muller PY, Brennan FR.

Safety assessment and dose selection for first-in-human clinical trials with immunomodulatory monoclonal antibodies. Clin Pharmacol Ther. 2009 Mar;85(3):247-58. doi: 10.1038/clpt.2008.273. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19177065/>

⁵⁷⁰ European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Guideline on strategies to identify and mitigate risks for first in human clinical trials with investigational medicinal products. Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/28367/07. EMA website https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-strategies-identify-mitigate-risks-first-human-early-clinical-trials-investigational_en.pdf

⁵⁷¹ European Medicines Agency. ICH topic M 3 (R2): non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorisation for pharmaceuticals. Note for guidance on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals (CPMP/ICH/286/95). https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-m3r2-non-clinical-safety-studies-conduct-human-clinical-trials-marketing-authorisation_en.pdf

⁵⁷² European Medicines Agency. ICH topic S 6: preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals. Note for guidance on preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals (CPMP/ICH/302/95). https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-s6r1-preclinical-safety-evaluation-biotechnology-derived-pharmaceuticals-step-5_en.pdf

⁵⁷³ Lappin G, Garner RC.

The utility of microdosing over the past 5 years. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2008 Dec;4(12):1499-506. doi: 10.1517/17425250802531767 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19040326/>

⁵⁷⁴ European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Position paper on non-clinical safety studies to support clinical trials with a single microdose. CPMP/SWP/2599/02 https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/concept-paper-development-chmp-guideline-non-clinical-requirements-support-early-phase-i-clinical_en.pdf

⁵⁷⁵ Guideline on development, production, characterisation and specification for monoclonal antibodies and related products EMA/CHMP/BWP/532517/2008 Committee for medicinal products for human use (CHMP) https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-development-production-characterisation-specification-monoclonal-antibodies-related_en.pdf

Le potenziali impurità legate al processo (ad esempio HCP, DNA della cellula ospite, residui di colture cellulari, residui di lavorazione a valle) dovrebbero essere identificate e valutate qualitativamente e/o quantitativamente, a seconda dei casi.

I contaminanti, che includono tutti i materiali introdotti accidentalmente non destinati a far parte del processo di fabbricazione (ad es. specie microbiche, endotossine) dovrebbero essere rigorosamente evitati e/o adeguatamente controllati. Laddove si sospettino contaminanti pro-infiammatori non endotossici, come il peptidoglicano, dovrebbe essere preso in considerazione l'uso di test aggiuntivi, come il test di attivazione dei monociti.

Considerando che la glicosilazione può avere un impatto sulla farmacocinetica del prodotto e può modulare le sue proprietà immunogeniche,⁵⁷⁶ per questo attributo dovrebbero essere presi in considerazione criteri di accettazione appropriati.

Di conseguenza, i test e i limiti di accettazione per le strutture di glicosilazione rilevanti dovrebbero essere considerati attentamente (ad es. quantità relative di G0, G1 e/o G2 di frammenti Fc, livelli di galattosilazione, fucosilazione e sialilazione) tenendo conto dell'impatto previsto e potenziale di questo attributo sull'attività biologica nel contesto della situazione clinica (es. la presenza di funzioni effettrici funzionali non richieste per il meccanismo d'azione previsto, glicosilazione Fab).

A questi fattori che influenzano la variabilità della risposta clinica, va aggiunto che recettori solubili possono legarsi all'anticorpo monoclonale con conseguente alterazione della farmacocinetica a causa della modifica della clearance o del volume. Il legame ai recettori solubili può aumentare la variabilità tra i soggetti nei parametri farmacocinetici, a causa delle differenze nei livelli dei recettori circolanti tra gli individui.

La capacità di legame alle proteine plasmatiche (albumina, α -glicoproteina acida) dovrebbe essere studiata quando considerata rilevante. Altre proteine leganti specifiche possono influenzare la farmacocinetica di varie proteine, come esemplificato dall'ormone della crescita (GH) legato alle proteine leganti il GH e dal fattore di crescita simile all'insulina (IGF-1) legato nel plasma alle proteine trasportatrici. Le proteine leganti possono anche causare difficoltà nella quantificazione della sostanza medicinale nel sangue o nel plasma.⁵⁷⁷

Previsione della capacità di causare CRS.

La tempesta di citochine è stata osservata dopo la somministrazione endovenosa di mAb, nel caso discusso TGN1412, e le citochine sieriche riscontrate *in vivo* potrebbero essere sintetizzate e rilasciate dai leucociti circolanti.

⁵⁷⁶ Liu L.

Antibody glycosylation and its impact on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins. *J Pharm Sci.* 2015 Jun;104(6):1866-1884. doi: 10.1002/jps.24444. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25872915/>

Bumbaca D, Boswell CA, Fielder PJ, Khawli LA.

Physicochemical and biochemical factors influencing the pharmacokinetics of antibody therapeutics. *AAPS J.* 2012 Sep;14(3):554-8. doi: 10.1208/s12248-012-9369-y. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3385840/>

Zhou Q, Qiu H.

The Mechanistic Impact of N-Glycosylation on Stability, Pharmacokinetics, and Immunogenicity of Therapeutic Proteins. *J Pharm Sci.* 2019 Apr;108(4):1366-1377. doi: 10.1016/j.xphs.2018.11.029. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30471292/>

Ryman JT, Meibohm B.

Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol.* 2017 Sep;6(9):576-588. doi: 10.1002/psp4.12224. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5613179/>

Datta-Mannan A.

Mechanisms Influencing the Pharmacokinetics and Disposition of Monoclonal Antibodies and Peptides. *Drug Metab Dispos.* 2019 Oct;47(10):1100-1110. doi: 10.1124/dmd.119.086488. <https://dmd.aspetjournals.org/content/47/10/1100>

⁵⁷⁷ Guideline on the clinical investigation of the pharmacokinetics of therapeutic proteins

EMA Doc. Ref. CHMP/EWP/89249/2004

https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-clinical-investigation-pharmacokinetics-therapeutic-proteins_en.pdf

Pertanto, sono stati stabiliti test *in vitro* che si basano sull'incubazione di TGN1412 con sangue intero umano o popolazioni cellulari come cellule mononucleate del sangue periferico.⁵⁷⁸ Per identificare e convalidare screening preclinici rilevanti per la CRS sarebbe utile per la comunità scientifica avere accesso a TGN1412 e relativi mAbs CD28-specifici e anticorpi e citochine immunostimolanti.

I test di screening preclinico predittivo dovrebbero soddisfare quattro criteri chiave per la CRS.

In *primo luogo*, dovrebbero essere eseguiti su una gamma di tipi di cellule umane (preferibilmente derivati dalla popolazione target) che rispondono ai potenziali meccanismi per la CRS, quali le cellule del sangue e dei tessuti, ma soprattutto le cellule endoteliali.

In *secondo luogo*, dovrebbero consentire letture convalidate e tecnicamente fattibili.

In *terzo luogo*, per determinare il loro potere predittivo e i loro limiti, dovrebbero prendere in considerazione una gamma di prodotti biologici e controlli: il TGN1412 è un reagente di prova necessario.

Infine, dovrebbero avere capacità predittive non solo per CRS, ma anche per l'attivazione delle cellule immunitarie e tissutali, attivazione del recettore Toll-like, perdita capillare, coagulazione intravascolare disseminata, shock cardiovascolare e sindrome da risposta infiammatoria sistemica.

Oltre a screening tissutali *in vitro* migliorati, altri approcci essenziali da considerare quando si valuta la sicurezza dei prodotti biologici includono il test delle molecole nella circolazione locale (ad esempio il naso o la pelle) nell'uomo e in combinazioni di esseri umani e animali *in vivo* e modelli *in vitro*.

Un approccio che necessita di maggiore considerazione è l'uso di studi di microdosaggio⁵⁷⁹, con un'attenta valutazione farmacocinetica e farmacodinamica in studi preliminari sull'uomo.

A condizione che siano disponibili dati animali precedenti per quanto riguarda la distribuzione del bersaglio e l'efficacia, questo approccio potrebbe includere l'intero corpo così come l'imaging microscopico per consentire la valutazione della distribuzione della molecola⁵⁸⁰ e saggi personalizzati per determinare eventuali effetti biologici o clinici della molecola.

Anticorpi monoclonali nel controllo della tempesta di citochine causata dalla COVID-19

I pazienti affetti da malattia da coronavirus presentano un numero enorme di cellule immunitarie infiammatorie, come i linfociti T e i macrofagi, che sono stimolati e infiltrati nei tessuti respiratori in risposta alle chemochine e alle citochine generate e rilasciate dalle cellule infette.

In caso di infezione COVID-19 lieve, il SARS-CoV-2 viene eliminato da queste cellule, mentre in caso di infezione grave, le principali citochine, come l'interleuchina-6 (IL-6), l'IL-1 β , l'IL-17, l'IFN- γ e il TNF- α , vengono prodotte dalle cellule infiammatorie in una risposta incontrollata che porta alla cosiddetta tempesta di citochine.⁵⁸¹

⁵⁷⁸ Stebbings R, et al

"Cytokine storm" in the phase I trial of monoclonal antibody TGN1412: better understanding the causes to improve preclinical testing of immunotherapeutics.

J Immunol. 2007 Sep 1;179(5):3325-31. doi: 10.4049/jimmunol.179.5.3325.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.5.3325>

Findlay L, Eastwood D, Stebbings R, Sharp G, Mistry Y, Ball C, Hood J, Thorpe R, Poole S.

Improved in vitro methods to predict the in vivo toxicity in man of therapeutic monoclonal antibodies including TGN1412.

J Immunol Methods. 2010 Jan 31;352(1-2):1-12. doi: 10.1016/j.jim.2009.10.013.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19895813/>

⁵⁷⁹ Lappin G, Garner RC.

The utility of microdosing over the past 5 years.

Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2008 Dec;4(12):1499-506. doi: 10.1517/17425250802531767.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19040326/>

⁵⁸⁰ Willmann JK, van Bruggen N, Dinkelborg LM, Gambhir SS.

Molecular imaging in drug development.

Nat Rev Drug Discov. 2008 Jul;7(7):591-607. doi: 10.1038/nrd2290.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18591980/>

Bullen A.

Microscopic imaging techniques for drug discovery.

Nat Rev Drug Discov. 2008 Jan;7(1):54-67. doi: 10.1038/nrd2446.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18079755/>

⁵⁸¹ Tabll AA, Shahein YE, Omran MM, Elnakib MM, Ragheb AA, Amer KE.

Gli anticorpi monoclonali disponibili o gli antagonisti specifici che possono contribuire al controllo della produzione di citochine, durante l'infezione da COVID-19, sono elencati nella Tabella seguente.

Cytokine		Available mAb/antagonist		Adverse effects of using the antibody
Name	Action/results	Name	Action/results	
IL-6	Destroys the alveoli membrane/hemorrhage in lungs then fibrosis	1-Tocilizumab (mAb) 2-Sarilumab (mAb) 3-Clazakizumab (mAb)	Binds then block the action of IL-6. No direct action on the virus/Inhibits the destructive effect of the virus. Blocks IL-1 β	1-Increase in hepatic enzymes 2-Skin allergy 3-Infection by opportunistic fungi Not identified
IL-1 β	Produced by macrophages, induces fever/respiratory fibrosis	Canakinumab (mAb)	Blocks IL-1 β	Not identified
IL-17	Produced by lymphoid cells, activates T-helper 17 cells, activates secretion of proinflammatory mediators and infiltration of neutrophils/lung tissue damage	No available	–	Not identified
IFN- γ	Produced by CD ⁺ , CD ⁺ 8, NK cells/lung tissue damage	Emapalumab (mAb)	Blocks IFN- γ /decrease the acute respiratory distress syndrome caused by the SARS-CoV-2	Not identified
TNF- α	One of the first cytokines produced during viral infection, induces differentiation of dendritic cells	XPro1595 (soluble protein used in Alzheimer's disease)	Inhibits the TNF- α binding to its receptor	Not identified

<https://content.iospress.com/articles/human-antibodies/hab200441>

Di seguito si riporta un estratto di quanto descritto nel sito dell'AIFA sull'[uso degli anticorpi monoclonali per COVID-19](#):

La Commissione europea, su parere dell'Agenzia europea per i medicinali (EMA), ha autorizzato i seguenti medicinali contenenti anticorpi monoclonali, da soli o in associazione, contro la proteina spike del virus SARS-CoV-2:

- o associazione **casirivimab-imdevimab** denominata **Ronapreve** (dell'azienda farmaceutica Regeneron / Roche) per il trattamento e la prevenzione di COVID-19;
- o **regdanvimab** denominato **Regkirona** (dell'azienda farmaceutica Celltrion Healthcare Hungary Kft) per il trattamento di COVID-19;
- o **sotrovimab** denominato **Xevudy** (dell'azienda GSK) per il trattamento di COVID-19;

A review of monoclonal antibodies in COVID-19: Role in immunotherapy, vaccine development and viral detection. Hum Antibodies. 2021;29(3):179-191. doi: 10.3233/HAB-200441. <https://content.iospress.com/articles/human-antibodies/hab200441>

A. Esmailzadeh A, Elahi R. Immunobiology and immunotherapy of COVID-19: A clinically updated overview. J Cell Physiol. 2021 Apr;236(4):2519-2543. doi: 10.1002/jcp.30076. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7675260/>

Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Immunotherapeutic implications of IL-6 blockade for cytokine storm. Immunotherapy. 2016 Jul;8(8):959-70. doi: 10.2217/imt-2016-0020. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27381687/>

- o associazione **tixagevimab-cilgavimab** denominata **Evusheld** (dell'azienda farmaceutica AstraZeneca) per la profilassi pre-esposizione di COVID-19.

L'Italia ha recepito le autorizzazioni europee con le Determine n. 155 e n. 156 del 25 novembre 2021 pubblicate nella Gazzetta Ufficiale n. 282 del 26 novembre 2021, per Ronapreve e Regkirona, rispettivamente, n. 169 del 23 dicembre 2021 (pubblicata nella Gazzetta Ufficiale n. 305 del 24 dicembre 2021) per Xevudy e n. 53 del 13 aprile 2022 (Gazzetta Ufficiale n. 88 del 14 aprile 2022) per Evusheld, classificando i medicinali ai fini del rimborso da parte del Servizio Sanitario Nazionale in "C non negoziata [C(nn)]" con il seguente regime di fornitura: *medicinale soggetto a prescrizione medica limitativa, da rinnovare volta per volta, vendibile al pubblico su prescrizione di centri ospedalieri individuati dalle regioni (RNRL)*. Tali medicinali sono sottoposti a monitoraggio addizionale.

Ciò permette la rapida identificazione di nuove informazioni sulla sicurezza. Agli operatori sanitari è richiesto di segnalare qualsiasi reazione avversa sospetta. Le schede relative a tutti i farmaci sottoposti a monitoraggio sono disponibili all'interno degli elenchi pubblicati nella pagina "[Lista aggiornata dei Registri e dei Piani Terapeutici web based](#)".

Lista degli anticorpi monoclonali anti SARS-Cov-2 e per la terapia del COVID-19 ⁵⁸²

<https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/public-health-threats/coronavirus-disease-covid-19/treatments-vaccines/treatments-covid-19/covid-19-treatments-authorise>

Tixagevimab e cilgavimab neutralizzano la spike del SARS-CoV-2 (sequenza originale di Wuhan-1)
Evusheld Tixagevimab/Cilgavimab <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/evusheld>

Anti IL-1

Kineret Anakinra <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/kineret>
<https://www.giornaledicardiologia.it/archivio/3666/articoli/36514/>

Regdanvimab neutralizza la spike del SARS-CoV-2 (sequenza originale di Wuhan-1)

Regkirona Regdanvimab <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/regkirona>

Tocilizumab si lega al recettore per l'interleuchina-6

RoActemra <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/roactemra>

⁵⁸² List of critical medicines for COVID-19 public health emergency (PHE) under Regulation (EU) 2022/123 EMA/285556/2022

https://www.ema.europa.eu/en/documents/other/list-critical-medicines-covid-19-public-health-emergency-phe-under-regulation-eu-2022/123_en.pdf

Anti-SARS-CoV-2 Monoclonal Antibodies

<https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/therapies/anti-sars-cov-2-antibody-products/anti-sars-cov-2-monoclonal-antibodies/>

Kreuzberger N, et al

SARS-CoV-2-neutralising monoclonal antibodies for treatment of COVID-19.

Cochrane Database Syst Rev. 2021 Sep 2;9(9):CD013825. doi: 10.1002/14651858.CD013825.pub2.

<https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD013825.pub2/full>

Anti-SARS-CoV-2 Monoclonal Antibodies

<https://www.idsociety.org/covid-19-real-time-learning-network/therapeutics-and-interventions/monoclonal-antibodies/>

COVID-19 Manufacturing for Monoclonal Antibodies

<https://healthpolicy.duke.edu/sites/default/files/2020-06/Issue%20Brief%20-%20COVID-19%20Manufacturing%20of%20Monoclonal%20Antibodies.pdf>

Monoclonal Antibodies for the Coronavirus (Updated May 5th)

Science 28 apr 2020

<https://www.science.org/content/blog-post/monoclonal-antibodies-coronavirus-updated-may-5th>

Anticorpi Monoclonali COVID-19: Cosa Sono, Come Funzionano, Effetti Collaterali

<https://www.my-personaltrainer.it/benessere/anticorpi-monoclonali-covid-19.html>

Casirivimab e imdevimab neutralizzano la spike del SARS-CoV-2 (sequenza originale di Wuhan-1)
 Ronapreve <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/ronapreve>

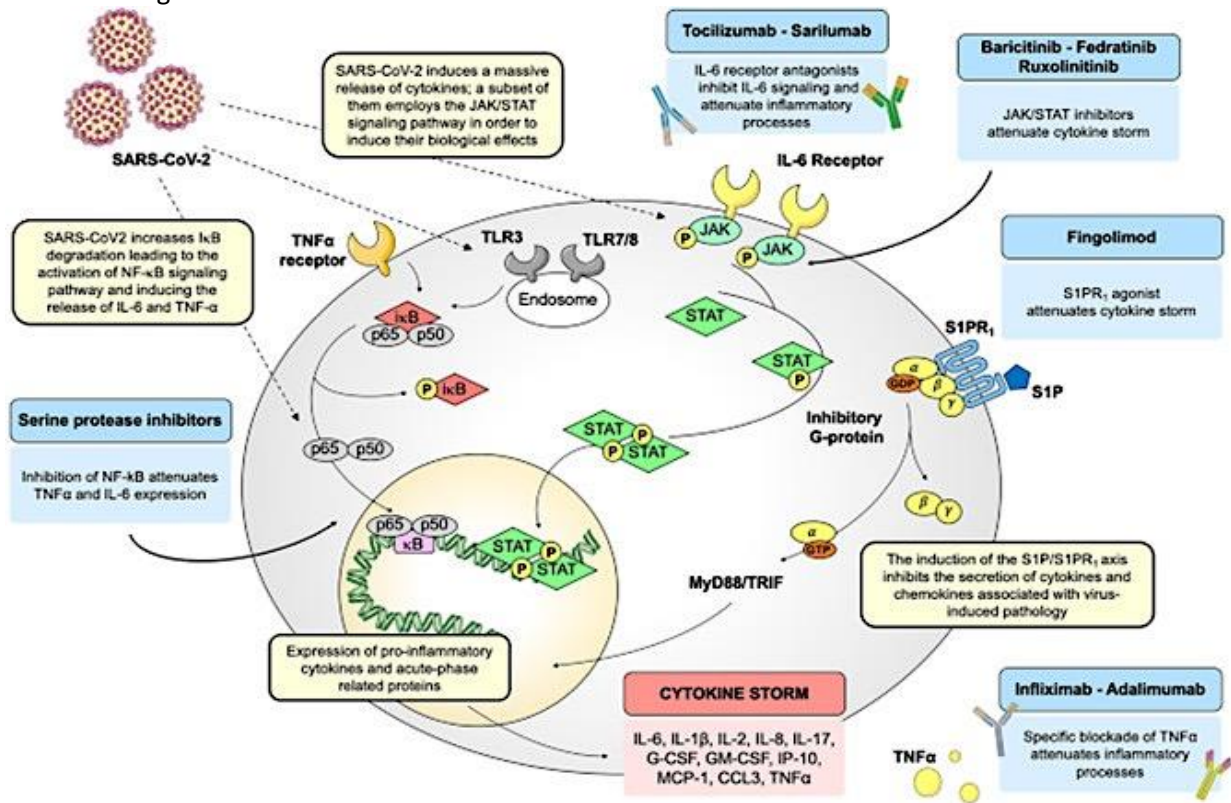
Sotrovimab neutralizza la spike del SARS-CoV-2 (sequenza originale di Wuhan-1)
 Xevudy <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/xevudy>

Rischi associati all'uso di anticorpi monoclonali contro il SARS-Cov-2

Come per altri anticorpi monoclonali, le reazioni correlate all'infusione sono potenziali reazioni avverse del trattamento.⁵⁸³

Le reazioni correlate all'infusione sono caratterizzate da vampate di calore, febbre/brividi, dolore alla schiena o addominale, nausea/vomito, prurito o eruzioni cutanee e si presentano in genere dopo 30-60 minuti dall'inizio dell'infusione.

La terapia con anticorpi monoclonali non è indicata nei casi gravi che richiedono il ricovero in ospedale.⁵⁸⁴ È stato riscontrato che gli anticorpi monoclonali possono essere associati a esiti peggiori per i pazienti che richiedono ossigeno ad alto flusso o ventilazione meccanica.



⁵⁸³ Brobst B, Borger J. Benefits And Risks Of Administering Monoclonal Antibody Therapy For Coronavirus (COVID-19). 2022 Apr 28. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK574507/>

⁵⁸⁴ An EUA for bamlanivimab and etesevimab for COVID-19. Med Lett Drugs Ther. 2021 Apr 05;63(1621):49-50 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33830966/>

An EUA for sotrovimab for treatment of COVID-19. Med Lett Drugs Ther. 2021 Jun 28;63(1627):97-xx98. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34181630/>

An EUA for casirivimab and imdevimab for COVID-19. Med Lett Drugs Ther. 2020 Dec 28;62(1614):201-202. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33451174/>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8662023/>

Rappresentazione schematica delle vie di segnalazione guidate da SARS-CoV-2 e dei potenziali bersagli farmacologici. Immagini riprodotte da Catanzaro et al. 61 Questo articolo è concesso in licenza in base a una licenza internazionale di attribuzione creative commons 4.0. <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. GM-CSF, fattore stimolante le colonie di granulociti-macrofagi; IL-6, interleuchina 6; JAK, Janus chinasi; NF-κB, fattore nucleare-κB; SARS-CoV-2, sindrome respiratoria acuta grave coronavirus 2; STAT, trasduttore di segnale e attivatore di trascrizione; TNF-α, fattore di necrosi tumorale-α

Potenziamento della malattia dipendente dall'anticorpo monoclonale

Come già discusso in precedenza, gli anticorpi monoclonali utilizzati nel trattamento dell'infezione da SARS-Cov-2, possono interferire direttamente con la patogenesi virale in molteplici modi.⁵⁸⁵

Il legame di un anticorpo neutralizzante al virione può impedire il legame e/o la fusione delle cellule bersaglio. Inoltre, il legame dell'anticorpo opsonizza i virioni o le cellule infette per l'assorbimento fagocitico.

Se le proteine virali sono intercalate nelle membrane cellulari bersaglio durante l'uscita virale, gli anticorpi monoclonali possono facilitare la morte delle cellule bersaglio attraverso la fissazione del complemento e l'attivazione del complesso di attacco di membrana (MAC) o la citotossicità anticorpo-dipendente.

Questi meccanismi possono provocare apoptosi o necrosi della cellula infetta, e in alcuni casi l'opsonizzazione di un virione può facilitare la patogenesi virale mediante il potenziamento anticorpo-dipendente.⁵⁸⁶

Come già dettagliato, l'ADE può avvenire attraverso due meccanismi distinti: gli anticorpi specifici del patogeno possono aumentare l'infezione attraverso l'assorbimento virale e la replicazione nelle cellule immunitarie che esprimono il recettore Fcγ (FcγR), oppure possono indurre una maggiore attivazione immunitaria in conseguenza delle funzioni effettrici mediate da Fc o dalla formazione di complessi immunitari.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8054133/>

Meccanismo d'azione degli anticorpi monoclonali per l'infezione virale e il potenziamento anticorpo-dipendente.

un | Gli anticorpi monoclonali possono interferire direttamente con la patogenesi virale in molteplici modi. In primo luogo, il legame di un anticorpo neutralizzante al virione può impedire il legame e/o la fusione delle cellule bersaglio. Inoltre, il legame dell'anticorpo opsonizza i virioni o le cellule infette per l'assorbimento fagocitico. Se le proteine virali sono intercalate nelle membrane cellulari bersaglio durante l'uscita virale, gli anticorpi monoclonali possono facilitare la morte delle cellule bersaglio attraverso la fissazione del complemento e l'attivazione del complesso di attacco di membrana (MAC) o la citotossicità anticorpo-dipendente. Questi meccanismi possono provocare apoptosi o necrosi della cellula infetta. b | In alcuni casi, l'opsonizzazione di un virione può facilitare la patogenesi virale in un processo chiamato "potenziamento anticorpo-dipendente" (ADE). L'ADE può avvenire attraverso due meccanismi distinti. In primo luogo, gli anticorpi specifici del patogeno potrebbero aumentare l'infezione attraverso l'assorbimento virale e la replicazione nelle cellule immunitarie che esprimono il recettore Fcγ (FcγR). In secondo luogo, l'ADE può essere mediato tramite una maggiore attivazione immunitaria da parte delle funzioni effettrici mediate da Fc o dalla formazione di complessi immunitari.

⁵⁸⁵ Taylor PC, Adams AC, Hufford MM, de la Torre I, Winthrop K, Gottlieb RL.

Neutralizing monoclonal antibodies for treatment of COVID-19.

Nat Rev Immunol. 2021 Jun;21(6):382-393. doi: 10.1038/s41577-021-00542-x.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8054133/>

Quiros-Roldan E, Amadasi S, Zanella I, Degli Antoni M, Storti S, Tiecco G, Castelli F.

Monoclonal Antibodies against SARS-CoV-2: Current Scenario and Future Perspectives.

Pharmaceuticals (Basel). 2021 Dec 6;14(12):1272. doi: 10.3390/ph14121272.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8707981/>

Kaplon H, Chenoweth A, Crescioli S, Reichert JM.

Antibodies to watch in 2022.

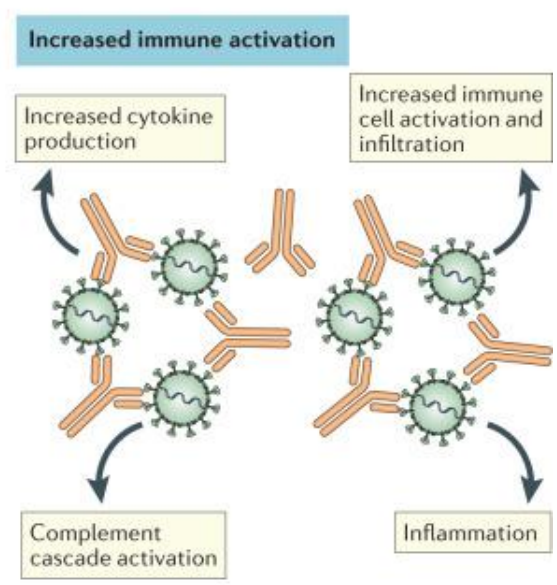
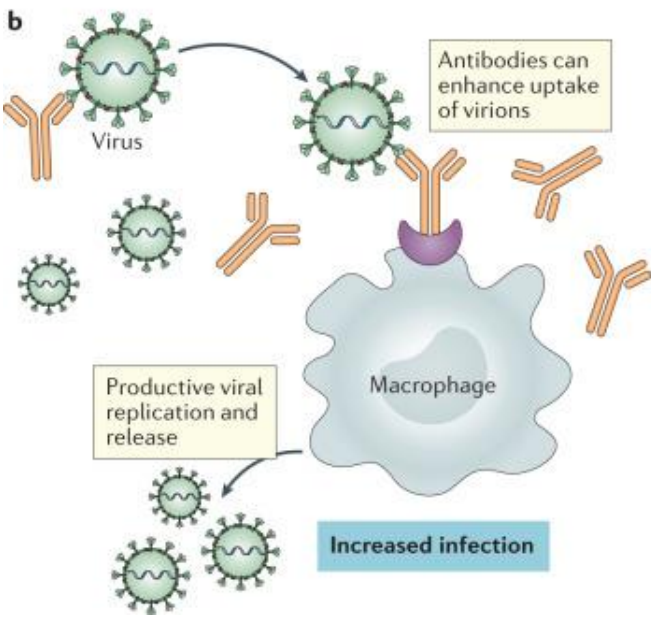
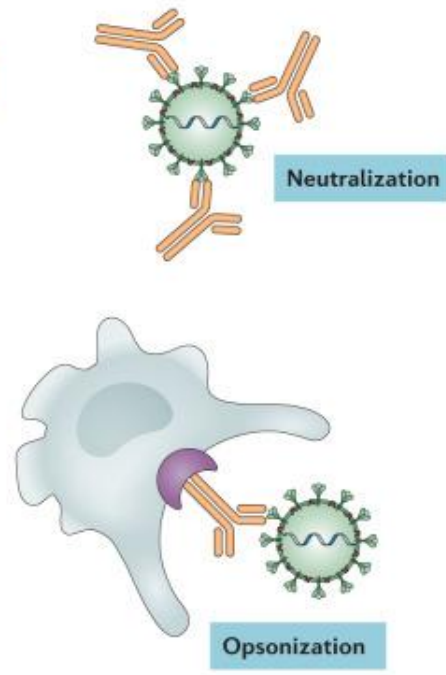
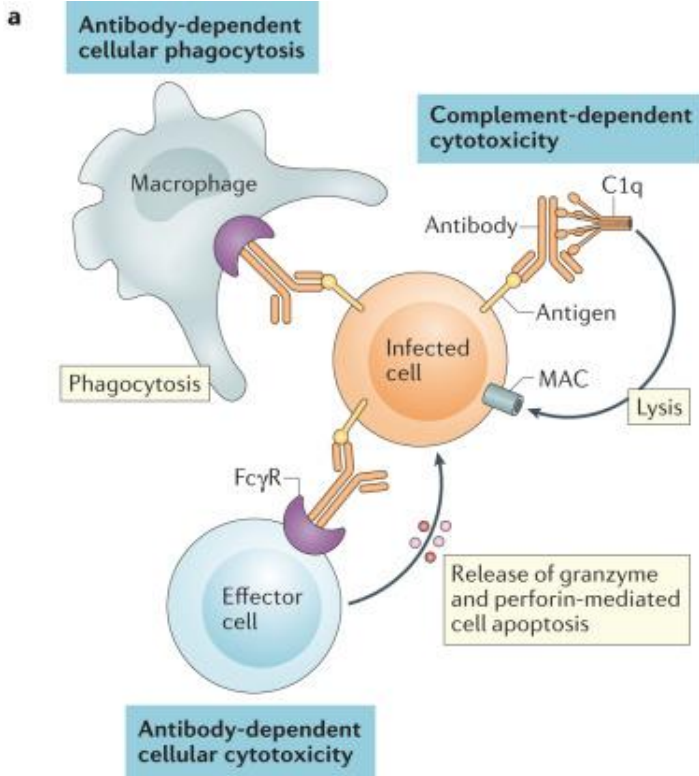
MAbs. 2022 Jan-Dec;14(1):2014296. doi: 10.1080/19420862.2021.2014296.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8765076/>

⁵⁸⁶ Goncalvez AP, Engle RE, St Claire M, Purcell RH, Lai CJ.

Monoclonal antibody-mediated enhancement of dengue virus infection in vitro and in vivo and strategies for prevention.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 May 29;104(22):9422-7. doi: 10.1073/pnas.0703498104.



Sicurezza del Tocilizumab

Tra gli anticorpi monoclonali impiegati inizialmente contro il SARS-Cov-2 e attualmente commercializzato, il tocilizumab (TCZ) è stato associato a casi di test enzimatici elevati di funzionalità epatica (LFT)⁵⁸⁷, perforazione gastrointestinale⁵⁸⁸, diverticolite, neutropenia, ipertensione, reazioni allergiche, rash cutanei (eritema tossico⁵⁸⁹) e reazioni correlate all'infusione.⁵⁹⁰

Nello studio di Pettit et al. 64 pazienti sono stati inclusi in ciascun gruppo, 17 infezioni nel gruppo TCZ (23%) e 6 (8%) infezioni nel gruppo di controllo si sono verificate > 48 ore dopo il ricovero (P = .013).

La maggior parte delle infezioni erano batteriche e la polmonite era la manifestazione più comune.

Le infezioni a esordio tardivo erano significativamente più comuni tra coloro che ricevevano TCZ.

Tra i pazienti che hanno ricevuto TCZ, sono stati osservati aumenti di LFT nel 51%, neutropenia nell'1,4% e ipertensione nell'8%. Combinando infezioni e tossicità correlate a TCZ, il 61% dei pazienti ha avuto una possibile complicanza post-TCZ e il tasso di mortalità tra coloro che hanno ricevuto TCZ era maggiore del controllo (39% contro 23%, P = .03).⁵⁹¹

Nella revisione dei dati di farmacovigilanza svolta da Jakaran et al,⁵⁹² sono stati esaminati un totale di 1005 eventi avversi da farmaco segnalati da 513 persone.

Analizzando i dati in base al numero di reazioni avverse segnalate, la maggior parte è stata segnalata dalla fascia di età 18-64 anni (46,26%) e più della metà degli da maschi.

I rapporti provenivano maggiormente dall'Europa e dalle Americhe rispetto ad Asia, Africa e Oceania.

Solo il 12% delle reazioni avverse è stato riportato dagli studi clinici, il resto è stato segnalato spontaneamente. L'80% di queste reazioni avverse erano gravi e il 20% sono risultate fatali.

La distribuzione delle reazioni avverse è riportata nel seguente diagramma:

⁵⁸⁷ Serviddio G, Villani R, Stallone G, Scioscia G, Foschino-Barbaro MP, Lacedonia D. Tocilizumab and liver injury in patients with COVID-19. *Therap Adv Gastroenterol.* 2020 Oct 7;13:1756284820959183. doi: 10.1177/1756284820959183 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7545299/>

⁵⁸⁸ Bruce-Hickman D, Sajeed SM, Pang YH, Seow CS, Chen W, Gulati Kansal M. Bowel ulceration following tocilizumab administration in a COVID-19 patient. *BMJ Open Gastroenterol.* 2020 Aug;7(1):e000484. doi: 10.1136/bmjgast-2020-000484. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32816957/>

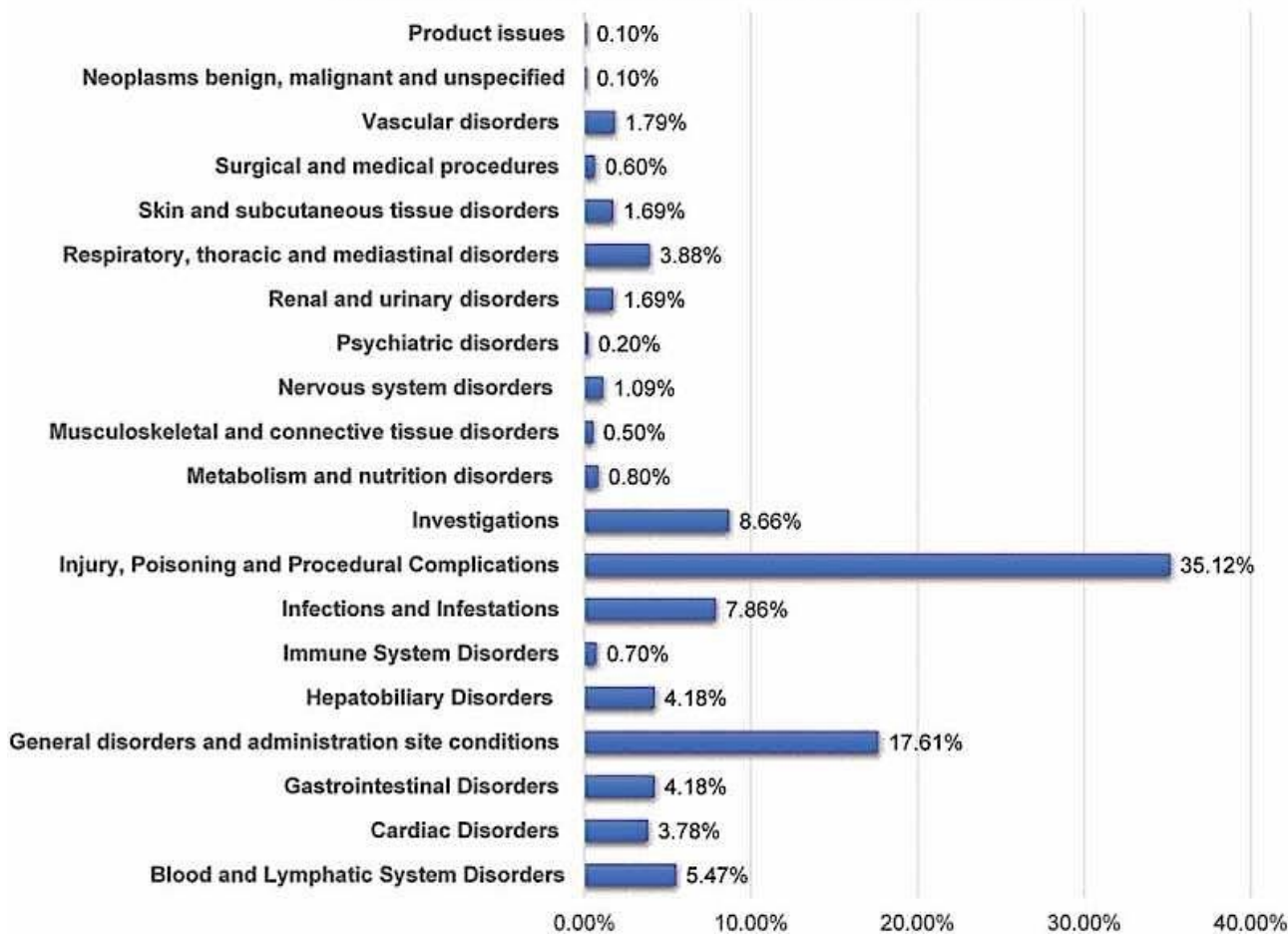
⁵⁸⁹ Sernicola A, Carnicelli G, Di Fraia M, Chello C, Furlan C, Muharremi R, Paolino G, Grieco T. 'Toxic erythema' and eosinophilia associated with tocilizumab therapy in a COVID-19 patient. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2020 Aug;34(8):e368-e370. doi: 10.1111/jdv.16620. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32386438/>

⁵⁹⁰ Boretti A, Banik B. Modulation of Covid-19 cytokine storm by tocilizumab. *J Med Virol.* 2022 Mar;94(3):823-828. doi: 10.1002/jmv.27380. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8662023/>

⁵⁹¹ Pettit NN, Nguyen CT, Mutlu GM, Wu D, Kimmig L, Pitrak D, Pursell K. Late onset infectious complications and safety of tocilizumab in the management of COVID-19. *J Med Virol.* 2021 Mar;93(3):1459-1464. doi: 10.1002/jmv.26429. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7436682/>

⁵⁹² Charan J, Dutta S, Kaur R, Bhardwaj P, Sharma P, Ambwani S, Jahan I, Abubakar AR, Islam S, Hardcastle TC, Rahman NAA, Lugova H, Haque M. Tocilizumab in COVID-19: a study of adverse drug events reported in the WHO database. *Expert Opin Drug Saf.* 2021 Sep;20(9):1125-1136. doi: 10.1080/14740338.2021.1946513. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8290369/>

Figure 4: Distribution of Adverse Drug Events Attributed to Tocilizumab



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8290369/>

Per quanto riguarda gli anticorpi monoclonali contro la spike del SARS-Cov-2, sono riportati in letteratura numerosi studi che dimostrano la rapida formazione di nuove varianti anticorpo monoclonale resistenti, quale ulteriore meccanismo del danno causato da questi farmaci. Tale argomento sarà approfondito nella sezione dedicata alle varianti naturali e vaccinali.

Nel seguente articolo divulgativo sono approfonditi ulteriori aspetti sulla sicurezza degli anticorpi monoclonali

prof. Francesco Cappello [Cura o procurata sventura? Anticorpi sintetici monoclonali](#)⁵⁹³

⁵⁹³ <https://www.francescocappello.com/2022/01/14/cura-o-procurata-sventura-anticorpi-sintetici-monoclonali/>

LA GLICOBIOLOGIA DELLE INFEZIONI VIRALI

Approfondimento

GLICOBIOLOGIA

Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. Essentials of Glycobiology [Internet]. 4th edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK579918/> doi: 10.1101/9781621824213

Video

[N linked glycosylation](#)

[Lecture 3 Protein glycosylation in ER](#)

I glicani sono molecole di zucchero costituite da disposizioni modulari di unità monosaccaridiche spesso attaccate a proteine e lipidi. I glicani variano in dimensioni da mono e oligosaccaridi lunghi pochi nanometri, a catene polisaccaridiche di migliaia di subunità e lunghe diversi micrometri.

I costituenti monosaccaridici dei glicani sono legati tra loro da legami glicosidici provenienti da molti degli atomi di carbonio idrossilati che formano ciascun anello monosaccaridico e quindi le strutture dei glicani possono essere ampiamente ramificate.

I glicani decorano la maggior parte delle proteine extracellulari e molti lipidi (le molecole combinate sono chiamate glicconiugati),⁵⁹⁴ si trovano principalmente sulla superficie esterna della membrana cellulare e sono anche secreti negli spazi extracellulari.

A differenza di proteine ed RNA, i glicani non sono costruiti da uno stampo. La loro sintesi è un processo di assemblaggio di aggiunta, rimozione e modifica sequenziale delle subunità zuccherine. La forma e la diversità delle strutture dei glicani sono guidate dalle proteine, ma dipendono anche intrinsecamente dalla dieta e dalle condizioni fisiologiche.⁵⁹⁵

Pertanto, oltre ad essere definito dal background genetico di un individuo, il glicoma (definito come l'insieme di tutti i glicani in un tessuto od organismo analizzato) è modellato da cambiamenti nell'espressione genica indotti dall'ambiente.

I fattori ereditari (genetici) e acquisiti (epigenetici - ambientali) che modulano la glicosilazione influenzano numerosi processi molecolari, comprese le interazioni con recettori specifici o l'emivita di numerose proteine di membrana.

Cambiamenti sia quantitativi che qualitativi nel repertorio delle strutture dei glicani sono stati trovati in molte malattie complesse e nel cancro.

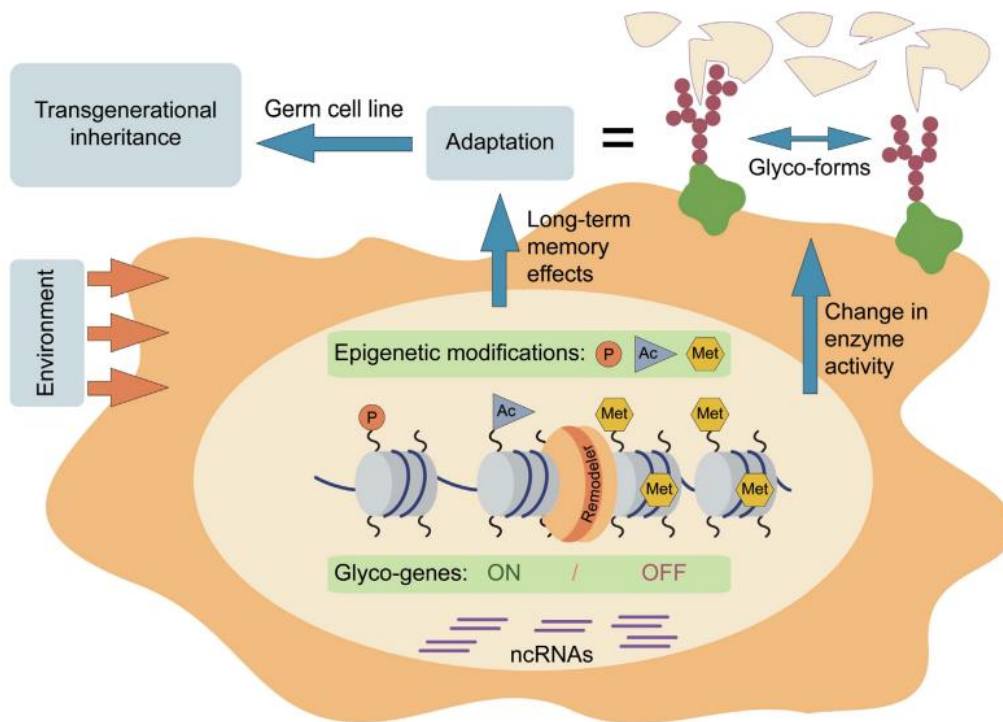
⁵⁹⁴ Marth JD.

A unified vision of the building blocks of life.
Nat Cell Biol. 2008 Sep;10(9):1015-6. doi: 10.1038/ncb0908-1015.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2892900/>

⁵⁹⁵ Zoldoš V, Novokmet M, Bečeheli I, Lauc G.
Genomics and epigenomics of the human glycome.
Glycoconj J. 2013 Jan;30(1):41-50. doi: 10.1007/s10719-012-9397-y.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22648057/>

Kunej T.

Rise of Systems Glycobiology and Personalized Glycomedicine: Why and How to Integrate Glycomics with Multiomics Science?
OMICS. 2019 Dec;23(12):615-622. doi: 10.1089/omi.2019.0149.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31651212/>



<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23999089/>

Rappresentazione schematica dell'adattamento ai cambiamenti dell'ambiente attraverso la regolazione epigenetica delle glico-forme. I meccanismi epigenetici sono mediatori tra l'ambiente e le glico-forme, che si riflettono nelle strutture finali dei glicani sulle glicoproteine di membrana che interagiscono con i microbi. L'espressione della glicofirma è regolata epigeneticamente dalla metilazione del DNA e dalle modificazioni della cromatina, che includono modificazioni covalenti delle code dell'istone (fosforilazione, acetilazione, metilazione, ecc.) e complessi di rimodellamento ATP-dipendenti; anche piccoli RNA non codificanti svolgono un ruolo regolatorio. Lo stato trascrizionale della glicofirma può cambiare in risposta a segnali esterni e intrinseci, al fine di ottenere un appropriato cambiamento funzionale nella glicosilazione proteica, che può diventare adattiva attraverso effetti epigenetici a lungo termine e persino passare alla generazione successiva

Poiché le strutture dei glicani maturi non sono codificate nel genoma, la loro storia evolutiva può essere scoperta solo indirettamente. Ad esempio, l'evoluzione delle proteine che modificano i glicani può rivelare a sua volta i cambiamenti dei glicani.

Il guadagno e la perdita di trasportatori degli zuccheri, transferasi e glicosidasi, hanno un impatto diretto sulla serie di glicani che un organismo può sintetizzare e degradare o utilizzare nella dieta.⁵⁹⁶

⁵⁹⁶ Schjoldager KT, Narimatsu Y, Joshi HJ, Clausen H.

Global view of human protein glycosylation pathways and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020 Dec;21(12):729-749. doi: 10.1038/s41580-020-00294-x. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33087899/>

Reily C, Stewart TJ, Renfrow MB, Novak J.

Glycosylation in health and disease. *Nat Rev Nephrol.* 2019 Jun;15(6):346-366. doi: 10.1038/s41581-019-0129-4. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6590709/>

Schnaar RL.

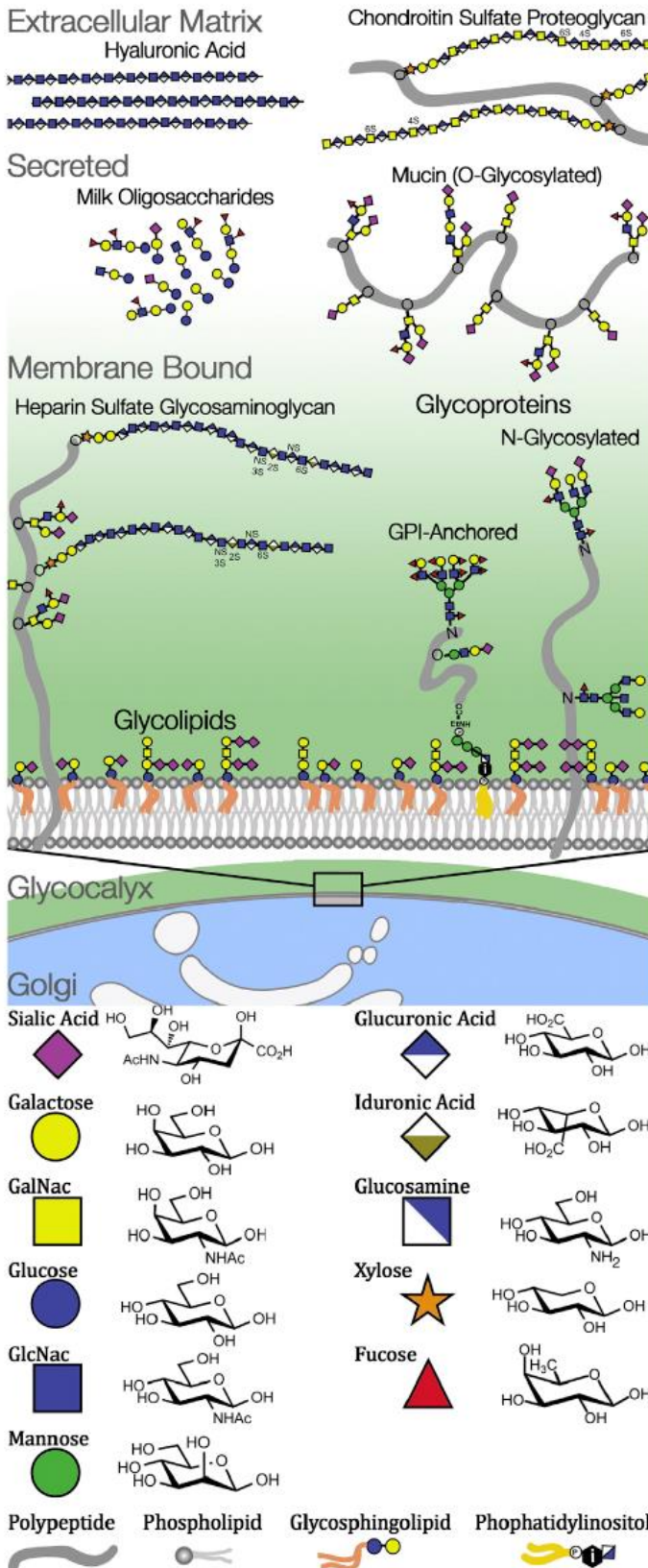
Glycans and glycan-binding proteins in immune regulation: A concise introduction to glycobiology for the allergist. *J Allergy Clin Immunol.* 2015 Mar;135(3):609-15. doi: 10.1016/j.jaci.2014.10.057. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4355172/>

Bennun SV, Hizal DB, Heffner K, Can O, Zhang H, Betenbaugh MJ.

Systems Glycobiology: Integrating Glycogenomics, Glycoproteomics, Glycomics, and Other 'Omics Data Sets to Characterize Cellular Glycosylation Processes. *J Mol Biol.* 2016 Aug 14;428(16):3337-3352. doi: 10.1016/j.jmb.2016.07.005. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27423401/>

Rabinovich GA, van Kooyk Y, Cobb BA.

Glycobiology of immune responses. *Ann N Y Acad Sci.* 2012 Apr;1253:1-15. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06492.x. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3884643/>



I glicani sono zuccheri composti da blocchi costitutivi di monosaccaridi. Queste unità di base possono essere collegate in catene e strutture ramificate. I mammiferi utilizzano solo una dozzina di unità di base di monosaccaridi, ma queste sono combinate in molti diversi tipi di strutture di glicani. I glicani possono essere collegati con diversi legami alle proteine (N- e O-glicani, glicosaminoglicani, proteoglicani) e ai lipidi (glicolipidi, proteine GPI-ancorate). I glicani possono anche essere secreti come oligo- o polisaccaridi liberi (acido ialuronico, oligosaccaridi del latte). Nelle cellule eucariotiche, gli N-glicani sono attaccati alle glicoproteine nel reticolo endoplasmatico e ampiamente rimodellati nel Golgi prima di spostarsi all'esterno della cellula. Nei procarioti, N- e O- glicani sono costruiti in modo graduale nel citoplasma ma non ampiamente potati o rimodellati. I batteri e gli archaea utilizzano centinaia di monosaccaridi diversi, ma solo raramente questi sono collegati alle strutture più complesse tipiche dei glicani degli eucarioti

Glicani e glicocongiugati sono classificati in diversi modi. I glicani N-linked e O-linked sono classificati in base al loro legame chimico a una proteina.

I glicosaminoglicani possono essere riconosciuti dalla loro composizione di monosaccaridi. Altri glicocongiugati, come le proteine ancorate con GPI e i glicolipidi, sono riconoscibili dai legami e dalle combinazioni delle loro molecole costituenti. Alcuni monosaccaridi, glicani e glicocongiugati sono espressi solo in particolari lignaggi filogenetici (glicosaminoglicani dei mammiferi), altri esistono nella maggior parte della vita cellulare (N-glicani). Esistono molti glicani rari, monosaccaridi, legami e modificazioni conosciute ed è probabile che molti altri restino da scoprire.

<https://www.nature.com/articles/s41581-019-0129-4>

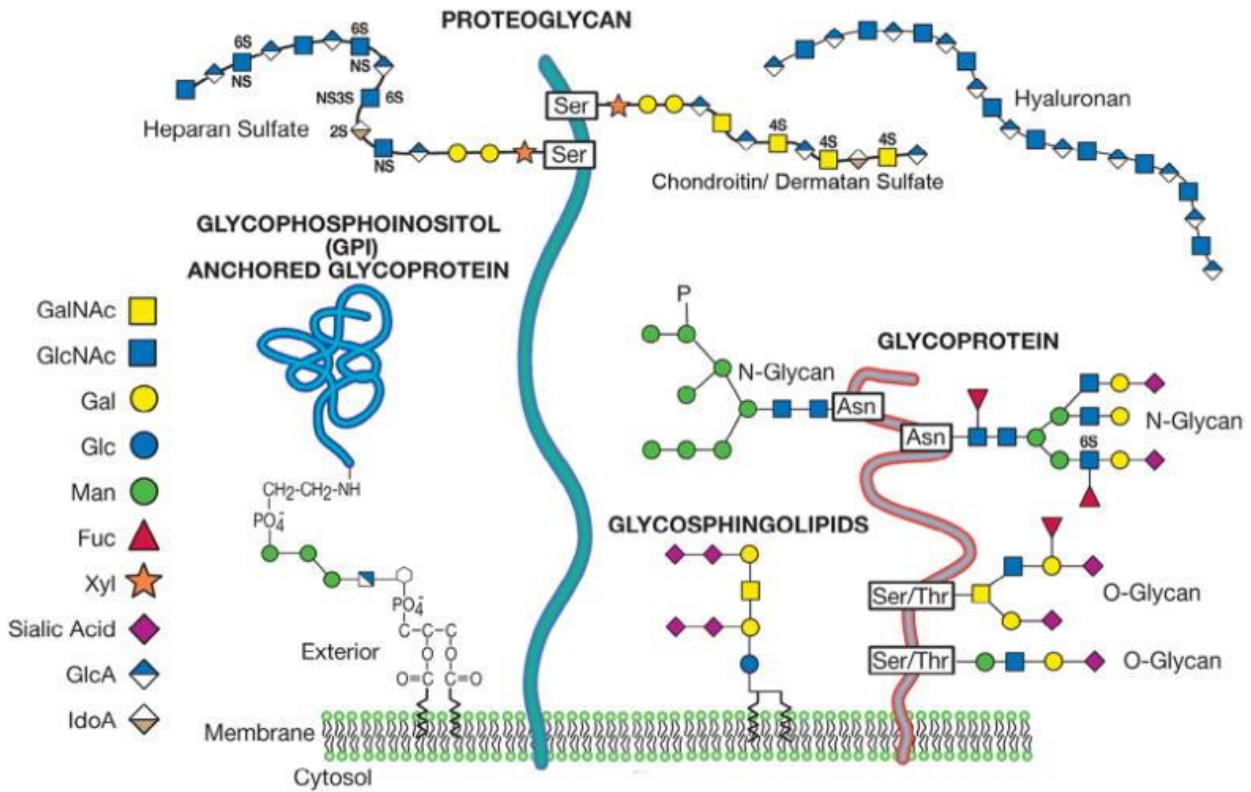
I glicani possono essere attaccati in modo covalente a proteine e lipidi per formare glicocongiugati; i glicani in questi composti sono classificati in base al legame con le parti lipidiche, glicani o proteiche. Le glicoproteine sono costituite da glicani e catene di glicani legati agli atomi di azoto e ossigeno dei residui di amminoacidi e sono quindi denominate rispettivamente N-glicani e O-glicani. Gli N-glicani sono costituiti da N-acetilglucosamina (GlcNAc) attaccata da un legame β 1-glicosidico all'atomo di azoto del gruppo amminico di Asn (N) al motivo consenso di glicosilazione Asn-X-Ser/Thr (in cui X denota qualsiasi amminoacido tranne Pro). Queste strutture N-glicano ramificate e altamente eterogenee sono costituite da un glicano centrale contenente due residui di GlcNAc e tre residui di mannosio (Man). Forse la forma più diversificata di glicosilazione proteica è la O-glicosilazione, in cui i glicani si attaccano all'atomo di ossigeno dei gruppi idrossilici dei residui Ser (S) o Thr (T). Gli O-glicani possono essere ulteriormente sottoclassificati sulla base dello zucchero iniziale attaccato alla proteina e delle strutture zuccherine aggiuntive aggiunte al glicano iniziale. Ad esempio, la glicosilazione O di tipo mucina indica che il glicano iniziale è N-acetilgalattosamina (GalNAc); i glicani di tipo mucina possono essere ulteriormente classificati sulla base dei glicani attaccati al GalNAc iniziale. Altri tipi di O-glicani, come il fucosio legato all'O (Fuc) e l'uomo legato all'O, si trovano spesso in proteine o domini proteici specifici, come le ripetizioni del fattore di crescita epidermico (EGF), le ripetizioni della trombospodina di tipo I (TSR) o il distroglicano. Gli N-glicani e gli O-glicani sono spesso ricoperti da acido sialico caricato negativamente. L'O-GlcNAc è un tipo unico di O-glicosilazione sintetizzata dalla O-GlcNAc transferasi; si verifica nel citosol e nel nucleo. (continua)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4762723/>

I proteoglicani rappresentano una classe importante di glicoproteine che sono definite da lunghe catene di glicosaminoglicani (GAG) attaccate alle proteine attraverso un nucleo di tetrasaccaride costituito da acido glucuronico (GlcA) – galattosio (Gal) – Gal – xilosio (Xyl); questo nucleo di carboidrati

Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. Essentials of Glycobiology. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1908/> https://ncfg.hms.harvard.edu/files/ncfg/files/cummings_overview_of_glycans.pdf

è attaccato al gruppo ossidrilico di Ser a motivi di amminoacidi Ser-Gly-X-Gly. I proteoglicani GAG possono essere ulteriormente classificati in base al numero, alla composizione e al grado di solfatazione delle loro unità disaccaridiche ripetitive; GAG comuni includono eparan solfato, condroitin solfato e dermatan solfato. Le glicoproteine ancorate al glicosilfosfatidilinositolo (GPI) rappresentano un'altra importante classe di glicocongiugati. Queste glicoproteine sono legate al terminale carbossilico attraverso un legame fosfodiesterico con fosfoetanolamina attaccato a un nucleo di glucosammina trimannosil-nonacetilata (Man3-GlcN); il residuo GlcN è legato al fosfatidilinositolo, che è incorporato nella membrana cellulare. I glicosfingolipidi sono una classe di glicocongiugati in cui i glicani, come Gal o glucosio (Glc), sono attaccati ai lipidi della membrana cellulare. Un'altra importante classe di glicani è rappresentata dai GAG che non sono attaccati ai nuclei proteici, come lo ialuronano, che viene sintetizzato sulla membrana plasmatica mediante l'aggiunta sequenziale di GlcA e GlcNAc. IdoA, acido iduronico.



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5556687/>

Glicani legati all'azoto (N-glicani)

Gli N-glicani sono oligosaccaridi, ciascuno legato in modo covalente a una proteina dall'atomo di azoto (N) di un'asparagina. I potenziali siti di glicosilazione legati all'N sono chiamati "sequoni" e hanno una sequenza amminoacidica di consenso N-X-S/T.

I glicani N-linked si trovano in tutti e tre i domini della vita, ma sono sintetizzati in modo diverso negli eucarioti rispetto agli eubatteri o agli archaea.⁵⁹⁷

Negli eucarioti, la glicosilazione legata all'N regola il ripiegamento delle proteine. I cambiamenti nella composizione dell'N-glicano tracciano il processo di ripiegamento delle proteine nel reticolo endoplasmatico. Dopo il ripiegamento, le glicoproteine maturano nell'apparato di Golgi, dove gli N-glicani attaccati vengono ristrutturati nelle loro forme mature.⁵⁹⁸

Nel Golgi, gli N-glicani vengono prima rifilati a una base oligomannosica e quindi costruiti in complesse forme multiramificate.⁵⁹⁹ Il Golgi è un sistema vescicolare multi-compartimento e la presenza o assenza di enzimi

⁵⁹⁷ Schwarz F, Aebi M. Mechanisms and principles of N-linked protein glycosylation. *Curr Opin Struct Biol.* 2011 Oct;21(5):576-82. doi: 10.1016/j.sbi.2011.08.005. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21978957/>

⁵⁹⁸ Stanley P, Schachter H, Taniguchi N. N-Glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME, editors. *Essentials of Glycobiology*. 2nd ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. Chapter 8. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1917/>

⁵⁹⁹ Hang I, Lin CW, Grant OC, Fleurkens S, Villiger TK, Soos M, Morbidelli M, Woods RJ, Gauss R, Aebi M.

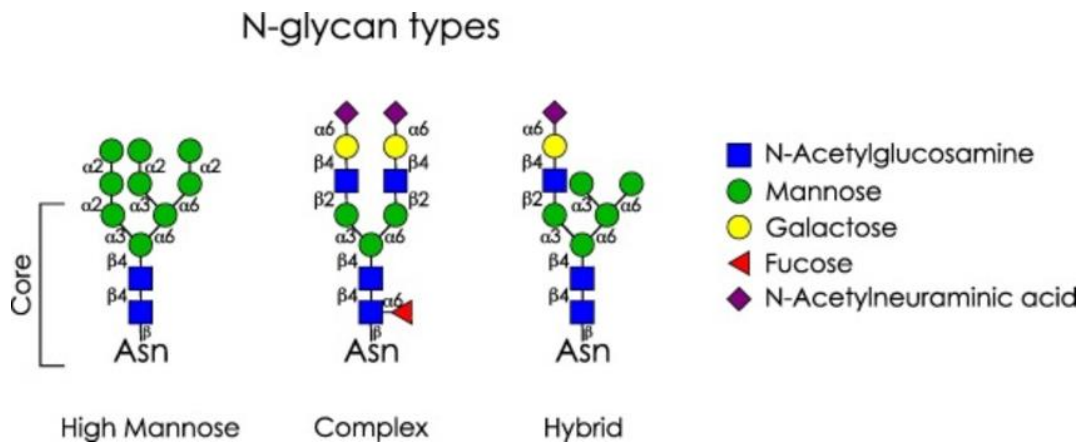
modificatori del glicano e donatori di zucchero nucleotidico in un dato compartimento del Golgi regola la composizione dell'N-glicano.

Le strutture dell'N-glicano variano ampiamente nei diversi organismi. Gli N-glicani dei mammiferi sono più spesso terminati dagli acidi sialici. Gli N-glicani vegetali non terminano mai negli acidi sialici e contengono modifiche non osservate negli N-glicani dei mammiferi.

I funghi producono N-glicani ricchi di residui di mannosio, mentre gli invertebrati producono N-glicani ibridi con meno ramificazioni rispetto ai vertebrati e con alcune delle stesse modifiche delle piante.⁵⁸⁹

Anche gli invertebrati come i gastropodi utilizzano monosaccaridi diversi.⁶⁰⁰ In generale gli organismi multicellulari producono una maggiore abbondanza e varietà di N-glicani rispetto ai batteri e agli archaea.

La diversità degli N-glicani multicellulari può aiutare a definire l'identità cellulare e a modulare la segnalazione cellula-cellula durante lo sviluppo.⁶⁰¹



<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.01.005>

Tipi di N-glicani. I tre diversi tipi (High Mannose, Complex e Hybrid) condividono una struttura centrale comune che include i primi due residui di N-acetilglucosamina e i primi tre residui di mannosio.

Glicani legati all'O (O-glicani)

Gli O-Glicani sono catene di oligosaccaridi coniugate a una proteina dall'atomo di ossigeno di una serina o treonina, e contengono meno ramificazioni e meno residui di mannosio rispetto agli N-glicani.

Gli O-glicani sono abbondanti nelle secrezioni animali come il muco sugli epitelii, e le glicoproteine della mucina possono essere per l'80% O-glicani in massa e formare gel idratati protettivi. La maggior parte degli O-glicani sono attaccati a una proteina mediante un monosaccaride GalNac.

Analysis of site-specific N-glycan remodeling in the endoplasmic reticulum and the Golgi.

Glycobiology. 2015 Dec;25(12):1335-49. doi: 10.1093/glycob/cwv058.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4634314/>

Higel F, Seidl A, Sörgel F, Friess W. N-glycosylation heterogeneity and the influence on structure, function and pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc fusion proteins. Eur J Pharm Biopharm. 2016 Mar;100:94-100. doi: 10.1016/j.ejpb.2016.01.005. Epub 2016 Jan 13. PMID: 26775146.

<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.01.005>

⁶⁰⁰ Stepan H, Staudacher E.

Optimization of monosaccharide determination using anthranilic acid and 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone for gastropod analysis.

Anal Biochem. 2011 Nov 1;418(1):24-9. doi: 10.1016/j.ab.2011.07.005.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3169793/>

⁶⁰¹ Lowe JB, Marth JD.

A genetic approach to Mammalian glycan function.

Annu Rev Biochem. 2003;72:643-91. doi: 10.1146/annurev.biochem.72.121801.161809.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12676797/>

Esmail S, Manolson MF.

Advances in understanding N-glycosylation structure, function, and regulation in health and disease.

Eur J Cell Biol. 2021 Sep-Nov;100(7-8):151186. doi: 10.1016/j.ejcb.2021.151186.

<https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2021.151186>

Recentemente, è stato scoperto che GlcNac legato all'O interagisce direttamente con il metabolismo cellulare e la fosforilazione⁶⁰² e che i glicani O-GlcNac possono agire come sensori diretti dello stato fisiologico.⁶⁰³ Anche i glicosaminoglicani sono attaccati alle proteine dall'atomo di ossigeno di una serina, ma non sono tipicamente classificati come glicani legati all'ossigeno.

Glicosaminoglicani e proteoglicani

I glicosaminoglicani (GAG) sono tra le più grandi molecole sintetizzate dagli animali.⁶⁰⁴ La loro sintesi inizia con uno xilosio legato all'O, che viene poi allungato da due molecole di galattosio.

Molte migliaia di N-acetilglucosamina e disaccaridi dell'acido glucuronico vengono aggiunti a questo trisaccaride iniziale per formare catene gigantesche.

È importante sottolineare che i GAG subiscono ulteriori modifiche: l'acido glucuronico può essere epimerizzato in acido iduronico e le N-acetilglucosammine possono essere N-deacetilate e N-solfatate, N-acetilate o O-solfatate.

I sei glicosaminoglicani dei mammiferi, condroitin solfato (**CS**), dermatan solfato (**DS**), eparina (**HP**), eparan solfato (**HS**)⁶⁰⁵, ialuronano (**HA**)⁶⁰⁶ e cheratan solfato (**KS**)⁶⁰⁷, sono polisaccaridi lineari costituiti da ripetizioni disaccaridiche.

Queste modifiche post-traduzionali generano schemi chimici complessi lungo ciascuna catena GAG con importanti funzioni di segnalazione.⁶⁰⁸

⁶⁰² Zhao L, Feng Z, Yang X, Liu J.

The regulatory roles of O-GlcNAcylation in mitochondrial homeostasis and metabolic syndrome. *Free Radic Res.* 2016 Oct;50(10):1080-1088. doi: 10.1080/10715762.2016.1239017. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5466075/>

⁶⁰³ Butkinaree C, Park K, Hart GW.

O-linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNac): Extensive crosstalk with phosphorylation to regulate signaling and transcription in response to nutrients and stress. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Feb;1800(2):96-106. doi: 10.1016/j.bbagen.2009.07.018. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2815129/>

⁶⁰⁴ Casale J, Crane JS.

Biochemistry, Glycosaminoglycans. [Updated 2022 Mar 27]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544295/>

⁶⁰⁵ Gallagher J.

Fell-Muir Lecture: Heparan sulphate and the art of cell regulation: a polymer chain conducts the protein orchestra. *Int J Exp Pathol.* 2015 Aug;96(4):203-31. doi: 10.1111/iep.12135. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4561558/>

Li JP, Kusche-Gullberg M.

Heparan Sulfate: Biosynthesis, Structure, and Function. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2016;325:215-73. doi: 10.1016/bs.ircmb.2016.02.009. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27241222/>

⁶⁰⁶ Garantziotis S, Savani RC.

Hyaluronan biology: A complex balancing act of structure, function, location and context. *Matrix Biol.* 2019 May;78-79:1-10. doi: 10.1016/j.matbio.2019.02.002. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6774756/>

⁶⁰⁷ Caterson B, Melrose J.

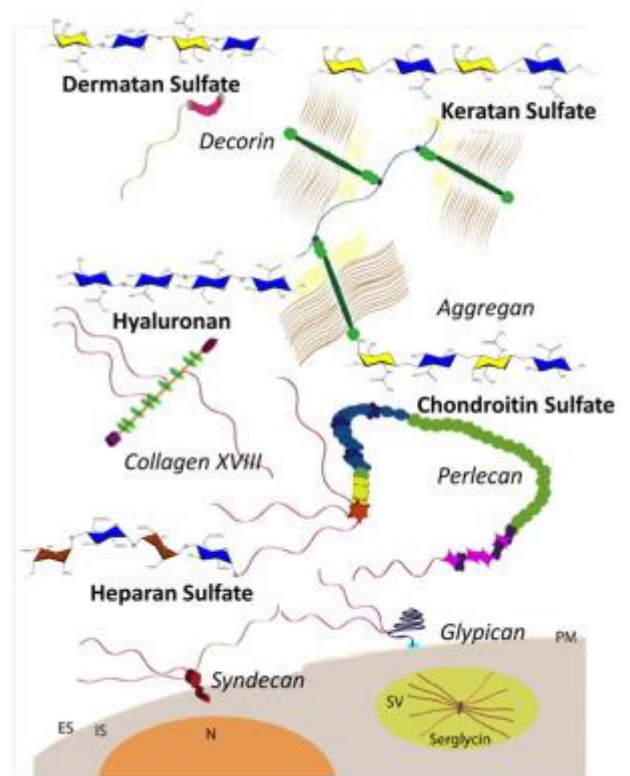
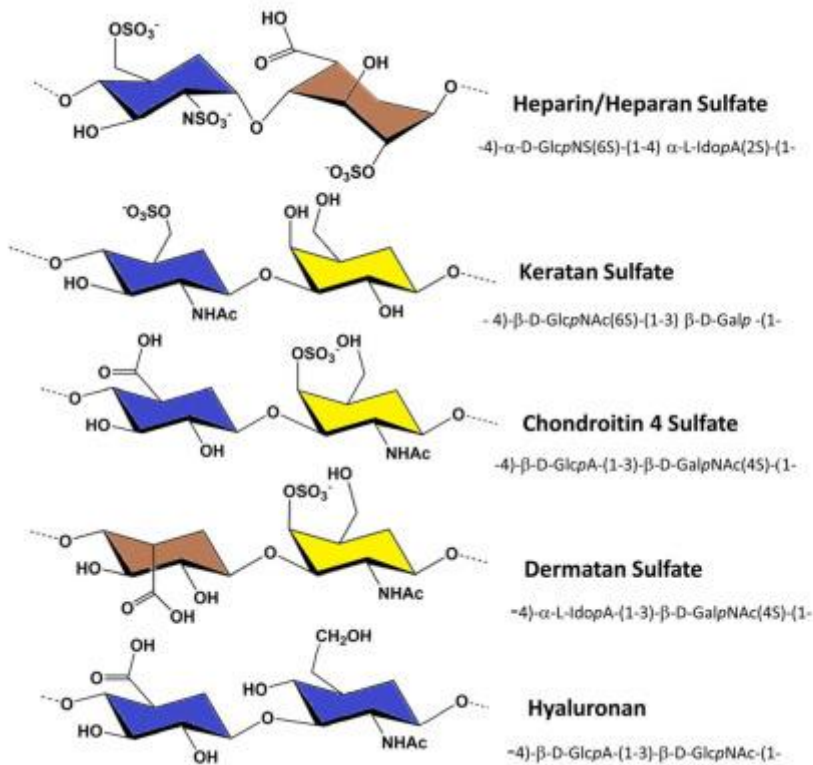
Keratan sulfate, a complex glycosaminoglycan with unique functional capability. *Glycobiology.* 2018 Apr 1;28(4):182-206. doi: 10.1093/glycob/cwy003. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5993099/>

Pomin VH.

Keratan sulfate: an up-to-date review. *Int J Biol Macromol.* 2015 Jan;72:282-9. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.08.029. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25179279/>

⁶⁰⁸ Vallet SD, Clerc O, Ricard-Blum S.

Glycosaminoglycan-Protein Interactions: The First Draft of the Glycosaminoglycan Interactome. *J Histochem Cytochem.* 2021 Feb;69(2):93-104. doi: 10.1369/0022155420946403. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7841700/>



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8615939/>

Rappresentazione della costituzione chimica delle cinque famiglie di GAG e di sei categorie di proteoglicani (aggrecano; decorina, perlecano e collagene; glicano; sindecano e serglicina). ES, extracellulare; E, intracellulare; N, nucleo; SV, vescicola secretoria.

I GAG svolgono numerosi ruoli biologici, che vanno dallo sviluppo embrionale⁶⁰⁹, l'assemblaggio della matrice extracellulare (ECM), alla regolazione della segnalazione cellulare⁶¹⁰ in vari contesti fisiologici e patologici⁶¹¹ come l'angiogenesi⁶¹², il cancro⁶¹³,

⁶⁰⁹ Kramer KL.

Specific sides to multifaceted glycosaminoglycans are observed in embryonic development. *Semin Cell Dev Biol.* 2010 Aug;21(6):631-7. doi: 10.1016/j.semcdb.2010.06.002. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2923045/>

Poulain FE, Yost HJ.

Heparan sulfate proteoglycans: a sugar code for vertebrate development? *Development.* 2015 Oct 15;142(20):3456-67. doi: 10.1242/dev.098178. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4631762/>

⁶¹⁰ Nikitovic D, Pérez S.

Preface for the Special Issue on the Exploration of the Multifaceted Roles of Glycosaminoglycans: GAGs. *Biomolecules.* 2021 Nov 4;11(11):1630. doi: 10.3390/biom11111630. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8615939/>

⁶¹¹ Soares da Costa D, Reis RL, Pashkuleva I.

Sulfation of Glycosaminoglycans and Its Implications in Human Health and Disorders. *Annu Rev Biomed Eng.* 2017 Jun 21;19:1-26. doi: 10.1146/annurev-bioeng-071516-044610. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28226217/>

⁶¹² Chiodelli P, Bugatti A, Urbinati C, Rusnati M.

Heparin/Heparan sulfate proteoglycans glycomic interactome in angiogenesis: biological implications and therapeutical use. *Molecules.* 2015 Apr 10;20(4):6342-88. doi: 10.3390/molecules20046342. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6272510/>

Spinelli FM, Vitale DL, Demarchi G, Cristina C, Alaniz L.

The immunological effect of hyaluronan in tumor angiogenesis. *Clin Transl Immunology.* 2015 Dec 4;4(12):e52. doi: 10.1038/cti.2015.35. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4685440/>

⁶¹³ Morla S.

l'infiammazione ⁶¹⁴, lo sviluppo neurale ⁶¹⁵, le malattie neurodegenerative ⁶¹⁶ e le interazioni ospite-patogeno. ⁶¹⁷ Questi ruoli sono mediati dalle interazioni dei GAG con una varietà di proteine, comprese le proteine solubili (fattori di crescita, morfogeni e chemochine ⁶¹⁸), le proteine ECM e frammenti bioattivi, recettori di membrana come le integrine ⁶¹⁹ e le lipoproteine ⁶²⁰.

Glycosaminoglycans and Glycosaminoglycan Mimetics in Cancer and Inflammation.
Int J Mol Sci. 2019 Apr 22;20(8):1963. doi: 10.3390/ijms20081963.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6514582/>

Vitale D, Kumar Katakam S, Greve B, Jang B, Oh ES, Alaniz L, Götte M.
Proteoglycans and glycosaminoglycans as regulators of cancer stem cell function and therapeutic resistance.
FEBS J. 2019 Aug;286(15):2870-2882. doi: 10.1111/febs.14967.
<https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/febs.14967>

⁶¹⁴ Johnson P, Arif AA, Lee-Sayer SSM, Dong Y.
Hyaluronan and its interactions with immune cells in the healthy and inflamed lung.
Front Immunol. 2018 Nov 29;9:2787. doi: 10.3389/fimmu.2018.02787.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6281886/>

⁶¹⁵ Saied-Santiago K, Bülow HE.
Diverse roles for glycosaminoglycans in neural patterning.
Dev Dyn. 2018 Jan;247(1):54-74. doi: 10.1002/dvdy.24555.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5866094/>

⁶¹⁶ Quittot N, Sebastiao M, Bourgault S.
Modulation of amyloid assembly by glycosaminoglycans: from mechanism to biological significance.
Biochem Cell Biol. 2017 Jun;95(3):329-337. doi: 10.1139/bcb-2016-0236.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28177755/>

Nishitsuji K, Uchimura K.
Sulfated glycosaminoglycans in protein aggregation diseases.
Glycoconj J. 2017 Aug;34(4):453-466. doi: 10.1007/s10719-017-9769-4.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28401373/>

⁶¹⁷ Aquino RS, Park PW.
Glycosaminoglycans and infection.
Front Biosci (Landmark Ed). 2016 Jun 1;21(6):1260-77. doi: 10.2741/4455.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4975577/>

⁶¹⁸ Monneau Y, Arenzana-Seisdedos F, Lortat-Jacob H.
The sweet spot: how GAGs help chemokines guide migrating cells.
J Leukoc Biol. 2016 Jun;99(6):935-53. doi: 10.1189/jlb.3MR0915-440R.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26701132/>

Proudfoot AEI, Johnson Z, Bonvin P, Handel TM.
Glycosaminoglycan Interactions with Chemokines Add Complexity to a Complex System.
Pharmaceuticals (Basel). 2017 Aug 9;10(3):70. doi: 10.3390/ph10030070. PMID: 28792472; PMCID: PMC5620614.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5620614/>

⁶¹⁹ Vorup-Jensen T, Chi L, Gjelstrup LC, Jensen UB, Jewett CA, Xie C, Shimaoka M, Linhardt RJ, Springer TA.
Binding between the integrin alphaXbeta2 (CD11c/CD18) and heparin.
J Biol Chem. 2007 Oct 19;282(42):30869-77. doi: 10.1074/jbc.M706114200.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4142650/>

Faye C, Moreau C, Chautard E, Jetne R, Fukai N, Ruggiero F, Humphries MJ, Olsen BR, Ricard-Blum S.
Molecular interplay between endostatin, integrins, and heparan sulfate.
J Biol Chem. 2009 Aug 14;284(33):22029-22040. doi: 10.1074/jbc.M109.002840.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2755927/>

⁶²⁰ Ma Z, Mao C, Jia Y, Fu Y, Kong W.
Extracellular matrix dynamics in vascular remodeling.
Am J Physiol Cell Physiol. 2020 Sep 1;319(3):C481-C499. doi: 10.1152/ajpcell.00147.2020.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7509265/>

Olsson U, Ostergren-Lundén G, Moses J.
Glycosaminoglycan-lipoprotein interaction.
Glycoconj J. 2001 Oct;18(10):789-97. doi: 10.1023/a:1021155518464.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12441668/>

I GAG si legano anche a numerosi agenti patogeni ⁶²¹, inclusi virus ⁶²², batteri ⁶²³, parassiti ⁶²⁴ e funghi. ⁶²⁵ L'interazione dell'HS con un certo numero di virus contribuisce al loro legame alle cellule ospiti o alla loro maggiore concentrazione sulla superficie cellulare, mentre gli HS-proteoglicani possono fungere da recettori di ingresso per alcuni virus. ⁶²⁶

⁶²¹ Aquino RS, Park PW.

Glycosaminoglycans and infection.

Front Biosci (Landmark Ed). 2016 Jun 1;21(6):1260-77. doi: 10.2741/4455.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4975577/>

Aquino RS, Lee ES, Park PW.

Diverse functions of glycosaminoglycans in infectious diseases.

Prog Mol Biol Transl Sci. 2010;93:373-94. doi: 10.1016/S1877-1173(10)93016-0.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20807653/>

Kamhi E, Joo EJ, Dordick JS, Linhardt RJ.

Glycosaminoglycans in infectious disease.

Biol Rev Camb Philos Soc. 2013 Nov;88(4):928-43. doi: 10.1111/brv.12034.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23551941/>

Jinno A, Park PW.

Role of glycosaminoglycans in infectious disease.

Methods Mol Biol. 2015;1229:567-85. doi: 10.1007/978-1-4939-1714-3_45.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4624626/>

⁶²² Ströh LJ, Stehle T.

Glycan Engagement by Viruses: Receptor Switches and Specificity.

Annu Rev Virol. 2014 Nov;1(1):285-306. doi: 10.1146/annurev-virology-031413-085417.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26958723/>

Dietrich MH, Harprecht C, Stehle T.

The bulky and the sweet: How neutralizing antibodies and glycan receptors compete for virus binding.

Protein Sci. 2017 Dec;26(12):2342-2354. doi: 10.1002/pro.3319.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5699497/>

⁶²³ García B, Merayo-Llodes J, Martín C, Alcalde I, Quirós LM, Vazquez F.

Surface Proteoglycans as Mediators in Bacterial Pathogens Infections.

Front Microbiol. 2016 Feb 24;7:220. doi: 10.3389/fmicb.2016.00220.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4764700/>

⁶²⁴ Merida-de-Barros DA, Chaves SP, Belmiro CLR, Wanderley JLM.

Leishmaniasis and glycosaminoglycans: a future therapeutic strategy?

Parasit Vectors. 2018 Oct 3;11(1):536. doi: 10.1186/s13071-018-2953-y.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6171297/>

Fatoux-Ardore M, Peysselon F, Weiss A, Bastien P, Pratlong F, Ricard-Blum S.

Large-scale investigation of Leishmania interaction networks with host extracellular matrix by surface plasmon resonance imaging.

Infect Immun. 2014 Feb;82(2):594-606. doi: 10.1128/IAI.01146-13. Epub 2013 Nov 25. Erratum in: Infect Immun. 2014 Apr;82(4):1741.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3911396/>

⁶²⁵ Aquino RS, Park PW.

Glycosaminoglycans and infection.

Front Biosci (Landmark Ed). 2016 Jun 1;21(6):1260-77. doi: 10.2741/4455.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4975577/>

Jinno A, Park PW.

Role of glycosaminoglycans in infectious disease.

Methods Mol Biol. 2015;1229:567-85. doi: 10.1007/978-1-4939-1714-3_45.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4624626/>

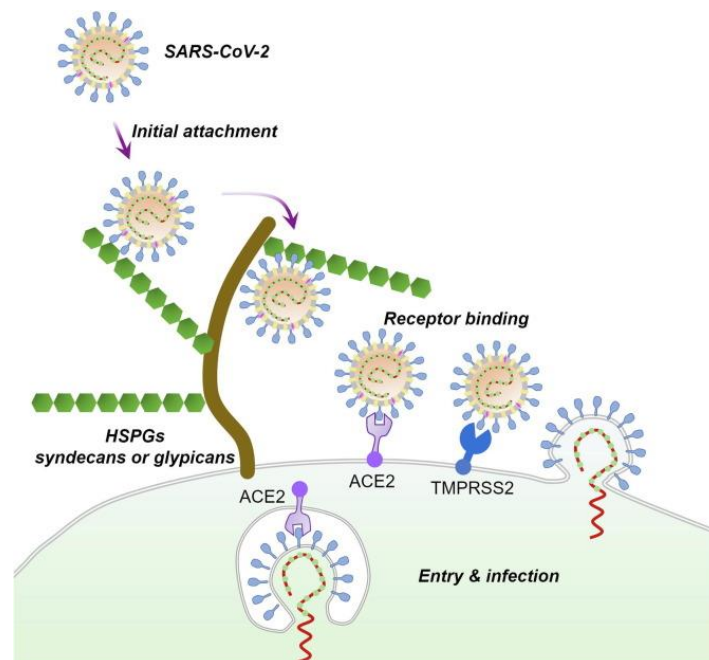
⁶²⁶ Cagno V, Tseligka ED, Jones ST, Tapparel C.

Heparan Sulfate Proteoglycans and Viral Attachment: True Receptors or Adaptation Bias?

Viruses. 2019 Jul 1;11(7):596. doi: 10.3390/v11070596.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6669472/>

È stato recentemente riportato che l'HP si lega alla glicoproteina spike sia monomerica che trimerica del SARS-CoV-2. L'interazione tra HP e la proteina Spike S1 SARS-CoV-2 è mediata dal dominio di legame del recettore della proteina.⁶²⁷



⁶²⁷ Möller S, Theiß J, Deinert TIL, Golat K, Heinze J, Niemeyer D, Wyrwa R, Schnabelrauch M, Bogner E. High-Sulfated Glycosaminoglycans Prevent Coronavirus Replication. *Viruses*. 2022 Feb 17;14(2):413. doi: 10.3390/v14020413. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8877876/>

Mycroft-West CJ, et al. Heparin Inhibits Cellular Invasion by SARS-CoV-2: Structural Dependence of the Interaction of the Spike S1 Receptor-Binding Domain with Heparin. *Thromb Haemost*. 2020 Dec;120(12):1700-1715. doi: 10.1055/s-0040-1721319. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7869224/>

Clausen TM, et al. SARS-CoV-2 Infection Depends on Cellular Heparan Sulfate and ACE2. *Cell*. 2020 Nov 12;183(4):1043-1057.e15. doi: 10.1016/j.cell.2020.09.033. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7489987/>

West, Dunhao Su, et al. The 2019 coronavirus (SARS-CoV-2) surface protein (Spike) S1 Receptor Binding Domain undergoes conformational change upon heparin binding. Courtney Mycroft- bioRxiv 2020.02.29.971093; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.02.29.971093> <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.02.29.971093v2.full.pdf>

Kalra RS, Kandimalla R. Engaging the spikes: heparan sulfate facilitates SARS-CoV-2 spike protein binding to ACE2 and potentiates viral infection. *Signal Transduct Target Ther*. 2021 Jan 29;6(1):39. doi: 10.1038/s41392-021-00470-1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7844799/>

Paiardi G, Richter S, Oreste P, Urbinati C, Rusnati M, Wade RC. The binding of heparin to spike glycoprotein inhibits SARS-CoV-2 infection by three mechanisms. *J Biol Chem*. 2022 Feb;298(2):101507. doi: 10.1016/j.jbc.2021.101507. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8683219/>

Kim SY, Jin W, Sood A, Montgomery DW, Grant OC, Fuster MM, Fu L, Dordick JS, Woods RJ, Zhang F, Linhardt RJ. Characterization of heparin and severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-CoV-2) spike glycoprotein binding interactions. *Antiviral Res*. 2020 Sep;181:104873. doi: 10.1016/j.antiviral.2020.104873. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7347485/>

Schuurs ZP, et al. Evidence of a putative glycosaminoglycan binding site on the glycosylated SARS-CoV-2 spike protein N-terminal domain. *Comput Struct Biotechnol J*. 2021;19:2806-2818. doi: 10.1016/j.csbj.2021.05.002. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8093007/>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7816574/>

Un possibile meccanismo per l'ingresso e l'infezione da SARS-CoV-2. Nella fase iniziale del processo di infezione, SARS-CoV-2 può prima interagire con gli HSPG sulla superficie delle cellule sensibili utilizzando la proteina S che sporge dalla particella del virus. Questo attacco iniziale può promuovere il successivo legame del virus con il recettore di ingresso ad alta affinità ACE2. Le proteasi transmembrana serina 2 (TMPRSS2) sulla superficie della cellula ospite e altre proteasi della cellula ospite possono aiutare nell'ingresso del virus scindendo la proteina S nei siti S1/S2 e/o S2'.

Le interazioni glicaminoglicani-proteine specifiche ⁶²⁸ e con proteine microbiche, sono oggetto di intensi studi in quanto importanti bersagli di interventi farmacologici. ⁶²⁹

Come si approfondirà in seguito, il legame dell'eparina accelera l'aggregazione delle proteine amiloidi patologiche presenti nel cervello, e Idrees et al ⁶³⁰ hanno dimostrato con studi di docking molecolare che il SARS-CoV-2 S1 RBD si lega a un certo numero di proteine leganti l'eparina inclini all'aggregazione tra cui A β , α -sinucleina, tau, prioni e TDP-43 RRM.

Queste interazioni suggeriscono che il sito di legame dell'eparina sulla proteina S1 potrebbe favorire il legame delle proteine amiloidi alla superficie virale e quindi potrebbe avviare l'aggregazione di queste proteine e di conseguenza portare alla neurodegenerazione nel cervello.

Glicosaminoglicani e microbiota intestinale

Un'altra funzione dei glicosaminoglicani molto importante è legata alla loro presenza nel colon umano in forme libere e come parte dei proteoglicani.

Il loro utilizzo è fondamentale per la colonizzazione e la proliferazione dei batteri intestinali e anche per la salute degli ospiti. Quindi, è essenziale determinare i membri dei batteri intestinali che degradano i GAG e il loro macchinario enzimatico per la depolimerizzazione dei GAG. ⁶³¹

⁶²⁸ Almer J, Gesslbauer B, Kungl AJ.

Therapeutic strategies to target microbial protein-glycosaminoglycan interactions. *Biochem Soc Trans.* 2018 Dec 17;46(6):1505-1515. doi: 10.1042/BST20170485. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30381333/>

Vallet SD, Berthollier C, Ricard-Blum S.

The glycosaminoglycan interactome 2.0. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2022 Jun 1;322(6):C1271-C1278. doi: 10.1152/ajpcell.00095.2022. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35544698/>

Shi D, Sheng A, Chi L.

Glycosaminoglycan-Protein Interactions and Their Roles in Human Disease. *Front Mol Biosci.* 2021 Mar 9;8:639666. doi: 10.3389/fmolb.2021.639666. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7985165/>

Raman R, Sasisekharan V, Sasisekharan R.

Structural insights into biological roles of protein-glycosaminoglycan interactions. *Chem Biol.* 2005 Mar;12(3):267-77. doi: 10.1016/j.chembiol.2004.11.020. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15797210/>

Kogut MM, Marcisz M, Samsonov SA.

Modeling glycosaminoglycan-protein complexes. *Curr Opin Struct Biol.* 2022 Apr;73:102332. doi: 10.1016/j.sbi.2022.102332. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35152187/>

⁶²⁹ Almer J, Gesslbauer B, Kungl AJ.

Therapeutic strategies to target microbial protein-glycosaminoglycan interactions. *Biochem Soc Trans.* 2018 Dec 17;46(6):1505-1515. doi: 10.1042/BST20170485. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30381333/>

⁶³⁰ Idrees D, Kumar V.

SARS-CoV-2 spike protein interactions with amyloidogenic proteins: Potential clues to neurodegeneration. *Biochem Biophys Res Commun.* 2021 May 21;554:94-98. doi: 10.1016/j.bbrc.2021.03.100. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7988450/>

⁶³¹ Rawat PS, Seyed Hameed AS, Meng X, Liu W.

Utilization of glycosaminoglycans by the human gut microbiota: participating bacteria and their enzymatic machineries. *Gut Microbes.* 2022 Jan-Dec;14(1):2068367. doi: 10.1080/19490976.2022.2068367. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9067506/>

Koropatkin NM, Cameron EA, Martens EC.

Il microbiota intestinale umano (HGM) è ora considerato uno degli "organi" metabolicamente più attivi dell'ospite umano⁶³² e contribuisce alla salute umana in numerosi modi.⁶³³

L'HGM catabolizza collettivamente la fibra indigeribile e diversi glicani dell'ospite per produrre acidi grassi a catena corta (SCFA).⁶³⁴

In particolare, i glicani del colon, inclusi i carboidrati della mucosa, i glicosaminoglicani (GAG) e il glicosfingolipide, forniscono una fonte continua di nutrimento per l'HGM.⁶³⁵

How glycan metabolism shapes the human gut microbiota.
Nat Rev Microbiol. 2012 Apr 11;10(5):323-35. doi: 10.1038/nrmicro2746.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4005082/>

Tuncil YE, Xiao Y, Porter NT, Reuhs BL, Martens EC, Hamaker BR.
Reciprocal Prioritization to Dietary Glycans by Gut Bacteria in a Competitive Environment Promotes Stable Coexistence.
mBio. 2017 Oct 10;8(5):e01068-17. doi: 10.1128/mBio.01068-17.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5635687/>

Eilam O, Zarecki R, Oberhardt M, Ursell LK, Kupiec M, Knight R, Gophna U, Ruppin E.
Glycan degradation (GlyDeR) analysis predicts mammalian gut microbiota abundance and host diet-specific adaptations.
mBio. 2014 Aug 12;5(4):e01526-14. doi: 10.1128/mBio.01526-14.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4145686/>

Ouwerkerk JP, de Vos WM, Belzer C.
Glycobiome: bacteria and mucus at the epithelial interface.
Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2013 Feb;27(1):25-38. doi: 10.1016/j.bpg.2013.03.001.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23768550/>

⁶³² Baquero F, Nombela C.
The microbiome as a human organ.
Clin Microbiol Infect. 2012 Jul;18 Suppl 4:2-4. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03916.x.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03916.x>

Yadav M, Verma MK, Chauhan NS.
A review of metabolic potential of human gut microbiome in human nutrition.
Arch Microbiol. 2018 Mar;200(2):203-217. doi: 10.1007/s00203-017-1459-x
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29188341/>

⁶³³ Louis P, Hold GL, Flint HJ.
The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer.
Nat Rev Microbiol. 2014 Oct;12(10):661-72. doi: 10.1038/nrmicro3344.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25198138/>

⁶³⁴ Cameron EA, Sperandio V.
Frenemies: Signaling and Nutritional Integration in Pathogen-Microbiota-Host Interactions.
Cell Host Microbe. 2015 Sep 9;18(3):275-84. doi: 10.1016/j.chom.2015.08.007.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4567707/>

Cockburn DW, Koropatkin NM.
Polysaccharide Degradation by the Intestinal Microbiota and Its Influence on Human Health and Disease.
J Mol Biol. 2016 Aug 14;428(16):3230-3252. doi: 10.1016/j.jmb.2016.06.021.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27393306/>

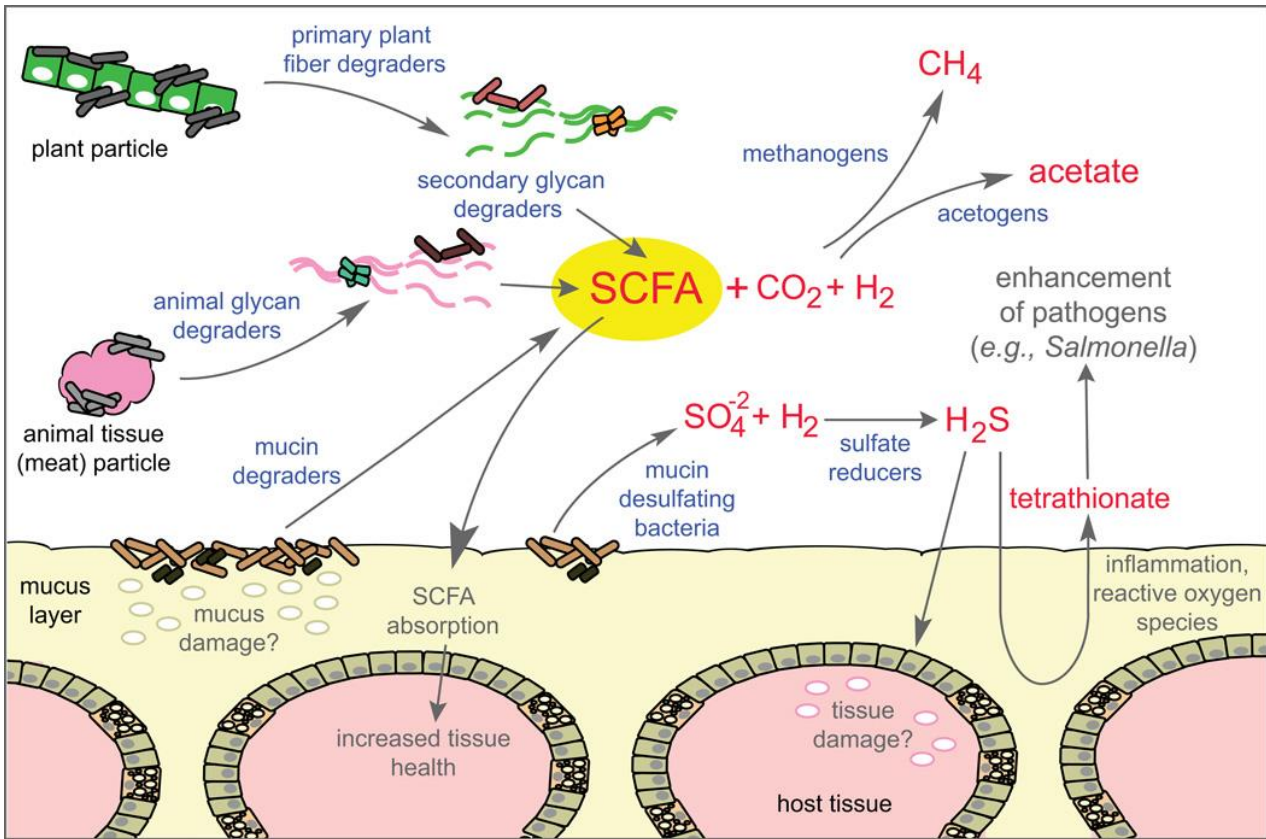
Liu F, Zhang N, Li Z, Wang X, Shi H, Xue C, Li RW, Tang Q.
Chondroitin sulfate disaccharides modified the structure and function of the murine gut microbiome under healthy and stressed conditions.
Sci Rep. 2017 Jul 28;7(1):6783. doi: 10.1038/s41598-017-05860-6.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5533764/>

Pan L, Ai X, Fu T, Ren L, Shang Q, Li G, Yu G.
In vitro fermentation of hyaluronan by human gut microbiota: Changes in microbiota community and potential degradation mechanism.
Carbohydr Polym. 2021 Oct 1;269:118313. doi: 10.1016/j.carbpol.2021.118313.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34294327/>

Coker JK, Moyne O, Rodionov DA, Zengler K.
Carbohydrates great and small, from dietary fiber to sialic acids: How glycans influence the gut microbiome and affect human health.
Gut Microbes. 2021 Jan-Dec;13(1):1-18. doi: 10.1080/19490976.2020.1869502.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7899658/>

⁶³⁵ Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI.
How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine.
Annu Rev Nutr. 2002;22:283-307. doi: 10.1146/annurev.nutr.22.011602.092259.

Al contrario, i carboidrati nella dieta possono variare in tipi e quantità in base alla dieta e ai tempi del pasto.⁶³⁶



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4005082/>
 Microhabitat glicani e catene alimentari nell'intestino

Un'illustrazione dei modi in cui si pensa che diversi microrganismi intestinali interagiscano durante l'elaborazione di vari substrati di glicani. Il digesto derivato dalla parete cellulare vegetale o dalle particelle di carne sarà ricco di glicani specifici della fonte, come cellulosa, emicellulosa e pectina (pianta) o glicosaminoglicani e glicoproteine cellulari (carne). È probabile che questi tipi di nutrienti entrino nell'intestino distale come forme particellari che verranno attaccate dai degradatori primari di glicani (es. specie *Roseburia*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Ruminococcus* e *Bifidobacterium*) che sono in grado di legarsi direttamente a queste particelle insolubili e di digerire i loro glicani. Dopo la degradazione iniziale delle particelle contenenti glicano, frammenti di glicani più solubili possono essere digeriti da altri batteri, che contribuiscono al pool liberato di prodotti di fermentazione SCFA derivati da degradatori di glicani primari e secondari. È stata proposta una catena alimentare simile di degradatori primari e secondari nello strato di muco; per cui alcune specie primarie sono in grado di degradare direttamente le glicoproteine della mucina ad alto peso molecolare e altre sono ottimizzate per mirare ai prodotti oligosaccaridi risultanti. La fermentazione dei glicani batterici è potenziata dalla rimozione dei consumatori di H₂ a valle, che convertono questo gas in metano, acetato o idrogeno solforato a seconda dei tipi di microrganismi presenti. Quest'ultima via richiede anche solfato libero, che può essere derivato da molti prodotti alimentari, ma anche dalla degradazione di proteine animali, glicani solfati abbondanti nei tessuti animali (es. condroitin solfato) o nel muco. L'H₂S risultante è tossico per le cellule ospiti, ma viene prontamente

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12055347/>

Pudlo NA, Urs K, Kumar SS, German JB, Mills DA, Martens EC.
 Symbiotic Human Gut Bacteria with Variable Metabolic Priorities for Host Mucosal Glycans.
mBio. 2015 Nov 10;6(6):e01282-15. doi: 10.1128/mBio.01282-15.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4659458/>

Johansson ME, Phillipson M, Petersson J, Velcich A, Holm L, Hansson GC.
 The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Sep 30;105(39):15064-9. doi: 10.1073/pnas.0803124105.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2567493/>

⁶³⁶ Vogt SL, Peña-Díaz J, Finlay BB.
 Chemical communication in the gut: Effects of microbiota-generated metabolites on gastrointestinal bacterial pathogens.
Anaerobe. 2015 Aug;34:106-15. doi: 10.1016/j.anaerobe.2015.05.002. Epub 2015 May 7. PMID: 25958185.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25958185/>

Li Z, Quan G, Jiang X, Yang Y, Ding X, Zhang D, Wang X, Hardwidge PR, Ren W, Zhu G.
 Effects of metabolites derived from gut microbiota and hosts on pathogens.
Front Cell Infect Microbiol. 2018 Sep 14;8:314. doi: 10.3389/fcimb.2018.00314.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6152485/>

metabolizzato e disintossicato dal tessuto del colon per formare tiosolfato. Nel contesto dell'infiammazione della mucosa, il tiosolfato può essere convertito in tetrionato tramite specie reattive dell'ossigeno, un evento che è stato recentemente legato al potenziamento metabolico del patogeno intestinale *Salmonella enterica* sottospecie *typhimurium*.

Poiché questi prodotti di degradazione sono anche bioattivi, il loro utilizzo disordinato potrebbe essere dannoso.⁶³⁷ Inoltre, è stato dimostrato che il contenuto totale dei singoli GAG subisce un'alterazione nei disturbi infiammatori intestinali (IBD).⁶³⁸

I GAG-PG sono essenziali per lo sviluppo del tessuto intestinale durante l'embriogenesi,⁶³⁹ e vari HSPG e CSPG sono coinvolti nella modulazione della forma cellulare, della motilità cellulare, dell'inibizione del contatto e della morfogenesi intestinale.⁶⁴⁰

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4005082/>

Utilizzo del glicano lungo la lunghezza dell'intestino e dei suoi potenziali effetti sulla salute

Uno schema dell'ileo e del colon umani codificato a colori per riflettere potenziali gradienti di glicani (schematizzati in base alla barra dei colori in basso). La solubilità e la digeribilità dei glicani alimentari che transitano nel lume sono variabili e quindi ogni glicano è probabilmente digerito a una velocità diversa. Anche lo spessore del muco intestinale segue un gradiente longitudinale lungo l'intestino, ma può essere reciproco a quello della digeribilità dei glicani, con lo spessore maggiore presente nel colon sigmoideo e nel retto dove è probabile che siano presenti per lo più glicani insolubili/indigeribili. Gli inserti a sinistra ea destra mostrano schemi delle nicchie luminali e mucose nell'ileo e nel colon distale (sigmoideo). Nell'ileo, lo strato di muco è relativamente sottile, il tempo di transito del contenuto è più rapido ed è probabile che i batteri prendano di mira i glicani più solubili e rapidamente digeribili, come l'inulina e diverse catene laterali di oligosaccaridi, come α -arabinani e β -galattani, che sono comunemente attaccati alla spina dorsale della pectina (ramnogalacturonan). Al contrario, il colon distale ha uno strato di muco molto più spesso, il tempo di transito è più lento ed è probabile che i glicani residui che alimentano la crescita batterica siano meno solubili e quindi impieghino più tempo per degradarsi. Si noti la presenza di strati di muco interni ed esterni, con colonizzazione batterica in gran parte presente solo nello strato esterno. Una possibile ragione per l'aumento dello spessore del muco nell'intestino distale potrebbe essere quella di proteggere l'epitelio dall'esposizione più prolungata a un numero maggiore di batteri, che hanno più tempo per proliferare data la velocità di transito più lenta. È ampiamente accettato che una maggiore assunzione di fibre nella dieta sia benefica per la salute del colon. Alla luce di questa idea, è interessante notare che l'incidenza dei tumori del colon in diversi paesi sviluppati del Nord America, Europa e Asia mostra una diminuzione dell'abbondanza nel colon distale e aumenta nelle regioni più prossimali negli ultimi decenni. Una spiegazione offerta per questo fenomeno riguarda il cambiamento delle abitudini alimentari in queste società, in particolare la riduzione dell'assunzione di fibre e l'aumento del consumo di grassi e proteine animali. Questa tendenza potrebbe alterare il microbiota o il suo metabolismo nelle regioni più distali, portando alla cancerogenesi attraverso diversi possibili meccanismi (tempo di transito ridotto, aumento della produzione di metaboliti tossici o diminuzione della produzione di metaboliti protettivi come il butirrato).

⁶³⁷ Desai MS, et al

A dietary fiber-deprived gut microbiota degrades the colonic mucus barrier and enhances pathogen susceptibility.

Cell. 2016 Nov 17;167(5):1339-1353.e21. doi: 10.1016/j.cell.2016.10.043.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5131798/>

Tao Liao, Yan-Ping Chen, Li-Li Tan, Chang-Qing Li, Qi Wang, Shui-Qing Huang, Xin-An Huang, Qin Xu, Qing-Ping Zeng

Chondroitin sulfate flourishes gut sulfatase-secreting bacteria to damage mucus layers, leak bacterial debris, and trigger inflammatory lesions in mice
bioRxiv 145714; doi: <https://doi.org/10.1101/145714>

<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/145714v1.full.pdf>

⁶³⁸ Murch SH, MacDonald TT, Walker-Smith JA, Levin M, Lionetti P, Klein NJ.

Disruption of sulphated glycosaminoglycans in intestinal inflammation.

Lancet. 1993 Mar 20;341(8847):711-4. doi: 10.1016/0140-6736(93)90485-y.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8095623/>

⁶³⁹ Newgreen DF, Hartley L.

Extracellular matrix and adhesive molecules in the early development of the gut and its innervation in normal and spotting lethal rat embryos.

Acta Anat (Basel). 1995;154(4):243-60. doi: 10.1159/000147776.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8773711/>

⁶⁴⁰ Simon-Assmann P, Bouziges F, Vigny M, Kedinger M.

Origin and deposition of basement membrane heparan sulfate proteoglycan in the developing intestine.

J Cell Biol. 1989 Oct;109(4 Pt 1):1837-48. doi: 10.1083/jcb.109.4.1837.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2115786/>

Oshiro M, Ono K, Suzuki Y, Ota H, Katsuyama T, Mori N.

Immunohistochemical localization of heparan sulfate proteoglycan in human gastrointestinal tract.

Histochem Cell Biol. 2001 May;115(5):373-80. doi: 10.1007/s004180100271.

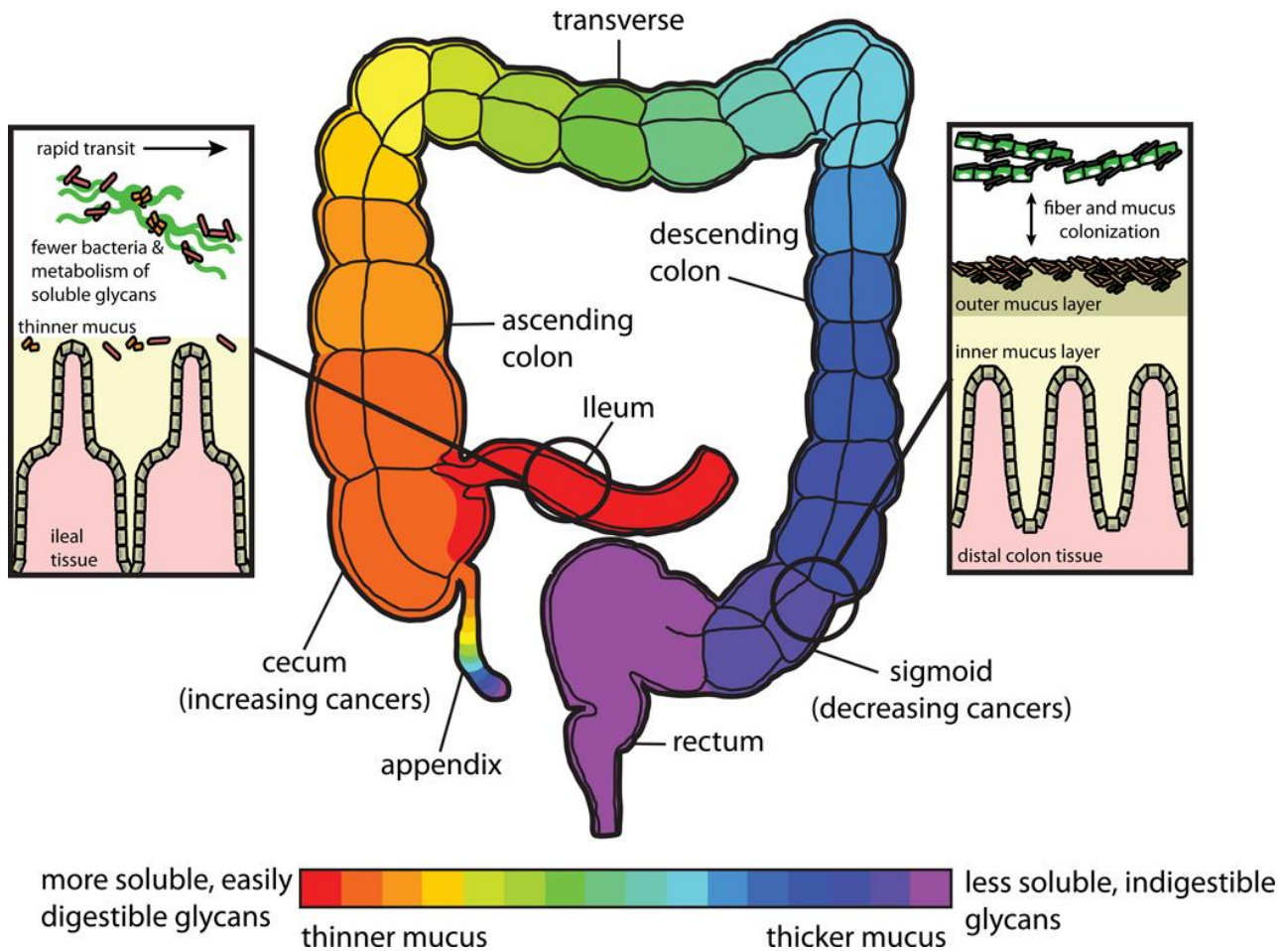
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11449885/>

Tang F, Lord MS, Stallcup WB, Whitelock JM.

Cell surface chondroitin sulphate proteoglycan 4 (CSPG4) binds to the basement membrane heparan sulphate proteoglycan, perlecan, and is involved in cell adhesion.

J Biochem. 2018 May 1;163(5):399-412. doi: 10.1093/jb/mvy008.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5905647/>



La disregolazione nella produzione e nel legame di questi proteoglicani alla membrana basale ha dimostrato di essere oncogenica nel colon.⁶⁴¹ I topi carenti dell'enzima richiesto per l'inizio della solfatazione dell'HS hanno mostrato un'istologia del colon alterata e un aumento del tasso di apoptosi dell'epitelio del colon.⁶⁴² Un'altra importante funzione dei GAG-PG è il mantenimento della funzione della barriera intestinale.⁶⁴³ L'omeostasi della membrana viene ottenuta mediante la modulazione della rigenerazione epiteliale

⁶⁴¹ Tang F, Lord MS, Stallcup WB, Whitelock JM. Cell surface chondroitin sulphate proteoglycan 4 (CSPG4) binds to the basement membrane heparan sulphate proteoglycan, perlecan, and is involved in cell adhesion. *J Biochem.* 2018 May 1;163(5):399-412. doi: 10.1093/jb/mvy008. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5905647/>

⁶⁴² Jao TM, Li YL, Lin SW, Tzeng ST, Yu IS, Yen SJ, Tsai MH, Yang YC. Alteration of colonic epithelial cell differentiation in mice deficient for glucosaminyl N-deacetylase/N-sulfotransferase 4. *Oncotarget.* 2016 Dec 20;7(51):84938-84950. doi: 10.18632/oncotarget.12915. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5356710/>

⁶⁴³ Bode L, Salvestrini C, Park PW, Li JP, Esko JD, Yamaguchi Y, Murch S, Freeze HH. Heparan sulfate and syndecan-1 are essential in maintaining murine and human intestinal epithelial barrier function. *J Clin Invest.* 2008 Jan;118(1):229-38. doi: 10.1172/JCI32335. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2117765/>

Dias AM, Pereira MS, Padrão NA, Alves I, Marcos-Pinto R, Lago P, Pinho SS. Glycans as critical regulators of gut immunity in homeostasis and disease. *Cell Immunol.* 2018 Nov;333:9-18. doi: 10.1016/j.cellimm.2018.07.007. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30049413/>

Brazil JC, Parkos CA. Finding the sweet spot: glycosylation mediated regulation of intestinal inflammation. *Mucosal Immunol.* 2022 Feb;15(2):211-222. doi: 10.1038/s41385-021-00466-8. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8591159/>

attraverso HSPGs⁶⁴⁴ e HA⁶⁴⁵ e la perdita della funzione di barriera è direttamente associata all'enteropatia con perdita di proteine, colite e IBD.⁶⁴⁶

Proteoglicani

Tutti i GAG, ad eccezione dell'HA (ialuronano), si trovano legati in modo covalente a specifiche proteine come proteoglicani. I modelli di espressione spaziale e temporale dei proteoglicani sono dettati principalmente dalla proteina centrale.

Un proteoglicano è costituito da una proteina centrale e da una o più catene GAG attaccate in modo covalente di polisaccaridi non ramificati composti da unità disaccaridiche ripetute. Nella maggior parte dei proteoglicani, i GAG costituiscono più del 50% della massa molecolare totale e mediano le funzioni biologiche.

La biosintesi del GAG viene avviata con la formazione di un legame covalente tra l'estremità riducente di un residuo xilosile (Xil) e la parte idrossile di alcuni residui di serina all'interno di una sequenza dipeptidica Ser-Gly spesso ripetuta due o più volte nella proteina centrale.

Questo è seguito dalla formazione del dominio di legame -GlcA-Gal-Gal-Xil tetrasaccaride (dove GlcA è acido glucuronico e Gal è galattosio), la polimerizzazione di una caratteristica unità disaccaridica e la modifica della catena polisaccaridica di nuova sintesi, catalizzata ad ogni passaggio da enzimi specifici.

I GAG sono definiti dalla natura (composizione e legame chimico) dell'unità disaccaridica ripetitiva, che comprende un'esosamina [ad es. N-acetilglucosamina (GlcNAc), N-acetilgalattosamina (GalNAc)] e acido uronico [es. GlcA, acido iduronico (IdoA)].

L'unità disaccaride caratteristica di **HS/eparina** è $\text{GlcA}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\alpha 1 \rightarrow 4$, del **CS** è $\text{GlcA}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow 4$, del **dermatan solfato (DS)** è $\text{IdoA}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow 4$, del **cheratan solfato (KS)** è $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow 3$ e dello **ialuronano (HA)** è $\text{GlcA}\beta 1 \rightarrow 3\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4$.

Fatta eccezione per HA, i GAG sono modificati nel complesso del Golgi da diverse reazioni di solfatazione ed epimerizzazione. Poiché le reazioni di polimerizzazione e modifica non si completano, il processo biosintetico genera una gamma eccezionalmente diversificata di strutture GAG.⁶⁴⁷

⁶⁴⁴ Fröhling M, et al
Syndecan-4 Modulates Epithelial Gut Barrier Function and Epithelial Regeneration in Experimental Colitis.
Inflamm Bowel Dis. 2018 Nov 29;24(12):2579-2589. doi: 10.1093/ibd/izy248.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30053064/>

⁶⁴⁵ Zheng L, Riehl TE, Stenson WF.
Regulation of colonic epithelial repair in mice by Toll-like receptors and hyaluronic acid.
Gastroenterology. 2009 Dec;137(6):2041-51. doi: 10.1053/j.gastro.2009.08.055.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2789856/>

⁶⁴⁶ Suzuki K, et al
Pivotal Role of Carbohydrate Sulfotransferase 15 in Fibrosis and Mucosal Healing in Mouse Colitis.
PLoS One. 2016 Jul 13;11(7):e0158967. doi: 10.1371/journal.pone.0158967.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4943596/>

⁶⁴⁷ Bartlett AH, Park PW.
Proteoglycans in host-pathogen interactions: molecular mechanisms and therapeutic implications.
Expert Rev Mol Med. 2010 Feb 1;12:e5. doi: 10.1017/S1462399409001367.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4634875/>

Bernfield M, Götte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J, Zako M.
Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans.
Annu Rev Biochem. 1999;68:729-77. doi: 10.1146/annurev.biochem.68.1.729.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10872465/>

Park PW, Reizes O, Bernfield M.
Cell surface heparan sulfate proteoglycans: selective regulators of ligand-receptor encounters.
J Biol Chem. 2000 Sep 29;275(39):29923-6. doi: 10.1074/jbc.R000008200.
<https://doi.org/10.1074/jbc.R000008200>

Kreuger J, Spillmann D, Li JP, Lindahl U.
Interactions between heparan sulfate and proteins: the concept of specificity.
J Cell Biol. 2006 Jul 31;174(3):323-7. doi: 10.1083/jcb.200604035.

I proteoglicani, in particolare quelli che ospitano le catene HS strutturalmente diverse, si legano e regolano una moltitudine di molecole biologiche attraverso le loro catene GAG. L'elenco include fattori di crescita, citochine, chemochine, proteinasi, fattori antimicrobici, componenti ECM (extracellular matrix) e molti altri

648

Sebbene i proteoglicani della superficie cellulare possano fungere da recettori primari per alcuni ligandi, nella maggior parte dei casi i proteoglicani della superficie cellulare funzionano come corecettori che catturano i ligandi e facilitano l'incontro tra i ligandi e i rispettivi recettori di segnalazione.

Ciò vale anche per l'interazione dei proteoglicani con i patogeni microbici, in cui la maggior parte dei patogeni microbici che legano l'HS utilizzano gli HSPG sulla superficie cellulare come corecettori per facilitare la loro interazione con i recettori di internalizzazione secondari.

I proteoglicani possono anche regolare le interazioni proteina-proteina influenzando la stabilità, la conformazione e lo stato di oligomerizzazione del ligando o del recettore, e alcune adesine microbiche e fattori di virulenza secreti sovvertono questi meccanismi per potenziare le attività patogene.

Inoltre, i proteoglicani possono funzionare come molecole solubili perché possono essere rilasciati dalla superficie cellulare o dall'ECM mediante scissione proteolitica.

Una volta solubilizzati, i proteoglicani mostrano funzioni simili o distinte dalle loro controparti immobilizzate ed è noto che alcuni agenti patogeni batterici sfruttano i proteoglicani solubili per inibire i meccanismi di difesa dell'ospite.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4634875/>

Meccanismi dei proteoglicani nell'attaccamento, ingresso e diffusione microbica

(a) Maggiore attaccamento microbico e interiorizzazione. I patogeni utilizzano i proteoglicani come corecettori per aumentare la concentrazione del patogeno sulla superficie cellulare, facilitando il legame a specifici recettori secondari. Questo legame spesso provoca l'interiorizzazione dell'agente patogeno. **(b)** Funzione del fattore di virulenza potenziata. Il virus della vaccinazione produce il fattore di virulenza N1L dopo l'internalizzazione. N1L si lega al CSPG bamacan, con conseguente miglioramento della crescita virale in vitro e neurovirulenza in vivo. **(c)** Sequestro di cellule infette da parassiti. Il tessuto placentare esprime un CS-A (viola), che lega i globuli rossi infetti da *Plasmodium falciparum*, portando al loro sequestro e alle manifestazioni cliniche inclusa l'anemia. **(d)** Maggiore internalizzazione del fattore di virulenza. HIV Tat si lega agli HSPG della superficie cellulare e viene quindi interiorizzato dove può attivare la trascrizione. Abbreviazioni: CS-A, condroitin solfato A; CSPG, proteoglicano condroitin solfato; HIV, virus dell'immunodeficienza umana; HSPG, proteoglicano eparan solfato; globuli rossi, globuli rossi; Tat, transattivatore della trascrizione.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2064228/>

⁶⁴⁸ Sarkar A, Desai UR.

A Simple Method for Discovering Druggable, Specific Glycosaminoglycan-Protein Systems. Elucidation of Key Principles from Heparin/Heparan Sulfate-Binding Proteins.

PLoS One. 2015 Oct 21;10(10):e0141127. doi: 10.1371/journal.pone.0141127.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4619353/>

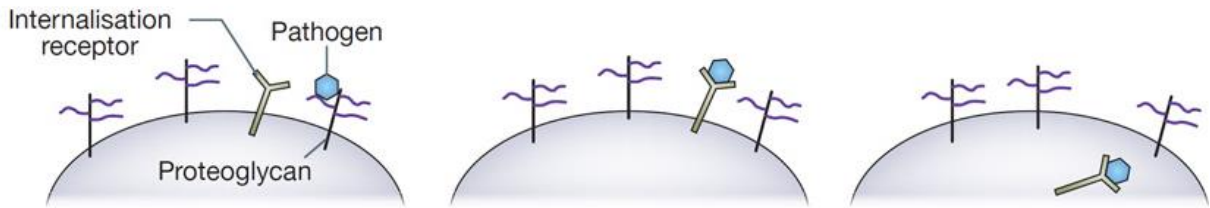
Weiss RJ, Esko JD, Tor Y.

Targeting heparin and heparan sulfate protein interactions.

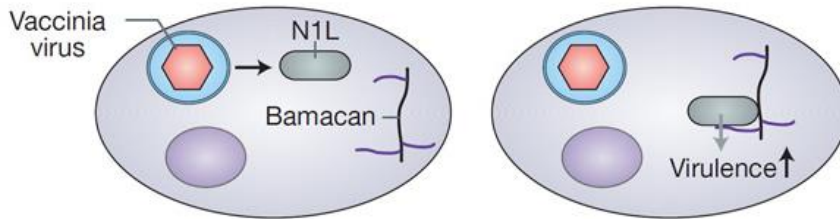
Org Biomol Chem. 2017 Jul 21;15(27):5656-5668. doi: 10.1039/c7ob01058c.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5567684/>

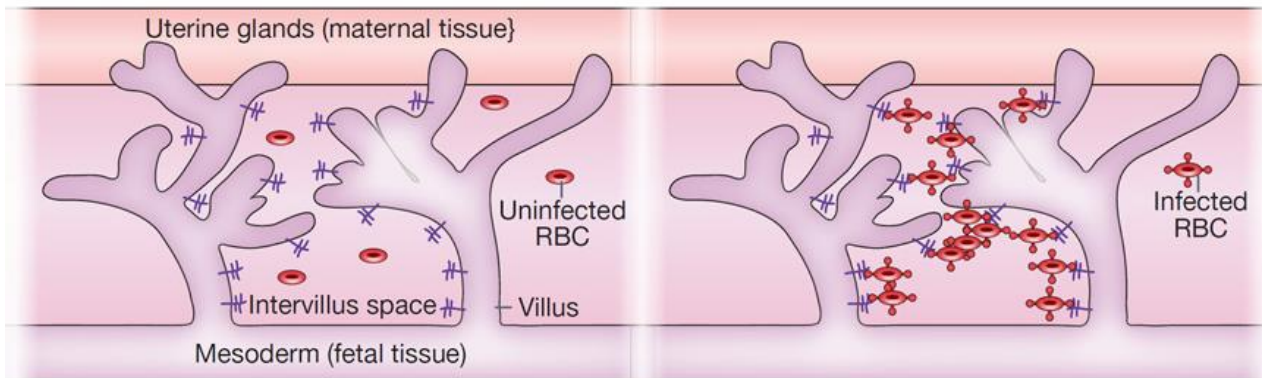
a Enhanced microbial attachment and internalisation



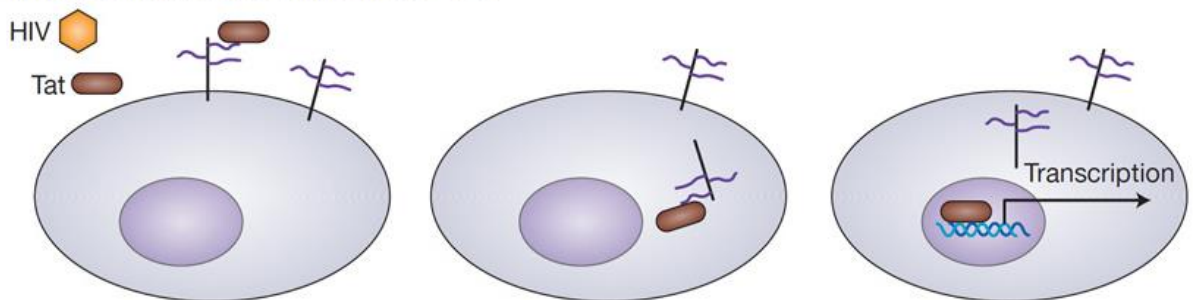
b Enhanced virulence factor function



c Sequestration of parasite-infected cells



d Enhanced virulence factor internalisation



Glicolipidi glicoconiuati

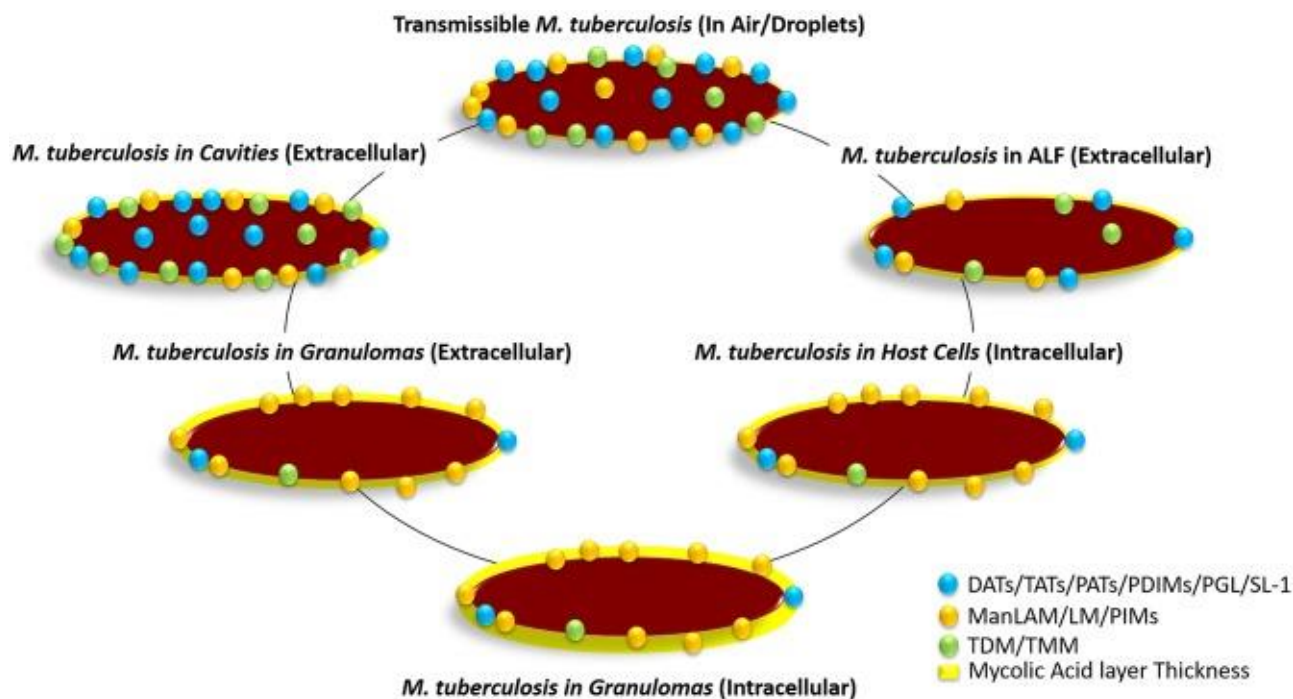
I glicolipidi sono oligosaccaridi coniugati a molecole lipidiche. I gangliosidi sono acido sialico contenente glicosfingolipidi, forme associate a zattere lipidiche sulla membrana cellulare esterna. Alcuni tipi cellulari possono avere foglietti della membrana esterna che sono costituiti quasi interamente da glicolipidi anziché da fosfolipidi.⁶⁴⁹

⁶⁴⁹ Schnaar RL, Suzuki A, Stanley P. Glycosphingolipids. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME, editors. Essentials of Glycobiology. 2nd ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. Chapter 10. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1909/>

L'orientamento spaziale dei glicani è importante perché il loro legame è spesso multivalente, coinvolgendo più contatti chimici nelle immediate vicinanze. Il raggruppamento dei glicani sulla superficie cellulare da parte dei glicolipidi può quindi avere importanti effetti funzionali.

Un esempio importante di patogeno che utilizza i glicolipidi per proteggersi dall'ospite è il *Mycobacterium tuberculosis*, il cui involucro cellulare si è evoluto nel tempo per rendere il batterio trasmissibile e adattabile all'ospite umano.

In questo contesto, l'involucro cellulare di *M. tuberculosis* è costituito da una barriera piena di lipidi, alcuni dei quali unici, che conferiscono al patogeno uno scudo contro i diversi ambienti dell'ospite che il micobatterio incontrerà nelle diverse fasi dell'infezione. Questa barriera lipidica è composta principalmente da glicolipidi che possono essere caratterizzati da tre diversi sottoinsiemi: glicolipidi contenenti trealosio, mannosio e 6-deossipiranosio.⁶⁵⁰



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6930167/>

Ipotetica distribuzione dei glicolipidi sulla superficie dell'involucro cellulare del batterio *M. tuberculosis* nelle diverse fasi dell'infezione. Si ritiene che il batterio trasmissibile contenga un gran numero di glicolipidi (DAT, TAT, PAT, SL-1, TMM, TDM, PDIMS, PIM, ecc.) sull'involucro cellulare che guida l'idrofobicità della superficie, che a sua volta ne favorisce la trasmissione attraverso l'aria. Dopo l'infezione e dopo aver raggiunto lo spazio alveolare, *M. tuberculosis* entra in contatto con il liquido di rivestimento alveolare (ALF; ipofase della mucosa polmonare). L'ALF contiene una serie di idrolasi omeostatiche che alterano in modo significativo la superficie dell'involucro cellulare di *M. tuberculosis* rimuovendo glicolipidi e lipoglicani, e quindi alterando in qualche modo l'idrofobicità della superficie cellulare e determinando come il batterio interagirà con le cellule ospiti alveolari. Dopo la fagocitosi da parte degli AM, è stato dimostrato che il batterio iperproduce PIM, oltre a passare a reti metaboliche come la beta-ossidazione, lo shunt di gliossilato e il ciclo inverso del metilcitrato. Questo interruttore metabolico all'interno delle cellule ospiti consente al batterio di scomporre gli acidi grassi e il colesterolo a catena lunga catturati e quelli dell'ospite per generare acetil-CoA e propionil-CoA, aumentando la sua produzione di acidi micolici a scapito della produzione di glicolipidi. Si ritiene che questo stato metabolico del batterio sia mantenuto negli stadi di latenza quando il batterio rimane intracellulare all'interno dei granulomi. Dopo la riattivazione, lo stato metabolico del batterio cambia nuovamente aumentando la produzione di glicolipidi a scapito della produzione di acidi micolici, ripristinando l'idrofobicità superficiale del batterio, pur rimanendo extracellulare all'interno dei granulomi. Questa idrofobicità della superficie batterica viene ulteriormente accentuata quando *M. tuberculosis* sfugge ai granulomi distrutti diventando extracellulare all'interno delle cavità, dove la distruzione idrolitica dei tessuti guidata dall'ospite facilita la fuga di *M. tuberculosis*.

⁶⁵⁰ Garcia-Vilanova A, Chan J, Torrelles JB.

Underestimated Manipulative Roles of Mycobacterium tuberculosis Cell Envelope Glycolipids During Infection.

Front Immunol. 2019 Dec 18;10:2909. doi: 10.3389/fimmu.2019.02909.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6930167/>

Lowary TL.

Twenty Years of Mycobacterial Glycans: Furanosides and Beyond.

Acc Chem Res. 2016 Jul 19;49(7):1379-88. doi: 10.1021/acs.accounts.6b00164.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4955529/>

nel flusso sanguigno e le vie aeree diventano nuovamente trasmissibili chiudendo il ciclo. Il numero relativo di molecole e le dimensioni non sono rappresentati accuratamente riflettendo i dati sperimentali pubblicati.

Glicoconjugati ancorati con GPI (glicosilfosfatidilinositolo)

Le glicoproteine GPI-ancorate sono molecole complesse che combinano un lipide, un glicano e una proteina. Il lipide è una coda di fosfoinositolo legata a un breve oligosaccaride glicano, a sua volta legato a un polipeptide da un legame fosfoetanolamminico.

I componenti polipeptidici della maggior parte delle proteine ancorate al GPI sono ulteriormente glicosilati e possono contenere N- e O-glicani e persino glicosaminoglicani chiamati glipicani.

È interessante notare che le proteine ancorate a GPI possono trasferire informazioni da una cellula all'altra, possono essere liberati dalla superficie di una cellula e incorporati nelle membrane di altre cellule.⁶⁵¹

Glicani e glicoconjugati rari

Ci sono molte altre classi di glicani che sono meno abbondanti delle classi sopra descritte. Alcuni hanno solo pochi esempi conosciuti; altri sono espressi solo in particolari lignaggi filogenetici.

È probabile che nei batteri e nell'archea esista un'enorme diversità inesplorata di glicani. Poiché mancano di un compartimento ER-Golgi, questi taxa hanno sviluppato modi diversi di assemblare i glicani rispetto agli eucarioti.

È già noto che i capsidi e i glicoconjugati di batteri e archei contengono una vasta diversità di glicani complessi e lo studio di questi è agli albori.⁶⁵² Gli ultimi anni hanno visto la scoperta di molte classi di glicani aggiuntive tra cui: O-xilosio, O-fucosio, C-mannosio e glicani legati all'S sui residui di cisteina.⁶⁵³

⁶⁵¹ Ferguson MAJ, Kinoshita T, Hart GW.

Glycosylphosphatidylinositol Anchors. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME, editors. *Essentials of Glycobiology*. 2nd ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. Chapter 11. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1966/>

⁶⁵² Schäffer C, Graninger M, Messner P.

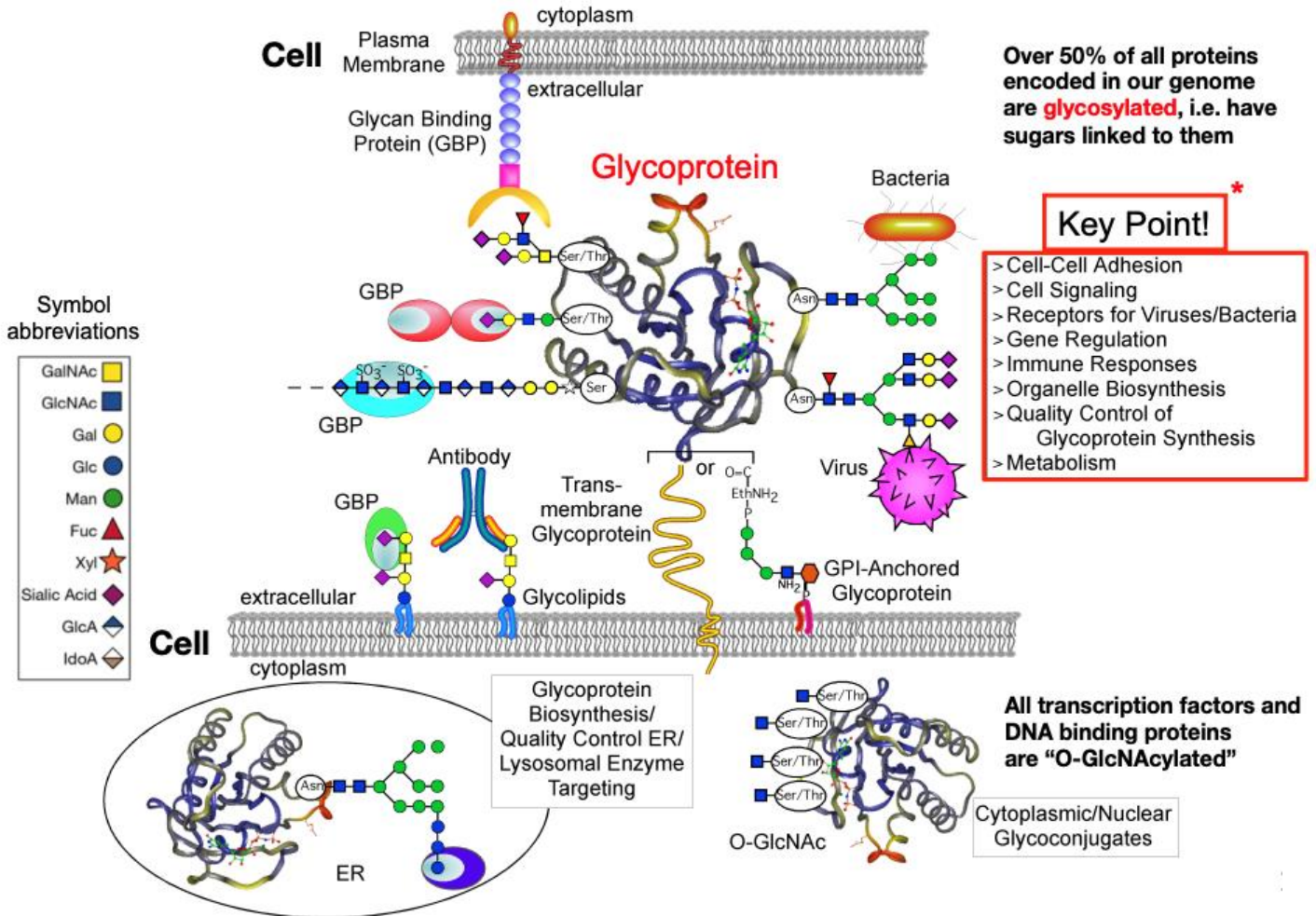
Prokaryotic glycosylation. *Proteomics*. 2001 Feb;1(2):248-61. doi: 10.1002/1615-9861(200102)1:2<248::AID-PROT248>3.0.CO;2-K. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11680871/>

⁶⁵³ Freeze HH, Haltiwanger RS.

Other Classes of ER/Golgi-derived Glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME, editors. *Essentials of Glycobiology*. 2nd ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. Chapter 12. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1947/>

Defaus S, Gupta P, Andreu D, Gutiérrez-Gallego R.

Mammalian protein glycosylation--structure versus function. *Analyst*. 2014 Jun 21;139(12):2944-67. doi: 10.1039/c3an02245e. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24779027/>



https://ncfg.hms.harvard.edu/files/ncfg/files/cummings_overview_of_glycans.pdf

Glicosilazione e sistema immunitario

L'infiammazione cronica è caratterizzata da numerosi cambiamenti fisiologici e biochimici sistemici, la maggior parte dei quali sono mediati da citochine proinfiammatorie abbondantemente secrete.

Sono le molecole chiave responsabili dell'attivazione del potenziale proinfiammatorio dell'immunità innata e adattativa, che spesso porta alla distruzione dei tessuti⁶⁵⁴. Inoltre, l'infiammazione cronica è caratterizzata da marcati cambiamenti nella glicosilazione⁶⁵⁵.

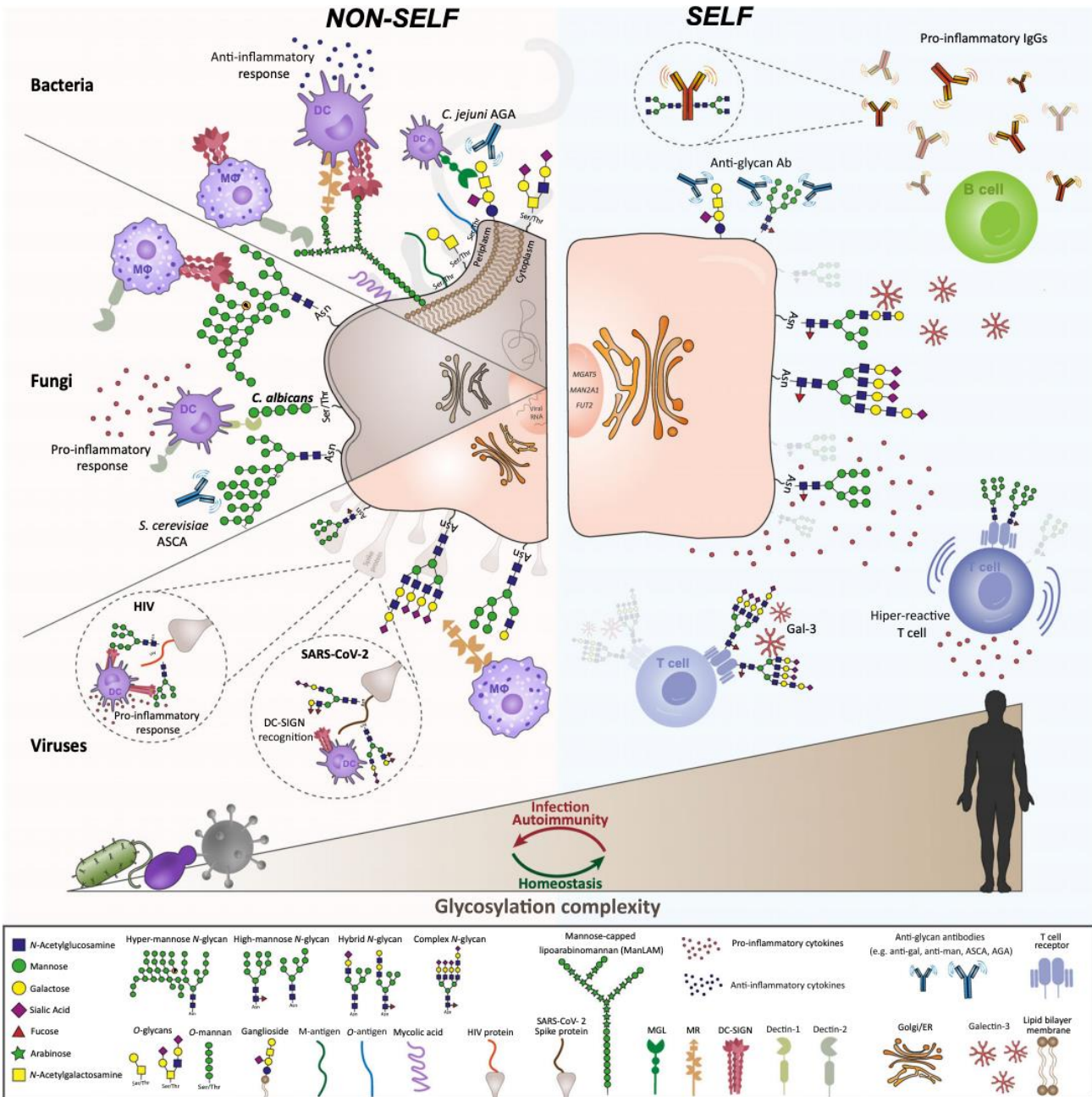
Gli N-glicani si trovano sulla superficie di entità chiave coinvolte nella risposta infiammatoria, comprese le molecole di adesione endoteliale, le cellule immunitarie dell'immunità innata e adattativa, le immunoglobuline secrete e le proteine di fase acuta (APP).

⁶⁵⁴ Feghali CA, Wright TM. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci.* 1997 Jan 1;2:d12-26. doi: 10.2741/a171. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9159205/>

⁶⁵⁵ Gudelj I, Lauc G, Pezer M. Immunoglobulin G glycosylation in aging and diseases. *Cell Immunol.* 2018 Nov;333:65-79. doi: 10.1016/j.cellimm.2018.07.009. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.07.009>

Groux-Degroote S, Cavdarli S, Uchimura K, Allain F, Delannoy P. Glycosylation changes in inflammatory diseases. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2020;119:111-156. doi: 10.1016/bs.apcsb.2019.08.008. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31997767/>

È stato dimostrato che la composizione dei loro N-glicani è modulata da citochine proinfiammatorie abbondantemente secrete che regolano l'espressione delle glicosiltransferasi (GT) e influenzano la disponibilità del substrato richiesto per la biosintesi degli N-glicani. Nel complesso, i cambiamenti nella N-glicosilazione osservati nell'infiammazione cronica sono diversi ma fortemente dipendenti dal particolare sottoinsieme di cellule immunitarie. Le caratteristiche interessate della struttura dell'N-glicano includono i cambiamenti nel numero di ramificazioni, i cambiamenti nella composizione della struttura dell'N-glicano e la diversificazione dei legami saccaridici con conseguenti epitopi di ligandi diversi. Di conseguenza, la N-glicosilazione alterata può influenzare in modo significativo il traffico dei leucociti, innescare uno spostamento verso funzioni effettrici più proinfiammatorie dei leucociti e avviare la trasformazione proinfiammatoria delle immunoglobuline secrete e delle APP, portando infine allo sviluppo di varie malattie infiammatorie.⁶⁵⁶



<https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/1873-3468.14347>

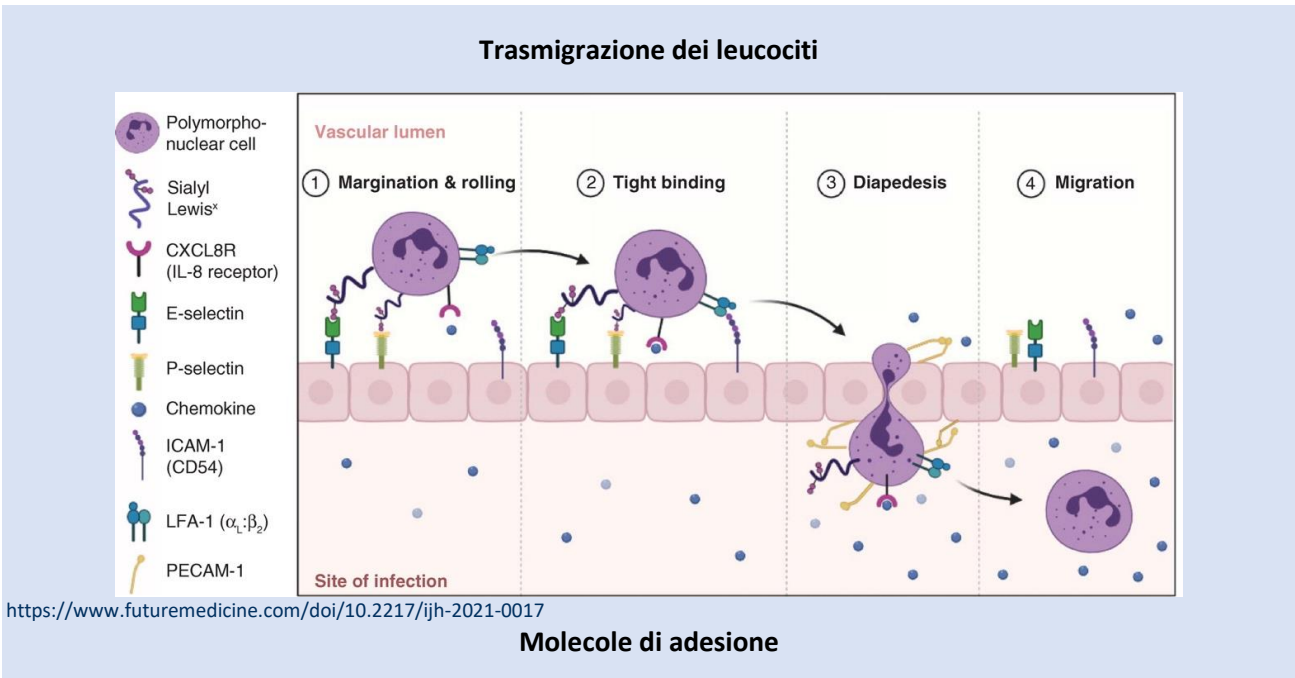
⁶⁵⁶ Radovani B, Gudelj I. N-Glycosylation and Inflammation; the Not-So-Sweet Relation. Front Immunol. 2022 Jun 27;13:893365. doi: 10.3389/fimmu.2022.893365 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9272703/>

I glicani come molecole centrali nella discriminazione dell'identità sé/non sé. La complessità della glicosilazione è un processo evolutivo in cui i patogeni mostrano un modello di glicosilazione distinto rispetto agli organismi superiori come i mammiferi, compreso l'uomo. Diversi modelli di glicani tra i microrganismi e gli esseri umani gettano le basi per il rilevamento molecolare e la discriminazione di sé/non sé. Sia le cellule immunitarie innate che quelle adattative sono dotate di una varietà di recettori che riconoscono i glicani (lectine di tipo C, galectine e siglecs) che sono in grado di percepire e riconoscere in modo specifico le diverse strutture dei glicani, istruendo risposte pro o antinfiammatorie associate a infezioni, infiammazioni e autoimmunità. Anche gli anticorpi contro specifiche strutture di glicani presenti sulla superficie dei microrganismi (anticorpi antiglicani) sono coinvolti nei processi di riconoscimento dipendenti dai glicani, rappresentando attori importanti nelle risposte immunitarie dell'ospite e di conseguenza nelle infezioni e nelle infiammazioni. Inoltre, i glicani possono anche modulare l'attività e la funzione delle cellule immunitarie, come le cellule T, nonché le funzioni effettrici degli anticorpi.

Per passare con successo attraverso l'endotelio, le cellule immunitarie subiscono un processo complesso che coinvolge il legame dipendente dal ligando seguito da laminazione superficiale, adesione e infine migrazione transendoteliale ⁶⁵⁷.

Ogni passaggio in questa cascata dipende dall'interazione tra le molecole di adesione endoteliale e i loro contro-recettori espressi sulla superficie dei leucociti.

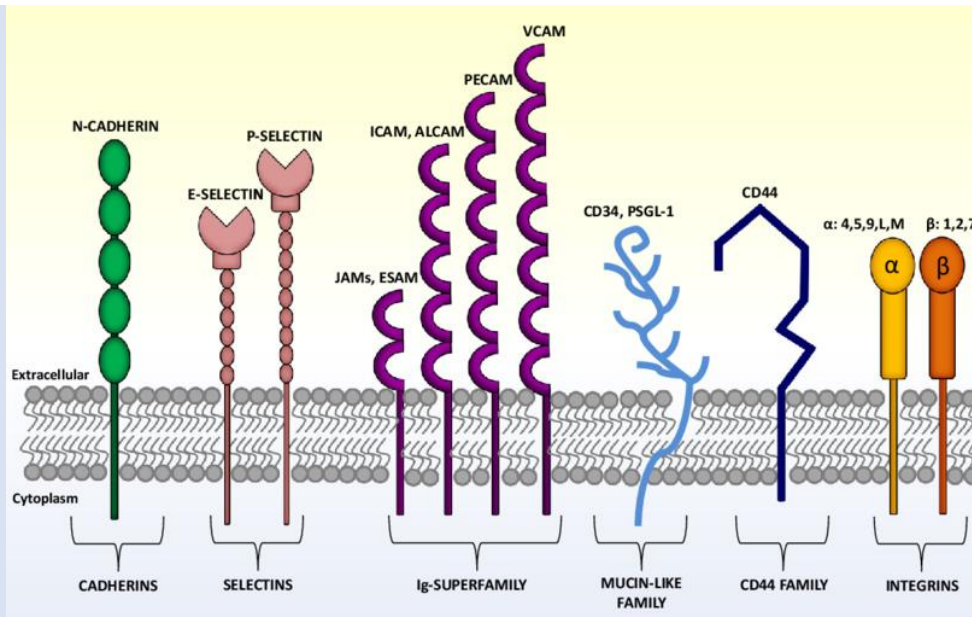
Gli attori chiave nel processo di trasmigrazione dei leucociti sono selectine, integrine, molecole di adesione intercellulare e vascolare (ICAM e VCAM), molecole di adesione delle cellule endoteliali piastriniche (PECAM) e molecole di adesione giunzionale (JAM) ⁶⁵⁸.



⁶⁵⁷ Kelly M, Hwang JM, Kubes P. Modulating leukocyte recruitment in inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2007 Jul;120(1):3-10. doi: 10.1016/j.jaci.2007.05.017 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17559914/>

Yano K, Gale D, Massberg S, Cheruvu PK, Monahan-Earley R, Morgan ES, Haig D, von Andrian UH, Dvorak AM, Aird WC. Phenotypic heterogeneity is an evolutionarily conserved feature of the endothelium. *Blood.* 2007 Jan 15;109(2):613-5. doi: 10.1182/blood-2006-05-026401. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-05-026401>

⁶⁵⁸ Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol.* 2007 Sep;7(9):678-89. doi: 10.1038/nri2156. PMID: 17717539. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17717539/>



<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26495446/>

Le molecole di adesione intercellulare
Molecole di adesione
Adesione stabile

video

[Cell Adhesion Molecules/ CAMs/ Integrins/ Adhesion molecules/ cadherins/selectins.](#)
[Adhesion in Leukocyte Extravasation](#)

La maggior parte delle molecole di adesione endoteliale sono fortemente N-glicosilate⁶⁵⁹, che è cruciale per il successo del traffico dei leucociti, come definito dall'ipotesi del "codice postale" (zip code)⁶⁶⁰.

In circolo, i leucociti incontrano varie proteine e zuccheri espressi sulle superfici endoteliali. L'adesione efficiente dei leucociti si ottiene solo quando viene espressa una specifica combinazione di una proteina della molecola di adesione e dell'N-glicano⁶⁵¹.

Le molecole di adesione non sono normalmente espresse nelle cellule a riposo, mentre la loro espressione è sovraregolata nell'infiammazione, tramite la via di segnalazione indotta dalle citochine, come NF- κ B⁶⁶¹.

⁶⁵⁹ Scott DW, Patel RP.

Endothelial heterogeneity and adhesion molecules N-glycosylation: implications in leukocyte trafficking in inflammation. *Glycobiology*. 2013 Jun;23(6):622-33. doi: 10.1093/glycob/cwt014. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23445551/>

⁶⁶⁰ Renkonen J, Tynnenen O, Häyry P, Paavonen T, Renkonen R.

Glycosylation might provide endothelial zip codes for organ-specific leukocyte traffic into inflammatory sites. *Am J Pathol*. 2002 Aug;161(2):543-50. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64210-1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1850742/>

⁶⁶¹ Gotsch U, Jäger U, Dominis M, Vestweber D.

Expression of P-selectin on endothelial cells is upregulated by LPS and TNF-alpha in vivo. *Cell Adhes Commun*. 1994 Apr;2(1):7-14. doi: 10.3109/15419069409014198. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7526954/>

Rahman A, Kefer J, Bando M, Niles WD, Malik AB.

E-selectin expression in human endothelial cells by TNF-alpha-induced oxidant generation and NF-kappaB activation. *Am J Physiol*. 1998 Sep;275(3):L533-44. doi: 10.1152/ajplung.1998.275.3.L533. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9728048/>

Hubbard AK, Rothlein R.

Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radic Biol Med*. 2000 May 1;28(9):1379-86. doi: 10.1016/S0891-5849(00)00223-9.

Inoltre, il ciclo degli N-glicani coinvolti nel traffico dei leucociti è strettamente controllato dall'infiammazione⁶⁶². Poiché la modulazione dipendente dall'infiammazione dell'espressione della molecola di adesione e la biosintesi dell'N-glicome è fondamentale per la risposta immunitaria innata, la disregolazione di questo asse può essere cruciale per la transizione da una risposta immunitaria innata alla malattia infiammatoria.

Risposta immunitaria innata

In qualsiasi infezione o lesione tissutale, l'infiammazione viene innescata quando le cellule immunitarie innate riconoscono modelli molecolari estranei a un tessuto, chiamati modelli molecolari associati ai patogeni (PAMP) e avviano una cascata di risposte infiammatorie.

Queste cellule immunitarie innate includono macrofagi derivati dai tessuti, cellule natural killer (cellule NK) e cellule dendritiche (DC), nonché leucociti circolanti come monociti e neutrofili⁶⁶³. Per comunicare con altre cellule immunitarie ed esercitare le loro funzioni immunomodulatorie, spesso si affidano agli N-glicani espressi sulla loro superficie e ai contro-recettori espressi dai loro partner di legame.

I **neutrofili** sono leucociti polimorfonucleati noti da tempo per essere attori chiave nel riconoscimento e nell'eliminazione dei patogeni in infiammazione acuta, ma è stato anche descritto il loro ruolo nelle malattie infiammatorie croniche e autoimmuni, come psoriasi, AR e LES⁶⁶⁴.

È stato dimostrato che la N-glicosilazione contribuisce a importanti funzioni effettrici dei neutrofili, come stravaso, fagocitosi, degranolazione e formazione di trappole extracellulari dei neutrofili (NET).⁶⁶⁵

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10924857/>

⁶⁶² Stolfa G, Mondal N, Zhu Y, Yu X, Buffone A Jr, Neelamegham S.
Using CRISPR-Cas9 to quantify the contributions of O-glycans, N-glycans and Glycosphingolipids to human leukocyte-endothelium adhesion. *Sci Rep.* 2016 Jul 26;6:30392. doi: 10.1038/srep30392.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4960646/>

Dewald JH, Colomb F, Bobowski-Gerard M, Groux-Degroote S, Delannoy P.
Role of Cytokine-Induced Glycosylation Changes in Regulating Cell Interactions and Cell Signaling in Inflammatory Diseases and Cancer. *Cells.* 2016 Nov 29;5(4):43. doi: 10.3390/cells5040043.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5187527/>

Mitoma J, et al
Critical functions of N-glycans in L-selectin-mediated lymphocyte homing and recruitment. *Nat Immunol.* 2007 Apr;8(4):409-18. doi: 10.1038/ni1442.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17334369/>

⁶⁶³ Akira S, Uematsu S, Takeuchi O.
Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 2006 Feb 24;124(4):783-801. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.015. i
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>

Beutler B.
Innate immunity: an overview. *Mol Immunol.* 2004 Feb;40(12):845-59. doi: 10.1016/j.molimm.2003.10.005.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14698223/>

⁶⁶⁴ Caielli S, Banchereau J, Pascual V.
Neutrophils come of age in chronic inflammation. *Curr Opin Immunol.* 2012 Dec;24(6):671-7. doi: 10.1016/j.coi.2012.09.008.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3684162/>

Whittaker Hawkins RF, et al
ICAM1+ neutrophils promote chronic inflammation via ASPRV1 in B cell-dependent autoimmune encephalomyelitis. *JCI Insight.* 2017 Dec 7;2(23):e96882. doi: 10.1172/jci.insight.96882.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5752297/>

⁶⁶⁵ Kelm M, Lehoux S, Azcutia V, Cummings RD, Nusrat A, Parkos CA, Brazil JC.
Regulation of neutrophil function by selective targeting of glycan epitopes expressed on the integrin CD11b/CD18. *FASEB J.* 2020 Feb;34(2):2326-2343. doi: 10.1096/fj.201902542R.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7018557/>

Filep JG.
Targeting Neutrophils for Promoting the Resolution of Inflammation.

I **monociti e i macrofagi tissutali** fanno parte del sistema dei fagociti mononucleati, che svolge un ruolo centrale nell'infiammazione attraverso la presentazione dell'antigene, la fagocitosi e la modulazione immunitaria mediata dalle citochine ⁶⁶⁶. Questi leucociti mononucleati sono considerati segni distintivi del passaggio dall'infiammazione acuta a quella cronica, poiché il loro accumulo è il risultato dell'apoptosi dei neutrofili indotta da citochine e dell'aumento della produzione della proteina chemiotattica dei monociti (MCP-1).

Nell'ultimo decennio, la N-glicosilazione ha guadagnato molta attenzione come strumento mediante il quale l'infiammazione orchestra la risposta immunitaria di monociti e macrofagi.

Ci sono tre fasi principali coinvolte nell'accumulo di macrofagi nell'ambiente infiammato: il reclutamento di monociti dalla circolazione, la differenziazione in macrofagi e l'attivazione dei macrofagi nel sito dell'infiammazione ⁶⁵⁷. Tutti e tre i passaggi sono sotto l'influenza diretta della N-glicosilazione alterata. ⁶⁶⁷

Le DC (**cellule dendritiche**) sono cellule presentanti l'antigene con la capacità di assorbire gli antigeni nella periferia e di esporli ai linfociti, colmando così il divario tra la risposta immunitaria innata e quella adattativa ⁶⁶⁸. Un sottoinsieme specifico di DC derivate da monociti (Mo-DC) gioca un ruolo chiave nell'infiammazione ⁶⁶⁹. La superficie delle Mo-DC è ricoperta da glicoproteine decorate prevalentemente con glicani sialilati ⁶⁷⁰. La sialilazione delle DC è regolata sia durante la differenziazione che durante la maturazione, ed è stato riscontrato che influisce in modo significativo sulle funzioni delle DC come l'assorbimento dell'antigene, la fagocitosi e l'innesco delle cellule T ⁶⁷¹.

Le **cellule NK** (natural killer) sono note per il loro ruolo nella citotossicità cellulo-mediata e nella secrezione di citochine proinfiammatorie ⁶⁷², fondamentali sia per la promozione dell'infiammazione e regolazione immunitaria ⁶⁷³.

Front Immunol. 2022 Mar 16;13:866747. doi: 10.3389/fimmu.2022.866747.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8966391/>

⁶⁶⁶ Hume DA, Irvine KM, Pridans C.
The Mononuclear Phagocyte System: The Relationship between Monocytes and Macrophages.
Trends Immunol. 2019 Feb;40(2):98-112. doi: 10.1016/j.it.2018.11.007.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30579704/>

⁶⁶⁷ Regal-McDonald K, Patel RP.
Selective Recruitment of Monocyte Subsets by Endothelial N-Glycans.
Am J Pathol. 2020 May;190(5):947-957. doi: 10.1016/j.ajpath.2020.01.006.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7221295/>

⁶⁶⁸ Iwasaki A, Medzhitov R.
Control of adaptive immunity by the innate immune system.
Nat Immunol. 2015 Apr;16(4):343-53. doi: 10.1038/ni.3123.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4507498/>

⁶⁶⁹ Randolph GJ, Inaba K, Robbiani DF, Steinman RM, Muller WA.
Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo.
Immunity. 1999 Dec;11(6):753-61. doi: 10.1016/S1074-7613(00)80149-1.
[https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80149-1](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80149-1)

⁶⁷⁰ Schauer R.
Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions.
Curr Opin Struct Biol. 2009 Oct;19(5):507-14. doi: 10.1016/j.sbi.2009.06.003.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7127376/>

⁶⁷¹ Carrascal, Mylène & Silva, Zélia & Crespo, Hélio & Cabral, Maria & Videira, Paula..
Sialylation and dendritic cells: Bridging innate and adaptive immune responses.
Carbohydrate Chemistry. (2011) 37. 94-116. 10.1039/9781849732765-00094.
https://www.researchgate.net/publication/285963460_Sialylation_and_dendritic_cells_Bridging_innate_and_adaptive_immune_responses

⁶⁷² Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S.
Functions of natural killer cells.
Nat Immunol. 2008 May;9(5):503-10. doi: 10.1038/ni1582.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18425107/>

⁶⁷³ Zitti B, Bryceson YT.
Natural killer cells in inflammation and autoimmunity.

Le funzioni effettrici delle cellule NK sono regolate da una serie di recettori attivatori e inibitori espressi sulla loro superficie, con la glicosilazione che gioca un ruolo cruciale nel riconoscimento del recettore-ligando. FcγRIIIa (CD16a) è il recettore attivante più abbondantemente espresso sulle cellule NK circolanti⁶⁷⁴, e il suo ruolo nella citotossicità cellulo-mediata anticorpo dipendente (ADCC) è ben stabilito⁶⁷⁵.

In particolare, è stato osservato un enorme aumento dell'affinità di legame delle IgG afucosilate proinfiammatorie quando erano presenti oligomannosi N-glicani su FcγRIIIa⁶⁷⁶.

Inoltre, è stato dimostrato che livelli più elevati dei complessi N-glicani sialilati su FcγRIIIa sono correlati con una minore affinità per il legame anticorpale⁶⁷⁷.

Nella loro recente review, Rosenstock e Kaufmann descrivono un importante contributo degli acidi sialici alle funzioni delle cellule NK, sia attraverso l'espressione dei recettori che legano l'acido sialico, sia grazie alla presenza di acidi sialici sulla loro superficie⁶⁷⁸.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9272703/>

Panoramica delle vie alterate della N-glicosilazione nelle cellule immunitarie innate durante l'infiammazione cronica. I principali fattori che contribuiscono alle alterazioni della N-glicosilazione sono le citochine proinfiammatorie (ad es. TNFα, IL-2, IFN-α, IFN-γ) che vengono rilasciate in eccesso durante l'infiammazione. Qui, gli elementi strutturali interessati degli N-glicani sulla superficie dei leucociti innati (neutrofili, macrofagi, cellule NK e DC) sono mostrati insieme alle glicosiltransferasi e glicosidasi associate. Nei neutrofili, l'aumento del motivo Lex sull'integrina MAC-1 porta a una migrazione disregolata dei neutrofili, mentre il legame del MAC-1 decorato con Lex al DC-SIGN innesca ulteriormente l'attivazione delle DC. Mentre i granuli neutrofilici (ad es. HNE) secreti dai neutrofili trasportano N-glicani troncati, la presenza di N-glicani complessi sialilati e/o il motivo sLex sulle entità di contrasto Siglec contribuisce al potenziale infiammatorio dei neutrofili in modo dipendente dal contesto. Le citochine proinfiammatorie migliorano il trasporto dei monociti e dirigono la loro differenziazione nei macrofagi proinfiammatori M1, contribuendo al contempo all'assenza di N-glicani sialilati, alla scissione di Gal-3 e all'aumento dell'espressione di Siglec-1. Mentre il Siglec-1 legato alla superficie è coinvolto nella risposta autoimmune nell'artrite reumatoide (RA), il Siglec-1 solubile è un marker nell'interferonopatia. Inoltre, il ciclo di feedback Gal-1/IFN-β coinvolto nella cessazione dell'infiammazione sembra essere disregolato nell'infiammazione cronica. Analogamente ai macrofagi, anche le DC mature mancano di acidi sialici terminali, plausibilmente a causa della diminuzione mediata dall'infiammazione della sialiltransferasi e/o dell'aumento dell'attività della neuraminidasi. Per quanto riguarda le cellule NK, la presenza di oligomannosi N-glicani su FcγRIIIa aumenta significativamente l'ADCC, mentre l'aumento della sialilazione indotto dalle citochine abroga l'inibizione delle cellule NK dipendenti da Siglec-9 mediante legame cis. BACE1, enzima 1 per la scissione di APP del sito beta; Gal, galectina; hAGP-1; glicoproteina acida α1 epatica; HNE, elastasi neutrofila umana; IFN, interferone; IL, interleuchina; ICAM-1, molecola di adesione intercellulare 1; MAC-1, antigene del macrofago-1; Uomo, Mannosidasi; MMP-12, metalloproteinasi di

Cytokine Growth Factor Rev. 2018 Aug;42:37-46. doi: 10.1016/j.cytogfr.2018.08.001.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30122459/>

⁶⁷⁴ Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR, Phillips JH.

The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol.* 1986 Jun 15;136(12):4480-6.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3086432/>

⁶⁷⁵ Battella S, Cox MC, Santoni A, Palmieri G.

Natural killer (NK) cells and anti-tumor therapeutic mAb: unexplored interactions.

J Leukoc Biol. 2016 Jan;99(1):87-96. doi: 10.1189/jlb.5VMR0415-141R.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26136506/>

⁶⁷⁶ Subedi GP, Barb AW.

CD16a with oligomannose-type N-glycans is the only "low-affinity" Fc γ receptor that binds the IgG crystallizable fragment with high affinity in vitro.

J Biol Chem. 2018 Oct 26;293(43):16842-16850. doi: 10.1074/jbc.RA118.004998.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6204906/>

Patel KR, Roberts JT, Subedi GP, Barb AW.

Restricted processing of CD16a/Fc γ receptor IIIa N-glycans from primary human NK cells impacts structure and function.

J Biol Chem. 2018 Mar 9;293(10):3477-3489. doi: 10.1074/jbc.RA117.001207.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5846152/>

Patel KR, Rodriguez Benavente MC, Lorenz WW, Mace EM, Barb AW.

Fc γ receptor IIIa/CD16a processing correlates with the expression of glycan-related genes in human natural killer cells.

J Biol Chem. 2021 Jan-Jun;296:100183. doi: 10.1074/jbc.RA120.015516.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7948478/>

⁶⁷⁷ Hayes JM, Frostell A, Karlsson R, Müller S, Martín SM, Pauers M, Reuss F, Cosgrave EF, Anneren C, Davey GP, Rudd PM.

Identification of Fc Gamma Receptor Glycoforms That Produce Differential Binding Kinetics for Rituximab.

Mol Cell Proteomics. 2017 Oct;16(10):1770-1788. doi: 10.1074/mcp.M117.066944.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5629263/>

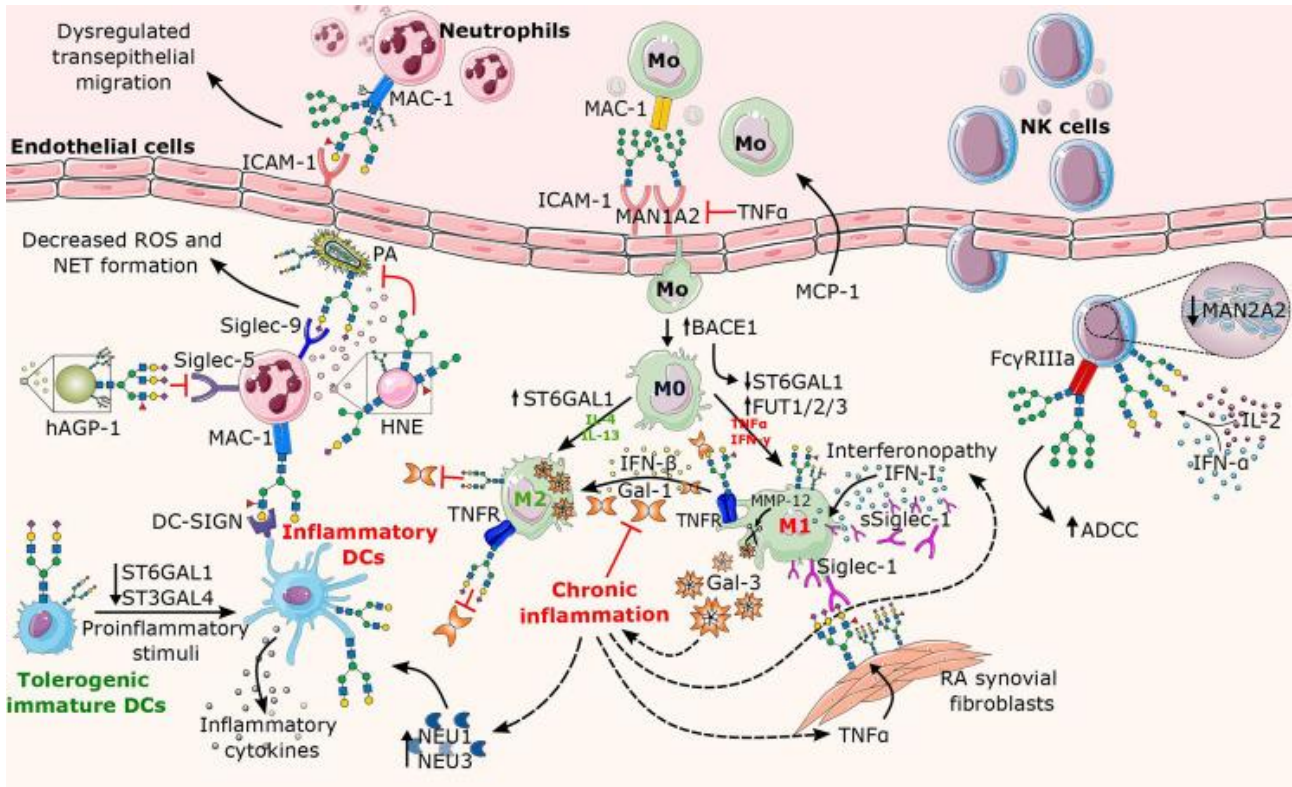
⁶⁷⁸ Rosenstock P, Kaufmann T.

Sialic Acids and Their Influence on Human NK Cell Function.

Cells. 2021 Jan 29;10(2):263. doi: 10.3390/cells10020263.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7911748/>

matrice 12; MCP-1, proteina chemoattraente dei monociti-1; NEU, neuraminidasi; NAGP-1, glicoproteina acida α 1 dei neutrofili; PA, *Pseudomonas aeruginosa*.



Risposta adattativa

Nell'immunità adattativa, i glicani sono essenziali per la trasduzione del segnale e delle interazioni cellula-cellula. È stato dimostrato che gli N-glicani regolano passaggi importanti nella biologia dei linfociti, come l'attività delle cellule T e B, la differenziazione e proliferazione cellulare e la funzione degli anticorpi secreti nell'infiammazione cronica.⁶⁷⁹

La funzione delle **cellule T** nell'infiammazione è altamente pleiotropica e dipende dalla comunicazione intra e intercellulare, spesso mediata dagli N-glicani e dai loro corrispondenti partner di legame.

A questo proposito, le alterazioni dell'N-glicoma dei linfociti T possono influenzare significativamente la loro attivazione, differenziazione, sopravvivenza e produzione di citochine, portando spesso all'autoimmunità, all'infiammazione cronica o al cancro⁶⁸⁰.

⁶⁷⁹ Wright RD, Cooper D. Glycobiology of leukocyte trafficking in inflammation. *Glycobiology*. 2014 Dec;24(12):1242-51. doi: 10.1093/glycob/cwu101. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25258391/>

Maverakis E, Kim K, Shimoda M, Gershwin ME, Patel F, Wilken R, Raychaudhuri S, Ruhaak LR, Lebrilla CB. Glycans in the immune system and The Altered Glycan Theory of Autoimmunity: a critical review. *J Autoimmun*. 2015 Feb;57:1-13. doi: 10.1016/j.jaut.2014.12.002. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4340844/>

⁶⁸⁰ Chien MW, Fu SH, Hsu CY, Liu YW, Sytwu HK. The Modulatory Roles of N-glycans in T-Cell-Mediated Autoimmune Diseases. *Int J Mol Sci*. 2018 Mar 8;19(3):780. doi: 10.3390/ijms19030780. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5877641/>

Coder BD, Wang H, Ruan L, Su DM. Thymic involution perturbs negative selection leading to autoreactive T cells that induce chronic inflammation. *J Immunol*. 2015 Jun 15;194(12):5825-37. doi: 10.4049/jimmunol.1500082. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4458423/>

In condizioni omeostatiche, le galectine sono i principali regolatori immunitari delle cellule T, con Gal-1, Gal-3 e Gal-9 che mostrano costantemente effetti immunosoppressivi.⁶⁸¹

Lectine

Come già discusso, le cellule ospiti, così come praticamente tutti i batteri, parassiti, funghi e virus, portano le strutture dei glicani sulla superficie cellulare ed è stato proposto che queste molecole possano servire a visualizzare informazioni critiche per la comunicazione ospite-microbo.

Questa informazione è, almeno in parte, decodificata da proteine o lectine che legano i glicani⁶⁸², e agiscono come recettori che potrebbero essere secreti o espressi sulla superficie cellulare delle cellule immunitarie.

Le famiglie delle lectine, comprese le lectine di tipo C, le siglec e le galectine, contengono uno o più domini di riconoscimento dei carboidrati (CRD) responsabili del riconoscimento dello zucchero.

La specificità del legame del glicano e l'espressione specifica del tipo cellulare di questi recettori sono ben documentate. Mentre le galectine sono secrete, la maggior parte delle lectine di tipo C e tutte le siglec conosciute sono proteine legate alla membrana⁶⁷³.

⁶⁸¹ Sundblad V, Morosi LG, Geffner JR, Rabinovich GA.

Galectin-1: A Jack-of-All-Trades in the Resolution of Acute and Chronic Inflammation. *J Immunol.* 2017 Dec 1;199(11):3721-3730. doi: 10.4049/jimmunol.1701172. <https://www.jimmunol.org/content/199/11/3721.long>

Cerliani JP, Blidner AG, Toscano MA, Croci DO, Rabinovich GA.

Translating the 'Sugar Code' into Immune and Vascular Signaling Programs. *Trends Biochem Sci.* 2017 Apr;42(4):255-273. doi: 10.1016/j.tibs.2016.11.003. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27986367/>

Illarregui JM, Croci DO, Bianco GA, Toscano MA, Salatino M, Vermeulen ME, Geffner JR, Rabinovich GA.

Tolerogenic signals delivered by dendritic cells to T cells through a galectin-1-driven immunoregulatory circuit involving interleukin 27 and interleukin 10. *Nat Immunol.* 2009 Sep;10(9):981-91. doi: 10.1038/ni.1772. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19668220/>

Thiemann S, Baum LG.

Galectins and Immune Responses-Just How Do They Do Those Things They Do? *Annu Rev Immunol.* 2016 May 20;34:243-64. doi: 10.1146/annurev-immunol-041015-055402. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26907217/>

Grigorian A, Torossian S, Demetriou M.

T-cell growth, cell surface organization, and the galectin-glycoprotein lattice. *Immunol Rev.* 2009 Jul;230(1):232-46. doi: 10.1111/j.1600-065X.2009.00796.x. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3059806/>

Colomb F, Giron LB, Trbojevic-Akmacic I, Lauc G, Abdel-Mohsen M.

Breaking the Glyco-Code of HIV Persistence and Immunopathogenesis. *Curr HIV/AIDS Rep.* 2019 Apr;16(2):151-168. doi: 10.1007/s11904-019-00433-w. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6441623/>

Rabinovich GA, Toscano MA.

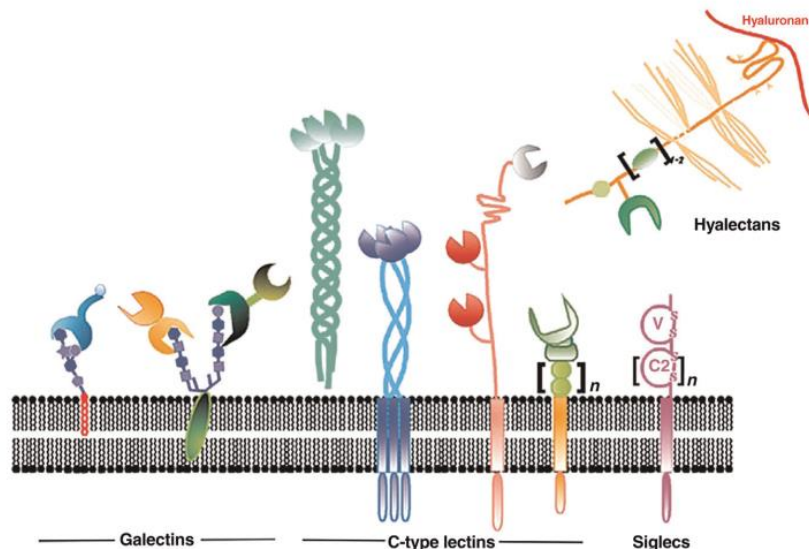
Turning 'sweet' on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2009 May;9(5):338-52. doi: 10.1038/nri2536. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19365409/>

⁶⁸² van Kooyk Y, Rabinovich GA.

Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 2008 Jun;9(6):593-601. doi: 10.1038/ni.f.203. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18490910/>

Ledeen RW, Kopitz J, Abad-Rodríguez J, Gabius HJ.

Glycan Chains of Gangliosides: Functional Ligands for Tissue Lectins (Siglecs/Galectins). *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2018;156:289-324. doi: 10.1016/bs.pmbts.2017.12.004. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29747818/>



<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29747818/>

Illustrazione dei modi strategici in cui i domini di riconoscimento dei carboidrati (CRD) nelle lectine animali e umane sono posizionati per raggiungere la selezione ottimale del ligando (ad esempio per separare il sé dai profili glicani non sé nell'immunità innata) e la complementarità topologica. Da sinistra a destra, i CRD vengono visualizzati nei tre sottotipi all'interno della famiglia delle galectine (disposizioni chimeriche, prototipo e tandem-ripetute che si legano a un ganglioside o un N-glicano di tipo complesso ramificato senza o con terminale α 2,3 -sialilazione), la presentazione di CRD (tipo C o dominio simile al fibrinogeno) nel siero e nelle collectine o nelle ficoline dei tensioattivi collegati ai loro steli collagene e l'associazione non covalente dei siti delle lectine nelle lectine transmembrana di tipo C da parte di una bobina a spirale α -elicoidale vengono somministrati steli (ad es. asialoglicoproteina e recettori delle cellule di Kupffer, la lectina di tipo C del recettore scavenger, CD23, DC-SIGNR o DC-SIGNR). Simile alle galectine di tipo tandem-ripetitivo, anche la famiglia di lectine C-type ha un ramo di membri con questo design, ovvero le immunlectine1, -2 e -3. Successivamente, la visualizzazione ripetuta in tandem nel recettore dei macrofagi specifico del mannosio (che si trova anche su cellule dendritiche, cellule endoteliali epatiche, cellule mesangiali renali, cellule epiteliali del pigmento retinico e cellule muscolari lisce tracheali) e la relativa lectina di tipo C Endo180 con otto domini così come nella lectina di tipo P indipendente dai cationi con 15 domini è presentata. La capacità di legare lo zucchero è limitata a pochi domini come illustrato. Il verificarsi dell'attività della lectina per l'ipofisi portatrice di ormoni glicoproteici GalNAc-4-SO₄ nel dominio ricco di cisteina, un membro della famiglia delle pieghe β -trifoglio con un dominio (QxW)₃ nella sezione N-terminale del recettore del mannosio dei macrofagi (aminoacidi 8-128), che è collegato tramite una fibronectina-tipo-II-modulo contenente la ripetizione alla sezione di ripetizione in tandem, è anche incluso nel disegno schematico per queste lectine con più di un tipo di CRD per catena proteica. Spostandosi ulteriormente sul lato destro, l'associazione di un CRD distale nelle selectine (collegato a un dominio simile al fattore di crescita epidermico (EGF) e da due a nove ripetizioni di consenso leganti il complemento) o nella sottofamiglia siglec delle lectine di tipo I utilizzando 1-16 unità simili a immunoglobuline C2-set come equivalenti distanziatori per consentire al CRD (V-set) di raggiungere i ligandi di contatto e di modulare la capacità di servire nelle interazioni cis o trans sulla superficie cellulare. Le alterazioni dipendenti dalla forza della disposizione topologica dei due domini distali nelle selectine rappresentano i legami di cattura delle selectine, un motivo inibitorio canonico a base di tirosina dell'immunorecettore (ITIM) insieme a un presunto motivo a base di tirosina è spesso presente nella porzione intracellulare di siglecs. Domini C2-Set legati alle ripetizioni di fibronectina-tipo-III stabiliscono la sezione extracellulare delle lectine di tipo I L1 e della molecola di adesione delle cellule neurali (NCAM). Nella matrice, i proteoglicani modulari (hyalectans/lectans: aggrecan, brevican, neurocan e versican) interagiscono (i) con lo ialuronano (e anche la proteina di collegamento) tramite i moduli di tipo link-proteina del dominio N-terminale G1 (e un modulo Ig-like), (ii) con recettori che si legano alle catene di glicosaminoglicani nella regione centrale e (iii) con carboidrati o proteine (fibuline-1 e -2 e tenascina-R) tramite la lectina di tipo C dominio simile affiancato da ripetizione consenso simile a EGF e legame dei moduli del complemento. (Per i dettagli, vedere Gabius H-J. Lectine animali e umane. In: Gabius H-J, ed. The Sugar Code. Fundamentals of Glycosciences. Weinheim, Germania: Wiley-VCH; 2009: 317-328.)

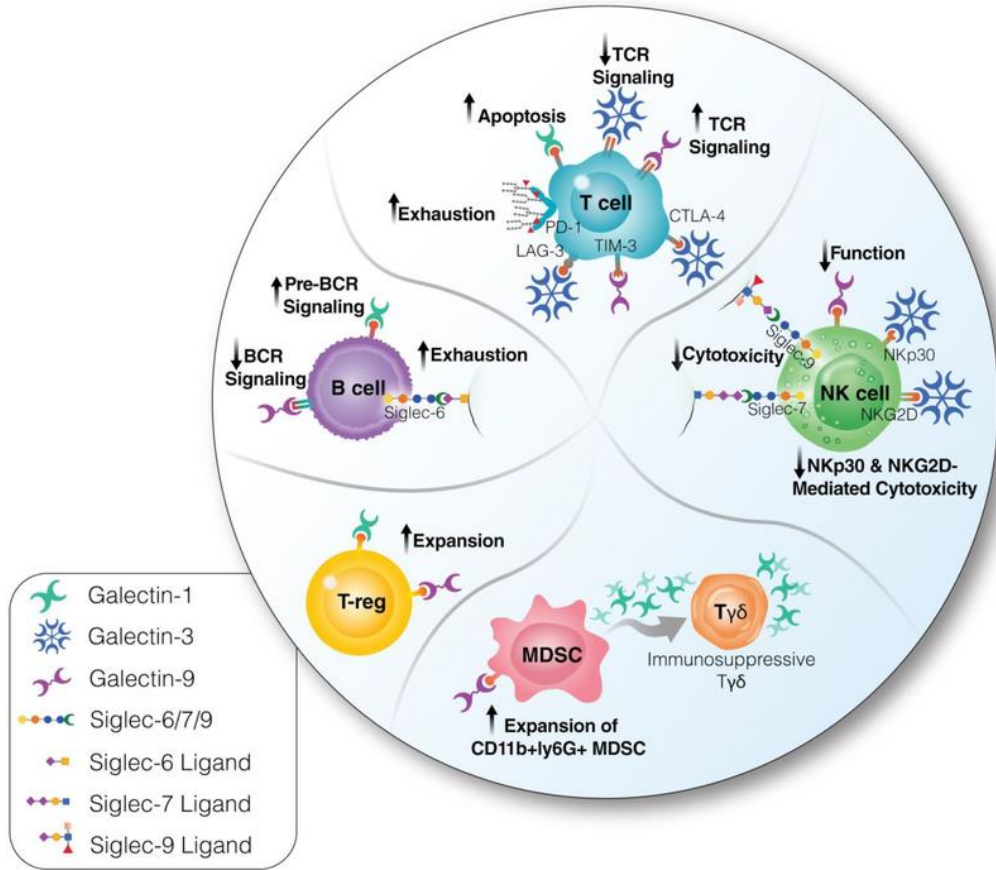
Sebbene le galectine siano sintetizzate e immagazzinate nel compartimento citoplasmatico, vengono rilasciate passivamente dalle cellule morenti o attivamente secrete dalle cellule attivate infiammatorie, in seguito a danno tissutale causato da agenti patogeni. A causa delle somiglianze con altri DAMP o allarmine, inclusa la localizzazione citosolica, il rilascio in seguito a danno tissutale ed externalizzazione non classica, è stato ipotizzato che le galectine agiscano come potenziali DAMP * ⁶⁸³.

⁶⁸³ Rabinovich GA, Toscano MA. Turning 'sweet' on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. Nat Rev Immunol. 2009 May;9(5):338-52. doi: 10.1038/nri2536. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19365409/>

Dam TK, Brewer CF. Lectins as pattern recognition molecules: the effects of epitope density in innate immunity. Glycobiology. 2010 Mar;20(3):270-9. doi: 10.1093/glycob/cwp186. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19939826/>

Roh JS, Sohn DH. Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases.

* I modelli molecolari associati al danno (DAMP) sono molecole pericolose endogene che vengono rilasciate da cellule danneggiate o morenti e attivano il sistema immunitario innato interagendo con i recettori di riconoscimento del modello (PRR). Sebbene i DAMP contribuiscano alla difesa dell'ospite, promuovono risposte infiammatorie patologiche.



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6441623/>

Le interazioni cellula-superficie glicano-lectina mediano i segnali che definiscono diversi processi cellulari e funzioni immunologiche centrali per l'infezione da HIV.

La struttura specifica di un glicano gli consente di legarsi a lectine specifiche, portando all'attivazione delle vie di segnalazione a valle. Questi percorsi sono fondamentali per una varietà di processi cellulari e funzioni immunologiche. cellule T. La galectina-1 induce l'apoptosi dei linfociti T. La galectina-9 induce la segnalazione del TCR, mentre la galectina-3 la riduce. La galectina-3 altera la funzione delle cellule T attraverso l'interazione con LAG3 e altri checkpoint immunitari negativi. Infine, la fucosilazione del PD-1 influisce sulla sua funzione. cellule NK. Siglecs-7 e -9 inibiscono l'attività NK. La galectina-9 altera la funzione/citotossicità delle NK e la produzione di citochine attraverso un meccanismo indipendente da Tim-3. La galectina-3 antagonizza l'immunità antitumorale mediata dalle cellule NK diminuendo l'affinità della catena A (MICA) correlata a MHC I per il recettore NKG2D o agendo come ligando inibitorio del recettore Nkp30. cellule B. Siglec-6 induce l'esaurimento delle cellule B. La galectina-1 è un ligando del recettore delle cellule pre-B che induce il raggruppamento dei recettori, portando a un'efficiente differenziazione delle cellule B. La galectina-9 sopprime la segnalazione BCR. T-reg. Le galectine-1 e -9 possono espandere i T-reg. Cellule soppressive di derivazione mieloide (MDSC). L'interazione galectina-9/Tim3 guida l'espansione di CD11b+ly6G+ MDSC. Le MDSC granulocitiche inducono le cellule γδ-T a produrre galectina-1, trasformandole così in cellule immunosoppressive. Queste interazioni glicano-lectina rappresentano potenziali nuovi bersagli per migliorare la funzionalità immunitaria durante l'infezione da HIV per curare l'HIV o prevenire la disfunzione immunitaria associata all'HIV e il successivo sviluppo di malattie associate alla disfunzione immunitaria.

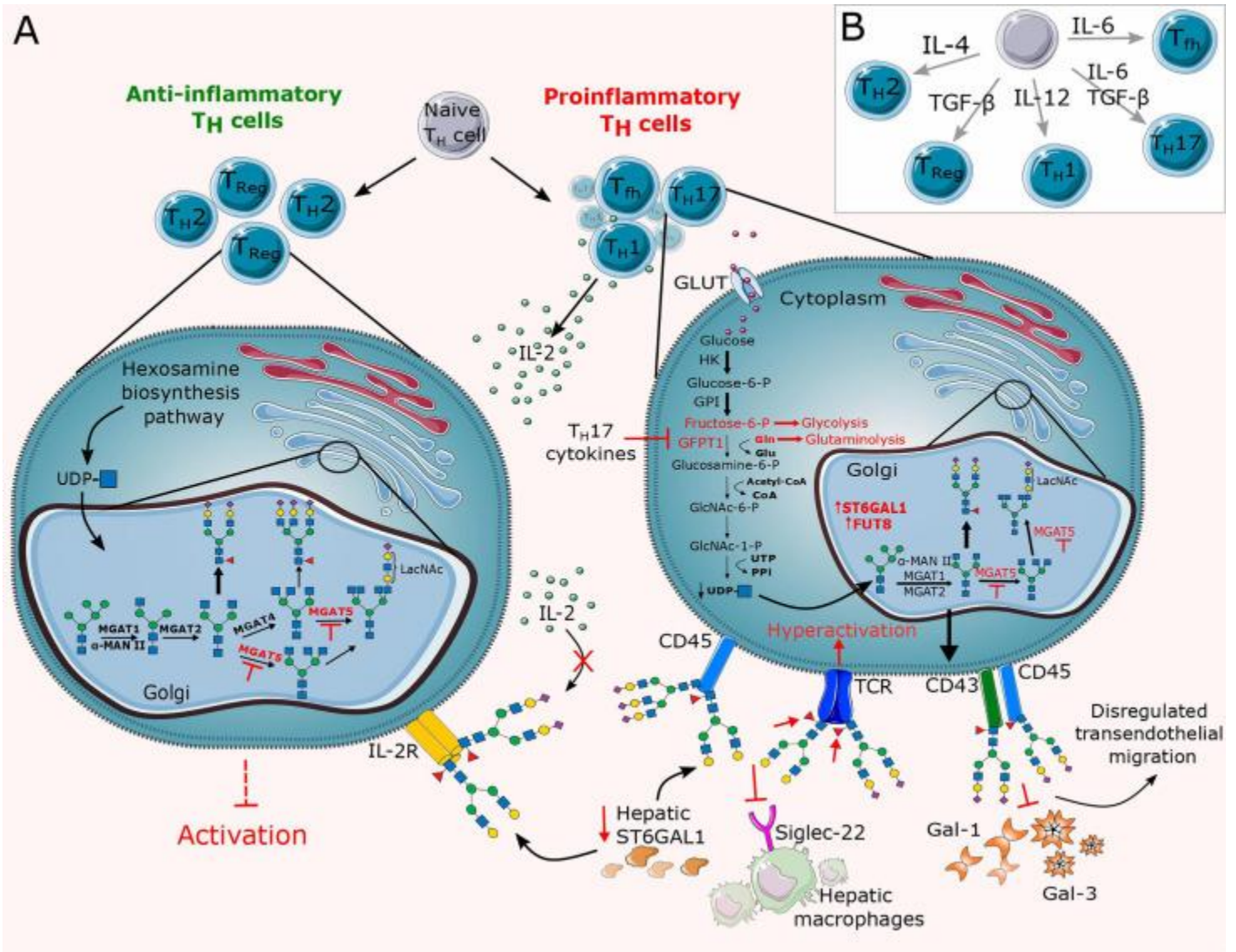
Immune Netw. 2018 Aug 13;18(4):e27. doi: 10.4110/in.2018.18.e27.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6117512/>

Sato S, St-Pierre C, Bhaumik P, Nieminen J.

Galectins in innate immunity: dual functions of host soluble beta-galactoside-binding lectins as damage-associated molecular patterns (DAMPs) and as receptors for pathogen-associated molecular patterns (PAMPs).

Immunol Rev. 2009 Jul;230(1):172-87. doi: 10.1111/j.1600-065X.2009.00790.x.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19594636/>



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9272703/>

Panoramica delle vie alterate della N-glicosilazione per quanto riguarda i linfociti T durante l'infiammazione cronica. (A) La differenziazione dei linfociti e quindi il loro N-glicome di superficie è sotto l'influenza diretta delle citochine e della stimolazione da parte delle cellule presentanti l'antigene (APC). Le citochine controllano la differenziazione a favore dei linfociti T proinfiammatori (Th1, Th17, Tfh), alterando così il loro N-glicome disregolando l'espressione delle glicosiltransferasi come MGAT5, ST6GAL1 e FUT8 e abrogando la disponibilità del substrato per la via di biosintesi dell'esosamina (HBP). I cambiamenti N-glicani risultanti riducono significativamente l'affinità di legame delle galectine inibitorie e dei Siglec. (B) Rappresentazione schematica delle citochine rilevanti responsabili della differenziazione delle cellule T. GLUT, trasportatore del glucosio; TCR, recettore delle cellule T; Tfh, cellula T helper follicolare; Cellula aiutante Th, T; Treg, cellula T regolatoria.

I linfociti B sono le principali cellule immunitarie effettrici centrali nel ramo umorale dell'immunità adattativa.

⁶⁸⁴ Oltre alla loro funzione di precursori delle plasmacellule che secernono anticorpi, i linfociti B sono coinvolti nella soppressione dei linfociti T e nella secrezione di citochine rilevanti che controllano l'immunità adattativa

⁶⁸⁵. La N-glicosilazione ha un enorme impatto sulla proliferazione, differenziazione e funzioni effettrici delle cellule B ma la ricerca su questo argomento è molto indietro rispetto a quella delle cellule T.

⁶⁸⁴ Forthall DN. Functions of Antibodies. Microbiol Spectr. 2014 Aug 15;2(4):1-17 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4159104/>

⁶⁸⁵ Lund FE. Cytokine-producing B lymphocytes-key regulators of immunity. Curr Opin Immunol. 2008 Jun;20(3):332-8. doi: 10.1016/j.coi.2008.03.003. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2474694/>

Nelle cellule B, tra i ruoli meglio compresi per le interazioni lectina-glicano ci sono quelli dei sialoglicani e dei Siglec nella segnalazione del BCR.

Gli acidi sialici sono spesso indicati come "auto-segnali" inibitori a causa della loro elevata concentrazione locale sulla superficie dei linfociti B. Pertanto, non sorprende che i Siglec siano considerati i principali immunomodulatori dei linfociti B.⁶⁸⁶

Il ruolo finale, ma non meno importante, dei linfociti B è la secrezione di immunoglobuline (Igs), le principali glicoproteine esecutive della risposta immunitaria adattativa umorale.

Tutte le classi di Ig umane sono N-glicosilate, con N-glicani attaccati alle regioni di glicosilazione conservate sul frammento cristallizzabile (Fc) e/o sul legame antigenico del frammento variabile (Fab), dove possono essere acquisiti nuovi siti di glicosilazione durante l'ipermutazione somatica⁶⁸⁷.

Gli N-glicani possono influenzare la stabilità strutturale e la conformazione delle immunoglobuline così come le loro funzioni effettrici⁶⁸⁸.

Modificazioni degli N-glicani delle IgG

Approfondimento

COMPLICAZIONI RESPIRATORIE- PARTE SECONDA - Immunopatologia da pag 15

Galattosilazione

L'aumento di glicani agalattosilati delle IgG è considerato un segno distintivo di varie malattie con una componente infiammatoria sottostante⁶⁸⁹. Si ritiene che i glicani Fc privi di galattosi terminali siano proinfiammatori e in grado di attivare il complemento attraverso la via alternativa, insieme alla via della lectina mediante il legame alla lectina legante il mannosio (MBL)⁶⁹⁰.

Mentre i glicani agalattosilati sono considerati strettamente proinfiammatori, la galattosilazione terminale sembra essere piuttosto controversa a questo proposito.

⁶⁸⁶ Collins BE, Blixt O, DeSieno AR, Bovin N, Marth JD, Paulson JC.
Masking of CD22 by cis ligands does not prevent redistribution of CD22 to sites of cell contact.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Apr 20;101(16):6104-9. doi: 10.1073/pnas.0400851101.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC395930/>

⁶⁸⁷ Schroeder HW Jr, Cavacini L.
Structure and function of immunoglobulins.
J Allergy Clin Immunol. 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S41-52. doi: 10.1016/j.jaci.2009.09.046.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3670108/>

⁶⁸⁸ Arnold JN, Wormald MR, Sim RB, Rudd PM, Dwek RA.
The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins.
Annu Rev Immunol. 2007;25:21-50. doi: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141702.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17029568/>

⁶⁸⁹ Gudelj I, Lauc G, Pezer M.
Immunoglobulin G glycosylation in aging and diseases.
Cell Immunol. 2018 Nov;333:65-79. doi: 10.1016/j.cellimm.2018.07.009.
<https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.07.009>

⁶⁹⁰ Arnold JN, Dwek RA, Rudd PM, Sim RB.
Mannan binding lectin and its interaction with immunoglobulins in health and in disease.
Immunol Lett. 2006 Aug 15;106(2):103-10. doi: 10.1016/j.imlet.2006.05.007.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16814399/>

Malhotra R, Wormald MR, Rudd PM, Fischer PB, Dwek RA, Sim RB.
Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein.
Nat Med. 1995 Mar;1(3):237-43. doi: 10.1038/nm0395-237. Erratum in: Nat Med 1995 Jun;1(6):599.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7585040/>

I glicani decorati con galattosio sono stati ritenuti responsabili dell'attenuazione dell'infiammazione legandosi all'inibitore FcγRIIB, seguito dall'inibizione dell'attività proinfiammatoria del componente C5a del complemento ⁶⁹¹.

Dall'altra parte, è stato dimostrato che la galattosilazione di Fc attiva la via classica del complemento facilitando l'esamerizzazione delle IgG, aumentando così l'avidità di C1q e potenziando il CDC ⁶⁹².

È stato anche scoperto che aumenta l'affinità delle IgG per l'attivazione di FcγR, portando all'ADCC ⁶⁹³.

Sializzazione delle IgG

L'aggiunta di acido sialico all'estremità terminale degli N-glicani delle IgG è essenziale per il controllo delle risposte immunitarie infiammatorie. Le IgG altamente sialilate hanno una minore affinità per l'attivazione di FcγRIIIa, con conseguente riduzione dell'ADCC ⁶⁹⁴, mentre stimolano la sovraregolazione dell'FcγRIIb inibitoria e quindi l'inibizione del CDC ⁶⁹⁵.

Nell'autoimmunità, si ritiene che l'iposialilazione sia responsabile dello sviluppo dell'infiammazione cronica.

Fucosilazione delle IgG

Più del 90% dei glicani Fc delle IgG negli individui sani hanno il fucosio legato al loro nucleo, che funge da "interruttore di sicurezza" e attenua l'ADCC potenzialmente dannoso ⁶⁹⁶.

Un esempio patologico è la ridotta fucosilazione del nucleo delle IgG nelle malattie autoimmuni della tiroide.

⁶⁹¹ Karsten CM, et al

Anti-inflammatory activity of IgG1 mediated by Fc galactosylation and association of FcγRIIB and dectin-1.

Nat Med. 2012 Sep;18(9):1401-6. doi: 10.1038/nm.2862.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3492054/>

⁶⁹² Wei B, Gao X, et al

Fc galactosylation follows consecutive reaction kinetics and enhances immunoglobulin G hexamerization for complement activation.

MAbs. 2021 Jan-Dec;13(1):1893427. doi: 10.1080/19420862.2021.1893427.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7946005/>

⁶⁹³ Subedi GP, Barb AW.

The immunoglobulin G1 N-glycan composition affects binding to each low affinity Fc γ receptor.

MAbs. 2016 Nov/Dec;8(8):1512-1524. doi: 10.1080/19420862.2016.1218586.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5098437/>

Dekkers G, et al

Decoding the Human Immunoglobulin G-Glycan Repertoire Reveals a Spectrum of Fc-Receptor- and Complement-Mediated-Effector Activities.

Front Immunol. 2017 Aug 2;8:877. doi: 10.3389/fimmu.2017.00877.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5539844/>

⁶⁹⁴ Kaneko Y, Nimmerjahn F, Ravetch JV.

Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation.

Science. 2006 Aug 4;313(5787):670-3. doi: 10.1126/science.1129594.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16888140/>

Raju TS.

Terminal sugars of Fc glycans influence antibody effector functions of IgGs.

Curr Opin Immunol. 2008 Aug;20(4):471-8. doi: 10.1016/j.coi.2008.06.007.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18606225/>

⁶⁹⁵ Quast I, Keller CW, Maurer MA, Giddens JP, Tackenberg B, Wang LX, Münz C, Nimmerjahn F, Dalakas MC, Lünemann JD.

Sialylation of IgG Fc domain impairs complement-dependent cytotoxicity.

J Clin Invest. 2015 Nov 2;125(11):4160-70. doi: 10.1172/JCI82695

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4639970/>

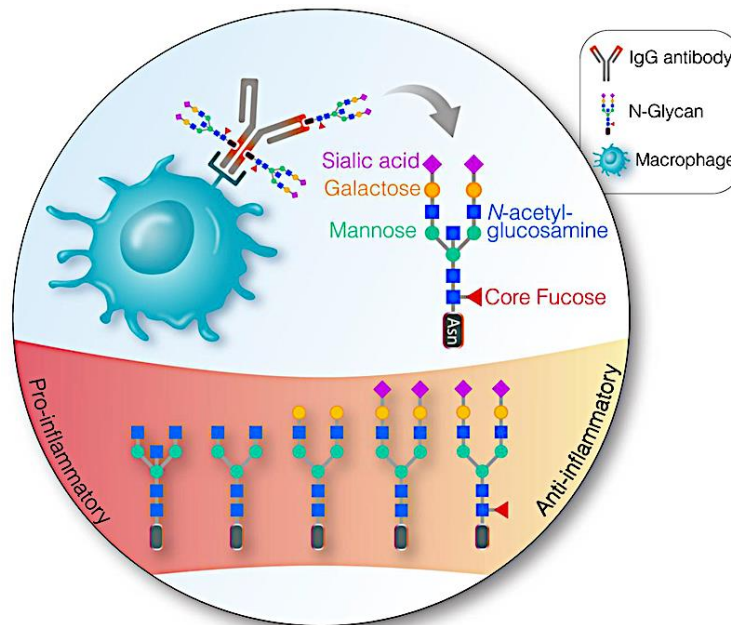
⁶⁹⁶ Shields RL, Lai J, Keck R, O'Connell LY, Hong K, Meng YG, Weikert SH, Presta LG.

Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human FcγRIII and antibody-dependent cellular toxicity.

J Biol Chem. 2002 Jul 26;277(30):26733-40. doi: 10.1074/jbc.M202069200.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M202069200>

Si ritiene che il meccanismo sottostante sia l'espressione anormale dei geni FUT8 e IKZF1 nei linfociti B che producono l'anticorpo della perossidasi tiroidea (TPOAb)⁶⁹⁷, entrambi associati a N-glicani IgG afucosilati⁶⁹⁸. Un altro esempio patologico è la metilazione aberrante nella regione del promotore del gene MGAT3 (che codifica per l'enzima MGAT3 responsabile della produzione di strutture bisecanti di GlcNAc) che determina un aumento della percentuale di GlcNAc bisecante sui glicani IgG nei pazienti con celiachia, suggerendo un possibile coinvolgimento della bisezione GlcNAc nella patogenesi della malattia⁶⁹⁹.



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6441623/>

Immunoglobuline A

Il concetto prevalente riguardo la funzione immunologica dell'immunoglobulina A (IgA) è la sua capacità di legarsi e neutralizzare i patogeni per prevenire l'infezione a livello delle mucose del corpo. Tuttavia, è diventato nel tempo chiaro che nell'uomo l'IgA è anche in grado di contribuire attivamente all'innesco dell'infiammazione, sia a livello della mucosa che di quella non mucosale. Questa funzione aggiuntiva delle IgA è avviata dalla formazione di immunocomplessi, che attivano il recettore Fc alfa I (FcαRI) e sinergizzano con vari altri recettori per amplificare le risposte infiammatorie. Recenti scoperte hanno dimostrato che la co-stimolazione di FcαRI influisce fortemente sulla produzione di citochine pro-infiammatorie da parte di varie cellule mieloidi, inclusi diversi sottogruppi di cellule dendritiche, macrofagi, monociti e cellule di Kupffer. L'infiammazione indotta da FcαRI svolge un ruolo cruciale nell'orchestrare la difesa dell'ospite umano contro gli agenti patogeni, nonché nella generazione dell'immunità tessuto-specifica. Inoltre, si ritiene che

⁶⁹⁷ Martin TC, et al
Decreased Immunoglobulin G Core Fucosylation, A Player in Antibody-dependent Cell-mediated Cytotoxicity, is Associated with Autoimmune Thyroid Diseases.
Mol Cell Proteomics. 2020 May;19(5):774-792. doi: 10.1074/mcp.RA119.001860.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7196582/>

⁶⁹⁸ Lauc G, et al
Loci associated with N-glycosylation of human immunoglobulin G show pleiotropy with autoimmune diseases and haematological cancers.
PLoS Genet. 2013;9(1):e1003225. doi: 10.1371/journal.pgen.1003225.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3561084/>

⁶⁹⁹ Klasić M, et al
IBD consortium, Lauc G, Zoldoš V. Promoter methylation of the MGAT3 and BACH2 genes correlates with the composition of the immunoglobulin G glycome in inflammatory bowel disease.
Clin Epigenetics. 2018 Jun 4;10:75. doi: 10.1186/s13148-018-0507-y.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5987481/>

l'infiammazione indotta da Fc α RI sia coinvolta nella patogenesi di vari disturbi infiammatori cronici, tra cui la malattia infiammatoria intestinale, la celiachia e l'artrite reumatoide.⁷⁰⁰

Una delle malattie infiammatorie croniche meglio studiate correlate alla N-glicosilazione delle IgA è la nefropatia da IgA (IgAN). Uno studio di Dotz et al. ha dimostrato che una diminuzione della sialilazione e galattosilazione N-linked e un aumento della bisezione di IgAN sono associati a un peggioramento della funzione renale.⁷⁰¹

Immunoglobuline E

l'immunoglobulina E (IgE) è meglio conosciuta per il suo ruolo nelle risposte immunitarie allergiche.

In particolare, le IgE si legano ai recettori IgE ad alta affinità (Fc ϵ RI) espressi sulla superficie dei basofili e dei mastociti, innescando la degranulazione e il rilascio di mediatori proinfiammatori⁷⁰².

L'IgE è l'immunoglobulina più glicosilata, con sette siti di N-glicosilazione⁷⁰³ e tra questi in particolare il sito di N-glicosilazione in Asn394, costituito esclusivamente da oligomannosi N-glicani, è fondamentale per l'inizio della cascata allergica mediata da IgE.

Mutazioni aminoacidiche specifiche o la completa deglicosilazione di Asn394 alterano la struttura delle IgE secondarie, abolendo il legame Fc ϵ RI e la successiva degranulazione e anafilassi mediata da IgE⁷⁰⁴.

È interessante notare che la mutazione di tutti gli altri siti N-linked delle IgE, che consistono in N-glicani complessi, non hanno quasi alcun effetto sulla capacità delle IgE di suscitare una risposta anafilattica⁷⁰⁵.

Immunoglobuline M

L'immunoglobulina M (IgM) è il più grande anticorpo nel siero e il suo livello è elevato in varie malattie infiammatorie e autoimmuni⁷⁰⁶.

È un altro anticorpo altamente N-glicosilato, poiché il suo dominio costante contiene cinque siti di glicosilazione N-linked, tre dei quali appartengono alla forma complessa biantennaria (Asn171, Asn332, Asn395) e due al tipo oligomannoso (ad Asn402, Asn563)⁷⁰⁷.

⁷⁰⁰ Hansen IS, Baeten DLP, den Dunnen J.

The inflammatory function of human IgA. *Cell Mol Life Sci.* 2019 Mar;76(6):1041-1055. doi: 10.1007/s00018-018-2976-8. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6513800/>

⁷⁰¹ Dotz V, Visconti A, Lomax-Browne HJ, Clerc F, Hipgrave Ederveen AL, Medjeral-Thomas NR, Cook HT, Pickering MC, Wuhrer M, Falchi M.

O- and N-Glycosylation of Serum Immunoglobulin A is Associated with IgA Nephropathy and Glomerular Function. *J Am Soc Nephrol.* 2021 Oct;32(10):2455-2465. doi: 10.1681/ASN.2020081208. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34127537/>

⁷⁰² Gould HJ, Sutton BJ.

IgE in allergy and asthma today. *Nat Rev Immunol.* 2008 Mar;8(3):205-17. doi: 10.1038/nri2273. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18301424/>

⁷⁰³ Dorrington KJ, Bennich HH.

Structure-function relationships in human immunoglobulin E. *Immunol Rev.* 1978;41:3-25. doi: 10.1111/j.1600-065x.1978.tb01458.x. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/100912/>

⁷⁰⁴ Sayers I, Cain SA, Swan JR, Pickett MA, Watt PJ, Holgate ST, Padlan EA, Schuck P, Helm BA.

Amino acid residues that influence Fc epsilon RI-mediated effector functions of human immunoglobulin E. *Biochemistry.* 1998 Nov 17;37(46):16152-64. doi: 10.1021/bi981456k. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9819207/>

⁷⁰⁵ Shade KT, Platzer B, Washburn N, Mani V, Bartsch YC, Conroy M, Pagan JD, Bosques C, Mempel TR, Fiebiger E, Anthony RM.

A single glycan on IgE is indispensable for initiation of anaphylaxis. *J Exp Med.* 2015 Apr 6;212(4):457-67. doi: 10.1084/jem.20142182. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4387292/>

⁷⁰⁶ Karlsson M.

IgM and IgD in Infection and Inflammatory Diseases. In: *Molecular and Cellular Mechanisms of Antibody Activity.* New York, NY: Springer; (2013). doi: 10.1007/978-1-4614-7107-3_1

⁷⁰⁷ Arnold JN, Wormald MR, Sim RB, Rudd PM, Dwek RA.

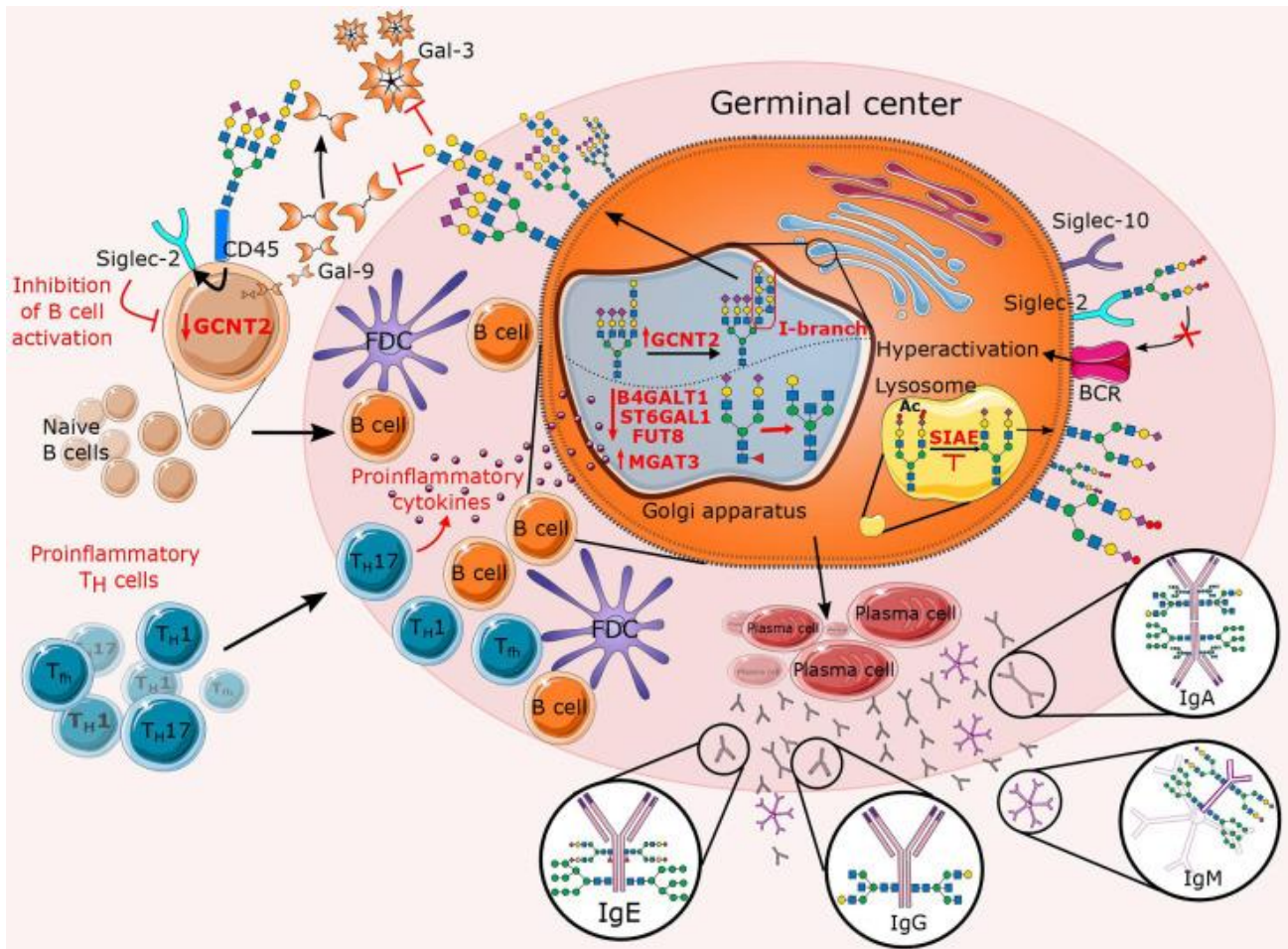
The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annu Rev Immunol.* 2007;25:21-50. doi: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141702.

Gli N-glicani oligomannosi hanno dimostrato di essere importanti per il legame MBL e la successiva eliminazione degli aggregati di IgM mediante opsonizzazione ⁷⁰⁸, mentre gli N-glicani complessi sono coinvolti nell'immunomodulazione dei linfociti T e B.

Colucci et al hanno dimostrato che i glicani N-linked sialilati inducono l'internalizzazione delle IgM da parte delle cellule T, che a sua volta provoca l'inibizione delle risposte delle cellule T.

Gli autori hanno quindi ipotizzato che l'immunosoppressione IgM-mediata avvenga attraverso il legame delle IgM sialilate al recettore Fc delle IgM costitutivamente espresso (FcμR) sulla superficie dei linfociti T ⁷⁰⁹.

Questi risultati supportano il concetto che la presenza di acido α2,6-sialico sulle Igs contribuisce all'immunosoppressione, come precedentemente dimostrato per gli effetti antinfiammatori della terapia immunoglobulinica endovenosa (IVIg) ⁷¹⁰.



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9272703/>

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17029568/>

⁷⁰⁸ Arnold JN, Wormald MR, Suter DM, Radcliffe CM, Harvey DJ, Dwek RA, Rudd PM, Sim RB. Human serum IgM glycosylation: identification of glycoforms that can bind to mannan-binding lectin. *J Biol Chem.* 2005 Aug 12;280(32):29080-7. doi: 10.1074/jbc.M504528200. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504528200>

⁷⁰⁹ Colucci M, Stöckmann H, Butera A, Masotti A, Baldassarre A, Giorda E, Petrini S, Rudd PM, Sitia R, Emma F, Vivarelli M. Sialylation of N-linked glycans influences the immunomodulatory effects of IgM on T cells. *J Immunol.* 2015 Jan 1;194(1):151-7. doi: 10.4049/jimmunol.1402025. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402025>

⁷¹⁰ Schwab I, Nimmerjahn F. Intravenous immunoglobulin therapy: how does IgG modulate the immune system? *Nat Rev Immunol.* 2013 Mar;13(3):176-89. doi: 10.1038/nri3401. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23411799/>

Panoramica delle vie alterate della N-glicosilazione per quanto riguarda i linfociti B durante l'infiammazione cronica. In presenza di stimoli proinfiammatori, le cellule T infiammatorie influenzano significativamente la proliferazione delle cellule B e il loro profilo N-glicano deregolando un sottoinsieme specifico di glicosiltransferasi (B4GALT1, ST6GAL1, FUT8, MGAT3 e GCNT2). Quest'ultimo si riflette in un aumento di caratteristiche come la bisezione di GlcNAc, agalattosilazione, afucosilazione e presenza di rami I che hanno dimostrato di inibire il legame di Gal-3 e Gal-9. Oltre agli enzimi del Golgi interessati, anche l'acetil esterasi dell'acido sialico lisosomiale (SIAE) è sottoregolata in modo che non sia in grado di deacetilare gli acidi sialici, che è necessario per l'immunomodulazione della segnalazione del recettore delle cellule B (BCR). Questa cifra riassume anche il Fc N-glicome delle immunoglobuline secrete, che riflette i cambiamenti correlati all'infiammazione che possono ulteriormente contribuire alla progressione della malattia.

Proteine della fase acuta (APP - Acute-phase proteins)

Le APP sono proteine principalmente sintetizzate e secrete dagli epatociti.

Durante l'infiammazione, le citochine proinfiammatorie come IL-1, IL-8, IL-6 e TNFalfa stimolano la risposta di fase acuta ⁷¹¹, aumentando i livelli sierici di APP fino a 1000 volte ⁷¹².

Diverse APP sono glicoproteine e sono stati osservati cambiamenti nei loro N-glicani nell'infiammazione cronica. I cambiamenti più significativi della N-glicosilazione osservati nelle APP sono l'elevata ramificazione (glicani tri e tetra-antennari) e l'aumento dei livelli di epitopo sLex rilevato sull'aptoglobina (HPT), glicoproteina acida $\alpha 1$ (AGP-1), $\alpha 1$ -antitripsina (A1AT) e $\alpha 1$ -antichimotripsina (ACT) ⁷¹³.

⁷¹¹ Hannoodee S, Nasuruddin DN.

Acute Inflammatory Response. [Updated 2021 Nov 21]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556083/>

Anglin RE, Rosebush PI, Mazurek MF.

Neuroleptic malignant syndrome: a neuroimmunologic hypothesis.

CMAJ. 2010 Dec 14;182(18):E834-8. doi: 10.1503/cmaj.091442.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3001529/>

Baumann H, Won KA, Jahreis GP.

Human hepatocyte-stimulating factor-III and interleukin-6 are structurally and immunologically distinct but regulate the production of the same acute phase plasma proteins.

J Biol Chem. 1989 May 15;264(14):8046-51.

[https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(18\)83148-9/pdf](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(18)83148-9/pdf)

Wigmore SJ, Fearon KC, Maingay JP, Lai PB, Ross JA.

Interleukin-8 can mediate acute-phase protein production by isolated human hepatocytes.

Am J Physiol. 1997 Oct;273(4):E720-6. doi: 10.1152/ajpendo.1997.273.4.E720.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9357801/>

Ceciliani F, Giordano A, Spagnolo V.

The systemic reaction during inflammation: the acute-phase proteins.

Protein Pept Lett. 2002 Jun;9(3):211-23. doi: 10.2174/0929866023408779.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12144517/>

⁷¹² Gabay C, Kushner I.

Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation.

N Engl J Med. 1999 Feb 11;340(6):448-54. doi: 10.1056/NEJM199902113400607. Erratum in: N Engl J Med 1999 Apr 29;340(17):1376.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9971870/>

⁷¹³ Arnold JN, Saldova R, Hamid UM, Rudd PM.

Evaluation of the serum N-linked glycome for the diagnosis of cancer and chronic inflammation.

Proteomics. 2008 Aug;8(16):3284-93. doi: 10.1002/pmic.200800163.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18646009/>

Gornik O, Lauc G.

Glycosylation of serum proteins in inflammatory diseases.

Dis Markers. 2008;25(4-5):267-78. doi: 10.1155/2008/493289.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3827815/>

Higai K, Aoki Y, Azuma Y, Matsumoto K.

Glycosylation of site-specific glycans of alpha1-acid glycoprotein and alterations in acute and chronic inflammation.

Biochim Biophys Acta. 2005 Aug 30;1725(1):128-35. doi: 10.1016/j.bbagen.2005.03.012.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15863355/>

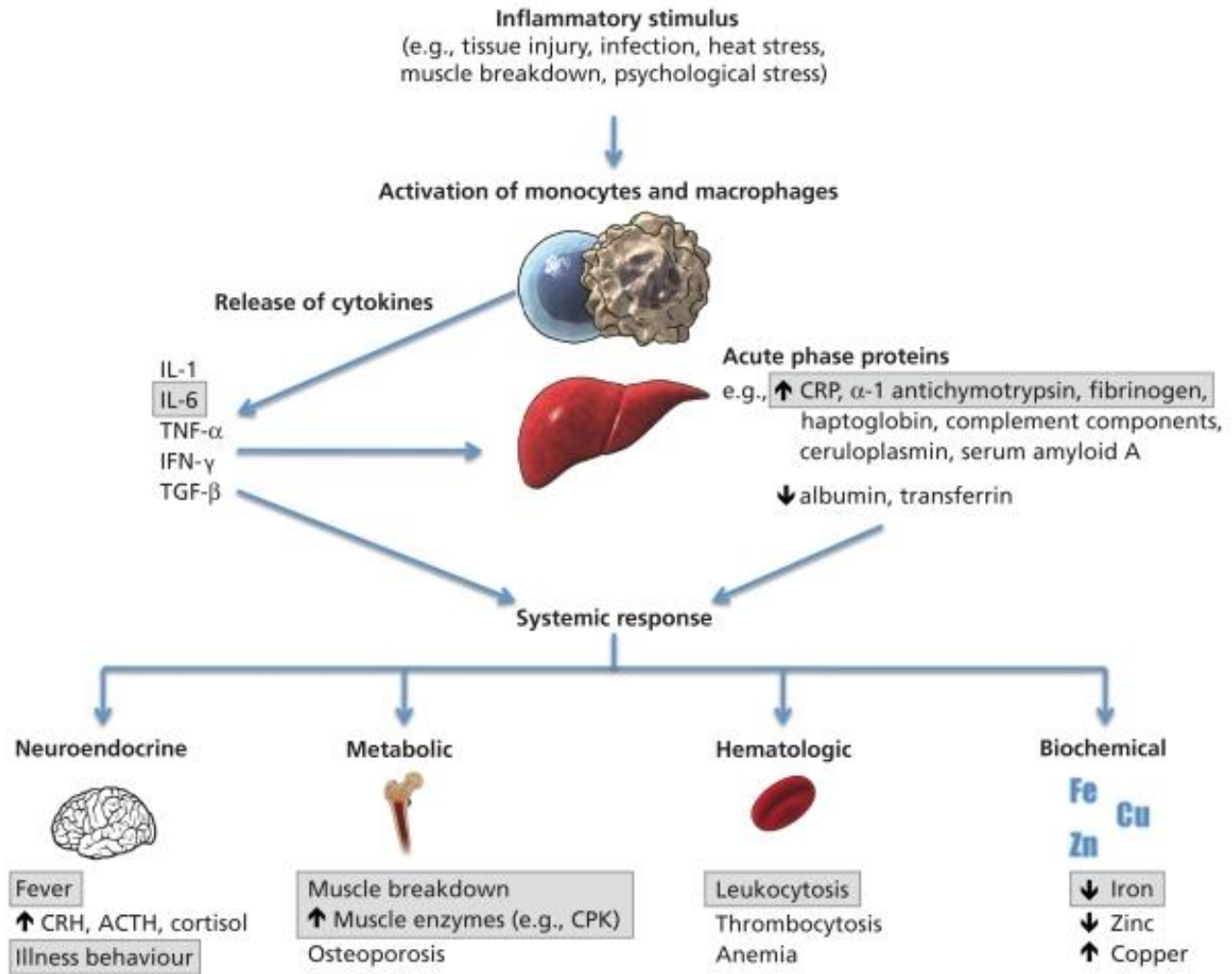
Brinkman-van der Linden EC, de Haan PF, Havenaar EC, van Dijk W.

Inflammation-induced expression of sialyl LewisX is not restricted to alpha1-acid glycoprotein but also occurs to a lesser extent on alpha1-antichymotrypsin and haptoglobin.

Glycoconj J. 1998 Feb;15(2):177-82. doi: 10.1023/a:1006972307166.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9557878/>

Le citochine proinfiammatorie IL-1 β , IL-6 e TNF α , coinvolte nell'induzione della risposta di fase acuta, possono anche essere coinvolte nella regolazione della biosintesi dei glicani delle APP negli epatociti.⁷¹⁴



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3001529/>

La risposta in fase acuta. Uno stimolo infiammatorio provoca l'attivazione di monociti e macrofagi che rilasciano citochine. Le citochine agiscono sul fegato per stimolare la produzione di proteine della fase acuta. Le citochine, insieme alle proteine di fase acuta, generano una risposta sistemica, con alterazioni neuroendocrine, metaboliche, ematologiche e biochimiche. Le caratteristiche della risposta di fase acuta che sono state direttamente osservate e misurate nella sindrome neurolettica maligna sono mostrate nei riquadri. Nota: ACTH = ormone adrenocorticotropo, CPK = creatina fosfochinasi, CRH = ormone di rilascio della corticotropina, CRP = proteina C-reattiva, IFN = interferone, IL = interleuchina, TGF = fattore di crescita trasformante, TNF = fattore di necrosi tumorale.

⁷¹⁴ Azuma Y, Murata M, Matsumoto K.

Alteration of sugar chains on alpha(1)-acid glycoprotein secreted following cytokine stimulation of HuH-7 cells in vitro.

Clin Chim Acta. 2000 Apr;294(1-2):93-103. doi: 10.1016/s0009-8981(99)00248-x.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10727676/>

Higai K, Miyazaki N, Azuma Y, Matsumoto K.

Interleukin-1beta induces sialyl Lewis X on hepatocellular carcinoma HuH-7 cells via enhanced expression of ST3Gal IV and FUT VI gene.

FEBS Lett. 2006 Nov 13;580(26):6069-75. doi: 10.1016/j.febslet.2006.09.073.

<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.09.073>

Wang Y, Kinzie E, Berger FG, Lim SK, Baumann H.

Haptoglobin, an inflammation-inducibile plasma protein.

Redox Rep. 2001;6(6):379-85. doi: 10.1179/135100001101536580.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11865981/>

Glicosilazione e immunità intestinale

La glicosilazione è un meccanismo di regolazione centrale dell'omeostasi intestinale implicato in molti processi diversi, che vanno dall'auto-rinnovamento epiteliale, il mantenimento dell'integrità della barriera del muco intestinale al controllo dell'immunità intestinale.⁷¹⁵

La glicosilazione delle cellule epiteliali intestinali (IEC) ha dimostrato di essere importante nella modulazione della risposta immunitaria dell'ospite. È stato infatti dimostrato che l'espressione di α -1,2 fucosio sul lato apicale delle IEC le protegge dai batteri patogeni.

Questo processo di fucosilazione è essenziale nel mantenimento del microbiota commensale⁷¹⁶ ed è mediato dalle cellule linfoidi innate del gruppo 3 (ILC3)⁷¹⁷.

In particolare, i batteri commensali e patogeni, nonché i prodotti batterici (lipopolisaccaridi (LPS)) stimolano le ILC3 a produrre IL-22 che a sua volta induce la fucosilazione α -1,2 delle IEC.

Di conseguenza, i polimorfismi inattivanti della fucosiltransferasi (FUT) 2 (stato non secretore) sono associati a malattie infiammatorie⁷¹⁸.

Un altro componente della mucosa intestinale sono le cellule Paneth (PC), cellule epiteliali secretorie che agiscono come guardiani delle piccole cripte intestinali, controllano il microbiota e sono anche coinvolte nella formazione della zona delle cellule staminali delle piccole cripte intestinali e nella morfogenesi dell'asse cripta-villi (CVA).⁷¹⁹

Il compartimento della cripta ospita abbondanti glicoproteine ricche di mannosio, mentre la zona dei villi maturi contiene principalmente glicoproteine di tipo complesso.⁷²⁰

⁷¹⁵ Dias AM, Pereira MS, Padrão NA, Alves I, Marcos-Pinto R, Lago P, Pinho SS. Glycans as critical regulators of gut immunity in homeostasis and disease. *Cell Immunol.* 2018 Nov;333:9-18. doi: 10.1016/j.cellimm.2018.07.007. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30049413/>

⁷¹⁶ Goto Y, Obata T, et al. Innate lymphoid cells regulate intestinal epithelial cell glycosylation. *Science.* 2014 Sep 12;345(6202):1254009. doi: 10.1126/science.1254009. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4774895/>

⁷¹⁷ Artis D, Spits H. The biology of innate lymphoid cells. *Nature.* 2015 Jan 15;517(7534):293-301. doi: 10.1038/nature14189. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25592534/>

⁷¹⁸ McGovern DP, et al. International IBD Genetics Consortium. Fucosyltransferase 2 (FUT2) non-secretor status is associated with Crohn's disease. *Hum Mol Genet.* 2010 Sep 1;19(17):3468-76. doi: 10.1093/hmg/ddq248. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2916706/>

Franke A, et al. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genet.* 2010 Dec;42(12):1118-25. doi: 10.1038/ng.717. PMID: 21102463; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3299551/>

⁷¹⁹ Holly MK, Smith JG. Paneth Cells during Viral Infection and Pathogenesis. *Viruses.* 2018 Apr 26;10(5):225. doi: 10.3390/v10050225. PMID: 29701691; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5977218/>

Salzman NH, Underwood MA, Bevins CL. Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: a hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. *Semin Immunol.* 2007 Apr;19(2):70-83. doi: 10.1016/j.smim.2007.04.002. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17485224/>

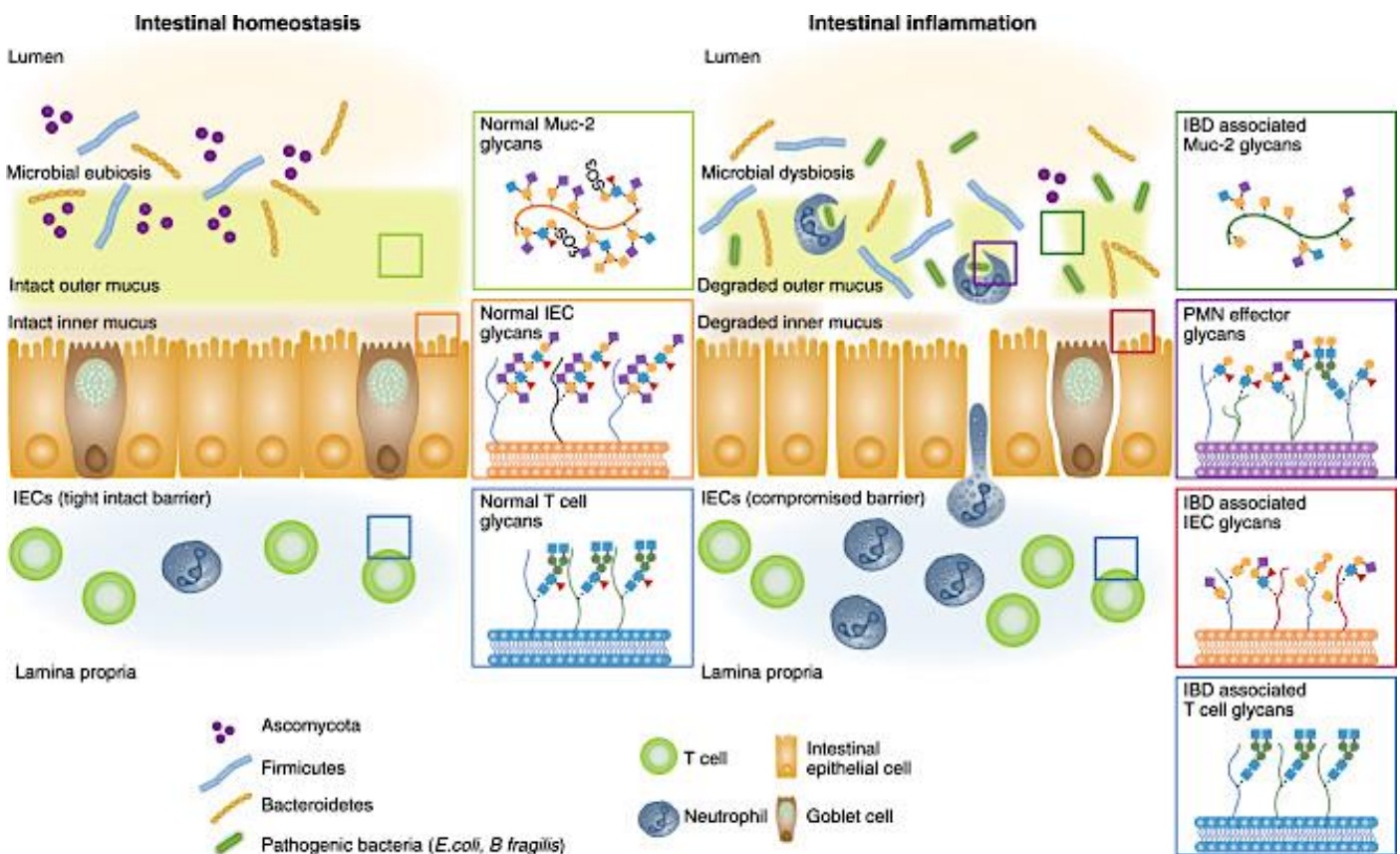
⁷²⁰ E. Köttgen E, Volk B, Kluge F, Gerok W. Gluten, a lectin with oligomannosyl specificity and the causative agent of gluten-sensitive enteropathy. *Biochem Biophys Res Commun.* 1982 Nov 16;109(1):168-73. doi: 10.1016/0006-291x(82)91580-7. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7159419/>

Boniotto M, Braida L, Baldas V, Not T, Ventura A, Vatta S, Radillo O, Tedesco F, Percopo S, Montico M, Amoroso A, Crovella S. Evidence of a correlation between mannosose binding lectin and celiac disease: a model for other autoimmune diseases. *J Mol Med (Berl).* 2005 Apr;83(4):308-15. doi: 10.1007/s00109-004-0623-3. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15645196/>

Rouhanifard et al ⁷²¹ hanno dimostrato che l'N-acetilattosammina terminale (LacNAc) delle PC contribuisce alla regolazione del comportamento delle cellule staminali a supporto del ruolo centrale della glicosilazione nel mantenimento dell'omeostasi della mucosa, attraverso il controllo della crescita e della differenziazione delle cellule staminali come evento critico per l'autorinnovamento dello strato epiteliale intestinale.

Una delle alterazioni più comuni della glicosilazione epiteliale osservata in condizioni di infiammazione intestinale cronica è l'espressione sovraregolata di glicani di superficie troncati o immaturi.⁷²²

Ramarker et al ⁷²³ hanno analizzato la superficie luminale di tessuti coloretali umani sani e neoplastici per la presenza e l'architettura del glicocalice *, una fitta rete di proteine altamente glicosilate, utilizzando la microscopia elettronica a trasmissione. Le analisi ultrastrutturali hanno mostrato che il 93% delle mucose sane era coperto da un glicocalice intatto. Al contrario, su oltre il 90% della superficie delle cellule neoplastiche il glicocalice era assente.



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8591159/>

Fälth-Magnusson K, Magnusson KE.

Elevated levels of serum antibodies to the lectin wheat germ agglutinin in celiac children lend support to the gluten-lectin theory of celiac disease.

Pediatr Allergy Immunol. 1995 May;6(2):98-102. doi: 10.1111/j.1399-3038.1995.tb00267.x.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7581728/>

⁷²¹ Rouhanifard SH, Lopez Aguilar A, Meng L, Moremen KW, Wu P.

Engineered Glycocalyx Regulates Stem Cell Proliferation in Murine Crypt Organoids.

Cell Chem Biol. 2018 Apr 19;25(4):439-446.e5. doi: 10.1016/j.chembiol.2018.01.010.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5910180/>

⁷²² Brazil JC, Parkos CA.

Finding the sweet spot: glycosylation mediated regulation of intestinal inflammation.

Mucosal Immunol. 2022 Feb;15(2):211-222. doi: 10.1038/s41385-021-00466-8.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8591159/>

⁷²³ Ramaker K, Bade S, Röckendorf N, Mecklein B, Vollmer E, Schultz H, Fröschle GW, Frey A.

Absence of the Epithelial Glycocalyx As Potential Tumor Marker for the Early Detection of Colorectal Cancer.

PLoS One. 2016 Dec 29;11(12):e0168801. doi: 10.1371/journal.pone.0168801.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5198998/>

Modello che mostra i cambiamenti nella glicosilazione della mucosa durante l'infiammazione intestinale.

Il pannello di sinistra mostra l'omeostasi intestinale con strati di muco intatti, eubiosi microbica ed espressione di glicani di superficie maturi. Il pannello di destra mostra l'infiammazione intestinale con strati di muco degradati, crescita eccessiva di batteri patogeni, aumento del traffico di PMN verso il lume e alterata espressione superficiale delle strutture dei glicani su cellule epiteliali, cellule immunitarie e mucine intestinali

Il Glicocalice

Per proteggere la mucosa intestinale da agenti patogeni e stress meccanici, le cellule epiteliali generano strati protettivi costituiti principalmente da glicoproteine secrete e transmembrana che rivestono l'intero tratto intestinale definite glicocalice.⁷²⁴

Nell'intestino tenue, lo strato di glicocalice ricopre direttamente l'intera superficie delle cellule epiteliali,⁷²⁵ mentre lo strato di muco lubrificante sovrastante è sottile e discontinuo⁷²⁶.

Il glicocalice comprende glicoproteine e glicolipidi altamente diversificati espressi sulla membrana cellulare epiteliale, molti dei quali fungono da recettori per l'adesione batterica⁷²⁷.

Il glicocalice funge quindi da sito di attacco per la flora normale per limitare la colonizzazione da parte di agenti patogeni, oltre a fungere da barriera di diffusione selettiva per le dimensioni, per escludere batteri e virus deleteri.⁷²⁸

⁷²⁴ Sun WW, Krystofiak ES, Leo-Macias A, Cui R, Sesso A, Weigert R, Ebrahim S, Kachar B.

Nanoarchitecture and dynamics of the mouse enteric glycocalyx examined by freeze-etching electron tomography and intravital microscopy.

Commun Biol. 2020 Jan 7;3(1):5. doi: 10.1038/s42003-019-0735-5.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6946683/>

⁷²⁵ Egberts HJ, Koninkx JF, van Dijk JE, Mouwen JM.

Biological and pathobiological aspects of the glycocalyx of the small intestinal epithelium. A review.

Vet Q. 1984 Sep;6(4):186-99. doi: 10.1080/01652176.1984.9693936.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6388138/>

Pelaseyed T, et al

The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system.

Immunol Rev. 2014 Jul;260(1):8-20. doi: 10.1111/imr.12182.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4281373/>

Moran AP, Gupta A, Joshi L.

Sweet-talk: role of host glycosylation in bacterial pathogenesis of the gastrointestinal tract.

Gut. 2011 Oct;60(10):1412-25. doi: 10.1136/gut.2010.212704.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21228430/>

⁷²⁶ Linden SK, Sutton P, Karlsson NG, Korolik V, McGuckin MA.

Mucins in the mucosal barrier to infection.

Mucosal Immunol. 2008 May;1(3):183-97. doi: 10.1038/mi.2008.5.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7100821/>

⁷²⁷ Hooper LV, Gordon JI.

Glycans as legislators of host-microbial interactions: spanning the spectrum from symbiosis to pathogenicity.

Glycobiology. 2001 Feb;11(2):1R-10R. doi: 10.1093/glycob/11.2.1r.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11287395/>

Corfield AP, Wiggins R, Edwards C, Myerscough N, Warren BF, Soothill P, Millar MR, Horner P.

A sweet coating--how bacteria deal with sugars.

Adv Exp Med Biol. 2003;535:3-15.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14714885/>

Barnich N, Carvalho FA, Glasser AL, Darcha C, Jantschke P, Allez M, Peeters H, Bommelaer G, Desreumaux P, Colombel JF, Darfeuille-Michaud A.

CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive E. coli, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease.

J Clin Invest. 2007 Jun;117(6):1566-74. doi: 10.1172/JCI30504.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1868786/>

⁷²⁸ Howe SE, Lickteig DJ, Plunkett KN, Ryerse JS, Konjufca V.

The uptake of soluble and particulate antigens by epithelial cells in the mouse small intestine.

PLoS One. 2014 Jan 27;9(1):e86656. doi: 10.1371/journal.pone.0086656.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3903549/>

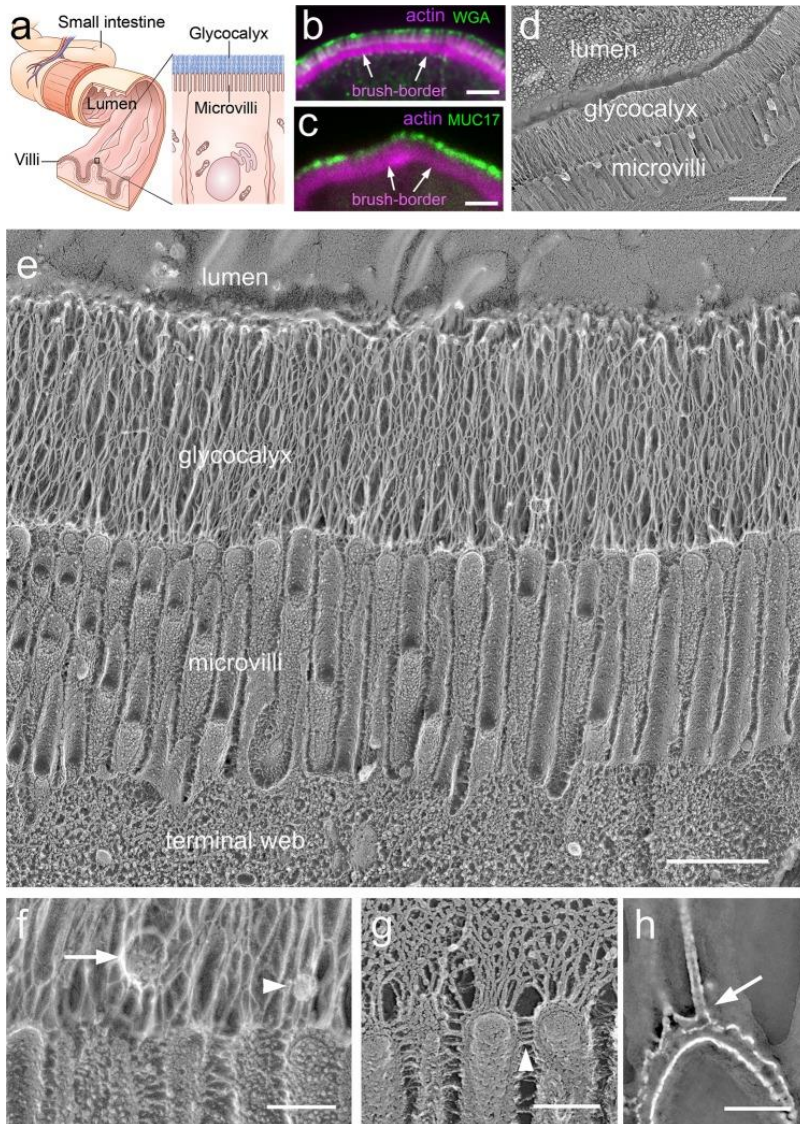
Stonebraker JR, Wagner D, Lefensty RW, Burns K, Gendler SJ, Bergelson JM, Boucher RC, O'Neal WK, Pickles RJ.

Glycocalyx restricts adenoviral vector access to apical receptors expressed on respiratory epithelium in vitro and in vivo: role for tethered mucins as barriers to luminal infection.

J Virol. 2004 Dec;78(24):13755-68. doi: 10.1128/JVI.78.24.13755-13768.2004.

Oltre a questi ruoli protettivi, il glicocalice intestinale contribuisce alla lubrificazione e all'idrofobicità della superficie mucosa ⁷²⁹, previene l'autodigestione e l'ulcerazione della mucosa, partecipa alla segnalazione cellulare e funge da barriera selettiva alla diffusione di sostanze sia endogene che esogene.

Dati questi molteplici ruoli nella funzione intestinale e nell'omeostasi, non sorprende che la compromissione del glicocalice sia implicata in una serie di malattie del tratto intestinale, comprese le malattie infiammatorie intestinali e il cancro. ⁷³⁰



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6946683/>

Il glicocalice enterico forma uno strato transcellulare uniforme che ricopre il bordo del pennello ricco di microvilli.

a) Schema del lume dell'intestino tenue, che è contorto in villi. Vista ravvicinata di un enterocita che mostra lo strato di glicocalice sopra i suoi microvilli. **b, c)** Le crio-sezioni dell'intestino tenue del topo sono state immunomarcate con (in alto) WGA (verde) e (in basso) umano anti-MUC17 (verde) per evidenziare la conca di glicocalice sopra il bordo del pennello ricco di actina (magenta).

d) Micrografia elettronica di una replica freeze-etch dell'intestino tenue del topo che mostra l'organizzazione stratificata del bordo del pennello ricco di microvilli e degli strati di glicocalice. **e)** Vista ravvicinata della regione apicale di un enterocita, che mostra il glicocalice che separa i microvilli del bordo della spazzola dal lume intestinale.

f) Maggiore ingrandimento dei microvilli che evidenziano i filamenti di glicocalice che emergono dalle punte distali dei microvillari. Questo pannello mostra anche una vescicola (freccia) e una struttura globulare (punta di freccia) incorporata nella rete del glicocalice. **g)** L'immagine di un campione non fissato conferma una rete di glicocalice emergente dalle punte dei microvillari. I filamenti di glicocalice emergono dalle punte dei microvilli e possono essere distinti dai collegamenti laterali tra i microvilli (punte di freccia). **h)** Singola fetta tomografica da 2 nm attraverso la punta di un microvillo che mostra che i filamenti colonnari emergono dalla membrana (freccia) coerenti con una mucina transmembrana. Barre di scala: b, c = 2 µm; d = 1 µm; e = 500 nm; f, h = 100 nm; g = 50 nm.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC533903/>

Frey A, Giannasca KT, Weltzin R, Giannasca PJ, Reggio H, Lencer WI, Neutra MR. Role of the glycocalyx in regulating access of microparticles to apical plasma membranes of intestinal epithelial cells: implications for microbial attachment and oral vaccine targeting.

J Exp Med. 1996 Sep 1;184(3):1045-59. doi: 10.1084/jem.184.3.1045.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2192803/>

⁷²⁹ Butler BD, Lichtenberger LM, Hills BA.

Distribution of surfactants in the canine gastrointestinal tract and their ability to lubricate.

Am J Physiol. 1983 Jun;244(6):G645-51. doi: 10.1152/ajpgi.1983.244.6.G645.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6859272/>

⁷³⁰ van Putten JPM, Strijbis K.

Transmembrane Mucins: Signaling Receptors at the Intersection of Inflammation and Cancer.

J Innate Immun. 2017;9(3):281-299. doi: 10.1159/000453594.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5516414/>

Studi di associazione sull'intero genoma (GWAS) hanno identificato forti associazioni tra la suscettibilità all'IBD e polimorfismi nelle $\alpha 1-2$ fucosiltransferasi intestinali (FUT1 e FUT2).⁷³¹

E' interessante notare che gli antigeni del gruppo sanguigno ABO derivano dalla modifica dei residui Gal terminali mediante l'aggiunta di $\alpha 1,2$ Fuc (antigene H) (vedi in seguito), e che FUT2 codifica per l'antigene H nelle cellule epiteliali intestinali che rivestono il tratto gastrointestinale, mentre FUT1 è necessario per la sintesi di queste strutture sugli eritrociti.⁷³²

Vari studi hanno permesso di stabilire che gli antigeni epiteliali correlati all'ABO influenzano fortemente la composizione microbica intestinale fungendo da epitopi leganti per alcuni microbi intestinali tra cui *Helicobacter pylori* e *Norovirus*, e agendo come fonte di carbonio per specie batteriche come *Escherichia coli*.⁷³³

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30049413/>

Impatto della glicosilazione nell'omeostasi intestinale e nell'infiammazione. Durante il passaggio dalla mucosa intestinale normale a quella infiammata si verificano cambiamenti nel repertorio dei glicani. L'espressione aberrante di glicani specifici che accompagnano l'infiammazione intestinale ha un impatto non solo sulla risposta immunitaria dell'ospite, ma anche sul contenuto e sulle funzioni del microbiota. La composizione dei glicani, in particolare nelle mucine, è fondamentale per mantenere la funzione protettiva della barriera intestinale contro il microbiota patogeno. In particolare, la fucosilazione $\alpha-1,2$ catalizzata da FUT2 nelle cellule epiteliali è fondamentale per mantenere il microbiota commensale proteggendo dai microrganismi patogeni. La perdita dell'integrità della mucosa provoca l'invasione di agenti patogeni in concomitanza con una cascata di eventi infiammatori mediati da cellule dendritiche, macrofagi, neutrofili e successivamente da cellule T. Questi microrganismi patogeni possono trarre vantaggio dai glicani dell'ospite, attraverso l'attività della glicosidasi come strategie per "sfuggire" al riconoscimento da parte del sistema immunitario dell'ospite. Questo processo selettivo dà origine alla disbiosi che nei disturbi intestinali, come nelle IBD, è caratterizzata da una diminuzione della diversità del microbiota (meno Firmicutes e più Proteobacteria) e un rapporto Funghi di Basidiomycota/Ascomycota più elevato. A livello della lamina propria, è noto che le alterazioni della glicosilazione regolano la risposta immunitaria mediata dai linfociti T. In omeostasi, l'espressione degli N-glicani ramificati $\beta 1,6$ GlcNAc, catalizzati da GnT-V è cruciale per controllare la funzione e la segnalazione del recettore delle cellule T (TCR). In questo processo, specifiche proteine di riconoscimento dei carboidrati come le galectine (Galectin-3) riconoscono la catena allungata (polilattosamina)

⁷³¹ McGovern DP, et al International IBD Genetics Consortium.

Fucosyltransferase 2 (FUT2) non-secretor status is associated with Crohn's disease.

Hum Mol Genet. 2010 Sep 1;19(17):3468-76. doi: 10.1093/hmg/ddq248.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2916706/>

Franke A, et al

Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci.

Nat Genet. 2010 Dec;42(12):1118-25. doi: 10.1038/ng.717.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3299551/>

Wu H, Sun L, Lin DP, Shao XX, Xia SL, Lv M.

Association of Fucosyltransferase 2 Gene Polymorphisms with Inflammatory Bowel Disease in Patients from Southeast China.

Gastroenterol Res Pract. 2017;2017:4148651. doi: 10.1155/2017/4148651.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5266819/>

Parmar AS, et al

Association study of FUT2 (rs601338) with celiac disease and inflammatory bowel disease in the Finnish population.

Tissue Antigens. 2012 Dec;80(6):488-93. doi: 10.1111/tan.12016.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23075394/>

Hu D, Zhang D, Zheng S, Guo M, Lin X, Jiang Y.

Association of Ulcerative Colitis with FUT2 and FUT3 Polymorphisms in Patients from Southeast China.

PLoS One. 2016 Jan 14;11(1):e0146557. doi: 10.1371/journal.pone.0146557.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4713070/>

⁷³² Stanley P, Cummings RD.

Structures Common to Different Glycans. 2017. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors.

Essentials of Glycobiology [Internet]. 3rd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015-2017. Chapter 14.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK453042/> doi: 10.1101/glycobiology.3e.014

⁷³³ Shirato H, Ogawa S, Ito H, Sato T, Kameyama A, Narimatsu H, Xiaofan Z, Miyamura T, Wakita T, Ishii K, Takeda N.

Noroviruses distinguish between type 1 and type 2 histo-blood group antigens for binding.

J Virol. 2008 Nov;82(21):10756-67. doi: 10.1128/JVI.00802-08.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2573190/>

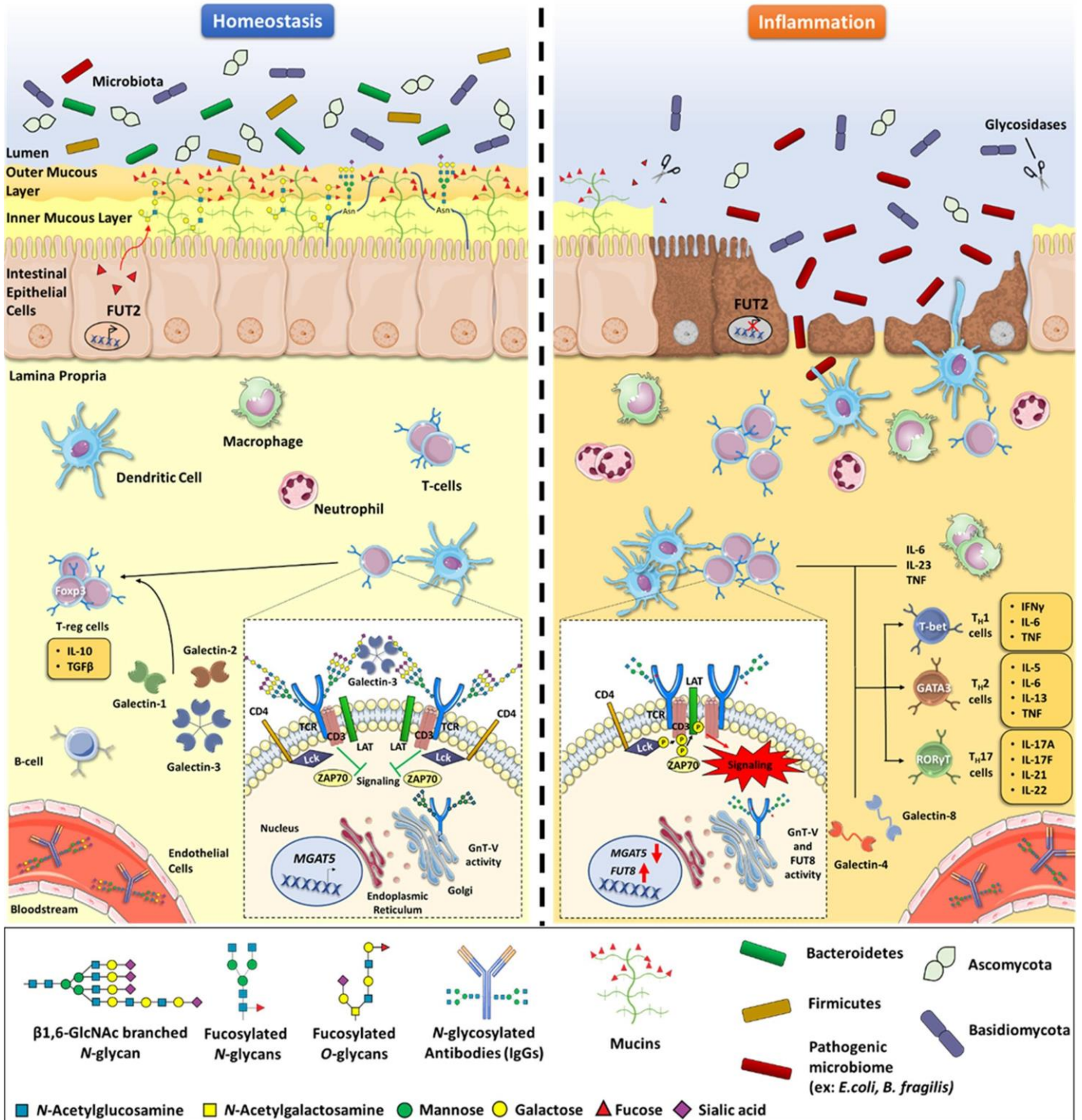
Pacheco AR, Curtis MM, Ritchie JM, Munera D, Waldor MK, Moreira CG, Sperandio V.

Fucose sensing regulates bacterial intestinal colonization.

Nature. 2012 Dec 6;492(7427):113-7. doi: 10.1038/nature11623.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3518558/>

degli N-glicani ramificati formando un "reticolo" che preclude il raggruppamento del TCR e in questo modo controlla la soglia di attivazione dei linfociti T. Altre galectine, come Galectin-1 e Galectin-2, sono importanti anche nel controllo della risposta immunitaria mediata dai linfociti T verso una risposta regolatoria T. È importante sottolineare che, in condizioni omeostatiche, è stato descritto che il profilo della glicosilazione delle IgG rilasciate nel siero mostra N-glicani galattosilati e terminali sialilati nella porzione Fc. Nell'infiammazione intestinale, alterazioni specifiche dell'espressione dei glicani, in particolare la sovraregolazione dell' α -1-6 fucosiltransferasi (FUT8) con sovraespressione del core fucose e la downregulation del gene MGAT5 con ridotta espressione degli N-glicani ramificati mediati da GnT-V, hanno un impatto negativo in Risposta dei linfociti T. Questa alterata espressione di N-glicani (ramificato e core-fucosilato) porta all'iperattivazione delle cellule T e alla segnalazione dei linfociti T intestinali, essendo anche associata a una differenziazione delle cellule T verso le risposte immunitarie Th1 e Th17. Inoltre, l'espressione delle galectine 4 e 8 stimola ulteriormente la proliferazione delle cellule T nella colite. Inoltre, nell'infiammazione intestinale (come nell'IBD) il profilo di espressione delle IgG sieriche è diverso dall'omeostasi, essendo caratterizzato principalmente dall'agalattosilazione.



Glico-RNA

I glicani modificano i lipidi e le proteine per mediare le interazioni intermolecolari e intramolecolari in tutti i domini della vita, tanto che Rabinovich et al nel loro articolo *"Glycobiology of immune response"*⁷³⁴ chiamano gli acidi nucleici "cugini" dei carboidrati, in quanto sia il DNA che l'RNA sono essenzialmente polisaccaridi composti da nuclei di poliribosio legati al fosfato. Senza carboidrati, gli acidi nucleici non formerebbero l'impalcatura lineare necessaria per la loro funzione.

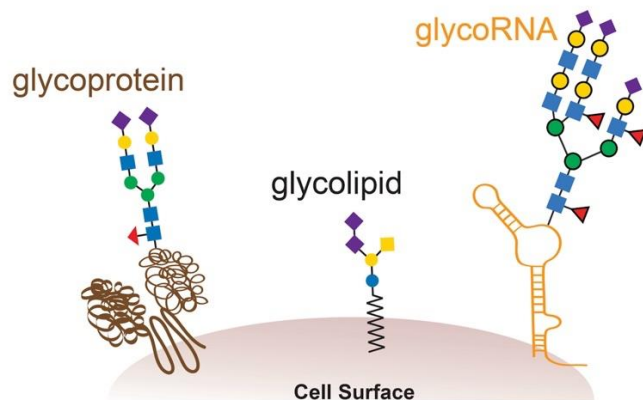
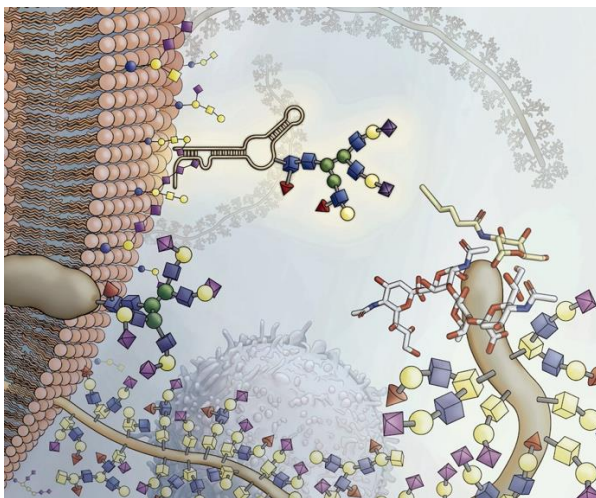
Allo stesso modo, definiscono proteine e carboidrati "coinquilini" perché nei mammiferi i carboidrati sono quasi sempre associati a proteine o lipidi.

Nonostante questa simpatica metafora, non si è mai ritenuto che l'RNA fosse uno dei principali bersagli della glicosilazione.

Flynn et al, nel loro articolo *"Small RNAs are modified with N-glycans and displayed on the surface of living cells"*⁷³⁵ sfidano questo punto di vista con l'evidenza che i mammiferi usano l'RNA come terza impalcatura per la glicosilazione. Utilizzando una batteria di approcci chimici e biochimici, hanno scoperto che gli small RNA non codificanti conservati portano glicani sialilati.

Questi "glicoRNA" erano presenti in più tipi di cellule e specie di mammiferi, in cellule coltivate e *in vivo*. L'assemblaggio del glicoRNA dipende dal macchinario per la biosintesi dell'N-glicano canonico e si traduce in strutture arricchite in acido sialico e fucosio.

L'analisi delle cellule viventi ha rivelato che la maggior parte dei glicoRNA era presente sulla superficie cellulare e può interagire con anticorpi anti-dsRNA e membri della famiglia dei recettori Siglec.



<https://www.hhmi.org/news/some-rna-molecules-have-unexpected-sugar-coating>

La scoperta di anticorpi contro un numero impressionante di RNA, da soli o in complesso con proteine glicosilate, che causano varie malattie autoimmuni suggerisce l'esistenza di un'interfaccia diretta tra la biologia dell'RNA e la glicobiologia e un ruolo ampliato per l'RNA nella biologia extracellulare.⁷³⁶

⁷³⁴ Rabinovich GA, van Kooyk Y, Cobb BA. Glycobiology of immune responses. *Ann N Y Acad Sci.* 2012 Apr;1253:1-15. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06492.x. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3884643/>

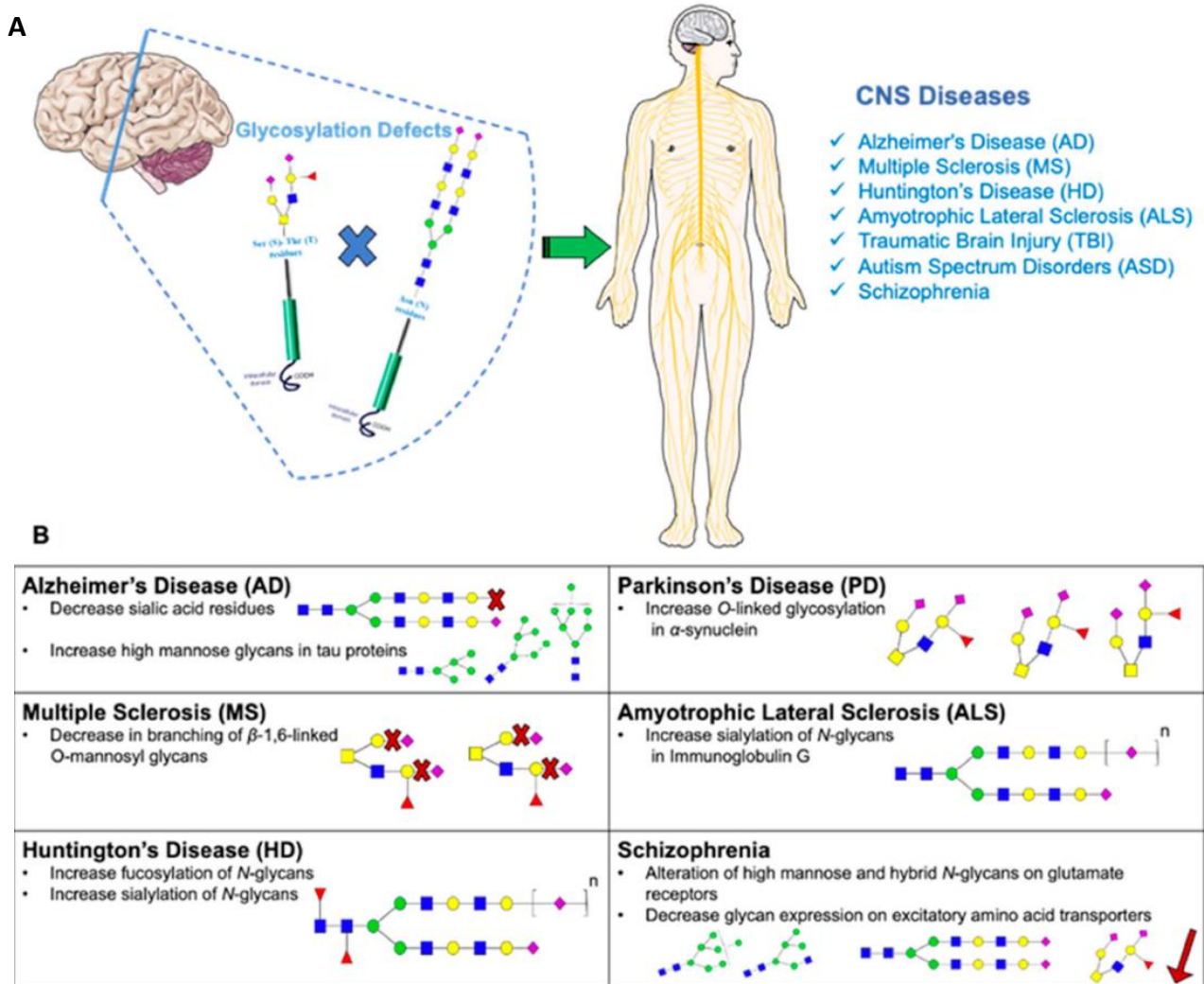
⁷³⁵ Flynn RA, Pedram K, Malaker SA, Batista PJ, Smith BAH, Johnson AG, George BM, Majzoub K, Villalta PW, Carette JE, Bertozzi CR. Small RNAs are modified with N-glycans and displayed on the surface of living cells. *Cell.* 2021 Jun 10;184(12):3109-3124.e22. doi: 10.1016/j.cell.2021.04.023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9097497/>

⁷³⁶ Ryan A. Flynn, et al Mammalian Y RNAs are modified at discrete guanosine residues with N-glycans bioRxiv 787614; doi: <https://doi.org/10.1101/787614> <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/787614v1.full.pdf>

Glicosilazione e malattie neurodegenerative

Nell'ultimo decennio, i ricercatori hanno lavorato a lungo per svelare le relazioni tra glicoproteine e malattie neurodegenerative, tra cui il morbo di Alzheimer (AD), il morbo di Parkinson (PD), la malattia di Huntington (HD), la sclerosi multipla (SM) e la sclerosi laterale amiotrofica (SLA).⁷³⁷

Nella figura seguente sono rappresentate le conseguenze dei difetti della glicosilazione.



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8834236/>

Correlazione tra alterazioni della glicosilazione e malattie del SNC. (A) Rappresentazione delle conseguenze dei difetti di glicosilazione che si verificano nei diversi lobi del cervello umano. (B) Caratterizzazione delle conseguenze della glicosilazione alterata in base al tipo di malattia neurologica o psichiatrica formata.

Vedi anche **tabella 3**

Glicosilazione e malattie da prioni

La glicosilazione interagisce anche con altri fattori che contribuiscono a diverse patologie neurodegenerative come la malattia da prioni e altri disturbi.

La malattia da prioni comprende il cambiamento strutturale di una specifica proteina prionica PrP^C nella sua isoforma PrP^{Sc} associata alla malattia⁷³⁸. PrP^C subisce due PTM (Post-Translational Modifications), la prima

⁷³⁷ Kobeissy F, et al
Glycomic and Glycoproteomic Techniques in Neurodegenerative Disorders and Neurotrauma: Towards Personalized Markers. Cells. 2022 Feb 8;11(3):581. doi: 10.3390/cells11030581
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8834236/>

⁷³⁸ Prusiner SB.

è l'attacco del GPI al suo residuo C-terminale Ser-231 e l'altra è la glicosilazione ai residui Asn-181 e Asn197⁷³⁹. Gli studi hanno dimostrato che, quando la PrP^C non è glicosilata al suo N-terminale, diventa più suscettibile alla conversione in PrP^{Sc}⁷⁴⁰. Ciò è stato osservato in uno studio che ha utilizzato cellule di neuroblastoma murino trattate con tunicamicina per bloccare la N-glicosilazione, e ha dimostrato che la ridotta glicosilazione di PrP^C la predispone a trasformarsi in PrP^{Sc}⁷⁴¹.

In particolare, la forma immatura ad alto contenuto di mannosio di PrP^C, che deve ancora subire una complessa glicosilazione, è la più suscettibile alla conversione in PrP^{Sc}.

La glicosilazione all'N-terminale può contenere fino a cinque residui di acido sialico⁷⁴² che alterano le proprietà della proteina e svolgono un ruolo nel tasso di infettività dell'isoforma PrP^{Sc} mal ripiegata⁷⁴³.

Poiché l'acido sialico è carico negativamente ed è diretto verso l'esterno per creare una densa nuvola negativa,⁷⁴⁴ Katorcha et al.⁷³⁰ hanno proposto che ciò potrebbe costituire un ostacolo elettrostatico per la replicazione di PrP^{Sc}, e a supporto di questo hanno dimostrato che il livello di deglicosilazione nella forma PrP^{Sc} era inferiore a quello nella PrP^C.

Inoltre, tra alcuni ceppi murini testati nello stesso studio, la desialilazione parziale ha causato un aumento del tasso di replicazione della proteina, aggiungendo prove che questo tipo di PTM forma una barriera alla replicazione. Inoltre, i cambiamenti nei livelli di sialilazione di PrP^C hanno influenzato la formazione di tre diversi glicoforni⁷⁴⁵ in grado di dare origine a PrP^{Sc} in modo selettivo.⁷⁴⁶

Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie.
Science. 1982 Apr 9;216(4542):136-44. doi: 10.1126/science.6801762.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6801762/>

⁷³⁹ Katorcha E, Makarava N, Savtchenko R, Baskakov IV.
Sialylation of the prion protein glycans controls prion replication rate and glycoform ratio.
Sci Rep. 2015 Nov 18;5:16912. doi: 10.1038/srep16912.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4649626/>

⁷⁴⁰ Schachter H.
Congenital disorders involving defective N-glycosylation of proteins.
Cell Mol Life Sci. 2001 Jul;58(8):1085-104. doi: 10.1007/PL00000923.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11529501/>

⁷⁴¹ Ma J, Lindquist S.
De novo generation of a PrP^{Sc}-like conformation in living cells.
Nat Cell Biol. 1999 Oct;1(6):358-61. doi: 10.1038/14053.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10559963/>

⁷⁴² Rudd PM, Endo T, Colominas C, Groth D, Wheeler SF, Harvey DJ, Wormald MR, Serban H, Prusiner SB, Kobata A, Dwek RA.
Glycosylation differences between the normal and pathogenic prion protein isoforms.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Nov 9;96(23):13044-9. doi: 10.1073/pnas.96.23.13044.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC23897/>

⁷⁴³ Katorcha E, Makarava N, Savtchenko R, Baskakov IV.
Sialylation of the prion protein glycans controls prion replication rate and glycoform ratio.
Sci Rep. 2015 Nov 18;5:16912. doi: 10.1038/srep16912.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4649626/>

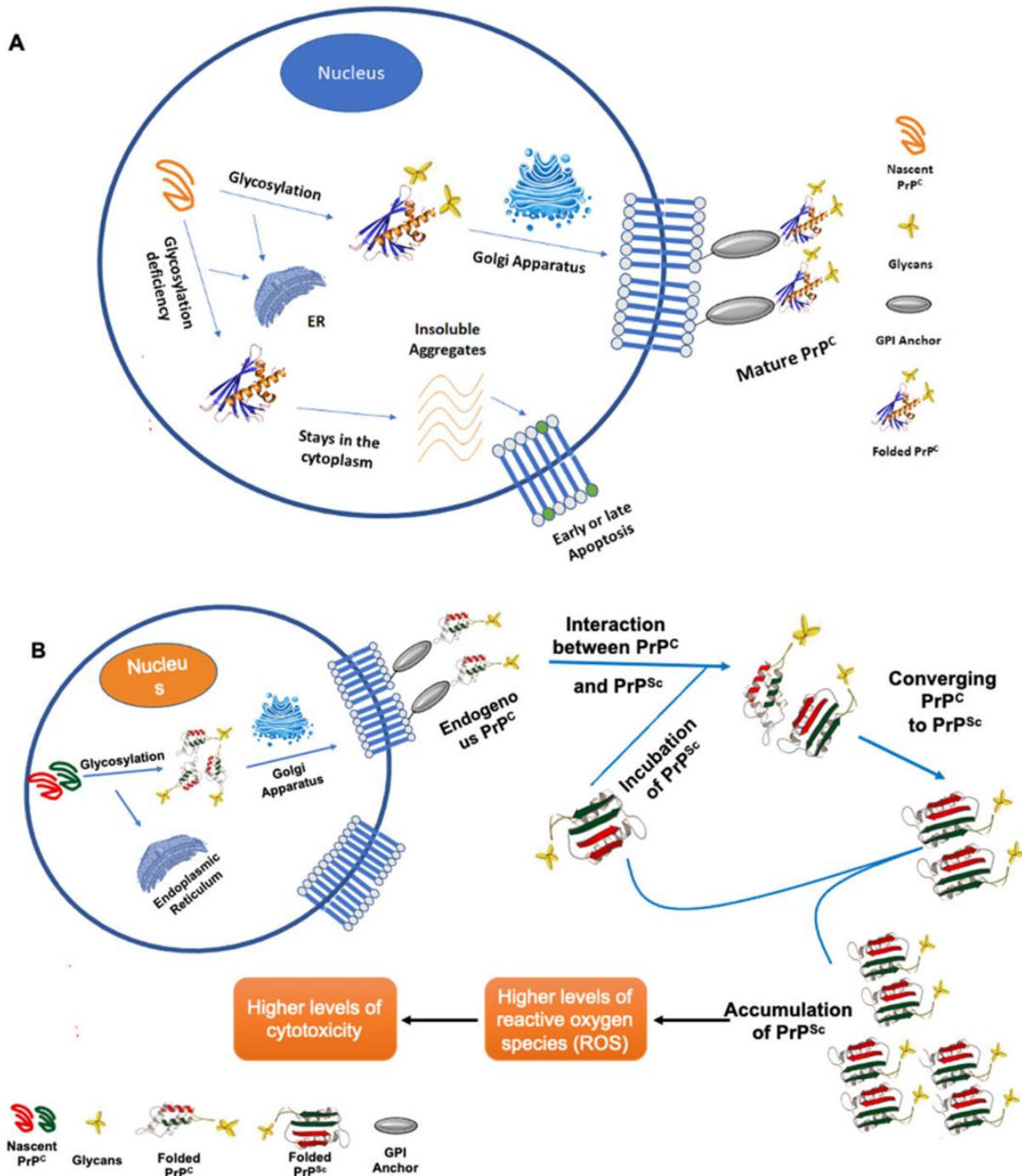
⁷⁴⁴ Wille H, Michelitsch MD, Guenebaut V, Supattapone S, Serban A, Cohen FE, Agard DA, Prusiner SB.
Structural studies of the scrapie prion protein by electron crystallography.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Mar 19;99(6):3563-8. doi: 10.1073/pnas.052703499.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC122563/>

Requena JR, Wille H.
The structure of the infectious prion protein: experimental data and molecular models.
Prion. 2014 Jan-Feb;8(1):60-6. doi: 10.4161/pri.28368.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7030906/>

⁷⁴⁵ Katorcha E, Makarava N, Savtchenko R, Baskakov IV.
Sialylation of the prion protein glycans controls prion replication rate and glycoform ratio.
Sci Rep. 2015 Nov 18;5:16912. doi: 10.1038/srep16912.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4649626/>

⁷⁴⁶ Xiao X, et al
Glycoform-selective prion formation in sporadic and familial forms of prion disease.
PLoS One. 2013;8(3):e58786. doi: 10.1371/journal.pone.0058786.

In un altro studio, è stato indagato il ruolo della glicosilazione nella localizzazione subcellulare di PrP^C,⁷⁴⁷ ed è stato riscontrato che mostra una localizzazione alterata sulla membrana plasmatica e che la glicosilazione potenzia la resistenza alla proteinasi K, la capacità di aggregazione della proteina, aumenta i livelli di ROS e la citotossicità.



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3602448/>

Somerville RA.

Host and transmissible spongiform encephalopathy agent strain control glycosylation of PrP.

J Gen Virol. 1999 Jul;80 (Pt 7):1865-1872. doi: 10.1099/0022-1317-80-7-1865.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10423157/>

⁷⁴⁷ Yi CW, Wang LQ, Huang JJ, Pan K, Chen J, Liang Y.

Glycosylation Significantly Inhibits the Aggregation of Human Prion Protein and Decreases Its Cytotoxicity.

Sci Rep. 2018 Aug 22;8(1):12603. doi: 10.1038/s41598-018-30770-6. Erratum in: Sci Rep. 2018 Sep 4;8(1):13486.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6105643/>

<https://www.mdpi.com/2073-4409/11/3/581/htm>

Il processo di glicosilazione della PrP normale e l'effetto della carenza di glicosilazione o conversione di PrP^C in PrP^{Sc}. (A) In condizioni normali, la PrP nascente subisce la glicosilazione che si verifica nel reticolo endoplasmatico (ER), quindi matura in l'apparato del Golgi ed eventualmente raggiunge il plasma con l'ausilio dell'ancora GPI. Tuttavia, quando si verifica un deficit di glicosilazione, la PrP nascente diventa aggregati insolubili che portano all'apoptosi precoce o tardiva (etichetta verde). (B) La PrP^C matura a livello del plasma può interagire con la PrP^{Sc} e ciò porterebbe a una conversione e l'accumulo di PrP^{Sc} che a sua volta aumenterebbe il livello di citotossicità dovuto alla presenza di questa malattia da prioni".

Altri fattori che inducono l'aggregazione della proteina amiloide

Effetto delle radiazioni elettromagnetiche emesse dai telefoni cellulari

È stato suggerito che le radiazioni emesse dai telefoni cellulari possano indurre diversi problemi di salute.⁷⁴⁸ Vari studi hanno riportato mal di testa e disturbi del sonno,⁷⁴⁹ danni della barriera ematoencefalica⁷⁵⁰ e anche alterazioni genetiche e proteomiche nell'uomo.⁷⁵¹

Studi *in vitro* hanno inoltre dimostrato che l'esposizione a campi elettromagnetici a bassissima frequenza (ELF-EMF) possono influenzare la modulazione delle proteine da shock termico, l'apoptosi e il danno al DNA.⁷⁵²

I disturbi neurodegenerativi come il morbo di Alzheimer (AD) e il morbo di Parkinson (PD), sono caratterizzati dalla progressiva degenerazione del sistema nervoso centrale (SNC). Le deposizioni cerebrali extracellulari

⁷⁴⁸ Hardell L, Sage C.

Biological effects from electromagnetic field exposure and public exposure standards. *Biomed Pharmacother.* 2008 Feb;62(2):104-9. doi: 10.1016/j.biopha.2007.12.004. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18242044/>

⁷⁴⁹ Hillert L, Akerstedt T, Lowden A, Wiholm C, Kuster N, Ebert S, Boutry C, Moffat SD, Berg M, Arnetz BB.

The effects of 884 MHz GSM wireless communication signals on headache and other symptoms: an experimental provocation study. *Bioelectromagnetics.* 2008 Apr;29(3):185-96. doi: 10.1002/bem.20379. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18044740/>

Schirmacher A, Winters S, Fischer S, Goeke J, Galla HJ, Kullnick U, Ringelstein EB, Stögbauer F.

Electromagnetic fields (1.8 GHz) increase the permeability to sucrose of the blood-brain barrier in vitro. *Bioelectromagnetics.* 2000 Jul;21(5):338-45. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10899769/>.

⁷⁵¹ Yan JG, Agresti M, Zhang LL, Yan Y, Matloub HS.

Qualitative effect on mRNAs of injury-associated proteins by cell phone like radiation in rat facial nerves. *Electromagn Biol Med.* 2009;28(4):383-90. doi: 10.3109/15368370903287614. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20017629/>

Misa-Agustiño MJ, Leiro-Vidal JM, Gomez-Amoza JL, Jorge-Mora MT, Jorge-Barreiro FJ, Salas-Sánchez AA, Ares-Pena FJ, López-Martín E.

EMF radiation at 2450 MHz triggers changes in the morphology and expression of heat shock proteins and glucocorticoid receptors in rat thymus. *Life Sci.* 2015 Apr 15;127:1-11. doi: 10.1016/j.lfs.2015.01.027. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25731700/>

⁷⁵² Kayhan H, Esmekaya MA, Saglam AS, Tuysuz MZ, Canseven AG, Yagci AM, Seyhan N.

Does MW Radiation Affect Gene Expression, Apoptotic Level, and Cell Cycle Progression of Human SH-SY5Y Neuroblastoma Cells? *Cell Biochem Biophys.* 2016 Jun;74(2):99-107. doi: 10.1007/s12013-016-0734-9. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27260669/>

Calabrò E, Condello S, Currò M, Ferlazzo N, Caccamo D, Magazù S, Ientile R.

Modulation of heat shock protein response in SH-SY5Y by mobile phone microwaves. *World J Biol Chem.* 2012 Feb 26;3(2):34-40. doi: 10.4331/wjbc.v3.i2.34. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3286792/>

Falone S, Grossi MR, Cinque B, D'Angelo B, Tettamanti E, Cimini A, Di Ilio C, Amicarelli F.

Fifty hertz extremely low-frequency electromagnetic field causes changes in redox and differentiative status in neuroblastoma cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(11):2093-106. doi: 10.1016/j.biocel.2007.06.001. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17662640/>

Seyyedi S, Mozdarani H, Rezaei Tavirani M, Heydari S.

Induction of chromosomal aberrations in human primary fibroblasts and immortalized cancer cells exposed to extremely-low-frequency electromagnetic fields. *Int J Radiat Res.* 2010; 8 (1) :25-29 <http://ijrr.com/article-1-606-en.pdf>

del peptide amiloide β ($A\beta$) sono considerate il segno istopatologico dell'AD, mentre la malattia di Parkinson è causata dalla degenerazione dei neuroni dopaminergici nella substantia nigra ⁷⁵³.

La principale caratteristica istopatologica del PD è la formazione di corpi di Lewy (LB) nei nuclei pigmentati del tronco cerebrale, ⁷⁵⁴ ed è stato suggerito che nel tessuto cerebrale normale, l'alfa sinucleina (α -syn) controlli i livelli di dopamina diminuendo l'attività del trasportatore della dopamina ⁷⁵⁵ e che gli aggregati di alfa sinucleina rappresentino il componente principale dei LB.

Si ritiene inoltre che i radicali liberi generati dal metabolismo della dopamina aumentino la neurotossicità dell' α -syn nei neuroni dopaminergici, ⁷⁵⁶ in cui le protofibrille tossiche oligomeriche di α -syn sono implicate nell'interruzione dell'omeostasi cellulare, la morte neuronale e il totale fallimento della funzione sinaptica. ⁷⁵⁷

Stefi et al, nello studio "*Mobile phone electromagnetic radiation affects Amyloid Precursor Protein and α -synuclein metabolism in SH-SY5Y cells*" ⁷⁵⁸ hanno riportato i risultati degli effetti del campo elettromagnetico (EMF) emesso da GSM a basso livello sulla proteina precursore dell'amiloide (APP) e sull' α -syn nelle cellule di neuroblastoma umano.

I dati hanno indicato alterazioni sull'elaborazione dell'APP e sulla topologia cellulare dopo l'esposizione a campi elettromagnetici ($E = 10,51$ V/m, SAR = 0,23 W/kg, tempo di esposizione: 3 volte, per 10 minuti, per 2 giorni), cambiamenti nell'accumulo e nella multimerizzazione dell' α -syn monomeric, nonché nell'induzione dello stress ossidativo e della morte cellulare.

In particolare, l'aumento dell' α -syn monomeric insieme alla generazione di nuovi frammenti amiloidogenici che possiedono una topologia cellulare alternativa, oltre all'induzione di tossicità cellulare e stress ossidativo, suggeriscono che le comunicazioni wireless possano rappresentare un nuovo fattore che influenza la salute umana, e che l'esposizione a questi dispositivi possa essere coinvolta in meccanismi patogenetici che portano alla neurodegenerazione.

Malattie da prioni e spike del SARS-Cov-2 naturale

La presenza di sequenze simil-prioniche nella spike del SARS-Cov-2 e nei vaccini contenenti la sequenza della spike intera e le conseguenze patologiche sono state approfondite nel capitolo "tossicologia della spike" da pag. 18.

⁷⁵³ Spatola M, Wider C.

Genetics of Parkinson's disease: the yield.

Parkinsonism Relat Disord. 2014 Jan;20 Suppl 1:S35-8. doi: 10.1016/S1353-8020(13)70011-7.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24262184/>

⁷⁵⁴ Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M.

Alpha-synuclein in Lewy bodies. Nature. 1997 Aug 28;388(6645):839-40. doi: 10.1038/42166.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9278044/>

⁷⁵⁵ Little KY, McLaughlin DP, Zhang L, McFinton PR, Dalack GW, Cook EH Jr, Cassin BJ, Watson SJ.

Brain dopamine transporter messenger RNA and binding sites in cocaine users: a postmortem study.

Arch Gen Psychiatry. 1998 Sep;55(9):793-9. doi: 10.1001/archpsyc.55.9.793.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9736005/>

⁷⁵⁶ Wersinger C, Sidhu A.

Attenuation of dopamine transporter activity by alpha-synuclein.

Neurosci Lett. 2003 Apr 17;340(3):189-92. doi: 10.1016/s0304-3940(03)00097-1.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12672538/>

⁷⁵⁷ Conway KA, Harper JD, Lansbury PT.

Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease.

Nat Med. 1998 Nov;4(11):1318-20. doi: 10.1038/3311.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9809558/>

⁷⁵⁸ Stefi AL, Margaritis LH, Skouroliakou AS, Vassilacopoulou D.

Mobile phone electromagnetic radiation affects Amyloid Precursor Protein and α -synuclein metabolism in SH-SY5Y cells.

Pathophysiology. 2019 Sep-Dec;26(3-4):203-212. doi: 10.1016/j.pathophys.2019.02.004.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30850244/>

Ulteriori studi hanno confermato il rischio di insorgenza di malattie da prioni in seguito all'infezione da SARS-CoV-2 ⁷⁵⁹

In particolare, Nyström et ⁷⁶⁰ al hanno analizzato le proprietà amiloidogene della proteina Spike e hanno riscontrato sette sequenze amiloidogeniche in grado di formare aggregati durante l'incubazione a 37°C. Tre peptidi sintetici derivati dalla spike lunghi 20 amminoacidi (sequenza 192–211, 601–620, 1166–1185) soddisfacevano tre criteri per la definizione di fibrilla amiloide *: la cinetica di polimerizzazione dipendente dalla nucleazione di ThT (thioflavin T), la positività al rosso Congo e la morfologia fibrillare ultrastrutturale.

** L'amiloide è definita dalla presenza di depositi di aggregati proteici fibrillari nei tessuti. Le fibrille amiloidi di diversa origine hanno caratteristiche strutturali comuni, in particolare una conformazione quaternaria unica, chiamata struttura a foglietto β (beta), con una regolarità inter-foglietto di 4,7 Å. È stato identificato l'attivatore del plasminogeno di tipo tissutale (tPA), un attivatore della fibrinolisi, come recettore multiligando per la struttura del cross-β amiloide in vitro ⁷⁶¹. La plasmina è una serina proteasi che media la proteolisi di*

⁷⁵⁹ Idrees D, Kumar V.

SARS-CoV-2 spike protein interactions with amyloidogenic proteins: Potential clues to neurodegeneration. *Biochem Biophys Res Commun.* 2021 May 21;554:94-98. doi: 10.1016/j.bbrc.2021.03.100. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7988450/>

Bernardini A, Gigli GL, Janes F, Pellitteri G, Ciardi C, Fabris M, Valente M. Creutzfeldt-Jakob disease after COVID-19: infection-induced prion protein misfolding? A case report. *Prion.* 2022 Dec;16(1):78-83. doi: 10.1080/19336896.2022.2095185. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9255144/>

Tetz G, Tetz V. Prion-like Domains in Spike Protein of SARS-CoV-2 Differ across Its Variants and Enable Changes in Affinity to ACE2. *Microorganisms.* 2022 Jan 25;10(2):280. doi: 10.3390/microorganisms10020280. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8878784/>

Liu S, et al Highly efficient intercellular spreading of protein misfolding mediated by viral ligand-receptor interactions. *Nat Commun.* 2021 Oct 19;12(1):5739. doi: 10.1038/s41467-021-25855-2. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8526834/>

Camacho RC, Alabed S, Zhou H, Chang SL. Network Meta-analysis on the Changes of Amyloid Precursor Protein Expression Following SARS-CoV-2 Infection. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2021 Dec;16(4):756-769. doi: 10.1007/s11481-021-10012-9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8579188/>

Semerdzhev SA, Fakhree MAA, Segers-Nolten I, Blum C, Claessens MMAE. Interactions between SARS-CoV-2 N-Protein and α-Synuclein Accelerate Amyloid Formation. *ACS Chem Neurosci.* 2022 Jan 5;13(1):143-150. doi: 10.1021/acscchemneuro.1c00666. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8739828/>

Shahzad S, Willcox M. The Possible Role of Prion-Like Viral Protein Domains on the Emergence of Novel Viruses as SARS-CoV-2. *J Mol Evol.* 2022 Aug;90(3-4):227-230. doi: 10.1007/s00239-022-10054-4. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8972983/>

Kozlov V.A., Sapozhnikov S.P. Rapid Amyloid Formation and Thrombi Formation in COVID-19 (A brief literature review) [Electronic resource] *Acta medica Eurasica.* – 2021. – №3. P. 1-9. – DOI: 10.47026/2413-4864-2021-3-1-9. <http://acta-medica-eurasica.ru/en/single/2021/3/1/>.

⁷⁶⁰ Nyström S, Hammarström P. Amyloidogenesis of SARS-CoV-2 Spike Protein. *J Am Chem Soc.* 2022 May 25;144(20):8945-8950. doi: 10.1021/jacs.2c03925. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9136918/> <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.12.16.472920v1.full.pdf>

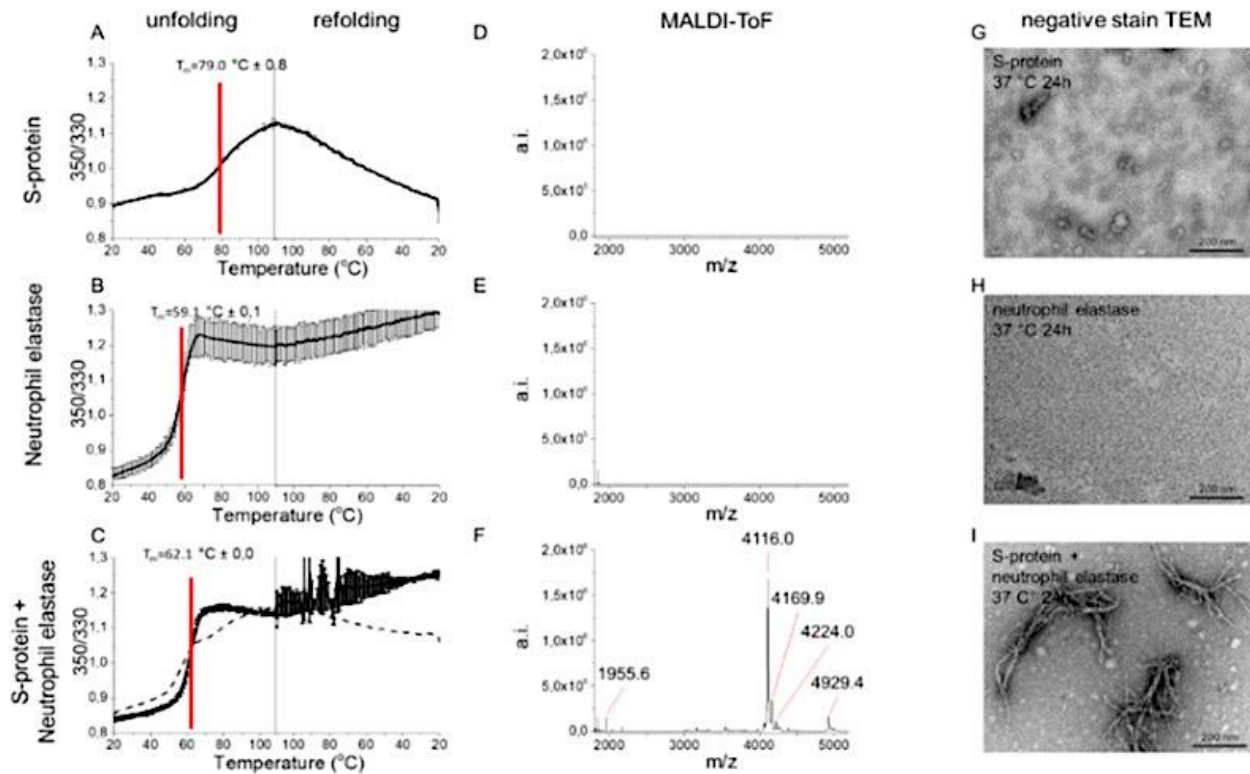
Taniya Bhardwaj, et al Amyloidogenic proteins in the SARS-CoV and SARS-CoV-2 proteomes *bioRxiv* 2021.05.29.446267; doi: <https://doi.org/10.1101/2021.05.29.446267> <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.05.29.446267v2.full.pdf>

⁷⁶¹ Kranenburg O, Bouma B, Kroon-Batenburg LM, Reijkerk A, Wu YP, Voest EE, Gebbink MF.

multi substrati, inclusa la fibrina e l'aumento dell'attività della plasmina è stato precedentemente implicato nel sanguinamento ⁷⁶². I depositi proteici accumulati nei pazienti con amiloidosi sistemica condividono le caratteristiche strutturali che attivano la formazione della plasmina. Le molecole disregolate includono la molecola infiammatoria della fase acuta Siero Amiloide A (SAA) e l' $\alpha(2)$ -antiplasmina ($\alpha 2AP$)⁷⁶³. I livelli di queste proteine circolanti sono risultati predittivi per l'esito clinico dei pazienti malati e in particolare i livelli plasmatici dei complessi PAP (plasmin- $\alpha 2$ -antiplasmin) erano significativamente elevati nei pazienti con amiloidosi sistemica, rispetto ai soggetti di controllo sani ⁷⁶⁴ e ciò è indicativo di uno spostamento dell'equilibrio emostatico verso uno stato fibrinolitico nei pazienti con amiloidosi sistemica.

La proteina S ripiegata a lunghezza intera non ha formato fibrille amiloidi, ma si sono formate fibrille simili ad amiloidi con ramificazioni evidenti durante 24 ore di co-incubazione della proteina S con la proteasi elastasi neutrofila (NE) *in vitro*.

L'NE ha scisso in modo efficiente la proteina S, favorendo l'esposizione dei segmenti amiloidogenici e l'accumulo del peptide amiloidogenico 194–203, unico per il SARS-Cov-2 il quale, in combinazione con l'infiammazione acuta e il reclutamento di neutrofili, noti per essere più prevalenti nel COVID-19 rispetto ad altre infezioni virali, potrebbe spiegare la formazione di amiloide associata alla COVID-19.



Tissue-type plasminogen activator is a multiligand cross-beta structure receptor. *Curr Biol.* 2002 Oct 29;12(21):1833-9. doi: 10.1016/S0960-9822(02)01224-1. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)01224-1](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)01224-1)

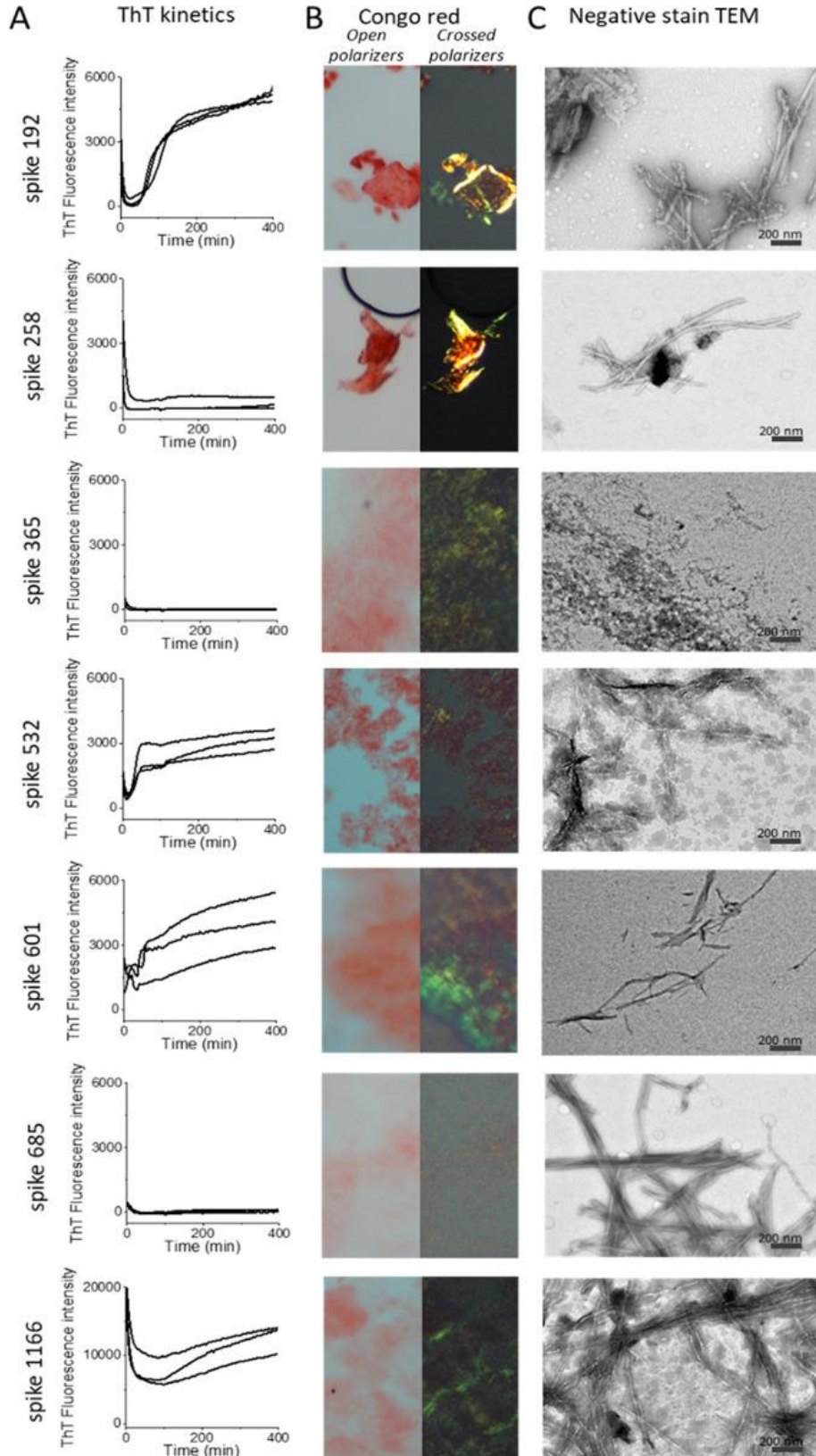
⁷⁶² Francis RB Jr. Clinical disorders of fibrinolysis: a critical review. *Blut.* 1989 Jul;59(1):1-14. doi: 10.1007/BF00320240. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2526671/>

⁷⁶³ Gillmore JD, Lovat LB, Persey MR, Pepys MB, Hawkins PN. Amyloid load and clinical outcome in AA amyloidosis in relation to circulating concentration of serum amyloid A protein. *Lancet.* 2001 Jul 7;358(9275):24-9. doi: 10.1016/S0140-6736(00)05252-1. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11454373/>

⁷⁶⁴ Bouma B, Maas C, Hazenberg BP, Lokhorst HM, Gebbink MF. Increased plasmin-alpha2-antiplasmin levels indicate activation of the fibrinolytic system in systemic amyloidosis. *J Thromb Haemost.* 2007 Jun;5(6):1139-42. doi: 10.1111/j.1538-7836.2007.02457.x. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02457.x>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9136918/>

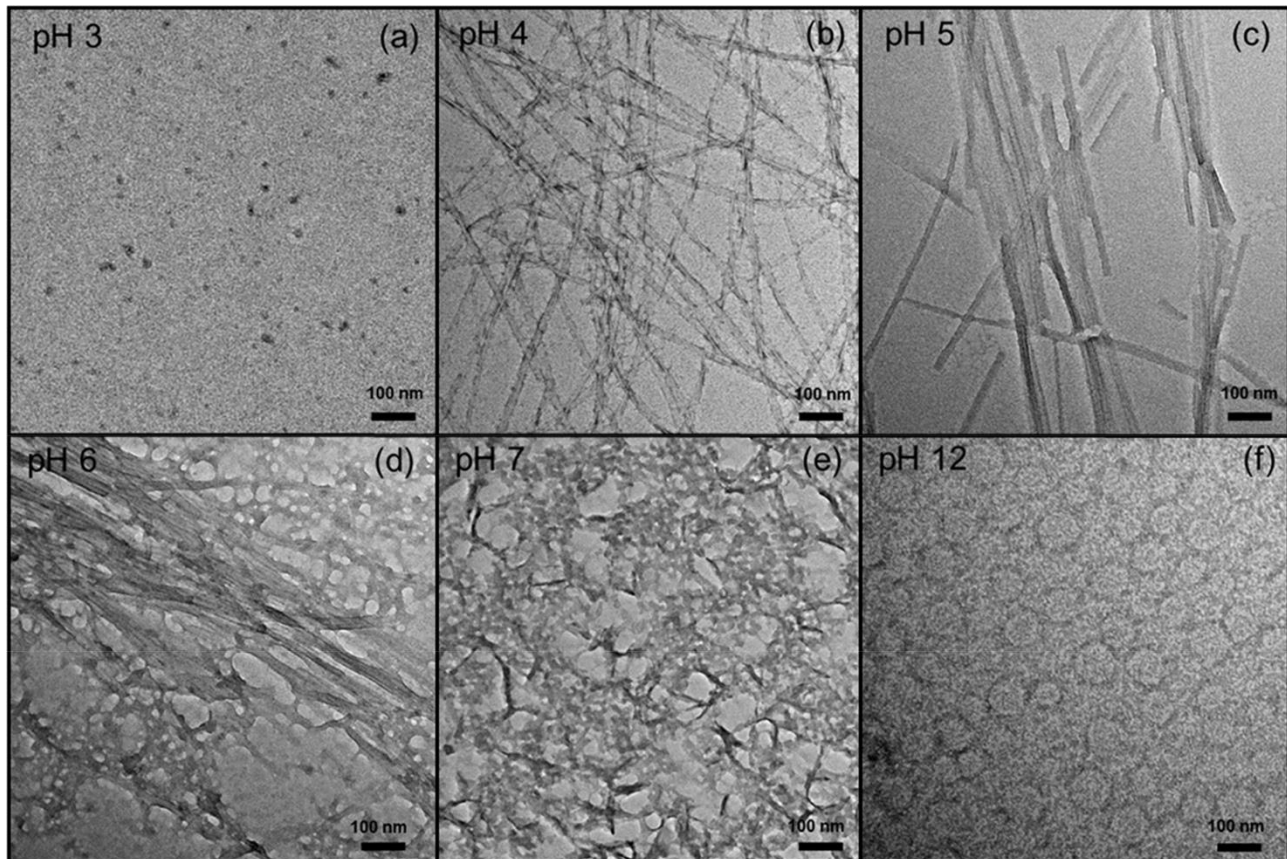
La proteolisi della proteina S da NE rende le fibrille simili all'amiloide. Termostabilità di (A) SARS-CoV-2 S-proteina, (B) NE, (C) S-proteina+NE, misurata da DSF. La linea tratteggiata in (C) è la somma matematica della proteina S e NE, rispettivamente, da (A) e (B) che supportano la scissione della proteina S da parte di NE. Spettri MALDI-ToF di peptidi isolati C18 di (D) S-proteina, (E) NE e (F) S-proteina + NE (6 h, 37 ° C). Micrografie TEM della sola proteina S (G) raffigurante i trimeri previsti, (H) NE da sola e (I) proteina S + NE coincubate a pH 8,4, 24 h, 37 ° C.



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9136918/>

Saggi della fibrilla amiloide dei peptidi SARS-CoV-2 S (0,1 mg/mL). (A) Cinetica di formazione di fibrille di fluorescenza ThT. (B) Microscopia a birifrangenza del rosso del Congo. (C) Ultrastruttura TEM a colorazione negativa.

Questi risultati sono stati confermati anche dallo studio di Castelletto et al,⁷⁶⁵ in cui è stata dimostrata la formazione di strutture fibrille a foglietto β dalla sequenza conservata della proteina spike del coronavirus, RSAIEDLLFDKV, e un comportamento di aggregazione e idrogelificazione dipendenti dal pH.



<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnano.1c10658>

Immagini TEM per soluzioni di RSAIEDLLFDKV all'1% in peso disciolte in (a) acqua (nativa; pH 3) o in soluzioni acquose di NaOH regolate per dare pH (b) 4, (c) 5, (d) 6, (e) 7 e (f) 12.

Va ricordato che l'amiloidosi* è piuttosto comune nella popolazione anziana,⁷⁶⁶ ed è stato proposto che una grave malattia infiammatoria, inclusa l'ARDS in combinazione con l'aggregazione della proteina SARS-CoV-2, possa indurre amiloidosi A sistemica.⁷⁶⁷

⁷⁶⁵ Valeria Castelletto, Ian W. Hamley
Amyloid and Hydrogel Formation of a Peptide Sequence from a Coronavirus Spike Protein
ACS Nano 2022 16 (2), 1857-1867 DOI: 10.1021/acsnano.1c10658
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnano.1c10658>

⁷⁶⁶ Benson MD, Buxbaum JN, Eisenberg DS, Merlini G, Saraiva MJM, Sekijima Y, Sipe JD, Westermark P.
Amyloid nomenclature 2020: update and recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) nomenclature committee.
Amyloid. 2020 Dec;27(4):217-222. doi: 10.1080/13506129.2020.1835263.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9136918/>

⁷⁶⁷ Sinha N, Thakur AK.
Likelihood of amyloid formation in COVID-19-induced ARDS.
Trends Microbiol. 2021 Nov;29(11):967-969. doi: 10.1016/j.tim.2021.03.008.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8007089/>

* *L'amiloidosi sistemica primaria (AL) è causata dall'accumulo di catene leggere di immunoglobuline monoclonali (LC), che sono prodotte in eccesso dalle plasmacellule*⁷⁶⁸. *L'AL è la forma più diffusa di amiloidosi sistemica. L'amiloidosi sistemica secondaria (AA) può essere riconosciuta dall'accumulo di proteina sierica amiloide A, un processo ritenuto un pericoloso effetto collaterale dell'infiammazione cronica*⁷⁶⁹. *In terzo luogo, esistono forme ereditarie di amiloidosi sistemica causate da mutazioni nella transtiretina (ATTR*⁷⁷⁰) *o, più raramente, da lisozima, fibrinogeno o altre proteine*⁷⁷¹, *che causano l'accumulo di queste proteine in depositi amiloidi. L'amiloidosi è associata ad angiopatia cerebrale amiloide, alterazione della coagulazione del sangue, disturbi fibrinolitici,*⁷⁷² *attivazione di FXII callicreina/chinina e tromboinfiammazione.*⁷⁷³

La colonizzazione neurotropica e la semina incrociata delle fibrille amiloidi della proteina S per indurre l'aggregazione di proteine endogene sono state discusse sopra nel contesto della neurodegenerazione.⁷⁷⁴

⁷⁶⁸ Comenzo RL.

Amyloidosis.

Curr Treat Options Oncol. 2006 May;7(3):225-36. doi: 10.1007/s11864-006-0015-8.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16615878/>

⁷⁶⁹ Suzuki A, Ohosone Y, Obana M, Mita S, Matsuoka Y, Irimajiri S, Fukuda J.

Cause of death in 81 autopsied patients with rheumatoid arthritis.

J Rheumatol. 1994 Jan;21(1):33-6.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8151583/>

⁷⁷⁰ Benson MD.

The hereditary amyloidoses.

Best Pract Res Clin Rheumatol. 2003 Dec;17(6):909-27. doi: 10.1016/j.berh.2003.09.001.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15123043/>

⁷⁷¹ Granel B, Valleix S, Serratrice J, Chérin P, Texeira A, Disdier P, Weiller PJ, Gâteau G.

Lysozyme amyloidosis: report of 4 cases and a review of the literature.

Medicine (Baltimore). 2006 Jan;85(1):66-73. doi: 10.1097/01.md.0000200467.51816.6d.

https://journals.lww.com/md-journal/Fulltext/2006/01000/Lysozyme_Amyloidosis__Report_of_4_Cases_and_a.7.aspx

Tennent GA, Brennan SO, Stangou AJ, O'Grady J, Hawkins PN, Pepys MB.

Human plasma fibrinogen is synthesized in the liver.

Blood. 2007 Mar 1;109(5):1971-4. doi: 10.1182/blood-2006-08-040956.

<https://doi.org/10.1182/blood-2006-08-040956>

Merlini G, Westermark P.

The systemic amyloidoses: clearer understanding of the molecular mechanisms offers hope for more effective therapies.

J Intern Med. 2004 Feb;255(2):159-78. doi: 10.1046/j.1365-2796.2003.01262.x.

<https://doi.org/10.1046/j.1365-2796.2003.01262.x>

de Carvalho M, Linke RP, Domingos F, Evangelista T, Ducla-Soares JL, Nathrath WB, Azevedo-Coutinho C, Lima R, Saraiva MJ.

Mutant fibrinogen A-alpha-chain associated with hereditary renal amyloidosis and peripheral neuropathy.

Amyloid. 2004 Sep;11(3):200-7. doi: 10.1080/13506120400000772.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15523923/>

Sucker C, Hetzel GR, Grabensee B, Stocksclaeder M, Scharf RE.

Amyloidosis and bleeding: pathophysiology, diagnosis, and therapy.

Am J Kidney Dis. 2006 Jun;47(6):947-55. doi: 10.1053/j.ajkd.2006.03.036.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16731289/>

⁷⁷² Hammarström P.

The bloody path of amyloids and prions.

J Thromb Haemost. 2007 Jun;5(6):1136-8. doi: 10.1111/j.1538-7836.2007.02575.x.

<https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02575.x>

⁷⁷³ Maas C, Govers-Riemslog JW, Bouma B, Schiks B, Hazenberg BP, Lokhorst HM, Hammarström P, ten Cate H, de Groot PG, Bouma BN, Gebbink MF.

Misfolded proteins activate factor XII in humans, leading to kallikrein formation without initiating coagulation.

J Clin Invest. 2008 Sep;118(9):3208-18. doi: 10.1172/JCI35424.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2518075/>

⁷⁷⁴ Tavassoly O, Safavi F, Tavassoly I.

Seeding Brain Protein Aggregation by SARS-CoV-2 as a Possible Long-Term Complication of COVID-19 Infection.

ACS Chem Neurosci. 2020 Nov 18;11(22):3704-3706. doi: 10.1021/acchemneuro.0c00676

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33147014/>

In particolare, nei pazienti con COVID-19 è stata segnalata la coagulazione del sangue associata ad aggregati fibrillari amiloidosi extracellulari nel flusso sanguigno. Inoltre, l'ipercoagulazione/fibrinolisi alterata è stata dimostrata nel plasma sanguigno di donatori sani addizionati sperimentalmente con proteina S⁷⁷⁵.

** questo studio dimostra che il sangue da donatori vaccinati e affetti da long-Covid possono indurre la coagulazione nei riceventi.*

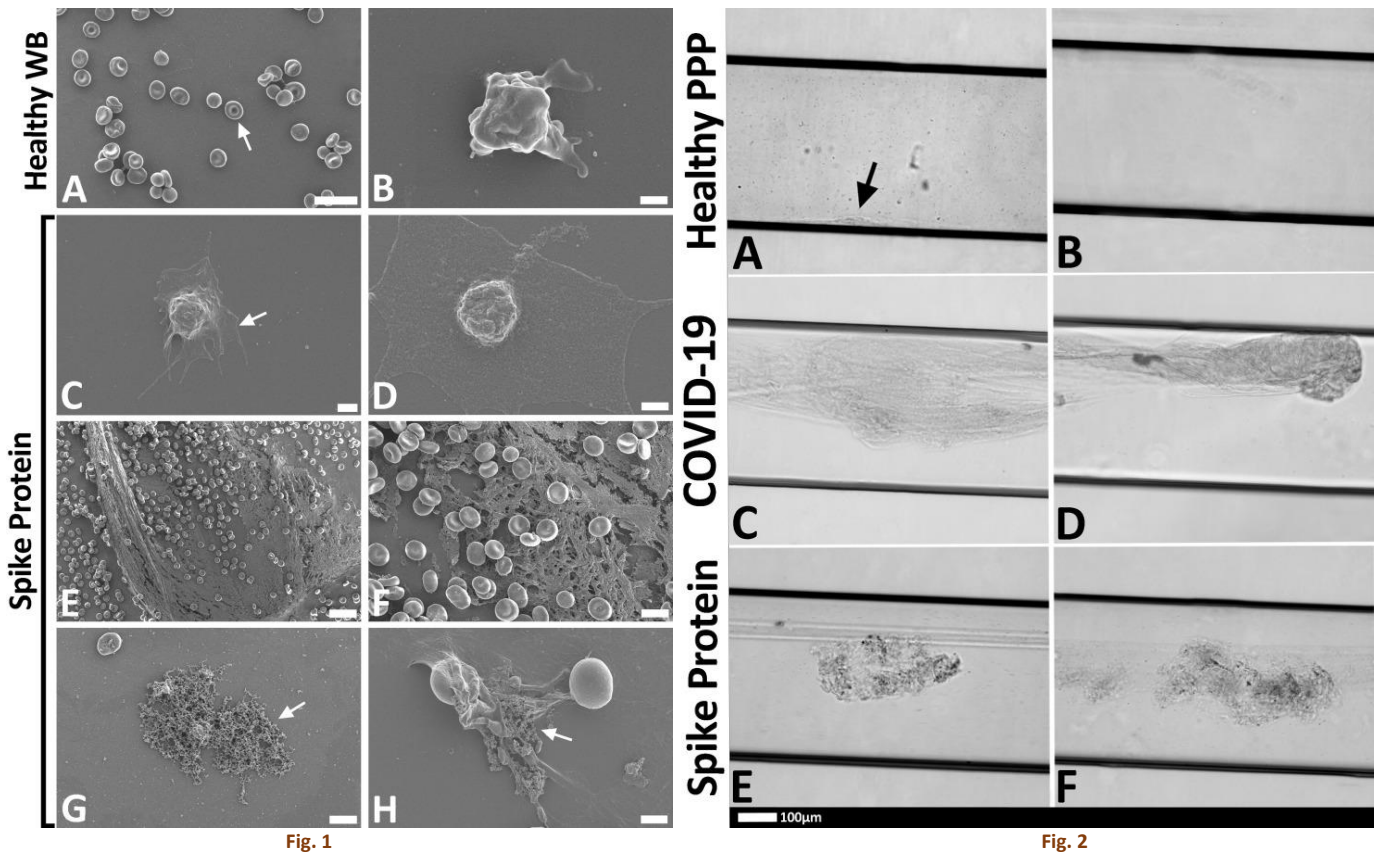


Fig. 1

Fig. 2

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8380922/>

Fig. 1 Campioni di sangue intero di volontari sani, prima e dopo l'esposizione alla proteina spike (A–H) Micrografie elettroniche a scansione rappresentative di un controllo sano del WB, con e senza proteina spike. (A, B) Strisci sani di WB, con una freccia che indica la normale ultrastruttura degli eritrociti. (C–H) WB sano esposto a proteina spike (1 ng.ml-1 concentrazione finale), con (C, D) che indica le piastrine attivate (freccia), (E, F) che mostra la rete di fibrina formata spontaneamente e (G, H) i depositi anomali di natura amiloide (freccie) (barre di scala: (E) 20 µm; (A) 10 µm; (F, G) 5 µm; (H) 2 µm; (C) 1 µm; (B, D) 500 nm).

Fig. 2 Micrografie rappresentative di coaguli di PPP nelle camere microfluidiche (le linee orizzontali nere sono i contorni delle camere) che sono state rivestite con trombina

(A) Coagulo di PPP sano, con formazione di piccoli coaguli (freccia), con (B) nessun coagulo formato nel campione di PPP sano. (C, D) esempi di coaguli da campioni di PPP COVID-19 e coagulo di PPP sano (E, F) con proteina spike. Freccia nera = piccolo coagulo formatosi nel campione di controllo; frecce rosse grandi coaguli nel campione COVID-19.

Alcuni anni fa, Kell et al⁷⁷⁶ hanno scoperto che il fibrinogeno nel sangue può coagularsi in una forma anomala di fibrina "amiloidica" che (come altri amiloidi e prioni β-ricchi) è relativamente resistente alla proteolisi (fibrinolisi).

⁷⁷⁵ Grobelaar LM, Venter C, Vlok M, Ngoepe M, Laubscher GJ, Lourens PJ, Steenkamp J, Kell DB, Pretorius E. SARS-CoV-2 spike protein S1 induces fibrin(ogen) resistant to fibrinolysis: implications for microclot formation in COVID-19. Biosci Rep. 2021 Aug 27;41(8):BSR20210611. doi: 10.1042/BSR20210611. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8380922/>

⁷⁷⁶ Kell DB, Laubscher GJ, Pretorius E. A central role for amyloid fibrin microclots in long COVID/PASC: origins and therapeutic implications. Biochem J. 2022 Feb 17;479(4):537-559. doi: 10.1042/BCJ20220016. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8883497/>

Il risultato, come avviene nel plasma povero di piastrine (PPP) di individui con long-COVID, sono estesi microcoaguli di amiloide di fibrina che possono persistere, intrappolare altre proteine e portare alla produzione di vari autoanticorpi. Questi microcoaguli sono più o meno facilmente misurabili in PPP con la colorazione tioflavina T e un semplice microscopio a fluorescenza.

Un'altra caratteristica della COVID-19 sono i livelli estremamente elevati di attivazione delle piastrine ⁷⁷⁷ dovuti alla disregolazione della P-selectina ⁷⁷⁸ (la P-selectina è un biomarcatore infiammatorio della coagulazione ed è noto per modulare le interazioni tra le cellule del sangue e le cellule endoteliali ⁷⁷⁹), e all'iperferritinemia ⁷⁸⁰.

Ciò comporta un apparente paradosso, dove sia la coagulazione che il sanguinamento possono essere osservati come parte della patologia, e si ritiene che la risoluzione del paradosso sia che queste fasi di coagulazione e sanguinamento siano separate nel tempo.

In particolare, la propensione al sanguinamento è mediata dalla precedente deplezione indotta dalla coagulazione sia del fibrinogeno che del fattore di von Willebrand (VWF).

Inoltre, la P-selectina può contribuire in modo significativo all'adesione di eritrociti sia patologici che sani all'endotelio danneggiato, nonché agli eritrociti adiacenti.

Per quanto riguarda l'iperferritinemia, è noto da tempo che l'eccesso di ferro circolante provoca la coagulazione del sangue in una forma anomala ⁷⁸¹, che in seguito si è rivelata di natura amiloide ⁷⁸² (è

⁷⁷⁷ Venter C, Bezuidenhout JA, Laubscher GJ, Lourens PJ, Steenkamp J, Kell DB, Pretorius E. Erythrocyte, Platelet, Serum Ferritin, and P-Selectin Pathophysiology Implicated in Severe Hypercoagulation and Vascular Complications in COVID-19. *Int J Mol Sci.* 2020 Nov 3;21(21):8234. doi: 10.3390/ijms21218234. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7662625/>

Grobler C, Maphumulo SC, Grobbelaar LM, Bredenkamp JC, Laubscher GJ, Lourens PJ, Steenkamp J, Kell DB, Pretorius E. Covid-19: The Rollercoaster of Fibrin(Ogen), D-Dimer, Von Willebrand Factor, P-Selectin and Their Interactions with Endothelial Cells, Platelets and Erythrocytes. *Int J Mol Sci.* 2020 Jul 21;21(14):5168. doi: 10.3390/ijms21145168. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7403995/>

⁷⁷⁸ Neri T., Nieri D., Celi A. P-selectin blockade in COVID-19-related ARDS. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2020;318:L1237–L1238. doi: 10.1152/ajplung.00202.2020 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7276981/>

Goshua G., Pine A.B., Meizlish M.L., Chang C.H., Zhang H., Bahel P., Baluha A., Bar N., Bona R.D., Burns A.J., et al. Endotheliopathy in COVID-19-associated coagulopathy: Evidence from a single-centre, cross-sectional study. *Lancet Haematol.* 2020;7:e575–e582. doi: 10.1016/S2352-3026(20)30216-7. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7326446/>

⁷⁷⁹ Neri T., Nieri D., Celi A. P-selectin blockade in COVID-19-related ARDS. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2020;318:L1237–L1238. doi: 10.1152/ajplung.00202.2020 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7276981/>

⁷⁸⁰ Perricone C, Bartoloni E, Bursi R, Cafaro G, Guidelli GM, Shoenfeld Y, Gerli R. COVID-19 as part of the hyperferritinemic syndromes: the role of iron depletion therapy. *Immunol Res.* 2020 Aug;68(4):213–224. doi: 10.1007/s12026-020-09145-5. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7366458/>

Gómez-Pastora J, Weigand M, Kim J, Wu X, Strayer J, Palmer AF, Zborowski M, Yazer M, Chalmers JJ. Hyperferritinemia in critically ill COVID-19 patients - Is ferritin the product of inflammation or a pathogenic mediator? *Clin Chim Acta.* 2020 Oct;509:249–251. doi: 10.1016/j.cca.2020.06.033 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7306200/>

⁷⁸¹ Pretorius E., Vermeulen N., Bester J., Lipinski B., Kell D.B. A novel method for assessing the role of iron and its functional chelation in fibrin fibril formation: The use of scanning electron microscopy. *Toxicol. Mech. Methods.* 2013;23:352–359. doi: 10.3109/15376516.2012.762082. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23278212/>

⁷⁸² Kell D.B., Pretorius E. Proteins behaving badly. Substoichiometric molecular control and amplification of the initiation and nature of amyloid fibril formation: Lessons from and for blood clotting. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2017;123:16–41. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2016.08.006. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2016.08.006>

importante riportare che anche l'LPS prodotto dai batteri Gram negativi è in grado formare coaguli di tipo amiloide e che è possibile inibire e revertire le strutture amiloidi *in vitro* con la somministrazione di piccole quantità di LBP (lipopolysaccharide-binding protein)⁷⁸³).

Sia le piastrine che gli eritrociti manifestano cambiamenti ultrastrutturali patologici⁷⁸⁴ in presenza di un aumento della ferritina sierica e di ferro⁷⁸⁵.

Kell DB, Pretorius E.

To What Extent Are the Terminal Stages of Sepsis, Septic Shock, Systemic Inflammatory Response Syndrome, and Multiple Organ Dysfunction Syndrome Actually Driven by a Prion/Amyloid Form of Fibrin?

Semin Thromb Hemost. 2018 Apr;44(3):224-238. doi: 10.1055/s-0037-1604108.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6193370/>

Pretorius E, Bester J, Page MJ, Kell DB.

The Potential of LPS-Binding Protein to Reverse Amyloid Formation in Plasma Fibrin of Individuals With Alzheimer-Type Dementia.

Front Aging Neurosci. 2018 Aug 22;10:257. doi: 10.3389/fnagi.2018.00257.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6113936/>

Pretorius E., Mbotwe S., Bester J., Robinson C.J., Kell D.B.

Acute induction of anomalous and amyloidogenic blood clotting by molecular amplification of highly substoichiometric levels of bacterial lipopolysaccharide.

J. R. Soc. Interface. 2016;123:20160539. doi: 10.1098/rsif.2016.0539

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5046953/>

Pretorius E, Page MJ, Hendricks L, Nkosi NB, Benson SR, Kell DB.

Both lipopolysaccharide and lipoteichoic acids potently induce anomalous fibrin amyloid formation: assessment with novel Amytracker™ stains.

J R Soc Interface. 2018 Feb;15(139):20170941. doi: 10.1098/rsif.2017.0941.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5832738/>

De Villiers S., Bester J., Kell D.B., Pretorius E.

Erythrocyte health and the possible role of amyloidogenic blood clotting in the evolving haemodynamics of female migraine-with-aura pathophysiology: Results from a pilot study.

Front. Neurol. 2019;10:1262. doi: 10.3389/fneur.2019.01262.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6887655/>

⁷⁸³ Pretorius E, Bester J, Page MJ, Kell DB.

The Potential of LPS-Binding Protein to Reverse Amyloid Formation in Plasma Fibrin of Individuals With Alzheimer-Type Dementia.

Front Aging Neurosci. 2018 Aug 22;10:257. doi: 10.3389/fnagi.2018.00257.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6113936/>

⁷⁸⁴ Du Plooy J.N., Bester J., Pretorius E.

Eryptosis in Haemochromatosis: Implications for rheology.

Clin. Hemorheol. Microcirc. 2018;69:457–469. doi: 10.3233/CH-170325.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29710680/>

Lipinski B, Pretorius E.

Novel pathway of iron-induced blood coagulation: implications for diabetes mellitus and its complications.

Pol Arch Med Wewn. 2012;122(3):115-22.

<http://pamw.pl/en/node/1201/pdf>

Olumuyiwa-Akeredolu OO, Page MJ, Soma P, Pretorius E.

Platelets: emerging facilitators of cellular crosstalk in rheumatoid arthritis.

Nat Rev Rheumatol. 2019 Apr;15(4):237-248. doi: 10.1038/s41584-019-0187-9.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30824879/>

Van Rooy M.J., Duim W., Ehlers R., Buys A.V., Pretorius E.

Platelet hyperactivity and fibrin clot structure in transient ischemic attack individuals in the presence of metabolic syndrome: A microscopy and thromboelastography study.

Cardiovasc. Diabetol. 2015;14:86. doi: 10.1186/s12933-015-0249-5.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4542104/>

⁷⁸⁵ Pretorius E.

The adaptability of red blood cells. Cardiovasc.

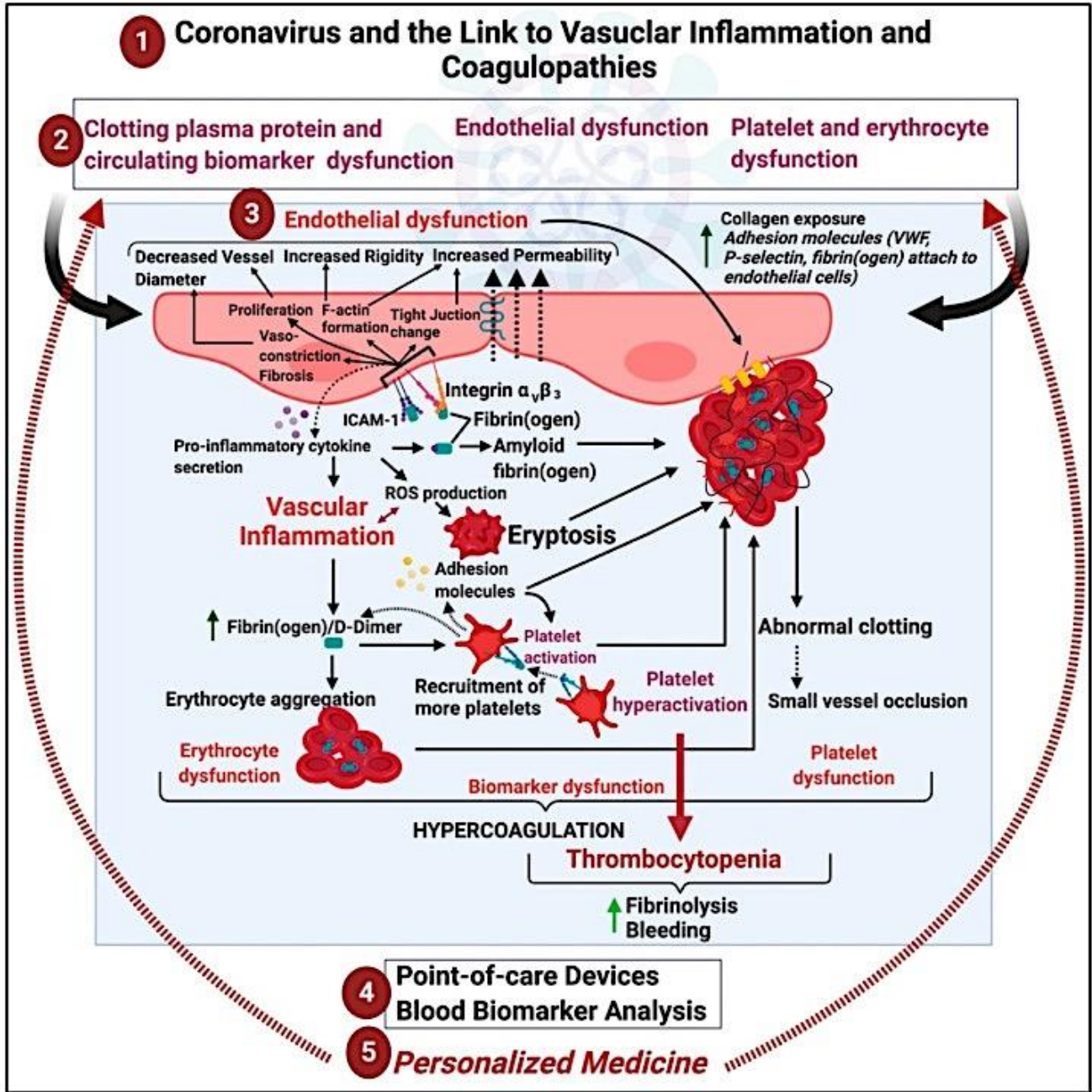
Diabetol. 2013;12:63. doi: 10.1186/1475-2840-12-63

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3637111/>

Lipinski B., Pretorius E., Oberholzer H.M., van der Spuy W.J.

Interaction of fibrin with red blood cells: The role of iron.

Ultrastruct. Pathol. 2012;36:79–84. doi: 10.3109/01913123.2011.627491.



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7403995/>

(1) Le implicazioni vascolari della sindrome respiratoria acuta coronavirus 2 (COVID-19) (2) possono provocare la coagulazione delle proteine e disfunzioni dei biomarcatori circolanti, endoteliali, eritrocitari e piastrinici. (3) Esaminiamo i vari processi biochimici associati alla disfunzione vascolare, concentrandoci su fibrina (ogeno), D-dimero, P-selectina e fattore di von Willebrand. (4) Concludiamo esaminando i dispositivi e le metodologie point-of-care nel trattamento del COVID-19 e suggeriamo che ogni paziente dovrebbe essere trattato utilizzando un (5) approccio di medicina personalizzata.

Insieme alla patologia piastrinica e alla presenza di microcoaguli in circolo, il danno endoteliale può essere il fattore chiave dei sintomi persistenti di long-COVID/PASC ⁷⁸⁶.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22471429/>

⁷⁸⁶ Pretorius E, Vlok M, Venter C, Bezuidenhout JA, Laubscher GJ, Steenkamp J, Kell DB. Persistent clotting protein pathology in Long COVID/Post-Acute Sequelae of COVID-19 (PASC) is accompanied by increased levels of antiplasmin. Cardiovasc Diabetol. 2021 Aug 23;20(1):172. doi: 10.1186/s12933-021-01359-7.

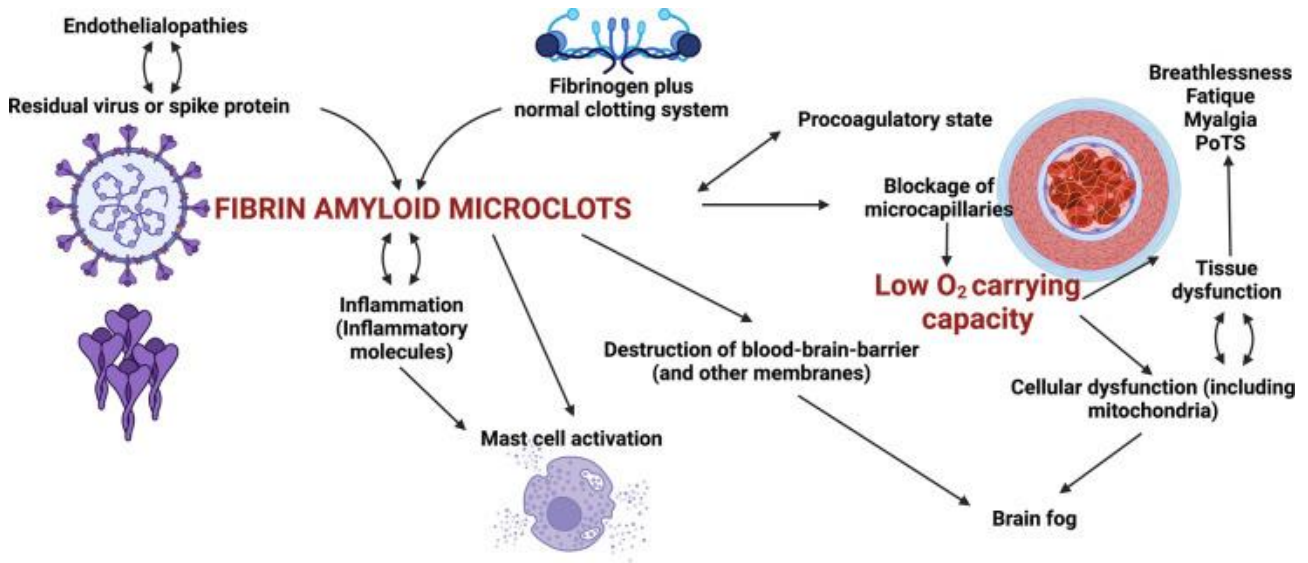
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8381139/>.

Pretorius E, Venter C, Laubscher GJ, Kotze MJ, Oladejo SO, Watson LR, Rajaratnam K, Watson BW, Kell DB.

In particolare, la capacità di questi microcoaguli amiloidi di fibrina (fibrinaloidi) di bloccare i capillari, di limitare il passaggio dei globuli rossi e di conseguenza lo scambio di O₂, può effettivamente essere alla base della maggior parte di questi sintomi.

Coerentemente con questo, in una relazione preliminare⁷⁸⁷, Pretorius et al hanno dimostrato che una terapia anticoagulante "tripla" adeguata e attentamente monitorata * che porta alla rimozione dei microcoaguli rimuove i sintomi persistenti.

* *Terapia anticoagulante testata: un mese di doppia terapia antiplastrinica (DAPT) (Clopidogrel 75 mg/Aspirina 75 mg) una volta al giorno e un anticoagulante orale diretto (DOAC) (Apixiban) 5 mg due volte al giorno. Per la protezione gastrica è stato anche prescritto un inibitore della pompa protonica (PPI) pantoprazolo 40 mg/die. Tale regime deve essere seguito solo sotto la guida medica rigorosa e qualificata per ovviare a eventuali pericoli, in particolare perdite emorragiche, e della terapia nel suo insieme.*



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8883497/>

Malattie da prioni e spike del SARS-Cov-2 vaccinale

Quanto riportato in letteratura riguardo il meccanismo d'induzione del danno da prioni da parte della spike naturale del SARS-Cov-2, è dimostrabile anche per i suoi vaccini⁷⁸⁸.

Prevalence of symptoms, comorbidities, fibrin amyloid microclots and platelet pathology in individuals with Long COVID/Post-Acute Sequelae of COVID-19 (PASC).

Cardiovasc Diabetol. 2022 Aug 6;21(1):148. doi: 10.1186/s12933-022-01579-5.

<https://cardiab.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12933-022-01579-5>

⁷⁸⁷ Pretorius, et al (2021).

Combined triple treatment of fibrin amyloid microclots and platelet pathology in individuals with Long COVID/ Post-Acute Sequelae of COVID-19 (PASC) can resolve their persistent symptoms.

https://www.researchgate.net/publication/357428572_Combined_triple_treatment_of_fibrin_amyloid_microclots_and_platelet_pathology_in_individuals_with_Long_COVID_Post-Acute_Sequelae_of_COVID-19_PASC_can_resolve_their_persistent_symptoms

⁷⁸⁸ Seneff, S., & Nigh, G. (2021).

Worse Than the Disease? Reviewing Some Possible Unintended Consequences of the mRNA Vaccines Against COVID-19.

International Journal of Vaccine Theory, Practice, and Research, 2(1), 38–79. <https://doi.org/10.56098/ijvtr.v2i1.23> (Original work published May 10, 2021)

<https://dpbh.nv.gov/uploadedFiles/dpbhngov/content/Boards/BOH/Meetings/2021/SENEFF~1.PDF>

Actis GC, Ribaldone DG, Pellicano R.

COVID vaccine's hot problems: erratic serious blood clotting, ill-defined prion-like reactogenicity of the spike, unclear roles of other factors.

Minerva Med. 2021 Dec;112(6):695-697. doi: 10.23736/S0026-4806.21.07769-7.

<https://www.minervamedica.it/en/journals/minerva-medica/article.php?cod=R10Y2021N06A0695>

Classen JB.

COVID-19 Vaccine Associated Parkinson's Disease, A Prion Disease Signal in the UK Yellow Card Adverse Event Database.

Va tenuto presente che i vaccini mRNA, oltre a presentare le stesse sequenze prioniche del virus originale, sono progettati con una sequenza alterata che sostituisce due aminoacidi adiacenti nel dominio di fusione con una coppia di proline.

Questo viene fatto intenzionalmente per costringere la proteina a rimanere nel suo stato aperto e rendere più difficile la sua fusione con la membrana. Questo può essere un passo pericoloso verso un ripiegamento errato che potenzialmente porta alla malattia da prioni.

Un documento pubblicato da J. Bart Classen⁷⁸⁹ ha proposto che la proteina spike nei vaccini mRNA potrebbe causare malattie simili ai prioni, in parte attraverso la sua capacità di legarsi a molte proteine prioniche note e indurre il loro ripiegamento errato in prioni patologici.

Come già discusso, Idrees e Kumar⁷⁹⁰ hanno proposto che il componente S1 della proteina spike sia incline ad agire come un amiloide funzionale e a formare aggregati tossici. Questi autori hanno evidenziato che S1 ha la capacità "di formare aggregati amiloidi e tossici che possono fungere da semi per aggregare molte delle proteine del cervello mal ripiegate e alla fine possono portare alla neurodegenerazione".

A sostegno di questa ipotesi, è stato riscontrato che $A\beta_{1-42}$ (la forma a 42 aminoacidi dell'amiloide β nel liquido cerebrospinale) si lega con alta affinità alla subunità S1 e ACE2, rafforzando il legame di S1 con ACE2, e aumenta l'ingresso virale e la produzione di IL-6 in un modello murino di infezione con pseudovirus SARS-CoV-2.

I dati di questo modello murino surrogato con inoculazione endovenosa di $A\beta_{1-42}$ hanno mostrato che la clearance di $A\beta_{1-42}$ nel sangue è stata ridotta in presenza del dominio extracellulare dei trimeri della proteina S.⁷⁹¹

Data l'ampia espressione di ACE2 nel cervello umano⁷⁹², uno studio di particolare interesse ha mostrato che la subunità S1 radioiodata iniettata per via endovenosa (I-S1) attraversava facilmente per transitosi la barriera ematoencefalica nei topi maschi, veniva assorbita in varie regioni del cervello, ed entrava nello spazio cerebrale parenchimale. I-S1 è stato anche assorbito nel polmone, milza, rene e fegato, e anche l'I-S1 somministrato per via intranasale è entrato nel cervello, sebbene a livelli inferiori rispetto a dopo la somministrazione endovenosa.⁷⁹³

J Med - Clin Res & Rev. 2021; 5(7): 1-6.

<https://scivisionpub.com/pdfs/covid19-vaccine-associated-parkinsons-disease-a-prion-disease-signal-in-the-uk-yellow-card-adverse-event-database-1746.pdf>

Quaderno 01/2022 di "Disinfection" con l'analisi in microscopia in campo oscuro del sangue di oltre mille soggetti trattati con vaccini a mRNA.

<https://www.ndmagazine.it/analisi-soggetti-trattati/>

⁷⁸⁹ Classen, J. B. (2021).

Review of COVID-19 Vaccines and the Risk of Chronic Adverse Events Including Neurological Degeneration.

Journal of Medical-Clinical Research and Reviews 5(4): 1-7.

<https://foundationforhealthresearch.org/review-of-covid-19-vaccines-and-the-risk-of-chronic-adverse-events/>.

Classen JB.

COVID-19 RNA Based Vaccines and the Risk of Prion Disease.

Microbiol Infect Dis. 2021; 5(1): 1-3

<https://scivisionpub.com/pdfs/covid19-rna-based-vaccines-and-the-risk-of-prion-disease-1503.pdf>

⁷⁹⁰ Idrees D, Kumar V.

SARS-CoV-2 spike protein interactions with amyloidogenic proteins: Potential clues to neurodegeneration.

Biochem Biophys Res Commun. 2021 May 21;554:94-98. doi: 10.1016/j.bbrc.2021.03.100

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7988450/>

⁷⁹¹ Hsu JT, Tien CF, Yu GY, Shen S, Lee YH, Hsu PC, Wang Y, Chao PK, Tsay HJ, Shie FS.

The Effects of $A\beta_{1-42}$ Binding to the SARS-CoV-2 Spike Protein S1 Subunit and Angiotensin-Converting Enzyme 2.

Int J Mol Sci. 2021 Jul 30;22(15):8226. doi: 10.3390/ijms22158226.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8347908/>

⁷⁹² Chen R, Wang K, Yu J, Howard D, French L, Chen Z, Wen C, Xu Z.

The Spatial and Cell-Type Distribution of SARS-CoV-2 Receptor ACE2 in the Human and Mouse Brains.

Front Neurol. 2021 Jan 20;11:573095. doi: 10.3389/fneur.2020.573095.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7855591/>

⁷⁹³ Rhea EM, Logsdon AF, Hansen KM, Williams LM, Reed MJ, Baumann KK, Holden SJ, Raber J, Banks WA, Erickson MA.

The S1 protein of SARS-CoV-2 crosses the blood-brain barrier in mice.

Nat Neurosci. 2021 Mar;24(3):368-378. doi: 10.1038/s41593-020-00771-8.

Inoltre, è stato scoperto che S1 interrompe l'integrità della barriera emato-encefalica in un modello 3D microfluidico della barriera emato-encefalica.⁷⁹⁴

Per quanto riguarda la sicurezza dei vaccini, è stata dimostrata dagli studi di biodistribuzione della piattaforma mRNA-LNP la presenza di bassi livelli di mRNA nel cervello, indicando che gli mRNA-LNP possono attraversare la barriera ematoencefalica e produrre spike libera.⁷⁹⁵

Ad oggi sono stati documentati vari casi di Creutzfeldt-Jakob Disease (CJD - encefalopatia spongiforme nota anche morbo della mucca pazza) da vaccino⁷⁹⁶; in particolare il gruppo di ricerca del prof. Montagnier⁷⁹⁷ ha pubblicato recentemente un preprint con lo studio di 26 casi di CJD, in cui i primi sintomi sono comparsi in media 11,38 giorni dopo la vaccinazione. Di questi 26 casi, 20 sono deceduti solo 4,76 mesi dopo l'iniezione. Tra questi, 8 di loro sono deceduti di morte improvvisa (2,5 mesi). Tutto ciò conferma la natura radicalmente diversa di questa nuova forma di CJD, rispetto alla forma classica richiede diversi decenni.

Il gruppo riassume nei seguenti punti i risultati più importanti dello studio dei casi:

“- *In primo luogo*, dimostriamo l'esistenza di una regione prionica in tutte le spikes del ceppo di SARS-CoV2 originale di Wuhan, di tutte le varianti e di tutti i vaccini, in quanto sono stati tutti costruiti da questa spike originale di Wuhan.

- *In secondo luogo*, dimostriamo che questa regione prionica è completamente scomparsa nell'ultima variante Omicron. Questo si spiega con l'albero filogenetico dei virus SARS-CoV-2, di cui l'Omicron è il risultato di uno dei primissimi rami, poi si sarebbe evoluto lentamente in Sud Africa, per emergere alla fine nel novembre 2021, in una forma che è diventata dominante.

-*Infine, e questo è il terzo notevole risultato*, se la presenza di questa regione prionica in tutti i vaccini COVID-19 costituiva "una ragione necessaria ma non sufficiente" per l'emergere di una possibile malattia da prioni, riportiamo qui la prova ufficiale di questa nuova forma di CJD subito dopo l'iniezione.”

Un'altra patologia neurodegenerativa gravemente invalidante segnalata dopo la vaccinazione è il morbo di Parkinson, sia di nuova insorgenza che di aggravamento della patologia pregressa.⁷⁹⁸ Questa malattia si può

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8793077/>

⁷⁹⁴ DeOre BJ, Tran KA, Andrews AM, Ramirez SH, Galie PA. SARS-CoV-2 Spike Protein Disrupts Blood-Brain Barrier Integrity via RhoA Activation. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2021 Dec;16(4):722-728. doi: 10.1007/s11481-021-10029-0. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8536479/>

⁷⁹⁵ https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/spikevax-previously-covid-19-vaccine-moderna-epar-public-assessment-report_en.pdf

Palmer, Michael and Sucharit Bhakdi. "The Pfizer mRNA vaccine: pharmacokinetics and toxicity." (2021). <https://doctors4covidethics.org/wp-content/uploads/2021/07/Pfizer-pharmacokinetics-and-toxicity.pdf>

⁷⁹⁶ Kuvanfik, Anil & Özcan, Ecenur & Serin, Simay & Sungurtekin, Hulya. (2021). Creutzfeldt-Jakob Disease After the COVID-19 Vaccination. *Turkish Journal of Intensive Care.* 20. 10.4274/tybd.galenos.2021.91885. https://cms.galenos.com.tr/Uploads/Article_50671/TYBD-0-0.pdf

⁷⁹⁷ Jean claude Perez, Claire Moret-Chalmin, & RIP Luc Montagnier. (2022). Towards the emergence of a new form of the neurodegenerative Creutzfeldt-Jakob disease: Twenty six cases of CJD declared a few days after a COVID-19 "vaccine" Jab (Version V4). Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.6641999> <https://zenodo.org/record/6641999#.YthiEexBz9E>

⁷⁹⁸ Erro R, Buonomo AR, Barone P, Pellecchia MT. Severe Dyskinesia After Administration of SARS-CoV2 mRNA Vaccine in Parkinson's Disease. *Mov Disord.* 2021 Oct;36(10):2219. doi: 10.1002/mds.28772. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8441657/>

Cosentino C, Torres L, Vélez M, Nuñez Y, Sánchez D, Armas C, Alvarado M. SARS-CoV-2 Vaccines and Motor Symptoms in Parkinson's Disease. *Mov Disord.* 2022 Jan;37(1):233. doi: 10.1002/mds.28851. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8661843/>

Salinas MR, Dieppa M.

manifestare anche dopo l'infezione da SARS-Cov-2⁷⁹⁹ ed è associata ai depositi di corpi di Lewy nel cervello, in cui la principale proteina trovata è l' α -sinucleina. Questa proteina si comporta come un prione quando in determinate condizioni si aggrega in oligomeri e fibrille solubili tossici.⁸⁰⁰

La ricerca ha dimostrato che l' α -sinucleina ripiegata in modo errato può formarsi prima nell'intestino per poi viaggiare da lì al cervello lungo il nervo vago, probabilmente sotto forma di esosomi, rilasciati dalle cellule morenti dove ha avuto origine la proteina ripiegata in modo errato⁸⁰¹.

Le condizioni cellulari che promuovono il ripiegamento errato includono sia un pH acido che un'elevata espressione di citochine infiammatorie. È ormai noto che il nervo vago è fondamentale per la trasmissione di proteine mal ripiegate al cervello, perché la rottura del nervo vago protegge dal Parkinson.

L'atrofia del nervo vago in associazione con il morbo di Parkinson fornisce un'ulteriore prova del coinvolgimento del nervo vago nel trasporto di oligomeri di α -sinucleina mal ripiegati dall'intestino al cervello.⁸⁰² Un altro percorso è attraverso il nervo olfattivo e la perdita dell'olfatto è un segno precoce del morbo di Parkinson, come pure è un sintomo comune, spesso temporaneo, dell'infezione da SARS-CoV-2.

Transient akathisia after the SARS-Cov-2 vaccine.

Clin Park Relat Disord. 2021;4:100098. doi: 10.1016/j.prdoa.2021.100098.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8178529/>

⁷⁹⁹ Kamel WA, Ismail II, Ibrahim M, Al-Hashel JY.

Unexplained worsening of parkinsonian symptoms in a patient with advanced Parkinson's disease as the sole initial presentation of COVID-19 infection: a case report.

Egypt J Neurol Psychiatr Neurosurg. 2021;57(1):60. doi: 10.1186/s41983-021-00314-3.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8127432/>

Bouali-Benazzouz R, Benazzouz A.

Covid-19 Infection and Parkinsonism: Is There a Link?

Mov Disord. 2021 Aug;36(8):1737-1743. doi: 10.1002/mds.28680.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8242862/>

Imbalzano G, Ledda C, Artusi CA, Romagnolo A, Montanaro E, Rizzone MG, Lopiano L, Zibetti M.

SARS-CoV-2 vaccination, Parkinson's disease, and other movement disorders: case series and short literature review.

Neurol Sci. 2022 Jun 6:1-4. doi: 10.1007/s10072-022-06182-w.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9167915/>

Gultekin M, Tufekcioglu Z.

COVID-19 infection presented as severe dyskinesia in a patient with Parkinson's disease: a case with daily video recording.

Neurol Sci. 2022 May;43(5):2961-2963. doi: 10.1007/s10072-022-05912-4.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9023739/>

Jaiswal V, et al

The Influence of Coronavirus Disease-2019 (COVID-19) On Parkinson's Disease: An Updated Systematic Review.

J Prim Care Community Health. 2021 Jan-Dec;12:21501327211039709. doi: 10.1177/21501327211039709.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8377313/>

Conte C.

Possible Link between SARS-CoV-2 Infection and Parkinson's Disease: The Role of Toll-Like Receptor 4.

Int J Mol Sci. 2021 Jul 1;22(13):7135. doi: 10.3390/ijms22137135.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8269350/>

⁸⁰⁰ Lema Tomé CM, Tyson T, Rey NL, Grathwohl S, Britschgi M, Brundin P.

Inflammation and α -synuclein's prion-like behavior in Parkinson's disease--is there a link?

Mol Neurobiol. 2013 Apr;47(2):561-74. doi: 10.1007/s12035-012-8267-8.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3589652/>.

⁸⁰¹ Kakarla R, Hur J, Kim YJ, Kim J, Chwae YJ.

Apoptotic cell-derived exosomes: messages from dying cells.

Exp Mol Med. 2020 Jan;52(1):1-6. doi: 10.1038/s12276-019-0362-8.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7000698/>

Steiner JA, Angot E, Brundin P.

A deadly spread: cellular mechanisms of α -synuclein transfer.

Cell Death Differ. 2011 Sep;18(9):1425-33. doi: 10.1038/cdd.2011.53.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3178422/>

⁸⁰² Walter U, Tsiberidou P, Kersten M, Storch A, Löhle M.

Atrophy of the Vagus Nerve in Parkinson's Disease Revealed by High-Resolution Ultrasonography.

Ci sono molti parallelismi tra l' α -sinucleina e la proteina spike, e ciò conferma la possibilità di una malattia simil-prionica dopo la vaccinazione.

Inoltre i lipidi cationici nel vaccino creano un pH acido favorevole al ripiegamento errato e inducono anche una forte risposta infiammatoria, un'altra condizione predisponente.

I centri germinali sono strutture all'interno della milza e di altri organi linfoidi secondari in cui le cellule dendritiche follicolari presentano antigeni alle cellule B, che a loro volta perfezionano la loro risposta anticorpale.

I ricercatori hanno dimostrato che i vaccini mRNA, in contrasto con i vaccini proteici ricombinanti, suscitano un robusto sviluppo di anticorpi neutralizzanti in questi centri germinativi nella milza.⁸⁰³ Tuttavia, ciò significa anche che i vaccini mRNA inducono una situazione ideale per la formazione di prioni dalla proteina spike⁸⁰⁴ e il suo trasporto attraverso gli esosomi lungo il nervo vago al cervello.⁸⁰⁵

Gli studi hanno dimostrato che la trasmissione del prione da un animale all'altro appare per la prima volta nei tessuti linfoidi, in particolare nella milza. Le cellule dendritiche follicolari differenziate sono centrali nel processo, poiché accumulano proteine prioniche mal ripiegate.⁸⁰⁶

Anche Classen nel suo articolo "*COVID-19 Vaccine Associated Parkinson's Disease, A Prion Disease Signal in the UK Yellow Card Adverse Event Database*"⁸⁰⁷ documenta, dalla revisione delle reazioni avverse pubblicate nel database inglese Yellow Card, un segnale specifico per un rischio aumentato di malattia di Parkinson. Un'altra malattia da prioni è l'insonnia familiare fatale, un raro disturbo genetico caratterizzato dall'incapacità di dormire⁸⁰⁸.

È stato notato nell'analisi dei dati del database sui disturbi nervosi che c'erano segnalazioni di disregolazione del sonno tra i gruppi di vaccini. Ciò potrebbe essere spiegata dalla proteina spike che aggrega le molecole di prioni già nelle cellule, come discusso sopra con i sintomi del morbo di Parkinson.

Front Neurol. 2018 Sep 27;9:805. doi: 10.3389/fneur.2018.00805.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6170613/>

⁸⁰³ Lederer K, et al
SARS-CoV-2 mRNA Vaccines Foster Potent Antigen-Specific Germinal Center Responses Associated with Neutralizing Antibody Generation. *Immunity*. 2020 Dec 15;53(6):1281-1295.e5. doi: 10.1016/j.immuni.2020.11.009.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7680029/>

⁸⁰⁴ Rossato F, Gazzola G, Carlucci V, Bisogno A, Crivellari S, Mozzetta S, Boso F, Cagnin A.
Cerebral amyloid angiopathy – Related inflammation after COVID-19 vaccination: Case or causality? *J Neurol Sci*. 2021 Oct;429:119917. doi: 10.1016/j.jns.2021.119917.
Mai Yamakawa, Sharon Lynch, Ryan Townley,
Neuroimmunology Reports, Volume 2, 2022, 100120, ISSN 2667-257X,
<https://doi.org/10.1016/j.nerep.2022.100120>.
(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2667257X22000663>)

⁸⁰⁵ Liu S, Hossinger A, Göbbels S, Vorberg IM.
Prions on the run: How extracellular vesicles serve as delivery vehicles for self-templating protein aggregates. *Prion*. 2017 Mar 4;11(2):98-112. doi: 10.1080/19336896.2017.1306162.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5399892/>

⁸⁰⁶ Al-Dybiat I, Moudjou M, Martin D, Reine F, Herzog L, Truchet S, Berthon P, Laude H, Rezaei H, Andréoletti O, Béringue V, Sibille P.
Prion strain-dependent tropism is maintained between spleen and granuloma and relies on lymphofollicular structures. *Sci Rep*. 2019 Oct 10;9(1):14656. doi: 10.1038/s41598-019-51084-1.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6787085/>

⁸⁰⁷ Classen JB.
COVID-19 Vaccine Associated Parkinson's Disease, A Prion Disease Signal in the UK Yellow Card Adverse Event Database. *J Med - Clin Res & Rev*. 2021; 5(7): 1-6.
<https://scivisionpub.com/pdfs/covid19-vaccine-associated-parkinsons-disease-a-prion-disease-signal-in-the-uk-yellow-card-adverse-event-database-1746.pdf>

⁸⁰⁸ He R, Hu Y, Yao L, Tian Y, Zhou Y, Yi F, Zhou L, Xu H, Sun Q.
Clinical features and genetic characteristics of two Chinese pedigrees with fatal family insomnia. *Prion*. 2019 Jan;13(1):116-123. doi: 10.1080/19336896.2019.1617027.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6629183/>

Un'ulteriore conferma della formazione di amiloidi dopo la vaccinazione proviene dalla recente ricerca dei dr. Benzi Cipelli, F. Giovannini e GP. Pisano divulgata nel Quaderno 01/2022 di "Disinfection" con *l'analisi in microscopia in campo oscuro del sangue di oltre mille soggetti trattati con vaccini a mRNA*.⁸⁰⁹

In particolare, gli autori riportano che dei 1006 soggetti analizzati, 48 pari al 94% del totale, evidenziavano, dopo inoculo di vaccini a mRNA [Pfizer o Moderna] a distanza di un mese, varie alterazioni dello stato di aggregazione degli eritrociti e la presenza nel sangue periferico di particelle di varia forma e dimensione di dubbia natura che presentano però le caratteristiche delle fibrille amiloidi.

Glicosilazione della spike di SARS-Cov-2

Il virus con involucro si sono evoluti con proteine dell'involucro che hanno diversi siti di glicosilazione legati al sequone amminoacidico N-X-S/T, cioè asparagina-qualsiasi amminoacido (eccetto prolina)-serina o treonina e in rari casi all'asparagina nel sequone asparagina- qualsiasi amminoacido-cisteina.

L'asparagina (N) in queste sequenze funge da amminoacido a cui sono legate catene di carboidrati ad alto contenuto di mannosio, o catene di carboidrati di tipo complesso (glicani) sintetizzate dal macchinario di glicosilazione della cellula ospite.⁸¹⁰

La presenza di più glicani sulle glicoproteine dell'involucro virale suggerisce che possono contribuire alla sopravvivenza dei virus negli ospiti. I ruoli di questi glicani possono variare e includere:

1. Formazione di uno strato protettivo di idratazione attorno al virus a causa della natura idrofila dei glicani.
2. In alcuni virus, l'acido sialico su queste glicoproteine conferisce una carica elettrostatica negativa che circonda il virus e impedisce l'adesione aspecifica alle membrane cellulari a causa della repulsione elettrostatica da parte delle cariche negative dell'acido sialico sui glicani della membrana cellulare.
3. Alcuni glicani si legano a una varietà di recettori della superficie cellulare.
4. I glicani agiscono come uno scudo (chiamato "scudo glicano") che maschera vari antigeni peptidici e previene il legame degli anticorpi neutralizzanti, diminuendo così l'efficacia della risposta immunitaria protettiva montata dall'ospite.⁸¹¹

⁸⁰⁹ Quaderno 01/2022 di "Disinfection" con l'analisi in microscopia in campo oscuro del sangue di oltre mille soggetti trattati con vaccini a mRNA.
<https://www.ndmagazine.it/analisi-soggetti-trattati/>

⁸¹⁰ Vigerust DJ, Shepherd VL.
Virus glycosylation: role in virulence and immune interactions.
Trends Microbiol. 2007 May;15(5):211-8. doi: 10.1016/j.tim.2007.03.003.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7127133/>

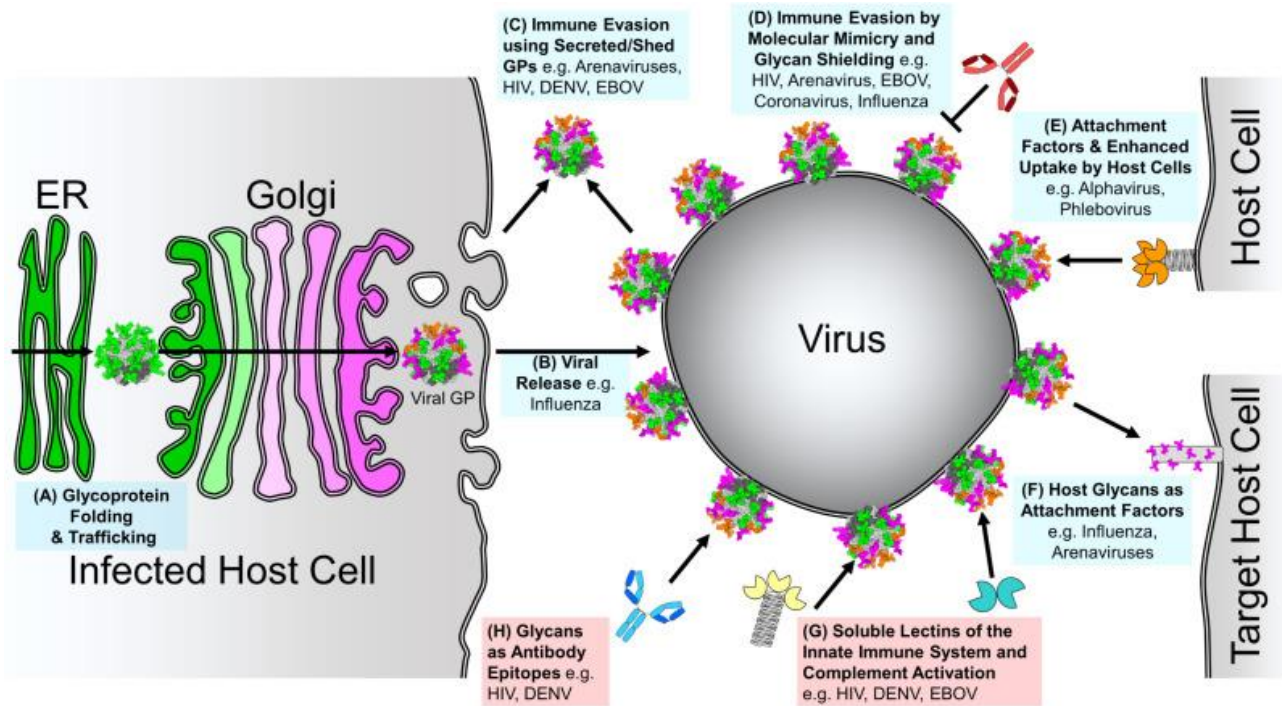
⁸¹¹ Walls AC, Tortorici MA, Frenz B, Snijder J, Li W, Rey FA, DiMaio F, Bosch BJ, Veerles D.
Glycan shield and epitope masking of a coronavirus spike protein observed by cryo-electron microscopy.
Nat Struct Mol Biol. 2016 Oct;23(10):899-905. doi: 10.1038/nsmb.3293.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5515730/>

Xiong X, Tortorici MA, Snijder J, Yoshioka C, Walls AC, Li W, McGuire AT, Rey FA, Bosch BJ, Veerles D.
Glycan Shield and Fusion Activation of a Deltacoronavirus Spike Glycoprotein Fine-Tuned for Enteric Infections.
J Virol. 2018 Jan 30;92(4):e01628-17. doi: 10.1128/JVI.01628-17.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5790929/>

Wei X, et al
Antibody neutralization and escape by HIV-1.
Nature. 2003 Mar 20;422(6929):307-12. doi: 10.1038/nature01470.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12646921/>

Crooks ET, et al
Vaccine-Elicited Tier 2 HIV-1 Neutralizing Antibodies Bind to Quaternary Epitopes Involving Glycan-Deficient Patches Proximal to the CD4 Binding Site.
PLoS Pathog. 2015 May 29;11(5):e1004932. doi: 10.1371/journal.ppat.1004932.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4449185/>

Lavie M, Hanouille X, Dubuisson J.
Glycan Shielding and Modulation of Hepatitis C Virus Neutralizing Antibodies.
Front Immunol. 2018 Apr 27;9:910. doi: 10.3389/fimmu.2018.00910.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5934428/>



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6686077/>

Ruoli della glicosilazione nella patogenesi virale. I ruoli che contribuiscono alla patogenesi virale e alle strategie delle cellule ospiti utilizzate per rispondere all'infezione virale sono rispettivamente di colore blu e rosso. Il verde e il rosa indicano rispettivamente gli stati di elaborazione di oligomannosi e glicani legati a N di tipo complesso. (A) Ripiegamento e traffico di glicoproteine. Come con tutte le glicoproteine, i glicani sulle glicoproteine virali aiutano nel ripiegamento e nel traffico attraverso la via secretoria dell'ospite. (B) Glicosilazione nella diffusione virale. La glicosilazione delle proteine della cellula ospite infetta può influenzare la diffusione virale. (C) Evasione immunitaria mediante glicoproteine secrete/sparate. I virus possono rilasciare o secernere glicoproteine che agiscono come richiami immunitari. (D) Evasione immunitaria da mimetismo molecolare e schermatura glicanica. Le proteine virali ampiamente glicosilate si proteggono dalla risposta immunitaria dell'ospite occludendo la superficie proteica immunogenica con un denso strato di glicani derivati dall'ospite. (E) Glicani come fattori di attacco e maggiore assorbimento da parte delle cellule immunitarie. Alcune glicoproteine visualizzate dall'involucro del virus contengono glicani di tipo oligomannosio sottoprocessati che funzionano come fattori di attacco della cellula ospite per aumentare o facilitare l'infezione delle cellule immunitarie. (F) Glicani ospiti come fattori di attacco. I virus possono riconoscere i glicani presentati sulle proteine della superficie della cellula ospite per facilitare l'attacco della cellula ospite. (G) Lectine solubili del sistema immunitario innato e attivazione del complemento. Poiché i glicani sottoprocessati sono presentati raramente sulle glicoproteine delle cellule ospiti mature [67,68], il sistema immunitario innato è in grado di riconoscere questi glicani come pattern molecolari associati ai patogeni (PAMP) utilizzando lectine solubili. (H) Glicani come epitopi di anticorpi. Laddove la schermatura dei glicani è conservata sulle glicoproteine virali, è possibile che la risposta immunitaria umorale, in rari casi, susciti anticorpi neutralizzanti che prendono di mira gli zuccheri come parte dei loro epitopi.

Tuttavia, poiché i glicani dei virus con involucro sono sintetizzati dall'apparato cellulare dell'ospite, gli stessi glicani possono anche essere considerati il "tallone d'Achille" del virus, in quanto ne possono provocare la neutralizzazione e la distruzione mediante anticorpi naturali che si legano agli antigeni dei carboidrati sullo scudo glicano del virus.

La produzione di questi anticorpi naturali negli esseri umani (e altri mammiferi) avviene per tutta la vita senza immunizzazione attiva, in quanto è il risultato della continua risposta immunitaria contro un'ampia gamma di glicani ambientali, la maggior parte dei quali si presenta sulla parete dei batteri che colonizzano il tratto gastrointestinale.⁸¹²

Ward AB, Wilson IA.
The HIV-1 envelope glycoprotein structure: nailing down a moving target.
Immunol Rev. 2017 Jan;275(1):21-32. doi: 10.1111/imr.12507.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5300090/>

York IA, Stevens J, Alymova IV.
Influenza virus N-linked glycosylation and innate immunity.
Biosci Rep. 2019 Jan 8;39(1):BSR20171505. doi: 10.1042/BSR20171505.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6328934/>

⁸¹² Wiener AS.
Origin of naturally occurring hemagglutinins and hemolysins; a review.

La varietà e la quantità di antigeni di carboidrati batterici che stimolano costantemente il sistema immunitario umano è enorme, poiché ci sono circa 400 ceppi di batteri che costituiscono più del 25% del materiale fecale.⁸¹³ Per fortuna, alcuni degli antigeni di carboidrati batterici immunogenici hanno strutture simili ai principali antigeni di carboidrati su altri mammiferi (ad esempio, l'epitopo α -gal e gli antigeni dell'acido N-glicolil-neuraminico (Neu5Gc) nei primati non umani), con conseguente produzione di anticorpi anti-carboidrati naturali che reagiscono in modo incrociato con questi antigeni di carboidrati.

Pertanto, un virus zoonotico che si replica in uno qualsiasi di questi ospiti non umani presenta antigeni di carboidrati che sono sintetizzati dal macchinario di glicosilazione dell'ospite e che legano anticorpi anti-carboidrati naturali umani che possono neutralizzare e distruggere il virus quando questo passa dall'ospite animale all'uomo (salto di specie).

In alcuni casi, la protezione da parte di questi anticorpi può comportare la completa distruzione del virus e l'individuo contagiato può risultare asintomatico.

In altri casi la protezione può essere parziale; se la neutralizzazione e la distruzione del virus invasore da parte degli anticorpi anti-carboidrati naturali non è completa, c'è una "corsa" all'interno dell'individuo infetto tra il virus replicante che danneggia i vari tessuti e la risposta immunitaria specifica anti-virus, che tenta di evitare che i virus raggiungano una massa letale.

In alcuni individui infetti, anche la protezione parziale da parte degli anticorpi anti-carboidrati naturali può consentire al sistema immunitario di "recuperare" la popolazione virale in espansione e prevenire la progressione verso uno stadio letale.

Tuttavia, nelle epidemie di virus con virulenza molto elevata, la penetrazione anche di pochi virioni nelle cellule umane può essere sufficiente per provocare la replicazione del virus con uno scudo glicano umano, che non lega alcun anticorpo umano naturale anti-carboidrati.

In questo scenario, la successiva replicazione rapida del virus provoca la morte di gran parte degli ospiti infetti, prima che possa essere suscitata una risposta immunitaria protettiva.⁸¹⁴

J Immunol. 1951 Feb;66(2):287-95.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14814309/>

Springer GF.
Blood-group and Forssman antigenic determinants shared between microbes and mammalian cells.
Prog Allergy. 1971;15:9-77.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4133332/>

Stowell SR, et al
Microbial glycan microarrays define key features of host-microbial interactions.
Nat Chem Biol. 2014 Jun;10(6):470-6. doi: 10.1038/nchembio.1525.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4158828/>

Bovin NV.
Natural antibodies to glycans.
Biochemistry (Mosc). 2013 Jul;78(7):786-97. doi: 10.1134/S0006297913070109.
<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/contents/v78/full/78071008.html>

Blixt O, et al
Printed covalent glycan array for ligand profiling of diverse glycan binding proteins.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Dec 7;101(49):17033-8. doi: 10.1073/pnas.0407902101.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC534418/>

⁸¹³ Stephen AM, Cummings JH.
The microbial contribution to human faecal mass.
J Med Microbiol. 1980 Feb;13(1):45-56. doi: 10.1099/00222615-13-1-45.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7359576/>

Gerritsen J, Smidt H, Rijkers GT, de Vos WM.
Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics.
Genes Nutr. 2011 Aug;6(3):209-40. doi: 10.1007/s12263-011-0229-7.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3145058/>

⁸¹⁴ Galili U.
Host Synthesized Carbohydrate Antigens on Viral Glycoproteins as "Achilles' Heel" of Viruses Contributing to Anti-Viral Immune Protection.
Int J Mol Sci. 2020 Sep 13;21(18):6702. doi: 10.3390/ijms21186702.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7555091/>

Come la maggior parte delle glicoproteine virali che vengono incorporate nel doppio strato della membrana dell'involucro, la proteina SARS-CoV-2 S è ampiamente decorata con glicani N-legati in entrambe le subunità S1 e S2, con un totale di 22 siti glicani N-legati (rispetto a 23 sulla SARS)⁸¹⁵, a cui si aggiungono siti di O-glicosilazione.

Questi glicani conferiscono due benefici al virus. In primo luogo, i residui di mannosio all'interno di questi glicani sono frazioni importanti per interagire con i fattori di attaccamento della superficie cellulare, come i glicosaminoglicani (GAG) e gli oligosaccaridi contenenti acido sialico⁸¹⁶, prima di legarsi al recettore ad alta affinità, che nel caso di SARS-CoV-2, è l'enzima di conversione dell'angiotensina 2 (ACE2)⁸¹⁷. Nel complesso spike-ACE2, è stata segnalata un'ampia glicosilazione all'interfaccia del complesso⁸¹⁸, evidenziando i ruoli dei glicani nella modulazione delle interazioni spike-ACE2.

In secondo luogo, come già discusso, i glicani mascherano stericamente gli epitopi polipeptidici sottostanti dal riconoscimento di anticorpi potenzialmente neutralizzanti, e quindi a volte sono indicati come "scudo glicano"⁸¹⁹.

⁸¹⁵ Cai Y, Zhang J, Xiao T, Peng H, Sterling SM, Walsh RM Jr, Rawson S, Rits-Volloch S, Chen B.

Distinct conformational states of SARS-CoV-2 spike protein. *Science*. 2020 Sep 25;369(6511):1586-1592. doi: 10.1126/science.abd4251. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7464562/>

Watanabe Y, Allen JD, Wrapp D, McLellan JS, Crispin M. Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike. *Science*. 2020 Jul 17;369(6501):330-333. doi: 10.1126/science.abb9983. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7199903/>

Watanabe Y, Berndsen ZT, Raghvani J, Seabright GE, Allen JD, Pybus OG, McLellan JS, Wilson IA, Bowden TA, Ward AB, Crispin M. Vulnerabilities in coronavirus glycan shields despite extensive glycosylation. *Nat Commun*. 2020 May 27;11(1):2688. doi: 10.1038/s41467-020-16567-0. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7253482/>

⁸¹⁶Li W, et al. Identification of sialic acid-binding function for the Middle East respiratory syndrome coronavirus spike glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Oct 3;114(40):E8508-E8517. doi: 10.1073/pnas.1712592114. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5635925/>

Tortorici MA, Walls AC, Lang Y, Wang C, Li Z, Koerhuis D, Boons GJ, Bosch BJ, Rey FA, de Groot RJ, Veerles D. Structural basis for human coronavirus attachment to sialic acid receptors. *Nat Struct Mol Biol*. 2019 Jun;26(6):481-489. doi: 10.1038/s41594-019-0233-y. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6554059/>

Robson B. Bioinformatics studies on a function of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein as the binding of host sialic acid glycans. *Comput Biol Med*. 2020 Jul;122:103849. doi: 10.1016/j.combiomed.2020.103849. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7278709/>

⁸¹⁷Hoffmann M, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. 2020 Apr 16;181(2):271-280.e8. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.052. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7102627/>

Zhou P, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020 Mar;579(7798):270-273. doi: 10.1038/s41586-020-2012-7. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7095418/>

⁸¹⁸Zhao P, et al. Virus-Receptor Interactions of Glycosylated SARS-CoV-2 Spike and Human ACE2 Receptor. *Cell Host Microbe*. 2020 Oct 7;28(4):586-601.e6. doi: 10.1016/j.chom.2020.08.004. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7443692/>

⁸¹⁹Doores KJ. The HIV glycan shield as a target for broadly neutralizing antibodies. *FEBS J*. 2015 Dec;282(24):4679-91. doi: 10.1111/febs.13530. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4950053/>

Le glicoproteine virali sono i principali bersagli degli anticorpi dell'ospite, poiché queste molecole sono presenti in modo prominente sulla superficie del virione⁸²⁰. Diversamente dai batteri, in cui i glicani sono codificati dal genoma batterico e sono trattati come epitopi "non sé" dagli ospiti corrispondenti, i virus sfruttano il macchinario delle cellule ospiti per la glicosilazione e generalmente sono decorati con i glicani "self", generalmente considerati una strategia per sfuggire alla risposta immunitaria dell'ospite.⁸²¹

Per consentire la loro biosintesi all'interno della cellula ospite, i virus dirottano il macchinario di glicosilazione dell'ospite, ma è noto che si verificano differenze dai tipici schemi di glicosilazione dell'ospite, della densità dei glicani e della loro composizione.

Ne segue che un certo livello di immunogenicità basata sui glicani può essere raggiunto quando i tipi di glicani e i modelli di glicosilazione sono significativamente diversi da quelli che si incontrano nelle proteine dell'ospite, e quindi diventano bersagli immunologici.

Il mascheramento della glicosilazione può essere razionalizzato da un punto di vista chimico: è improbabile che l'associazione di un anticorpo a un antigene glicosilato abbia le elevate affinità attese dal riconoscimento anticorpale dei loci proteici a causa della significativa perdita di entropia conformazionale ($-\Delta S \gg R$, $R =$ costante dei gas) associato al vincolo dei glicani implicati nell'evento di riconoscimento.

Quindi, oltre a proteggere la proteina sottostante dal riconoscimento dell'anticorpo, i glicani attenuano la capacità del sistema immunitario ospite di reclutare anticorpi contro gli epitopi glicosilati.

La glicosilazione funge anche da mascheramento nei confronti della risposta immunitaria adattativa mediata dai linfociti T.

I peptidi del patogeno vengono portati sulle cellule presentanti l'antigene dal complesso maggiore di istocompatibilità II (MHC II). Questo complesso ha motivi peptidici preferiti, e quindi è possibile prevedere quali regioni antigeniche di una proteina patogena possono suscitare una risposta immunitaria adattativa.

Tuttavia, quando il presunto peptide antigenico è glicosilato, la sua incorporazione all'interno dell'MHC può essere annullata a causa dell'impedimento sterico determinato dalla dinamica dei glicani.⁸²²

Bagdonaite I, Wandall HH.

Global aspects of viral glycosylation.

Glycobiology. 2018 Jul 1;28(7):443-467. doi: 10.1093/glycob/cwy021.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7108637/>

⁸²⁰ Murin CD, Wilson IA, Ward AB.

Antibody responses to viral infections: a structural perspective across three different enveloped viruses.

Nat Microbiol. 2019 May;4(5):734-747. doi: 10.1038/s41564-019-0392-y.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6818971/>

⁸²¹ Alexander S, Elder JH.

Carbohydrate dramatically influences immune reactivity of antisera to viral glycoprotein antigens.

Science. 1984 Dec 14;226(4680):1328-30. doi: 10.1126/science.6505693.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6505693/>

Zheng L, Ma Y, Chen M, Wu G, Yan C, Zhang XE.

SARS-CoV-2 spike protein receptor-binding domain N-glycans facilitate viral internalization in respiratory epithelial cells.

Biochem Biophys Res Commun. 2021 Nov 19;579:69-75. doi: 10.1016/j.bbrc.2021.09.053.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8459579/>

Schulze IT.

Effects of glycosylation on the properties and functions of influenza virus hemagglutinin.

J Infect Dis. 1997 Aug;176 Suppl 1:S24-8. doi: 10.1086/514170.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9240690/>

⁸²² Fernández A.

Glycosylation of SARS-CoV-2 Steers Evolutionary Outcomes in the Postvaccination Phase.

ACS Pharmacol Transl Sci. 2021 Jan 21;4(1):410-412. doi: 10.1021/acscptsci.1c00015.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7887837/>

Harbison AM, Fogarty CA, Phung TK, Satheesan A, Schulz BL, Fadda E.

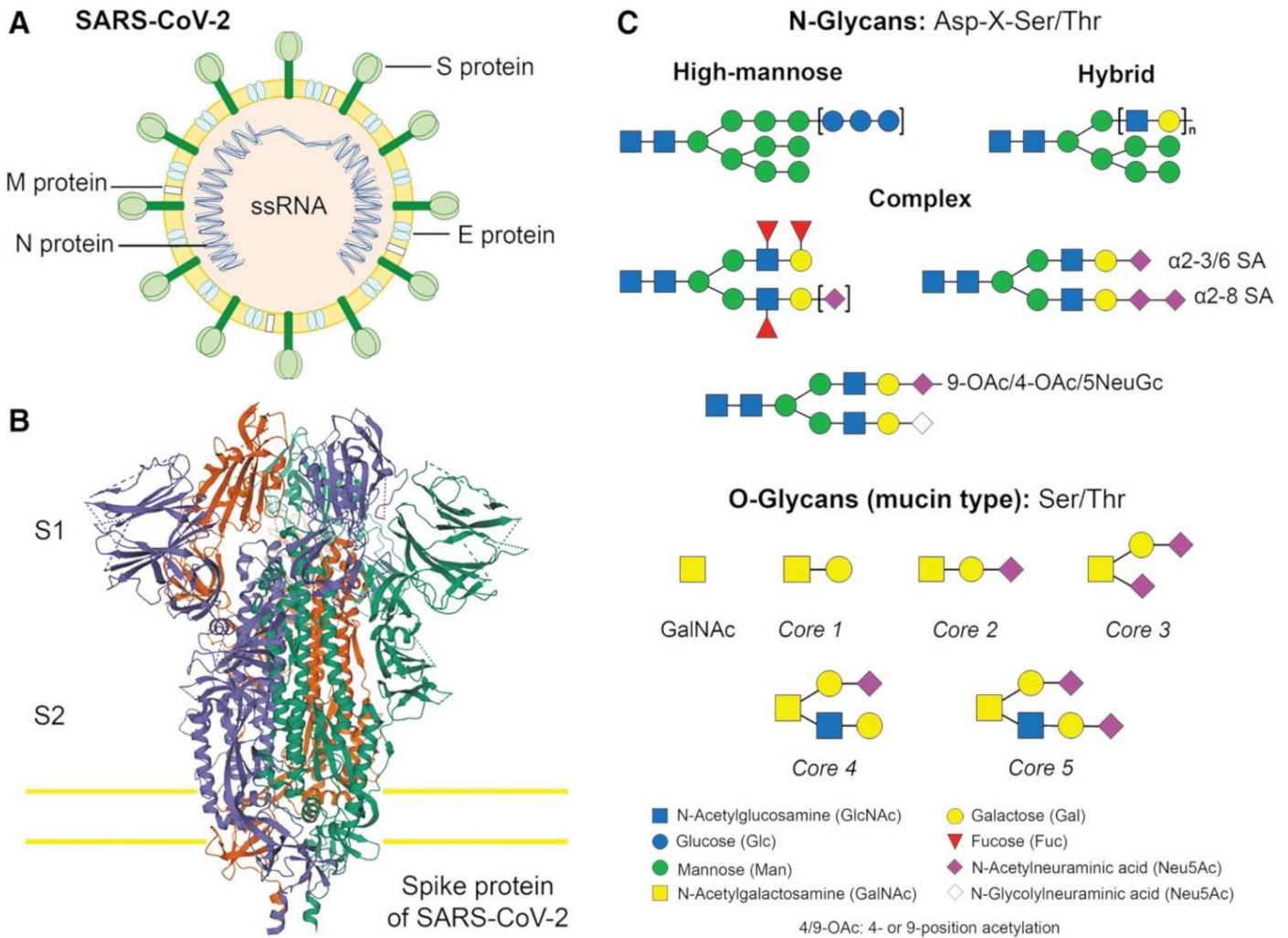
Fine-tuning the spike: role of the nature and topology of the glycan shield in the structure and dynamics of the SARS-CoV-2 S.

Chem Sci. 2021 Nov 25;13(2):386-395. doi: 10.1039/d1sc04832e.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8729800/>

Zhao X, Chen H, Wang H.

Glycans of SARS-CoV-2 Spike Protein in Virus Infection and Antibody Production.

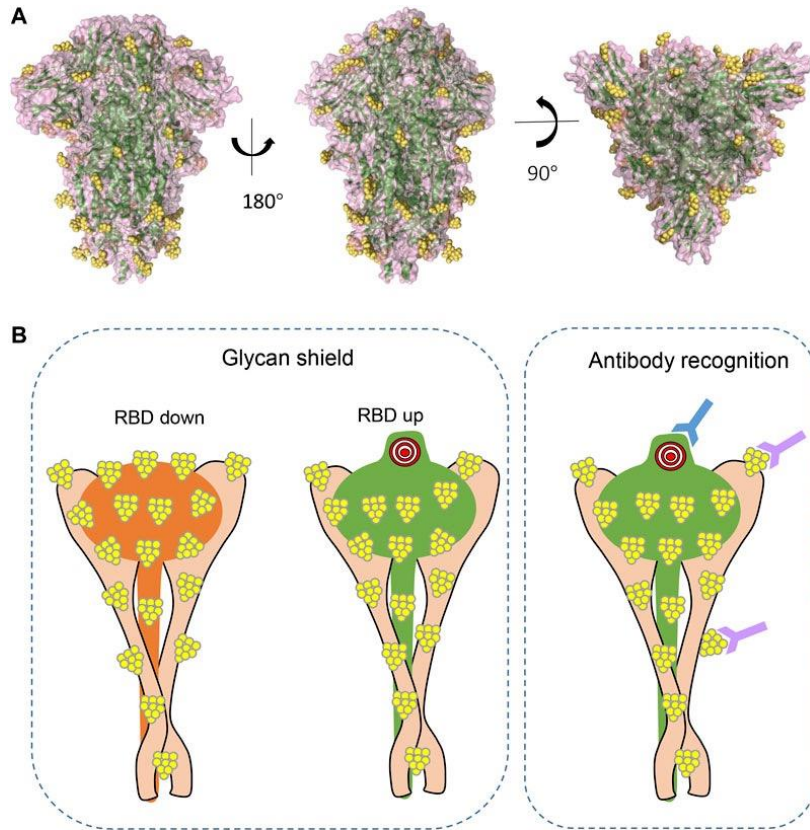


<https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/vim.2020.0174>

Introduzione ai coronavirus e alla glicoproteina S. (A) Diagramma di un virione di coronavirus con le principali proteine strutturali. (B) struttura 3D della glicoproteina SARS-CoV-2 S che mostra il consenso del sito di N- e O-glicosilazione (PDB:6X6P). (C) Profilo di glicosilazione del coronavirus SARS-CoV-2, dove sono stati trovati siti di N-glicosilazione e O-glicosilazione con core-1 type O-glicani. Rappresentazione dei simboli dei monosaccaridi secondo il sistema SNFG. SNFG, nomenclatura dei simboli per i glicani; SARS-CoV, coronavirus della sindrome respiratoria acuta grave

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2021.629873/full>

l'effetto schermante della glicosilazione sul trimero della proteina S (A). Rappresentazioni strutturali da diversi punti di vista che dimostrano epitopi di glicani. Le palline gialle rappresentano i glicani e la spina dorsale S è stata generata in base all'ID PDB: 6VXX. (B). Diagramma dei glicani nella schermatura del riconoscimento molecolare e il loro ruolo potenziale nell'elicitazione degli anticorpi (pannello di sinistra: rispetto a RBD in posizione "su", RBD in posizione "giù" ha una maggiore copertura di glicano; pannello di destra: oltre agli epitopi peptidici, alcuni glicani possono anche essere riconosciuti dall'anticorpo e sono quindi epitopi importanti nella produzione di anticorpi).



Di seguito è riportata la mappatura della glicosilazione della spike.⁸²³

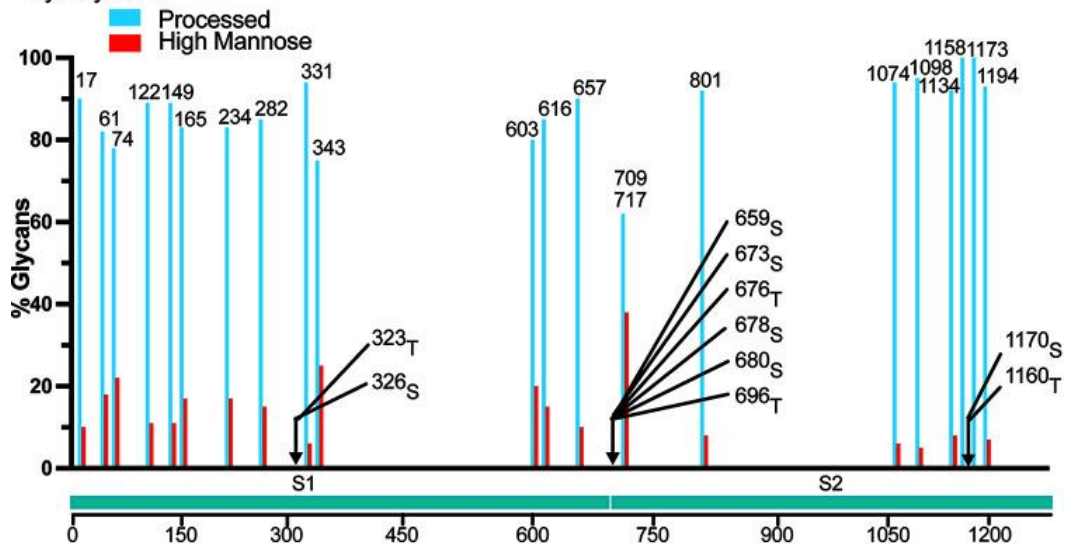
Glycosylation Analysis of the SARS-CoV-2 S Glycoproteins

Summary:

Glycosylation	Number	Detected	No. of Glycans
N-linked	22	22	826*
O-linked	3 previously reported (T323, S325, T678)	10 detected (T323, S325, S659, S673, T676, T678, S680, T696, T1160, S1170)	17

* Total N-linked glycans used in the bar graph

Glycosylation



⁸²³ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8827021/>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8827021/>

Profilo di glicosilazione delle glicoproteine S purificate. L'analisi MS delle glicoproteine S purificate ha identificato 22 siti di glicosilazione legati all'N e siti di glicosilazione legati all'O, riassunti nel pannello superiore. La composizione del glicano in ciascun sito di glicosilazione N-linked è mostrata nel pannello inferiore. I residui di serina e treonina contenuti nei glicopeptidi con carboidrati legati all'O sono indicati dalle frecce.

I glicani nella glicoproteina potrebbero quindi stimolare la produzione di anticorpi specifici per i carboidrati, che svolgono un ruolo importante nella protezione dell'ospite dalle malattie infettive.⁸²⁴

D'altra parte, potrebbero anche reagire in modo incrociato con gli antigeni dell'ospite, portando a malattie autoimmuni⁸²⁵.

Studi precedenti hanno dimostrato che le malattie autoimmuni, come la sindrome di Guillain-Barre, la sclerosi multipla e la malattia infiammatoria intestinale, sono causate da anticorpi specifici per i carboidrati correlati a infezioni batteriche o microbi intestinali.⁸²⁶

Un recente studio SARS-CoV-2 ha mostrato che i pazienti COVID-19 hanno anticorpi IgM e IgG insolitamente alti contro gli auto-carboidrati, inclusi gangliosidi, glicani N-linked, derivati del LacNAc, gruppo sanguigno H1 e sialyl Lewis X⁸²⁷, indicando la possibilità di malattie autoimmuni causate da questi anticorpi.

Le glicoproteine SARS-CoV-2 S prodotte per essere utilizzate come immunogeni del vaccino sono state progettate per consentire la secrezione di trimeri solubili, per inibire la scissione della furina e per stabilizzare le conformazioni di prefusione⁸²⁸.

⁸²⁴ Casalino L, Gaieb Z, Goldsmith JA, Hjorth CK, Dommer AC, Harbison AM, Fogarty CA, Barros EP, Taylor BC, McLellan JS, Fadda E, Amaro RE. Beyond Shielding: The Roles of Glycans in the SARS-CoV-2 Spike Protein. *ACS Cent Sci.* 2020 Oct 28;6(10):1722-1734. doi: 10.1021/acscentsci.0c01056. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7523240/>

Zhao X, Chen H, Wang H. Glycans of SARS-CoV-2 Spike Protein in Virus Infection and Antibody Production. *Front Mol Biosci.* 2021 Apr 13;8:629873. doi: 10.3389/fmolb.2021.629873. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8076860/>

⁸²⁵ Patel P, Kearney JF. Immunological Outcomes of Antibody Binding to Glycans Shared between Microorganisms and Mammals. *J Immunol.* 2016 Dec 1;197(11):4201-4209. doi: 10.4049/jimmunol.1600872. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5119654/>

⁸²⁶ Kappler K, Hennet T. Emergence and significance of carbohydrate-specific antibodies. *Genes Immun.* 2020 Aug;21(4):224-239. doi: 10.1038/s41435-020-0105-9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7449879/>

⁸²⁷ Butler DL, Imberti L, Quaresima V, Fiorini C; NIAID COVID-19 Consortium, Gildersleeve JC. Abnormal antibodies to self-carbohydrates in SARS-CoV-2-infected patients. *PNAS Nexus.* 2022 Jun 17;1(3):pgac062. doi: 10.1093/pnasnexus/pgac062. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35865361/>

⁸²⁸ Corbett KS, et al. SARS-CoV-2 mRNA vaccine design enabled by prototype pathogen preparedness. *Nature.* 2020 Oct;586(7830):567-571. doi: 10.1038/s41586-020-2622-0. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7581537/>

Yu J, et al. DNA vaccine protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Science.* 2020 Aug 14;369(6505):806-811. doi: 10.1126/science.abc6284. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7243363/>

Corbett KS, et al. Evaluation of the mRNA-1273 Vaccine against SARS-CoV-2 in Nonhuman Primates. *N Engl J Med.* 2020 Oct 15;383(16):1544-1555. doi: 10.1056/NEJMoa2024671. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7449230/>

Mercado NB, et al. Single-shot Ad26 vaccine protects against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Nature.* 2020 Oct;586(7830):583-588. doi: 10.1038/s41586-020-2607-z. Epub 2020 Jul 30. Erratum in: *Nature.* 2021 Feb;590(7844):E25. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7581548/>

Bos R, et al

Sono stati caratterizzati i profili di glicosilazione delle glicoproteine S del virione e di molte di queste glicoproteine S modificate.⁸²⁹

I trimeri purificati legano preferenzialmente MAb che riconoscono una conformazione prefusionale chiusa con tutti e tre i RBD in posizione abbassata. Tuttavia, è prevedibile che il trimero della glicoproteina S di tipo

Ad26 vector-based COVID-19 vaccine encoding a prefusion-stabilized SARS-CoV-2 Spike immunogen induces potent humoral and cellular immune responses.

NPJ Vaccines. 2020 Sep 28;5:91. doi: 10.1038/s41541-020-00243-x.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7522255/>

Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veesler D.
Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein.
Cell. 2020 Apr 16;181(2):281-292.e6. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.058. Epub 2020 Mar 9. Erratum in: Cell. 2020 Dec 10;183(6):1735.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7102599/>

Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh CL, Abiona O, Graham BS, McLellan JS.
Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation.
Science. 2020 Mar 13;367(6483):1260-1263. doi: 10.1126/science.abb2507.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7164637/>

Bangaru S, et al
Structural analysis of full-length SARS-CoV-2 spike protein from an advanced vaccine candidate.
Science. 2020 Nov 27;370(6520):1089-1094. doi: 10.1126/science.abe1502.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7857404/>

⁸²⁹ Yao H, Song Y, Chen Y, Wu N, Xu J, Sun C, Zhang J, Weng T, Zhang Z, Wu Z, Cheng L, Shi D, Lu X, Lei J, Crispin M, Shi Y, Li L, Li S.
Molecular Architecture of the SARS-CoV-2 Virus.
Cell. 2020 Oct 29;183(3):730-738.e13. doi: 10.1016/j.cell.2020.09.018.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7474903/>

Zhang Y, Zhao W, Mao Y, Chen Y, Wang S, Zhong Y, Su T, Gong M, Du D, Lu X, Cheng J, Yang H.
Site-specific N-glycosylation Characterization of Recombinant SARS-CoV-2 Spike Proteins.
Mol Cell Proteomics. 2021;20:100058. doi: 10.1074/mcp.RA120.002295.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7876485/>

Allen JD, et al
Site-Specific Steric Control of SARS-CoV-2 Spike Glycosylation.
Biochemistry. 2021 Jul 13;60(27):2153-2169. doi: 10.1021/acs.biochem.1c00279.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8262170/>

Brun J, Vasiljevic S, Gangadharan B, Hensen M, V Chandran A, Hill ML, Kiappes JL, Dwek RA, Alonzi DS, Struwe WB, Zitzmann N.
Assessing Antigen Structural Integrity through Glycosylation Analysis of the SARS-CoV-2 Viral Spike.
ACS Cent Sci. 2021 Apr 28;7(4):586-593. doi: 10.1021/acscentsci.1c00058.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8029450/>

Cai Y, Zhang J, Xiao T, Peng H, Sterling SM, Walsh RM Jr, Rawson S, Rits-Volloch S, Chen B.
Distinct conformational states of SARS-CoV-2 spike protein.
Science. 2020 Sep 25;369(6511):1586-1592. doi: 10.1126/science.abd4251.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7464562/>

Watanabe Y, Allen JD, Wrapp D, McLellan JS, Crispin M.
Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike.
Science. 2020 Jul 17;369(6501):330-333. doi: 10.1126/science.abb9983.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7199903/>

Zhao P, et al
Virus-Receptor Interactions of Glycosylated SARS-CoV-2 Spike and Human ACE2 Receptor.
Cell Host Microbe. 2020 Oct 7;28(4):586-601.e6. doi: 10.1016/j.chom.2020.08.004.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7443692/>

Sanda M, Morrison L, Goldman R.
N and O glycosylation of the SARS-CoV-2 spike protein.
bioRxiv [Preprint]. 2020 Jul 26:2020.07.05.187344. doi: 10.1101/2020.07.05.187344. Update in: Anal Chem. 2021 Feb 2;93(4):2003-2009.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7359517/>

Bangaru S, et al
Structural analysis of full-length SARS-CoV-2 spike protein from an advanced vaccine candidate.
Science. 2020 Nov 27;370(6520):1089-1094. doi: 10.1126/science.abe1502.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7857404/>

selvatico nativo sia dinamico ⁸³⁰ e possa mostrare una maggiore flessibilità rispetto ai costrutti della glicoproteina S che sono stati ingegnerizzati per favorire la conformazione prefusogena.

Questa flessibilità naturale della glicoproteina S potrebbe aumentare l'accesso dei glicani agli enzimi di elaborazione nell'apparato del Golgi.

Come gran parte delle glicoproteine virali, il polipeptide S durante la sua biosintesi, mentre è N-glicosilato nel RE, interagisce con gli chaperoni molecolari cellulari calnexina e/o calreticolina, e successivamente i carboidrati vengono processati nel RE e nell'apparato del Golgi.⁸³¹

Nel caso del coronavirus SARS è stato dimostrato che il legame della proteina S alla calnexina è essenziale per il corretto ripiegamento della proteina spike glicosilata e che questo chaperone ER svolge un ruolo critico nella capacità infettiva dei virus della progenie e di conseguenza sull'infezione da SARS-CoV.⁸³²

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6686077/>

Glicosilazione di una glicoproteina virale nei percorsi classici legati all'N e alla mucina dei mammiferi. **(A)** Le classi virali contenenti prevalentemente virus con involucro e senza involucro sono colorate rispettivamente in blu e grigio. Sebbene non avvolti, virus come i rotavirus possono anche sfruttare le vie di glicosilazione dell'ospite per modificare le loro proteine. **(B)** Dopo la sintesi dell'mRNA, il precursore del glicano N-linked tri-glucosilato maturo, dolichol-P-P-glycan, viene trasferito co-traduzionalmente in blocco dall'oligosaccariltransferasi al residuo di asparagina di un sequone Asn-X-Ser/Thr su un nascente catena polipeptidica. Dopo il trasferimento del precursore glicano alla proteina, le glucosidasi nell'ER rimuovono i tre residui di glucosio mentre la proteina si ripiega nel ciclo Calnexin/Calreticulin. Una serie di mannosidasi ER e Golgi successivamente scinde i residui di mannosio fino al glicano Man5GlcNAc2. L'azione della GlcNAc transferasi-I (GlcNAcT-I) avvia il primo ramo dell'N-glicano. Una volta che l' α -mannosidasi II rimuove i due residui di mannosio esterni rimanenti, altri enzimi di elaborazione dei glicani come le galattosil, fucosil e sialil-transferasi, possono agire per costruire un vasto assortimento di glicani di tipo complesso. **(C)** La via della glicosilazione legata all'O di tipo mucina è avviata da una famiglia di transferasi ppGalNAc che collegano in modo covalente un monosaccaride N-acetilgalattosammina (GalNAc) a qualsiasi residuo di serina, treonina e tirosina. A seguito di questa coniugazione, una serie di glicosiltransferasi può agire sul residuo primario di GalNAc per generare i quattro nuclei comuni di glicani legati all'O. Ciascuno di questi nuclei può essere esteso ed elaborato ulteriormente per generare numerosi glicani legati all'O di tipo mucina. I glicani sono presentati utilizzando la nomenclatura simbolica del Consortium for Functional Glycomics e i collegamenti del sistema Oxford, come da chiave.

⁸³⁰ Benton DJ, Wrobel AG, Xu P, Roustan C, Martin SR, Rosenthal PB, Skehel JJ, Gamblin SJ. Receptor binding and priming of the spike protein of SARS-CoV-2 for membrane fusion. *Nature*. 2020 Dec;588(7837):327-330. doi: 10.1038/s41586-020-2772-0. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7116727/>

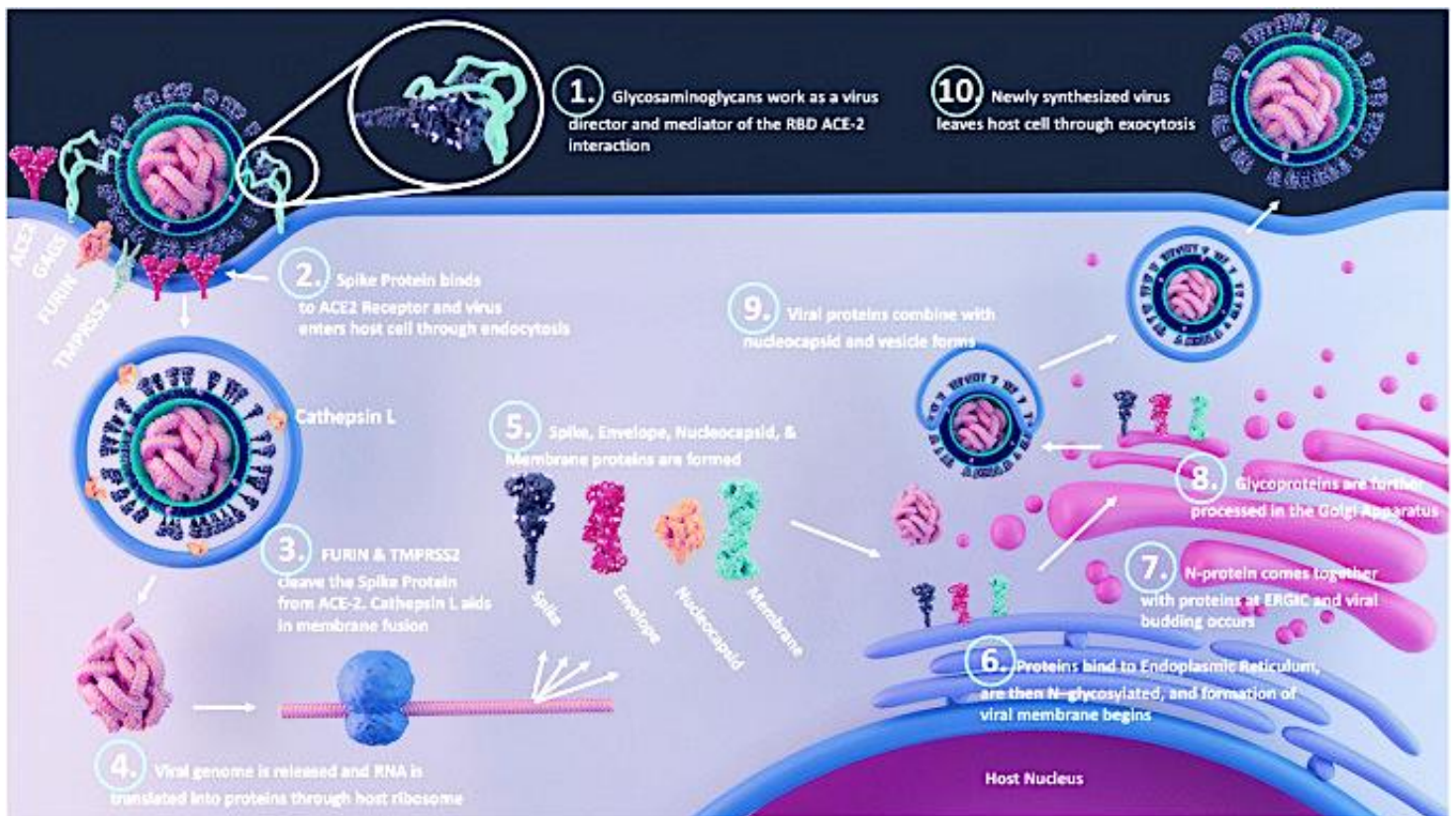
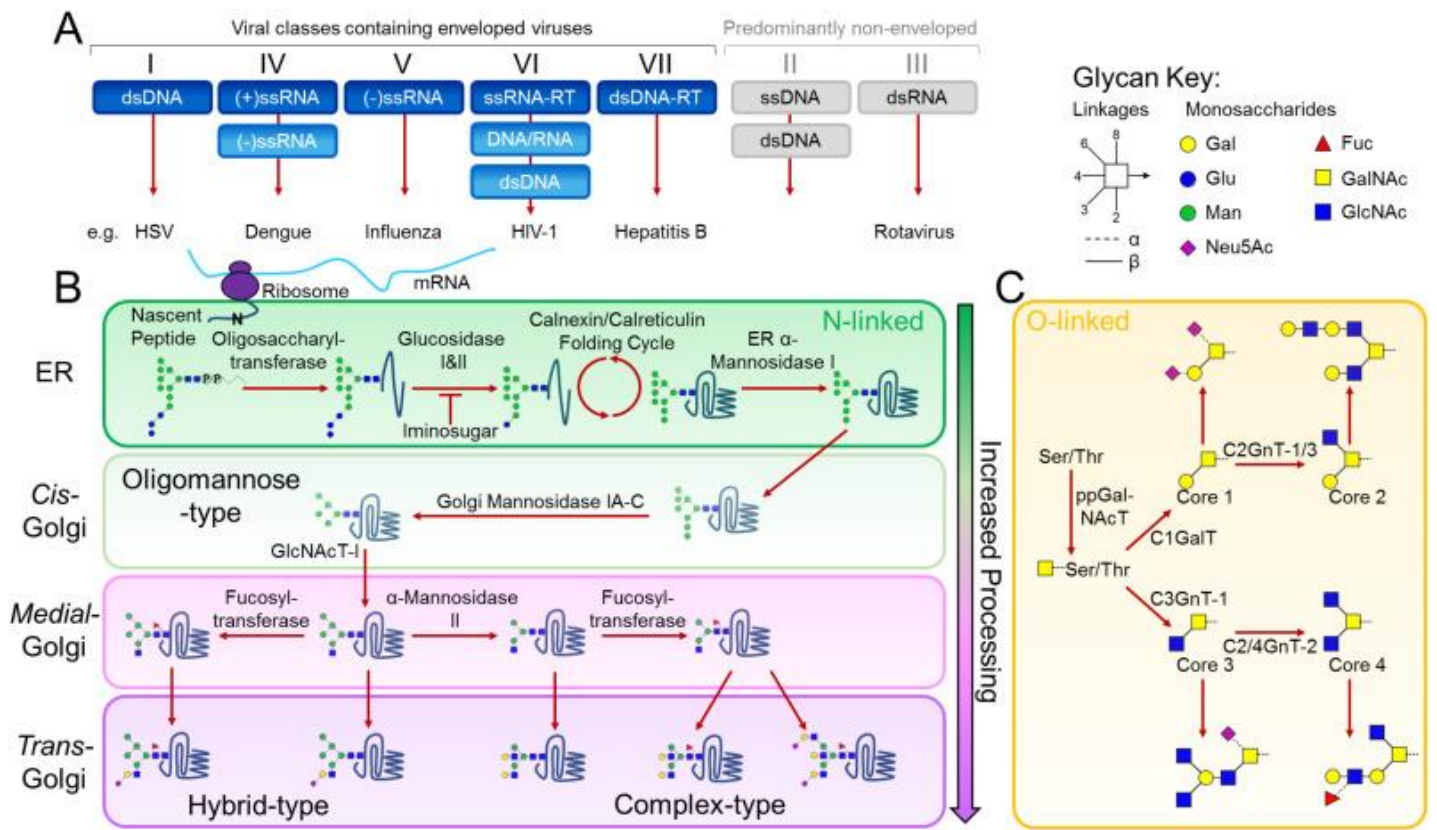
⁸³¹ Braakman I, van Anken E. Folding of viral envelope glycoproteins in the endoplasmic reticulum. *Traffic*. 2000 Jul;1(7):533-9. doi: 10.1034/j.1600-0854.2000.010702.x. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7190097/>

Fung TS, Liu DX. Post-translational modifications of coronavirus proteins: roles and function. *Future Virol*. 2018 Jun;13(6):405-430. doi: 10.2217/fvl-2018-0008. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7080180/>

Watanabe Y, Bowden TA, Wilson IA, Crispin M. Exploitation of glycosylation in enveloped virus pathobiology. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2019 Oct;1863(10):1480-1497. doi: 10.1016/j.bbagen.2019.05.012. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6686077/>

Shajahan A, Pepi LE, Rouhani DS, Heiss C, Azadi P. Glycosylation of SARS-CoV-2: structural and functional insights. *Anal Bioanal Chem*. 2021 Dec;413(29):7179-7193. doi: 10.1007/s00216-021-03499-x. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8262766/>

⁸³² Fukushi M, Yoshinaka Y, Matsuoka Y, Hatakeyama S, Ishizaka Y, Kirikae T, Sasazuki T, Miyoshi-Akiyama T. Monitoring of S protein maturation in the endoplasmic reticulum by calnexin is important for the infectivity of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Virol*. 2012 Nov;86(21):11745-53. doi: 10.1128/JVI.01250-12. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3486308/>



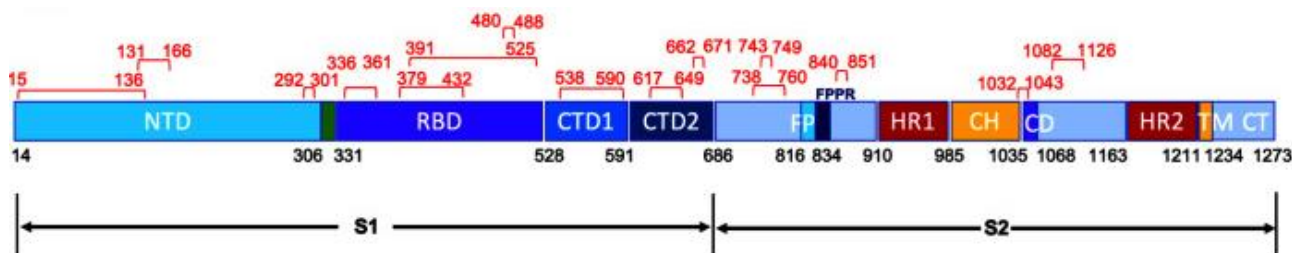
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8262766/>

Processi diversi durante l'infezione da SARS-CoV-2. Legame virale: il dominio di legame del recettore (RBD) della proteina spike (S) interagisce con i recettori della superficie della cellula ospite come ACE2, GAG e altri potenziali recettori; fusione: le proteasi dell'ospite come TMPRSS2, catepsine e furina scindono le subunità S1 e S2 e la subunità S2 media la fusione virale; e ingresso: il virus entra nella cellula ospite per endocitosi o fusione di membrana. Una volta all'interno della cellula ospite, l'RNA utilizza il macchinario ospite per tradurre le proteine virali. Le modifiche post-traduzionali

si verificano sulle proteine strutturali dirottando il sistema ospite e il germogliamento virale si verifica nei compartimenti intermedi del reticolo endoplasmatico-Golgi (ER/GIC). Infine, si verifica l'assemblaggio virale e il virus viene rilasciato per escitosi

Oltre all'apparato calnexina/calreticolina necessario per il corretto ripiegamento, la formazione post-traduzionale di legami disolfuro gioca un ruolo decisivo nella generazione dell'architettura glicoproteica finale. Ad esempio, è stato dimostrato che la formazione del legame disolfuro è essenziale per il corretto ripiegamento, traffico e trimerizzazione della proteina spike del coronavirus MHV.⁸³³

Nel caso della proteina S SARS-CoV-2, sono stati trovati nove residui di cisteina nel dominio di legame del recettore S1, otto dei quali formano quattro coppie di legami disolfuro. Tra queste quattro coppie, tre (Cys336–Cys361, Cys379–Cys432 e Cys391–Cys525) stabilizzano la struttura del foglietto β , mentre la quarta (Cys480–Cys488) collega le anse nell'estremità distale dell'RBM.⁸³⁴



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8827021/>

Topologia del legame disolfuro delle glicoproteine S purificate. I legami disolfuro canonici identificati dalla SM sono mostrati in rosso sopra una rappresentazione schematica della glicoproteina SARS-CoV-2 S. Le regioni della glicoproteina S includono il dominio N-terminale (NTD), il dominio di legame del recettore (RBD), i domini C-terminale (CTD1 e CTD2), il peptide di fusione (FP), la regione prossimale del peptide di fusione (FPPR), le regioni di ripetizione dell'eptade (HR1 e HR2), regione elicoidale centrale (CH), dominio del connettore (CD), regione transmembrana (TM) e coda citoplasmatica.

Si ritiene che questi legami disolfuro intramolecolari contribuiscano agli orientamenti stereospecifici dei residui di amminoacidi della proteina spike che interagiscono con ACE2 e quindi svolgano un ruolo rilevante nel legame dell'RBM al recettore.

È stato ipotizzato che la perturbazione della conformazione funzionalmente attiva della spike attraverso la riduzione dei legami disolfuro accessibili possa essere una strategia fattibile per dissociare la proteina spike dal recettore ACE2, prevenendo l'infezione⁸³⁵.

Studi *in silico* suggeriscono che la N-acetil cisteina (NAC), un farmaco usato come agente antiossidante e mucolitico, possa legarsi in prossimità di un legame disolfuro accessibile al solvente (Cys391-Cys525) e che la riduzione di questo legame disolfuro tramite lo scambio tiolo/disolfuro, seguito dalla coniugazione covalente di NAC, perturbi gli orientamenti stereospecifici dei residui chiave interagenti della glicoproteina S, indebolendo l'affinità di legame della spike con il recettore ACE2.⁸³⁶

⁸³³ Opstelten DJ, de Groot P, Horzinek MC, Vennema H, Rottier PJ.

Disulfide bonds in folding and transport of mouse hepatitis coronavirus glycoproteins.

J Virol. 1993 Dec;67(12):7394-401. doi: 10.1128/JVI.67.12.7394-7401.1993.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC238203/>

⁸³⁴ 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.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32225176/>

⁸³⁵ Debnath U, Dewaker V, Prabhakar YS, Bhattacharyya P, Mandal A.

Conformational Perturbation of SARS-CoV-2 Spike Protein Using N-Acetyl Cysteine, a Molecular Scissor: A Probable Strategy to Combat COVID-19.

ChemRxiv. Cambridge: Cambridge Open Engage; 2020; DOI 10.26434/chemrxiv.12687923.v1

<https://chemrxiv.org/engage/chemrxiv/article-details/60c753a54c8919810fad4380>

⁸³⁶ Santopolo S, Riccio A, Santoro MG.

The biogenesis of SARS-CoV-2 spike glycoprotein: multiple targets for host-directed antiviral therapy.

Biochem Biophys Res Commun. 2021 Jan 29;538:80-87. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.10.080.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7698684/>

Zhang S, Go EP, Ding H, Anang S, Kappes JC, Desaire H, Sodroski JG.

Un'altra importante modificazione post-traduzionale dei glicani è la S-acilazione, una modifica post-traduzionale che comporta prevalentemente il legame di una catena di acidi grassi con un amminoacido cisteina in un legame tioestere, descritta per la prima volta da Schmidt e Schlesinger nella glicoproteina G del VSV (Vesicular Stomatitis Virus)⁸³⁷, e successivamente trovata onnipresente e altamente conservata dal lievito all'uomo.

Poiché la molecola dell'acido grasso è prevalentemente il palmitato, viene utilizzato anche il termine "palmitoilazione", ma anche altri acidi grassi saturi (ad esempio, miristico e stearico) e insaturi (ad esempio, oleico e arachidonico) possono formare modifiche.

La S-acilazione influenza il traffico proteico, le interazioni proteina-proteina e proteina-membrana, ed essendo accoppiata alla fusione della membrana o all'assemblaggio del virus, è nota per influenzare la replicazione e la patogenesi virale.⁸³⁸

Nel caso di SARS-CoV, la porzione citoplasmatica della proteina spike contiene quattro cluster ricchi di cisteina, due dei quali (cluster I e II) sono modificati dalla palmitoilazione.

La fusione cellulare mediata da S è stata notevolmente ridotta dalle mutazioni in questi cluster di cisteina rispetto alla proteina di tipo selvaggio, suggerendo che la palmitoilazione nell'endodominio potrebbe essere necessaria per l'attività fusogena della proteina SARS-CoV S.⁸³⁹

Per quanto riguarda la palmitoilazione della proteina spike SARS-CoV-2, l'analisi dell'allineamento delle proteine SARS-CoV e SARS-CoV-2 S ha rivelato che tutti i 9 siti di palmitoilazione putativi in SARS-CoV sono conservati in SARS-CoV-2 ed è stato ipotizzato che la palmitoilazione potrebbe contribuire alla nascente spike del SARS-CoV-2 mirata a zattere lipidiche GM1 nelle cellule produttrici.⁸⁴⁰

L'acilazione previene la degradazione prematura promuovendo la biogenesi della spike, che viene successivamente trasportata all'ERGIC dove arriva con un massimo di 30 catene aciliche che decorano ogni trimero.

Analysis of Glycosylation and Disulfide Bonding of Wild-Type SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *J Virol.* 2022 Feb 9;96(3):e0162621. doi: 10.1128/JVI.01626-21. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8827021/>

Grishin AM, Dolgova NV, Landreth S, Fisetto O, Pickering IJ, George GN, Falzarano D, Cygler M. Disulfide Bonds Play a Critical Role in the Structure and Function of the Receptor-binding Domain of the SARS-CoV-2 Spike Antigen. *J Mol Biol.* 2022 Jan 30;434(2):167357. doi: 10.1016/j.jmb.2021.167357. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8588607/>

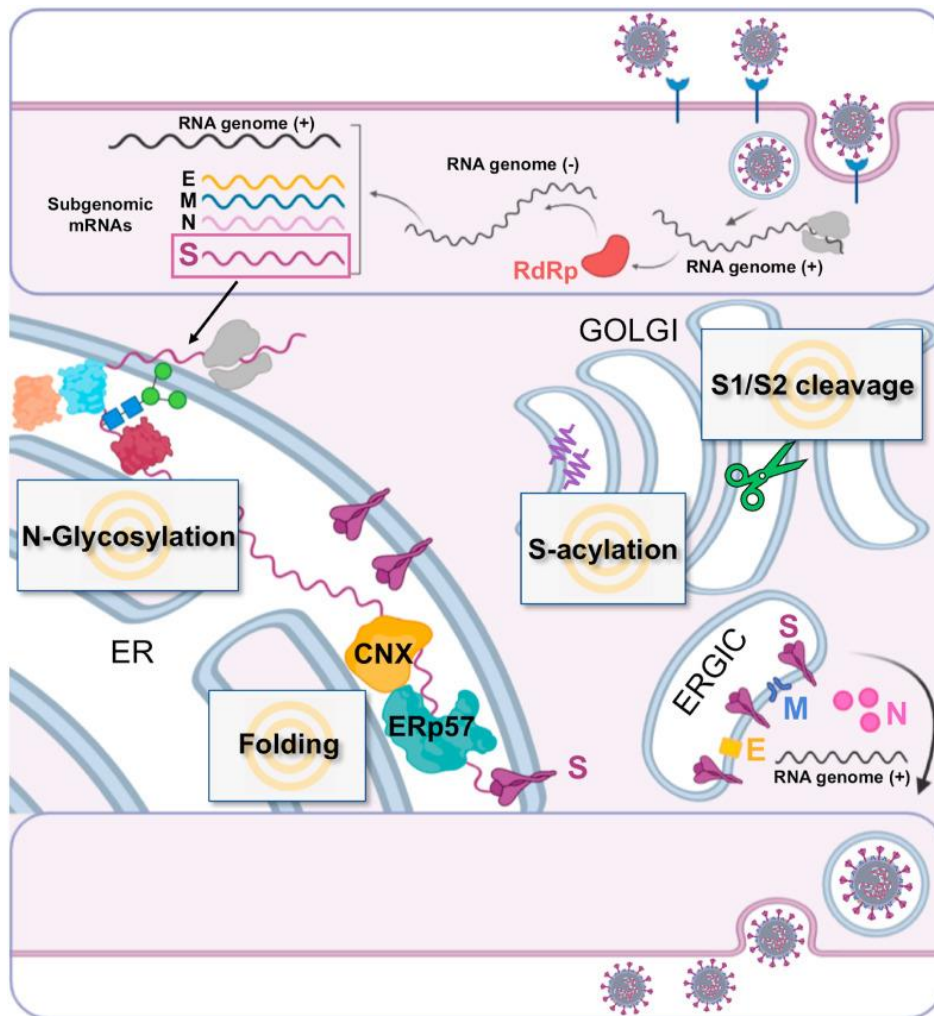
⁸³⁷ Schmidt MF, Schlesinger MJ. Fatty acid binding to vesicular stomatitis virus glycoprotein: a new type of post-translational modification of the viral glycoprotein. *Cell.* 1979 Aug;17(4):813-9. doi: 10.1016/0092-8674(79)90321-0. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/226266/>

⁸³⁸ Ramadan AA, Mayilsamy K, McGill AR, Ghosh A, Giulianotti MA, Donow HM, Mohapatra SS, Mohapatra S, Chandran B, Deschenes RJ, Roy A. Identification of SARS-CoV-2 Spike Palmitoylation Inhibitors That Results in Release of Attenuated Virus with Reduced Infectivity. *Viruses.* 2022 Mar 4;14(3):531. doi: 10.3390/v14030531. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8950683/>

⁸³⁹ Petit CM, Chouljenko VN, Iyer A, Colgrove R, Farzan M, Knipe DM, Kousoulas KG. Palmitoylation of the cysteine-rich endodomain of the SARS-coronavirus spike glycoprotein is important for spike-mediated cell fusion. *Virology.* 2007 Apr 10;360(2):264-74. doi: 10.1016/j.virol.2006.10.034. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7103323/>.

⁸⁴⁰ Wang H, Yuan Z, Pavel MA, Jablonski SM, Jablonski J, Hobson R, Valente S, Reddy CB, Hansen SB. The role of high cholesterol in age-related COVID19 lethality. *bioRxiv [Preprint].* 2021 Jun 28:2020.05.09.086249. doi: 10.1101/2020.05.09.086249. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7263494/>

La presenza di questi lipidi saturi attira il colesterolo,⁸⁴¹ guidando la formazione di domini specifici attorno allo spike. Usando VLP pseudotipizzati con WT o spike carente di acilazione, è stato possibile dimostrare che l'acilazione è necessaria per un'efficiente fusione virale.⁸⁴²



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7698684/>

Rappresentazione schematica della biogenesi della glicoproteina della spike SARS-CoV-2. Nel disegno sono illustrate diverse fasi del ciclo di replicazione SARS-CoV-2, tra cui il legame al recettore ACE2 (blu), l'ingresso del virus, la replicazione dell'RNA virale, la trascrizione e la traduzione dell'RNA subgenomico. RdRp, RNA polimerasi RNA-dipendente; E, involucro; M, membrana; N, nucleoproteina; S, spike; CNX, Calnexin; ER, reticolo endoplasmatico; Vano intermedio ERGIC, ER-Golgi. Le caselle di testo grigie evidenziano i processi delle cellule ospiti implicati nella biogenesi della spike SARS-CoV-2 che potrebbero rappresentare potenziali bersagli per i farmaci antivirali diretti dall'ospite.

⁸⁴¹ Levental I, Levental KR, Heberle FA.

Lipid Rafts: Controversies Resolved, Mysteries Remain.

Trends Cell Biol. 2020 May;30(5):341-353. doi: 10.1016/j.tcb.2020.01.009.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7798360/>

⁸⁴² Wu Z, Zhang Z, Wang X, Zhang J, Ren C, Li Y, Gao L, Liang X, Wang P, Ma C.

Palmitoylation of SARS-CoV-2 S protein is essential for viral infectivity.

Signal Transduct Target Ther. 2021 Jun 11;6(1):231. doi: 10.1038/s41392-021-00651-y.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8193602/>

Zeng XT, Yu XX, Cheng W.

The interactions of ZDHHC5/GOLGA7 with SARS-CoV-2 spike (S) protein and their effects on S protein's subcellular localization, palmitoylation and pseudovirus entry.

Virology. 2021 Dec 27;18(1):257. doi: 10.1186/s12985-021-01722-w. Erratum in: Virology. 2022 Feb 3;19(1):25.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8711289/>

Mesquita FS, et al

S-acylation controls SARS-CoV-2 membrane lipid organization and enhances infectivity.

Dev Cell. 2021 Oct 25;56(20):2790-2807.e8. doi: 10.1016/j.devcel.2021.09.016.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8486083/>

Approfondimento

Di seguito si riporta un articolo sulle bioinformazioni mediate dai glicani presenti nella matrice extracellulare

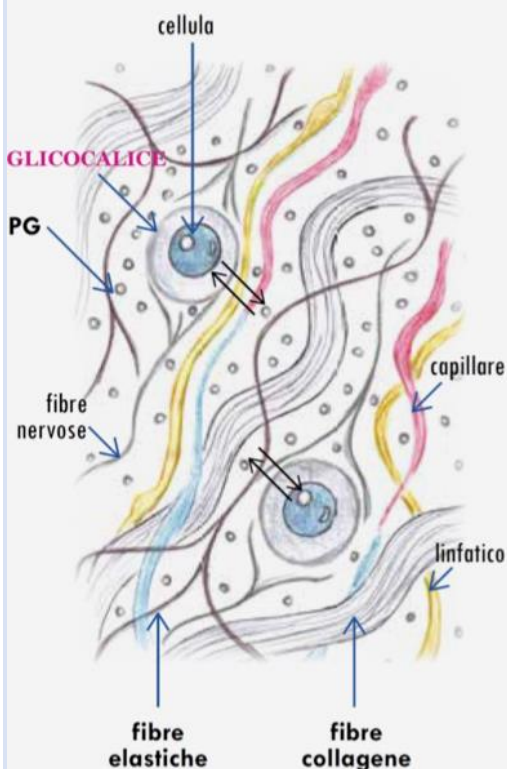
La Matrice ExtraCellulare: il mezzo attraverso cui si muovono le bioinformazioni ⁸⁴³

Il percorso dove si muovono le bioinformazioni è la matrice extracellulare (MEC), un sistema a tre stadi: stadio solido, stadio fluido e stadio di contatto con le membrane cellulari. È composta da proteine di adesione, come proteoglicani PG e glicosaminoglicani GAG, proteine strutturali, come fibre elastiche e collagene, e liquido interstiziale (acqua e suoi soluti).

GAG, PG e liquido interstiziale formano un gel dalla consistenza gelatinosa che può essere più o meno solidificabile a seconda delle condizioni fisiologiche e patologiche dell'organismo cui appartiene. Può infatti stabilizzarsi o passare rapidamente da uno stato di maggiore soluzione (SOL) ad uno di maggiore addensamento (GEL) con spazi più stretti tra le cellule.

I GAG e i PG, per la loro rapida capacità di effettuare cambiamenti strutturali, grazie alla loro parte saccaridica, di differenziarsi, di legarsi all'acqua e scambiare ioni, rappresentano i supporti perfetti per l'eliminazione dei fotoni non coerenti e la diffusione di quelli coerenti.

MEC



① NON FIBRILLARE Proteine di adesione

Glicosamminoglicani GAG, Proteoglicani PG

Insieme al collagene formano il **GLICOALICE**

- Il glicocalice è un **rivestimento unico e identificativo** che **circonda la cellula**
- Presenta filamenti che funzionano da **antenne capaci di fornire una gran diversità di messaggi** (si comporta da dipolo)
- È un filtro biofisico che si trova nella **zona di trasmissione dei mediatori** e delle sostanze essenziali che passano dalla circolazione sanguigna alla cellula e viceversa
- È un'area di **adesione delle tossine** che rimangono imbrigliate per dimensione, carica o solubilità

② FIBRILLARE Proteine strutturali

Fibre collagene, reticolari, elastiche

- Conducono segnali elettromagnetici informativi nella direzione in cui sono orientate (si comportano da dipolo)
- La propagazione dei messaggi dipende dalla disposizione del legame fra PG/GAG e superficie delle fibrille
- Determinano l'inizio dei processi di riparazione e rigenerazione connettivale

③ LIQUIDO INTERSTIZIALE Acqua e suoi soluti

⁸⁴³ La Matrice ExtraCellulare: il mezzo attraverso cui si muovono le bioinformazioni Dicembre 2021

<https://www.mednews.care/wp-content/uploads/2021/12/PDF-La-Matrice-ExtraCellulare-il-mezzo-atteverso-cui-si-muovono-le-bioinformazioni-Dicembre-2021.pdf>

Glicocalice e matrisomi

I GAG e i PG possono essere liberi negli spazi extracellulari oppure essere connessi alle membrane cellulari a formare il glicocalice, essenziale per la differenziazione e il mantenimento degli organismi pluricellulari, e importante per l'ancoraggio della cellula all'ambiente extracellulare, per l'identificazione cellulare e per l'adesione intracellulare.

Il glicocalice è il portale della comunicazione biofisica tra la cellula e il comparto extracellulare: la parte saccaridica dei GAG/PG fluttua nella matrice con il compito biofisico di distinguere e selezionare gli impulsi elettrodinamici, la bioinformazione, che debbono transitare, in entrata ed in uscita, attraverso la membrana cellulare.

PG, GAG, proteine reticolari, glicoproteine strutturali e strutture vincolate temporaneamente come citochine, fattori di crescita, proteasi, metaboliti, cataboliti formano i matrisomi, strutture connettivali collegate l'una con un'altra. Sono singole unità ripetitive, costruite come piccole reti arrotolate dalle dimensioni frattali, assemblate e smontate velocemente, con periodi di $10^{-9}/10^{-5}$ secondi, capaci di cambiare continuamente per adattarsi alle bioinformazioni.

I matrisomi mostrano internamente dei tunnel nei quali i biofotoni verrebbero scagliati nel mezzo verso il loro target. A passaggio avvenuto vengono smontati molto velocemente e così la dispersione energetica è minima ed il messaggio più diretto e selettivo.

La matrice, essendo il luogo dove avvengono i primi contatti con unità esogene e dove si possono incontrare tutte le bioinformazioni, si adatta ai messaggi biofisici, per rispondere a stress patologici o fisiologici, secondo due modelli organizzativi:

1. i fibroblasti producono proteine più strutturali, diminuiscono gli ioni liberi, la matrice diviene più densa, gli spazi extracellulari divengono più stretti, l'acqua si organizza in clusters con minori escursioni oscillatorie. In questo substrato la bioinformazione scorre con difficoltà;
2. le proteine strutturali tendono allo smantellamento, la matrice diviene più fluida, l'acqua è caratterizzata da movimenti maggiormente cinetici, sono presenti molti più ioni liberi, gli spazi extracellulari sono più ampi e così la bioinformazione scorre più facilmente.

L'acqua biologica interstiziale, il conduttore della bioinformazione

La MEC comprende anche il liquido interstiziale costituito da ACQUA e suoi soluti.

La struttura dell'acqua può essere influenzata nei suoi legami dalle molecole in soluzione che ne modificano il comportamento, mostrando configurazioni stechiometriche nuove anche a distanza dal soluto.

In questo modo le molecole d'acqua sono in continuo cambiamento di stato e, quindi, in continuo movimento vibratorio che la rendono capace di attrarre, produrre e riprodurre biomessaggi sia propri che provenienti da altre strutture. Quindi la struttura dell'acqua può essere modificata anche da una molecola disciolta in essa, configurandosi in modo nuovo in base alle informazioni con cui è venuta a contatto.

Tali modifiche si mantengono piuttosto stabili se persistono le stesse condizioni che le hanno create.

Ogni molecola d'acqua è un dipolo che cede protoni ad altre due molecole d'acqua e ne riceve da altre due. Essendo i protoni divisi fra due atomi di ossigeno, si modificano di continuo variando i loro rapporti fra energia libera ed energia nei legami con produzione di un incessante movimento vibratorio.

A livello biologico le molecole di acqua possono comportarsi anche da isolanti e, cioè, collegarsi in catene tramite legami idrogeno, con ossigeno libero, e formare, così, una strada attraverso cui protoni H^+ possono saltare da un atomo di ossigeno ad un altro (jumping protonico) coprendo distanze significative all'interno o attorno alle strutture macromolecolari, senza perdita di calore. In pratica, l'acqua biologica fornisce un «rivestimento dinamico» che realizza una minore dispersione della informazione.

L'acqua inoltre può strutturarsi in clusters, o clatrati, grappoli di molecole cristalliformi pentagonali o esagonali che si uniscono e si organizzano come una rete circondando cavità vuote o contenenti macromolecole, frammenti di macromolecole o molecole. La regolare organizzazione dei clusters si deve alla sequenziale disposizione dei legami idrogeno.

I clatrati sono in grado di produrre oscillazioni coerenti in risonanza con i campi magnetici delle strutture chimiche che racchiudono e poi di diffondere all'esterno i biomessaggi che provengono da queste.

L'acqua biologica interstiziale conduce quindi la bioinformazione che sembra continuare ad essere inviata anche quando la molecola che la genera non c'è più.

DNA srotolato, il produttore intracellulare della bioinformazione endogena

La bioinformazione prodotta dalle strutture viventi ha come risonatore chiave intracellulare la catena del DNA. Popp ha dimostrato infatti che la massima emissione biofotonica proviene dal DNA endonucleare in fase di srotolamento quando viene stimolato da inputs esterni selezionati dalla membrana cellulare e nucleare.

Solo la parte coerente dei biofotoni liberati si dirige verso vari targets nel nucleo, nel citoplasma e verso la membrana cellulare esterna che agisce da filtro fisico e chimico delle informazioni in uscita e in entrata.

La prova di questo fatto fu data da M. Rattemeyer ed A. Popp con il seguente esperimento: una sostanza colorante, il bromuro di etidio (BE), ha la caratteristica di legarsi avidamente alla catena del DNA e provocarne lo srotolamento; l'entità di tale srotolamento è direttamente proporzionale alla concentrazione del BE.

Quando, però, lo srotolamento dell'elica di DNA è giunto al termine, l'ulteriore aggiunta di BE provoca il riarrotolamento dell'elica ma nel senso opposto.

Supponendo che il DNA fosse la fonte maggiore di produzione fotonica, gli sperimentatori valutarono l'emissione fotonica in rapporto alla concentrazione di BE e videro che vi era un aumento di emissione fotonica con l'aumento della concentrazione di BE fino a quando si raggiungeva il massimo dello srotolamento dell'elica del DNA; a questo punto, con l'ulteriore aggiunta di BE, l'emissione fotonica diminuiva e questo era in accordo con il fatto che l'elica ricominciava a riarrotolarsi.

Un altro esperimento importante fu quello eseguito presso il centro ricerche mediche dell'Università di Novosibirsk: due palloni di vetro contenenti delle colture di fibroblasti di cui una infettata da un virus, venivano unite tra di loro attraverso un diaframma, inizialmente di vetro mentre, in seguito, venne sostituito da quarzo e permeabile ai fotoni.

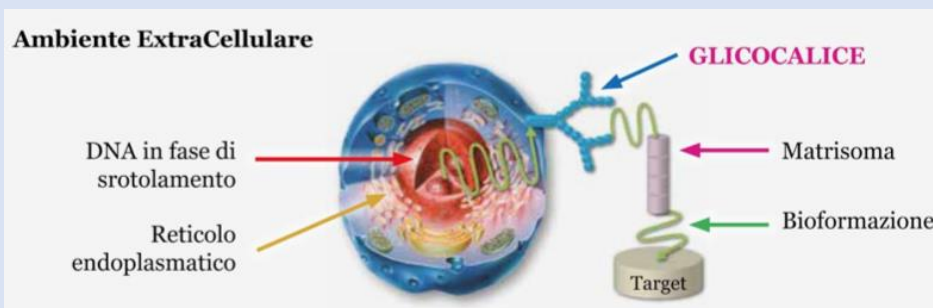
Fino a che il diaframma era costituito da vetro, le colture si comportavano indipendentemente l'una dall'altra, solo quando il diaframma fu sostituito da una lastra di quarzo si vide che la coltura di fibroblasti non contaminata dal virus iniziava a manifestare delle lesioni tipiche dell'infezione.

Due sono i dati importanti: il primo è che l'esperimento fu ripetuto 10.000 volte e risultò positivo nell'80% dei casi; il secondo è che dei segnali patogeni mediati da radiazioni ultraviolette (fotoni) sono penetrati nell'ampolla attraverso il quarzo, stimolando lo sviluppo della coltura sana senza trasmissione di virus o particelle.

Il percorso intracellulare ed extracellulare della bioinformazione

La bioinformazione endogena coerente proveniente dal DNA endonucleare in fase di srotolamento è frutto del corredo cromosomico, è l'espressione fisica di ogni sistema biologico ed è in grado di attivare in modo ordinato e altamente specializzato qualsiasi procedura chimica e fisica e di confrontarsi con qualsiasi informazione esogena.

Questi biomessaggi, disposti in fasci di fotoni coerenti che si susseguono l'uno all'altro, si dirigono in parte verso il nucleo stesso per coordinare la risposta ed in parte entrano nel sistema reticolare endoplasmatico, lungo il tunnel nel quale il treno fotonico prende velocità, fino ad arrivare alla membrana cellulare che, avendo una struttura isolante, li obbliga a dirigersi verso i glicocalici, vie di uscita verso l'extracellulare.



Nella matrice vengono assemblati i matrisomi a seconda delle necessità della bioinformazione e al loro interno i biofotoni viaggiano nel mezzo, la matrice, verso i loro bersagli, posti anche a grande distanza. La matrice è, quindi, principalmente un grande organo ubiquitario di relazione.

In caso di GEL del sistema, tipico delle flogosi croniche, i messaggi viaggiano meno rapidamente, mentre in caso di SOL del sistema, tipico delle flogosi acute, i fibroblasti ed i macrofagi sono attivati a smantellare le proteine strutturali, le molecole di acqua tendono a muoversi più rapidamente e ad organizzarsi meno in clusters ed i messaggi viaggiano in modo più diretto e rapido.

Riferimenti bibliografici disponibili nell'articolo

F.A. Popp, Nuovi orizzonti in medicina. La teoria dei biofotoni, Nuova IPSA, 2003

F.A. Popp, Coherent photon storage in biological systems, Electromagnetic Bioinformation, Ed. by F.A.Popp, München-Wien-Baltimore 1989 (pp.144-167)

L. Rosa, E. Rosa, L.Sarner and S.Barrett, A Close Look at Therapeutic Touch, Journal of the American Medical Association 279, 1998 (pp.1005-1010).

[Medicina Funzionale](#)

[Alcune riflessioni sulle strategie biologiche dell'acqua quale potenziale «chiave di lettura della vita»?](#)

[Biofotoni da Einstein a Fritz Popp](#)

[Biofotoni e armonizzazione della vita biologica](#)

Associazione tra gruppo sanguigno e COVID-19

Approfondimento

[Relazione tra gruppo sanguigno ed esposizione a SARS-Cov-2 e COVID-19](#) Rivista L'Infermiere N° 4 – 2021

[Gruppi sanguigni](#)

[Compatibilità dei gruppi sanguigni](#)

[Lezioni di Medicina di Laboratorio](#)

[Il Sangue](#)

[Test di agglutinazione](#)

Un'interessante osservazione emersa dagli studi sull'uso del CCP da parte del gruppo del Dr. De Donno⁸⁴⁴ e confermata da altri ricercatori,⁸⁴⁵ è l'associazione tra il gruppo sanguigno ABO e COVID-19 in una popolazione

⁸⁴⁴ Franchini M, Glingani C, Del Fante C, Capuzzo M, Di Stasi V, Rastrelli G, Vignozzi L, De Donno G, Perotti C. The protective effect of O blood type against SARS-CoV-2 infection. Vox Sang. 2021 Feb;116(2):249-250. doi: 10.1111/vox.13003. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7537255/>

Franchini M, Mengoli C, Ballotari A, Glingani C. Correlation between ABO blood group and neutralizing anti-SARS-CoV-2 antibody titers in convalescent plasma donations. Transfus Clin Biol. 2022 May;29(2):186-187. doi: 10.1016/j.tracli.2021.10.002. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8507567/>

⁸⁴⁵ Goel R, et al ISBT COVID-19 Working Group. ABO blood group and COVID-19: a review on behalf of the ISBT COVID-19 Working Group. Vox Sang. 2021 Sep;116(8):849-861. doi: 10.1111/vox.13076. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8014128/>

Ray JG, Schull MJ, Vermeulen MJ, Park AL.

omogenea di donatori CP guariti dall'infezione da SARS-CoV-2, in cui i soggetti di gruppo sanguigno O hanno dimostrato una ridotta predisposizione a contrarre l'infezione.⁸⁴⁶

Gli antigeni ABH (l'antigene H definisce il gruppo sanguigno O) sono oligosaccaridi esposti sui globuli rossi ed altre cellule e si trovano anche nelle secrezioni corporee.

Gli antigeni A e B sono determinati da geni allelici codificanti per le glicosiltransferasi, che trasferiscono i monosaccaridi alle estremità non riducenti di glicani specifici su glicoproteine e glicolipidi.

Per A e B, questo monosaccaride è rispettivamente l'N-acetil-D-galattosamina e il D-galattosio.

Negli individui del gruppo O, le corrispondenti glicosiltransferasi A e B non sono presenti o sono state inattivate da uno dei vari polimorfismi, in modo tale che le estremità non riducenti dei corrispondenti glicani esprimono l'antigene H.⁸⁴⁷

Association Between ABO and Rh Blood Groups and SARS-CoV-2 Infection or Severe COVID-19 Illness : A Population-Based Cohort Study.
Ann Intern Med. 2021 Mar;174(3):308-315. doi: 10.7326/M20-4511.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7711653/>

Wu BB, Gu DZ, Yu JN, Yang J, Shen WQ.
Association between ABO blood groups and COVID-19 infection, severity and demise: A systematic review and meta-analysis.
Infect Genet Evol. 2020 Oct;84:104485. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104485.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7391292/>

Li J, Wang X, Chen J, Cai Y, Deng A, Yang M.
Association between ABO blood groups and risk of SARS-CoV-2 pneumonia.
Br J Haematol. 2020 Jul;190(1):24-27. doi: 10.1111/bjh.16797.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7267665/>

Dzik S, Eliason K, Morris EB, Kaufman RM, North CM.
COVID-19 and ABO blood groups.
Transfusion. 2020 Aug;60(8):1883-1884. doi: 10.1111/trf.15946.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7323215/>

Zietz M, Zucker J, Tatonetti NP.
Associations between blood type and COVID-19 infection, intubation, and death.
Nat Commun. 2020 Nov 13;11(1):5761. doi: 10.1038/s41467-020-19623-x.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7666188/>

Zhang Y, Garner R, Salehi S, La Rocca M, Duncan D.
Association between ABO blood types and coronavirus disease 2019 (COVID-19), genetic associations, and underlying molecular mechanisms: a literature review of 23 studies.
Ann Hematol. 2021 May;100(5):1123-1132. doi: 10.1007/s00277-021-04489-w.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7939543/>

Shokri P, Golmohammadi S, Noori M, Nejadghaderi SA, Carson-Chahhoud K, Safiri S.
The relationship between blood groups and risk of infection with SARS-CoV-2 or development of severe outcomes: A review.
Rev Med Virol. 2022 Jan;32(1):e2247. doi: 10.1002/rmv.2247.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8209917/>

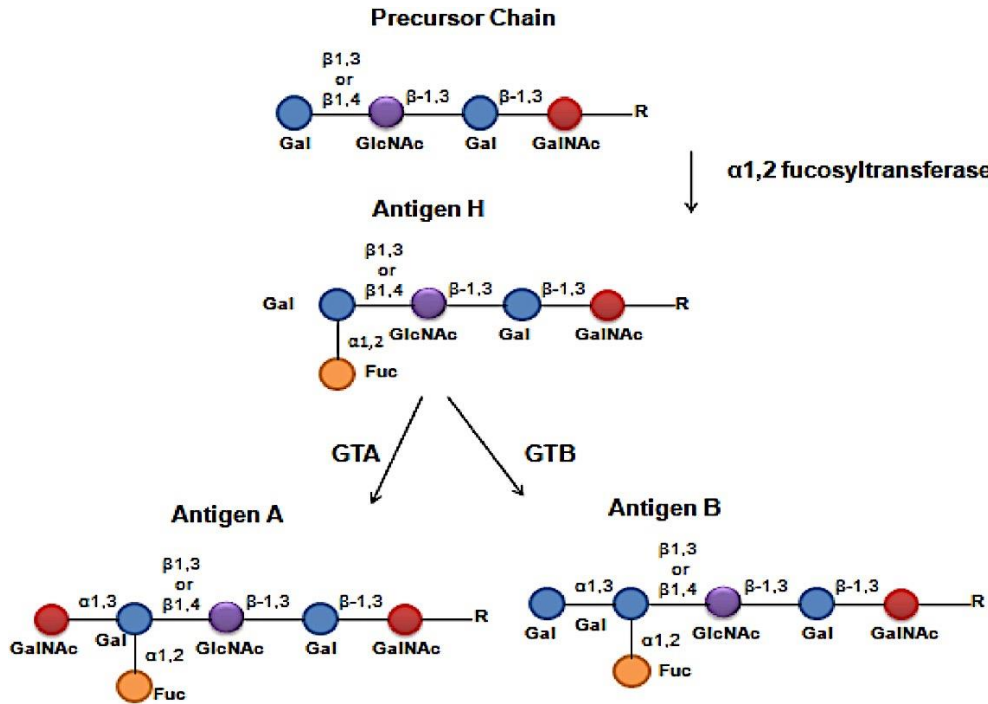
Ayatollahi AA, Aghcheli B, Amini A, Nikbakht H, Ghassemzadehpirsala P, Behboudi E, Rajabi A, Tahamtan A.
Association between blood groups and COVID-19 outcome in Iranian patients.
Future Virol. 2021 Aug;10.2217/fvl-2021-0090. doi: 10.2217/fvl-2021-0090.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8462120/>

Pendu JL, Breiman A, Rocher J, Dion M, Ruvoën-Clouet N.
ABO Blood Types and COVID-19: Spurious, Anecdotal, or Truly Important Relationships? A Reasoned Review of Available Data.
Viruses. 2021 Jan 22;13(2):160. doi: 10.3390/v13020160.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7911989/>

⁸⁴⁶ Matzhold EM, Berghold A, Bemelmans MKB, Banfi C, Stelzl E, Kessler HH, Steinmetz I, Krause R, Wurzer H, Schlenke P, Wagner T.
Lewis and ABO histo-blood types and the secretor status of patients hospitalized with COVID-19 implicate a role for ABO antibodies in susceptibility to infection with SARS-CoV-2.
Transfusion. 2021 Sep;61(9):2736-2745. doi: 10.1111/trf.16567.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8447157/>

⁸⁴⁷ Pereira E, et al
ABO blood group and link to COVID-19: A comprehensive review of the reported associations and their possible underlying mechanisms.
Microb Pathog. 2022 Jun 25;169:105658. doi: 10.1016/j.micpath.2022.105658.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9233352/>

Cooling L.



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9233352/>

Sintesi sequenziale degli antigeni ABO. Gal: d-galattosio, GlcNAc: N-acetilglucosamina, GalNAc: N-acetil-galattosamina, Fuc: l-fucosio, R: gruppo radicale, GTA: glucosiltransferasi A, GTB: glucosiltransferasi B, $\beta 1,3$: catena di tipo 1, $\beta 1,4$: Catena di tipo 2

Gli anticorpi di questo sistema (cioè anti-A e anti-B) si sviluppano nei primi mesi di vita e sono prodotti dopo il contatto con antigeni non-auto A e/o B, spesso presenti negli alimenti e nei microrganismi, in particolare nel microbiota intestinale.⁸⁴⁸

Gli anticorpi Anti-A e anti-B, tipicamente dell'isotipo IgM, circolano in quasi tutti gli individui sani privi del corrispondente antigene e le IgG anti-A,B si trovano spesso negli individui del gruppo O.⁸⁴⁹

La trasfusione di globuli rossi incompatibili con ABO può provocare reazioni trasfusionali emolitiche acute, perché i corrispondenti anticorpi IgM si legano efficacemente al complemento, causando emolisi intravascolare dei globuli rossi trasfusi e attivazione della coagulazione. Anche gli anticorpi IgG possono causare una grave emolisi intravascolare in questo contesto, a causa dell'altissima densità di antigeni ABH

Blood Groups in Infection and Host Susceptibility. Clin Microbiol Rev. 2015 Jul;28(3):801-70. doi: 10.1128/CMR.00109-14. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4475644/>

⁸⁴⁸ Holodick NE, Rodríguez-Zhurbenko N, Hernández AM. Defining Natural Antibodies. Front Immunol. 2017 Jul 26;8:872. doi: 10.3389/fimmu.2017.00872. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5526850/>

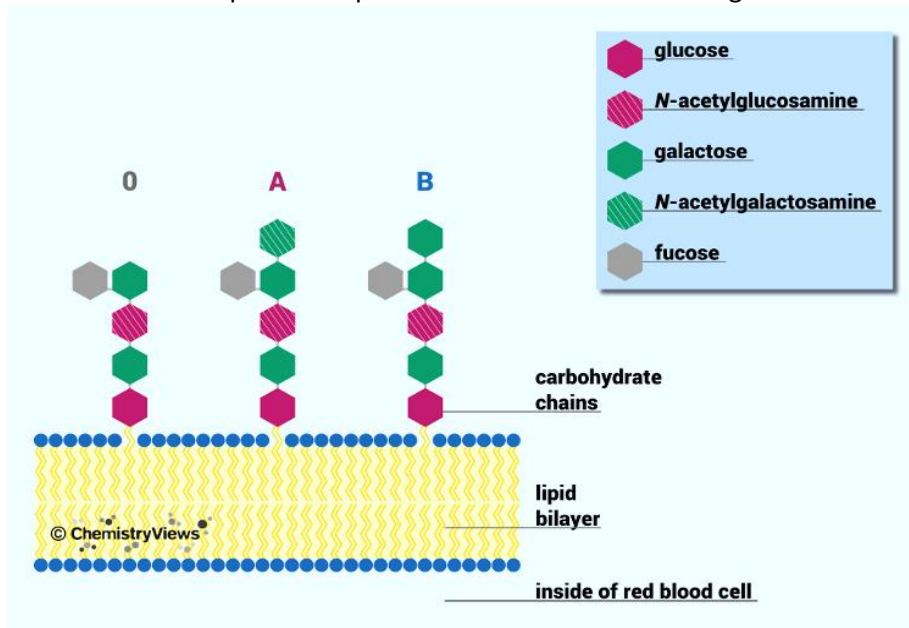
⁸⁴⁹ Gérard C, Maggipinto G, Minon JM. COVID-19 and ABO blood group: another viewpoint. Br J Haematol. 2020 Jul;190(2):e93-e94. doi: 10.1111/bjh.16884. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7283642/>

Stussi G, Huggel K, Lutz HU, Schanz U, Rieben R, Seebach JD. Isotype-specific detection of ABO blood group antibodies using a novel flow cytometric method. Br J Haematol. 2005 Sep;130(6):954-63. doi: 10.1111/j.1365-2141.2005.05705.x. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16156865/>

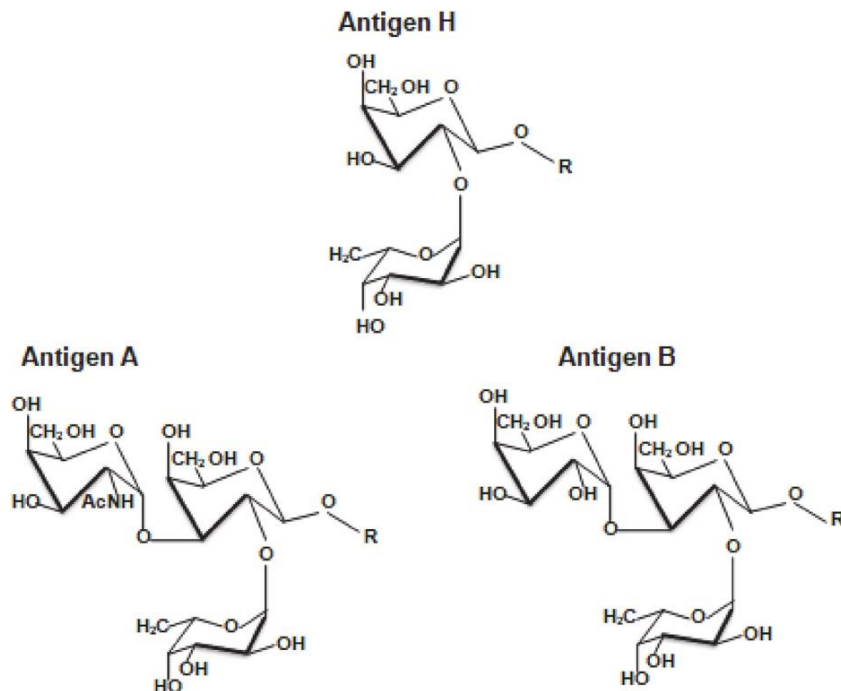
Focosi D. Anti-A isohaemagglutinin titres and SARS-CoV-2 neutralization: implications for children and convalescent plasma selection. Br J Haematol. 2020 Aug;190(3):e148-e150. doi: 10.1111/bjh.16932. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7300571/>

sui globuli rossi, che porta a una stretta vicinanza di molecole IgG anti-A e/o anti-B sulla superficie dei globuli rossi con successiva attivazione del complemento.⁸⁵⁰

Se non trattata, questa emergenza medica può indurre insufficienza renale acuta, coagulazione intravascolare disseminata e morte. Pertanto, la trasfusione continua di globuli rossi compatibili con ABO è un obiettivo centrale dei moderni processi e procedure nelle banche del sangue.



https://www.chemistryviews.org/details/ezine/8522131/Blood_Types_and_Carbohydrate_Chemistry/



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9233352/>

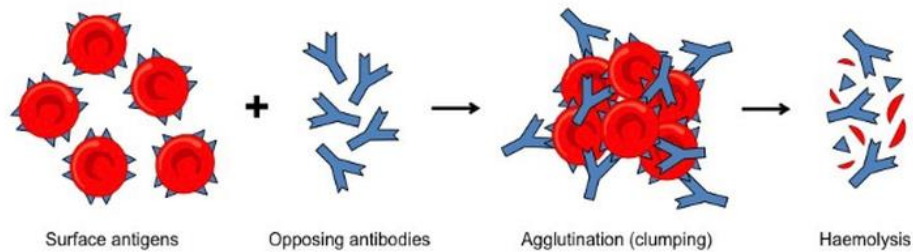
⁸⁵⁰ Zimring JC, Spitalnik SL. Pathobiology of transfusion reactions. *Annu Rev Pathol.* 2015;10:83-110. doi: 10.1146/annurev-pathol-012414-040318. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25621658/>

Branch DR. Anti-A and anti-B: what are they and where do they come from? *Transfusion.* 2015 Jul;55 Suppl 2:S74-9. doi: 10.1111/trf.13087. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26174901/>

Summary of the ABO Blood Groups

	Type A	Type B	Type AB	Type O
Antigen (on RBC)	Antigen A 	Antigen B 	Antigens A + B 	Neither A or B
Antibody (in plasma)	Anti-B Antibody 	Anti-A Antibody 	Neither Antibody	Both Antibodies
Blood Donors	Cannot have B or AB blood Can have A or O blood	Cannot have A or AB blood Can have B or O blood	Can have any type of blood Is the universal recipient	Can only have O blood Is the universal donor

The Consequence of an Incompatible Blood Transfusion

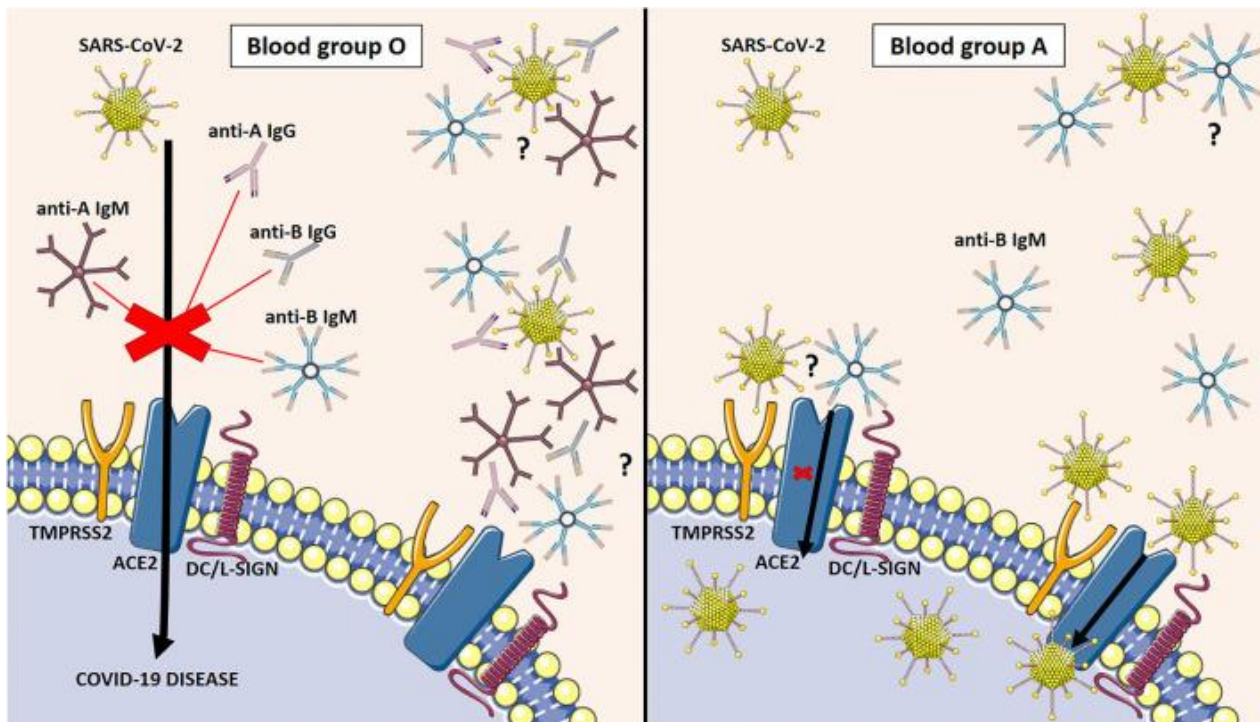


<https://mysciencesquad.weebly.com/ib-hl-34a1.html>

Gli studi condotti ad oggi hanno permesso di stabilire quanto segue: ⁸⁵¹

- a) La presenza o l'assenza di qualsiasi antigene del sistema ABO è correlata a diverse suscettibilità, con una maggiore comorbidità nei pazienti con antigene A (gruppo sanguigno A), mentre l'assenza di antigeni (gruppo sanguigno O) è associata a minor rischio trombotico e cardiovascolare. Questo è uno dei motivi per cui il numero di pazienti infetti da SARS-CoV-2 che sono stati ricoverati in ospedale con esiti peggiori, appartiene al gruppo sanguigno non-O.
- b) Gli anticorpi naturali anti-A e -B del sistema ABO sono in grado di interferire con la proteina S (SARS-CoV-2) e ACE2 (recettore della cellula ospite). La presenza di elevate concentrazioni plasmatiche di anticorpi nel gruppo sanguigno O conferisce una maggiore protezione a questi pazienti.
- c) L'isotipo degli anticorpi naturali sembra decisivo perché i gruppi sanguigni A, B e O presentano IgM specifiche, ma solo il gruppo sanguigno O presenta anticorpi IgG anti-A e anti-B nel plasma.
- d) Lo stato immunosoppressivo, come negli anziani e nei pazienti con alcune malattie o sottoposti a trattamenti farmacologici, è associato alla mancanza di anticorpi e quindi i pazienti con i gruppi sanguigni O, A o B si comporteranno come pazienti con il gruppo sanguigno AB che li rende più suscettibili alle infezioni.

⁸⁵¹ Tamayo-Velasco Á, Peñarrubia-Ponce MJ, Álvarez FJ, de la Fuente I, Pérez-González S, Andaluz-Ojeda D. ABO Blood System and COVID-19 Susceptibility: Anti-A and Anti-B Antibodies Are the Key Points. Front Med (Lausanne). 2022 Apr 25;9:882477. doi: 10.3389/fmed.2022.882477. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9081929/>



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9081929/>

Meccanismo molecolare che spiega la suscettibilità e la gravità della malattia COVID-19 a seconda del gruppo sanguigno ABO. La presenza di anticorpi anti-A e probabilmente anticorpi anti-B inibisce l'interazione tra la proteina S del virus e l'ACE2 sulla superficie cellulare nel gruppo sanguigno O (lato sinistro). L'assenza di anticorpi nel gruppo sanguigno A facilita l'ingresso di SARS-CoV-2 nella cellula ospite e la conseguente infezione virale (lato destro). ACE2: enzima di conversione dell'angiotensina 2. TMPRSS2: membro della sottofamiglia della serina della proteasi transmembrana DC/L-SIGN; non integrina che cattura ICAM3 specifica per le cellule dendritiche; Gli anticorpi naturali legano gli epitopi glicosilati o di carboidrati nella proteina S di SARS-CoV-2 (in alto) o ACE2 (in basso).

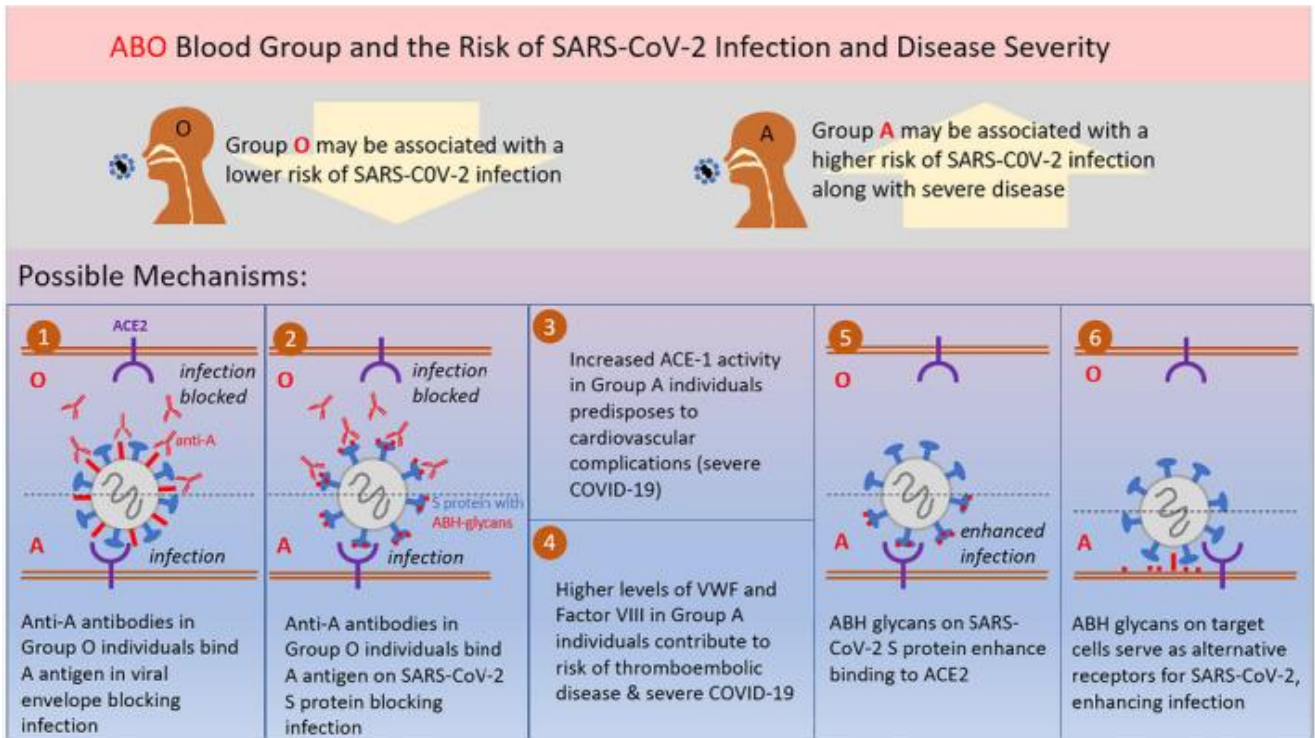
Meccanismi proposti per l'associazione tra gruppo sanguigno ABO e infezione da SARS-CoV-2 ⁸⁵²

- Gli anticorpi anti-A e/o anti-B fungono da anticorpi neutralizzanti virali legandosi agli antigeni A e/o B espressi sull'involucro virale, prevenendo così l'infezione delle cellule bersaglio
- La proteina SARS-CoV-2 S è legata agli anticorpi umani anti-A, che possono bloccare l'interazione tra il virus e ACE2R, impedendo così l'ingresso nell'epitelio polmonare
- Un aumento dell'attività dell'ACE-1 negli individui del gruppo A predispone a complicanze cardiovascolari, che rappresentano una COVID-19 grave
- Variazione dei livelli di VWF e Fattore VIII per tipo ABO con livelli più elevati negli individui del gruppo A che contribuiscono al rischio di malattia tromboembolica e COVID-19 grave
- I glicani ABH, se presenti sulla proteina SARS-CoV-2 S, possono modificare l'affinità di SARS-CoV-2 per ACE2R, il suo recettore cellulare.
- I glicani ABH sulle cellule bersaglio potrebbero fungere da recettori alternativi a bassa affinità per la proteina SARS-CoV-2 S o legare altre strutture dell'involucro virale.

⁸⁵² Goel R, et al ISBT COVID-19 Working Group. ABO blood group and COVID-19: a review on behalf of the ISBT COVID-19 Working Group. Vox Sang. 2021 Sep;116(8):849-861. doi: 10.1111/vox.13076. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8014128/>

Shibeb S, Khan A. ABO blood group association and COVID-19. COVID-19 susceptibility and severity: a review. Hematol Transfus Cell Ther. 2022 Jan-Mar;44(1):70-75. doi: 10.1016/j.htct.2021.07.006. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8437766/>

Nella figura seguente sono rappresentati i meccanismi ipotizzati sopra, per spiegare la protezione indotta dal gruppo sanguigno O.



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8014128/>

Meccanismi proposti per l'associazione tra gruppo sanguigno ABO e infezione da SARS-CoV-2

1) Gli anticorpi anti-A e/o anti-B fungono da anticorpi neutralizzanti virali legandosi agli antigeni A e/o B espressi sull'involucro virale, prevenendo così l'infezione delle cellule bersaglio. 2) La proteina SARS-CoV-2 S è legata agli anticorpi umani anti-A, che possono bloccare l'interazione tra il virus e ACE2R, impedendo così l'ingresso nell'epitelio polmonare. 3) Un aumento dell'attività dell'ACE-1 negli individui del gruppo A predisponde a complicanze cardiovascolari, che rappresentano una forma grave di COVID-19. 4) Variazioni dei livelli di VWF e Fattore VIII per tipo ABO con livelli più elevati negli individui del gruppo A che contribuiscono al rischio di malattia tromboembolica e COVID-19 grave. 5) I glicani ABH, se presenti sulla proteina SARS-CoV-2 S, possono modificare l'affinità di SARS-CoV-2 per ACE2R, il suo recettore cellulare. 6) I glicani ABH sulle cellule bersaglio potrebbero fungere da recettori alternativi a bassa affinità per la proteina SARS-CoV-2 S o legare altre strutture dell'involucro virale.

Peter Arend nell'articolo *"Why blood group A individuals are at risk whereas blood group O individuals are protected from SARS-CoV-2 (COVID-19) infection: A hypothesis regarding how the virus invades the human body via ABO(H) blood group-determining carbohydrates"*⁸⁵³ propone un nuovo meccanismo d'interazione tra il SARS-Cov-2 e il sistema ABO.

Il concetto proposto di invasione virale, iniziata dalla mobilizzazione della molecola di serina dalla proteina S virale e completata dalla formazione di un ponte molecolare ibrido ospite-patogeno A-like/Tn mostra un'interazione aggiuntiva e più specifica tra ospite e patogeno.

La posizione evolutiva di rilievo della molecola della serina, che determina molto probabilmente anche la polireattività delle IgM neonatali⁸⁵⁴, si rivela nell'infezione da SARS-CoV-2 ed è evidente anche in altre malattie infettive non correlate, ad esempio con l'antigene ripetuto della serina (SERA) nella malaria tropicale

⁸⁵³ Arend P.

Why blood group A individuals are at risk whereas blood group O individuals are protected from SARS-CoV-2 (COVID-19) infection: A hypothesis regarding how the virus invades the human body via ABO(H) blood group-determining carbohydrates.

Immunobiology. 2021 May;226(3):152027. doi: 10.1016/j.imbio.2020.152027.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7609233/>

⁸⁵⁴ Willis JR, Briney BS, DeLuca SL, Crowe JE Jr, Meiler J.

Human germline antibody gene segments encode polyspecific antibodies.

PLoS Comput Biol. 2013 Apr;9(4):e1003045. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003045.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3636087/>

⁸⁵⁵ e la proteina E. histolytica ricca di serina (STREHP) di *Entamoeba histolytica* ⁸⁵⁶, che determina il legame e la virulenza del parassita ⁸⁵⁷ nella dissenteria amebica.

Infine, una nuova osservazione terapeutica nelle infezioni da SARS-CoV potrebbe spiegare il ruolo della molecola di serina all'interno di questa infezione: un polimero inorganico, il polifosfato, blocca il legame della proteina spike SARS-CoV-2 al recettore ACE2 ⁸⁵⁸, mentre la molecola di serina è il bersaglio preferito anche nella fosforilazione proteica ⁸⁵⁹.

Le interazioni tra diversi virus patogeni e glicani ABO(H) umani sono state riconosciute per decenni e possono essere spiegate da modelli biologici molecolari di natura simile.

Un rotavirus umano interagisce con l'antigene del gruppo sanguigno di tipo A e la sua infettività è specificamente abrogata dagli anticorpi anti-A ⁸⁶⁰.

Lo studio completo di Guillon et al. ⁸⁶¹ e la loro analisi di un focolaio SARS-CoV-1 a Hong Kong nel 2003 hanno dimostrato che il gruppo sanguigno O(H) era associato a un basso rischio di infezione, mentre l'interazione

⁸⁵⁵ Bzik DJ, Li WB, Horii T, Inselburg J.

Amino acid sequence of the serine-repeat antigen (SERA) of *Plasmodium falciparum* determined from cloned cDNA. *Mol Biochem Parasitol.* 1988 Sep;30(3):279-88. doi: 10.1016/0166-6851(88)90097-7. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2847041/>

Aoki S, Li J, Itagaki S, Okech BA, Egwang TG, Matsuoka H, Palacpac NM, Mitamura T, Horii T.

Serine repeat antigen (SERA5) is predominantly expressed among the SERA multigene family of *Plasmodium falciparum*, and the acquired antibody titers correlate with serum inhibition of the parasite growth. *J Biol Chem.* 2002 Dec 6;277(49):47533-40. doi: 10.1074/jbc.M207145200. [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021-9258\(19\)71489-6](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021-9258(19)71489-6)

Arisue N, Kawai S, Hirai M, Palacpac NM, Jia M, Kaneko A, Tanabe K, Horii T.

Clues to evolution of the SERA multigene family in 18 *Plasmodium* species. *PLoS One.* 2011 Mar 15;6(3):e17775. doi: 10.1371/journal.pone.0017775. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3058004/>

⁸⁵⁶ Zhang T, Cieslak PR, Foster L, Kunz-Jenkins C, Stanley SL Jr.

Antibodies to the serine rich *Entamoeba histolytica* protein (SREHP) prevent amoebic liver abscess in severe combined immunodeficient (SCID) mice. *Parasite Immunol.* 1994 May;16(5):225-30. doi: 10.1111/j.1365-3024.1994.tb00344.x. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8072766/>

Stanley SL Jr, Tian K, Koester JP, Li E.

The serine-rich *Entamoeba histolytica* protein is a phosphorylated membrane protein containing O-linked terminal N-acetylglucosamine residues. *J Biol Chem.* 1995 Feb 24;270(8):4121-6. doi: 10.1074/jbc.270.8.4121. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.8.4121>

⁸⁵⁷ Manochitra K, Parija SC.

In-silico prediction and modeling of the *Entamoeba histolytica* proteins: Serine-rich *Entamoeba histolytica* protein and 29 kDa Cysteine-rich protease. *PeerJ.* 2017 Jun 28;5:e3160. doi: 10.7717/peerj.3160. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5493030/>

⁸⁵⁸ Neufurth M, Wang X, Tolba E, Lieberwirth I, Wang S, Schröder HC, Müller WEG.

The inorganic polymer, polyphosphate, blocks binding of SARS-CoV-2 spike protein to ACE2 receptor at physiological concentrations. *Biochem Pharmacol.* 2020 Dec;182:114215. doi: 10.1016/j.bcp.2020.114215. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7474874/>

⁸⁵⁹ Ardito F, Giuliani M, Perrone D, Troiano G, Lo Muzio L.

The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). *Int J Mol Med.* 2017 Aug;40(2):271-280. doi: 10.3892/ijmm.2017.3036. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5500920/>

⁸⁶⁰ Hu L, Crawford SE, Czako R, Cortes-Penfield NW, Smith DF, Le Pendu J, Estes MK, Prasad BV.

Cell attachment protein VP8* of a human rotavirus specifically interacts with A-type histo-blood group antigen. *Nature.* 2012 Apr 15;485(7397):256-9. doi: 10.1038/nature10996. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3350622/>

⁸⁶¹ Guillon P, Clément M, Sébille V, Rivain JG, Chou CF, Ruvoën-Clouet N, Le Pendu J.

Inhibition of the interaction between the SARS-CoV spike protein and its cellular receptor by anti-histo-blood group antibodies. *Glycobiology.* 2008 Dec;18(12):1085-93. doi: 10.1093/glycob/cwn093. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7108609/>

tra la proteina S virale e il recettore della cellula ospite era inibita da anticorpi naturali e monoclonali anti-A in vitro.

Infine, come già discusso sopra, gli individui con gruppo sanguigno A hanno un rischio significativamente più elevato di contrarre l'infezione da SARS-CoV-2 o COVID-19, mentre le persone con gruppo sanguigno O hanno un rischio significativamente inferiore di infezione rispetto ai gruppi sanguigni non-O.⁸⁶²

Tuttavia, l'infezione da SARS CoV-2 (COVID-19) può essere considerata una malattia evolutiva selettiva, che contribuisce all'attuale distribuzione globale sulla base dei gruppi sanguigni umani O(H), A, B e AB, che secondo Springer e Wiener⁸⁶³ si sono sviluppati nel corso di milioni di anni principalmente in connessione con malattie mortali legate al gruppo sanguigno ABO(H), come la malaria⁸⁶⁴.

La sintesi del gruppo sanguigno AB consente il contatto più forte con un patogeno e preclude qualsiasi attività dell'isoagglutinina, rendendo questo gruppo il meno protetto e il più piccolo tra i gruppi sanguigni ABO(H).

Al contrario, gli individui con gruppo sanguigno O(H), che sono inclini ad altre infezioni, in particolare il colera, sono sopravvissuti a tutte le malattie infettive in un equilibrio immunologico con molti agenti patogeni e rimangono il gruppo sanguigno più grande al mondo nonostante le estese pandemie storiche di colera⁸⁶⁵.

Queste persone sviluppano raramente malattie gravi da infezioni correlate al gruppo sanguigno A/B, in quanto mantengono l'attività delle isoagglutinine anti-A/Tn cross-reattive e anti-B complemento-dipendenti, esercitate dalle IgM polireattive e non immuni, considerate la punta di diamante dell'immunità innata e della prima linea di difesa.

⁸⁶² Zhao J, Yang Y, Huang H, Li D, Gu D, Lu X, Zhang Z, Liu L, Liu T, Liu Y, He Y, Sun B, Wei M, Yang G, Wang X, Zhang L, Zhou X, Xing M, Wang PG. Relationship Between the ABO Blood Group and the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Susceptibility. *Clin Infect Dis*. 2021 Jul 15;73(2):328-331. doi: 10.1093/cid/ciaa1150. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7454371/>

⁸⁶³ Springer GF, Wiener AS. Alleged causes of the present-day world distribution of the human ABO blood groups. *Nature*. 1962 Feb;193:444-5. doi: 10.1038/193444a0. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14039466/>

⁸⁶⁴ Cserti-Gazdewich, C.M. (2010), *Plasmodium falciparum* malaria and carbohydrate blood group evolution. *ISBT Science Series*, 5: 256-266 <https://doi.org/10.1111/j.1751-2824.2010.01380.x>

Cserti CM, Dzik WH. The ABO blood group system and *Plasmodium falciparum* malaria. *Blood*. 2007 Oct 1;110(7):2250-8. doi: 10.1182/blood-2007-03-077602. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-03-077602>

Arend P. Position of human blood group O(H) and phenotype-determining enzymes in growth and infectious disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2018 Aug;1425(1):5-18. doi: 10.1111/nyas.13694. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7676429/>

Arend, P., 2020. Malaria tropica evades host immunity through ABO blood group hybridization. *figshare*, v120. <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.8208689.v120>.

⁸⁶⁵ M.J. Echenberg. Africa in the time of cholera: a history of pandemics from 1815 to the present (African studies) Cambridge University Press, Cambridge (2011) 10.1017/CBO9780511976599 <https://www.worldcat.org/title/africa-in-the-time-of-cholera-a-history-of-pandemics-from-1815-to-the-present/oclc/813230825>

Mutreja A, et al. Evidence for several waves of global transmission in the seventh cholera pandemic. *Nature*. 2011 Aug 24;477(7365):462-5. doi: 10.1038/nature10392. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3736323/>

Chowdhury FR, Nur Z, Hassan N, von Seidlein L, Dunachie S. Pandemics, pathogenicity and changing molecular epidemiology of cholera in the era of global warming. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2017 Mar 7;16(1):10. doi: 10.1186/s12941-017-0185-1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5341193/>

Si ritiene che l'immunità innata umorale ⁸⁶⁶ e la sua complessa connessione con la formazione del fenotipo ABO(H) svolgano un ruolo principale nell'infezione da SARS-CoV-2 e nel corso della successiva malattia.

Contrariamente alle attività adattative delle immunoglobuline o dei linfociti B indotte dall'ambiente, la produzione delle IgM non immuni e polireattive non è limitata ai linfociti B, ma si verifica spontaneamente nelle cellule epiteliali normali e maligne nel topo ⁸⁶⁷ e nell'uomo ⁸⁶⁸.

La molecola IgM neonatale non immune umana ⁸⁶⁹ è un anticorpo aggressivo anti-glicano-reattivo, che dimostra le attività innate dell'isoagglutinina anti-A e anti-B durante trasfusioni di sangue incompatibili e suggerisce l'induzione di ADCC (dipendente dagli anticorpi) e/o citotossicità mediata dal complemento, che funge da ponte per l'immunità cellulare.

Nell'uomo, la maggior parte delle infezioni si verifica in considerazione di questa innata superiorità immunologica del gruppo sanguigno O(H).

SARS-CoV-2 elude ipoteticamente l'immunità umana mediante l'ibridazione dei gruppi sanguigni ABO(H) o imitando le vie metaboliche sopra descritte.

In definitiva, i fenotipi del gruppo sanguigno ABO(H) umano derivano dal sistema genetico evolutivamente più antico trovato nelle popolazioni di primati e si sviluppano in connessione molecolare e funzionale con una speciale immunità innata umorale, dominata dalle IgM polireattive non immuni.

⁸⁶⁶ Maloney BE, Perera KD, Saunders DRD, Shadipeni N, Fleming SD. Interactions of viruses and the humoral innate immune response. *Clin Immunol*. 2020 Mar;212:108351. doi: 10.1016/j.clim.2020.108351. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7062564/>

Stravalaci, M., Pagani, I., Paraboschi, E.M. et al. Recognition and inhibition of SARS-CoV-2 by humoral innate immunity pattern recognition molecules. *Nat Immunol* 23, 275–286 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41590-021-01114-w>

Persson C. Humoral First-Line Mucosal Innate Defence in vivo. *J Innate Immun*. 2020;12(5):373-386. doi: 10.1159/000506515. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7506265/>

Hillion S, Arleevskaya MI, Blanco P, Bordron A, Brooks WH, Cesbron JY, Kaveri S, Vivier E, Renaudineau Y. The Innate Part of the Adaptive Immune System. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2020 Apr;58(2):151-154. doi: 10.1007/s12016-019-08740-1. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31154567/>

⁸⁶⁷ Zhou R, O'Hara SP, Chen XM. MicroRNA regulation of innate immune responses in epithelial cells. *Cell Mol Immunol*. 2011 Sep;8(5):371-9. doi: 10.1038/cmi.2011.19. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4012889/>

Shao W, Hu F, Ma J, Zhang C, Liao Q, Zhu Z, Liu E, Qiu X. Epithelial cells are a source of natural IgM that contribute to innate immune responses. *Int J Biochem Cell Biol*. 2016 Apr;73:19-29. doi: 10.1016/j.biocel.2016.01.017. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26820901/>

⁸⁶⁸ Hu F, Zhang L, Zheng J, Zhao L, Huang J, Shao W, Liao Q, Ma T, Geng L, Yin CC, Qiu X. Spontaneous production of immunoglobulin M in human epithelial cancer cells. *PLoS One*. 2012;7(12):e51423. doi: 10.1371/journal.pone.0051423. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3520907/>

⁸⁶⁹ Grönwall C, Vas J, Silverman GJ. Protective Roles of Natural IgM Antibodies. *Front Immunol*. 2012 Apr 4;3:66. doi: 10.3389/fimmu.2012.00066. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3341951/>

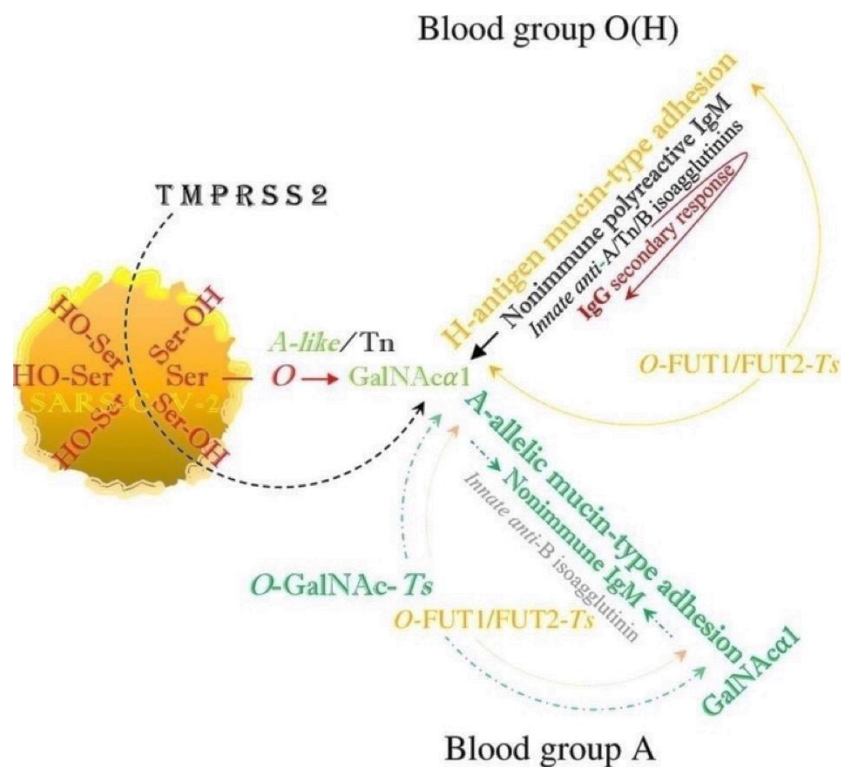
Fereidan-Esfahani M, Nayfeh T, Warrington A, Howe CL, Rodriguez M. IgM Natural Autoantibodies in Physiology and the Treatment of Disease. *Methods Mol Biol*. 2019;1904:53-81. doi: 10.1007/978-1-4939-8958-4_3. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30539466/>

La glicosilazione fenotipica ABO(H) sia delle superfici cellulari che delle proteine plasmatiche avviene in modo identico, il che in condizioni normali preclude fisiologicamente una corrispondente autoreattività naturale esercitata dalle IgM ancestrali non immuni o neonatali.⁸⁷⁰

La mancanza fisiologica di anticorpi anti-A e anti-B innati nei gruppi sanguigni non-O, vale a dire A, B e AB, pone un dilemma immunologico.

Da un lato li protegge dall'autoreattività nei confronti delle strutture complementari, ma dall'altro non può impedire la formazione di strutture ibride, il che significa legami tra carboidrati e/o glicopeptidi autologhi e peptidi estranei, molto probabilmente strutture autoantigeniche che insorgono in una successiva fase patogena e possono indurre la produzione di autoanticorpi.

Si presume che durante l'infezione da SARS-CoV-2, specialmente nei gruppi sanguigni non-O, l'induzione di processi autoimmuni possa contribuire allo sviluppo di sintomi gravi, che possono anche essere dominati dall'infiammazione autoimmune.⁸⁷¹



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7609233/>

I residui di serina virale SARS-CoV-2, mobilitati dal TMPRSS2 dell'ospite, dirottano il metabolismo GalNAc dell'ospite e sia il gruppo sanguigno O (H) che il gruppo sanguigno A sono infettati in modo identico tramite il gruppo sanguigno intermedio A-like/Tn, trans-specie indipendente dal gruppo sanguigno, Glicosilazione O-GalNAcα1-Ser/Thr-R. Nel gruppo sanguigno O(H) questa struttura ibrida intermedia è sostituita dalla fucosilazione di mucin-tipo o dalla formazione dell'antigene H, che neutralizza l'attività dell'isoagglutinina innata anti-H ma lascia inalterate le attività dell'anti-A/Tn innata e dell'anti-B isoagglutinine, esercitate dalle IgM polireattive non immuni, che implicano una risposta IgG secondaria. Nel gruppo sanguigno A, il legame Tn intermedio è ipoteticamente sostituito dalla formazione ibrida di tipo mucina allelica A tramite fucosilazione di tipo mucina. Ciò comporta la sistemazione fenotipica delle IgM non immuni polireattive, la sottoregolazione delle attività anti-A/Tn IgM (isoagglutinina) e la diminuzione del livello dell'attività anti-B IgM (isoagglutinina), mentre le formazioni IgG reattive anti-A/B sono precluse per selezione clonale. Questa figura è stata costruita secondo 'Fig. 2' in un precedente articolo⁸⁷², in cui questo meccanismo può essere utilizzato in modo simile da un agente patogeno non virale, come il parassita protozoico Plasmodium falciparum.

⁸⁷⁰ Arend P.

ABO (histo) blood group phenotype development and human reproduction as they relate to ancestral IgM formation: A hypothesis.

Immunobiology. 2016 Jan;221(1):116-27. doi: 10.1016/j.imbio.2015.07.003.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26433867/>

⁸⁷¹ Arend P.

Why blood group A individuals are at risk whereas blood group O individuals are protected from SARS-CoV-2 (COVID-19) infection: A hypothesis regarding how the virus invades the human body via ABO(H) blood group-determining carbohydrates.

Immunobiology. 2021 May;226(3):152027. doi: 10.1016/j.imbio.2020.152027.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7609233/>

⁸⁷² Arend P.

Stato del secretore e antigeni ABH (gene FUT2)

Il gruppo sanguigno ABH e gli antigeni di Lewis non si trovano solo sui globuli rossi, dove A e B determinano il gruppo, ma queste molecole sono anche presenti in un'ampia varietà di tessuti, possono aumentare la suscettibilità alle infezioni e contribuiscono allo sviluppo di altre malattie tromboemboliche e cardiovascolari.⁸⁷³

Gli epitelii del tratto gastrointestinale, respiratorio, urinario e riproduttivo esprimono sulla loro superficie carboidrati coniugati con lipidi (glicolipidi) e proteine (glicoproteine) che includono gli antigeni ABH e di Lewis. Questi antigeni conferiscono proprietà biologiche essenziali, partecipano al ricambio e al traffico intercellulare e sono coinvolti nell'interazione cellulare durante lo sviluppo.

Il termine "secretore ABH", usato nelle banche del sangue, si riferisce alla secrezione di antigeni del gruppo sanguigno ABO in fluidi come saliva, sudore, lacrime, sperma e siero.

Una persona definita secretore di ABH secernerà antigeni in base al proprio gruppo sanguigno; per esempio, un individuo del gruppo O secernerà l'antigene H, un individuo del gruppo A secernerà gli antigeni A e H, ecc. Per verificare lo stato del secreto, viene eseguito un test di inibizione o neutralizzazione utilizzando la saliva. Il principio del test è che se gli antigeni ABH sono presenti in una forma solubile in un fluido (es. saliva) gli antigeni neutralizzeranno i loro anticorpi corrispondenti e gli anticorpi non saranno più in grado di agglutinare i globuli rossi che possiedono gli stessi antigeni.⁸⁷⁴

Il gene FUT2 codifica per un enzima, noto come α -1,2-fucosiltransferasi, essenziale per la secrezione delle forme solubili degli antigeni dei gruppi sanguigni ABH e Lewis nella mucosa e nelle ghiandole secretorie.

Tali antigeni solubili producono cambiamenti fisiologici significativi nel microambiente tissutale, influenzando l'aderenza batterica e lo stato delle immunoglobuline, tra gli altri processi.⁸⁷⁵

I polimorfismi che riducono l'attività dell'enzima α -1,2-fucosiltransferasi come W143X nei caucasici e I129F negli asiatici, producono il fenotipo "non secretorio" caratterizzato dal non avere questi antigeni nelle secrezioni corporee e, di conseguenza, influenzano la loro suscettibilità a molti agenti patogeni e malattie.

Una delle principali differenze fisiologiche tra secretori e non secretori riguarda differenze qualitative e quantitative nei componenti della loro saliva, muco e altre secrezioni corporee.

La secrezione di ABH è controllata da due alleli, Se e se. Se è dominante e se è recessivo (o amorfico) ed è da notare che circa l'80 per cento delle persone è secretore (SeSe o Sese).

Position of human blood group O(H) and phenotype-determining enzymes in growth and infectious disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2018 Aug;1425(1):5-18. doi: 10.1111/nyas.13694. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7676429/>

⁸⁷³ Mankelov TJ, et al
Blood group type A secretors are associated with a higher risk of COVID-19 cardiovascular disease complications. *EJHaem.* 2021 May;2(2):175-187. doi: 10.1002/jha2.180. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8176350/>

⁸⁷⁴ D'Adamo PJ, Kelly GS.
Metabolic and immunologic consequences of ABH secretor and Lewis subtype status. *Altern Med Rev.* 2001 Aug;6(4):390-405. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11578255/>

⁸⁷⁵ Secretor status and ABH antigens (FUT2 gene) <https://www.tellmegen.com/en/results/dna-traits-test/secretor-status-abh-antigens-fut2-gene>

Bullerdiek J, Reisinger E, Rommel B, Dotzauer A.
ABO blood groups and the risk of SARS-CoV-2 infection. *Protoplasma.* 2022 Apr 1:1-15. doi: 10.1007/s00709-022-01754-1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8973646/>

Cooling L.
Blood Groups in Infection and Host Susceptibility. *Clinical Microbiology Reviews.* 2015 Jul;28(3):801-870. DOI: 10.1128/cmr.00109-14. <https://europemc.org/article/pmc/pmc4475644>

Fattore Rh (Rhesus Factor) e suscettibilità al SARS-Cov-2

Il fattore Rhesus (fattore Rh) è un antigene di superficie degli eritrociti,⁸⁷⁶ scoperto per la prima volta nelle scimmie Rhesus, da cui il nome.⁸⁷⁷

Il sistema del gruppo sanguigno Rh è costituito da più antigeni (oltre 50), ma D, C, c, E ed e sono gli antigeni più comuni identificati.⁸⁷⁸

L'antigene D è principalmente responsabile della malattia Rh a causa della sua elevata immunogenicità.

Una persona può essere Rh-positiva o Rh-negativa in base alla presenza o assenza dell'antigene D sulla superficie dei globuli rossi, rispettivamente.

La malattia emolitica Rh, nota anche come incompatibilità Rh, è una condizione che si verifica quando una donna con gruppo sanguigno Rhesus-negativo viene esposta a cellule del sangue Rhesus-positive, portando allo sviluppo di anticorpi anti-D mediante un processo chiamato isoimmunizzazione.

Dopo la sensibilizzazione, questi alloanticorpi materni (immunoglobuline IgG) possono persistere per tutta la vita e spostarsi liberamente attraverso la placenta fino alla circolazione fetale durante le gravidanze successive, dove portano alla distruzione degli eritrociti fetali dopo aver formato complessi antigene-anticorpo con il loro antigene D di superficie.

Ciò si traduce in anemia emolitica alloimmune nel feto nota come eritroblastosi fetale. La gravità della malattia dipende molto dal numero di immunoglobuline, dall'età gestazionale e dall'attività enzimatica del feto.⁸⁷⁹ Se non diagnosticata, il tasso di mortalità è alto, fino al 24% nei neonati.

Lo screening parentale universale e il trattamento profilattico con immunoglobuline Rh hanno ridotto significativamente i tassi di mortalità neonatale.⁸⁸⁰ Due geni (RHD, RHCE) in stretta vicinanza sul cromosoma

⁸⁷⁶ Cooling L.

Blood Groups in Infection and Host Susceptibility.
Clin Microbiol Rev. 2015 Jul;28(3):801-70. doi: 10.1128/CMR.00109-14.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4475644/>

Huang, C.-H. (2013).

Rh Factor and Rh System. Brenner's Encyclopedia of Genetics, 231–234. doi:10.1016/b978-0-12-374984-0.01333-4

Huang CH, Liu PZ, Cheng JG.

Molecular biology and genetics of the Rh blood group system.
Semin Hematol. 2000 Apr;37(2):150-65. doi: 10.1016/s0037-1963(00)90040-4.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10791884/>

⁸⁷⁷ Sarwar A, Citla Sridhar D.

Rh-Hemolytic Disease. [Updated 2022 May 1]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560488/>

⁸⁷⁸ Avent ND, Reid ME.

The Rh blood group system: a review.
Blood. 2000 Jan 15;95(2):375-87. Erratum in: Blood 2000 Apr 1;95(7):2197.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10627438/>

Cartron JP.

Defining the Rh blood group antigens.
Biochemistry and molecular genetics.
Blood Rev. 1994 Dec;8(4):199-212. doi: 10.1016/0268-960x(94)90108-2.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7888828/>

⁸⁷⁹ Nassar GN, Wehbe C.

Erythroblastosis Fetalis. 2022 Jun 27. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513292/>

Sarwar A, Citla Sridhar D.

Rh-Hemolytic Disease. [Updated 2022 May 1]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560488/>

⁸⁸⁰ Zipursky A.

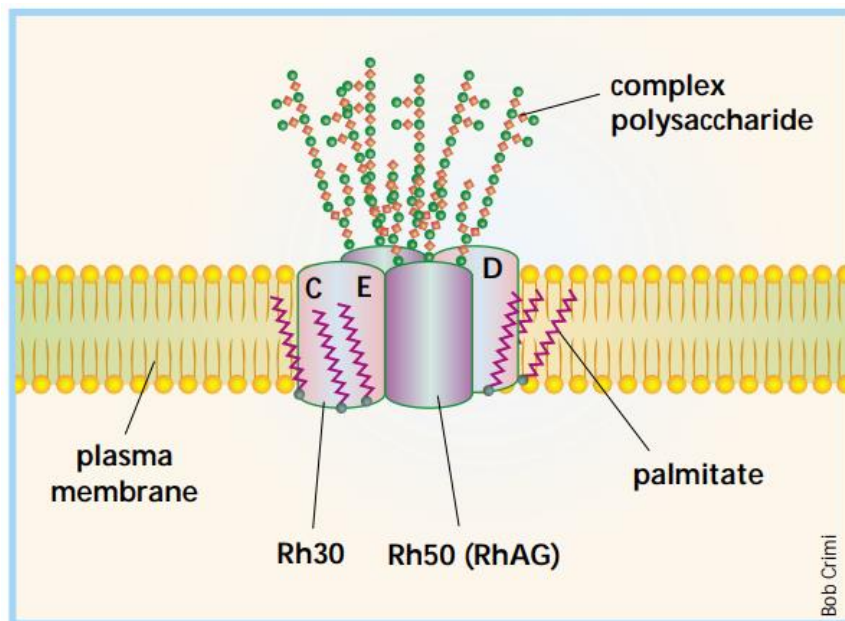
The universal prevention of Rh immunization.
Clin Obstet Gynecol. 1971 Sep;14(3):869-84. doi: 10.1097/00003081-197109000-00013.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5003669/>

1 codificano per le proteine Rh, RhD e RhCE; uno trasporta l'antigene D e l'altro trasporta antigeni CE in varie combinazioni (ce, Ce, cE o CE).⁸⁸¹

I geni sono identici al 97%, ciascuno ha 10 esoni e codifica per proteine che differiscono da 32 a 35 aminoacidi. Ciò è in contrasto con la maggior parte degli antigeni del gruppo sanguigno che sono codificati da singoli geni con alleli che differiscono solo per uno o pochi amminoacidi.

Il gran numero di differenze di amminoacidi spiega perché l'esposizione a RhD può provocare una potente risposta immunitaria in un individuo RhD-.

RhD e RhCE condividono il 92% di identità come conseguenza della duplicazione genica e gli antigeni D e CE sono epitopi distinti all'interno delle due proteine. (Si noti che 'Rh negativo' significa assenza di D, poiché l'allele antitetico di D non esiste.)⁸⁸²



https://www.nature.com/articles/ng1100_258

⁸⁸¹ Westhoff CM.

The Rh blood group system in review: a new face for the next decade.

Transfusion. 2004 Nov;44(11):1663-73. doi: 10.1111/j.0041-1132.2004.04237.x. Erratum in: Transfusion. 2005 Jan;45(1):125.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15504174/>

Chérif-Zahar B, Bloy C, Le Van Kim C, Blanchard D, Bailly P, Hermand P, Salmon C, Cartron JP, Colin Y.

Molecular cloning and protein structure of a human blood group Rh polypeptide.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Aug;87(16):6243-7. doi: 10.1073/pnas.87.16.6243.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC54509/>

Chérif-Zahar B, Mattéi MG, Le Van Kim C, Bailly P, Cartron JP, Colin Y.

Localization of the human Rh blood group gene structure to chromosome region 1p34.3-1p36.1 by in situ hybridization.

Hum Genet. 1991 Feb;86(4):398-400. doi: 10.1007/BF00201843.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1900257/>

Arce MA, Thompson ES, Wagner S, Coyne KE, Ferdman BA, Lublin DM.

Molecular cloning of RhD cDNA derived from a gene present in RhD-positive, but not RhD-negative individuals.

Blood. 1993 Jul 15;82(2):651-5.

<https://doi.org/10.1182/blood.V82.2.651.651>

Simsek S, de Jong CA, Cuijpers HT, Bleeker PM, Westers TM, Overbeeke MA, Goldschmeding R, van der Schoot CE, von dem Borne AE.

Sequence analysis of cDNA derived from reticulocyte mRNAs coding for Rh polypeptides and demonstration of E/e and C/c polymorphisms.

Vox Sang. 1994;67(2):203-9. doi: 10.1111/j.1423-0410.1994.tb01661.x.

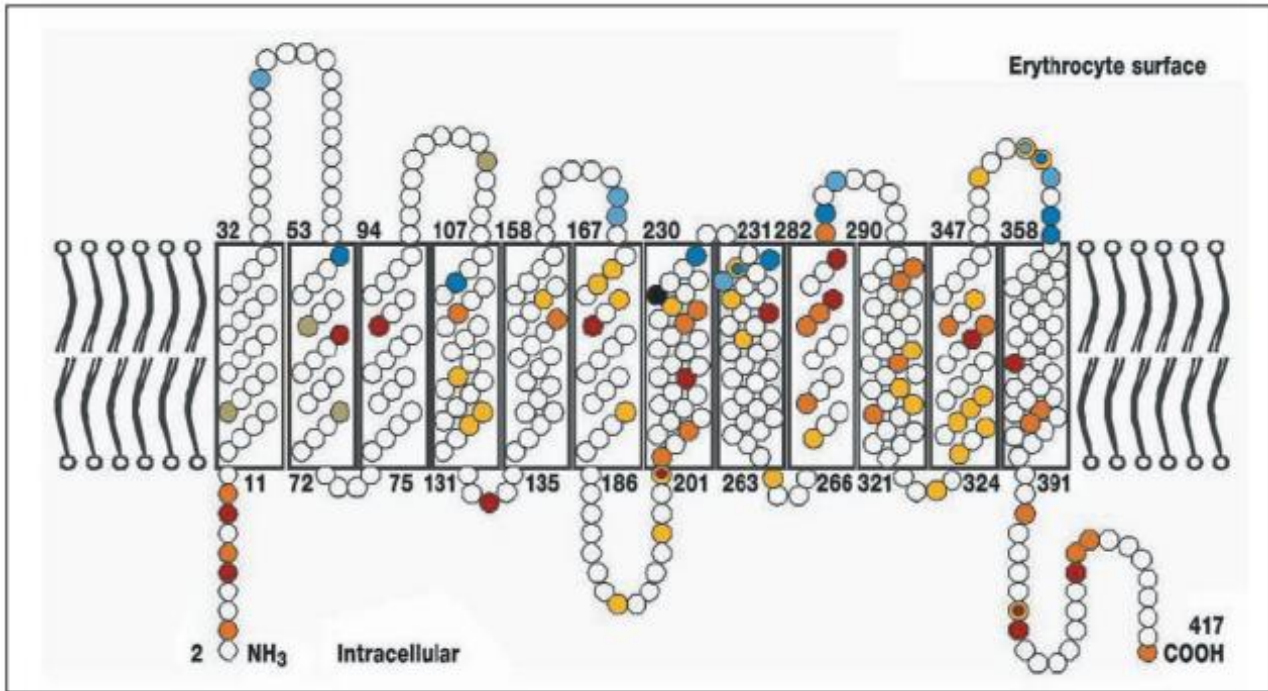
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7801613/>

⁸⁸² Heitman J, Agre P.

A new face of the Rhesus antigen.

Nat Genet. 2000 Nov;26(3):258-9. doi: 10.1038/81532.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11062455/>



<https://bloodtransfusion.it/articoli/000035/en/000167.pdf>

La proteina Rhesus nella membrana degli eritrociti. Entrambe le proteine Rhesus mostrano 417 aminoacidi, mostrati qui come cerchi. Le proteine mature nella membrana mancano del primo aminoacido. Le sostituzioni amminoacidiche che distinguono la proteina RhD dalla proteina RhCE sono evidenziate in giallo, con i quattro aminoacidi che codificano per l'antigene C in verde e quello che codifica per l'antigene E in nero. Le sostituzioni dei singoli aminoacidi che codificano per D parziale sono in blu, quelle che codificano per D debole sono in rosso. Le mutazioni, identificate dal gruppo Ulm, sono in azzurro e arancione.

La scoperta che la famiglia di proteine Rh è coinvolta nel trasporto dell'ammoniaca o dell'ammonio ed è idealmente posizionata nei tessuti chiave essenziali per l'eliminazione dell'ammonio è una scoperta significativa perché a lungo si è ritenuto che l'elevata permeabilità della membrana dell'ammoniaca (NH₃) avrebbe ovviato alla necessità di vie di trasporto specifiche nelle cellule di mammifero.⁸⁸³

Ciò ricorda la scoperta della funzione della proteina del gruppo sanguigno Colton come primo membro di una famiglia di trasportatori dell'acqua (acquaporine) e della proteina del gruppo sanguigno Kidd come primo membro di una famiglia di trasportatori dell'urea.

Originariamente si pensava anche che il movimento dell'acqua e dell'urea avvenisse solo per movimento passivo attraverso il doppio strato lipidico.

Come le acquaporine e i trasportatori dell'urea, gli omologhi delle proteine Rh sono stati trovati in altri tessuti e in molti organismi tra cui la spugna, la muffa melmosa, il moscerino della frutta, il pesce e la rana (riassunti in Huang et al.⁸⁸⁴), indicando che hanno una funzione essenziale e conservata durante l'evoluzione.

Le interazioni proteina-citoscheletro e proteina-proteina di membrana dei globuli rossi sono aree di indagine attive.

È importante sottolineare che i risultati di cui sopra evidenziano i principali contributi che lo studio della funzione delle proteine del gruppo sanguigno continua a fornire alla biologia e alla fisiologia e sottolineano le opportunità di ricerca all'interno della professione del medico trasfusionale.

⁸⁸³ Avent ND.

A new chapter in Rh research: Rh proteins are ammonium transporters. Trends Mol Med. 2001 Mar;7(3):94-6. doi: 10.1016/s1471-4914(01)01949-9. [https://doi.org/10.1016/S1471-4914\(01\)01949-9](https://doi.org/10.1016/S1471-4914(01)01949-9)

⁸⁸⁴ Huang CH, Liu PZ, Cheng JG.

Molecular biology and genetics of the Rh blood group system. Semin Hematol. 2000 Apr;37(2):150-65. doi: 10.1016/s0037-1963(00)90040-4. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10791884/>

Le recenti rivelazioni sul ruolo delle proteine Rh/RhAG nell'integrità strutturale della membrana dei globuli rossi e sulla loro funzione di trasporto hanno portato il campo di Rh ben oltre la considerazione come semplice famiglia di antigeni di gruppi sanguigni.

Per quanto riguarda la correlazione tra gruppo Rh, infezione da SARS-Cov-2 e severità della COVID-19 è stato riportato in più studi ⁸⁸⁵ che il gruppo A+ ha una maggiore suscettibilità all'infezione rispetto al gruppo 0- e nella maggior parte degli studi anche alla severità dell'infezione.

⁸⁸⁵ Kerbage A, Haddad SF, Nasr L, Riachy A, Mekhael E, Nassim N, Hoyek K, Sleilaty G, Nasr F, Riachy M. Impact of ABO and Rhesus blood groups on COVID-19 susceptibility and severity: A case-control study. *J Med Virol.* 2022 Mar;94(3):1162-1166. doi: 10.1002/jmv.27444. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8662239/>

Ray JG, Schull MJ, Vermeulen MJ, Park AL. Association Between ABO and Rh Blood Groups and SARS-CoV-2 Infection or Severe COVID-19 Illness : A Population-Based Cohort Study. *Ann Intern Med.* 2021 Mar;174(3):308-315. doi: 10.7326/M20-4511. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7711653/>

Anderson JL, May HT, Knight S, Bair TL, Horne BD, Knowlton KU. Association of Rhesus factor blood type with risk of SARS-CoV-2 infection and COVID-19 severity. *Br J Haematol.* 2022 Jun;197(5):573-575. doi: 10.1111/bjh.18086. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35106763/>

Donskov SI, et al
ABO and rhesus blood groups as a risk factor for ARVI COVID-19. *Klin Lab Diagn.* 2021 Nov 29;66(11):661-665. English. doi: 10.51620/0869-2084-2021-66-11-661-665. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34882350/>

Taha SAH, Osman MEM, Abdoelkarim EAA, Holie MAI, Elbasheir MM, Abuzeid NMK, Al-Thobaiti SA, Fadul SB, Konozy EHE. Individuals with a Rh-positive but not Rh-negative blood group are more vulnerable to SARS-CoV-2 infection: demographics and trend study on COVID-19 cases in Sudan. *New Microbes New Infect.* 2020 Nov;38:100763. doi: 10.1016/j.nmni.2020.100763. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7505818/>

Soo KM, Chung KM, Mohd Azlan MAA, Lam JY, Ren JWX, Arvind JJ, Wong YP, Chee HY, Amin-Nordin S. The association of ABO and Rhesus blood type with the risks of developing SARS-CoV-2 infection: A meta-analysis. *Trop Biomed.* 2022 Mar 1;39(1):126-134. doi: 10.47665/tb.39.1.015. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35507935/>

Wu BB, Gu DZ, Yu JN, Yang J, Shen WQ. Association between ABO blood groups and COVID-19 infection, severity and demise: A systematic review and meta-analysis. *Infect Genet Evol.* 2020 Oct;84:104485. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104485. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7391292/>