

Perspective

# Gli effetti collaterali associati alla potente attività dei vaccini COVID-19 a mRNA possono essere superati dai vaccini mucosali

Maurizio Federico

National Center for Global Health, Istituto Superiore di Sanità, 00161 Rome, Italy; maurizio.federico@iss.it

**Riassunto:** L'azione dei vaccini basati su mRNA richiede l'espressione dell'antigene nelle cellule che internalizzano le nanoparticelle lipidiche-mRNA. Quando l'antigene del vaccino non è completamente trattenuto dalle cellule produttrici, la sua diffusione locale e sistemica può avere conseguenze a seconda sia dei livelli di espressione dell'antigene che della sua attività biologica. Una peculiarità dei vaccini COVID-19 basati su mRNA è la quantità straordinariamente elevata dell'antigene Spike espresso dalle cellule bersaglio. Inoltre, lo Spike del vaccino può essere rilasciato e legarsi ai recettori cellulari ACE-2, inducendo così risposte di significato patogenetico, tra cui il rilascio di fattori solubili che, a loro volta, possono deregolare processi immunologici chiave. Le risposte immunitarie circolatorie innescate dalla proteina Spike del vaccino sono molto potenti e possono portare al legame degli anticorpi anti-Spike su bersagli molecolari non specifici, nonché all'emergere sia di autoanticorpi sia che di anticorpi anti-idiotipo. In questo articolo vengono discussi gli svantaggi immunologici dell'elevata efficienza di traduzione dell'mRNA associato ai vaccini anti-COVID-19, insieme alle argomentazioni a sostegno dell'idea che la maggior parte di essi possa essere evitata con l'avvento dei vaccini anti-COVID-19 mucosali di nuova generazione.

**Keywords:** COVID-19 mRNA vaccines; SARS-CoV-2 Spike; mucosal vaccines; ACE-2; autoimmunity

## 1. Introduzione

I vaccini COVID-19 basati su mRNA sono stati ampiamente distribuiti sia nella loro versione originale che in quelle aggiornate. La tecnologia a mRNA è anche la base di ulteriori vaccini sperimentali e di immunoterapie antitumorali di ultima generazione. Pertanto, appare necessario identificare, monitorare e analizzare in modo approfondito gli eventi inattesi più rilevanti che questa tecnologia può produrre, anche se raramente, negli esseri umani. Diverse caratteristiche distinguono i vaccini COVID-19 basati su mRNA da quelli "tradizionali" basati su virus attenuati/inattivati, subunità proteiche o proteine ricombinanti, e che sono stati così utili per l'eliminazione/contenimento di diverse malattie infettive. In primo luogo, la formulazione del vaccino comprende nanoparticelle lipidiche (LNP) complessate con molecole di mRNA prodotte tramite il processo della trascrizione "in vitro". In secondo luogo, l'immunogeno non fa parte della formulazione del vaccino, ma si prevede che venga sintetizzato dalle cellule che internalizzano i complessi mRNA/LNP. In proposito, questa evidenza giustifica la definizione più appropriata di profarmaco (inteso come una sostanza farmacologicamente inattiva che viene convertita in un farmaco farmacologicamente attivo una volta somministrato) piuttosto che di vaccino [1]. Terzo, l'immunogeno (cioè la proteina virale Spike) viene sintetizzato dalle cellule bersaglio in quantità molto elevate e persiste nel tempo [2]. Quarto, l'immunogeno riconosce, lega e attiva un recettore cellulare di segnalazione diffuso, cioè l'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE)-2, ed è stabilizzato nella sua conformazione pre-fusione attraverso due mutazioni consecutive

alla prolina nelle posizioni degli aminoacidi 986 e 987, mutazioni che non hanno un impatto negativo sul legame/attivazione dell'ACE-2. Quindi, abbondanza, diffusione, persistenza, attività biologica e stabilità dell'immunogeno sono punti chiave che distinguono i vaccini COVID-19 basati su mRNA. In questo articolo vengono discusse le conseguenze più rilevanti sia della sovrapproduzione dell'antigene Spike dopo la vaccinazione COVID-19 basata su mRNA, che della potente risposta immunitaria circolatoria evocata. Avere un quadro completo di tutte le possibili criticità sarebbe di grande utilità per lo sviluppo di vaccini più sicuri e mirati contro SARS-CoV-2 e altri agenti infettivi aerogeni. Tra questi, i vaccini mucosali meritano grande considerazione data la loro azione alla porta di ingresso del virus e la mancanza di effetti sistemici indesiderati.

## 2. Livelli elevati e persistenti di Spike circolante dopo la vaccinazione

I complessi mRNA/LNP possono entrare in qualsiasi tipo di cellula. Seppure l'inoculo nel muscolo deltoide favorisce il loro ingresso nelle cellule muscolari, tuttavia, la moderata infiammazione indotta da alcuni componenti lipidici [3] può attrarre cellule presentanti l'antigene (APC) professionali nel sito di iniezione. Le APC possono ingerire le LNP, subire l'attivazione e migrare verso i linfonodi [4]. Inoltre, quantità non quantificabili di complessi mRNA/LNP iniettati sfuggono all'internalizzazione cellulare nel sito di inoculo, entrando così in circolazione. Consistentemente, studi di biodistribuzione condotti da un produttore di vaccini mRNA COVID-19 hanno evidenziato la potenziale diffusione delle LNP iniettate per via intramuscolare in praticamente tutti i tessuti [5].

Sia l'mRNA che lo Spike del vaccino persistono nel corpo per lungo tempo dopo la vaccinazione. Uno studio condotto su campioni autoptici di pazienti dopo la vaccinazione contro il COVID-19 ha dimostrato la persistenza dell'mRNA del vaccino nei linfonodi ascellari bilaterali fino a 30 giorni dopo la vaccinazione [6]. Inoltre, l'mRNA del vaccino è stato trovato anche in entrambi i ventricoli cardiaci fino a 20 giorni dopo le iniezioni, e la sua presenza era correlata a lesioni miocardiche associate a un numero anormalmente elevato di macrofagi miocardici. In un altro studio, l'mRNA del vaccino è stato trovato fino a 60 giorni dopo la seconda dose in biopsie di linfonodi ascellari isolaterali [2].

Parte della Spike espressa a livello intracellulare rimane esposta sulla membrana plasmatica delle cellule bersaglio nella sua forma trimérica, mentre una frazione consistente di essa può essere rilasciata e circolare. Una quantità media di 47 pg/mL di Spike libera è stata misurata nel plasma dei vaccinati 1-2 giorni dopo l'iniezione, con picchi di 174 pg/mL [2]. Questi livelli di Spike nel plasma appaiono sorprendentemente elevati, essendo, ad esempio, paragonabili alle concentrazioni di citochine infiammatorie rilevate nei soggetti con infiammazione sistemica acuta [7]. Questa evidenza è di particolare rilevanza data l'elevata affinità di Spike per ACE-2, cioè un recettore cellulare diffuso coinvolto in diversi processi fisiologici chiave.

## 3. ACE-2: funzioni, distribuzione e attivazione cellulare a seguito del legame con Spike

ACE-2 è una proteina transmembranaria di tipo I composta da 805 aminoacidi con una regione N-terminale extracellulare glicosilata contenente il dominio carbossipeptidasi la cui funzione è quella di rimuovere singoli aminoacidi dall'estremità C-terminale dei suoi substrati. ACE-2 è un regolatore chiave del sistema renina-angiotensina-aldosterone che controlla la pressione sanguigna. Catalizza la conversione dell'angiotensina I, un decapeptide, in angiotensina 1-9, che può essere convertita in peptidi di angiotensina vasodilatatori più piccoli (ad esempio, angiotensina 1-7) dall'ACE nei polmoni. ACE-2 lega anche l'angiotensina II, ovvero un octapeptide generato dalla scissione dell'angiotensina I catalizzata dall'ACE, per produrre l'angiotensina vasodilatatrice 1-7.

L'ACE-2 è anche coinvolto nella produzione di bradichinine, ovvero un gruppo di peptidi con potenti effetti vasodilatatori [8].

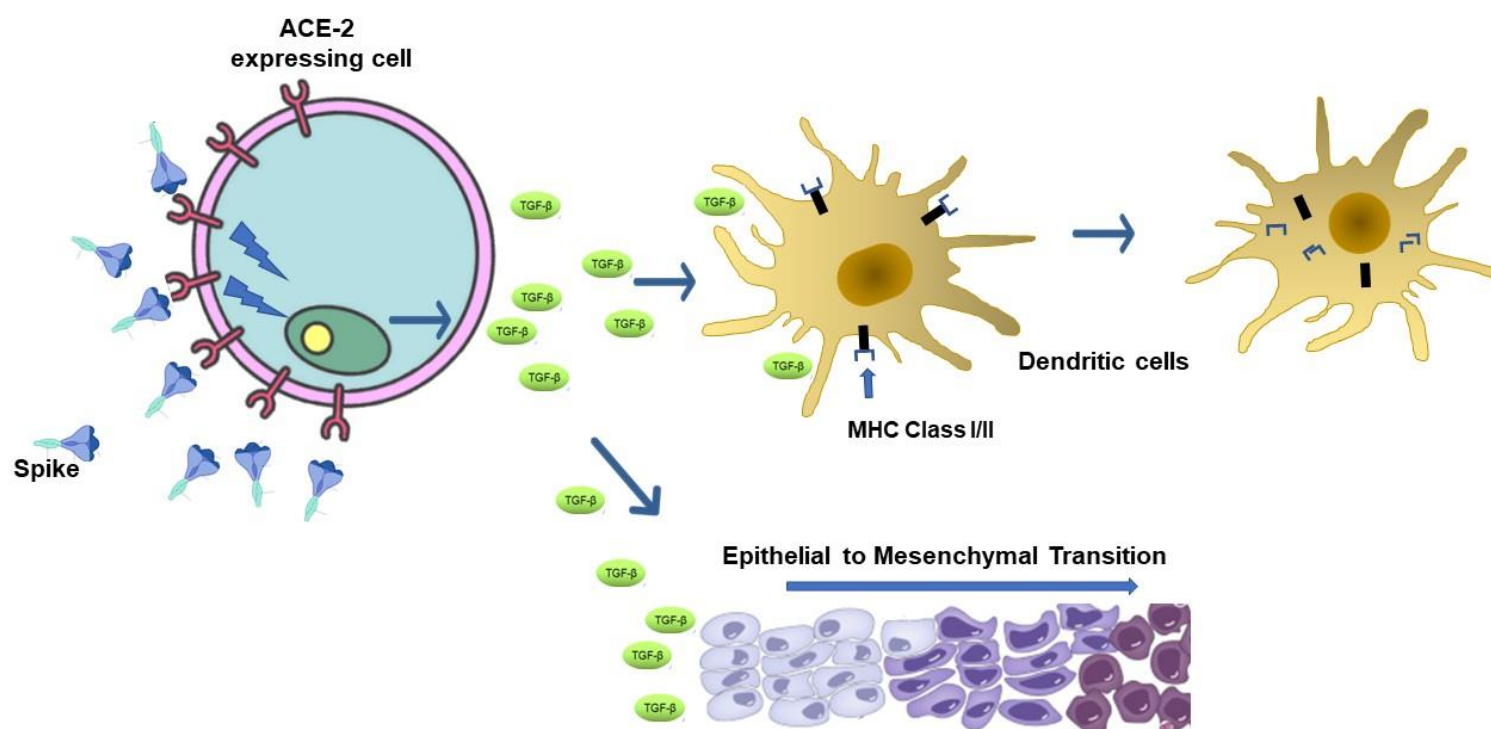
L'ACE-2 è espresso da un'ampia varietà di cellule, tra cui enterociti, cardiomiociti, tubuli renali, vasi e cellule duttali. Al contrario, l'espressione dell'ACE-2 nei tessuti respiratori è limitata a un piccolo numero di tipi di cellule specializzate, ovvero cellule alveolari di tipo II e macrofagi alveolari [9].

L'interazione tra ACE-2 e angiotensina II induce vari segnali di attivazione che portano al rilascio di diverse citochine, tra cui IL-6, TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  [10]. In questo quadro, va segnalato che gli effetti dell'interazione di ACE-2 con Spike ricapitolano quelli descritti per il legame con i suoi ligandi naturali [11]. In particolare, nelle cellule endoteliali vascolari, la Spike naturale genera un blocco delle funzioni mitocondriali [12] stimolando la attivazione cellulare dipendente dall'integrina  $\alpha 5\beta 1$  che porta alla traslocazione nucleare di NF- $\kappa$ B. Questi eventi inducono infine l'espressione di VCAM-1, ICAM-1, di fattori di coagulazione e il rilascio di citochine infiammatorie TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 [13]. Meccanismi di attivazione simili sono stati segnalati sia per i macrofagi che per le cellule dendritiche [14,15]. È importante notare che la Spike naturale induce sia nelle cellule epiteliali che in quelle endoteliali il rilascio della citochina multifunzionale TGF- $\beta$  [16].

#### **4. L'asse SARS-CoV-2 Spike/ACE-2/TGF- $\beta$ nella sorveglianza immunitaria antitumorale e nella transizione epiteliale-mesenchimale**

Il legame di Spike con ACE-2 produce profonde alterazioni nella segnalazione intracellulare con l'attivazione di fattori di trascrizione e il rilascio di diversi fattori solubili. In particolare, è stato scoperto che le cellule endoteliali vascolari umane trattate con Spike rilasciano sia TGF- $\beta 1$  che TGF- $\beta 2$  [17], in linea con precedenti prove "in vivo" che suggeriscono un ruolo chiave di TGF- $\beta$  nella patogenesi del COVID-19 [18, 19].

TGF- $\beta$ , con le sue tre isoforme,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  e  $\beta 3$ , è un regolatore chiave della risposta immunitaria adattativa [20], agendo, ad esempio, come inibitore dell'attività di presentazione dell'antigene nelle cellule dendritiche (DC) attraverso la internalizzazione e degradazione delle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) [21, 22] (Fig. 1). TGF- $\beta$  riduce anche l'espressione di IL-12 e di molecole co-stimolatorie come CD40 nei macrofagi e CD80, CD83 e CD86 nelle DC, come parte dei meccanismi regolatori dell'attivazione delle cellule immunitarie mediata da APC [23, 24].



**Figura 1.** Effetti “bystander” del legame Spike/ACE-2. La proteina Spike di SARS-CoV-2 lega le cellule che esprimono ACE-2, inducendo così la segnalazione intracellulare che porta al rilascio di fattori solubili. Tra questi, è noto che il TGF- $\beta$  riduce l'attività di presentazione dell'antigene nelle APC tramite la riduzione della MHC di classe I/II. Il TGF- $\beta$  è anche un importante motore della transizione epitelio-mesenchimale che è alla base dello sviluppo sia di tumori solidi che di metastasi.

Il TGF- $\beta$  può anche interferire con i meccanismi di sorveglianza immunitaria che controllano la crescita delle cellule tumorali. Ad esempio, il TGF- $\beta$  può indurre la polarizzazione dei macrofagi da M1 (forma caratterizzata dal rilascio di citochine infiammatorie come IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-18) a macrofagi M2, cellule che secernono citochine antinfiammatorie come IL-1ra e IL-10 e caratterizzate da molteplici proprietà immunosoppressive nel microambiente tumorale [25]. D'altra parte, il TGF- $\beta$  è un importante motore della transizione epitelio-mesenchimale (EMT) [26] che è la base dello sviluppo sia di tumori solidi che di metastasi. In questo scenario, risultati coerenti dal lavoro sperimentale di due gruppi di ricerca hanno sollevato l'ipotesi che la Spike naturale possa contribuire all'EMT (Fig. 1). In dettaglio, Lai e coll. hanno fornito prove che la attivazione cellulare correlata a TGF- $\beta$  è parte del meccanismo alla base dell'acquisizione di un fenotipo mesenchimale delle cellule di cancro al seno umano che esprimono Spike. Ancora più importante, hanno dimostrato che il numero di metastasi polmonari nei topi inoculati con cellule di cancro al seno 4T1 che esprimono Spike è aumentato rispetto a quello indotto dalle cellule parentali [27, 28]. Ciszewski e coll. hanno osservato che il trattamento con Spike ricombinante sia di HUVEC che di cellule endoteliali umane HMEC-1 induce il rilascio di TGF- $\beta$  associato alla trans-differenziazione (EMT) cellulare. Indagandone il meccanismo d'azione, hanno dimostrato il coinvolgimento dell'asse ACE-

2/TGF- $\beta$ /MRTF (fattore di trascrizione correlato alla miocardina)- $\beta$  nell'EMT osservato. Infine, il contributo del TGF- $\beta$  nell'EMT correlato a Spike è stato ulteriormente corroborato dalla dimostrazione che le cellule endoteliali umane trattate con Spike non sono riuscite a transdifferenziarsi, e quindi a divenire tumorali, in presenza di anticorpi anti-TGF- $\beta$  [17].

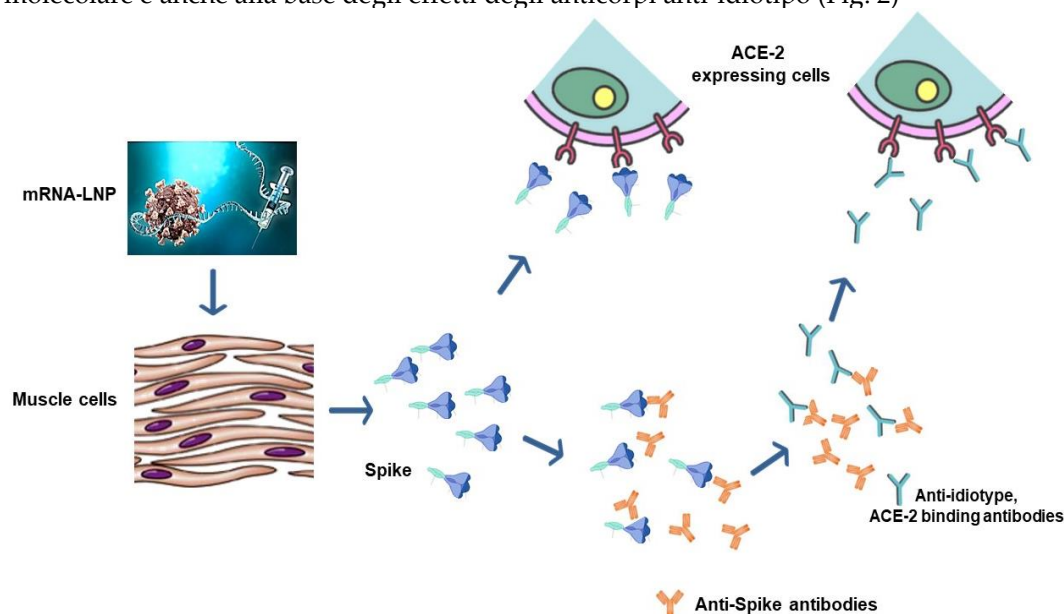
I risultati di questi studi sollevano la questione se Spike possa contribuire all'EMT negli esseri umani. Anche se finora non sono disponibili dati clinici che descrivano eventi associati a queste risposte immunitarie patologiche, le potenziali implicazioni in termini di sicurezza dei vaccini COVID-19 sembrano evidenti anche considerando il fatto che gli mRNA/LNP possono entrare in qualsiasi tipo di cellula. Ad esempio, l'ingresso indesiderato di complessi mRNA/LNP in cellule tumorali già formate può riprodurre le condizioni descritte da Lai e coll., rappresentando quindi un pericolo in termini di formazione di metastasi. D'altro canto, gli effetti patogenetici bystander possono essere indotti attraverso la produzione locale di alte concentrazioni di Spike da parte di cellule normali che internalizzano gli mRNA/LNP e situate nelle vicinanze delle cellule tumorali, come descritto da Ciszewski e coll. Per queste ragioni, l'estensione degli studi ad altri sistemi cellulari nonché ad appropriati modelli "in vivo" sembra necessaria considerando la possibilità che i complessi mRNA/LNP circolino nel corpo dopo la vaccinazione.

### **5. Immunità aspecifica indotta dal vaccino mRNA COVID-19: legame non specifico degli anticorpi anti-Spike, induzione di autoanticorpi, di anticorpi anti-idiotipo e produzione di proteine non identificate**

Gli alti livelli di proteina Spike prodotti dopo l'inoculo dei vaccini COVID-19 a mRNA sono associati a una risposta immunitaria circolatoria straordinariamente potente, con la produzione di alti titoli di anticorpi anti-Spike. Da un lato, questo risultato può essere considerato un vantaggio in termini di protezione antivirale; dall'altro, tuttavia, una così potente immunogenicità può essere associata a rilevanti effetti indesiderati che in genere emergono in presenza di stimoli antigenici elevati e persistenti. Tra gli effetti indesiderati va considerato il legame aspecifico degli anticorpi anti-Spike che possono reagire con molecole fisiologicamente espresse dall'organismo inducendo processi patologici. Inoltre, va considerato l'emergere di autoanticorpi e la generazione di anticorpi anti-idiotipo. Questi eventi sono stati correlati con la manifestazione nei vaccinati di patologie come trombocitopenia, miocardite, vari disturbi del ciclo mestruale, ricomparsa di infezioni latenti e sindrome post-vaccino COVID (PCVS).

Gli anticorpi anti-Spike che reagiscono in modo aspecifico legano bersagli eterologhi attraverso il meccanismo del mimetismo molecolare. Gli effetti patogenetici possono essere prodotti quando quantità sufficienti di essi si legano a target molecolari aspecifici che sono parte di processi biologici rilevanti. Attraverso l'analisi computazionale studiata del mimetismo molecolare tra Spike ed epitopi di proteine umane, è stato riportato che Spike condivide motivi lineari immunogenici con, tra gli altri, la trombopoietina (TQPLL) e la tropomiosina alfa-3 (ELDKY) [29]. Questi risultati sembrano rilevanti poiché il primo è un fattore di crescita chiave necessario per la differenziazione megacariocitaria e la produzione piastrinica, e il secondo è un componente strutturale dei cardiomiociti. In un altro studio, è stato riportato che Spike condivide 41 determinanti immunitari con 27 proteine umane specifiche per il sistema riproduttivo femminile relative all'oogenesi, alla ricettività uterina, alla decidualizzazione e alla placentazione [30]. Studi clinici hanno fornito prove che l'inoculo di vaccini mRNA COVID-19 può essere associato alla produzione di autoanticorpi, ovvero anticorpi non anti-Spike che riconoscono autoantigeni (proteine normalmente espresse dal corpo umano), come possibile conseguenza di uno squilibrio

immunitario generale. Ad esempio, Xu e coll. [31] hanno trovato anticorpi neutralizzanti anti-interferone di tipo I nel 10% degli individui sani vaccinati, sebbene gli studi siano stati completati con una dimensione del campione limitata. In un altro studio, è stato riscontrato che il 18% dei pazienti che sviluppano PCVS produce autoanticorpi contro le subunità dei neurofilamenti [32]. Anche se in alcuni casi gli autoanticorpi possono essere non reattivi, non è ancora chiaro se la vaccinazione riattivi un'autoimmunità latente preesistente o induca una generazione "de novo" di autoanticorpi. Il mimetismo molecolare è anche alla base degli effetti degli anticorpi anti-idiotipo (Fig. 2)



**Figura 2.** Generazione di anticorpi anti-idiotipo dopo la vaccinazione COVID-19. Il sistema immunitario può generare anticorpi contro le sequenze di anticorpi anti-Spike che riconoscono il dominio Spike che lega il recettore ACE-2 (receptor-binding domain, RBD). Attraverso un meccanismo di mimetismo molecolare, questi anticorpi (anticorpi anti-idiotipo) possono legare ACE-2 proprio come la Spike immunogenico.

Nel caso in cui l'immunogeno sia un antigene che si lega a un partner molecolare, il sistema immunitario può reagire contro le sequenze all'interno degli anticorpi anti-antigene indotti che riconoscono la regione dell'antigene che lega il suo partner, ad esempio, nel caso di Spike, il dominio di legame del recettore (RBD). In generale, in condizioni fisiologiche, questo meccanismo contribuisce al controllo della produzione di anticorpi antigene-specifici. Tuttavia, in presenza di quantità eccessive di anticorpi antigene-specifici, come nel caso della vaccinazione anti-COVID-19 basata su mRNA, la conseguente iper-produzione di anticorpi anti-idiotipo può portare a effetti che imitano quelli indotti dal legame di Spike con ACE-2 [33]. Per esempio, Bellucci e coll. hanno recentemente dimostrato effetti collaterali associati alla produzione di anticorpi anti-idiotipo leganti ACE-2. In particolare, questi ricercatori hanno segnalato complicazioni cliniche neurologiche tra cui radicolite, mielite e sindrome di Guillain-Barré in soggetti infetti e non infetti da SARS-CoV-2 iniettati con vaccini COVID-19 basati su mRNA e che sviluppano autoanticorpi anti-ACE-2 [34]. Purtroppo, sia gli autoanticorpi che gli anticorpi anti-idiotipo possono persistere ben oltre la durata della risposta immunitaria anti-Spike.

La recente scoperta che l'incorporazione di N1-metil-pseudouridina in luogo del residuo di uridina naturale nella struttura portante dell'mRNA associato al vaccino può indurre uno spostamento di lettura ribosomiale +1, producendo così prodotti proteici ignoti, ha aggiunto un altro livello di complessità in termini di risposta immunitaria indotta dal vaccino. È stato stimato che circa l'8% dei prodotti tradotti totali dall'mRNA sintetico che incorpora N1-metil-pseudouridina rappresenti proteine sconosciute che,

cosa di fondamentale importanza, sono immunogeniche negli esseri umani [35]. Il potenziale autoimmune dei prodotti proteici aberranti generati in questo modo rappresenta un altro punto che deve essere ulteriormente approfondito.

## 6. Vaccini mucosali: un'alternativa potenzialmente priva di effetti collaterali sistemici

Il campo di battaglia dell'infezione da SARS-CoV-2 è il sistema respiratorio, dove il vaccino COVID-19 ideale dovrebbe sviluppare la sua forza immunologica e antivirale più efficace. I dati clinici riportati con gli attuali vaccini COVID-19 basati su mRNA supportano l'idea che la forte risposta immunitaria circolatoria indotta sia associata a un'immunità antivirale troppo limitata nei distretti respiratori [36].

Analogamente a quanto dimostrato con l'infezione naturale [37], i vaccini mucosali hanno la capacità di indurre risposte immunitarie efficaci nel compartimento respiratorio attraverso la produzione sia di IgA dimeriche/secretorie neutralizzanti nel distretto oronasofaringeo [38], sia di linfociti antivirali CD8+ T di memoria nel tratto respiratorio inferiore [39]. In questo modo, i vaccini mucosali possono avere l'incomparabile vantaggio di bloccare la catena di trasmissione del SARS-COV-2 e di altri virus trasmessi per via aerea.

Attualmente, sono stati approvati due vaccini mucosali COVID-19 e altri sono in sperimentazione clinica [40]. Da notare che, in nessun caso, ci si aspetta che questi vaccini inducano risposte immunitarie sistemiche robuste come quelle osservate con gli attuali vaccini COVID-19. Tuttavia, un'immunizzazione sistemica subottimale/debole non dovrebbe essere considerata uno svantaggio funzionalmente rilevante considerando la compartimentazione del sistema immunitario respiratorio [41] che limita l'accesso di anticorpi IgG neutralizzanti e cellule immunitarie antivirali dal distretto circolatorio. Al contrario, può rappresentare un vantaggio in termini di forte riduzione degli effetti sistemici immunologici indotti dai vaccini COVID-19 basati su mRNA inoculati intramuscolarmente.

## 7. Conclusioni

Diverse evidenze sperimentali supportano l'idea che la proteina Spike venga prodotta in abbondanza e persista in circolo e nei linfonodi dopo la vaccinazione mRNA COVID-19. Gli attuali vaccini COVID-19 basati su mRNA riconoscono una serie di limitazioni rilevanti, tra cui il rapido declino della risposta immunitaria, l'incapacità di montare una risposta immunitaria efficace al punto di ingresso del virus, e la ridotta efficacia delle formulazioni aggiornate a causa del fenomeno del "peccato antigenico originale" [42, 43]. D'altro canto, la potente traduzione di mRNA associata alla sovrapproduzione di Spike può portare a una deregolazione della segnalazione intracellulare ACE-2-dipendente e della produzione di citochine, al legame aspecifico di anticorpi contro bersagli molecolari fisiologici, all'emersione di anticorpi anti-idiotipo e autoanticorpi e a risposte immunitarie contro prodotti proteici sconosciuti. Inoltre, le citochine prodotte dopo il legame Spike/ACE-2 possono influenzare sfavorevolmente il destino di tumori ancora "dormienti", di patologie autoimmuni preesistenti e infiammazioni croniche. Per queste ragioni, l'attuale indicazione dei vaccini mRNA COVID-19 per la popolazione "fragile" dovrebbe essere attentamente rivalutata alla luce della tipologia di ogni specifica fragilità. Nonostante la notevole efficienza della produzione di Spike a seguito della vaccinazione con mRNA/LNP, sorprendentemente sono stati sviluppati tentativi di migliorare le prestazioni di questi vaccini COVID-19 basati su mRNA nella direzione di rafforzare ancora la produzione di Spike attraverso l'inoculo di vettori basati su mRNA autoreplicanti [44]. In particolare, il Ministero della Salute giapponese ha recentemente approvato una sperimentazione clinica per testare la sicurezza e l'efficacia di un vaccino COVID-19 basato su questa tecnologia [45]. Questa scelta sembra essere veramente discutibile date le criticità sopra descritte indotte dalla

produzione eccessiva e dalla persistenza di Spike circolatorio dettate dagli attuali vaccini COVID-19 basati su mRNA. In questo scenario, si prevede che l'aumento delle quantità e della persistenza di Spike circolante esacerberà gli effetti collaterali sia cellulari che immunologici, tuttavia senza agire sul limite funzionale più rilevante di questi vaccini, ovvero la loro incapacità di suscitare un'immunità neutralizzante nelle vie respiratorie a causa della compartimentazione immunitaria del sistema respiratorio. Inoltre, è noto che uno stimolo immunogenico troppo potente e persistente induce tolleranza immunologica, come riportato in un paio di articoli per gli attuali vaccini COVID-19 [46, 47].

Al contrario, una strada più plausibile da percorrere è rappresentata dallo sviluppo di vaccini mucosali [48] data la loro capacità di agire alla porta di ingresso del virus e di evitare la maggior parte degli effetti collaterali sistemici osservati nei vaccini mRNA COVID-19 iniettati per via intramuscolare.

La tecnologia basata su mRNA attualmente attira l'interesse di molti scienziati in tutto il mondo. Nel caso dei vaccini anti-COVID-19, sembra più che ragionevole che una adeguata quantità di indagini debba essere focalizzata sull'identificazione e l'analisi di eventi inattesi, con l'intento di rendere questa strategia profilattica più sicura e commisurata all'uso su un gran numero di persone sane.

**Funding:** This work was supported by the RiPrEI grant, n. Rip1, from Ministry of Health, Rome, Italy.

**Institutional Review Board Statement:** not applicable.

**Informed Consent Statement:** not applicable.

**Data Availability Statement:** no new data are created.

**Acknowledgments:** I thank Rosangela Duranti and Federica Magnani for their secretarial assistance.

**Conflicts of Interest:** The author declares no conflict of interest.

## References

1. Cosentino, M.; Marino, F. Understanding the Pharmacology of COVID-19 mRNA Vaccines: Playing Dice with the Spike? *International Journal of Molecular Sciences* **2022**, *23* (18), 10881. <https://doi.org/10.3390/ijms231810881>.
2. Röltgen, K.; Nielsen, S. C. A.; Silva, O.; Younes, S. F.; Zaslavsky, M.; Costales, C.; Yang, F.; Wirz, O. F.; Solis, D.; Hoh, R. A.; Wang, A.; Arunachalam, P. S.; Colburg, D.; Zhao, S.; Haraguchi, E.; Lee, A. S.; Shah, M. M.; Manohar, M.; Chang, I.; Gao, F.; Mallajosyula, V.; Li, C.; Liu, J.; Shoura, M. J.; Sindher, S. B.; Parsons, E.; Dashdorj, N. J.; Dashdorj, N. D.; Monroe, R.; Serrano, G. E.; Beach, T. G.; Chinthrajah, R. S.; Charville, G. W.; Wilbur, J. L.; Wohlstadter, J. N.; Davis, M. M.; Pulendran, B.; Troxell, M. L.; Sigal, G. B.; Natkunam, Y.; Pinsky, B. A.; Nadeau, K. C.; Boyd, S. D. Immune Imprinting, Breadth of Variant Recognition, and Germinal Center Response in Human SARS-CoV-2 Infection and Vaccination. *Cell* **2022**, *185* (6), 1025–1040.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.01.018>.
3. Moghimi, S. M.; Simberg, D. Pro-Inflammatory Concerns with Lipid Nanoparticles. *Mol Ther* **2022**, *30* (6), 2109–2110. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2022.04.011>.
4. Lindsay, K. E.; Bhosle, S. M.; Zurla, C.; Beyersdorf, J.; Rogers, K. A.; Vanover, D.; Xiao, P.; Araínga, M.; Shirreff, L. M.; Pitard, B.; Baumhof, P.; Villinger, F.; Santangelo, P. J. Visualization of Early Events in mRNA Vaccine Delivery in Non-Human Primates via PET-CT and near-Infrared Imaging. *Nat Biomed Eng* **2019**, *3* (5), 371–380. <https://doi.org/10.1038/s41551-019-0378-3>.
5. 2021. EMA. 2020a. Assessment report Comirnaty Common name: COVID-19 mRNA vaccine (nucleoside modified). [https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/comirnaty-epar-public-assessment-report\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/comirnaty-epar-public-assessment-report_en.pdf)
6. Krauson, A. J.; Casimero, F. V. C.; Siddiquee, Z.; Stone, J. R. Duration of SARS-CoV-2 mRNA Vaccine Persistence and Factors Associated with Cardiac Involvement in Recently Vaccinated Patients. *NPJ Vaccines* **2023**, *8* (1), 141. <https://doi.org/10.1038/s41541-023-00742-7>.
7. Wong, C. K.; Lam, C. W. K.; Wu, A. K. L.; Ip, W. K.; Lee, N. L. S.; Chan, I. H. S.; Lit, L. C. W.; Hui, D. S. C.; Chan, M. H. M.; Chung, S. S. C.; Sung, J. J. Y. Plasma Inflammatory Cytokines and Chemokines in Severe Acute Respiratory Syndrome. *Clin Exp Immunol* **2004**, *136* (1), 95–103. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2004.02415.x>.



8. Kuba, K.; Yamaguchi, T.; Penninger, J. M. Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) in the Pathogenesis of ARDS in COVID-19. *Front Immunol* **2021**, *12*, 732690. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.732690>.
9. Hikmet, F.; Méar, L.; Edvinsson, Å.; Mücke, P.; Uhlén, M.; Lindskog, C. The Protein Expression Profile of ACE2 in Human Tissues. *Mol Syst Biol* **2020**, *16* (7), e9610. <https://doi.org/10.15252/msb.20209610>.
10. Santos, R. A. S.; Sampaio, W. O.; Alzamora, A. C.; Motta-Santos, D.; Alenina, N.; Bader, M.; Campagnole-Santos, M. J. The ACE2/Angiotensin-(1-7)/MAS Axis of the Renin-Angiotensin System: Focus on Angiotensin-(1-7). *Physiol Rev* **2018**, *98* (1), 505–553. <https://doi.org/10.1152/physrev.00023.2016>.
11. Ni, W.; Yang, X.; Yang, D.; Bao, J.; Li, R.; Xiao, Y.; Hou, C.; Wang, H.; Liu, J.; Yang, D.; Xu, Y.; Cao, Z.; Gao, Z. Role of Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) in COVID-19. *Crit Care* **2020**, *24* (1), 422. <https://doi.org/10.1186/s13054-020-03120-0>.
12. Lei, Y.; Zhang, J.; Schiavon, C. R.; He, M.; Chen, L.; Shen, H.; Zhang, Y.; Yin, Q.; Cho, Y.; Andrade, L.; Shadel, G. S.; Hepokoski, M.; Lei, T.; Wang, H.; Zhang, J.; Yuan, J. X.-J.; Malhotra, A.; Manor, U.; Wang, S.; Yuan, Z.-Y.; Shyy, J. Y.-J. SARS-CoV-2 Spike Protein Impairs Endothelial Function via Downregulation of ACE 2. *Circulation Research* **2021**, *128* (9), 1323–1326. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.121.318902>.
13. Robles, J. P.; Zamora, M.; Adan-Castro, E.; Siqueiros-Marquez, L.; Escalera, G. M. de la; Clapp, C. The Spike Protein of SARS-CoV-2 Induces Endothelial Inflammation through Integrin A5β1 and NF-KB Signaling. *Journal of Biological Chemistry* **2022**, *298* (3). <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101695>.
14. Barhoumi, T.; Alghanem, B.; Shaibah, H.; Mansour, F. A.; Alamri, H. S.; Akiel, M. A.; Alroqi, F.; Boudjelal, M. SARS-CoV-2 Coronavirus Spike Protein-Induced Apoptosis, Inflammatory, and Oxidative Stress Responses in THP-1-Like-Macrophages: Potential Role of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor (Perindopril). *Front Immunol* **2021**, *12*, 728896. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.728896>.
15. Winheim, E.; Rinke, L.; Lutz, K.; Reischer, A.; Leutbecher, A.; Wolfram, L.; Rausch, L.; Kranich, J.; Wratil, P. R.; Huber, J. E.; Baumjohann, D.; Rothenfusser, S.; Schubert, B.; Hilgendorff, A.; Hellmuth, J. C.; Scherer, C.; Muenchhoff, M.; von Bergwelt-Baildon, M.; Stark, K.; Straub, T.; Bocker, T.; Keppler, O. T.; Subklewe, M.; Krug, A. B. Impaired Function and Delayed Regeneration of Dendritic Cells in COVID-19. *PLoS Pathog* **2021**, *17* (10), e1009742. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009742>.
16. Gracie, N. P.; Lai, L. Y. S.; Newsome, T. P. Cellular Signalling by SARS-CoV-2 Spike Protein. *Microbiol. Aust.* **2024**, *45* (1), 13–17. <https://doi.org/10.1071/MA24005>.
17. Ciszewski, W. M.; Woźniak, L. A.; Sobierajska, K. Diverse Roles of SARS-CoV-2 Spike and Nucleocapsid Proteins in EndMT Stimulation through the TGF-β-MRTF Axis Inhibited by Aspirin. *Cell Commun Signal* **2024**, *22* (1), 296. <https://doi.org/10.1186/s12964-024-01665-z>.
18. Biering, S. B.; Gomes de Sousa, F. T.; Tjang, L. V.; Pahmeier, F.; Zhu, C.; Ruan, R.; Blanc, S. F.; Patel, T. S.; Worthington, C. M.; Glasner, D. R.; Castillo-Rojas, B.; Servellita, V.; Lo, N. T. N.; Wong, M. P.; Warnes, C. M.; Sandoval, D. R.; Clausen, T. M.; Santos, Y. A.; Fox, D. M.; Ortega, V.; Näär, A. M.; Baric, R. S.; Stanley, S. A.; Aguilar, H. C.; Esko, J. D.; Chiu, C. Y.; Pak, J. E.; Beatty, P. R.; Harris, E. SARS-CoV-2 Spike Triggers Barrier Dysfunction and Vascular Leak via Integrins and TGF-β Signaling. *Nat Commun* **2022**, *13* (1), 7630. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34910-5>.
19. Carvacho, I.; Piesche, M. RGD-Binding Integrins and TGF-β in SARS-CoV-2 Infections - Novel Targets to Treat COVID-19 Patients? *Clin Transl Immunology* **2021**, *10* (3), e1240. <https://doi.org/10.1002/cti2.1240>.
20. Deng, Z.; Fan, T.; Xiao, C.; Tian, H.; Zheng, Y.; Li, C.; He, J. TGF-β Signaling in Health, Disease, and Therapeutics. *Signal Transduct Target Ther* **2024**, *9* (1), 61. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01764-w>.
21. Battle, E.; Massagué, J. Transforming Growth Factor-β Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity* **2019**, *50* (4), 924–940. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.024>.
22. Nandan, D.; Reiner, N. E. TGF-Beta Attenuates the Class II Transactivator and Reveals an Accessory Pathway of IFN-Gamma Action. *J Immunol* **1997**, *158* (3), 1095–1101.
23. Geissmann, F.; Revy, P.; Regnault, A.; Lepelletier, Y.; Dy, M.; Brousse, N.; Amigorena, S.; Hermine, O.; Durandy, A. TGF-Beta 1 Prevents the Noncognate Maturation of Human Dendritic Langerhans Cells. *J Immunol* **1999**, *162* (8), 4567–4575.
24. Takeuchi, M.; Alard, P.; Streilein, J. W. TGF-Beta Promotes Immune Deviation by Altering Accessory Signals of Antigen-Presenting Cells. *J Immunol* **1998**, *160* (4), 1589–1597.
25. Mantovani, A.; Sozzani, S.; Locati, M.; Allavena, P.; Sica, A. Macrophage Polarization: Tumor-Associated Macrophages as a Paradigm for Polarized M2 Mononuclear Phagocytes. *Trends Immunol* **2002**, *23* (11), 549–555. [https://doi.org/10.1016/s1471-4906\(02\)02302-5](https://doi.org/10.1016/s1471-4906(02)02302-5).
26. Angioni, R.; Sánchez-Rodríguez, R.; Viola, A.; Molon, B. TGF-β in Cancer: Metabolic Driver of the Tolerogenic Crosstalk in the Tumor Microenvironment. *Cancers* **2021**, *13* (3), 401. <https://doi.org/10.3390/cancers13030401>.
27. Lai, Y.-J.; Chao, C.-H.; Liao, C.-C.; Lee, T.-A.; Hsu, J.-M.; Chou, W.-C.; Wang, J.; Huang, H.-C.; Chang, S.-J.; Lin, Y.-L.; Li, C.-W. Epithelial-Mesenchymal Transition Induced by SARS-CoV-2 Required Transcriptional Upregulation of Snail. *Am J Cancer Res* **2021**, *11* (5), 2278–2290.
28. Huang, H.-C.; Liao, C.-C.; Wang, S.-H.; Lee, I.-J.; Lee, T.-A.; Hsu, J.-M.; Kuo, C.-T.; Wang, J.; Hsieh, W.-C.; Chang, S.-J.; Chen, S.-Y.; Tao, M.-H.; Lin, Y.-L.; Lai, Y.-J.; Li, C.-W. Hyperglycosylated Spike of SARS-CoV-2 Gamma Variant Induces Breast Cancer Metastasis. *Am J Cancer Res* **2021**, *11* (10), 4994–5005.
29. Nunez-Castilla, J.; Stebliankin, V.; Baral, P.; Balbin, C. A.; Sobhan, M.; Cickovski, T.; Mondal, A. M.; Narasimhan, G.; Chapagain, P.; Mathee, K.; Silberg-Liberles, J. Potential Autoimmunity Resulting from Molecular Mimicry between SARS-CoV-2 Spike and Human Proteins. *Viruses* **2022**, *14* (7), 1415. <https://doi.org/10.3390/v14071415>.

30. Dotan, A.; Kanduc, D.; Muller, S.; Makatsariya, A.; Shoenfeld, Y. Molecular Mimicry between SARS-CoV-2 and the Female Reproductive System. *Am J Reprod Immunol* **2021**, *86* (6), e13494. <https://doi.org/10.1111/aji.13494>.
31. Xu, W.; Wen, X.; Cong, X.; Jiang, W. COVID-19 mRNA Vaccine, but Not a Viral Vector-Based Vaccine, Promotes Neutralizing Anti-Type I Interferon Autoantibody Production in a Small Group of Healthy Individuals. *J Med Virol* **2023**, *95* (10), e29137. <https://doi.org/10.1002/jmv.29137>.
32. Murphy, W. J.; Longo, D. L. A Possible Role for Anti-Idiotypic Antibodies in SARS-CoV-2 Infection and Vaccination. *N Engl J Med* **2022**, *386* (4), 394–396. <https://doi.org/10.1056/NEJMcibr2113694>.
33. Arlt, F. A.; Breuer, A.; Trampenau, E.; Boesl, F.; Kirchner, M.; Mertins, P.; Sánchez-Sendín, E.; Nasouti, M.; Mayrhofer, M.; Blüthner, M.; Endres, M.; Prüss, H.; Franke, C. High Serum Prevalence of Autoreactive IgG Antibodies against Peripheral Nerve Structures in Patients with Neurological Post-COVID-19 Vaccination Syndrome. *Front Immunol* **2024**, *15*, 1404800. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1404800>.
34. Bellucci, M.; Bozzano, F. M.; Castellano, C.; Pesce, G.; Beronio, A.; Farshchi, A. H.; Limongelli, A.; Uccelli, A.; Benedetti, L.; De Maria, A. Post-SARS-CoV-2 Infection and Post-Vaccine-Related Neurological Complications Share Clinical Features and the Same Positivity to Anti-ACE2 Antibodies. *Front Immunol* **2024**, *15*, 1398028. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1398028>.
35. Mulrone, T. E.; Pöyry, T.; Yam-Puc, J. C.; Rust, M.; Harvey, R. F.; Kalmar, L.; Horner, E.; Booth, L.; Ferreira, A. P.; Stoneley, M.; Sawarkar, R.; Mentzer, A. J.; Lilley, K. S.; Smales, C. M.; von der Haar, T.; Turtle, L.; Dunachie, S.; Klenerman, P.; Thaventhiran, J. E. D.; Willis, A. E. N1-Methylpseudouridylation of mRNA Causes +1 Ribosomal Frameshifting. *Nature* **2024**, *625* (7993), 189–194. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06800-3>.
36. Tang, J.; Zeng, C.; Cox, T. M.; Li, C.; Son, Y. M.; Cheon, I. S.; Wu, Y.; Behl, S.; Taylor, J. J.; Chakarabarty, R.; Johnson, A. J.; Shiavo, D. N.; Utz, J. P.; Reisenauer, J. S.; Midthun, D. E.; Mullon, J. J.; Edell, E. S.; Alameh, M. G.; Borish, L.; Teague, W. G.; Kaplan, M. H.; Weissman, D.; Kern, R.; Hu, H.; Vassallo, R.; Liu, S.-L.; Sun, J. Respiratory Mucosal Immunity against SARS-CoV-2 after mRNA Vaccination. *Sci Immunol* **2022**, *7* (76), eadd4853. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.add4853>.
37. Mitsi, E.; Diniz, M. O.; Reiné, J.; Collins, A. M.; Robinson, R. E.; Hyder-Wright, A.; Farrar, M.; Liatsikos, K.; Hamilton, J.; Onyema, O.; Urban, B. C.; Solórzano, C.; Belij-Rammerstorfer, S.; Sheehan, E.; Lambe, T.; Draper, S. J.; Weiskopf, D.; Sette, A.; Maini, M. K.; Ferreira, D. M. Respiratory Mucosal Immune Memory to SARS-CoV-2 after Infection and Vaccination. *Nat Commun* **2023**, *14* (1), 6815. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-42433-w>.
38. Sun, B.; Wang, Q.; Zheng, P.; Niu, X.; Feng, Y.; Guan, W.; Chen, S.; Li, J.; Cui, T.; Deng, Y.; Cheng, Z. J.; Li, Y.; Zhou, X.; Fang, Y.; Wang, W.; Wang, Z.; Chen, L.; Zhong, N. An Intranasally Administered Adenovirus-Vectored SARS-CoV-2 Vaccine Induces Robust Mucosal Secretory IgA. *JCI Insight* **2024**, *9* (18), e180784. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.180784>.
39. Ma, B.; Tao, M.; Li, Z.; Zheng, Q.; Wu, H.; Chen, P. Mucosal Vaccines for Viral Diseases: Status and Prospects. *Virology* **2024**, *593*, 110026. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2024.110026>.
40. Rathore, A. P. S.; St. John, A. L. Promises and Challenges of Mucosal COVID-19 Vaccines. *Vaccine* **2023**, *41* (27), 4042–4049. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2023.04.013>.
41. Allie, S. R.; Bradley, J. E.; Mudunuru, U.; Schultz, M. D.; Graf, B. A.; Lund, F. E.; Randall, T. D. The Establishment of Resident Memory B Cells in the Lung Requires Local Antigen Encounter. *Nat Immunol* **2019**, *20* (1), 97–108. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0260-6>.
42. Planas, D.; Bruel, T.; Grzelak, L.; Guivel-Benhassine, F.; Staropoli, I.; Porrot, F.; Planchais, C.; Buchrieser, J.; Rajah, M. M.; Bishop, E.; Albert, M.; Donati, F.; Prot, M.; Behillil, S.; Enouf, V.; Maquart, M.; Smati-Lafarge, M.; Varon, E.; Schortgen, F.; Yahyaoui, L.; Gonzalez, M.; De Sèze, J.; Péré, H.; Veyer, D.; Sève, A.; Simon-Lorière, E.; Fafi-Kremer, S.; Stefic, K.; Mouquet, H.; Hocqueloux, L.; van der Werf, S.; Prazuck, T.; Schwartz, O. Sensitivity of Infectious SARS-CoV-2 B.1.1.7 and B.1.351 Variants to Neutralizing Antibodies. *Nat Med* **2021**, *27* (5), 917–924. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01318-5>.
43. Tang, Y.; Boribong, B. P.; Swank, Z. N.; Demokritou, M.; Luban, M. A. F.; Fasano, A.; Du, M.; Wolf, R. L.; Griffiths, J.; Shultz, J.; Borberg, E.; Chalise, S.; Gonzalez, W. I.; Walt, D. R.; Yonker, L. M.; Horwitz, B. H. COVID-19 mRNA Vaccines Induce Robust Levels of IgG but Limited Amounts of IgA within the Oronasopharynx of Young Children. *J Infect Dis* **2024**, *jiae450*. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiae450>.
44. Oda, Y.; Kumagai, Y.; Kanai, M.; Iwama, Y.; Okura, I.; Minamida, T.; Yagi, Y.; Kurosawa, T.; Greener, B.; Zhang, Y.; Walson, J. L. Immunogenicity and Safety of a Booster Dose of a Self-Amplifying RNA COVID-19 Vaccine (ARCT-154) versus BNT162b2 mRNA COVID-19 Vaccine: A Double-Blind, Multicentre, Randomised, Controlled, Phase 3, Non-Inferiority Trial. *The Lancet Infectious Diseases* **2024**, *24* (4), 351–360. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(23\)00650-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00650-3).
45. Dolgin, E. Self-Copying RNA Vaccine Wins First Full Approval: What's next? *Nature* **2023**, *624* (7991), 236–237. <https://doi.org/10.1038/d41586-023-03859-w>.
46. Uversky, V. N.; Redwan, E. M.; Makis, W.; Rubio-Casillas, A. IgG4 Antibodies Induced by Repeated Vaccination May Generate Immune Tolerance to the SARS-CoV-2 Spike Protein. *Vaccines* **2023**, *11* (5), 991. <https://doi.org/10.3390/vaccines11050991>.
47. Irrgang, P.; Gerling, J.; Kocher, K.; Lapuente, D.; Steininger, P.; Habenicht, K.; Wytopil, M.; Beileke, S.; Schäfer, S.; Zhong, J.; Ssebyatika, G.; Krey, T.; Falcone, V.; Schüle, C.; Peter, A. S.; Nganou-Makamdop, K.; Hengel, H.; Held, J.; Bogdan, C.; Überla, K.; Schober, K.; Winkler, T. H.; Tenbusch, M. Class Switch toward Noninflammatory, Spike-Specific IgG4 Antibodies after Repeated SARS-CoV-2 mRNA Vaccination. *Sci Immunol* **2023**, *8* (79), eade2798. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.ade2798>.
48. Zhu, F.; Huang, S.; Liu, X.; Chen, Q.; Zhuang, C.; Zhao, H.; Han, J.; Jaen, A. M.; Do, T. H.; Peter, J. G.; Dorado, A. G.; Tirador, L. S.; Zabat, G. M. A.; Villalobos, R. E. M.; Gueco, G. P.; Botha, L. L. G.; Pertuz, S. P. I.; Tan, J.; Zhu, K.; Quan, J.; Lin, H.; Huang, Y.; Jia, J.; Chu, X.; Chen, J.; Chen, Y.; Zhang, T.; Su, Y.; Li, C.; Ye, X.; Wu, T.; Zhang, J.; Xia, N. Safety and Efficacy of the Intranasal

---

Spray SARS-CoV-2 Vaccine dNS1-RBD: A Multicentre, Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 3 Trial. *The Lancet Respiratory Medicine* **2023**, *11* (12), 1075–1088. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(23\)00349-1](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(23)00349-1).

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.