



FEDERAZIONE  
RINASCIMENTO  
ITALIA

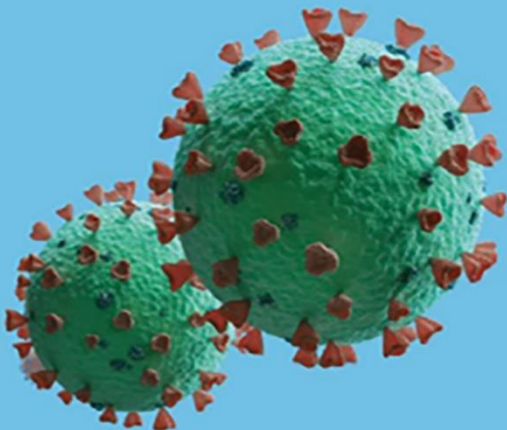
[rinascimentoitalia.it](http://rinascimentoitalia.it)

# PROGETTO FRI ZEROSPIKE

- Breve sintesi sulla Proteina Spike -

## DR.SSA LORETTA BOLGAN

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



[ZEROSPIKE.ORG](http://ZEROSPIKE.ORG)

## SOMMARIO

<b><i>IL PROGETTO CIVICO DI RICERCA SCIENTIFICA FRI ZEROSPIKE (zerospike.org)</i></b> .....	<b>2</b>
<b>LE CARATTERISTICHE DEL SARS-COV-2 E DELLA PROTEINA SPIKE</b> .....	<b>2</b>
<b>DIFFERENZA TRA LA SPIKE NATURALE E VACCINALE</b> .....	<b>6</b>
<b>IL CONCETTO DI QUASISPECIE E POTENZIAMENTO DELLA MALATTIA</b> .....	<b>9</b>
<b>SEQUENZE TOSSICHE DELLA SPIKE</b> .....	<b>14</b>
<b>SPIKE E FORMAZIONE DI SINCIZI</b> .....	<b>14</b>
<b>PROPRIETA' PRIONICHE</b> .....	<b>16</b>
<b>DANNI ENDOTELIALI</b> .....	<b>19</b>
<b>MIMETISMO MOLECOLARE</b> .....	<b>22</b>

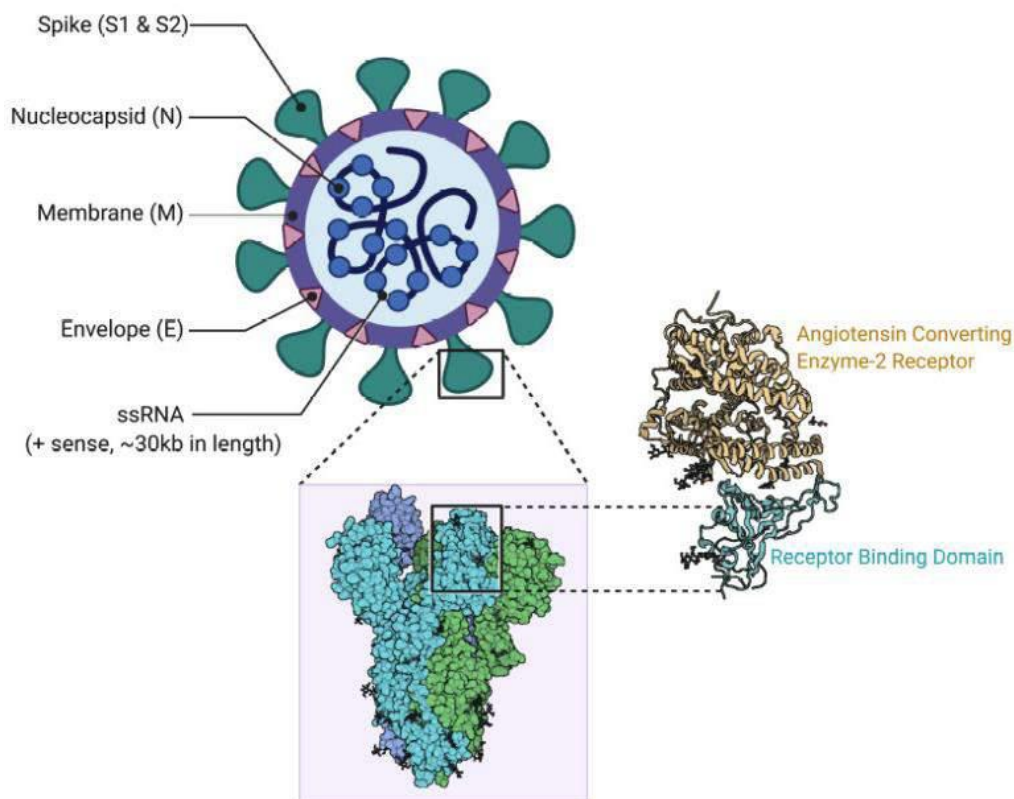
Il progetto ZeroSpike nasce dallo studio delle caratteristiche tossicologiche della proteina cosiddetta "Spike" del virus SARS-Cov-2 e dei vaccini correlati, con lo scopo di trovare dei rimedi utili per la detossificazione dell'organismo nei casi di Covid acuto, Long Covid e danno da vaccino.

## LE CARATTERISTICHE DEL SARS-COV-2 E DELLA PROTEINA SPIKE

I coronavirus sono importanti patogeni umani e animali. Alla fine del 2019, un nuovo coronavirus è stato identificato come la causa di un gruppo di casi di polmonite a Wuhan, una città nella Provincia cinese di Hubei, che si diffuse rapidamente, provocando un'epidemia in tutta la Cina, seguita da una pandemia globale. Nel febbraio 2020, l'Organizzazione mondiale della sanità ha denominato la malattia COVID-19, che sta per "coronavirus disease 2019". Il virus che causa la COVID-19 inizialmente è stato indicato come 2019-nCoV e successivamente denominato "sindrome respiratoria acuta grave coronavirus 2" (SARS-CoV-2) per la similarità con il virus SARS-Cov-1 responsabile di un'epidemia nel 2003 in Cina. <sup>1</sup>

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

Il SARS-CoV-2 ha quattro proteine strutturali: la proteina spike (S), la proteina dell'involucro (E), la proteina di membrana (M) e la proteina del nucleocapside (N). Tra queste proteine, la proteina S trimerica è indispensabile per le interazioni virus-recettore cellulare durante l'ingresso virale.



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

<sup>1</sup> <https://www.uptodate.com/contents/covid-19-epidemiology-virology-and-prevention>

La proteina S comprende una subunità S1 N-terminale responsabile del legame recettore-virus e una subunità S2 C-terminale responsabile della fusione della membrana cellulare-virus. S1 è ulteriormente suddivisa in un dominio N-terminale (NTD) e un dominio di legame del recettore (RBD).

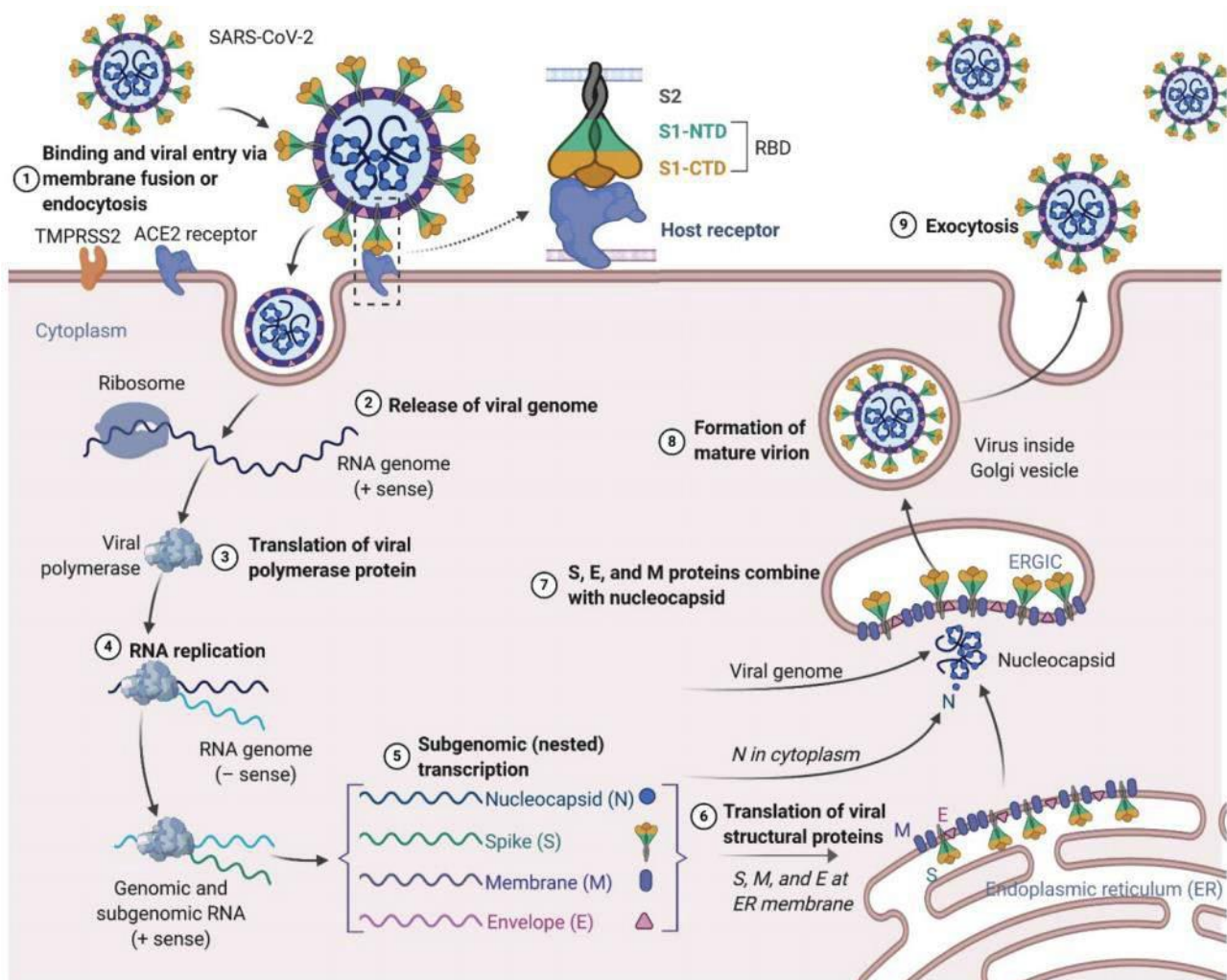
Il SARS-CoV-2 entra nelle cellule attraverso la proteina S, che si lega principalmente al recettore dell'enzima di conversione dell'angiotensina 2 (ACE2) umano e impiega la serina proteasi cellulare TMPRSS2 per l'attivazione della proteina S.

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

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

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

Queste fasi del ciclo di vita virale forniscono i potenziali bersagli per vaccini e terapie per prevenire e trattare l'infezione da SARS-CoV-2.<sup>2</sup>

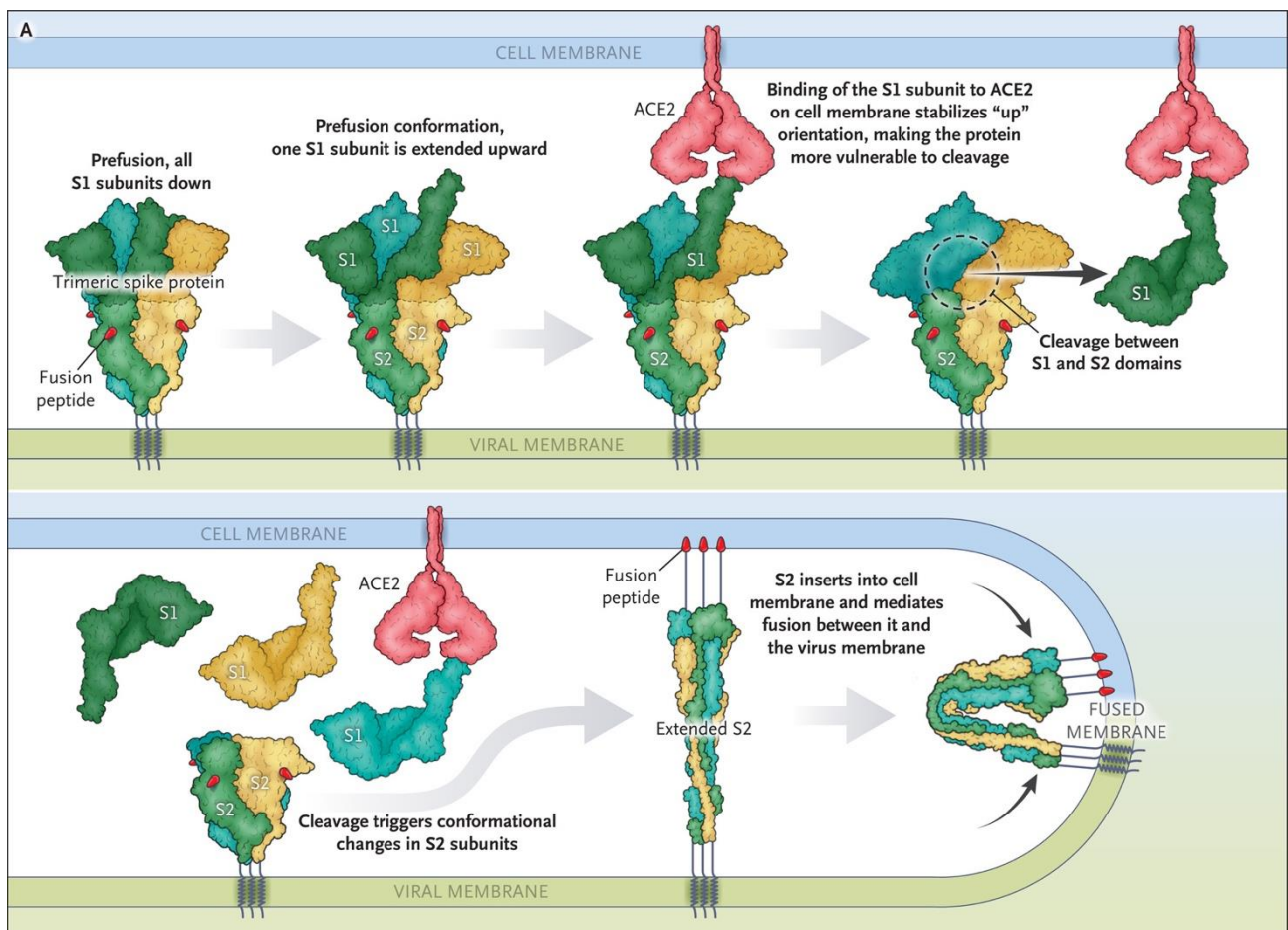


<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7359073/>

La proteina S è un trimero che segue un meccanismo di fusione definito di classe I: presenta una conformazione di 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

<sup>2</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8447893/>

accessibilità al recettore ACE. Quando la subunità S1 si lega al recettore, effettua un movimento a cerniera, che permette di esporre gli altri RBD in una posizione cosiddetta “up” e fa assumere alla subunità S2 una conformazione di post fusione che porta la membrana virale a fondersi con quella cellulare.<sup>3</sup>



<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMcibr2101205>

È interessante il fatto che la CoV-2-S possieda un’inserzione di quattro amminoacidi (sito polibasicco PRRAR) al confine tra S1 ed S2 rispetto alla proteina S di SARS-CoV, in cui è assente.

Questi quattro amminoacidi costituiscono il sito di taglio per una specifica proteasi umana chiamata furina. Data l’espressione praticamente ubiquitaria delle proteasi simili alla furina, questa caratteristica 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 patogenicità.

È stato dimostrato di recente che, come la TMPRSS2, la furina è essenziale per l’ingresso del 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.<sup>4</sup>

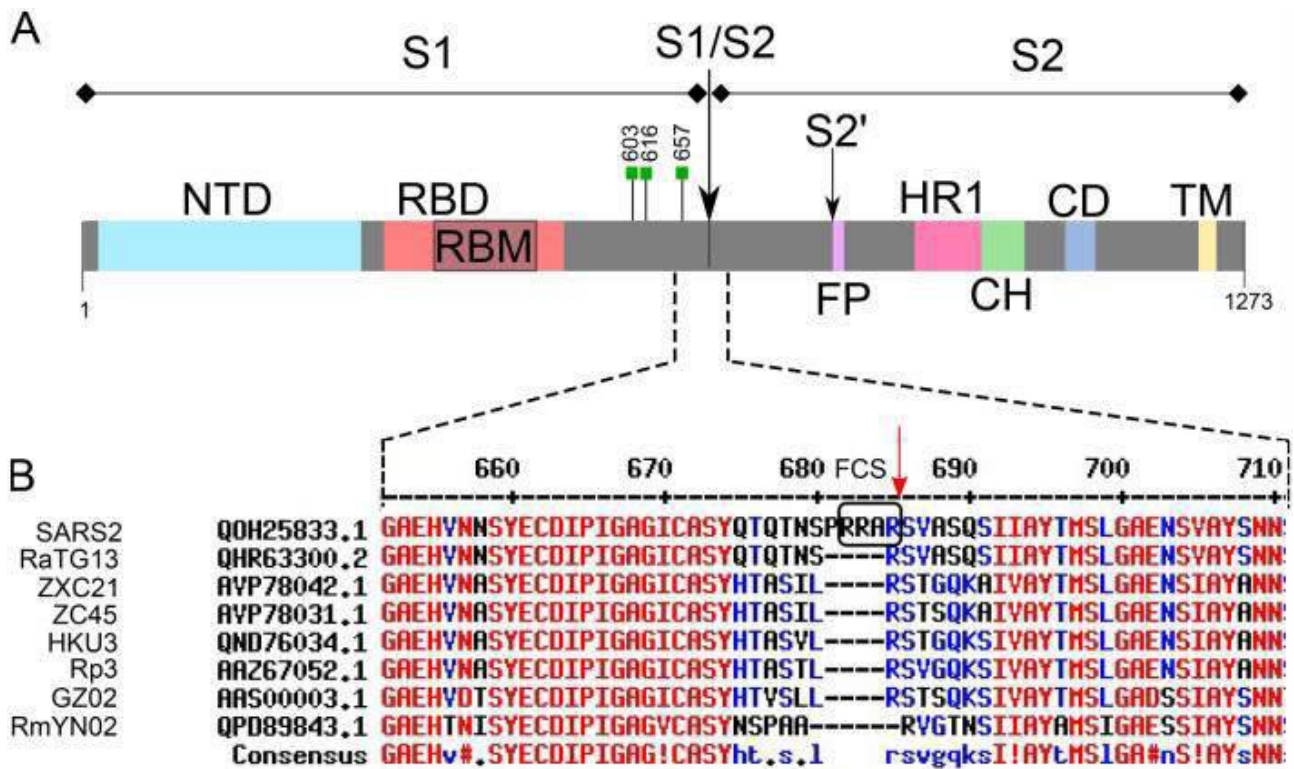
Inoltre, il motivo "RRAR" crea un motivo C-terminale (CendR) con un sito di legame per i recettori di membrana della neuropilina (NRP1 e NRP2), più ampiamente espressi rispetto ad ACE2.

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.<sup>5</sup>

<sup>3</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7474903/>

<sup>4</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9044946/>

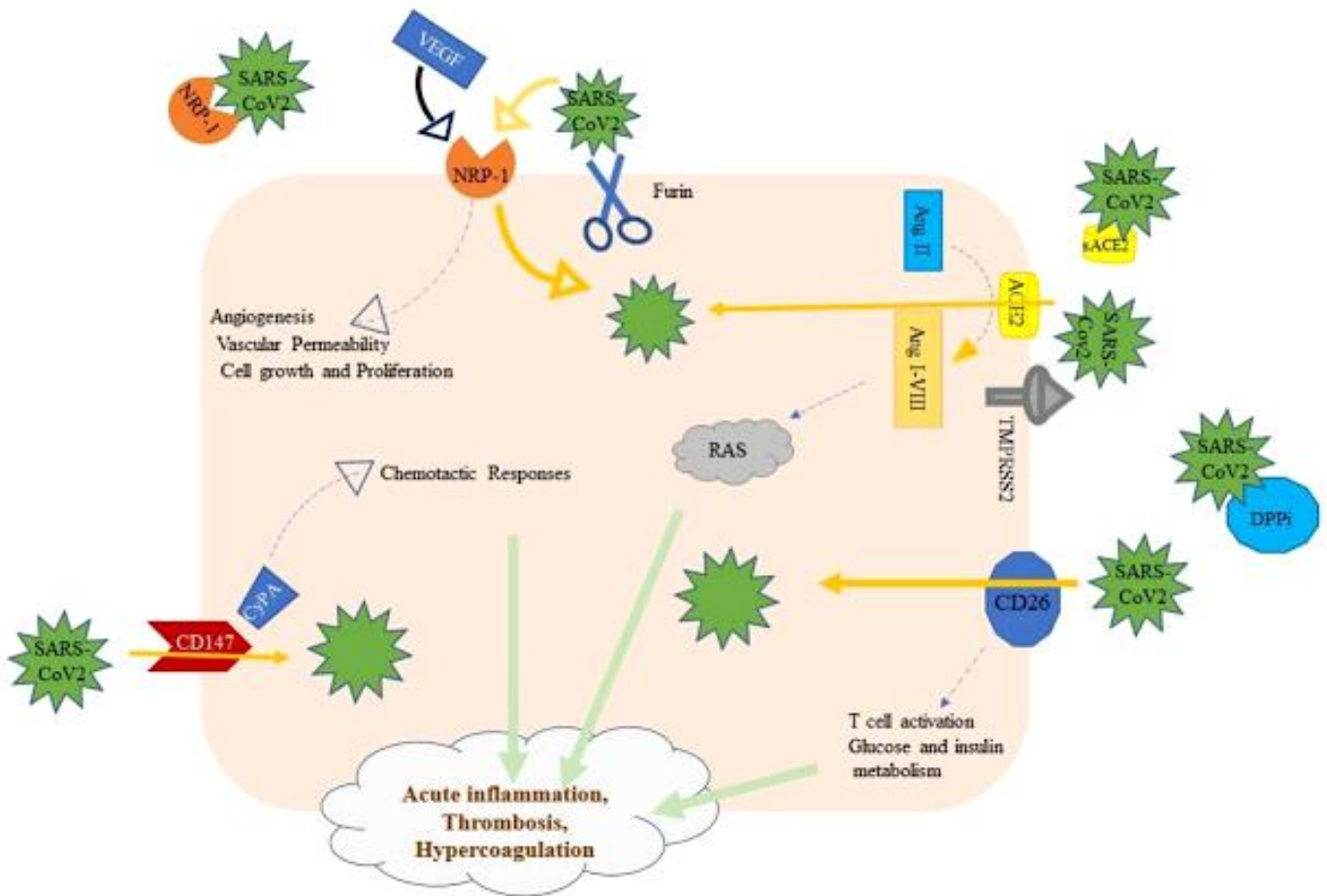
<sup>5</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7857391/>



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7993900/>

Sebbene ACE2 svolga un ruolo fondamentale nella replicazione di SARS-CoV-2, i suoi profili di espressione non sono completamente associati a modelli di infezione, risposte immunitarie e manifestazioni cliniche. Inoltre, SARS-CoV-2 infetta le cellule prive di ACE2 e l'infezione è resistente agli anticorpi monoclonali contro l'RBD della spike in vitro, indicando che alcune cellule umane possiedono recettori alternativi ACE2-indipendenti, che possono mediare l'ingresso di SARS-CoV-2. Questi recettori, oltre a NRP1 di cui si è accennato sopra, includono CD147, AXL, CD209L/L-SIGN/CLEC4M, CD209/DC-SIGN/CLEC4L, CLEC4G/LSECTin, ASGR1/CLEC4H1, LDLRAD3, TMEM30A e KREMEN1. La maggior parte di questi recettori è nota per essere coinvolta nell'ingresso di altri virus e per modulare le funzioni cellulari e le risposte immunitarie. La variante omicron SARS-CoV-2 mostra un tropismo cellulare alterato e un cambiamento associato nel percorso di ingresso cellulare, indicando che le varianti emergenti possono utilizzare recettori alternativi per sfuggire alla pressione immunitaria contro l'ingresso virale ACE2-dipendente causata dalla vaccinazione contro l'RBD della spike.<sup>6</sup>

<sup>6</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9244107/>



## DIFFERENZA TRA LA SPIKE NATURALE E VACCINALE

Come già accennato sopra, la proteina S del virus SARS-CoV-2 funziona come trimero e consiste di tre molecole identiche, che sono codificate dallo stesso gene. 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" e che la forma della proteina con conformazione chiusa è debolmente immunogenica.

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).

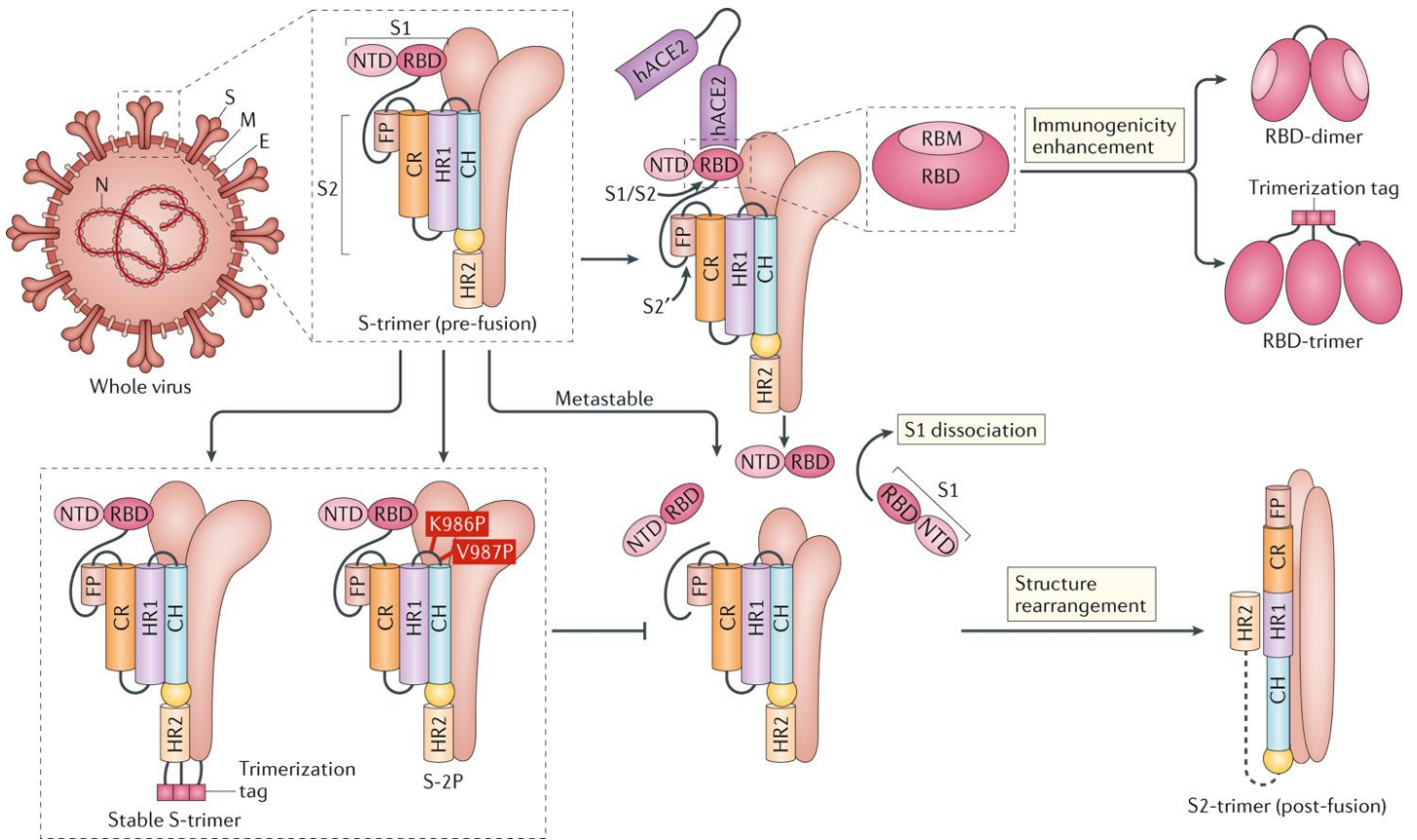
In particolare, dopo l'espressione della sequenza codificante BNT162b2 nelle cellule, si è visto che una parte delle molecole presentava stabilmente un RBD nello stato "su" (accessibile per il legame con il recettore), e due RBD "in giù" (conformazione chiusa).<sup>7</sup>

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 del ceppo di Wuhan-1) comportano la formazione di anticorpi mirati contro questo antigene vaccinale, i quali proprio a causa della loro alta specificità possono essere responsabili della selezione di varianti virali vaccinoresistenti<sup>8</sup> e di un maggior rischio di un fenomeno di potenziamento della

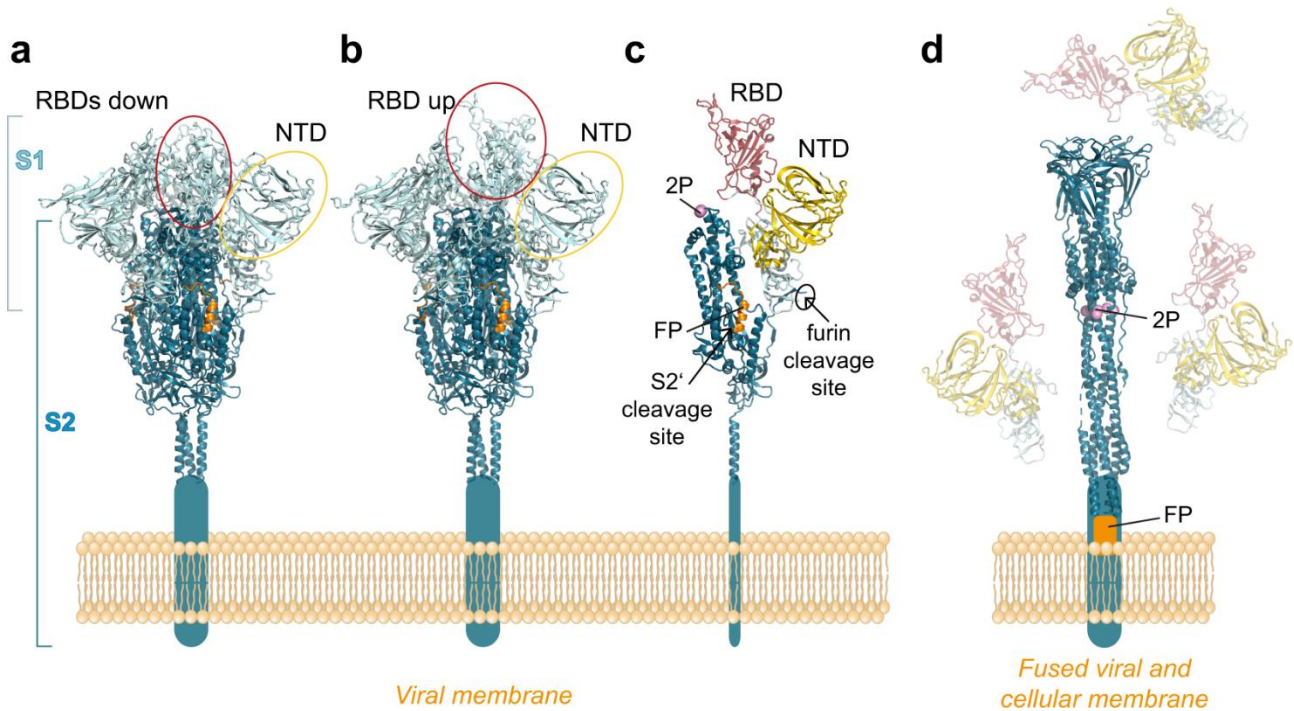
<sup>7</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8311925/>  
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.701501/full>  
<https://www.nature.com/articles/s41541-021-00369-6>

<sup>8</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8805732/>

malattia, già evidenziato per altri virus tra cui il SARS-Cov-1, noto come ADE (potenziamento dipendente dall'anticorpo).<sup>9</sup>



<https://www.nature.com/articles/s41577-020-00480-0/>



<https://www.nature.com/articles/s41541-021-00369-6>

<sup>9</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8814804/>

Ogni monomero di S è composto da diversi elementi strutturali, incluso il dominio N-terminale (NTD) e il dominio di legame del recettore (RBD) in S1, che occlude la porzione S2 nel trimero nativo S (Fig. 2A-C). Il RBD oscilla tra una posizione "su" e "giù" e l'interazione con il recettore cellulare (ACE2) è possibile solo con l'RBD esposto transitoriamente nella posizione "su". Nella sua forma matura, il trimero S è metastabile e pronto a subire cambiamenti conformazionali innescati che consentono a S2 di guidare la fusione delle membrane virali e cellulari per l'ingresso del virus. Il grilletto comprende il legame di RBD a ACE2 e un'ulteriore scissione proteolitica da parte delle proteasi cellulari (oltre alla scissione della furina tra S1 e S2) nel cosiddetto sito S2', con conseguente rimozione di un piccolo elemento di sequenza e l'esposizione del peptide di fusione all'N-terminale di S2 (Fig. 2C). Come conseguenza di questi cambiamenti, le subunità S1 si dissociano dal trimero, rilasciando S2 dai suoi vincoli nella conformazione di pre-fusione per consentire una conversione irreversibile in una caratteristica struttura post-fusione allungata (Fig. 2d). L'energia acquisita dalla formazione di questa struttura simile a una forcina, in cui il peptide di fusione viene giustapposto all'ancora di membrana C-terminale, è la forza trainante della fusione della membrana virale durante l'ingresso.

Il potenziale del trimero S di adottare diverse conformazioni può comportare un problema per il suo uso nei vaccini, perché la struttura nativa - richiesta per indurre anticorpi potenzialmente neutralizzanti- può essere interrotta durante la produzione di vaccini convenzionali o quando la proteina è espressa nelle cellule dei vaccinati dopo la vaccinazione genica. Alcuni produttori hanno quindi introdotto mutazioni stabilizzanti che hanno lo scopo di prevenire la conversione strutturale involontaria della proteina S labile. Queste modifiche includono due mutazioni di prolina in S2 (K986P e V987P) alla giunzione tra due eliche alfa nella forma pre-fusione per evitare il loro passaggio conformazionale fusogenico in una forma ad alfa elica allungata in forma post-fusione e mutazioni che aboliscono la scissione della furina tra S1 e S2 per mantenere il trimero pre-fusione e per prevenire lo spargimento di S (Fig. 2C, D).

Type	Manufacturer	Name	Stabilizing mutations	Virus strain	Eukaryotic production cell line	Dosage
mRNA	BioNTech-Pfizer (Germany, USA)	BNT162b2, Comirnaty	Yes (prolines)	Wuhan-Hu-1	not applicable	30 µg RNA (2x)
mRNA	Moderna-NIAID (USA)	mRNA-1273, COVID-19 Vaccine Moderna	yes (prolines)	Wuhan-Hu-1	not applicable	100 µg RNA (2x)
mRNA	CureVac (Germany)	CVnCoV	yes (prolines)	Wuhan-Hu-1	not applicable	12 µg RNA (2x)
Adenovector	University of Oxford-AstraZeneca (UK, Sweden)	COVID-19 vaccine AstraZeneca, AZD1222, ChAdOx1-S, Vaxzeria; Covishield	no	Wuhan-Hu-1	HEK293	5×10 <sup>10</sup> adenovirus vector particles (2x)
Adenovector	CanSino Biological Inc., Beijing Institute of Biotechnology (China)	Ad5 nCoV, Convidecia	no	Wuhan-Hu-1	HEK293	5×10 <sup>10</sup> adenovirus vector particles (2x)
Adenovector	Gamaleya Research Institute (Russia)	rAd26-S + rAd5-S, Gam-COVID-Vac, Sputnik V	no	Wuhan-Hu-1 (probably)	HEK293	10×10 <sup>10</sup> adenovirus vector particles (2x)
Adenovector	Janssen-Johnson & Johnson (NL/USA)	Ad26.COV2.S, COVID-19 Vaccine Janssen	yes (prolines, furin cleavage site)	Wuhan-Hu-1	PER.C6	5×10 <sup>10</sup> adenovirus vector particles (1x)
Inactivated whole virus	Sinopharm, Beijing Institute of Biological Products Co (China)	BBIBP-CorV, Sinopharm COVID-19 vaccine	not applicable	Wuhan-Hu-1-like HB02 strain	Vero	4 µg proposed (2x)
Inactivated whole virus	Sinovac (China)	CoronaVac	not applicable	Wuhan-Hu-1-like CN2 strain	Vero	3 µg proposed (2x)
Inactivated whole virus	Bharat Biotech (India)	Covaxin, BBV152	not applicable	NIV2020-770 (D614G)	Vero	6 µg proposed (2x)
Subunit	Novavax (USA)	NVX-CoV2373	yes (prolines, furin cleavage site)	Wuhan-Hu-1	Sf9	5 µg S ( +50 µg adjuvant) (2x)

<https://www.nature.com/articles/s41541-021-00369-6>

## IL CONCETTO DI QUASISPECIE E POTENZIAMENTO DELLA MALATTIA

- QUASISPECIE

Uno dei principali fattori del successo evolutivo dei virus a RNA è l'utilizzo della replicazione soggetta a errori che generalmente manca di meccanismi di correzione delle bozze. I tassi medi di mutazione sono circa  $10^{-4}$ – $10^{-5}$  errori per nucleotide copiato o, in base alle dimensioni genomiche medie, circa una mutazione per genoma copiato. Di conseguenza, una popolazione virale non esiste come un insieme di sequenze geneticamente identiche, ma piuttosto come una raccolta di mutanti strettamente correlati definiti quasispecie. La teoria delle quasispecie ha importanti ripercussioni per l'evoluzione e l'adattabilità del virus a RNA. Essendo una vasta popolazione di mutanti generati casualmente, una popolazione virale di quasispecie avrà un'ampia gamma di variazioni fenotipiche. La ricombinazione genetica fornisce ulteriori fonti di variazione genetica. Avere una grande quantità di variazione preesistente porterebbe quindi a un rapido adattamento in risposta ai cambiamenti nell'ambiente, e le quasispecie virali possono già contenere mutazioni resistenti ancora prima che venga applicata una pressione selettiva. Gli alti tassi di mutazione riscontrati in una quasispecie di RNA aumentano anche la probabilità della generazione di mutazioni di evasione immunitaria. Queste mutazioni di evasione verrebbero quindi selezionate in presenza di pressioni ambientali (ad esempio farmaci antivirali, anticorpi vaccinali o monoclonali).<sup>10</sup>

Nel diagramma riportato di seguito è rappresentato in maniera schematica il meccanismo della resistenza dei virus a RNA a farmaci antivirali e vaccini: durante la prima fase, una singola particella virale (virus wild-type rappresentato da un punto nero) infetta la cellula e inizia a replicarsi. Di conseguenza, viene generato un ampio pool di particelle virali molto diversificate (rappresentate da punti colorati), definito quasi-specie. Praticamente ogni virus differisce dall'altro così come dalla forma wild-type. Quando le particelle virali lasciano la cellula sono sottoposte alla selezione da parte dell'organismo ospite. Prima di tutto, devono essere infettive per entrare in una nuova cellula (primo stadio di selezione). Quei virus che sono stati in grado di infettare nuove cellule devono replicare i loro genomi e produrre progenie; nell'altro caso la progenie viene eliminata (seconda fase di selezione). Dopo alcuni giorni, i virus in replicazione vengono sottoposti a selezione da parte del sistema immunitario dell'ospite. Di conseguenza, i mutanti che eludono la risposta immunitaria vengono generati nella terza fase della selezione.

Infine, il paziente infetto viene sottoposto a terapia antivirale e solo i mutanti resistenti ai farmaci possono replicarsi e diffondere ulteriormente (quarto stadio di selezione). In questo modo, la selezione in quattro fasi genera varianti virali infettive, replicanti, non neutralizzabili e resistenti ai farmaci.<sup>11</sup>

Va fatto presente che nel corso dell'infezione naturale, le varianti che si selezionano nel corso della terza fase di selezione, dipendono dalla risposta immunitaria: se il sistema immunitario è efficiente si selezionano varianti progressivamente asintomatiche che portano a tolleranza la replicazione virale nell'organismo e favoriscono l'immunità di gregge,<sup>12</sup> viceversa se il sistema immunitario è compromesso, il virus si replica per tempi più lunghi e si possono selezionare varianti anche più aggressive.<sup>13</sup>

---

<sup>10</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4488735/>

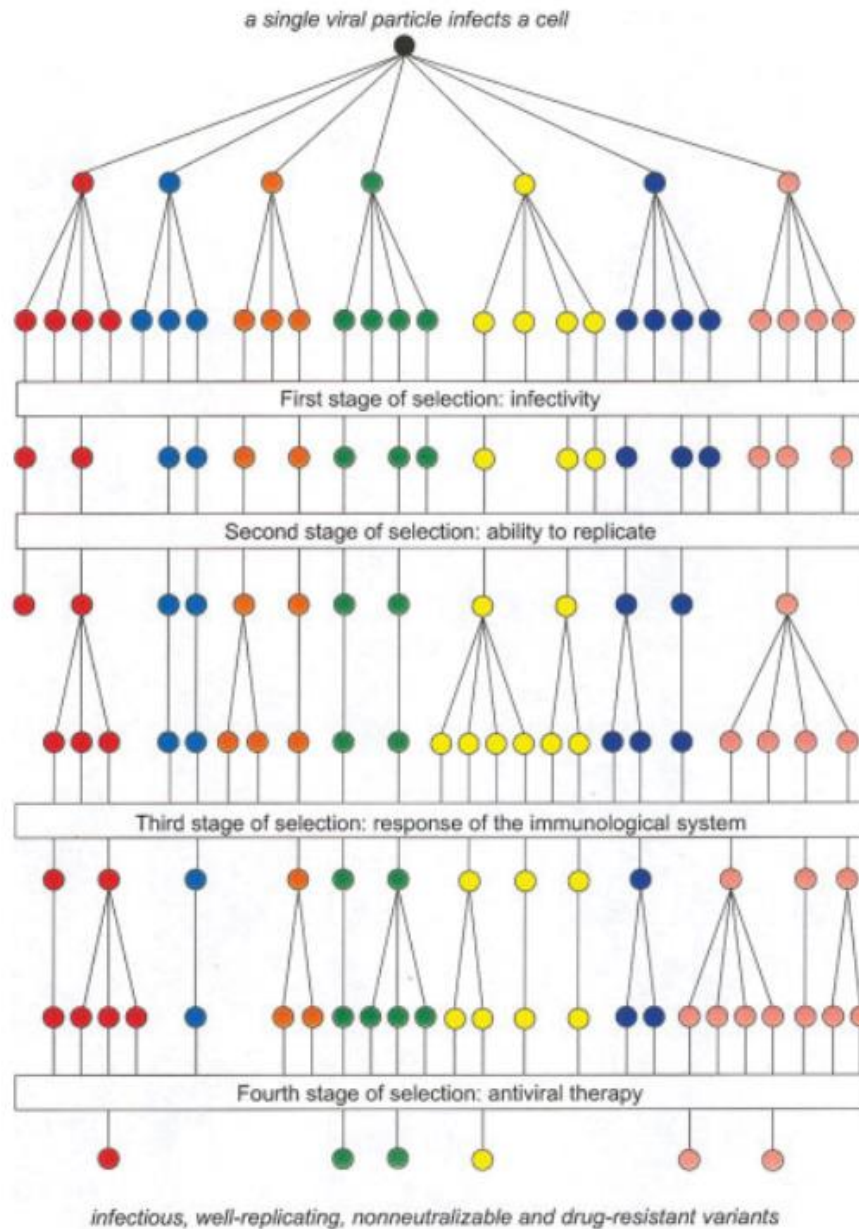
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6797082/>

<https://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev-virology-091919-105900>

<sup>11</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7168509/pdf/MED-23-488.pdf>

<sup>12</sup> <https://academic.oup.com/cid/article/75/1/e545/6563799>

<sup>13</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8494465/>



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7168509/pdf/MED-23-488.pdf>

L'infezione da virus a RNA come complesso esperimento di selezione dell'RNA in vivo. Le infezioni da virus a RNA possono essere confrontate con gli esperimenti di selezione dell'RNA che vengono regolarmente eseguiti in vitro in molti laboratori in tutto il mondo. Durante il primo stadio, una singola particella virale (virus wild-type rappresentato da un punto nero) infetta la cellula e inizia a replicare. Di conseguenza, viene generato un ampio pool di particelle virali molto diversificate (rappresentate da punti di colore). Praticamente ogni virus differisce dall'altro e dalla forma di tipo selvaggio. Quando le particelle virali lasciano la cellula, sono sottoposte alla selezione dall'organismo ospite. Prima di tutto, devono essere contagiosi per entrare in una nuova cella nella prima fase della selezione. Quei virus che sono stati in grado di infettare le nuove cellule devono replicare i loro genomi e produrre progenie. Nell'altro caso, hanno eliminato la seconda fase di selezione. Dopo alcuni giorni, i virus replicati sono sottoposti a selezione dal sistema immunitario ospite. Di conseguenza, i mutanti di evasione immunitaria sono generati nella terza fase della selezione. Infine, il paziente infetto è soggetto a terapia antivirale e solo i mutanti resistenti ai farmaci possono replicare e diffondersi ulteriormente nella quarta fase di selezione. In questo modo, la selezione in quattro fasi genera varianti virali infettive, replicanti, non neutralizzabili e resistenti ai farmaci.

- **POTENZIAMENTO DELLA MALATTIA DIPENDENTE DALL'ANTICORPO**

Nella lotta contro i virus, il sistema immunitario ha due armi principali, i linfociti T citotossici e gli anticorpi neutralizzanti, che svolgono entrambi un ruolo chiave nel controllo delle infezioni virali, soprattutto nel caso

dei virus respiratori. Tuttavia, gli anticorpi virus-specifici possono anche promuovere la patologia, un fenomeno denominato potenziamento dipendente dall'anticorpo (ADE). L'ADE è generalmente dovuto ad anticorpi specifici del virus che facilitano l'ingresso del virus nelle cellule ospiti e, in alcuni casi, aumentano la replicazione del virus nei monociti, nelle cellule dendritiche e nei macrofagi attraverso il legame dell'anticorpo ai recettori Fc, o attraverso meccanismi alternativi che coinvolgono il componente del complemento C1q.

L'ADE è stato osservato in due situazioni tipiche: (a) reinfezione con una variante virale dopo infezione primaria con un ceppo diverso o un virus cross-reattivo, e (b) come risultato di infezione virale in persone vaccinate.

Diversi elementi di prova possono argomentare a favore di un problema di ADE per SARSCoV-2: (a) L'ADE è stata segnalata per coronavirus animali come il virus della peritonite infettiva felina e per la SARS-CoV-1. Negli studi preclinici, gli animali precedentemente vaccinati sono andati incontro a morte prematura dopo il challenge test al coronavirus; (b) Sono stati riscontrati epitopi ADE nei coronavirus umani correlati a SARS-CoV-2, ovvero SARS-CoV-1 e MERS-CoV. Il caso di SARSCoV-1 è particolarmente interessante poiché la sua proteina spike mostra un epitopo ADE lineare, 597-LYQDVNC-603 che è completamente conservato nella sequenza proteica della spike del SARS-CoV-2 utilizzata per i vaccini a mRNA COVID-19<sup>14</sup>

È più probabile che l'ADE si verifichi quando una persona viene vaccinata con un virus o un costrutto genetico che esprime una proteina S con una forma prevalentemente aperta di RBD e poi infettata da un virus con una conformazione prevalentemente chiusa di questa proteina.<sup>15</sup>

### Tipologie di ADE

#### 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.<sup>16</sup>

#### *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

---

<sup>14</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9412366/>  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9230616/>

<sup>15</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7569100/>

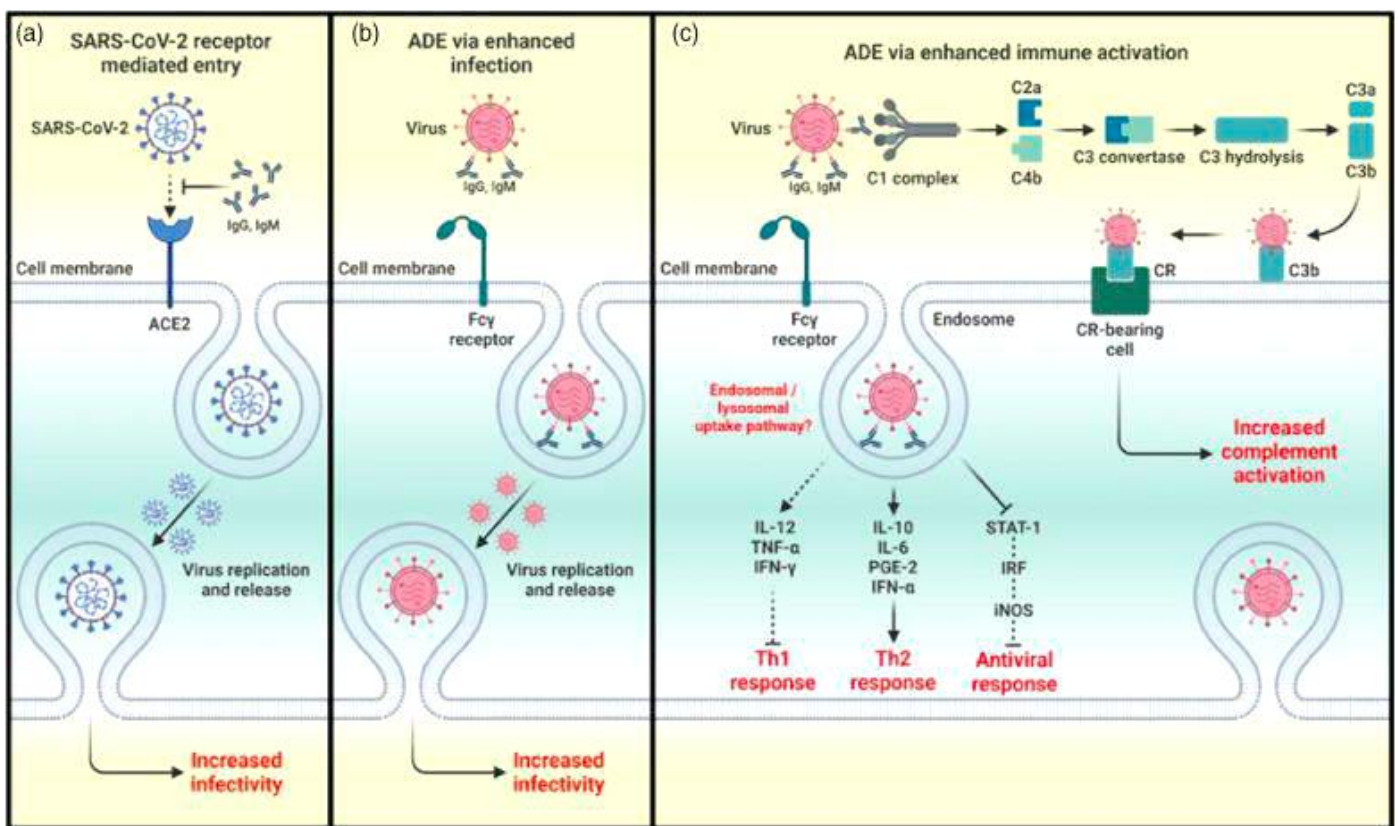
<sup>16</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9548747/>  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8570879/>

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.

*ADE mediata dal complemento*

L'ADE mediata dal complemento (C-ADE) si verifica quando la combinazione di virus e anticorpo forma un complesso immunitario in seguito all'attivazione del complemento, si lega al complemento per formare un complesso (virus-anticorpo-complemento) e quindi entra nella cellula favorendo l'infezione.

Non solo l'ingresso cellulare degli immunocomplessi, ma anche i complessi extracellulari (virus-anticorpo-complemento) possono attivare le vie del complemento attraverso la deposizione nel tessuto delle vie aeree, che induce ulteriormente il reclutamento e l'attivazione di neutrofili, monociti ed eosinofili e stimola la produzione di una serie di citochine pro-infiammatorie. Inoltre, l'attivazione non controllata del complemento contribuisce alla coagulazione intravascolare disseminata (DIC), all'infiammazione, alla morte delle cellule del sistema immunitario, alla paralisi immunitaria e alla fine porta a insufficienza multiorgano e morte.<sup>17</sup>



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

*ADE e mastociti*

I mastociti sono cellule residenti nei tessuti, contenenti mediatori in grado di regolare sia la risposta immunitaria innata che quella adattativa e sono classicamente noti per la loro risposta delle IgE cross-linkate con il recettore FcεR1, 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.

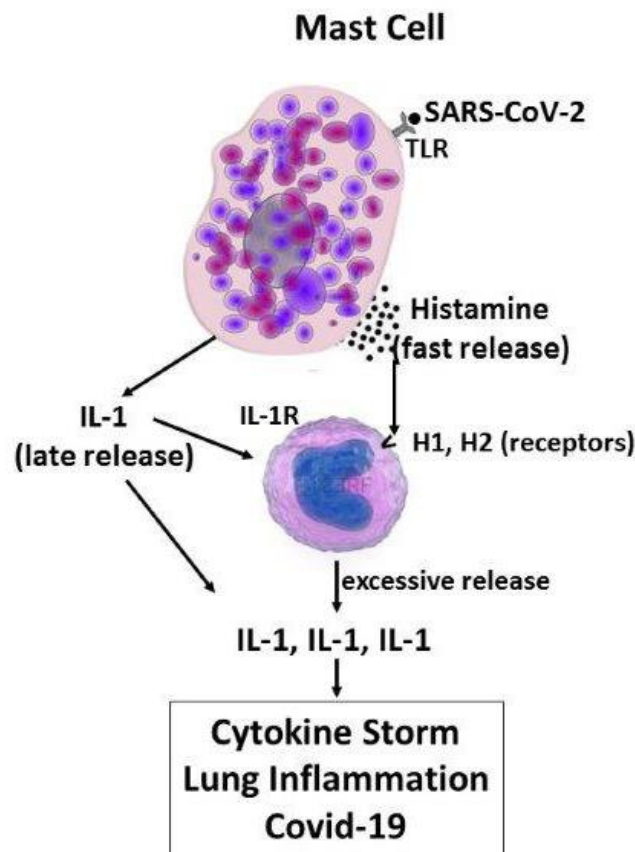
I mastociti hanno due fasi distinte di attivazione: la degranulazione immediata, con conseguente rilascio di mediatori pre-sintetizzati (istamina, TNF-alfa, triptasi e chimasasi, amine), e la secrezione ritardata di mediatori secondari sintetizzati de novo.

<sup>17</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9647202/>

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.<sup>18</sup>



[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](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)

L'attivazione dei mastociti mediata dagli anticorpi, può presentarsi in seguito a varie infezioni e vaccini, ed è stata studiata con maggior attenzione quale meccanismo immunopatologico per la MIS-C (sindrome infiammatoria multisistemica nel bambino) e MIS-A (sindrome infiammatoria multisistemica nell'adulto) come complicazione della COVID-19 58 e dei vaccini anti SARS-Cov-2.

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.

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.

Degno di nota è il coinvolgimento cardiaco con disfunzione miocardica, pericardite, disfunzione valvolare o anomalie coronariche. 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.<sup>19</sup>

<sup>18</sup> <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32945158/>

<sup>19</sup> <https://scionline.org/open-access/etiology-scenarios-for-multisystem-inflammatory-syndrome-in-children-and-adults-associated-with-sars-cov-2.pdf>

## SEQUENZE TOSSICHE DELLA SPIKE

Recentemente è stata riportata l'omologia tra sequenze proteiche della spike del SARS-CoV-2 e neurotossine di origine animale (dai generi *Ophiophagus* (cobra) e *Bungarus*, così come le regioni simili alle neurotossine di tre ceppi di virus della rabbia) note per essere competitori antagonisti ad alta affinità dell'acetilcolina per l' $\alpha 7$ -AChR (recettori nicotinici).

In particolare, l'inserito PRRA con i sette residui che precedono nella sequenza e il successivo R<sub>685</sub> (conservato tra i  $\beta$ -CoV) formano un motivo, Y<sub>674</sub>QTQTNSPRRAR<sub>685</sub>, omologo a quello delle neurotossine dei generi *Ophiophagus* (cobra), *Bungarus*, e RABV.

I peptidi relativi a questa sequenza sono stati riscontrati in campioni di plasma e feci di pazienti COVID-19 e la loro presenza è stata messa in relazione ai sintomi extrapolmonari dei malati COVID e dei casi di long Covid. In particolare, la presenza di peptidi di conotossine potrebbe spiegare l'insorgenza di molti sintomi (come iposmia, ipogeusia e i segni tipici della sindrome di Guillain-Barre) osservati in alcuni pazienti COVID-19. La loro presenza può alterare il normale funzionamento dei canali ionici, dei recettori nicotinici dell'acetilcolina e dei livelli di acetilcolina.<sup>20</sup>

Inoltre, lo studio degli effetti della spike virale e dei peptidi tossici su colture in vitro di cellule nervose staminali pluripotenti ha dimostrato l'alterazione dell'espressione di geni critici per lo sviluppo del sistema nervoso e la diminuzione dell'attività elettrica spontanea.<sup>21</sup>

Da un'analisi bioinformatica più approfondita, è emerso che lo stesso segmento ha una stretta somiglianza con il motivo SAg (Superantigene) da F<sub>164</sub> a V<sub>174</sub> della glicoproteina HIV-1 gp120 e c'è un'omologia di sequenza tra il frammento T<sub>678</sub> e Q<sub>690</sub> della spike del SARS-Cov2 e il peptide superantigenico SEB T<sub>150</sub>NKKKATVQELD<sub>161</sub>. Questa sequenza dodecapeptidica mostra una forte conservazione in un'ampia gamma di SAg stafilococciche e streptococciche.

Il SEB (staphylococcal enterotoxins B) consente l'attivazione e la proliferazione diffusa delle cellule T, con conseguente produzione massiccia di citochine proinfiammatorie tra cui IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL-2 dalle cellule T, nonché IL-1 e TNF $\alpha$  dalle cellule che presentano l'antigene. Questa tempesta di citochine porta a danni multiorgano come quelli che si osservano nella MIS-C.

I risultati suggeriscono che la sindrome iperinfiammatoria abbia origine dall'attività superantigenica della glicoproteina S del SARS-CoV-2, e sollevano la possibilità che l'iperinfiammazione osservata nei casi gravi di COVID-19 negli adulti possa essere attivata anche dall'azione SAg-like della proteina S.<sup>22</sup>

## SPIKE E FORMAZIONE DI SINCIZI

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.

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.

La spike del SARS-CoV-2 può fondere le cellule anche se il virus non è infettivo, o se la spike è incorporata nelle vescicole extracellulari (esosomi) rilasciate dalle cellule infette.

Questo meccanismo è noto come fusione dall'esterno, 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 dal SARS-CoV-2, la loro origine potrebbe essere difficile da rintracciare. Ciò significa anche che le vescicole extracellulari prodotte nei pazienti con COVID-19 possono essere in grado di formare sincizi sia

---

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

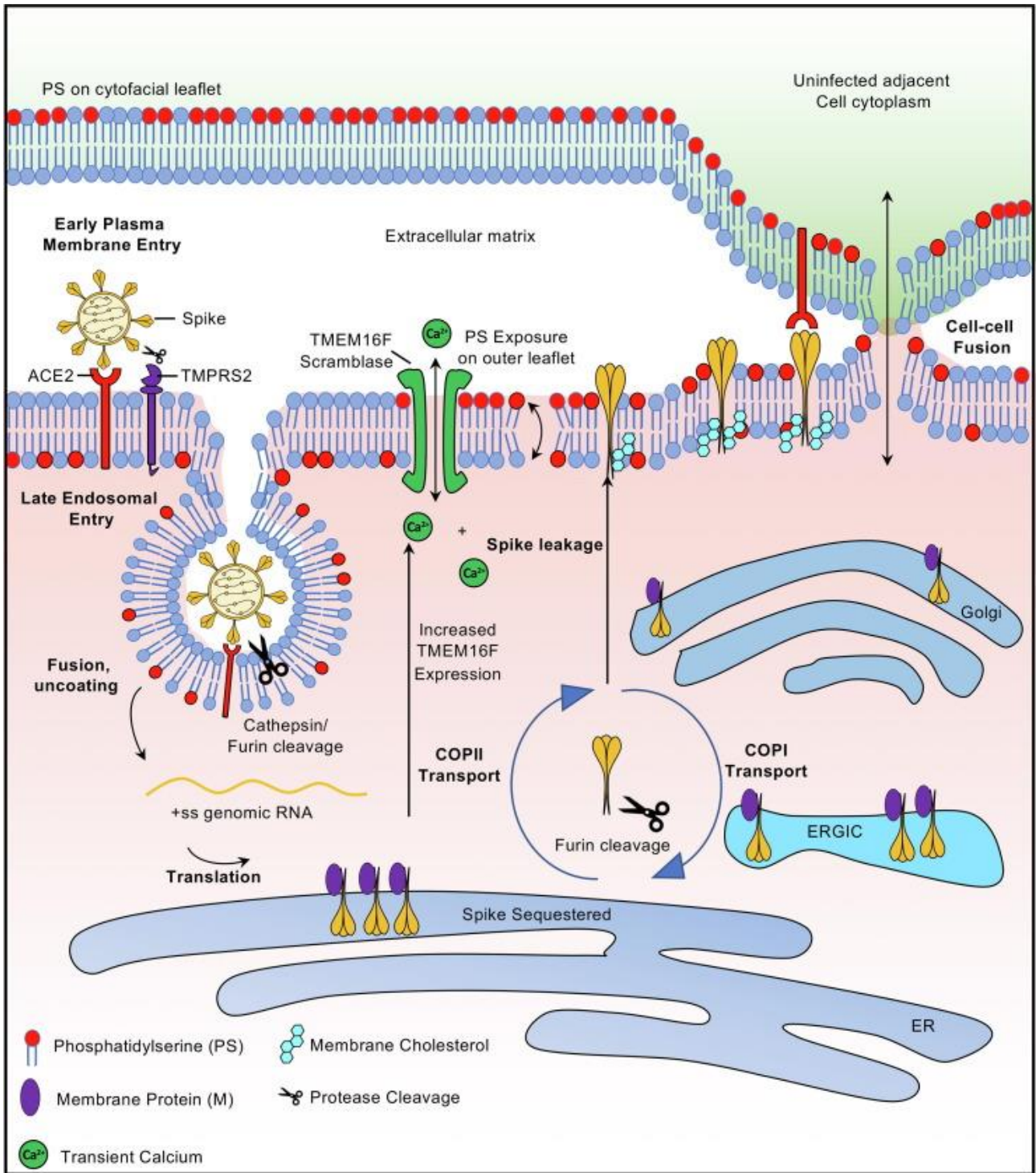
<sup>20</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8772524/>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9855837/>

<sup>21</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9068247/>

<sup>22</sup> <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.2010722117>

localmente, fondendo le cellule infette, sia da remoto tramite gli esosomi che trasportano la spike anche nei tessuti che non sono infettati dal virus.<sup>23</sup>



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8485708/>

Rappresentazione schematica delle diverse attività della proteina SARS-CoV-2 Spike (S) durante l'infezione e la formazione di sincitio. L'infezione virale inizia quando la proteina S sulla superficie del virione interagisce con il recettore ACE2. Durante l'ingresso precoce, la proteina S viene elaborata dalla proteasi TMPRSS2 e dalla fusione con la membrana plasmatica (PM). La proteina S può anche fondersi con membrane endosomiali durante l'ingresso tardivo, dopo essere stata innescata da catepsine e furina. L'RNA genomico virale a filamento singolo a filamento positivo (+SS) viene

<sup>23</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8485708/>

depositato nel citoplasma e tradotto. La replicazione e la trascrizione dell'RNA virale si verificano sulle membrane. Dopo essere stata tradotta, la proteina S viene traslocata e inserita nel reticolo endoplasmatico (ER) ed è generalmente sequestrata all'interno delle membrane intracellulari dalla proteina strutturale di membrana (M). L'espressione della proteina S porta a fluttuazioni del calcio intracellulare e alla maggiore espressione della scramblasi TMEM16F. La TMEM16F espone la fosfatidilserina (PS) dal lato citoplasmatico della PM al lato esterno. La proteina S tradotta viene elaborata dalla furina e trasportata in tutta la rete ER-Golgi. Durante il trasporto COPI (retrogrado) e COPII (anterograde), le perdite della proteina S possono verificarsi dalle vescicole (non mostrate nello schema semplificato). La proteina S viene quindi traslocata nella PM, dove si associa ai colesteroli, e induce la formazione di sincitia interagendo con i recettori sulle cellule non infette vicine. La proteina S sequestrata è assemblata in virioni che si muovono nel compartimento intermedio Golgi o ER-Golgi (ERGIC) e i virioni escono dalla cellula attraverso l'esocitosi deacidificata del lisosoma (non mostrato). Le membrane ER, Ergic e Golgi sono doppi strati che sono rappresentati come linee singole in questo schema.

Nel caso del SARS-Cov-2, la spike è stata rilevata nel cervello di pazienti deceduti con COVID-19, e considerando l'efficienza con cui la spike fonde le cellule 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.

È stato 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, compresi i cardiomiociti.<sup>24</sup>

Poiché i vaccini Covid ad oggi utilizzati mantengono in parte le proprietà fusogeniche della spike virale, e si riscontrano in circolo esosomi che trasportano la spike vaccinale, è ipotizzabile che vari tipi di danni da vaccino possano essere innescati anche da questo meccanismo.<sup>25</sup>

## PROPRIETA' PRIONICHE

È ampiamente riconosciuto che il ripiegamento errato delle proteine prioniche umane e delle proteine simili a prioni svolge un ruolo causale in un numero ampio e crescente di malattie neurodegenerative. È stato dimostrato da diversi studi che la proteina spike di SARS-CoV-2 contiene sequenze amminoacidiche estese precedentemente stabilite come caratteristiche di una proteina simil-prionica. Ciò suggerisce che la produzione di proteine spike indotta dal vaccino comporti la presenza di spike simil-prionica con sue le conseguenze patologiche quali la neuroinfiammazione, le malattie neurodegenerative e i disturbi della coagulazione all'interno del sistema vascolare.<sup>26</sup>

Uno studio che ha valutato il potenziale amiloidogenico della proteina spike ha utilizzato metodi sia teorici che sperimentali per verificare se la proteina spike SARS-CoV-2 poteva causare la comparsa di fibrille simili all'amiloide dopo che la proteina veniva sottoposta a proteolisi. Le previsioni teoriche hanno identificato sette sequenze potenzialmente amiloidogeniche all'interno della proteina spike. In esperimenti di laboratorio in cui la proteina è stata incubata con la proteasi neutrofila elastasi, sono comparse fibrille simili all'amiloide durante 24 ore di coincubazione. Un segmento specifico, spike 194-213 (FKNIDGYFKI) era molto abbondante dopo sei ore e si sovrapponeva quasi completamente alla sequenza più amiloidogenica identificata teoricamente. I neutrofili che rispondono all'attivazione immunitaria rilasciano elastasi neutrofila nel mezzo, dove avrebbe accesso alla proteina spike e sarebbe in grado di scomporla nei segmenti amiloidogenici.<sup>27</sup>

I corpi di Lewy sono aggregati di proteine che si accumulano nel cervello in associazione con il morbo di Parkinson e altre malattie neurodegenerative. Uno studio pubblicato nel 2022 ha scoperto sperimentalmente che la proteina spike interagisce con le proteine amiloidogeniche, in particolare l' $\alpha$ -sinucleina, un fattore

---

<sup>24</sup> <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34613786/>

<https://www.nature.com/articles/s41418-021-00782-3>

<sup>25</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8664391/>

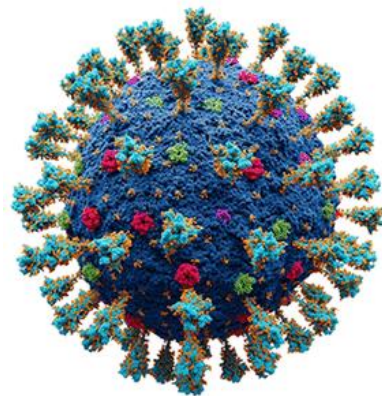
<sup>26</sup> <https://www.authorea.com/users/455597/articles/582067-sars-cov-2-spike-protein-in-the-pathogenesis-of-prion-like-diseases>

<sup>27</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9136918/>

causale nella malattia di Parkinson (Mdp), e induce una patologia simile al corpo di Lewy in una linea cellulare.<sup>28</sup>

Un documento in preprint con co-autore il prof. Montagnier descrive 26 casi di pazienti con sintomi gravi di CJD poco dopo un vaccino COVID-19. 23 casi su 26 hanno sviluppato sintomi entro 15 giorni dalla seconda iniezione di un vaccino a mRNA. Gli altri tre casi sono stati associati al vaccino AstraZeneca a vettore adenovirale e i sintomi sono comparsi entro il primo mese. Dei 26, 20 erano morti al momento della stesura del documento, e i restanti 6 erano in condizioni critiche. Il tempo medio alla morte era inferiore a cinque mesi dopo l'iniezione.<sup>29</sup>

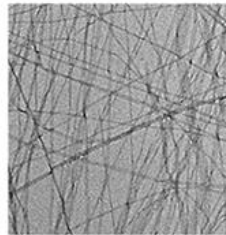
Inoltre, nei pazienti con COVID-19 è stata segnalata la coagulazione del sangue associata ad aggregati fibrillari amiloidosi extracellulari nel flusso sanguigno. L'ipercoagulazione/fibrinolisi alterata è stata dimostrata nel plasma sanguigno di donatori sani addizionati sperimentalmente con proteina S.<sup>30</sup>



Coronavirus Spike Peptide  
RSAIEDLLFDKV



Amyloid



Hydrogel



<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnano.1c10658>

<sup>28</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8949667/>

<sup>29</sup> [10.5281/zenodo.6641998](https://zenodo.org/record/6641998)

<sup>30</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8380922/>

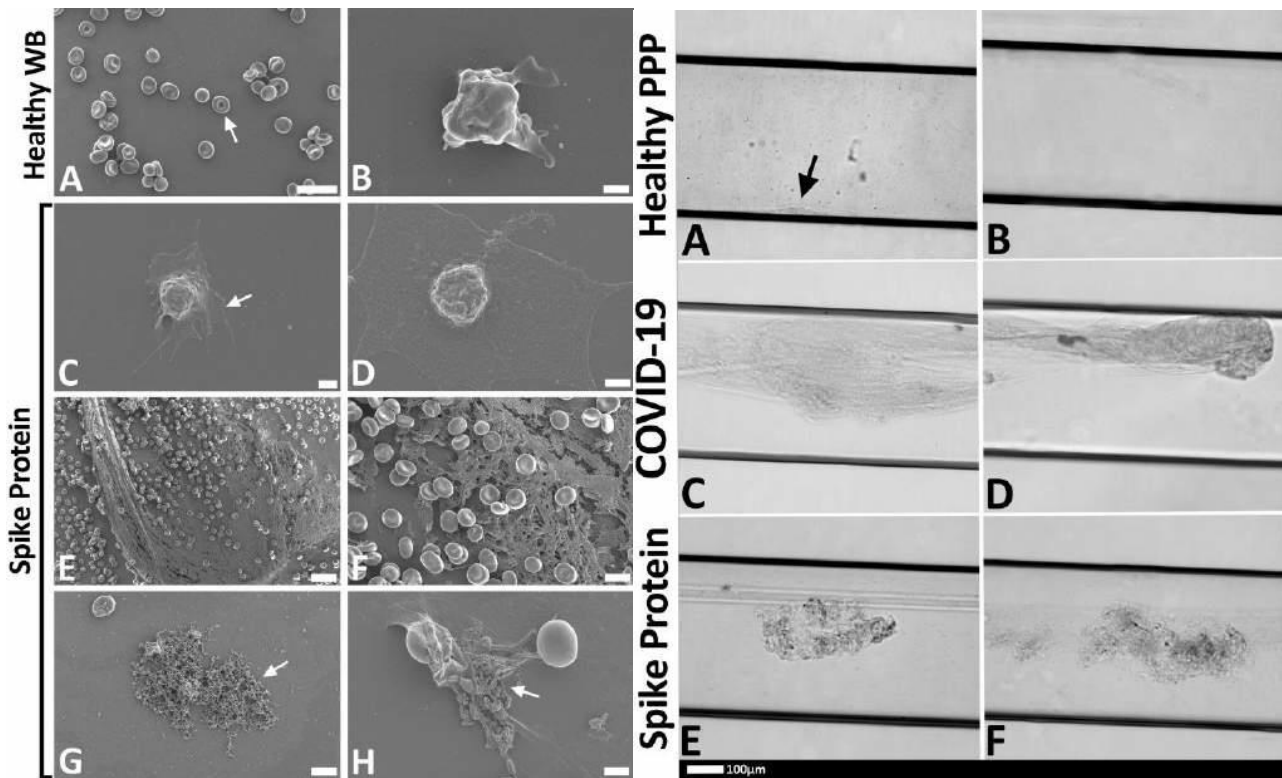


Fig. 1

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

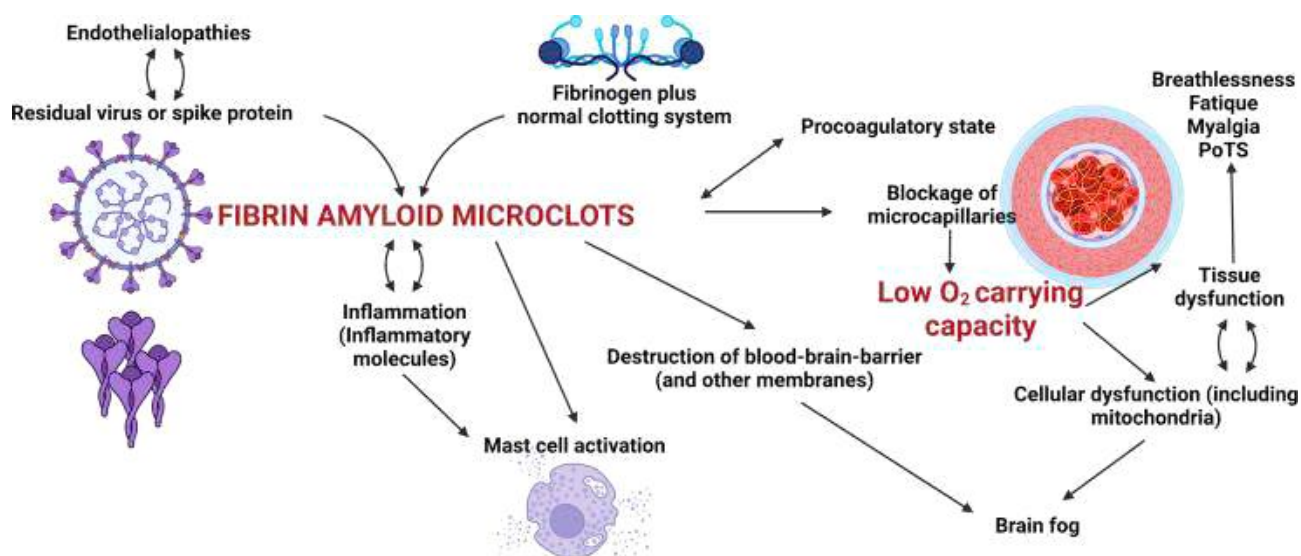
(A–H) Micrografie elettroniche a scansione rappresentative di un controllo sano del WB, con e senza proteina spike. (A, B) Strisci sani di WB, con una freccia che indica la normale ultrastruttura degli eritrociti. (C-H) WB sano esposto a proteina spike (1 ng.ml<sup>-1</sup> concentrazione finale), con (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.

Il fibrinogeno nel sangue può coagularsi in una forma anomala di fibrina "amiloide" che (come altri amiloidi e prioni β-ricchi) è relativamente resistente alla proteolisi (fibrinolisi). 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.

Un'altra caratteristica della COVID-19 sono i livelli estremamente elevati di attivazione delle piastrine dovuti alla disregolazione della P-selectina (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), e all'iperferritinemia.

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.



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8883497/>

La differenza tra l'mRNA del vaccino e il genoma virale riguardo la capacità di formare spike in forma prionica è correlata alla fase di "ottimizzazione del codone" dell'mRNA vaccinale. Questa modificazione genetica consiste nella sostituzione dei codoni codificanti per gli aminoacidi utilizzati dal virus con altri più efficienti nell'assemblaggio delle proteine. Nel caso dei vaccini a mRNA in commercio i codoni più efficienti contengono in media più guanine rispetto ad altri codoni.

I nucleotidi guaninici, quando sono arricchiti nella sequenza nucleotidica, sono talvolta in grado di configurarsi in una struttura terziaria chiamata "G quadruplex" (G4), ed è noto che l'mRNA della proteina prionica umana contiene più motivi che formano G4, i quali possono svolgere un ruolo critico nel far assumere alla proteina prionica una conformazione patologica.<sup>31</sup>

La sequenza nucleotidica originale nella versione virale dell'mRNA della proteina spike ha il potenziale per formare quattro motivi G4, mentre la versione Pfizer ha il potenziale per produrne nove e la versione Moderna può formarne 19,<sup>32</sup> a conferma del maggior rischio di formazione di spike vaccinale in forma prionica patologica.

## DANNI ENDOTELIALI

È stato suggerito da diversi studi che il danno endoteliale è una parte centrale della patologia SARS-CoV-2 che può essere indotta dalla sola proteina S. Infatti, l'iniezione endovenosa (iv) della subunità S1 nei topi ha determinato la sua localizzazione nell'endotelio dei microvasi cerebrali dei topi che mostrano colocalizzazione con ACE2, caspasi-3, IL-6, fattore di necrosi tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e C5b-9. Inoltre, la subunità S1 (o S1 RBD ricombinante) è stata in grado di compromettere la funzione endoteliale attraverso la sottoregolazione dell'ACE2 e di indurre la degradazione delle proteine giunzionali che mantengono l'integrità della barriera endoteliale in un modello murino di cellule endoteliali microvascolari cerebrali o arterie cerebrali. Allo stesso modo, la subunità S1 ha diminuito la resistenza transendoteliale microvascolare e la funzione di barriera nelle cellule polmonari umane in coltura e ha interrotto la funzione dei periciti cardiaci umani, innescando un aumento della produzione di fattori proapoptotici nei periciti, causando la morte delle cellule endoteliali.

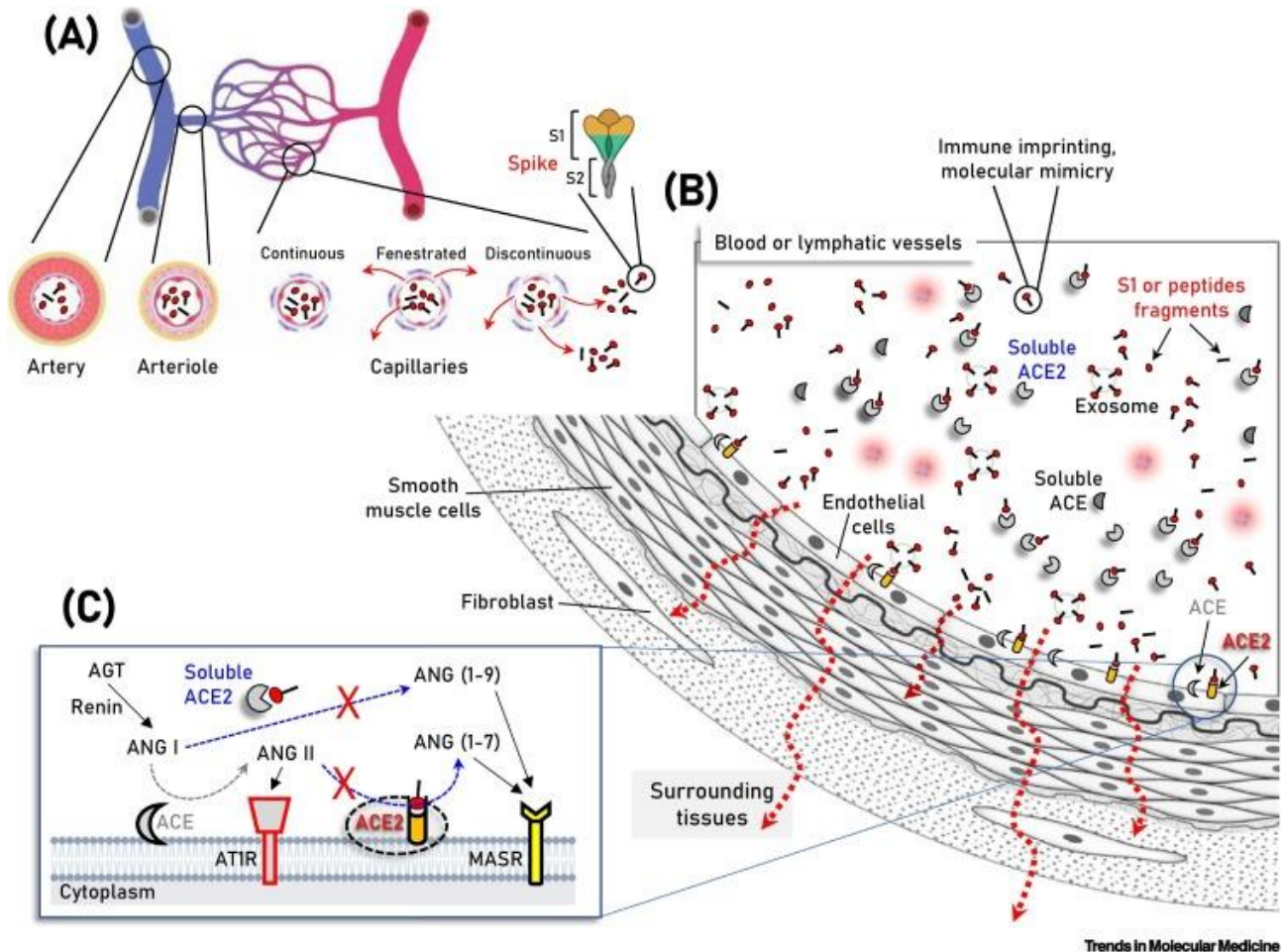
La potenziale interazione a livello dell'intero organismo della proteina S nativa e/o delle subunità/frammenti peptidici con ACE2 solubile o attaccato alla membrana cellulare può promuovere l'internalizzazione e la degradazione dell'ACE2. A sostegno di questo, è stato dimostrato che l'ACE2 solubile induce l'endocitosi mediata dal recettore del SARS-CoV-2 attraverso l'interazione con le proteine correlate al RAS. La perdita prolungata o la ridotta attività di ACE2 possono provocare un'ampia destabilizzazione del RAS che può quindi

<sup>31</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4132711/>

<sup>32</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9012513/>

<https://osf.io/bcsa6/>

innescare vasocostrizione, aumento dell'infiammazione e/o trombosi a causa di effetti mediati da ACE e angiotensina-2 (ANG II) incontrastati. Infatti, la diminuzione dell'espressione e/o dell'attività di ACE2 contribuisce, tra le altre cose, allo sviluppo dell'ipertensione mediata da ANG II nei topi, indicando una disfunzione vascolare. Questi effetti, specialmente nei letti capillari, e la presenza prolungata dell'antigene nella circolazione, insieme all'eccessiva risposta immunitaria sistemica all'antigene, possono quindi innescare un'infiammazione prolungata che può danneggiare l'endotelio, interrompendo le sue proprietà antitrombogene in più letti vascolari.<sup>33</sup>



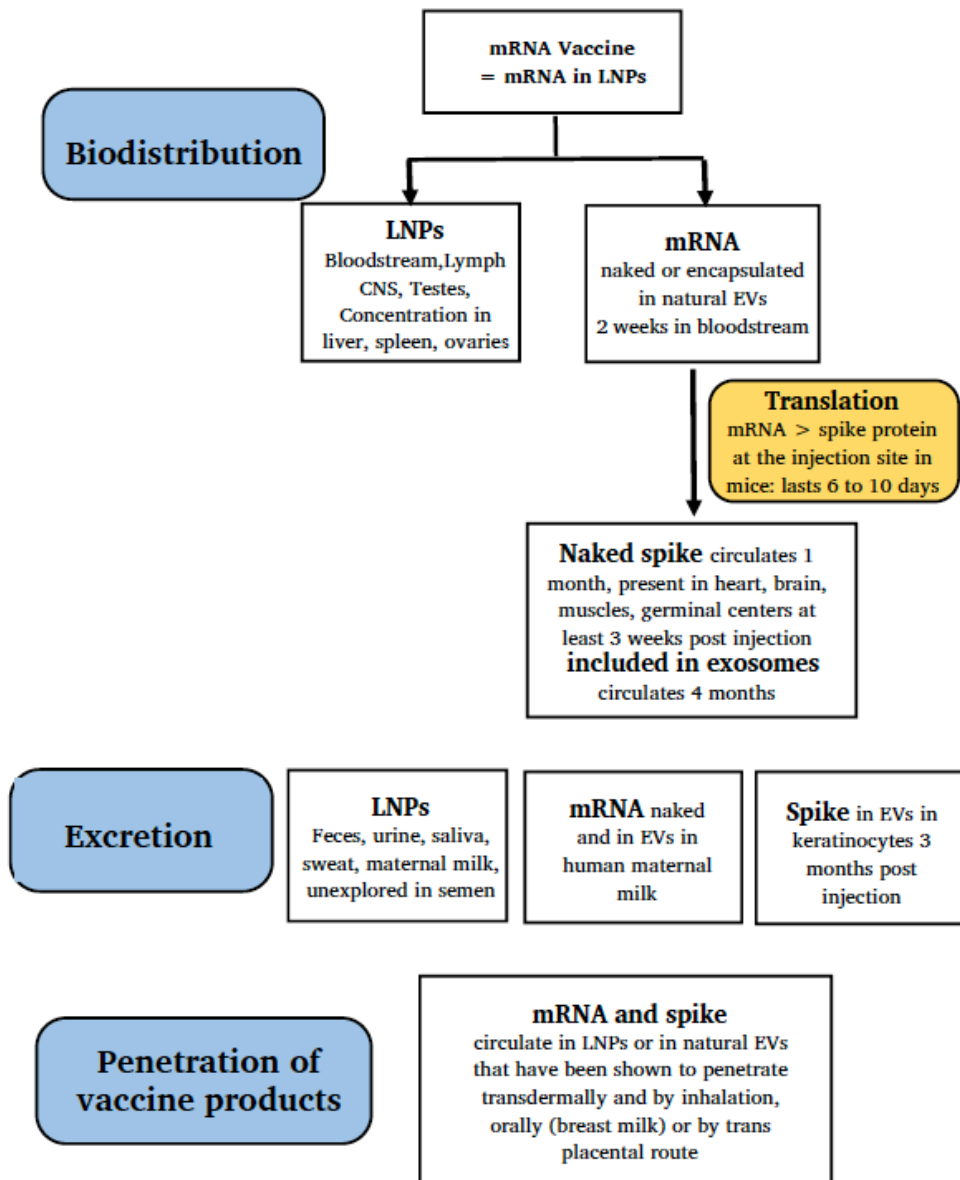
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9021367/>

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) solubile o legato alla membrana delle cellule 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. 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 vie antifibrotiche, antinfiammatorie e vasodilatazione. Vengono mostrati anche moduli aggiuntivi del RAS (cioè renina e angiotensinogeno, AGT). Abbreviazione: AT1R, recettore dell'angiotensina II tipo 1.

<sup>33</sup> <https://www.mdpi.com/2227-9059/11/2/451>

Dopo la vaccinazione, una cellula può presentare la proteina S prodotta (o le sue subunità/frammenti peptidici) per mobilitare risposte immunitarie o essere distrutta dal sistema immunitario (ad esempio, mediante le cellule T citotossiche). Di conseguenza, i detriti prodotti, o anche la secrezione diretta (compresa la diffusione) dell'antigene da parte delle cellule trasfettate, possono rilasciare in circolo grandi quantità della proteina S o delle sue subunità/frammenti peptidici. Gli LNP (liposomi) contenenti mRNA del vaccino anti-SARS-CoV-2 vengono iniettati nel muscolo deltoide ed esercitano un effetto nel tessuto muscolare stesso, nel sistema linfatico e nella milza, ma possono anche localizzarsi nel fegato e in altri tessuti da cui la proteina S o le sue subunità/frammenti peptidici possono entrare in circolo e distribuirsi in tutto il corpo. 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 del vaccino. Secondo quanto riferito, la clearance dell'antigene è correlata con la produzione di immunoglobuline antigene-specifiche o può rimanere in circolo (ad es. negli esosomi) per periodi più lunghi, Pertanto, è probabile che vi sia un'ampia gamma di interazioni attese tra proteina S fluttuante/subunità/frammenti peptidici e ACE2 circolante nel sangue (o linfatico), o ACE2 espresso nelle cellule di vari tessuti/organi.<sup>34</sup>



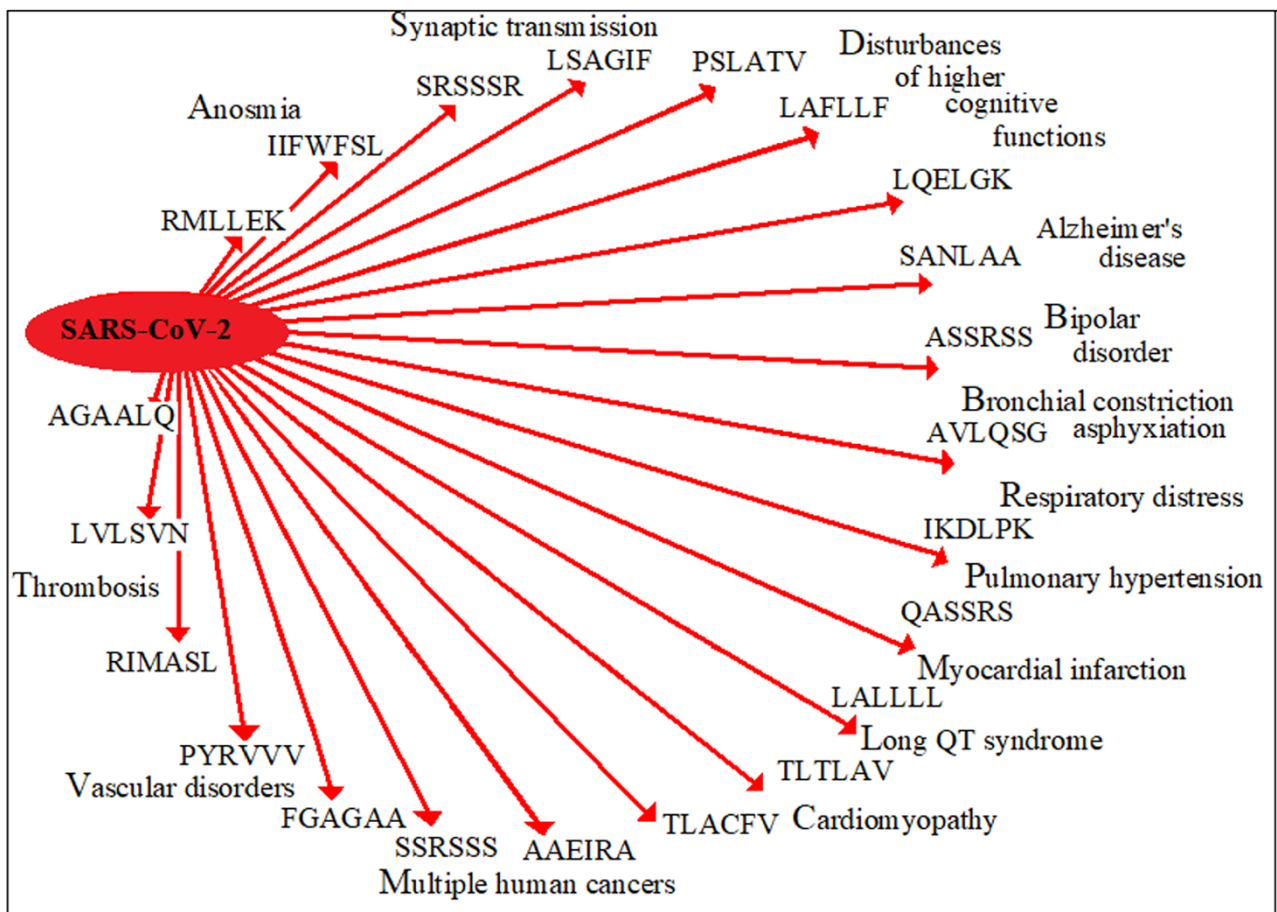
<sup>34</sup> <https://www.mdpi.com/2227-9059/11/2/451>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9021367/>

## MIMETISMO MOLECOLARE

La proteina Spike presenta alcuni motivi comuni con le proteine umane, tra cui un tratto di cinque amminoacidi (TQLPP) con proprietà antigeniche che sono omologhe con una sequenza trovata nella trombopoietina, e il motivo ELDKY che è condiviso con la tropomiosina e con la proteina Kinasi cGMP-dipendente di tipo 1 (PRKG1), una chinasi coinvolta nell'attivazione piastrinica e nella regolazione del calcio. Il mimetismo molecolare è uno dei meccanismi ipotizzati per spiegare lo sviluppo della malattia autoimmune. Una preoccupazione importante è se la vaccinazione mRNA per la produzione della proteina Spike possa determinare una rottura nella tolleranza e lo sviluppo di una malattia autoimmune a causa del mimetismo molecolare. Il rischio aumenta con somministrazioni frequenti e ravvicinate del vaccino, che sfidano lo stato immunogenico rispetto a quello tollerogenico del sistema immunitario.<sup>35</sup>

In questa condizione, le citochine proinfiammatorie possono alterare il controllo dei circuiti immunoregolatori in modo che le cellule T autoreattive possono diventare efficaci e innescare l'autoimmunità. Inoltre, le "omologie" tra la proteina Spike e le proteine umane sono molto maggiori che per altri virus e batteri, aumentando il rischio di sviluppare malattie autoimmuni.<sup>36</sup>



<https://www.mdpi.com/2073-4468/9/3/33>

La questione delle interazioni tra il sistema immunitario e ACE2 (o altri recettori del virus) è ulteriormente complicata se si considera che il sistema immunitario è complesso e dinamico.

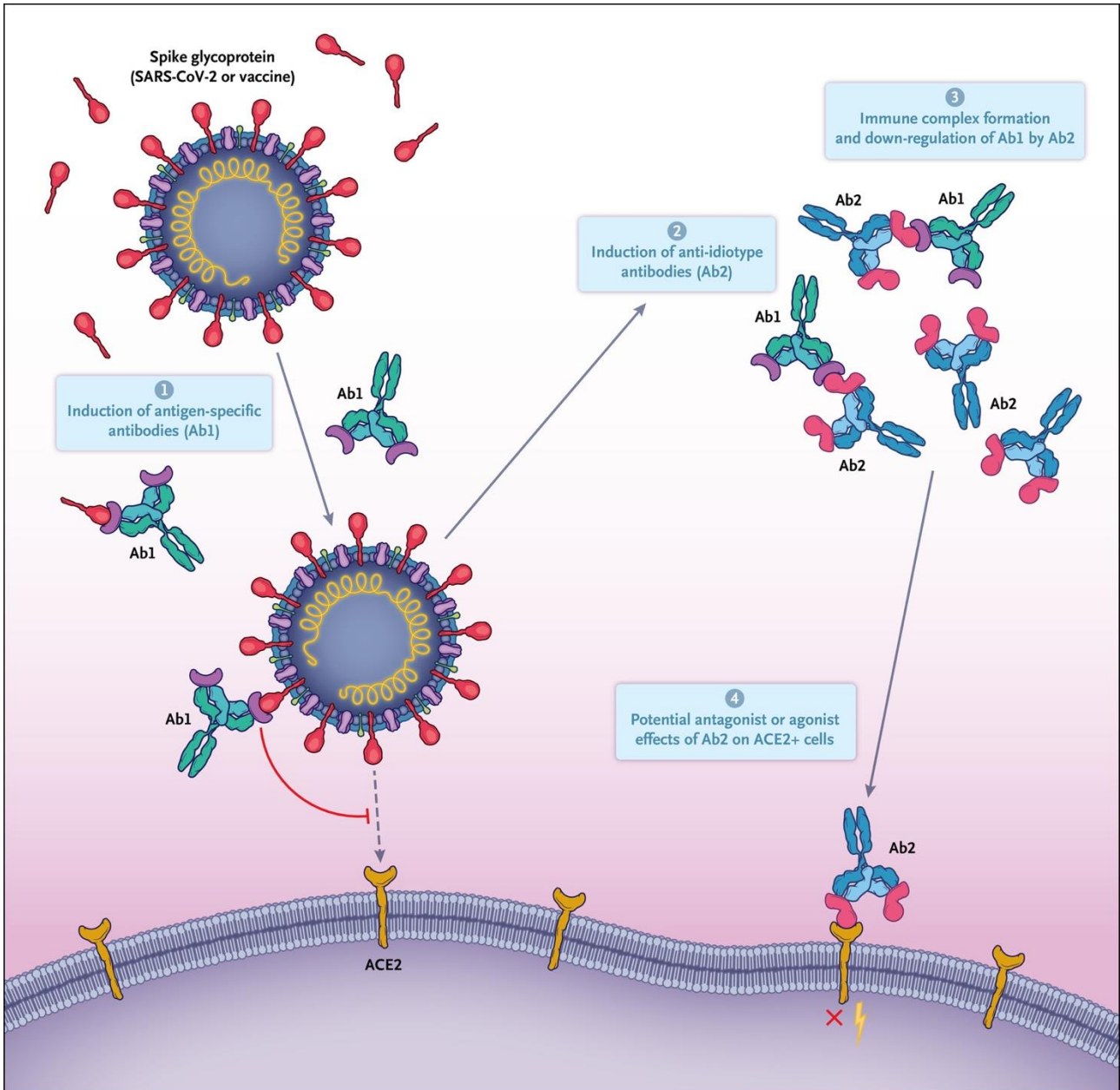
Ad esempio, la formazione di anticorpi e linfociti anti-idiotipo è una possibile spiegazione della persistenza dei sintomi tipici del COVID-19 anche dopo che il virus è stato eliminato dall'organismo. Infatti, gli anticorpi

<sup>35</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9318917/>

<sup>36</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7551747/>

anti-idiotipo (Ab2 nella Figura seguente), che riflettono l'epitopo Spike, possono legarsi ad ACE2 o strutture simili e causare la reazione fisiopatologica del long Covid.

Questo fenomeno può verificarsi con l'infezione da SARS-CoV-2 così come con i vaccini anti-COVID-19, spiegando almeno in parte la persistenza di reazioni avverse in alcuni individui. È stato anche suggerito che gli anticorpi anti-idiotipo potrebbero legarsi alla neuropilina-1, che è riconosciuta dalla Spike del virus SARS-CoV-2, e questo potrebbe spiegare alcuni effetti avversi neurologici come la neuropatia periferica che insorge dopo la vaccinazione con BNT162b2.<sup>33, 37</sup>



<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34818473/>

Per riassumere, i meccanismi attraverso i quali la proteina Spike libera può agire nei sistemi viventi sono elencati nella Tabella seguente.<sup>33</sup>

<sup>37</sup> <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34818473/>

Molecular Mechanisms	Pathogenic Mechanisms	Possible Clinical Effects
Spike-ACE2	Platelet hyperreactivity and aggregation	Thrombosis
Spike-ACE2	Human endothelial cell activation and pro-inflammatory phenotype	Inflammation, thrombosis
Spike-ACE2	Inhibition of hematopoietic stem cells differentiation	Immunosuppression
Spike (S1)-ACE2	Intratracheal S1 subunit of Spike protein in hACE2 transgenic mice that overexpress human ACE2	Lung vascular permeability and lung injury
Spike-ACE2	Mast cell activation	Lung inflammation and injury
Spike-ACE2	Oxidative stress in pericytes, activation of nuclear factor-kappa-B signaling pathways	Encephalitis
Spike-ACE2	Down-regulation of endothelial ACE2 and e-NOS, mitochondrial damage	Interstitial pneumonia
Spike-ACE2	Decrease of type I interferons in lung primary cells	Severity of pneumonia
Spike (S1)-ACE2	S1 subunit co-localized with caspase-3, ACE2, IL6, TNF $\alpha$ , and C5b-9 (mice brain endothelia)	Inflammation and neuropathology
Spike (S1)-ACE2	S1 subunit elicits MEK/ERK pathway cell signaling in lung vascular cells.	Pulmonary vascular wall thickening, pulmonary hypertension
Spike-ACE2	Decrease of taste buds of rat circumvallate papillae	Taste disorders
Spike-ACE2	Loss of integrity of the human brain-blood barrier	Pro-inflammatory response on brain
Spike (S1)-ACE2	Loss of integrity of human pulmonary arterial endothelial cells	Pro-inflammatory response on lung
Spike-sACE2-antibodies	Soluble ACE2 internalization and clearance	Hypertensive crisis, inflammation, bradykinin storm
Spike-CD147	Cell signaling in human cardiac pericytes, secretion of cytokines, apoptosis	Cardiac microvascular damage
Spike-CD147	Cell signaling in human platelets	Thrombosis, inflammation

Molecular Mechanisms	Pathogenic Mechanisms	Possible Clinical Effects
Spike-ACE2	Platelet hyperreactivity and aggregation	Thrombosis
Spike-ACE2	Human endothelial cell activation and pro-inflammatory phenotype	Inflammation, thrombosis
Spike-ACE2	Inhibition of hematopoietic stem cells differentiation	Immunosuppression
Spike (S1)-ACE2	Intratracheal S1 subunit of Spike protein in hACE2 transgenic mice that overexpress human ACE2	Lung vascular permeability and lung injury
Spike-ACE2	Mast cell activation	Lung inflammation and injury
Spike-ACE2	Oxidative stress in pericytes, activation of nuclear factor-kappa-B signaling pathways	Encephalitis
Spike-ACE2	Down-regulation of endothelial ACE2 and e-NOS, mitochondrial damage	Interstitial pneumonia
Spike-ACE2	Decrease of type I interferons in lung primary cells	Severity of pneumonia
Spike (S1)-ACE2	S1 subunit co-localized with caspase-3, ACE2, IL6, TNF $\alpha$ , and C5b-9 (mice brain endothelia)	Inflammation and neuropathology
Spike (S1)-ACE2	S1 subunit elicits MEK/ERK pathway cell signaling in lung vascular cells.	Pulmonary vascular wall thickening, pulmonary hypertension
Spike-ACE2	Decrease of taste buds of rat circumvallate papillae	Taste disorders
Spike-ACE2	Loss of integrity of the human brain-blood barrier	Pro-inflammatory response on brain
Spike (S1)-ACE2	Loss of integrity of human pulmonary arterial endothelial cells	Pro-inflammatory response on lung
Spike-sACE2-antibodies	Soluble ACE2 internalization and clearance	Hypertensive crisis, inflammation, bradykinin storm
Spike-CD147	Cell signaling in human cardiac pericytes, secretion of cytokines, apoptosis	Cardiac microvascular damage
Spike-CD147	Cell signaling in human platelets	Thrombosis, inflammation
Spike-PAF	Augmentation of in vitro PAF-induced platelet aggregation and stimulation of U-937 (myeloid lineage) PAF production	Inflammatory syndromes, long COVID-19
Molecular mimicry	Cross-reaction of anti-Spike antibodies with pericardium	Pericarditis
Molecular mimicry	Cross-reaction of anti-Spike antibodies with thrombopoietin and with tropomyosin	Thrombocytopenia, myocarditis
Spike-autoantibody	Thyroid inflammation	Subacute thyroiditis
Spike-PF4 interaction	Generation of anti-PF4 antibodies and binding to platelet ACE2	Thrombosis with thrombocytopenia
Anti-PF4 antibodies	Platelet activation and aggregation	Thrombosis with thrombocytopenia
Anti-idiotypic	Anti-idiotypic (Ab2) would bind to ACE2 and/or to neuropilin-1	COVID-19-like symptoms
Gene expression	Decrease of ACE2 and increase of ACE	Inflammation, myocarditis
Spike-TLR4	The S protein triggers TLRs and induces inflammatory cytokines	Worsening of inflammatory reactions
Immune imprinting	Vaccine immune memory against S protein of the original variant inhibits the response to new epitopes of SARS-CoV-2	Increased susceptibility to COVID-19 variants

<https://www.mdpi.com/2227-9059/11/2/451>

Meccanismi molecolari, cellulari e immunologici degli effetti patogeni della proteina Spike libera. Una sinossi degli studi che riportano i possibili effetti clinici e i meccanismi sottostanti, causati dall'espressione della proteina Spike codificata

da SARS-CoV-2 o dal vaccino a mRNA. I meccanismi includono l'interazione molecolare della proteina S con peptidi legati alla membrana o solubili (ad es. ACE2, sACE2, CD147, PAF, PF4, TLR), il mimetismo molecolare, l'induzione di autoanticorpi e di anticorpi anti-idiotipo, espressione genica alterata, splicing alternativo e printing immunitario. PAF, fattore di attivazione piastrinica; PF4, Fattore piastrinico 4; TLR, recettore Toll-like