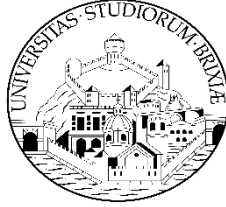


UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BRESCIA

Dipartimento di Medicina Molecolare e Traslazionale



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI BRESCIA**

**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOMEDICHE E MEDICINA
TRASLAZIONALE**

Settore Scientifico Disciplinare: Med/07

CICLO XXXV

**Valutazione della risposta umorale e cellulo-mediata contro SARS-CoV-2
evocata dal vaccino Pfizer mRNA BNT162b2 in pazienti immunosoppressi**

Dott.ssa Federica Filippini

Tutor: Chiar.mo Prof. Arnaldo Caruso

Coordinatore del Dottorato: Chiar.ma Prof.ssa Maria Cristina Missale

2021/2022

INDICE

RIASSUNTO

INTRODUZIONE

- Coronavirus
- SARS-CoV-2
 - Struttura genomica
 - Proteina di superficie (S)
 - Proteina dell'involucro (E)
 - Proteina di membrana (M)
 - Proteina del nucleocapside (N)
 - Ciclo replicativo di SARS-CoV-2 nella cellula ospite
 - Patogenesi
 - Trasmissione del virus e misure di prevenzione
 - Quadro clinico da COVID-19
 - Risposta immunitaria dell'ospite all'infezione da SARS-CoV-2
 - Caratterizzazione immunopatologica dei pazienti COVID-19 e meccanismi di evasione dell'immunità innata di SARS-CoV-2
 - Diagnosi di infezione da COVID-19
 - Farmaci utilizzati contro l'infezione da SARS-CoV-2
 - Ab monoclonali
 - Farmaci immunosoppressori
 - Antivirali
 - Il Vaccino PFIZER mRNA BNT162b2 (Comirnaty)
 - Patologie autoimmuni e COVID-19
 - Tocilizumab
 - Rituximab
 - Immunoglobuline per uso endovenoso (IVIG)
 - Abatacept

OBIETTIVI

MATERIALI E METODI

- Casistica
- Studio della risposta anticorpale evocata dal vaccino Comirnaty
- Studio della risposta cellulo-mediata
- Isolamento di cellule mononucleate del sangue periferico (PBMCs) dei pazienti
- Induzione di PBMCs SARS-CoV-2-specifici
- Analisi citofluorimetrica della produzione citochinica intracitoplasmatica di PBMCs SARS-CoV-2-specifici.
- Analisi citofluorimetrica della produzione di chemochine da parte di linfociti T ottenute dai campioni sottoposti al QuantiFERON test.
- Analisi del “repertoire” di cellule T specifiche
- Analisi del “subset” dei linfociti T
- Analisi statistica

RISULTATI

- Valutazione della risposta anticorpale (o umorale) evocata dal vaccino Comirnaty
- Valutazione della risposta cellulo-mediata
- Valutazione delle diverse sottopopolazioni delle cellule T SARS-CoV-2 specifiche
- Analisi del profilo chemochinico di linfociti T SARS-CoV-2-specifici
- Valutazione dell’aumento della produzione di chemochine tra cellule T non stimulate e stimulate con Ag1 e Ag2
- Analisi del “repertoire” di cellule T SARS-CoV-2 specifiche
- Effetti della terza dose di vaccino a mRNA anti-SARS-CoV-2

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

BIBLIOGRAFIA

Riassunto

In questo lavoro di tesi è stata valutata la risposta immunitaria umorale e cellulo-mediata, in seguito alla somministrazione del vaccino a mRNA anti-COVID-19 (Pfizer mRNA BNT162b2), in pazienti trattati con farmaci immunosoppressivi e con immunodeficienza comune variabile (CVID). Dall'Unità di Reumatologia e Immunologia Clinica, dell'A.O. Spedali Civili di Brescia sono stati reclutati 38 pazienti, di cui 34 affetti da malattie reumatiche croniche (RDs), 4 da CVID e 11 persone sane (HC), utilizzate come controlli. Tutti i pazienti con RDs erano sottoposti ad una terapia a base di corticosteroidi e/o trattamento immunosoppressivo e/o farmaci biologici; in particolare, 14 pazienti assumevano abatacept (ABA), 10 rituximab (RTX) e 10 tocilizumab (TCZ). In primo luogo, è stato valutato il titolo anticorpale sia contro la proteina del nucleocapside (N) che della proteina Spike (S) di SARS-CoV-2 mediante immunodosaggio ad elettrochemiluminescenza. È stata analizzata la risposta immunitaria cellulo-mediata dei linfociti T CD4⁺ e CD4⁺-CD8⁺ mediante il test di rilascio dell'interferone- γ (IFN- γ) e valutata la produzione di chemochine indotte dall'IFN- γ (CXCL9 e CXCL10) e dalle cellule dell'immunità innata (CCL2, CXCL8 e CCL5), mediante l'uso di cytometric bead array method (CBA) a seguito di stimolazione con due pool di peptidi differenti della proteina S di SARS-CoV-2. Infine, mediante citofluorimetria, è stata studiata l'espressione di marcatori di attivazione precoce, come CD40L, CD137 e di citochine intracellulari, come IL-2, IFN- γ e IL-17, a seguito di stimolazione dei linfociti T con due pool di peptidi differenti della proteina S. I principali risultati ottenuti sono stati: (i) una ridotta risposta anti-S nei pazienti trattati con ABA, ripristinata però dopo la terza dose vaccinale; (ii) una ridotta attivazione delle cellule T dovuta ad una riduzione di IFN- γ e

chemochine (CXCL9 e CXCL10); (iii) una riduzione di cellule T CD8⁺ della memoria nei pazienti trattati con ABA; (iv) una significativa abilità dei pazienti trattati con ABA di sviluppare una risposta cellulo-mediata delle cellule T CD4⁺, se stimolate con antigeni derivati dalla proteina S di SARS-CoV-2. Nonostante questo lavoro sia stato limitato dal basso numero di pazienti reclutati, l'esecuzione di numerose valutazioni effettuate a livello cellulare, ha contribuito a dimostrare il tipo di risposta immunitaria che i pazienti sottoposti a diverse terapie immunosoppressive sono stati in grado di generare a seguito della vaccinazione anti-COVID-19. La capacità di generare cloni di linfociti T CD4⁺ SARS-CoV-2 specifici in seguito alla vaccinazione, ha garantito a questi pazienti un'efficace protezione contro il virus. Inoltre, dal momento che, i pazienti trattati con ABA, dopo la somministrazione della terza dose di vaccino a mRNA anti-COVID-19 hanno acquisito la capacità di aumentare la risposta anticorpale, si può affermare che dosi ripetute di vaccino potrebbero essere necessarie al fine di ottimizzare la risposta immunologica in pazienti altamente vulnerabili.

Introduzione

I Coronavirus

I Coronavirus (CoV) sono un'ampia famiglia di virus respiratori che da diversi anni sono oggetto di numerosi studi; sebbene la storia dei Coronavirus sia iniziata già negli anni '40 [1], i primi Coronavirus patogeni per l'uomo sono stati identificati a partire dal 1960. In particolare, nel 1965, la rivista "The British Medical Journal" pubblicò un articolo relativo alla scoperta di un Coronavirus denominato B814, isolato dal muco di un paziente che presentava sintomatologia di un comune raffreddore [2].

I Coronavirus sono virus appartenenti all'ordine *Nidovirales* e alla famiglia *Coronaviridae*, una famiglia di virus che colpisce le vie respiratorie a cui appartiene la sottofamiglia *Orthocoronavirinae*; quest'ultima, comprende quattro generi: *alphacoronavirus* [α -CoV], *betacoronavirus* [β -CoV], *gammacoronavirus* [γ -CoV] e *deltacoronavirus* [δ -CoV] [3]. I γ -CoV e δ -CoV infettano un ampio spettro di specie animali, in particolare quelle aviarie. Gli α -CoV e i β -CoV infettano, invece, prevalentemente i mammiferi, tra cui l'uomo. I ceppi che circolano da più tempo all'interno della popolazione e che causano circa un terzo dei casi di raffreddore e lievi infezioni a livello del tratto respiratorio, [4] come anche malattie enteriche e neurologiche [5], sono: HCoV-229 [α -CoV], HCoV-OC43 [β -CoV], scoperti entrambi negli anni '60 [6] e HCoV-NL63 [α -CoV], HCoV-HKU1 [β -CoV], scoperti rispettivamente negli anni 2004 e 2005 [7].

Negli ultimi anni sono emersi, invece, Coronavirus in grado di causare patologie severe, in alcuni casi fatali, a livello dell'apparato respiratorio. Tra questi possiamo citare MERS-CoV (Middle East Respiratory Syndrome), SARS-CoV (Severe Acute

Respiratory Sindrome) e SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Sindrome 2) [8, 9].

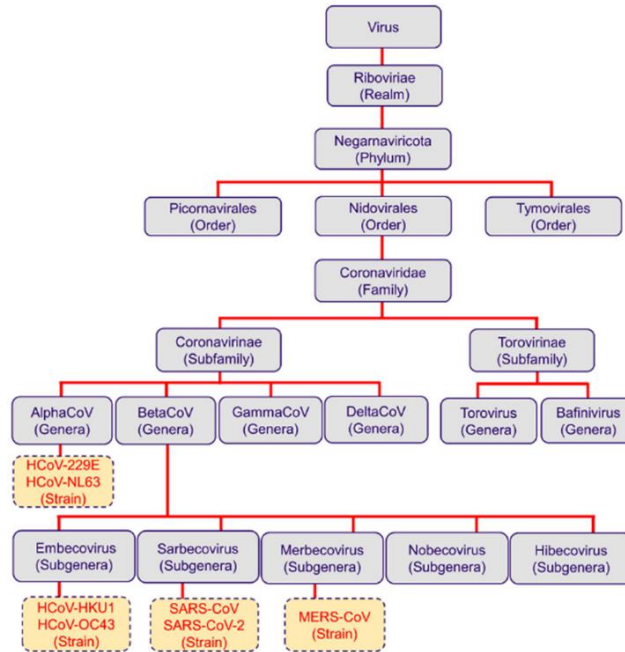


Figura 1. Tassonomia dei coronavirus [10].

I Coronavirus sono virus dotati di pericapside, con un genoma molto ampio (27.000-30.000 basi) a singolo filamento di RNA con polarità positiva. Prendono questo nome dalla glicoproteina “Spike” (S) localizzata sulla superficie esterna del pericapside, che sembra formare una vera e propria corona attorno al virus. Il loro genoma è associato e stabilizzato dalla proteina del core (N), con la quale forma un nucleocapside elicoidale. Le altre proteine strutturali che compongono il virione sono la proteina dell’envelope (E), la proteina della matrice (M) e la proteina S presente sulla superficie esterna della particella virale [11, 12].

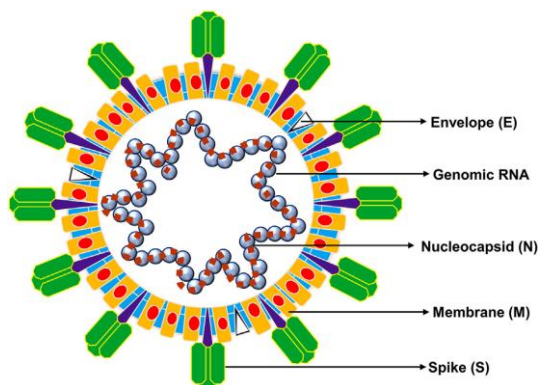


Figura 2. Struttura dei coronavirus [10].

SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 della sindrome respiratoria acuta grave, la cui denominazione gli è stata attribuita l'11 febbraio del 2020 dall'International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) [13], è un coronavirus altamente trasmissibile e patogeno. SARS-CoV-2 è un β -CoV ed è, ad oggi, il settimo Coronavirus riconosciuto in grado di infettare gli esseri umani [14].

SARS-CoV-2 è stato identificato come l'agente eziologico responsabile dei casi di polmonite acuta registrati a Wuhan, in Cina nel dicembre del 2019 [15]. La patologia da nuovo Coronavirus è stata denominata "malattia da coronavirus 2019" (COVID-19) dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) [16] ed è stata dichiarata pandemia l'11 marzo del 2020.

Il nome viene impropriamente, e ormai largamente, usato come sinonimo del virus stesso, sebbene si riferisca alla patologia da esso causata [17].

Struttura genomica

Il genoma di SARS-CoV-2 è costituito da 29,9 kb, organizzato in 12 Open Reading Frames (ORFs). All'estremità 5' del genoma sono presenti ORF1a e ORF1b, che occupano due terzi dell'intero genoma e codificano per 16 proteine non strutturali (NSPs). Le NSPs costituiscono il complesso di replicazione e trascrizione virale (RTC), che comprende anche l'enzima virale RNA polimerasi-RNA dipendente (NSP12) [12]. Gli ORFs, che codificano per le 4 proteine strutturali (S; E; M e N) e per le proteine accessorie, sono trascritti a partire dall'estremità 3' del genoma fino a formare un insieme di 7 mRNA sub-genomici, successivamente tradotti a livello del citoplasma della cellula ospite. Il primo ORF, costituito da circa 21kb, è seguito dal gene S, codificante per la proteina della superficie. Vi è poi l'ORF3a, il gene E che codifica per la proteina dell'involucro, il gene M codificante per la proteina della matrice e, in successione, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8. Infine, all'estremità 3'-UTR, il gene N che codifica per la proteina del nucleocapside e l'ORF10 [12].

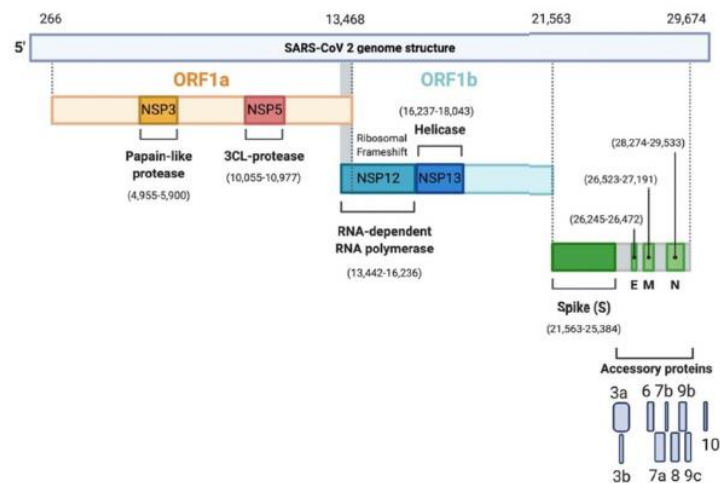


Figura 2. Rappresentazione schematica del genoma di SARS-CoV-2 [18].

Proteina di superficie (S)

La glicoproteina di superficie, proteina S, è una proteina transmembrana di classe I che sporge dall'involucro virale, conferendo al virus la caratteristica forma a corona. La proteina S dei Coronavirus è costituita da 1.273 amminoacidi ed è divisa in due parti funzionalmente distinte, S1 e S2 [19]. Il dominio S1 della proteina S è esposto in superficie e agisce come importante antigene. Contiene due subunità, il dominio N-terminale (NTD) ed il dominio C-terminale (CTD); quest'ultimo agisce come dominio di legame con il recettore (RBD) interagendo con l'*angiotensin-converting enzyme 2* (ACE2), identificato come il recettore principale che consente a SARS-CoV-2 di infettare le cellule dell'ospite [20].

Il dominio S2, agendo come proteina di fusione, aiuta il virione a fondersi con la membrana cellulare dell'ospite.

Per poter entrare nella cellula, la proteina S deve subire un taglio proteolitico da parte della proteasi transmembrana serina 2 (TMPRSS2) dell'ospite. In seguito al taglio, la subunità S1, comprendente il dominio RBD, si attiva e media il legame con il recettore, mentre la subunità S2 promuove la fusione del virione con la membrana citoplasmatica dell'ospite.

La regione di interazione con il recettore ACE2 è altamente conservata tra i Coronavirus; infatti, la sequenza amminoacidica della proteina S di SARS-CoV-2 presenta un'omologia del 76% con la proteina S di SARS-CoV e del 97% con quella del Coronavirus RaTG13, tipico dei pipistrelli [21]. Nonostante ciò, a livello della regione dell'RBD, l'identità tra SARS-CoV e SARS-CoV-2 diminuisce, determinando una maggiore affinità di SARS-CoV-2 per ACE2. È possibile che il

virus che si è diffuso recentemente abbia acquisito determinate mutazioni a livello del dominio RBD per potersi adattare meglio alle diverse specie [21].

Proteina dell'involucro (E)

La proteina dell'involucro, o proteina E, è una proteina integrale di membrana relativamente piccola, costituita da 75 amminoacidi, presente in bassa quantità nel virione. Essa ha un ruolo importante nel processo di maturazione delle particelle virali ed è in grado di modulare il processo di patogenesi. Essa può causare infatti un ripiegamento proteico scorretto (UPR) in grado di indurre un fenomeno di apoptosi. Le proteine E agiscono come viroporine, ossia proteine virali che si assemblano nella membrana della cellula ospite formando pori coinvolti nel trasporto ionico [22], fondamentali sia per il trasporto di ioni, come Ca^{2+} , che per l'assemblaggio ed il rilascio di virioni [21].

Proteina di membrana (M)

La glicoproteina di membrana, o proteina M, è una proteina strutturale costituita da 222 amminoacidi. Essa svolge un ruolo fondamentale per quanto riguarda l'impacchettamento dell'RNA e dell'assemblaggio delle particelle virali [23]. L'interazione delle proteine M, S ed E conferisce la forma caratteristica dell'involucro di SARS-CoV-2. La proteina M presenta tre domini transmembrana; il terzo dominio contiene una regione anfipatica, che è altamente conservata in tutti i Coronavirus. La proteina M è la proteina più abbondante nei virioni di SARS-CoV-2 e può essere presente in due conformazioni, allungata, se associata ad

un'elevata densità di proteina S o compatta, se associata invece ad una bassa densità di proteina S [24].

Proteina del nucleocapside (N)

La proteina del nucleocapside, o proteina N, è una proteina strutturale capace di legare [24] l'RNA virale attraverso un dominio lungo circa 140 amminoacidi, formando così il nucleo di una ribonucleoproteina che media l'ingresso nella cellula ospite e l'interazione con i processi cellulari a seguito della fusione del virus [21].

Ciclo replicativo di SARS-CoV-2 nella cellula ospite

La prima fase del ciclo replicativo di SARS-CoV-2 consiste nell'ingresso del virus all'interno della cellula ospite, mediato dall'interazione tra la glicoproteina S, i recettori espressi sulla superficie cellulare e da altri co-fattori. La proteina S possiede il dominio RBD che è in grado di legare il recettore ACE2 presente sulla superficie delle cellule epiteliali, bersaglio di SARS-CoV-2 [25]. Il dominio RBD di SARS-CoV-2 mostra una maggiore affinità per il recettore ACE2 rispetto all'RBD di SARS-CoV; questo potrebbe essere dovuto sia a variazioni amminoacidiche nel dominio RBD di questi virus, sia alla presenza di variabilità nei pattern di glicosilazione [26]. Per poter entrare nella cellula, la proteina S, costituita dalle subunità S1 e S2, deve subire un taglio proteolitico da parte della TMPRSS2 dell'ospite. Infatti, avvenuto il taglio, la proteina S viene attivata affinché la subunità S1, che comprende il dominio RBD, medi il legame con il recettore; la subunità S2, invece, contribuisce alla fusione del virione con la membrana citoplasmatica dell'ospite.

Una volta avvenuto l'ingresso di SARS-CoV-2 nella cellula, il suo genoma viene rilasciato direttamente nel citoplasma, dove ha inizio il processo di traduzione dell'mRNA virale, il quale è fortemente dipendente dai ribosomi dell'ospite. Nel reticolo endoplasmatico rugoso vengono immediatamente tradotti gli ORF1a e ORF1b situati all'estremità 5' del genoma. Vengono generate le proteine pp1a e pp1ab che dopo essere state sottoposte all'azione delle proteasi virali, danno origine alle 16 proteine non strutturali (NSPs) di SARS-CoV-2 [21]. Tra queste sono presenti le proteine che formano il complesso di replicazione-trascrizione del coronavirus (RTC), compresa l'RNA polimerasi-RNA dipendente [12]. Dal reticolo endoplasmatico si originano anche gli organelli di replicazione virale costituiti da piccole vescicole (DMVs) che contribuiscono a creare un microambiente favorevole alla replicazione e alla trascrizione dell'RNA virale. Infatti, al loro interno, l'RNA polimerasi-RNA dipendente utilizza il genoma virale come stampo per sintetizzare un filamento temporaneo di RNA a polarità negativa (ssRNA-), da cui vengono trascritti gli RNA messaggeri sub-genomici a polarità positiva (sgRNAs). Mentre l'mRNA della proteina del nucleocapside viene tradotto dai ribosomi citosolici, gli mRNA delle proteine S, E e M sono tradotti dai ribosomi presenti sul reticolo endoplasmatico. Le proteine tradotte raggiungono il compartimento intermedio reticolo endoplasmatico-Golgi (ERGIC), dove avviene l'incapsulamento dei genomi virali e l'assemblaggio dei virioni. I nuovi virioni maturi vengono rilasciati dalla cellula infettata per esocitosi [12].

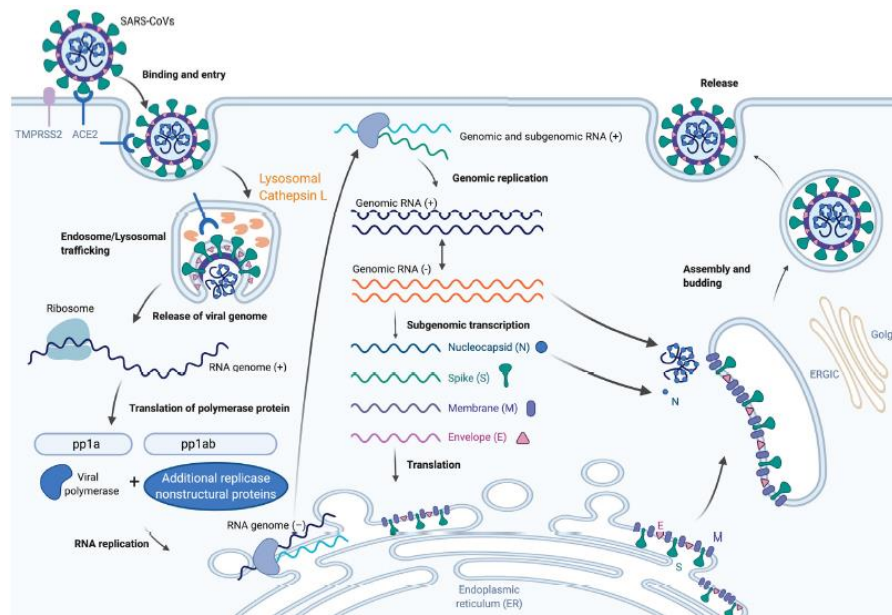


Figura 3. Ciclo replicativo di SARS-CoV-2 [27].

Patogenesi

La maggior parte dei Coronavirus sono responsabili del comune raffreddore con sintomi moderati che coinvolgono soprattutto le vie respiratorie superiori e in alcuni casi il tratto gastrointestinale. I Coronavirus altamente patogeni invece, compreso SARS-CoV-2, causano sintomi più severi. Inizialmente la patologia si manifesta con sintomi lievi, simil-influenzali, ma in alcuni casi può progredire fino all'insorgenza di una grave insufficienza respiratoria.

Il decorso dell'infezione da SARS-CoV-2 può essere suddiviso in tre stadi:

1. Fase iniziale dell'infezione: in questa fase il virus colonizza principalmente gli epitelii delle alte vie aeree dell'ospite e si moltiplica. Il paziente spesso presenta sintomi lievi e non specifici, come febbre e tosse secca. È la fase virale della malattia che nella maggior parte dei casi si risolve senza ricovero del paziente.

2. Fase intermedia: se l'infezione non si risolve e la carica virale aumenta, il paziente sviluppa un'inflammatione polmonare caratterizzata da tosse, febbre e difficoltà respiratorie. In questa fase, il paziente deve essere monitorato molto attentamente ma nella maggior parte dei casi non necessita di ospedalizzazione. In questa fase inizia a istaurarsi una risposta infiammatoria dell'organismo che, man mano, assume un ruolo sempre più importante nel decorso della malattia.
3. Fase avanzata: una parte minore dei pazienti affetti da COVID-19 entra in uno stadio più avanzato dell'infezione in cui si manifesta uno stato di "iperinflammatione" sistemica. Questa è la fase più critica dell'infezione e tra questi pazienti la frequenza di complicazioni letali è rilevante. Le complicazioni possono anche interessare apparati diversi da quello respiratorio tra cui il sistema vascolare, il cui ruolo nella progressione della patologia è stato ampiamente documentato [28]. La reazione infiammatoria e trombotica scatenata dall'infezione è l'elemento costitutivo dell'ultimo stadio nell'evoluzione della COVID-19 [29].

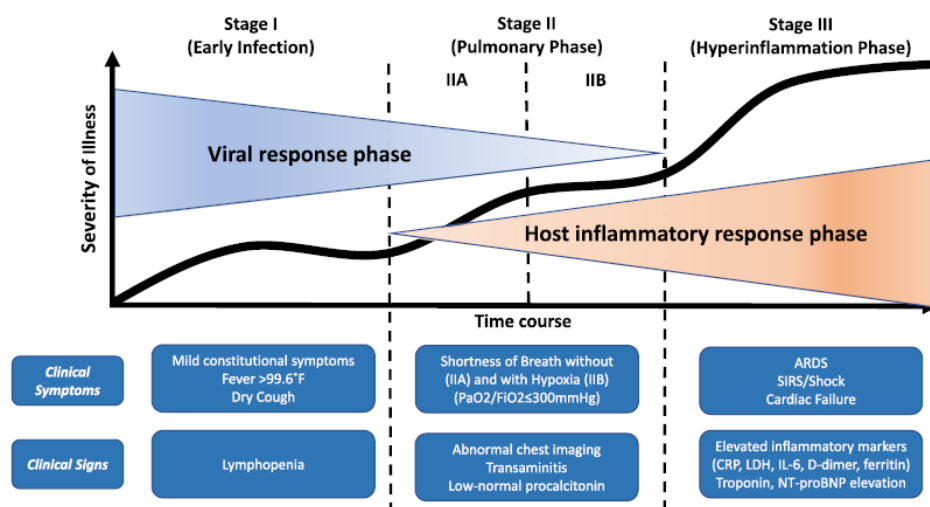


Figura 4. Classificazione degli stati patologici di COVID-19.

Trasmissione del virus e misure di prevenzione

I Coronavirus umani infettano le vie respiratorie superiori o il tratto gastroenterico e vengono trasmessi principalmente per via aerea. Numerosi studi hanno dimostrato che esistono diversi tipi di trasmissione interumana [30, 31, 32]:

- Trasmissione tramite goccioline respiratorie (“droplets”) che vengono espulse dal soggetto infetto con uno starnuto o un colpo di tosse ed inalate dai soggetti sani che si trovano in prossimità del soggetto infetto;
- Trasmissione per contatto diretto, dove un soggetto sano tocca un oggetto o una superficie contaminata;
- Trasmissione tramite aerosol, dove le “droplets” si mescolano all’aria causando infezione solo se inalate ad alte dosi. Solitamente ciò accade quando il soggetto sano si trova in prossimità del soggetto infetto in una stanza chiusa;
- Trasmissione tramite via oro-fecale [33, 34].

SARS-CoV-2 segue le medesime modalità di trasmissione passando da persona a persona per lo più attraverso le goccioline respiratorie (“droplets”) prodotte tramite starnuti e/o colpi di tosse [35].

Il virus può essere trasmesso non solo da pazienti che manifestano sintomi ma anche da pazienti asintomatici [36, 37, 38].

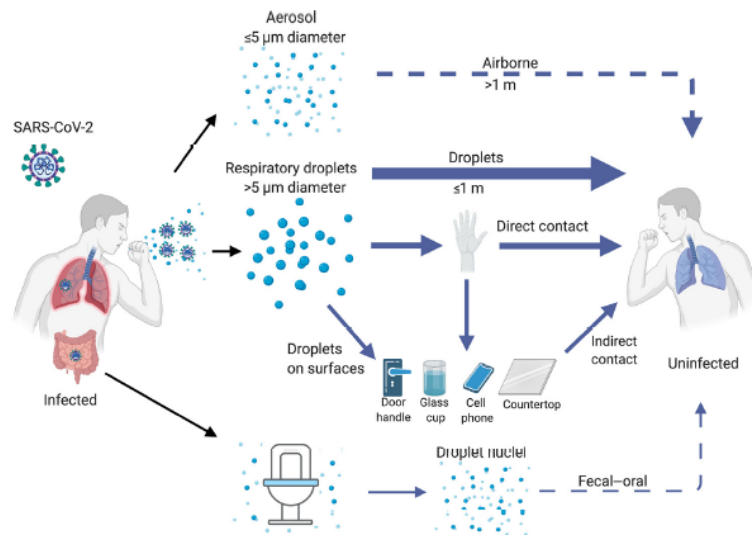


Figura 5. Possibili vie di trasmissione di SARS-CoV-2 [27].

Le indicazioni dell'OMS sulle misure di prevenzione consistono nell'utilizzo di dispositivi di protezione individuale (utilizzo di mascherine, lavaggio/igienizzazione delle mani, mantenimento della distanza di almeno 1 metro con le altre persone, evitare il contatto con persone infette); la precoce identificazione dei casi ed il successivo isolamento domiciliare o in strutture sanitarie dei soggetti positivi; la sanificazione e l'adeguata ventilazione delle strutture sanitarie; l'addestramento e l'informazione del personale sanitario e della popolazione; la quarantena per le persone non infette ma che hanno avuto un contatto diretto con un paziente infetto.

Quadro clinico da COVID-19

La maggior parte dei pazienti che si infettano con il virus SARS-CoV-2 presenta sintomi dopo un periodo di incubazione variabile tra 1 e 14 giorni mostrando inizialmente sintomi lievi come: mal di testa, febbre, tosse, diarrea, mal di gola, dolore toracico, brividi, nausea, vomito, ageusia e anosmia e occasionalmente

possono coinvolgere il tratto gastrointestinale e neurologico. In diversi casi, i sintomi evolvono in insufficienza multi-organo, shock settico, edema polmonare, dispnea, mialgia, affaticamento, sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS), insufficienza renale e morte [33, 39, 40, 41].

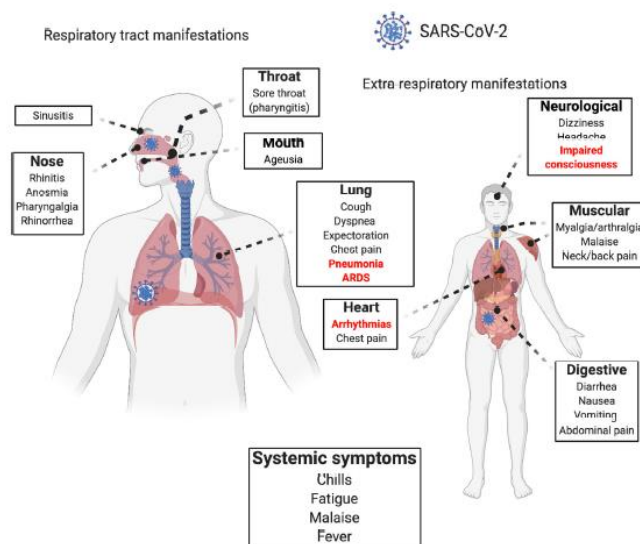


Figura 6. Sintomi clinici da COVID-19 [27].

Con il progredire della pandemia, è diventato sempre più chiaro come il COVID-19 non comprenda solo malattie respiratorie/gastrointestinali acute, ma può indurre anche effetti a lungo termine [42].

Nonostante SARS-CoV-2 sia in grado di infettare anche bambini e giovani adulti, è stato dimostrato che pazienti di età avanzata (> 60 anni), soprattutto con gravi malattie preesistenti, presentano maggior rischio di sviluppo di ARDS con conseguente prognosi infausta [43].

Al momento del ricovero questi pazienti mostrano condizioni di linfopenia marcata e livelli molto elevati di citochine plasmatiche, il che conferma un processo immunopatologico causato da una importante cascata citochinica [44]. Ulteriori

anomalie riportate nei test di laboratorio nei casi di infezione grave da COVID-19 includono anche un aumento dei livelli degli enzimi epatici (LDH, ALT e AST), della bilirubina totale, della creatinina, della troponina cardiaca, del D-dimero, del tempo di protrombina, della procalcitonina e della proteina C reattiva (CRP) [45]. Nonostante tutte queste evidenze, si può comunque affermare che qualsiasi persona, indipendentemente dall'età e dal caso clinico, è suscettibile all'infezione da SARS-CoV-2 [46].

Risposta immunitaria dell'ospite all'infezione da SARS-CoV-2

Una volta legatosi alle cellule epiteliali del tratto respiratorio mediante il recettore ACE2, SARS-CoV-2 inizia a replicare e a migrare verso le basse vie aeree. La rapida replicazione a livello polmonare, mediata dall'enzima cPLA2 α , può innescare una forte risposta immunitaria. Se nelle fasi precoci, il virus non viene eliminato dal sistema immunitario, si diffonde, causando gravi danni nei tessuti colpiti, soprattutto a livello polmonare. A questo proposito, analisi istopatologiche hanno evidenziato: danno alveolare bilaterale diffuso, formazione di membrane ialine, desquamazione degli pneumociti e dei depositi di fibrina nei polmoni [44]. In alcuni casi è stata osservata anche insufficienza multiorgano [46].

Le cellule danneggiate all'interno del polmone attivano la risposta infiammatoria, mediata principalmente da macrofagi e monociti pro-infiammatori. Nella maggior parte dei pazienti sono state riscontrate elevate concentrazioni di marcatori associati all'infezione, come citochine e chemochine infiammatorie [47, 48, 49].

Ambienti ricchi di citochine provocano l'attivazione di monociti CD14⁺ e CD16⁺ infiammatori che causano una sovra-espressione di interleuchina-6 (IL-6), in grado di aumentare la risposta infiammatoria [50].

Anche gli inflammasomi, oligomeri multiproteici intracellulari, sono in grado di intervenire nella risposta immunitaria innata a seguito di stimoli endogeni ed esogeni, trasformando una moltitudine di segnali in risposte pro-infiammatorie [51]. Questi complessi multiproteici inducono, infatti, l'attivazione della caspasi-1 infiammatoria che, a sua volta, attiva l'interleuchina-1 β (IL-1 β) e l'interleuchina-18 (IL-18), in grado di indurre una risposta infiammatoria sistemica.

L'attivazione della caspasi-1 è in grado di provocare anche un fenomeno di piroptosi, una forma altamente infiammatoria di morte cellulare litica programmata. Sono stati, ad oggi, identificati numerosi inflammasomi, ma il più conosciuto è l'inflammasoma intracellulare Nod-Like Receptor Protein 3 (NLRP3), appartenente alla famiglia dei recettori dell'immunità innata (PRRs), deputati alla rilevazione dei segnali provenienti da patogeni esterni.

Età avanzata, casi di linfocitopenia, neutrofilia e problemi di coagulazione nei pazienti affetti da COVID-19 determinano una ridotta capacità da parte dei linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ di produrre interferone- γ (IFN- γ) e interleuchina-2 (IL-2), che determinano una minore attivazione dei linfociti T da parte delle cellule dendritiche, compromettendo la risposta immunitaria adattativa e aggravando il quadro clinico. Nei lavaggi bronco-alveolari di pazienti in gravi condizioni sono stati ritrovati elevati livelli di chemochine infiammatorie (ad esempio CCL2): l'elevata concentrazione di citochine e di chemochine pro-infiammatorie amplifica il danno tissutale. Questa condizione di pro-infiammazione induce le cellule endoteliali ad

una up-regolazione dell'espressione delle molecole di adesione dei leucociti, promuovendo quindi un maggiore accumulo delle cellule del sistema immunitario che portano rapidamente al cedimento del sistema respiratorio. L'iperinfiammazione del polmone, inoltre, induce dei cambi a livello trascrizionale nei macrofagi e nei neutrofili che portano alla perpetuazione del danno tissutale e, infine, al danno irreversibile del polmone [27].

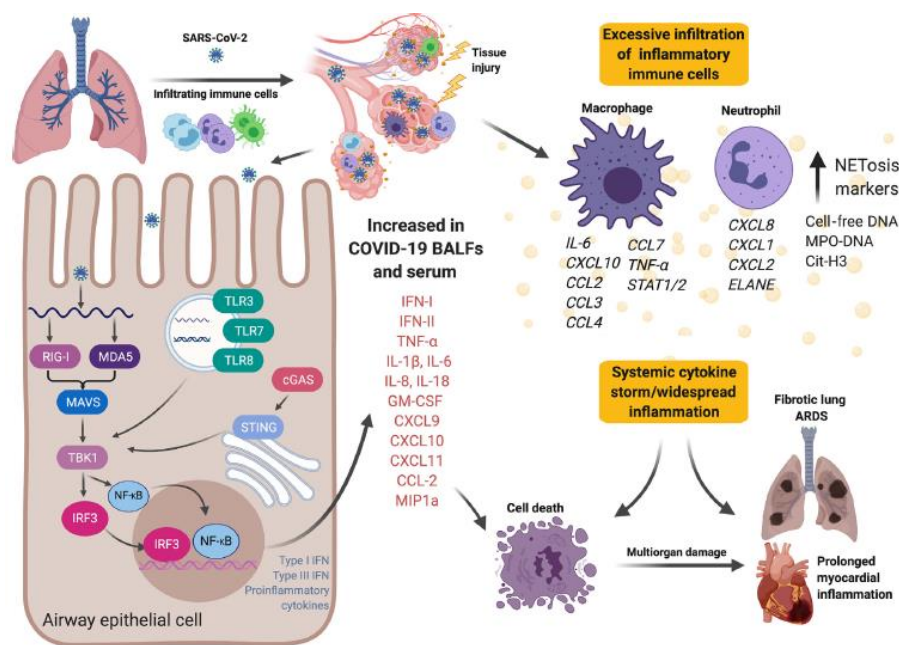


Figura 7. Risposta dell'ospite a SARS-CoV-2 [27].

Caratterizzazione immunopatologica dei pazienti COVID-19 e meccanismi di evasione dell'immunità innata di SARS-CoV-2

L'analisi post morte di pazienti affetti da COVID-19 mostra un numero elevato di cellule mononucleari a livello delle aree affette (polmone, cuore, rene), questo si associa ad una “tempesta citochinica” e linfopenia. In pazienti gravemente affetti da COVID-19 si può quindi osservare una risposta immunitaria sbilanciata, con alte

concentrazioni di citochine e/o chemochine infiammatorie e bassi livelli di IFN- α o IFN- β circolante, determinanti persistenza della viremia [52]. In particolare, si è evidenziata una marcata linfopenia di CD4⁺, CD8⁺ e NK nei soggetti COVID-19 positivi rispetto ai soggetti sani, con una maggiore frequenza di CD4⁺ e CD8⁺ attivati (CD38⁺/HLA-DR⁺) in pazienti più gravi, che hanno inoltre mostrato un numero ridotto di CD4⁺ e CD8⁺ della memoria effettrice (CCR7⁻; CD45RA⁻) ed un numero elevato di CD4⁺ granzima B positivi [53].

L'aberrante risposta infiammatoria, tipica dei pazienti gravi, è attribuibile ad una asincronia immunologica causata dal virus stesso [54].

Normalmente, la risposta immune antivirale è caratterizzata da una cascata cellulare e molecolare ben orchestrata e bilanciata a livello spazio-temporale che permette la clearance virale, attenuando la tossicità di una eccessiva risposta immune.

A poche ore dall'infezione, si può osservare una prima risposta immunitaria volta a circoscrivere la replicazione virale attraverso l'induzione dell'IFN di tipo I/III, accompagnata dalla produzione di diverse citochine come, IL-1 β , IL-6 e IL-18 che promuovono un processo di infiammazione e di risposta T_H1 mediata e la produzione di chemochine quali, CCL2 e CCL7, importanti per il reclutamento di monociti e cellule T nel sito dell'infezione. Pochi giorni dopo l'infezione, invece, viene attivata l'immunità adattativa e progressivamente de-regolata l'immunità innata.

Con l'eliminazione del patogeno, una serie di cellule regolatorie dell'immunità innata, come macrofagi M2 e cellule dendritiche tissutali, e cellule che modulano il processo legato all'immunità adattativa (Treg e Breg), contribuiscono alla risoluzione dell'infiammazione [54].

I meccanismi di controllo di questa risposta sono molteplici, (i) ridotta sopravvivenza dei neutrofili, (ii) ridotta capacità proliferativa dei macrofagi tissutali e (iii) tendenza all'apoptosi indotta dall'attivazione cellulare dei linfociti. Molti pathway inibitori sono indotti dall'infiammazione stessa, quali ad esempio la produzione di IL-1RA e IL-18BP in risposta ad IFN- γ e IL-10. Mentre per i checkpoint inibitori l'induzione avviene in seguito ad eccessiva e prolungata attivazione dei linfociti [55].

I Coronavirus hanno sviluppato molteplici sistemi per contenere la risposta immune innata. Per evitare l'attivazione del sistema immunitario da parte dell'ospite è stato dimostrato che questi sarebbero in grado di promuovere la formazione di DMVs, capaci di sequestrare l'acido nucleico virale, impedendo così il riconoscimento da parte dei PRR della cellula ospite e di conseguenza, l'attivazione delle molecole coinvolte nella segnalazione immunitaria [56, 57].

I Coronavirus sono estremamente sensibile all'IFN, pertanto nel tempo, si sono evoluti al fine di poter riuscire ad antagonizzare il riconoscimento immunitario, interferendo con la segnalazione a valle dei recettori degli interferoni, o inibendo specifici prodotti genici indotti dall'IFN stesso (ISG) [58].

Molte proteine di SARS-CoV, alcune delle quali conservate in SARS-CoV-2, agiscono come inibitori dell'IFN e come inibitori di molecole di rilevamento (sentinelle) del sistema immune innato, come il fattore regolatore dell'interferone-3 (IRF-3) ed il gene inducibile all'acido retinoico I (RIG-I) [54, 59]. Questo spiega i bassi livelli di IFN di tipo I osservati nel plasma di pazienti affetti da SARS-CoV-2 [49].

Alcune proteine virali, inoltre, un esempio è l'ORF3a, sono in grado di attivare l'inflammosoma agendo direttamente su NLRP3, inducendo un aumento della produzione di citochine infiammatorie, come IL-1 e IL-6 [60].

Più in generale la proteina N dei Coronavirus è in grado di interagire attraverso la porzione C terminale con la proteina 25 contenente il motivo tripartito (TRIM25), determinando un'inibizione competitiva in grado di ridurre l'interazione fra TRIM25 e RIG-I, inibendo l'attivazione e l'ubiquitinazione di RIG-I. Normalmente RIG-I agisce da recettore per l'RNA virale, dopo l'interazione con esso i domini di reclutamento della caspasi N terminale (CARD) di RIG-1 vengono modificati dall'ubiquitina, previa interazione con TRIM25. I domini di RIG-I, mediante l'interazione con ulteriori partner a valle (quali MAVS/VISA/IPS-1/Cardif), portano all'attivazione di fattori di trascrizione come IRF3 e NFκB, inducendo la produzione di IFN tipo I [59].

Infine, altre proteine virali quali ORF3b e ORF6 sono in grado di ridurre oltre alla produzione di IFN di tipo I (analogamente alla proteina N) anche il signaling dell'IFN-I stesso. In particolare, queste due proteine inibiscono l'espressione di quei geni che nel promotore contengono sequenze ISRE (interferon-stimulated response element) contrastando a più livelli gli effetti degli IFN di tipo I, oltre che la sintesi di INF [61].

L'inattivazione della segnalazione dell'IFN da parte di SARS-CoV-2 e l'alterata produzione di IFN nelle cellule immunitarie del sangue periferico umano possono quindi contribuire a favorire il processo di replicazione virale, trasmissione e sviluppo, garantendo al virus una maggiore sopravvivenza nelle cellule ospiti. Sono

comunque necessarie ulteriori analisi per la comprensione approfondita di queste vie di evasione [52].

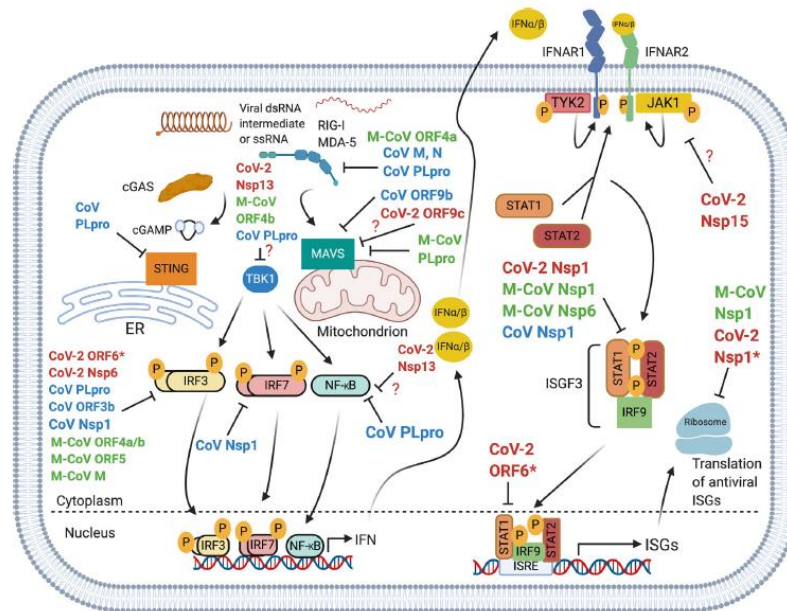


Figura 8. Risposta canonica dell'IFN dopo il rilevamento dei virus a RNA.

Diagnosi di infezione da COVID-19

La diagnosi standard di infezione da SARS-CoV-2 viene effettuata mediante l'esecuzione di un tampone nasofaringeo analizzato con tecniche molecolari di Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) per individuare i geni virali principalmente espressi durante l'infezione, ORF1b (compreso RdRp), N, E o S [62]. Tale procedura viene eseguita solo in laboratori specializzati e richiede un tempo medio di elaborazione del campione di circa 5/6 ore dal momento della sua presa in carico. Inoltre, possono essere analizzati anche campioni derivati da tamponi faringei, salivari, espettorato e liquido bronchiale. La carica virale ottenuta mediante questa analisi molecolare può essere influenzata da diversi fattori e risulta

essere maggiore nei campioni prelevati dal tratto respiratorio inferiore [63]. Esistono anche analisi le cui tempistiche possono durare solo diversi minuti, come test sierologici o l'imaging TC del torace [64]. I test sierologici SARS-CoV-2 sono test cromatografici di immuno-dosaggio che determinano il rilevamento qualitativo di anticorpi anti-SARS-CoV-2 IgG e IgM (contro la proteina N o S) nel sangue e sono test di tipo qualitativo. Si differenziano dagli immuno-dosaggi quantitativi, fatti su campioni di siero o plasma, che oltre a rilevare la presenza di anticorpi ne determinano anche il titolo. Gli anticorpi solitamente tendono ad aumentare alla fine del corso della malattia; la durata media del rilevamento degli anticorpi IgM SARS-CoV-2 è di 5 giorni, mentre il rilevamento di IgG avviene circa 2 settimane dopo la comparsa dei sintomi [65]. L'analisi sierologica è semplice, rapida e non richiede strumentazione particolare. Il campione è di facile raccolta e può fornire risultati in soli 15 minuti. Nonostante ciò, i test sierologici disponibili in commercio differiscono per sensibilità e specificità e questi limiti impongono che ogni campione risultato positivo alle IgG o alle IgM debba essere obbligatoriamente sottoposto a un tampone di conferma.

La TC del torace invece è uno strumento di "imaging" di routine per la diagnosi di polmonite, relativamente facile e rapida da eseguire che mostra caratteristiche radiografiche tipiche in quasi tutti i casi di COVID-19 [66].

Farmaci utilizzati contro l'infezione da SARS-CoV-2

Le strategie terapeutiche adottate contro il nuovo coronavirus si sono evolute grazie allo studio approfondito dei meccanismi alla base dell'infezione da SARS-CoV-2. Ad oggi, non è stata ancora individuata una terapia specifica in grado di curare efficacemente tutti i casi di COVID-19 ed è per questo motivo che vengono

utilizzati diversi farmaci con l'obiettivo di inibire la replicazione del virus, la risposta infiammatoria generata dal sistema immunitario e i danni all'organismo [67].

I farmaci a disposizione contro SARS-CoV-2 possono essere classificati come:

- **Anticorpi monoclonali**
- **Immunosoppressori**
- **Antivirali**

Gli *anticorpi monoclonali* sono prodotti da cloni di linfociti B opportunamente modificati per produrre immunoglobuline dirette contro molecole presenti nel virus o nella catena infiammatoria post-infezione. In Italia, alcuni anticorpi monoclonali sono stati autorizzati dall'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA) per il trattamento di COVID-19 e vengono utilizzati soprattutto per la cura di soggetti fragili o portatori di comorbidità, quindi ad alto rischio di sviluppare forme gravi della malattia.

Gli anticorpi monoclonali agiscono principalmente legandosi alla glicoproteina S provocandone alterazioni conformazionali irreversibili che ne impediscono il legame al recettore ACE2. L'inibizione dell'interazione proteina S/ACE2 inibisce l'attacco del virus alla cellula ospite e la successiva fusione con la membrana [68]. I monoclonali devono essere somministrati nelle fasi precoci dell'infezione entro la prima settimana dall'insorgenza della malattia. Oltre i 7 giorni sono utilizzati in soggetti con immunodeficienza che presentino sierologia per SARS-CoV-2 negativa, ma una prolungata positività al tampone molecolare.

Nonostante si tratti di una terapia attualmente in uso per il trattamento di alcuni casi selezionati di COVID-19, gli anticorpi monoclonali non costituiscono una terapia utilizzabile su larga scala, in quanto:

- possono essere somministrati in un numero limitato di strutture ospedaliere, individuate da Regioni e Ministero della Salute;
- hanno generalmente una durata limitata a qualche mese;
- hanno un costo di produzione elevato;
- devono essere somministrati precocemente.

Gli *immunosoppressori* sono farmaci in grado di ridurre la catena di reazioni infiammatorie indotte dalle cellule immunitarie, nota con il nome di tempesta citochinica. Quelli utilizzati sono Anakinra e Baricitinib. Il trattamento con Anakinra è limitato ai pazienti con polmonite da COVID-19 da moderata a severa. Baricitinib è utilizzato nel trattamento di soggetti in condizioni cliniche gravi, ad evoluzione rapida.

Gli *antivirali* sono farmaci capaci di inibire la replicazione del virus. Il farmaco ad oggi più utilizzato è il Remdesivir, un farmaco antivirale entrato in fase di studio a livello clinico negli Stati Uniti come cura per il COVID-19 [69]. Possiede un ampio spettro d'azione contro diversi virus a RNA a singolo filamento, come ad esempio il virus respiratorio sinciziale umano (RSV), SARS-CoV e MERS-CoV. Nello specifico, Remdesivir essendo un analogo nucleotidico dell'adenosina, viene metabolizzato nelle cellule ospiti per formare il metabolita trifosfato nucleosidico farmacologicamente attivo. Remdesivir trifosfato agisce come un analogo

dell'adenosina trifosfato (ATP) e compete con il substrato naturale dell'ATP per l'incorporazione nelle catene di RNA nascente da parte della RNA-polimerasi RNA-dipendente del SARS-CoV-2, causando la terminazione del filamento ritardato durante la replicazione dell'RNA virale. Da un'indagine condotta su un modello di scimmia è emersa la sua capacità di ridurre i danni a livello polmonare e di inibire la replicazione del virus se somministrato prima o dopo l'infezione [70].

Il vaccino PFIZER mRNA BNT162b2 (Comirnaty)

Nel contesto di una pandemia, i vaccini a mRNA rappresentano un'arma molto importante, grazie al loro rapido sviluppo. Pfizer-BioNTech è stata la prima azienda farmaceutica a sviluppare un vaccino a mRNA anti-SARS-CoV-2, chiamato BNT162b1; si tratta di un vaccino costituito da nanoparticelle liposolubili che incapsulano l'mRNA della proteina S di SARS-CoV-2. Grazie a tali nanoparticelle, la sequenza di mRNA viene internalizzata dal doppio strato fosfolipidico delle cellule umane e viene tradotta in proteina S. A questo punto, la proteina S prodotta viene riconosciuta come un antigene estraneo e stimola la risposta immunitaria con l'attivazione dei linfociti e la produzione di anticorpi. Anche dopo la vaccinazione, i linfociti B della memoria sopravvivono per mesi e questo permette al sistema immunitario della persona vaccinata di attivare un'efficace risposta anticorpale contro l'infezione da SARS-CoV-2. La fase 1 della sperimentazione ha evidenziato come i soggetti riceventi la dose di vaccino producevano un titolo elevato di anticorpi contro SARS-CoV-2 ed una consistente risposta da parte delle cellule T CD8⁺ e CD4⁺ di tipo T_H1 specifiche per l'antigene virale.

Il vaccino è risultato ben tollerato dalla popolazione; solo alcuni soggetti hanno manifestato delle reazioni avverse di lieve entità. Un altro studio ha dimostrato che il vaccino è in grado di promuovere una potente risposta da parte dei linfociti T CD4⁺ e CD8⁺, oltre ad un'elevata produzione di IFN- γ . Pfizer-BioNTech ha sviluppato anche un secondo vaccino a mRNA chiamato BNT162b2, differente dal precedente in quanto nella nanoparticella liposolubile viene incapsulata l'intera sequenza dell'mRNA del gene che codifica per la proteina S del virus. I trials clinici hanno dimostrato che entrambi i vaccini inducevano un elevato titolo di anticorpi neutralizzanti, addirittura superiore a quello dei soggetti che avevano contratto l'infezione naturale. Sebbene entrambi i vaccini avessero la stessa capacità di indurre un elevato titolo anticorpale, BNT162b2 generava delle reazioni avverse più lievi e sembrava essere più efficace anche sulle persone più anziane. Entrambi i vaccini sono entrati nella fase 2 di sperimentazione ma nella fase 3, che ha coinvolto 44.000 persone negli USA, Argentina, Brasile, Sud-Africa e Turchia, solamente BNT162b2 è risultato efficace [71, 72]. Il 9 novembre 2020 Pfizer ha pubblicato i risultati della fase 3 di sperimentazione del vaccino: i soggetti riceventi due dosi di BNT162b2 a distanza di 21 giorni hanno dimostrato un rischio di contrarre l'infezione sintomatica da COVID-19 ridotto del 95% (8 casi su 18.198 mostravano i sintomi di COVID-19) se confrontati con i soggetti riceventi una dose placebo (162 casi su 18.325 avevano sintomi di COVID-19), senza mostrare alcuna reazione avversa grave. Le reazioni avverse osservate più frequentemente (più di 1 persona su 10) nei trials clinici del vaccino Comirnaty sono state di entità lieve o moderata, come dolore e gonfiore nel sito di iniezione, stanchezza, mal di testa, dolore ai muscoli e alle articolazioni, brividi e febbre, e si sono risolte dopo pochi

giorni dalla somministrazione. Arrossamento nel sito di iniezione e nausea si sono verificati in meno di 1 persona su 10. Prurito nel sito di iniezione, dolore agli arti, ingrossamento dei linfonodi, difficoltà ad addormentarsi e sensazione di malessere sono stati invece effetti avversi non comuni, che hanno interessato meno di 1 persona su 100. Le reazioni sistemiche avverse sono state più frequenti e pronunciate dopo la seconda dose.

In Italia, Comirnaty è stato il primo vaccino ad essere autorizzato il 22 dicembre 2020 per i soggetti di età pari o superiore a 16 anni e le somministrazioni sono iniziate il 27 dicembre 2020. Da maggio 2021, il vaccino Comirnaty è stato autorizzato anche per la fascia di età compresa tra i 12 e i 15 anni [73]. Il 24 novembre 2021 l'Agencia Europea del Farmaco (EMA) ha approvato l'indicazione del vaccino Comirnaty anti-SARS-CoV-2 per i bambini tra 5 e 11 anni, raccomandazione confermata anche dall'AIFA il 1° dicembre 2021.

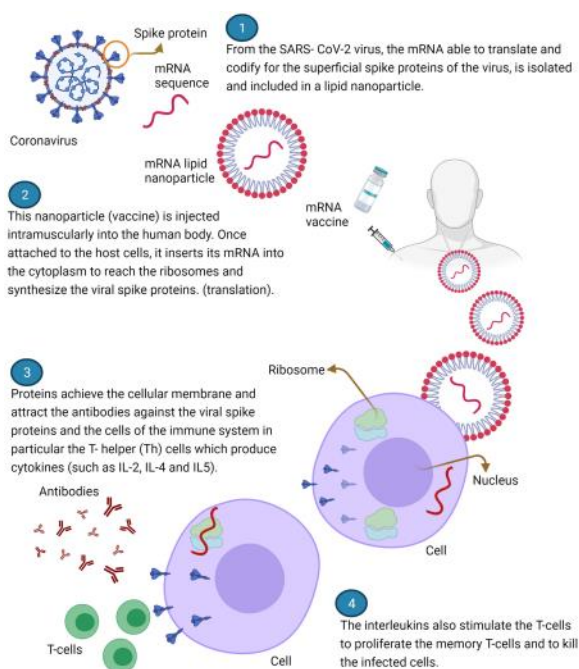


Figura 9. Meccanismo d'azione del vaccino Pfizer mRNA BNT162b2 [74].

Il 7 gennaio 2021, l'AIFA ha autorizzato in Italia l'uso di un secondo vaccino prodotto dalla ditta Moderna e denominato Spikevax mRNA-1273 basato sullo stesso principio del vaccino Pfizer (mRNA contenente la sequenza della proteina S, incapsulato in vescicole lipidiche). Il vaccino di Moderna è stato destinato alle persone di età maggiore o uguale a 18 anni e il ciclo vaccinale completo prevedeva due dosi a distanza di 28 giorni una dall'altra.

Patologie autoimmuni e COVID-19

Le malattie reumatiche autoimmuni (ARD) sono un ampio gruppo di disturbi che colpiscono principalmente le articolazioni, le ossa, i muscoli e il tessuto connettivo e che interessano circa il 3-5% della popolazione occidentale [75, 76].

La gestione ottimale delle ARD richiede terapie che comportano immuno-modulazione e immunosoppressione. Tra le principali terapie utilizzate per il trattamento di questi disturbi possiamo citare: Tocilizumab (TCZ), Rituximab (RTX), le immunoglobuline somministrate per via endovenosa (IVIG) e Abatacept (ABA).

TOCILIZUMAB

TCZ è un anticorpo monoclonale ricombinante dell'immunoglobulina (Ig) G1 umanizzata che inibisce il legame dell'IL-6 a IL-6R sia quando si trova in forma solubile sia quando legato alla membrana. Questo farmaco è stato approvato dalla Food and Drug Administration (FDA) per il trattamento dell'artrite reumatoide grave, dell'artrite idiopatica giovanile sistemica, dell'arterite a cellule giganti e, più

recentemente, per la sindrome da rilascio di citochine che si verifica dopo la terapia con cellule CAR-T.

RITUXIMAB

RTX è un anticorpo di sintesi, molto simile per struttura agli anticorpi che il nostro sistema immunitario produce normalmente per contrastare le infezioni. RTX ha come bersaglio l'antigene CD20, una proteina che si trova normalmente sulla superficie dei linfociti B. Il rituximab è definito anticorpo chimerico in quanto è costituito da una parte di origine umana e da una parte di origine murina che lega il CD20.

RTX agisce legandosi ai linfociti B provocandone la distruzione, così come avviene nel nostro organismo quando gli anticorpi prodotti naturalmente dall'infezione interagiscono con batteri o virus. Per queste sue caratteristiche, questo farmaco nasce e trova la sua principale applicazione nel trattamento dei tumori del sistema linfatico (linfomi) che originano dai linfociti B.

IMMUNOGLOBULINE PER USO ENDOVENOSO (IVIG)

Le IVIG sono utilizzate nel trattamento di numerose condizioni patologiche. Vengono preparate a partire dal plasma raccolto da diverse migliaia di donatori. Le immunoglobuline prodotte per uso terapeutico consistono principalmente di IgG polivalenti. Il trattamento sostitutivo con IgG è la terapia standard per i deficit primitivi di anticorpi (PAD) ed ha lo scopo di sopperire alla mancanza di anticorpi naturali aiutando l'organismo a difendersi dalle infezioni.

ABATACEPT

ABA è una proteina di fusione (prodotta mediante tecnologia del DNA ricombinante) che, modulando un segnale chiave di co-stimolazione necessario per la completa attivazione dei linfociti T, riduce la proliferazione degli stessi e la produzione di citochine infiammatorie responsabili della sinovite e di altre manifestazioni dell'artrite reumatoide [77].

È stato dimostrato come i soggetti sottoposti a terapia immunosoppressiva, abbiano un aumentato rischio di contrarre l'infezione da SARS-CoV-2. In questi pazienti, la risposta anticorpale evocata dalla vaccinazione potrebbe risultare compromessa dalla terapia immunosoppressiva. Nonostante ciò, molteplici organizzazioni reumatologiche, tra cui l'American College of Rheumatology, la European League Against Rheumatism (EULAR), la British Society of Rheumatology e la Canadian Rheumatology Association, incoraggiano la somministrazione del vaccino anti-SARS-CoV-2 ai pazienti con ARD indipendentemente dal regime terapeutico o dalla diagnosi iniziale [78, 79].

Obiettivi

Ad oggi, gli studi clinici relativi al vaccino anti-SARS-CoV-2 hanno escluso i soggetti riceventi terapie immunosoppressive, in quanto solitamente considerati poco responsivi ai vaccini [80, 81]. In realtà, la loro risposta immunitaria può variare indipendentemente dai trattamenti terapeutici utilizzati. Per esempio, in pazienti trattati con rituximab è stata osservata un'alterata risposta umorale a seguito di vaccinazione antinfluenzale e anti-pneumococcica [81, 82, 83, 84].

Fino ad ora, i dati relativi a pazienti aventi patologie autoimmuni e vaccinati con vaccino anti-SARS-CoV-2 non sono definitivi. Vi è, infatti, un urgente bisogno di comprendere l'impatto delle terapie immunosoppressive sull'efficacia dei vaccini anti-SARS-CoV-2 al fine di ottenere informazioni utili per la pratica clinica.

La vaccinazione anti-SARS-CoV-2 induce la produzione di anticorpi neutralizzanti specifici per la proteina S di SARS-CoV-2 [85]. Tuttavia, la durata di tale protezione umorale non è chiara, in quanto numerosi studi hanno dimostrato un calo dei livelli di anticorpi anti-S nel tempo [86]. Al contrario, diversi autori hanno evidenziato una potente risposta cellulo-mediata dei linfociti T sia immediata che a lungo termine in soggetti vaccinati [87, 88] [89, 90]. È stato infatti dimostrato come la guarigione da COVID-19 sia spesso associata alla comparsa di cellule T CD4⁺ e CD8⁺ reattive [91] mentre le forme più gravi di COVID-19 correlano con linfopenia delle cellule T periferiche [92]. Inoltre, un recente studio ha dimostrato come le varianti B.1.1.7 e B.1.351 di SARS-CoV-2 sono in grado di evadere parzialmente l'immunità umorale, senza però influenzare quella cellulo-mediata [93]. In aggiunta, *Kalimuddin e colleghi* hanno dimostrato come una risposta precoce delle

cellule T nei soggetti vaccinati svolge un ruolo centrale nel generare un'efficace protezione contro COVID-19 [94].

L'obiettivo del presente studio è stato quindi quello di valutare l'entità della risposta immunitaria, sia cellulare che umorale, in una coorte di soggetti affetti da patologie reumatologiche, trattati con farmaci immunosoppressori e sottoposti a vaccinazione con vaccino a mRNA anti SARS-CoV-2 (Pfizer BNT162b2). I pazienti reclutati nel nostro studio non hanno mai contratto l'infezione da SARS-CoV-2 prima di sottoporsi al completo ciclo vaccinale.

Materiali e metodi

Casistica

Per questo studio sono stati, inizialmente, reclutati 40 pazienti dall'Unità di Reumatologia e Immunologia Clinica, dell'A.O. Spedali Civili di Brescia, di cui 36 affetti da RDs autoimmuni e 4 da immunodeficienza comune variabile (CVID). Come gruppo di controllo (HC) sono stati reclutati 12 soggetti che non presentavano nessuna patologia autoimmune.

Poichè una precedente infezione da SARS-CoV-2 avrebbe potuto influenzare la risposta umorale e cellulo-mediata evocata dalla vaccinazione, è stato valutato in tutti i soggetti reclutati nello studio il titolo degli anticorpi diretti contro la proteina del nucleocapside di SARS-CoV-2. Sulla base dei dati ottenuti, due pazienti con patologia autoimmune e un soggetto del gruppo di controllo sono stati esclusi dallo studio.

Quindi, la coorte considerata in questo lavoro era infine composta da 38 pazienti adulti sottoposti a terapia immunosoppressiva (età ≥ 18 anni) e da 11 HC selezionati in modo paragonabile per sesso ed età ai pazienti con patologia autoimmune considerati. Ventiquattro pazienti erano affetti da artrite reumatoide sieropositiva (RA), caratterizzata in 13 casi sia dalla presenza del fattore reumatoide (FR+) che degli anticorpi anti-proteine citrullinate (ACPA+); i restanti 11 pazienti erano caratterizzati, invece, da singola positività a FR o ACPA; 4 pazienti erano affetti da CVID e mostravano livelli di IgG pari a 500 mg/dL prima della vaccinazione; 4 pazienti erano affetti da vasculite sistemica (SV), di cui 2 presentavano anticorpi anti-citoplasma dei neutrofili (ANCA). Tre pazienti erano affetti da miosite

infiammatoria idiopatica (MII), con presenza di anticorpi anti-SRP, anti-PL12, anti-Ro52 (2 casi) ed anti-Ku (1 caso); 2 pazienti affetti da sclerosi sistemica (SSc), ognuno dei quali caratterizzato dalla presenza di anticorpi anti-centromeri e anti-topoisomerasi I; 1 paziente era affetto da lupus eritematoso sistemico (LES) e caratterizzato da anticorpi anti-nucleo (ANA), ma non da anticorpi anti-dsDNA.

Le caratteristiche cliniche dei pazienti coinvolti e dei controlli sani sono riportate nella *Tabella 1*.

	PAZIENTI n.38 (%)	CONTROLLI n.11 (%)
N° donne	33 (87)	6 (55)
Età media	63 (53-69)	66 (56-69)
Tempo medio di durata della malattia	14 (11-21)	
DIAGNOSI:		
Artrite Reumatoide	24 (63)	
Vasculite sistemica	4 (10.5)	
Miosite infiammatoria idiopatica	3 (7.9)	
Lupus eritematoso sistemico	1 (2.6)	
Sclerosi sistemica	2 (5.2)	
Immunodeficienza comune variabile	4 (10.5)	
TRATTAMENTO:		
farmaci antireumatici modificanti la malattia (bDMARDs)	34/38 (89)	
ABA	14/34 (41.2)	
TCZ	10/34 (29.4)	
RTX	10/34 (29.4)	
+IVIG	4/38 (11)	
DMARD convenzionali - terapia associata	21/34 (44)	
Methotrexate	15/34 (44.1)	
Leflunomide	3/34 (8.8)	
Cyclosporine	2/34 (5.8)	
Mycophenolate-mofetil	1/34 (2.9)	
Glucocorticoids associated	22 (57.9)	
DOSE GIORNALIERA MEDIA DI SOMMINISTRAZIONE (mg):	3 (1-5)	
< 5mg PDN	9/22 (40.9)	
≥ 5mg PDN	13/22 (59)	

Tabella 1. Caratteristiche cliniche dei pazienti (38) e dei controlli sani (11).

Tutti i pazienti con RDs sono stati trattati con terapia corticosteroidica cronica, trattamento immunosoppressivo e/o con farmaci biologici; in particolare, 14

pazienti sono stati trattati con ABA, 10 con RTX e 10 con TCZ. ABA, RTX e TCZ sono farmaci approvati per casi di RA grave e sono raccomandati per il trattamento di tale patologia [95]. I pazienti affetti da CVID sono stati sottoposti ad infusioni mensili di immunoglobuline (IVIG), somministrate come supplemento. Le caratteristiche demografiche e cliniche tra il gruppo dei pazienti e il gruppo di controllo non presentavano differenze significative per sesso, età, durata della patologia e trattamento con i diversi farmaci (*tabella 2*).

	ABA n.14	TCZ n. 10	RTX n. 10	CVID n. 4
N° donne	13 (92.8%)	8 (80%)	8 (80%)	3 (75%)
Età media	62.4 (10.7)	63 (16.3)	57.3 (15.6)	66.2 (10.8)
Tempo medio di durata della malattia	19.8 (11.7)	14.4 (4.6)	16.3 (11.9)	18.2 (10.5)
+Corticosteroidi	11 (78.6%)	6 (60%)	6 (60%)	NA
Dose giornaliera media di somministrazione (mg)	3.76 (2.67)	3.8 (2.14)	4.28 (3.26)	NA
Methotrexate	7 (50%)	3 (30%)	3 (30%)	NA
Leflunomide	2 (14.3%)	1 (10%)	0	NA
Cyclosporine	0	1 (10%)	1 (10%)	NA
Mycophenolate-mofetil	0	1 (10%)	0	NA

Tabella 2. Caratteristiche cliniche dei diversi gruppi.

Tutti i soggetti reclutati per questo studio hanno ricevuto il vaccino PFIZER mRNA BNT162b2 (Comirnaty) e la loro risposta umorale e cellulo-mediata verso SARS-CoV-2 è stata valutata dopo il completamento del ciclo vaccinale.

Nel dettaglio, le due dosi previste dal ciclo vaccinale completo sono state somministrate ai pazienti trattati con ABA dopo 4.9 settimane dalla somministrazione dell'ultimo trattamento con il farmaco, nei pazienti trattati con RTX, il vaccino è stato somministrato dopo 6 mesi dall'ultima infusione, mentre i pazienti trattati con TCZ si sono sottoposti al ciclo vaccinale dopo 15 giorni dall'ultima somministrazione del farmaco, secondo le raccomandazioni dell'*European Alliance of Associations for Rheumatology* (EULAR) e

dell'*American College of Rheumatology* (ACR). Il numero medio di giorni tra l'ultimo trattamento con il farmaco e la raccolta del campione dopo la somministrazione della seconda dose di vaccino risultava essere pari a 29 giorni per il trattamento con ABA, 21 per quello con TCZ e 251 per RTX. Per quanto riguarda i controlli, invece, il numero medio di giorni trascorsi tra la somministrazione della seconda dose vaccinale e la raccolta del campione ematico è stato pari a 60 giorni.

I campioni ematici di 36 pazienti sono stati ulteriormente raccolti a seguito della somministrazione della terza dose di vaccino anti-SARS-CoV-2; 2 pazienti sui 38 totali non hanno ricevuto la terza dose, nel primo caso a causa di un rifiuto da parte del soggetto di sottoporsi alla somministrazione della dose "booster", nel secondo caso per decesso del paziente. I campioni ematici dopo il completamento del ciclo vaccinale sono stati raccolti nel periodo compreso tra giugno e luglio 2021, mentre quelli dopo la somministrazione della terza dose sono stati raccolti nel periodo compreso tra dicembre 2021 e gennaio 2022.

Studio della risposta anticorpale evocata dal vaccino Comirnaty

La quantificazione degli anticorpi totali (IgA, IgM e IgG) verso le proteine virali S e N di SARS-CoV-2 è stata eseguita mediante immuno-dosaggio ad elettro-chemiluminescenza con metodica Elecsys anti-SARS-CoV-2. I campioni di siero sono stati valutati sull'analizzatore Roche Cobas secondo il protocollo fornito dal produttore. I risultati sono stati calcolati automaticamente in U/mL sotto forma di indice di cutoff (COI), con valori < 0.80 e < 1.0 considerati negativi e con valori ≥ 0.80 e ≥ 1.0 U/mL considerati come positivi per gli anticorpi diretti rispettivamente verso le proteine virali S e N di SARS-CoV-2.

Studio della risposta cellulo-mediata

La risposta cellulo-mediata dei linfociti T è stata valutata mediante saggio QuantiFERON, un test che misura il rilascio dell'interferone- γ (Interferone- γ Release Assay, IGRA). Questo test si basa sulla stimolazione *in vitro* dei linfociti T CD4⁺ o CD4⁺-CD8⁺ nel sangue intero eparinizzato con una combinazione di antigeni specifici della proteina S di SARS-CoV-2 (Ag1 e Ag2), cui segue la misurazione della produzione di IFN- γ mediante saggio immunoenzimatico in fase solida (ELISA).

In particolare, sono stati utilizzati 2 tubi di QuantiFERON SARS-CoV-2 Starter Set per il prelievo del campione ematico, denominati Ag1 e Ag2. Il tubo QuantiFERON SARS-CoV-2 Ag1 contiene epitopi derivati dalla subunità S1 della proteina S, che possono essere presentati solo a linfociti T CD4⁺, mentre il tubo Ag2 contiene una combinazione di epitopi derivati dalle subunità S1 e S2, che possono essere presentati sia ai linfociti T CD4⁺ che ai CD8⁺; il test è corredato, inoltre, di provette utilizzate come controllo negativo (Nil) e positivo (mitogeni). La subunità S1 è stata utilizzata per ridurre il più possibile le risposte aspecifiche ad altri Coronavirus [91]. Infatti, la porzione S2 della proteina S rappresenta la regione più conservata di SARS-CoV-2 ed è molto simile in tutti i Coronavirus; questa omologia conferisce a tale subunità la capacità di generare risposte aspecifiche ad altri Coronavirus a cui i pazienti possono essere stati esposti in passato. I tubi contenenti i campioni ematici sono stati incubati a 37°C per 16-24 ore ed in seguito centrifugati per 15 minuti a 2500g così da poter raccogliere il plasma. Il plasma recuperato dai campioni stimolati è stato utilizzato per la rilevazione di IFN- γ utilizzando l'analizzatore

automatico Personal LAB ELISA. I campioni sono stati trattati secondo le istruzioni del produttore. I valori finali di IFN- γ (UI/mL) sono stati ricavati sottraendo il valore Nil dai dati ottenuti, così da evitare risultati aspecifici. La risposta positiva è stata definita per un valore di cutoff ≥ 0.15 UI/mL.

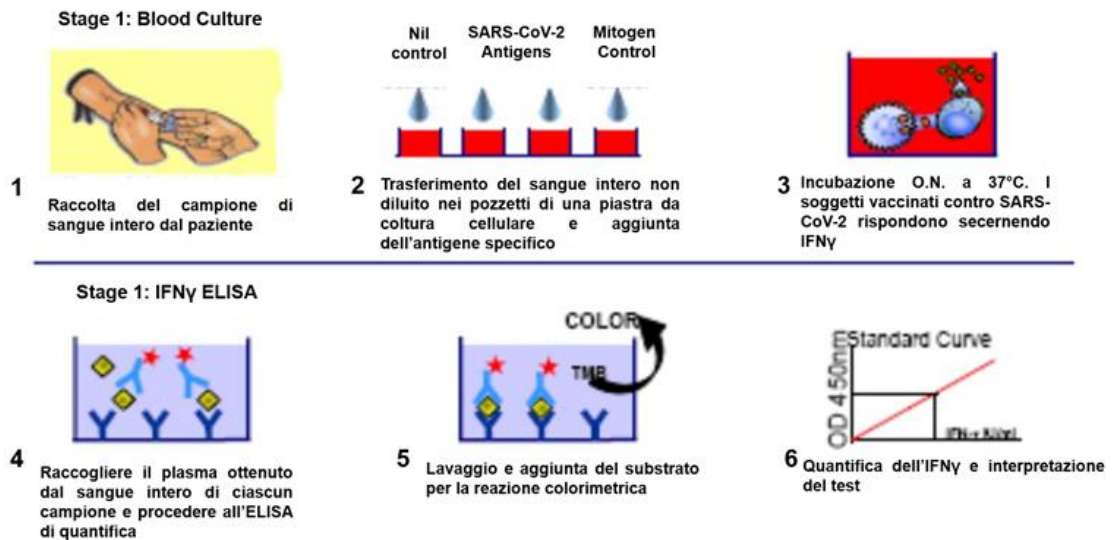


Figura 10: QuantiFERON test.

Isolamento di cellule mononucleate del sangue periferico (PBMCs) dei pazienti

Il campione di sangue intero dei soggetti sottoposti allo studio, è stato raccolto in tubi BD Vacutainer Plus Plastic Whole Blood utilizzando l'eparina come anticoagulante [96]. Per ottenere i PBMCs, il campione è stato “stratificato” su Ficoll-HyPaque Lymphocyte e centrifugato secondo gradiente di densità.

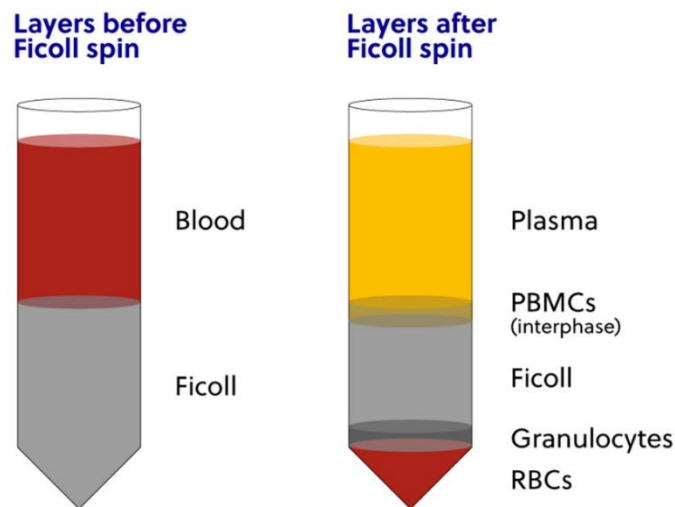


Figura 11: Separazione dei PBMCs mediante Ficoll.

Le cellule isolate sono state poi lavate in tampone fosfato salino (PBS) e seminate in piastre da 96 pozzetti con fondo a U ad una densità di 1×10^6 cellule/pozzetto e coltivate in terreno RPMI contenente 60 mg/L di penicillina, 12.5 mg/L di streptomina e 10% di siero fetale bovino (FBS), precedentemente inattivato a 56°C .

Induzione di PBMCs SARS-CoV-2-specifici

Per ottenere PBMCs SARS-CoV-2-specifici, 1×10^6 di cellule isolate da ogni paziente sono state stimulate con $1 \mu\text{g/mL}$ di un “pool” di peptidi con lunghezza media pari a 15 aminoacidi sintetizzati sull’intero dominio N-terminale della subunità S1 di SARS-CoV-2. Due ore dopo l’aggiunta del “pool” di peptidi, ai PBMCs sono stati aggiunti $1 \mu\text{g/mL}$ di brefeldina A e $1 \mu\text{g/mL}$ di monensina. Ventiquattro ore dopo il trattamento, i PBMCs così ottenuti sono stati risospesi in terreno completo ed è stata analizzata l’espressione citochinica intracitoplasmatica mediante citometria a flusso.

Analisi citofluorimetrica della produzione citochinica intracitoplasmatica di PBMCs SARS-CoV-2-specifici

I PBMCs ottenuti dai pazienti e stimolati come descritto precedentemente, sono stati lavati con PBS e colorati con LIVE/DEAD BD Fixable Viability Stain 70 per 10 minuti a 4°C per determinarne la vitalità. Dopo un lavaggio con PBS, le cellule sono state trattate con FcR blocking reagent a 4°C per 10 minuti e colorate con una combinazione appropriata di anticorpi per la marcatura delle diverse sottopopolazioni cellulari. Nel dettaglio, le cellule sono state incubate con una miscela di anticorpi anti-CD3, CD4 e CD8 diluiti in 50 µL di tampone Brilliant Stain ed incubati per 15 minuti a temperatura ambiente. Successivamente, le cellule sono state lavate con PBS e fissate con 100 µl di tampone A (fissante). Trascorso il tempo di fissazione, le cellule sono state lavate in PBS ed incubate con una miscela contenente anticorpi specifici anti-IL-2, anti-IL-17, anti-IFN- γ , anti-CD40L e anti-CD137 diluiti in 100 µl di tampone B (permeabilizzante), per la marcatura intracitoplasmatica delle citochine. Le cellule sono state quindi lavate con PBS, acquisite mediante citofluorimetro BD FACSCelesta ed analizzate attraverso il software FloJo. In tutte le analisi citofluorimetriche sono stati acquisiti fra i 50×10^4 ed i 1×10^5 eventi nel gate dei linfociti CD3.

Analisi citofluorimetrica della produzione di chemochine da parte di linfociti T ottenute dai campioni sottoposti al QuantiFERON test

Sui campioni precedentemente sottoposti al saggio del QuantiFERON, sono stati analizzati i livelli di chemochine prodotte da linfociti T in risposta alla stimolazione con peptidi specifici per SARS-CoV-2. Il dosaggio è stato effettuato mediante l'uso di "cytometric bead array method" (CBA) utilizzando lo Human Chemokine Kit,

seguendo le istruzioni del produttore, che permette l'analisi simultanea di differenti citochine. In particolare, sono state quantificate le seguenti citochine: CXCL10 (IP-10), CXCL8 (IL-8), CXCL9 (MIG), CCL5 (RANTES) e CCL2 (MCP-1).

In seguito, i campioni sono stati acquisiti sul citofluorimetro BD FACSCelesta Cell ed analizzati con il software FCAP v3; la percentuale di cellule non stimulate è stata sottratta dalla percentuale di cellule stimulate per ogni coppia di campioni.

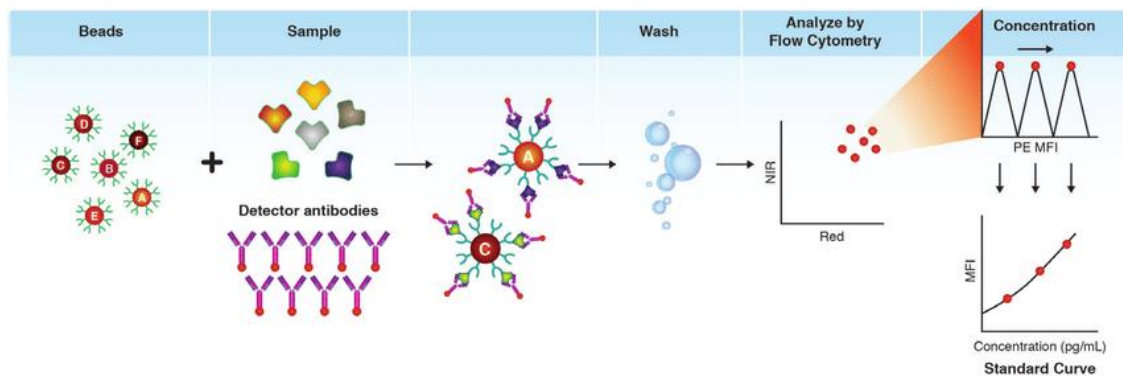


Figure 12: Cytometric Bead Array method (CBA).

Analisi del “repertoire” di cellule T specifiche

La specificità dei linfociti T $CD4^+$ o $CD8^+$ nei confronti della proteina S di SARS-CoV-2 è stata valutata mediante citometria a flusso. Sulla base di recenti studi riportati in letteratura [53, 91], è stata studiata l'espressione di CD40L, CD137, come marcatori di attivazione precoce dei linfociti T, ed IL-2, IFN- γ ed IL-17 come citochine intracellulari.

Analisi del subset dei linfociti T

Il sangue fresco intero (200 μ l) ottenuto dai pazienti è stato colorato per l'analisi dell'immuno-fenotipo dei linfociti T. Dopo la colorazione con LIVE/DEAD (vedi

sopra), i campioni di sangue sono stati colorati con la seguente combinazione di anticorpi monoclonali: anti-CCR7, anti-CD4, anti-CD28, anti-CD8, anti-CD95, anti-CD45RO e anti-CD3 diluiti in 50 µl di brilliant stain buffer per 15 minuti. I campioni sono stati poi lisati e fissati in buffer “Fix and Lyse” per 15 minuti a temperatura ambiente. Dopo essere stati lavati, sono stati acquisiti mediante analizzatore BD FACSCelesta. I dati ottenuti sono stati analizzati mediante software FlowJo versione 10.0 (Tree Star Inc.). In tutte le analisi citofluorimetriche sono stati acquisiti non meno di 1×10^4 eventi nel gate dei linfociti CD3.

Analisi statistica

La dimensione del campione è stata calcolata mediante il software Epi Info versione 7 ed inclusa nello studio approvato dal comitato etico locale. Sono stati coinvolti 37 soggetti in relazione all’obiettivo primario, considerando una prevalenza globale di patologie reumatiche pari al 2,5%, ipotizzando una popolazione di dimensioni potenzialmente infinite, un margine di errore accettabile del 5% ed un intervallo di confidenza del 95%. I dati sono stati ottenuti da molteplici esperimenti indipendenti, in modo da garantire la riproducibilità dei risultati ed espressi come media \pm deviazioni standard (DS) nel testo e come mediana con intervallo interquartile (IQR) nelle figure. Per confrontare le variabili continue dei gruppi indipendenti sono stati utilizzati il test t di Student ed il test U di Mann-Whitney. Le relazioni tra le variabili dipendenti continue, Y, e 2 gruppi come variabili indipendenti, X, sono state analizzate confrontando coppie linearmente indipendenti e l’analisi è stata basata sul Modello Generale Lineare Multivariato.

È stato considerato significativo un p value < 0.05 . L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il software IBM-SPSS versione 26.0.1.

Risultati

Valutazione della risposta anticorpale (o umorale) evocata dal vaccino Comirnaty

Dall'analisi del titolo anticorpale anti-proteina N di SARS-CoV-2, tutti i 38 pazienti reclutati nel presente studio hanno dimostrato di non aver contratto l'infezione naturale da SARS-CoV-2 prima di ricevere il vaccino Comirnaty. Come riportato nel grafico ed in tabella, non sono state riscontrate differenze significative nei titoli anticorpali tra i diversi gruppi di pazienti e tra gli individui sani di controllo. (*figura 13 o tabella 3*)

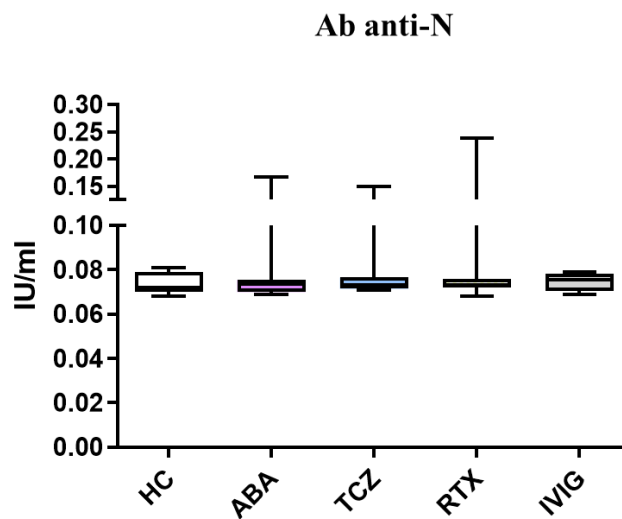


Figura 13. Titoli anticorpali della proteina N di SARS-CoV-2.

L'analisi dei livelli di anticorpi neutralizzanti totali anti-S ha mostrato una forte risposta anticorpale diretta verso la proteina S di SARS-CoV-2 dopo la somministrazione della seconda dose di vaccino nel gruppo HC (*figura 14*). Nei gruppi di pazienti trattati con TCZ, RTX e IVIG, il titolo anticorpale era

leggermente inferiore a quello del gruppo HC, seppur in modo non significativo (*figura 14*). Tutti i pazienti trattati con TCZ e IVIG hanno generato una risposta umorale, mentre nel gruppo dei pazienti trattati con RTX il tasso di sieroconversione è risultato essere pari al 70%. Al contrario, i pazienti trattati con ABA hanno mostrato un titolo anticorpale significativamente più basso rispetto al gruppo controllo HC (*figura 14*). Inoltre, il 7% di questi pazienti (1/14) non ha generato alcuna risposta anticorpale anti-S.

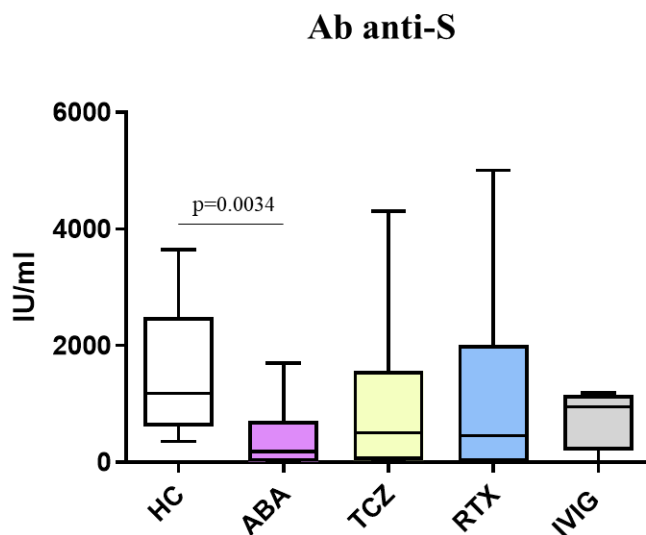


Figura 14. Analisi dei livelli di anticorpi neutralizzanti totali anti-S.

I risultati ottenuti hanno mostrato come solo i pazienti trattati con ABA presentavano livelli di anticorpi anti-S, evocati dalla vaccinazione anti-SARS-CoV-2, significativamente ridotti rispetto al gruppo di controllo. Al contrario, pazienti trattati con TCZ, RTX e IVIG, non presentavano differenze nel titolo anticorpale se confrontati con il gruppo dei soggetti sani (*Figura 14 o tabella 3*).

	Media Ab vs N (UI/ml)	Dev. Standard	Media Ab vs S (UI/ml)	Dev. Standard
CONTROLLI SANI	0.07345	±0.004569	1479	± 1051
TOCILIZUMAB	0.08211	±0.02556	986	± 1473
RITUXIMAB	0.08827	±0.05007	1272	± 1720
IVIG	0.07475	±0.004193	773	± 535
ABATACEPT	0.07993	±0.02535	432	± 562

Tabella 3: Media dei valori degli anticorpi neutralizzanti totali anti-N e anti-S di SARS-CoV-2.

Valutazione della risposta cellulo-mediata

La risposta immunitaria cellulo-mediata dei soggetti sottoposti al ciclo vaccinale completo è stata analizzata valutando il rilascio di IFN- γ da parte dei linfociti T stimolati con due “pool” diversi di peptidi, denominati Ag1 e Ag2, derivati dalla proteina S di SARS-CoV-2.

Come mostrato nella *figura 15*, pannelli A e B, il gruppo HC ha mostrato una risposta specifica delle cellule T CD4⁺ e CD4⁺-CD8⁺ in risposta ai peptidi Ag1 e Ag2 di SARS-CoV-2 con secrezione di alti livelli di IFN- γ (rispettivamente, 0.9 ± 0.66 e 1.48 ± 1.03 UI/mL). I pazienti trattati con ABA, invece, hanno mostrato una secrezione di IFN- γ da parte delle cellule T CD4⁺ (0.38 ± 1.1 UI/mL, *figura 15*, pannello A) e CD4⁺-CD8⁺ (0.5 ± 1.07 UI/mL, *figura 15*, pannello B) significativamente ridotta se confrontata con il gruppo di controllo (rispettivamente, p=0.0016 e p=0.0078). Il gruppo di pazienti trattato con ABA ha mostrato, inoltre, una ridotta risposta cellulo-mediata, seppure non significativa, delle cellule T CD4⁺, rispetto al gruppo di pazienti trattati con TCZ (1.88 ± 2.44 UI/mL; p=0.066) (*figura*

15, pannello A). Infatti, solo il 29% dei pazienti trattati con ABA ha mostrato la capacità di sviluppare una risposta cellulo-mediata nei confronti dei peptidi di SARS-CoV-2. Al contrario, i soggetti trattati con TCZ, RTX e IVIG hanno mostrato una risposta cellulo-mediata dei linfociti CD4⁺ e CD4⁺-CD8⁺, paragonabile a quella osservata nel gruppo di controllo (figura 12 A e B).

Complessivamente, questi risultati hanno evidenziato la ridotta capacità dei pazienti trattati con ABA di attivare una risposta cellulo-mediata con rilascio di IFN- γ in risposta alla stimolazione delle cellule T con i peptidi di SARS-CoV-2, rispetto al gruppo di controllo e ai pazienti trattati con gli altri farmaci immunosoppressivi.

Valutazione delle diverse sottopopolazioni delle cellule T

Dalle analisi eseguite sulle sottopopolazioni di linfociti T isolati dagli individui inclusi nello studio, il numero di linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ e la quantità di cellule naïve, cellule della memoria, cellule differenziate, cellule differenziate terminali e della memoria staminale (calcolate come percentuali sul totale delle cellule parentali) non variavano significativamente tra i diversi gruppi (dati non mostrati).

Al contrario, è stata osservata una riduzione significativa della sottopopolazione di cellule T CD8⁺ effettrici della memoria (CD8⁺ Tem) sia nei pazienti trattati con ABA (27.41% \pm 10.23%) che in quelli trattati con TCZ (22.93% \pm 13.70%), rispetto al gruppo di controllo (38.77% \pm 10.72%; rispettivamente, p=0.0109 e p=0.0122) (figura 15, pannello C).

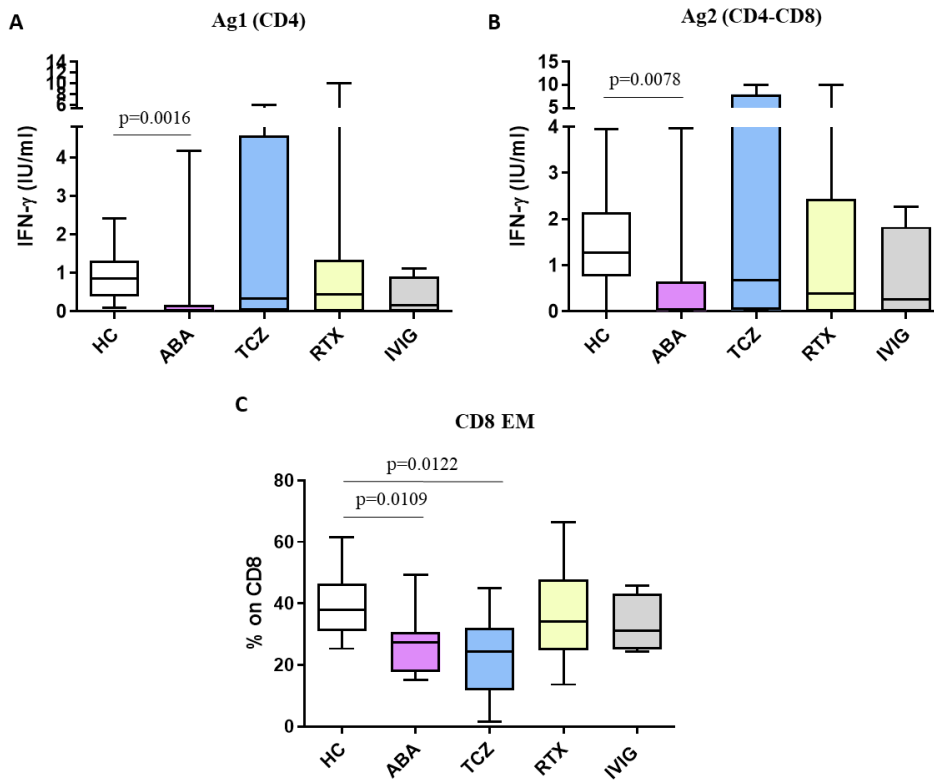


Figura 15. (A-B) Analisi della risposta cellulo-mediata indotta dai peptidi Ag1 e Ag2 derivati dalla proteina S di SARS-CoV-2, (C) analisi della sottopopolazione di cellule CD8⁺ TEM.

Inoltre, nei gruppi trattati con ABA è stato osservato una minore percentuale della sottopopolazione CD4⁺ TEM rispetto al gruppo controllo HC, senza però mostrare differenze statisticamente significative ($p=0.1468$) (figura 16, pannello A). Non è stata osservata, invece, alcuna differenza nel rapporto CD4⁺/CD8⁺ e nella percentuale di CD3⁺ tra le diverse coorti (figura 16, pannelli B e C).

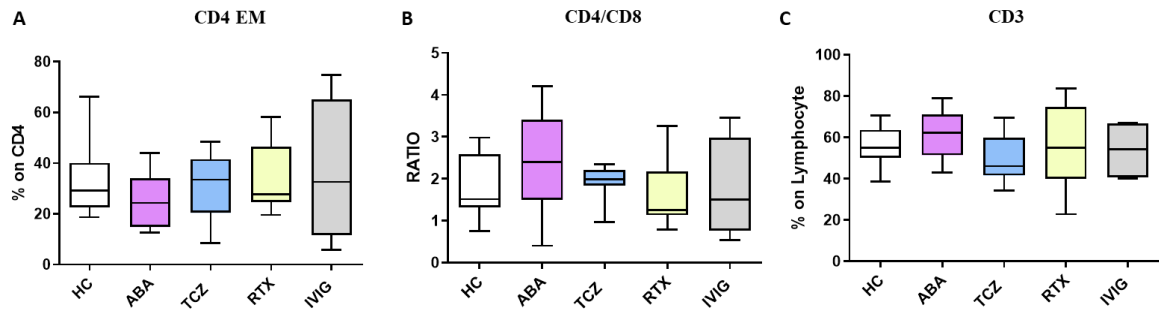


Figura 16. (A) analisi della sottopopolazione di cellule T CD4⁺ effettrici della memoria. (B) rapporto CD4⁺/CD8⁺; (C) tasso di CD3⁺.

In conclusione, l'analisi delle sottopopolazioni delle cellule T ha evidenziato una riduzione significativa delle cellule CD8⁺ TEM nei pazienti trattati con ABA e TCZ, rispetto al gruppo di controllo.

Analisi del profilo chemochinico di linfociti T SARS-CoV-2-specifici

Per analizzare in modo approfondito la risposta cellulo-mediata in seguito alla somministrazione del vaccino anti-SARS-CoV-2, abbiamo valutato, sullo stesso campione utilizzato per il saggio QuantiFERON, le principali chemochine la cui espressione è noto essere aumentata in risposta alla stimolazione con peptidi specifici, Ag1 e Ag2, contro la proteina S di SARS-CoV-2. Nel dettaglio, sono state valutate le seguenti chemochine: MIG (CXCL9) e IP-10 (CXCL10), chemochine indotte da IFN- γ ; MCP-1 (CCL2) e IL-8 (CXCL8), chemochine derivate dai monociti; e CCL5 (RANTES) come chemochina coinvolta nella risposta infiammatoria.

I dati ottenuti hanno mostrato come i soggetti trattati con ABA presentino livelli plasmatici più bassi di CXCL10 rispetto al gruppo controllo, sia nei campioni stimolati con Ag1 (2687 ± 5333 pg/mL vs 6454 ± 6649 pg/mL; $p=0.0048$) che con Ag2 (3273 ± 4830 pg/mL vs 8466 ± 7311 pg/mL; $p=0.0079$) (figura 17, pannello A). Per quanto riguarda la produzione di CXCL9, abbiamo rilevato livelli significativamente ridotti nei pazienti trattati con ABA rispetto al gruppo HC sia in seguito a stimolazione con Ag1 (403.0 ± 650.1 pg/mL vs 2182 ± 2132 pg/mL; $p=0.0011$) che con Ag2 (532.8 ± 714.9 pg/mL vs 2989 ± 2665 pg/mL; $p=0.0006$) (figura 17, pannello B). Al contrario, i livelli plasmatici di MCP-1 (CCL2) e IL-8 (CXCL8) non variavano significativamente tra i diversi gruppi (dati non mostrati).

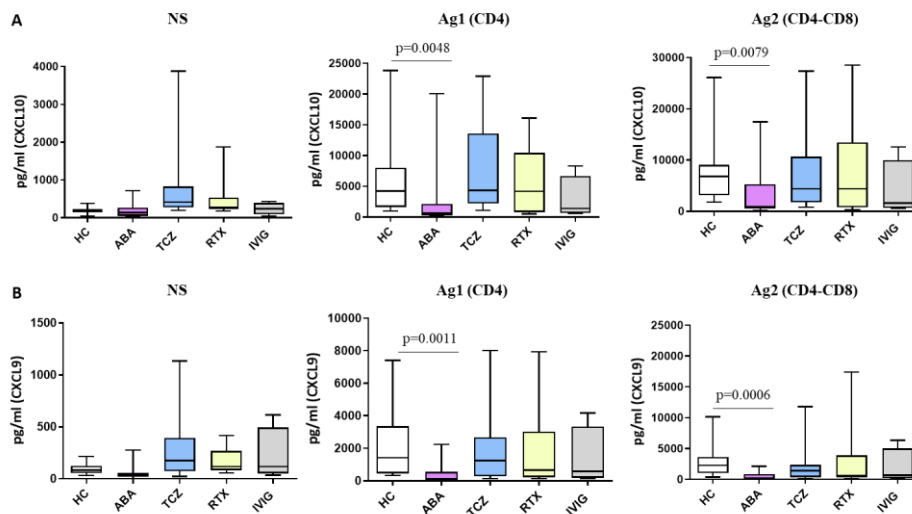


Figura 17. Analisi delle chemochine CXCL10 (A) e CXCL9 (B) studiate in risposta alla stimolazione con peptidi Ag1 e Ag2 nei diversi gruppi.

Infine, i livelli di RANTES (CCL5) risultavano significativamente inferiori nei pazienti trattati con ABA rispetto al gruppo controllo HC solo nelle cellule non stimolate (16720 ± 6901 pg/mL vs 22680 ± 7652 pg/mL; $p=0.020$) ed in quelle

stimolate con Ag1 (20950 ± 7413 pg/mL vs 27660 ± 8502 pg/mL; $p=0.0401$).
(figura 18).

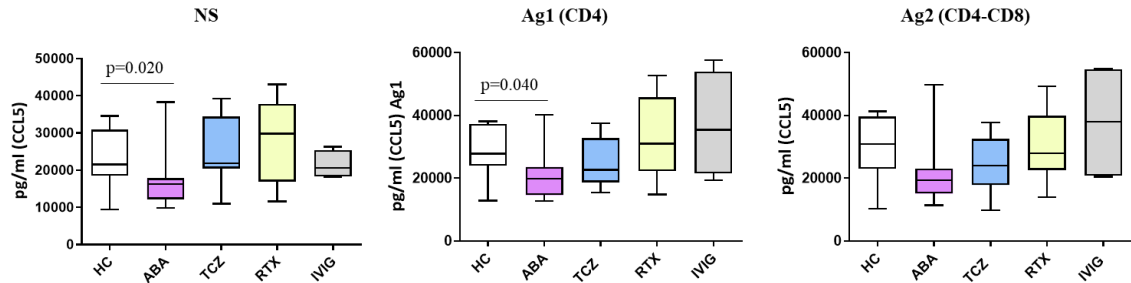


Figura 18. Analisi della chemochina CCL5 studiata in risposta alla stimolazione con peptidi Ag1 e Ag2 nei diversi gruppi.

Come mostrato nella *Tabella 4*, l'analisi GLM multivariata ha confermato una correlazione diretta tra il trattamento con ABA e la riduzione di CXCL10 in cellule T stimulate con Ag2 ($p=0.044$), la riduzione di CXCL9 in cellule T stimulate con Ag1 ($p=0.007$) e con Ag2 ($p=0.003$), e la riduzione di IFN- γ in seguito a stimolazione delle cellule con Ag2 ($p=0.031$).

	ABA (n.14)	HC (n.11)
Livelli di CXCL10 dopo stimolazione con Ag1	646.04 (132.9-20055.58)	4227.66 (975.5-23796.11)
Livelli di CXCL10 dopo stimolazione con Ag2	919.64 (186.32-17450.19)	6780.87 (1770.99-26102.46)
Livelli di CXCL9 dopo stimolazione con Ag1	92.43 (22.99-2239.84)	1420.36 (331.16-7396.36)
Livelli di CXCL9 dopo stimolazione con Ag2	176.13 (24.21-2138.90)	2258.80 (354.3-10128.63)
Livelli di IFN- γ dopo stimolazione con Ag1	0.02 (0-4.17)	0.85 (0.09-2.42)
Livelli di IFN- γ dopo stimolazione con Ag2	0.05 (0-3.97)	1.28 (0.01-3.95)

Tabella 4. Confronto tra i gruppi trattati con ABA e i controlli sani per quanto riguarda i livelli di CXCL10, CXCL9 e IFN- γ dopo la stimolazione con Ag1 e Ag2.

Valutazione dell'aumento della produzione di chemochine tra cellule T non stimulate e stimulate con Ag1 e Ag2

Come mostrato nella *figura 19*, in tutti i gruppi è stato osservato l'aumento, espresso come "fold increase", dei livelli di chemochine tra cellule T non stimulate o stimulate con i peptidi Ag1 e Ag2.

Sia i gruppi di pazienti trattati che il gruppo controllo, hanno mostrato un aumento significativo di CXCL10 e CXCL9 tra le cellule T non stimulate e quelle stimulate con Ag1, oltre che tra le cellule T non stimulate e quelle stimulate con Ag2 (*figura 19*, pannelli A e B).

Inoltre, in tutti i gruppi è stato osservato un aumento significativo anche di CCL2, CXCL8 e CCL5 nelle cellule T stimulate con Ag1 e con Ag2, rispetto alle cellule non stimulate (*figura 19*, pannelli C, D e E).

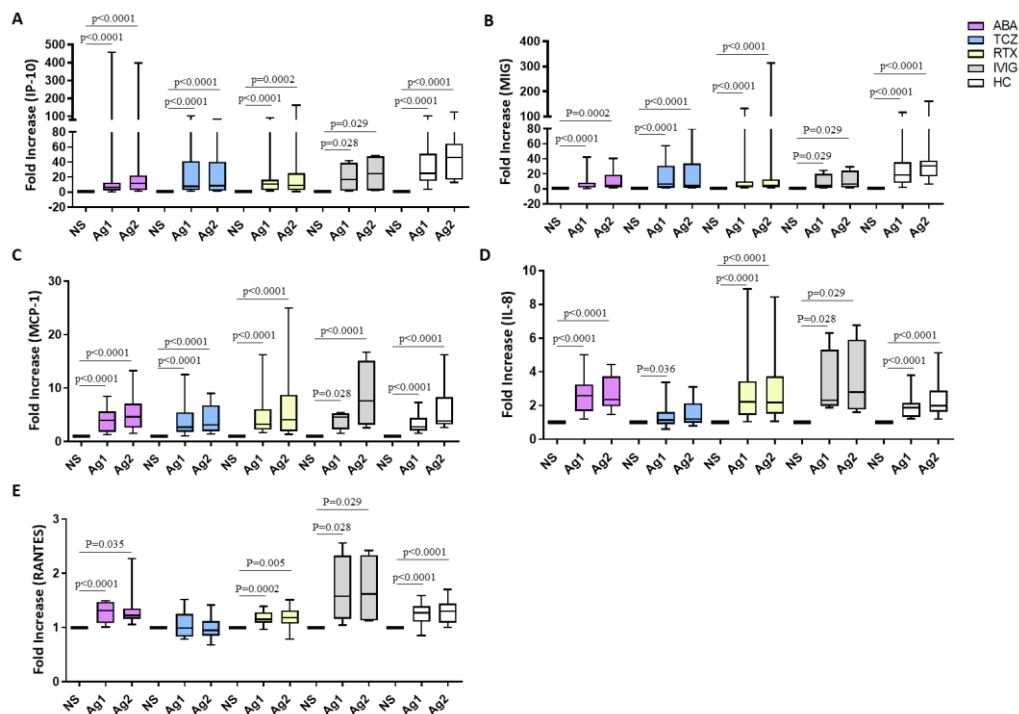


Figura 19. Analisi della produzione di chemochine tra cellule T non stimulate e stimulate con Ag1 e Ag2.

Nei pazienti trattati con ABA è stato osservato il minore aumento di CXCL10 e CXCL9 in seguito a stimolazione con Ag1 e Ag2, rispetto al gruppo controllo HC (Tabella 6).

	ABA (n.14)	RTX (n.10)	TCZ (n.10)	CVID (n.4)	HC (n.11)	p*
CXCL10 (Ag1-NS) (FI)	6.33 (1-456.8)	12.9 (1.53-91.35)	4.11 (1.11-102.68)	16.8 (1.75-41.8)	22.53 (4.08-82.91)	0.0138
CXCL10 (Ag2-NS) (FI)	11.57 (1.44-397.5)	10.8 (1.47-161.95)	3.05 (0.9-84.37)	24.79 (2.48.38)	35.74 (12.9-153.51)	0.0073
CXCL9 (Ag1-NS) (FI)	2.955 (0.59-42.42)	5.14 (1.52-132.7)	1.91 (1-57.28)	4.47 (1.37-24.67)	17.03 (2.3-117.23)	0.01
CXCL9 (Ag2-NS) (FI)	4.58 (1.22-40.5)	5.75 (1.45-314.22)	1.44 (1.12-79.72)	6.43 (1.78-29.2)	32.12 (6.6-160.54)	0.0044

Tabella 6. Confronto tra i gruppi trattati in fold increase (mediana) per quanto riguarda i livelli di CXCL10, CXCL9 dopo la stimolazione con Ag1 e Ag2.

In conclusione, anche se i pazienti trattati con ABA hanno mostrato una minore produzione di chemochine indotte da IFN- γ , come CXCL9 e CXCL10, rispetto al gruppo di controllo, essi hanno mantenuto la capacità di incrementare la produzione di tali chemochine in seguito a stimolazione con peptidi derivati dalla proteina S, Ag1 e Ag2.

Analisi del “repertoire” di cellule T SARS-CoV-2 specifiche

Infine, per verificare se nei soggetti vaccinati fossero presenti cloni di linfociti T SARS-CoV-2-specifici, abbiamo stimolato con il peptide specifico della subunità S1 di SARS-CoV-2 i PBMCs dei pazienti e dei controlli, e abbiamo valutato l'espressione di alcuni marcatori specifici di attivazione dei linfociti T quali CD40L, CD137, IL-2, IFN- γ e IL-17. Come mostrato nella *Figura 20, pannelli A,*

C, E, G, non è stata osservata alcuna differenza significativa nella percentuale di cellule T doppiamente positive CD40L/CD137, CD40L/IL-2, CD40L/IFN- γ e CD40L/IL-17 nei diversi gruppi sia dei pazienti che dei soggetti di controllo. Inoltre, l'analisi della percentuale delle popolazioni di CD4⁺ e CD8⁺ doppiamente positive per CD40L/CD137, CD40L/IL-2, CD40L/IFN- γ e CD40L/IL-17, ha mostrato una predominanza della sottopopolazione CD4⁺, mentre la sottopopolazione attivata CD8⁺ era molto bassa o addirittura assente in tutti i gruppi analizzati (Figura 20, pannelli B, D, F, H).

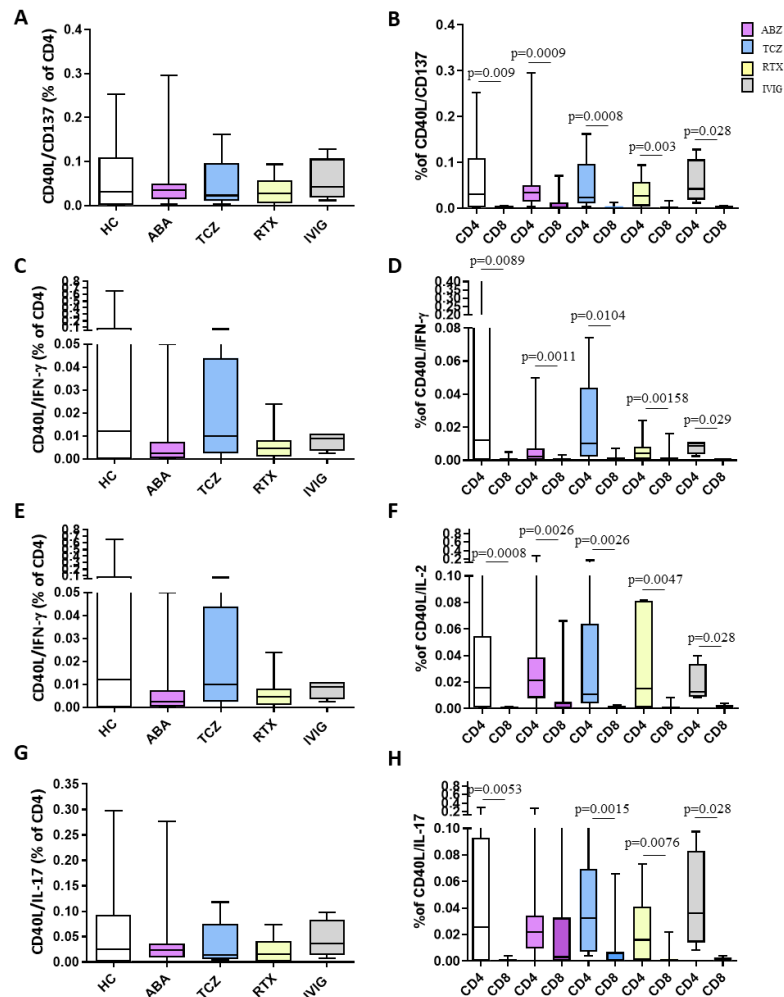


Figura 20. Analisi dell'espressione di CD40L, CD137, IL-2, IFN- γ e IL-17 su cellule T CD4⁺ e CD8⁺ nei diversi gruppi dei soggetti analizzati.

In conclusione, la somministrazione del vaccino a mRNA anti-SARS-CoV-2, è stata in grado di indurre la formazione di cellule T CD4⁺ specifiche verso la proteina S di SARS-CoV-2 in tutti i pazienti trattati, se confrontati con il gruppo controllo HC, mentre la formazione di cloni CD8⁺ SARS-CoV-2 specifici è risultata bassa o addirittura assente sia nei soggetti sani che in quelli sottoposti a terapia immunosoppressiva.

Effetti della terza dose di vaccino a mRNA anti-SARS-CoV-2

Come mostrato nel grafico della *figura 21*, tutti i pazienti sottoposti allo studio hanno mostrato un titolo anticorpale verso la proteina N di SARS-CoV-2 inferiore a 0.8 U/ml, indicando che nessuno dei soggetti aveva contratto l'infezione naturale dopo la somministrazione della terza dose.

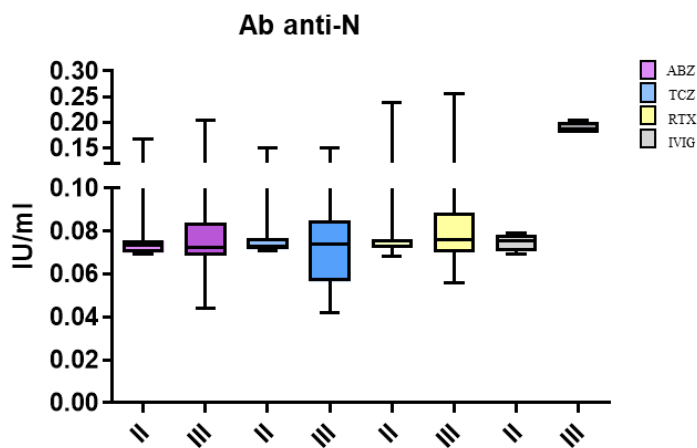


Figura 21. Titoli anticorpali della proteina N di SARS-CoV-2 dopo la terza dose di vaccino.

Sulla base di questo risultato, 36 soggetti sono stati inclusi in un ulteriore studio per valutare la risposta umorale e cellulo-mediata in risposta alla terza dose di vaccino

a mRNA Pfizer BNT162b2. Dopo la somministrazione della dose “booster”, abbiamo osservato un aumento significativo degli anticorpi anti-S nei pazienti trattati con ABA, se confrontati con il titolo anticorpale ottenuto dopo la seconda dose vaccinale (432.3 ± 562.0 vs 2423 ± 1896 UI/mL; $p=0.0047$). Inoltre, i gruppi di pazienti trattati con TCZ e IVIG hanno mostrato un titolo anticorpale più alto dopo la somministrazione della terza dose rispetto a quello ottenuto dopo la seconda dose, sebbene non statisticamente significativo. Al contrario, nei pazienti trattati con RTX, il titolo di anticorpi anti-S non è variato dopo la somministrazione della terza dose se confrontato con quello ottenuto dopo la seconda dose (*Figura 22 pannello A*).

In nessun gruppo di pazienti è stata osservata alcuna differenza nel rilascio di IFN- γ da parte delle cellule T in risposta alla stimolazione con Ag1 e Ag2 dopo la terza dose di vaccino (*Figura 22 pannelli B e C*). Inoltre, in tutti i gruppi analizzati, non è stata osservata alcuna differenza nella percentuale di cellule T CD4⁺ effettrici, nel rapporto tra CD4⁺/CD8⁺ e nella percentuale di CD3⁺ (*Figura 18 pannelli B, C e D*) così come, in nessun gruppo di pazienti risultava variata la percentuale di cellule T CD8⁺ della memoria dopo la somministrazione della terza dose se confrontati con i valori ottenuti dopo la seconda dose (*Figura 22 pannello D*).

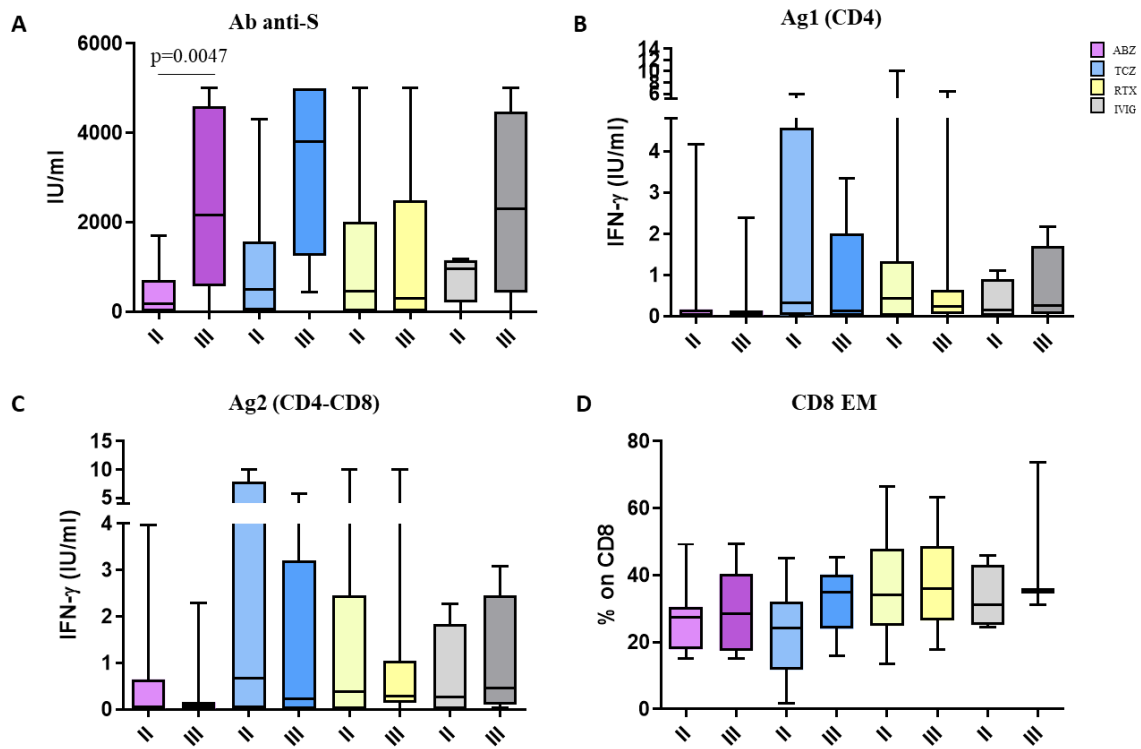


Figura 19. Confronto tra il titolo anticorpale anti-S (A), il rilascio di IFN- γ post stimolazione con pool di peptidi, Ag1 (B), Ag2 (C) e la sottopopolazione di cellule T CD8 effettrici della memoria (D) nei diversi gruppi di pazienti dopo la somministrazione della seconda e della terza dose di vaccino

Nel complesso, questi dati mostrano come, dopo la terza dose di vaccino anti-SARS-CoV-2, i pazienti trattati con ABA, siano stati in grado di aumentare significativamente la risposta anticorpale verso la proteina S di SARS-CoV-2 rispetto a quanto osservato dopo la seconda dose di vaccino. Tuttavia, questi pazienti non hanno sviluppato un'ulteriore risposta diretta verso SARS-CoV-2 delle cellule T, che è risultata paragonabile a quella ottenuta dopo la somministrazione della seconda dose di vaccino Comirnaty.

Discussione e conclusioni

In questo studio abbiamo valutato la capacità dei pazienti affetti da RD autoimmune, trattati con differenti terapie immunosoppressive, e di pazienti affetti da COVID, trattati con IVIG, di generare una risposta immunitaria specifica sia umorale che cellulo-mediata, in seguito alla somministrazione di due o tre dosi del vaccino anti-SARS-CoV-2 a mRNA Pfizer BNT162b2.

I risultati principali sono stati: (i) una ridotta risposta anti-S nei pazienti trattati con ABA, ripristinata dopo la terza dose vaccinale; (ii) una ridotta attivazione delle cellule T nei pazienti trattati con ABA, rappresentata da una riduzione di IFN- γ e chemochine (CXCL9 e CXCL10); (iii) una riduzione di cellule T CD8⁺ della memoria nei pazienti trattati con ABA; (iv) una significativa abilità dei pazienti trattati con ABA di sviluppare una risposta cellulo-mediata delle cellule T CD4⁺, se stimulate con antigene virale derivato dalla proteina S di SARS-CoV-2.

Dai dati ottenuti in questo lavoro, è stato evidenziato come i pazienti trattati con ABA correlino con una ridotta capacità di produrre anticorpi anti-S in risposta al vaccino Pfizer BNT162b2, mentre i soggetti trattati con RTX e TCZ hanno mostrato un titolo anticorpale leggermente ridotto rispetto al gruppo controllo HC, ma con un'alta percentuale di sierconversione pari, rispettivamente, al 70% ed al 100%. Questi dati sono in linea con i risultati di sierconversione ottenuti in diversi lavori, in cui i pazienti trattati con TCZ hanno mostrato un'eccellente risposta anticorpale dopo la somministrazione del vaccino anti-SARS-CoV-2 (> 90%), mentre i pazienti trattati con ABA hanno mostrato una bassa percentuale di sierconversione (< 70%) [97, 98, 99]. Diversi Autori hanno riportato una bassa percentuale di

sieroconversione, anche, in pazienti trattati con RTX [98, 99], mentre nel nostro caso questo farmaco non ha influenzato in modo significativo la risposta umorale, che è risultata paragonabile a quella del gruppo di controllo. Questi dati discrepanti potrebbero essere attribuibili al momento della vaccinazione ed al campionamento, essendo considerati aspetti critici per lo sviluppo della risposta anticorpale durante il trattamento con RTX [98, 99]. Nel nostro studio, la vaccinazione è stata effettuata dopo 6 mesi dall'ultimo trattamento con RTX ed il prelievo ematico è stato effettuato dopo 2 mesi dalla somministrazione della seconda dose di vaccino. Altri gruppi non hanno riportato se la terapia con RTX fosse stata interrotta o ritardata prima della vaccinazione e delle procedure di campionamento [98, 99]; tuttavia, il periodo tra l'esposizione all'RTX e la raccolta del campione sembrava essere più breve rispetto a quello previsto nella nostra coorte. Nel nostro studio, inoltre, abbiamo dimostrato come la terza dose di vaccino a mRNA anti-COVID-19 abbia migliorato significativamente la risposta immunitaria umorale nei pazienti trattati con ABA e con TCZ, come dimostrato dal forte aumento di anticorpi specifici anti-S in questi pazienti. Tali dati confermano i risultati pubblicati in un recente lavoro, in cui è stato osservato un significativo aumento del titolo di anticorpi anti-S in 4 pazienti trattati con ABA dopo la terza dose di vaccino [100]. Al contrario, la somministrazione della terza dose di vaccino in pazienti trattati con RTX non è riuscita ad indurre un aumento significativo del titolo di anticorpi anti-S, come dimostrato anche in altri lavori [101, 102].

Dopo due dosi di vaccino a mRNA anti-SARS-CoV-2, i pazienti trattati con ABA hanno mostrato una ridotta risposta cellulo-mediata mediata dei linfociti T CD4⁺ e CD4⁺/CD8⁺, con un ridotto rilascio di IFN- γ e di chemochine, come CXCL9 e

CXCL10. L'analisi GLM multivariata ha confermato una correlazione tra l'esposizione ad ABA e una ridotta produzione di CXCL9, CXCL10 e IFN- γ . Questa risposta compromessa delle cellule T rimane invariata anche dopo la terza dose di vaccino.

Questi risultati, come previsto, sono in linea con gli effetti biologici di ABA. Infatti, ABA, un analogo dell'antigene 4 associato ai linfociti T (CTLA4) espresso sulle cellule T attivate, si comporta come una molecola immunomodulante negativa, inibendo la piena attivazione dei linfociti T [103, 102]; questo porta ad una ridotta sopravvivenza dei linfociti T, ad una ridotta espansione clonale, ad una ridotta produzione di citochine ed ad una minore cooperazione con i linfociti B [104, 105, 106, 107, 108]. Tali effetti biologici possono indurre una selezione alterata delle cellule B ed una compromessa risposta immunitaria delle stesse, come dimostrato nel nostro studio ed in altri lavori [98, 99].

Inoltre, i nostri dati, mostrano un ridotto rilascio di IFN- γ ed una minore produzione di chemochine IFN- γ -inducibili, in linea con studi precedenti nei quali è stato dimostrato come il trattamento con ABA sia in grado di influenzare direttamente i livelli di IFN- γ e di CXCL10 [109, 110, 111].

Inoltre, poiché l'IFN- γ è noto per essere un potente induttore di CXCL10 [111], l'inibizione di IFN- γ da parte di ABA potrebbe indurre una minore produzione di chemochine correlate all'IFN- γ , con un possibile coinvolgimento di altre citochine infiammatorie, come IL-1 β e TNF [112, 113, 114]. Nel nostro studio, i pazienti trattati con ABA hanno mostrato una significativa riduzione di altre chemochine infiammatorie, tra cui CCL2 e RANTES. Questi dati potrebbero essere spiegati

dall'effetto diretto del farmaco sui recettori CD80/CD86 dei monociti, che potrebbero influenzare il loro stato funzionale e la loro capacità di produrre citochine pro-infiammatorie, come TNF- α , IL-1 β , IL-6, CXCL8 e CCL2 [115, 116]. L'azione nel controllo dell'infiammazione sembra essere basata sulla funzione di "immunoblocco" delle vie effettrici dei monociti, portando così alla ridotta produzione di citochine pro-infiammatorie [116].

I dati pubblicati sulla risposta specifica delle cellule T in seguito alla vaccinazione anti-SARS-CoV-2, hanno dimostrato una risposta cellulo-mediata dei linfociti T CD8⁺ fortemente stabile e specifica contro la proteina S di SARS-CoV-2 nei soggetti sani [117, 118]. In particolare, alti livelli di cellule T CD8⁺ effettrici specifiche sono stati rapidamente riscontrati dopo l'esposizione a diversi vaccini anti-SARS-CoV-2. Gli stessi dati non sono stati osservati nel nostro gruppo controllo HC, forse a causa di una più lunga tempistica di campionamento effettuata nel nostro studio rispetto a quella considerata in altri lavori [117, 118]. Inoltre, nel nostro studio, i pazienti trattati con ABA e con TCZ hanno mostrato una significativa riduzione del tasso di cellule T CD8⁺ della memoria: questi dati probabilmente sono dovuti, rispettivamente, al noto effetto di ABA sulle cellule T dei pazienti affetti da RA [119] e alla riduzione della percentuale sia di cellule T naïve sia di cellule T CD8⁺ della memoria osservata durante il trattamento dei pazienti con TCZ [120].

Al contrario, il gruppo di pazienti trattati con RTX non ha mostrato alcuna differenza significativa nella generazione di una risposta effettrice da parte delle cellule T CD8⁺ della memoria in seguito alla vaccinazione, rispetto al gruppo

controllo HC; questi risultati sono in linea con il repertorio di sottopopolazioni di cellule T CD8⁺ osservato durante la terapia con RTX, descritto da altri gruppi [121].

Sebbene i pazienti trattati con ABA abbiano mostrato un'alterazione della risposta immunitaria umorale e della produzione di chemochine, hanno mantenuto la capacità di generare un repertorio di cellule T CD4⁺ specifico per la proteina S di SARS-CoV-2, come osservato negli altri gruppi analizzati. Tutti i pazienti ed il gruppo controllo HC hanno mostrato livelli più alti di CD4⁺ specifici attivati (in particolare, doppi positivi CD40L/CD137, CD40L/IL-2, CD40L/IFN- γ , CD40L/IL-17), rispetto ai livelli delle sottopopolazioni attivate di CD8⁺. Questi dati non sono in linea con quelli di altri autori, nei quali è stato evidenziato un rapido incremento delle cellule T CD8⁺ in risposta al vaccino anti-COVID-19 [118]. Tuttavia, la mobilitazione dei linfociti T CD8⁺ sembra rappresentare una fase molto precoce della risposta immunitaria evocata dalla vaccinazione anti-COVID-19 (entro 1 o 2 settimane) [117, 118], seguita da un forte incremento di cellule T CD4⁺ e di cellule B [117]. Gli alti livelli di cellule T CD4⁺ attivate e quelli più bassi di CD8⁺ potrebbero rappresentare la situazione persistente nel momento successivo al campionamento, rispetto a quanto dimostrato da altri gruppi.

Nei pazienti sottoposti a terapia immunosoppressiva, l'immunità cellulare indotta dal vaccino rappresenta un buon metodo per lo sviluppo della protezione immunitaria [122, 123, 124]. In effetti, è noto il ruolo cruciale che ha l'immunità cellulare nell'infezione da SARS-CoV-2, in quanto sono state identificate risposte CD4⁺ e CD8⁺ specifiche in individui sani guariti da COVID-19 ed in pazienti guariti dall'infezione ma affetti da agammaglobulinemia [125, 126].

Il nostro lavoro è stato limitato dal basso numero di pazienti reclutati: la bassa numericità del nostro campione è giustificata dalla scelta di avere un accurato coordinamento tra i tempi di sospensione del farmaco, la somministrazione della prima e della seconda dose vaccinale e dalla rigorosa tempistica del campionamento. La dimensione limitata del nostro campione, paragonabile a quella analizzata da altri autori che hanno condotto studi simili, non ha permesso di trarre conclusioni generalizzate [99, 118, 121]. Tuttavia, questa limitazione potrebbe essere superata dall'esecuzione di esperimenti indipendenti che forniscano dati riproducibili e da diversi metodi statistici che dimostrino una diretta correlazione tra l'esposizione al farmaco ABA e la risposta immunitaria associata al rilascio di IFN.

Mediante l'esecuzione di valutazioni cellulari estese in risposta alla vaccinazione anti-SARS-CoV-2 in pazienti cronicamente esposti a diverse terapie immunosoppressive, il nostro lavoro contribuisce a spiegare quali siano le risposte immunitarie. La conservata capacità di generare cloni di linfociti T CD4⁺ specifici per la proteina S di SARS-CoV-2 garantisce un'efficace protezione del vaccino verso il virus. Inoltre, dopo la somministrazione della terza dose di vaccino a mRNA anti-SARS-CoV-2, i pazienti trattati con ABA hanno mostrato la capacità di aumentare in maniera significativa la risposta anticorpale, nonostante abbiano mantenuto una ridotta risposta dei linfociti T CD8⁺ SARS-CoV-2 specifici. Tutti questi dati suggeriscono che dosi ripetute di vaccino potrebbero essere necessarie al fine di ottimizzare la risposta immunologica sia umorale che cellulo-mediata in pazienti altamente vulnerabili.

Bibliografia

- [1] F. Cheever e Daniels JB, «A murine virus (JHM) causing disseminated encephalomyelitis with extensive destruction of myelin,» *J Exp Med.* 1949 Sep;90(3):181-210. doi: 10.1084/jem.90.3.181.
- [2] D. Tyrrell e M. Bynoe, «Cultivation of viruses from a high proportion of patients with colds,» *Lancet.* 1966 Jan 8;1(7428):76-7. doi: 10.1016/s0140-6736(66)92364-6.
- [3] C. Wu, Y. Liu, Y. Yang e e. al., «Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods,» *Acta Pharm Sin B.* 2020 May;10(5):766-788. doi: 10.1016/j.apsb.2020.02.008.
- [4] A. Kanwar, S. Selvaraju e F. Esper, «Human Coronavirus-HKU1 Infection Among Adults in Cleveland, Ohio,» *Open Forum Infect Dis.* 2017 Mar 25;4(2):ofx052. doi: 10.1093/ofid/ofx052.
- [5] N. Arbour, R. Day, J. Newcombe e e. al., «Neuroinvasion by human respiratory coronaviruses,» *J Virol.* 2000 Oct;74(19):8913-21. doi: 10.1128/jvi.74.19.8913-8921.2000.
- [6] D. Hamre e J. Procknow, «A new virus isolated from the human respiratory tract,» *Proc Soc Exp Biol Med.* 1966 Jan;121(1):190-3. doi: 10.3181/00379727-121-30734. *McInnews*, 1966.
- [7] L. Van der Hoek, K. Pyrc, M. Jebbink e e. al., «Identification of a new human coronavirus,» *Nat Med.* 2004 Apr;10(4):368-73. doi: 10.1038/nm1024. *Epub* 2004 Mar 21. *Woo et al.*, 2005.
- [8] S. Fung, K. Yuen, Z. Ye e e. al., «A tug-of-war between severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 and host antiviral defence: lessons from other pathogenic viruses,» *Emerg Microbes Infect.* 2020 Mar 14;9(1):558-570. doi: 10.1080/22221751.2020.1736644.
- [9] J. Peiris, S. Lai, L. Poon e e. al., «Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome,» *Lancet.* 2003 Apr 19;361(9366):1319-25. doi: 10.1016/s0140-6736(03)13077-2.
- [10] N. Kirtipal, S. Bharadwaj e S. Kang, «From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses,» *Infect Genet Evol.* 2020 Nov;85:104502. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104502.
- [11] C. Sigrist, A. Bridge e P. Le Mercier, «A potential role for integrins in host cell entry by SARS-CoV-2,» *Antiviral Res.* 2020 May;177:104759. doi: 10.1016/j.antiviral.2020.104759. *Epub* 2020 Mar 1.
- [12] P. V'kovski, A. Kratzel, S. Steiner e e. al., «Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2,» *Nat Rev Microbiol.* 2021 Mar;19(3):155-170. doi: 10.1038/s41579-020-00468-6.
- [13] K. Hui, M. Cheung, R. Perera e e. al., «Tropism, replication competence, and innate immune responses of the coronavirus SARS-CoV-2 in human respiratory tract and conjunctiva: an analysis in ex-vivo and in-vitro cultures,» *Lancet Respir Med.* 2020 Jul;8(7):687-695. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30193.

- [14] «Che cos'è il coronavirus,» *Agenzia Giornalistica Italiana*, 7 marzo 2020.
- [15] N. Zhu, D. Zhang, W. Wang e e. al., «China Novel Coronavirus Investigating and Research Team. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019,» *N Engl J Med*. 2020 Feb 20;382(8):727-733. doi: 10.1056/NEJMoa2001017.
- [16] K. Sun e e. al., «Atlas of ACE2 gene expression in mammals reveals novel insights in transmission of SARS-CoV-2,» *BioRxiv*. Published online March 31, 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.03.30.015644>.
- [17] «L'OMS ha chiamato COVID-19 la sindrome causata dal nuovo coronavirus,» *Il Post*, 11 febbraio 2020. URL consultato l'11 febbraio 2020.
- [18] L. Alanagreh, F. Alzoughool e M. Atoum, «The Human Coronavirus Disease COVID-19: Its Origin, Characteristics, and Insights into Potential Drugs and Its Mechanisms,» *Pathogens*. 2020 Apr 29;9(5):331. doi: 10.3390/pathogens9050331.
- [19] M. Wang, R. Zhao, L. Gao, X. Gao, D. Wang e J. Cao, «SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development,» *Front Cell Infect Microbiol*. 2020 Nov 25;10:587269. doi: 10.3389/fcimb.2020.587269.
- [20] J. Lan, J. Ge, J. Yu e e. al., «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.
- [21] S. Adam, G. Sukhramani, P. Bishnoi e e. al., «SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: Molecular and structural insights,» *J Basic Microbiol*. 2021 Mar;61(3):180-202. doi: 10.1002/jobm.202000537.
- [22] S. Li, L. Yuan, G. Dai e e. al., «Regulation of the ER Stress Response by the Ion Channel Activity of the Infectious Bronchitis Coronavirus Envelope Protein Modulates Virion Release, Apoptosis, Viral Fitness, and Pathogenesis,» *Front Microbiol*. 2020 Jan 24;10:3022. doi: 10.3389/fmicb.2019.
- [23] T. Ang, M. Bidon, J. Jaimes e e. al., «Coronavirus membrane fusion mechanism offers a potential target for antiviral development,» *Antiviral Res*. 2020 Jun;178:104792. doi: 10.1016/j.antiviral.2020.104792.
- [24] Y. Hu, J. Wen, L. Tang, H. Zhang, X. Zhang e Y. Li, «The M protein of SARS-CoV: basic structural and immunological properties,» *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2003;1:118-30.
- [25] Y. Zhao, Z. Zhao, Y. Wang e e. al., «Single-Cell RNA Expression Profiling of ACE2, the Receptor of SARS-CoV-2,» *Am J Respir Crit Care Med*. 2020 Sep 1;202(5):756-759. doi: 10.1164/rccm.202001-0179LE. Erratum in: *Am J Respir Crit Care Med*. 2021 Mar 15;203(6):782.
- [26] I. Bagdonaite e H. Wandall, «Global aspects of viral glycosylation,» *Glycobiology*. 2018 Jul 1;28(7):443-467. doi: 10.1093/glycob/cwy021.

- [27] A. Harrison, T. Lin e P. Wang, «Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis,» *Trends Immunol.* 2020 Dec;41(12):1100-1115. doi: 10.1016/j.it.2020.10.004.
- [28] M. Matthay, R. Zemans, G. Zimmerman, Y. Arabi, J. Beitler, A. Mercat, M. Herridge, A. Randolph e C. Calfee, «Acute respiratory distress syndrome,» *Nat Rev Dis Primers.* 2019 Mar 14;5(1):18. doi: 10.1038/s41572-019-0069-0. PMID: 30872586; PMCID: PMC6709677.
- [29] «Italfarmaco, direzione medico scientifica,» [Online]. Available: <https://www.italfarmaco.com/LinkClick.aspx?fileticket=CBv1GXXKr4%3D&portalid=0&language=en-US×tamp=1588322658547> .
- [30] H. Siddiqi e M. Mehra, «COVID-19 illness in native and immunosuppressed states: A clinical-therapeutic staging proposal,» *J Heart Lung Transplant.* 2020 May;39(5):405-407. doi: 10.1016/j.healun.2020.03.012.
- [31] I. Yu, Y. Li, T. Wong e e. al., «Evidence of airborne transmission of the severe acute respiratory syndrome virus,» *N Engl J Med.* 2004 Apr 22;350(17):1731-9. doi: 10.1056/NEJMoa032867.
- [32] J. Otter, C. Donskey, S. Yezli e e. al., «Transmission of SARS and MERS coronaviruses and influenza virus in healthcare settings: the possible role of dry surface contamination,» *J Hosp Infect.* 2016 Mar;92(3):235-50. doi: 10.1016/j.jhin.2015.08.027.
- [33] D. Wang, B. Hu, C. Hu e e. al., «Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China,» *JAMA.* 2020 Mar 17;323(11):1061-1069. doi: 10.1001/jama.2020.1585.
- [34] Q. Li, X. Guan, P. Wu e e. al., «Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia,» *N Engl J Med.* 2020 Mar 26;382(13):1199-1207. doi: 10.1056/NEJMoa2001316.
- [35] Y. Li, X. Huang, I. Yu e e. al., «Role of air distribution in SARS transmission during the largest nosocomial outbreak in Hong Kong,» *Indoor Air.* 2005 Apr;15(2):83-95. doi: 10.1111/j.1600-0668.2004.00317.x.
- [36] H. Meng, R. Xiong, R. He e e. al., «CT imaging and clinical course of asymptomatic cases with COVID-19 pneumonia at admission in Wuhan, China,» *J Infect.* 2020 Jul;81(1):e33-e39. doi: 10.1016/j.jinf.2020.04.004.
- [37] C. Rothe, M. Schunk, P. Sothmann e e. al., «Transmission of 2019-nCoV Infection from an Asymptomatic Contact in Germany,» *N Engl J Med.* 2020 Mar 5;382(10):970-971. doi: 10.1056/NEJMc2001468.
- [38] Y. Xu, X. Li, B. Zhu e e. al., «Characteristics of pediatric SARS-CoV-2 infection and potential evidence for persistent fecal viral shedding,» *Nat Med.* 2020 Apr;26(4):502-505. doi: 10.1038/s41591-020-0817-4.

- [39] N. Chen, M. Zhou, X. Dong e e. al., «Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study,» *Lancet*. 2020 Feb 15;395(10223):507-513. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30211-7.
- [40] J. Chan, S. Yuan, K. Kok e e. al., «A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster,» *Lancet*. 2020 Feb 15;395(10223):514-523. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30154-9.
- [41] T. Ksiazek, D. Erdman, C. Goldsmith e e. al., «SARS Working Group. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome,» *N Engl J Med*. 2003 May 15;348(20):1953-66. doi: 10.1056/NEJMoa030781.
- [42] B. Guery, J. Poissy, L. Mansouf e e. al., «MERS-CoV study group. Clinical features and viral diagnosis of two cases of infection with Middle East Respiratory Syndrome coronavirus: a report of nosocomial transmission,» *Lancet*. 2013 Jun 29;381(9885):2265-72. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60982-4.
- [43] V. Puntmann, M. Careri, I. Wieters e e. al., «Outcomes of Cardiovascular Magnetic Resonance Imaging in Patients Recently Recovered From Coronavirus Disease 2019 (COVID-19),» *JAMA Cardiol*. 2020 Nov 1;5(11):1265-1273. doi: 10.1001/jamacardio.2020.3557.
- [44] C. Wu, X. Chen, Y. Cai e e. al., «Risk Factors Associated With Acute Respiratory Distress Syndrome and Death in Patients With Coronavirus Disease 2019 Pneumonia in Wuhan, China,» *JAMA Intern Med*. 2020 Jul 1;180(7):934-943. doi: 10.1001/jamainternmed.2020.0994.
- [45] C. Huang, Y. Wang, X. Li e e. al., «Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China,» *Lancet*. 2020 Feb 15;395(10223):497-506. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
- [46] J. Chan, A. Zhang, S. Yuan e e. al., «Simulation of the Clinical and Pathological Manifestations of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in a Golden Syrian Hamster Model: Implications for Disease Pathogenesis and Transmissibility,» *Clin Infect Dis*. 2020 Dec 3;71(9):2428-2446. doi: 10.1093/cid/ciaa325.
- [47] Z. Wu e J. McGoogan, «Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72 314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention,» *JAMA*. 2020 Apr 7;323(13):1239-1242. doi: 10.1001/jama.2020.2648.
- [48] C. Qin, L. Zhou, Z. Hu e e. al., «Dysregulation of Immune Response in Patients With Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China,» *Clin Infect Dis*. 2020 Jul 28;71(15):762-768. doi: 10.1093/cid/ciaa248.
- [49] D. Blanco-Melo, B. Nilsson-Payant, W. Liu, S. Uhl e e. al., «Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19,» *Cell*. 2020 May 28;181(5):1036-1045.e9. doi: 10.1016/j.cell.2020.04.026.

- [50] H. Chen e e. al., «SARS-CoV-2 activates lung epithelia cell proinflammatory signaling and leads to immune dysregulation in COVID-19 patients by single-cell sequencing,» *MedRxiv.Published online May 13, 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.05.08.20096024>.*
- [51] Z. Xu, L. Shi, Y. Wang e e. al., «Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome,» *Lancet Respir Med. 2020 Apr;8(4):420-422. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30076-X.*
- [52] J. Hadjadj, N. Yatim, L. Barnabei e e. al., «Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients,» *Science. 2020 Aug 7;369(6504):718-724. doi: 10.1126/science.abc6027.*
- [53] C. Tincati, E. Cannizzo, M. Giacomelli, R. Badolato, A. D'Arminio Monforte e G. Marchetti, «Heightened Circulating Interferon-Inducible Chemokines, and Activated Pro-Cytolytic Th1-Cell Phenotype Features Covid-19 Aggravation in the Second Week of Illness,» *Front Immunol. 2020 Oct 20;11:580987. doi: 10.3389/fimmu.2020.580987.*
- [54] T. Zhou, T. Su, T. Mudianto e e. al., «Immune asynchrony in COVID-19 pathogenesis and potential immunotherapies,» *J Exp Med. 2020 Oct 5;217(10):e20200674. doi: 10.1084/jem.20200674.*
- [55] A. Mantovani, C. Dinarello, M. Molgora e C. Garlanda, «Interleukin-1 and Related Cytokines in the Regulation of Inflammation and Immunity,» *Immunity. 2019 Apr 16;50(4):778-795. doi: 10.1016/j.immuni.2019.03.012.*
- [56] E. Snijder, Y. Van der Meer, J. Zevenhoven-Dobbe e e. al., «Ultrastructure and origin of membrane vesicles associated with the severe acute respiratory syndrome coronavirus replication complex,» *J Virol. 2006 Jun;80(12):5927-40. doi: 10.1128/JVI.02501-05.*
- [57] E. Kindler, V. Thiel e F. Weber, «Interaction of SARS and MERS Coronaviruses with the Antiviral Interferon Response,» *Adv Virus Res. 2016;96:219-243. doi: 10.1016/bs.aivir.2016.08.006.*
- [58] A. Totura e R. Baric, «SARS coronavirus pathogenesis: host innate immune responses and viral antagonism of interferon,» *Curr Opin Virol. 2012 Jun;2(3):264-75. doi: 10.1016/j.coviro.2012.04.004.*
- [59] Y. Hu, W. Li, T. Gao, Y. Cui, Y. Jin, P. Li, Q. Ma, X. Liu e C. Cao, «The Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Nucleocapsid Inhibits Type I Interferon Production by Interfering with TRIM25-Mediated RIG-I Ubiquitination,» *J Virol. 2017 Mar 29;91(8):e02143-16. doi: 10.1128/JVI.02143-16. Erratum in: J Virol. 2020 Sep 29;94(20): PMID: 28148787; PMCID: PMC5375661.*
- [60] A. Shah, «Novel Coronavirus-Induced NLRP3 Inflammasome Activation: A Potential Drug Target in the Treatment of COVID-19,» *Front Immunol. 2020 May 19;11:1021. doi: 10.3389/fimmu.2020.01021. PMID: 32574259; PMCID: PMC7248552.*
- [61] S. Kopecky-Bromberg, L. Martínez-Sobrido, M. Frieman, R. Baric e P. Palese, «Severe acute respiratory syndrome coronavirus open reading frame (ORF) 3b, ORF 6, and nucleocapsid

- proteins function as interferon antagonists,» *J Virol.* 2007 Jan;81(2):548-57. doi: 10.1128/JVI.01782-06. Epub 2006 Nov 15. PMID: 17108024; PMCID: PMC1797484.
- [62] L. Bordi, E. Nicastri, L. Scorzolini e e. al., «Differential diagnosis of illness in patients under investigation for the novel coronavirus (SARS-CoV-2), Italy, February 2020,» *Euro Surveill.* 2020 Feb;25(8):2000170. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.8.2000170.
- [63] L. Zou, F. Ruan, M. Huang e e. al., «SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients,» *N Engl J Med.* 2020 Mar 19;382(12):1177-1179. doi: 10.1056/NEJMc2001737..
- [64] T. Li, «Diagnosis and clinical management of severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection: an operational recommendation of Peking Union Medical College Hospital (V2.0),» *Emerg Microbes Infect.* 2020 Mar 14;9(1):582-585. doi: 10.1080/22221751.2020.1735265.
- [65] L. Guo, L. Ren, S. Yang e e. al., «Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19),» *Clin Infect Dis.* 2020 Jul 28;71(15):778-785. doi: 10.1093/cid/ciaa310.
- [66] M. Chung, A. Bernheim, X. Mei e e. al., «CT Imaging Features of 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV),» *Radiology.* 2020 Apr;295(1):202-207. doi: 10.1148/radiol.20200230.
- [67] «Intervista al dott. Massarotti.,» [Online]. Available: <https://lamadonnina.grupposandonato.it/news/2021/dicembre/come-curare-covid>.
- [68] C. Wang, W. Li, D. Drabek e e. al., «A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection,» *Nat Commun.* 2020 May 4;11(1):2251. doi: 10.1038/s41467-020-16256-y.
- [69] M. Holshue, C. DeBolt, S. Lindquist e e. al., «First Case of 2019 Novel Coronavirus in the United States,» *N Engl J Med.* 2020 Mar 5;382(10):929-936. doi: 10.1056/NEJMoa2001191.
- [70] E. De Wit, F. Feldmann, J. Cronin e e. al., «Prophylactic and therapeutic remdesivir (GS-5734) treatment in the rhesus macaque model of MERS-CoV infection,» *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020 Mar 24;117(12):6771-6776. doi: 10.1073/pnas.1922083117..
- [71] D. Li e Q. Li, «SARS-CoV-2: vaccines in the pandemic era,» *Mil Med Res.* 2021 Jan 6;8(1):1. doi: 10.1186/s40779-020-00296-y.
- [72] F. Polack, S. Thomas, N. Kitchin e e. al., «Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine,» *N Engl J Med.* 2020 Dec 31;383(27):2603-2615. doi: 10.1056/NEJMoa2034577.
- [73] «AIFA. Vaccini a mRNA | Agenzia Italiana del Farmaco.,» [Online].
- [74] M. Mascellino, F. Di Timoteo e M. De Angelis, «Overview of the Main Anti-SARS-CoV-2 Vaccines: Mechanism of Action, Efficacy and Safety,» *Infect Drug Resist.* 2021 Aug 31;14:3459-3476. doi: 10.2147/IDR.S315727.
- [75] D. Van der Heijde, D. Daikh, N. Betteridge e e. al., «Common language description of the term rheumatic and musculoskeletal diseases (RMDs) for use in communication with the lay

- public, healthcare providers and other stakeholders endorsed by the EULAR and the ACR,» *Ann Rheum Dis.* 2018 Jun;77(6):829-832. doi: 10.1136/annrheumdis-2017-212565.
- [76] S. Hayter e M. Cook, «Updated assessment of the prevalence, spectrum and case definition of autoimmune disease,» *Autoimmun Rev.* 2012 Aug;11(10):754-65. doi: 10.1016/j.autrev.2012.02.001.
- [77] «"Orencia- abatacept injection, powder, lyophilized, for solution Orencia- abatacept injection, solution"».
- [78] N. Kennedy, J. Goodhand, C. Bewshea e e. al., «Anti-SARS-CoV-2 antibody responses are attenuated in patients with IBD treated with infliximab,» *Gut.* 2021 May;70(5):865-875. doi: 10.1136/gutjnl-2021-324388.
- [79] P. Deepak, W. Kim, M. Paley e e. al., «Glucocorticoids and B cell depleting agents substantially impair immunogenicity of mRNA vaccines to SARS-CoV-2,» *medRxiv.* 2021 doi: 10.1101/2021.04.05.21254656.
- [80] K. Krueger, M. Ison e C. Ghossein, «Practical Guide to Vaccination in All Stages of CKD, Including Patients Treated by Dialysis or Kidney Transplantation,» *Am J Kidney Dis.* 2020 Mar;75(3):417-425. doi: 10.1053/j.ajkd.2019.06.014.
- [81] C. Hua, T. Barnetche, B. Combe e e. al., «Effect of methotrexate, anti-tumor necrosis factor α , and rituximab on the immune response to influenza and pneumococcal vaccines in patients with rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis,» *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2014 Jul;66(7):1016-26. doi: 10.1002/acr.22246.
- [82] S. Oren, M. Mandelboim, Y. Braun-Moscovici e e. al., «Vaccination against influenza in patients with rheumatoid arthritis: the effect of rituximab on the humoral response,» *Ann Rheum Dis.* 2008 Jul;67(7):937-41. doi: 10.1136/ard.2007.077461.
- [83] U. Arad, S. Tzadok, S. Amir e e. al., «The cellular immune response to influenza vaccination is preserved in rheumatoid arthritis patients treated with rituximab,» *Vaccine.* 2011 Feb 11;29(8):1643-8. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.12.072.
- [84] S. Van Assen, A. Holvast, C. Benne e e. al., «Humoral responses after influenza vaccination are severely reduced in patients with rheumatoid arthritis treated with rituximab,» *Arthritis Rheum.* 2010 Jan;62(1):75-81. doi: 10.1002/art.25033.
- [85] E. Walsh, R. Frenck, A. Falsey e e. al., «Safety and Immunogenicity of Two RNA-Based Covid-19 Vaccine Candidates,» *N Engl J Med.* 2020 Dec 17;383(25):2439-2450. doi: 10.1056/NEJMoa202790.
- [86] N. Post, D. Eddy, C. Huntley e e. al., «Antibody response to SARS-CoV-2 infection in humans: A systematic review,» *PLoS One.* 2020 Dec 31;15(12):e0244126. doi: 10.1371/journal.pone.0244126.
- [87] A. Grifoni, D. Weiskopf, S. Ramirez e e. al., «Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals,» *Cell.* 2020 Jun 25;181(7):1489-1501.e15. doi: 10.1016/j.cell.2020.05.015.437.

- [88] J. Dan, J. Mateus, Y. Kato e e. al., «Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection,» *Science*. 2021 Feb 5;371(6529):eabf4063. doi: 10.1126/science.abf4063..
- [89] U. Sahin, A. Muik, E. Derhovanesian e e. al., «COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and TH1 T cell responses,» *Nature*. 2020 Oct;586(7830):594-599. doi: 10.1038/s41586-020-2814-7..
- [90] K. Ewer, J. Barrett, S. Belij-Rammerstorfer e e. al., «T cell and antibody responses induced by a single dose of ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) vaccine in a phase 1/2 clinical trial,» *Nat Med*. 2021 Feb;27(2):270-278. doi: 10.1038/s41591-020-01194-5.
- [91] J. Braun, L. Loyal, M. Frentsch e e. al., «SARS-CoV-2-reactive T cells in healthy donors and patients with COVID-19,» *Nature*. 2020 Nov;587(7833):270-274. doi: 10.1038/s41586-020-2598-9.443.
- [92] M. Shrotri, M. Van Schalkwyk, N. Post e e. al., «T cell response to SARS-CoV-2 infection in humans: A systematic review,» *PLoS One*. 2021 Jan 25;16(1):e0245532. doi: 10.1371/journal.pone.0245532..
- [93] D. Geers, M. Shamier, S. Bogers e e. al., «SARS-CoV-2 variants of concern partially escape humoral but not T-cell responses in COVID-19 convalescent donors and vaccinees,» *Sci Immunol*. 2021 May 25;6(59):eabj1750. doi: 10.1126/sciimmunol.abj1750. 446.
- [94] S. Kalimuddin, C. Tham, M. Qui e e. al., «Early T cell and binding antibody responses are associated with COVID-19 RNA vaccine efficacy onset,» *Med (N Y)*. 2021 Jun 11;2(6):682-688.e4. doi: 10.1016/j.medj.2021.04.003..
- [95] J. Smolen, R. Landewé, F. Breedveld e e. al., «EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs,» *Ann Rheum Dis*. 2010 Jun;69(6):964-75. doi: 10.1136/ard.2009.126532..
- [96] S. Fiorentini, S. Licenziati, G. Alessandri e e. al., «CD11b expression identifies CD8+CD28+ T lymphocytes with phenotype and function of both naive/memory and effector cells,» *J Immunol*. 2001 Jan 15;166(2):900-7. doi: 10.4049/jimmunol.166.2.900.
- [97] A. Jena, S. Mishra, P. Deepak e e. al., «Response to SARS-CoV-2 vaccination in immune mediated inflammatory diseases: Systematic review and meta-analysis,» *Autoimmun Rev*. 2022 Jan;21(1):102927. doi: 10.1016/j.autrev.2021.102927..
- [98] V. Furer, T. Eviatar, D. Zisman e e. al., «Immunogenicity and safety of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine in adult patients with autoimmune inflammatory rheumatic diseases and in the general population: a multicentre study,» *Ann Rheum Dis*. 2021 Oct;80(10):1330-1338. doi: 10.1136/annrheumdis-2021-220647.
- [99] C. Sieiro Santos, S. Calleja Antolin, C. Moriano Morales e e. al., «Immune responses to mRNA vaccines against SARS-CoV-2 in patients with immune-mediated inflammatory rheumatic diseases,» *RMD Open*. 2022 Jan;8(1):e001898. doi: 10.1136/rmdopen-2021-001898.

- [100] S. Syversen, I. Jyssum, A. Tvetter e e. al., «Immunogenicity and Safety of Standard and Third-Dose SARS-CoV-2 Vaccination in Patients Receiving Immunosuppressive Therapy,» *Arthritis Rheumatol.* 2022 Aug;74(8):1321-1332. doi: 10.1002/art.42153.
- [101] E. Azzolini, C. Pozzi, L. Germagnoli e e. al., «mRNA COVID-19 vaccine booster fosters B- and T-cell responses in immunocompromised patients,» *Life Sci Alliance.* 2022 Feb 15;5(6):e202201381. doi: 10.26508/lsa.202201381.
- [102] M. Weisman, P. Durez, D. Hallegua e e. al., «Reduction of inflammatory biomarker response by abatacept in treatment of rheumatoid arthritis,» *J Rheumatol.* 2006 Nov;33(11):2162-6.
- [103] L. Lundquist, «Abatacept: a novel therapy approved for the treatment of patients with rheumatoid arthritis,» *Adv Ther.* 2007 Mar-Apr;24(2):333-45. doi: 10.1007/BF02849902..
- [104] A. Yamada, A. Salama e M. Sayegh, «The role of novel T cell costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation,» *J Am Soc Nephrol.* 2002 Feb;13(2):559-575. doi: 10.1681/ASN.V132559.
- [105] J. Bluestone, «New perspectives of CD28-B7-mediated T cell costimulation,» *Immunity.* 1995 Jun;2(6):555-9. doi: 10.1016/1074-7613(95)90000-4.
- [106] P. Linsley, W. Brady, M. Urnes e e. al., «CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7,» *J Exp Med.* 1991 Sep 1;174(3):561-9. doi: 10.1084/jem.174.3.561.
- [107] T. Walunas, D. Lenschow, C. Bakker e e. al., «CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation,» *Immunity.* 1994 Aug;1(5):405-13. doi: 10.1016/1074-7613(94)90071-x.
- [108] T. Walunas, C. Bakker e J. Bluestone, «CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation,» *J Exp Med.* 1996 Jun 1;183(6):2541-50. doi: 10.1084/jem.183.6.2541. Erratum in: *J Exp Med* 1996 Jul 1;184(1):301..
- [109] C. Clavel, L. Ceccato, F. Anquetil e e. al., «Among human macrophages polarised to different phenotypes, the M-CSF-oriented cells present the highest pro-inflammatory response to the rheumatoid arthritis-specific immune complexes containing ACPA,» *Ann Rheum Dis.* 2016 Dec;75(12):2184-2191. doi: 10.1136/annrheumdis-2015-208887.
- [110] L. Tweehuysen, A. Den Broeder, K. Schraa e e. al., «Predictive value of ex-vivo drug-inhibited cytokine production for clinical response to biologic DMARD therapy in rheumatoid arthritis,» *Clin Exp Rheumatol.* 2019 May-Jun;37(3):367-372.
- [111] K. Yukawa, S. Mokuda, H. Kohno e e. al., «Serum CXCL10 levels are associated with better responses to abatacept treatment of rheumatoid arthritis,» *Clin Exp Rheumatol.* 2020 Sep-Oct;38(5):956-963.
- [112] A. Luster e J. Ravetch, «Biochemical characterization of a gamma interferon-inducible cytokine (IP-10),» *J Exp Med.* 1987 Oct 1;166(4):1084-97. doi: 10.1084/jem.166.4.1084.
- [113] J. Groom e A. Luster, «CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions,» *Immunol Cell Biol.* 2011 Feb;89(2):207-15. doi: 10.1038/icb.2010.158.

- [114] A. Ueno, M. Yamamura, M. Iwahashi e e. al., «The production of CXCR3-agonistic chemokines by synovial fibroblasts from patients with rheumatoid arthritis,» *Rheumatol Int.* 2005 Jun;25(5):361-7. doi: 10.1007/s00296-004-0449-x.
- [115] M. Cutolo, S. Soldano, P. Montagna e e. al., «CTLA4-Ig interacts with cultured synovial macrophages from rheumatoid arthritis patients and downregulates cytokine production,» *Arthritis Res Ther.* 2009;11(6):R176. doi: 10.1186/ar2865.
- [116] A. Bozec, Y. Luo, C. Engdahl e e. al., «Abatacept blocks anti-citrullinated protein antibody and rheumatoid factor mediated cytokine production in human macrophages in IDO-dependent manner,» *Arthritis Res Ther.* 2018 Feb 7;20(1):24. doi: 10.1186/s13075-018-1527-x.
- [117] Y. Chen, S. Yin, X. Tong e e. al., «Dynamic SARS-CoV-2-specific B-cell and T-cell responses following immunization with an inactivated COVID-19 vaccine,» *Clin Microbiol Infect.* 2022 Mar;28(3):410-418. doi: 10.1016/j.cmi.2021.10.006.
- [118] V. Oberhardt, H. Luxenburger, J. Kemming e e. al., «Rapid and stable mobilization of CD8+ T cells by SARS-CoV-2 mRNA vaccine,» *Nature.* 2021 Sep;597(7875):268-273. doi: 10.1038/s41586-021-03841-4.
- [119] M. Scarsi, T. Ziglioli e P. Airò, «Decreased circulating CD28-negative T cells in patients with rheumatoid arthritis treated with abatacept are correlated with clinical response,» *J Rheumatol.* 2010 May;37(5):911-6. doi: 10.3899/jrheum.091176.
- [120] S. Dulic, Z. Vászrhelyi, F. Sava e e. al., «T-Cell Subsets in Rheumatoid Arthritis Patients on Long-Term Anti-TNF or IL-6 Receptor Blocker Therapy,» *Mediators Inflamm.* 2017;2017:6894374. doi: 10.1155/2017/6894374.
- [121] N. Madelon, K. Lauper e G. Breville, «Robust T-Cell Responses in Anti-CD20-Treated Patients Following COVID-19 Vaccination: A Prospective Cohort Study,» *Clin Infect Dis.* 2022 Aug 24;75(1):e1037-e1045. doi: 10.1093/cid/ciab954.
- [122] J. McElhaney, D. Xie, W. Hager e e. al., «T cell responses are better correlates of vaccine protection in the elderly,» *J Immunol.* 2006 May 15;176(10):6333-9. doi: 10.4049/jimmunol.176.10.6333.1.
- [123] J. McElhaney, C. Ewen, X. Zhou e e. al., «Granzyme B: Correlates with protection and enhanced CTL response to influenza vaccination in older adults,» *Vaccine.* 2009 Apr 21;27(18):2418-25. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.01.136.
- [124] R. Cox e K. Brokstad, «Not just antibodies: B cells and T cells mediate immunity to COVID-19,» *Nat Rev Immunol.* 2020 Oct;20(10):581-582. doi: 10.1038/s41577-020-00436-4.
- [125] J. Juno, H. Tan e W. Lee, «Humoral and circulating follicular helper T cell responses in recovered patients with COVID-19,» *Nat Med.* 2020 Sep;26(9):1428-1434. doi: 10.1038/s41591-020-0995-0.

- [126] I. Quinti, V. Lougaris, C. Milito e e. al., «A possible role for B cells in COVID-19? Lesson from patients with agammaglobulinemia,» *J Allergy Clin Immunol.* 2020 Jul;146(1):211-213.e4. doi: 10.1016/j.jaci.2020.04.013.
- [127] J. Hu, C. Havenar-Daughton e S. Crotty, «Modulation of SAP dependent T:B cell interactions as a strategy to improve vaccination,» *Curr Opin Virol.* 2013 Jun;3(3):363-70. doi: 10.1016/j.coviro.2013.05.015.
- [128] S. Crotty, «Follicular helper CD4 T cells (TFH),» *Annu Rev Immunol.* 2011;29:621-63. doi: 10.1146/annurev-immunol-031210-101400.
- [129] F. Castellino, A. Huang, G. Altan-Bonnet, S. Stoll, C. Scheinecker e R. Germain, «Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8+ T cells to sites of CD4+ T cell-dendritic cell interaction,» *Nature.* 2006 Apr 13;440(7086):890-5. doi: 10.1038/nature04651.
- [130] J. Sun e M. Bevan, «Sun JC, Bevan MJ. Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help,» *Science.* 2003 Apr 11;300(5617):339-42. doi: 10.1126/science.1083317.
- [131] B. Laidlaw, J. Craft e S. Kaech, «The multifaceted role of CD4(+) T cells in CD8(+) T cell memory,» *Nat Rev Immunol.* 2016 Feb;16(2):102-11. doi: 10.1038/nri.2015.10.
- [132] J. Teijaro, D. Verhoeven, C. Page, D. Turner e D. Farber, «Memory CD4 T cells direct protective responses to influenza virus in the lungs through helper-independent mechanisms,» *J Virol.* 2010 Sep;84(18):9217-26. doi: 10.1128/JVI.01069-10.
- [133] T. Strutt, K. McKinsty e S. Swain, «Control of innate immunity by memory CD4 T cells,» *Adv Exp Med Biol.* 2011;780:57-68. doi: 10.1007/978-1-4419-5632-3_6.
- [134] R. Channappanavar, C. Fett, J. Zhao, D. Meyerholz e S. Perlman, «Virus-specific memory CD8 T cells provide substantial protection from lethal severe acute respiratory syndrome coronavirus infection,» *J Virol.* 2014 Oct;88(19):11034-44. doi: 10.1128/JVI.01505-14.
- [135] J. Zhao, J. Zhao, A. Mangalam e e. al., «Airway Memory CD4(+) T Cells Mediate Protective Immunity against Emerging Respiratory Coronaviruses,» *Immunity.* 2016 Jun 21;44(6):1379-91. doi: 10.1016/j.immuni.2016.05.006.
- [136] M. Moossavi, N. Parsamanesh, A. Bahrami, S. Atkin e A. Sahebkar, «Role of the NLRP3 inflammasome in cancer,» *Mol Cancer.* 2018 Nov 17;17(1):158. doi: 10.1186/s12943-018-0900-3.
- [137] G. Hazlewood, J. Pardo, C. Barnabe e e. al., «Canadian Rheumatology Association Recommendation for the Use of COVID-19 Vaccination for Patients With Autoimmune Rheumatic Diseases,» *J Rheumatol.* 2021 Aug;48(8):1330-1339. doi: 10.3899/jrheum.210288.
- [138] J. Singh, C. Cameron, S. Noorbaloochi e e. al., «Risk of serious infection in biological treatment of patients with rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis,» *Lancet.* 2015 Jul 18;386(9990):258-65. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61704-9. 400 2.

- [139] E. Williamson, A. Walker, K. Bhaskaran e e. al., «Factors associated with COVID-19-related death using OpenSAFELY,» *Nature*. 2020 Aug;584(7821):430-436. doi: 10.1038/s41586-020-2521-4.
- [140] A. Strangfeld, M. Schäfer, M. Gianfrancesco e e. al., «Factors associated with COVID-19-related death in people with rheumatic diseases: results from the COVID-19 Global Rheumatology Alliance physician-reported registry,» *Ann Rheum Dis*. 2021 Jul;80(7):930-942. doi: 10.1136/annrheumdis-2020-219498.