



**Die sog. Covid-19-„Impfstoffe“ müssen sofort vom Markt genommen und die Impfkampagne umgehend eingestellt werden
Alles andere ist unverantwortlich!**

**PRESSEKONFERENZ
Beginn der Corona-Aufarbeitung**

4. Dezember 2024
im Südtiroler Landtag, Repräsentationssaal

organisiert von RA DDr. Renate Holzeisen, Abgeordnete zum Südtiroler Landtag

in Anwesenheit von Vertretern der Gesundheitsberufe und der Sozialunion WIR-NOI sowie mit Zuschaltung aus Rom von Dr. Maurizio Federico, Leiter des National Center for Global Health des Istituto Superiore di Sanità (Oberste Italienische Gesundheitsbehörde)

Link zum Video der PK:

<https://odysee.com/@renateholzeisen:e/Die-Covid-19-Impfstoffe-sofort-vom-Markt-nehmen-Ritiro-immediato-dal-mercato-dei-vaccini-Covid-19:a>

Die **Aufarbeitung der sog. Corona-Maßnahmen** ist auch **für die Vermeidung von weiteren katastrophalen politischen Entscheidungen aktuell und zukünftig notwendig.**

Die **Südtiroler Landesregierung** hat bis dato diesbezüglich nicht nur gar nichts gemacht, sondern **zeigt klar, dass man an einer Aufarbeitung nicht interessiert ist.**

Der **Gesundheitslandesrat Hubert Messner** leugnet in aller Öffentlichkeit im **Südtiroler Landtag** sogar die aus dem **Beipackzettel der sog. Covid-19-„Impfstoffe“** hervorgehenden für **Gesundheit und Leben gravierenden Risiken**, und würdigt eine erst unlängst erschienene wichtige Studie des Leiters des Nationalen Zentrums für Globale Gesundheit der Obersten Italienischen Gesundheitsbehörde (*Istituto Superiore di Sanità*), Dr. Maurizio Federico, herab.

Es wird **weiterhin für die Covid-19-Impfung auch mit Einsatz von Steuergeld regelrecht geworben**, und die **Bürger werden nach wie vor komplett desinformiert. Insbesondere Schwangeren wird diese experimentelle hoch gefährliche Injektion nach wie vor nahegelegt.**

Das Thema des signifikanten **Geburtenrückgangs** (viele Totgeburten) wird offiziell in keinerlei Zusammenhang mit den Covid-19-„Impfungen“ gebracht, obwohl es **bekannt ist, dass diese Substanzen die Plazentabariere durchbrechen.** Das hat es vorher noch nie gegeben, dass Ungeborene systematisch mit der Mutter „geimpft“ bzw. einer experimentellen Substanz systematisch ausgesetzt werden.

Eine Gruppe von Südtiroler und Trentiner Ärzten, Pharmazeuten und ein Psychologe haben gleich zu Beginn des Ausrollens der sog. Covid-19-„Impfkampagne“ (Anfang 2021) mit einem Video den Bürgern wichtige Informationen zukommen lassen. Die Reaktion darauf in wenigen Worten: Herabwürdigung, Beschimpfung, Rufschädigung bis hin zu disziplinarrechtlicher Verfolgung durch die entsprechenden Berufskammern.

Die Zeitungsartikel aus dieser Zeit zeigen, wie Meinungsmacher der Südtiroler Gesellschaft, u.a. auch der aktuelle Landesrat für Gesundheit, Hubert Messner, anstatt sich mit dem Inhalt der wichtigen Botschaften auseinanderzusetzen, diese einfach als unwissenschaftlich, gefährlich und verantwortungslos abgetan haben.

Heute habe ich zu dieser Pressekonferenz geladen, um gemeinsam mit diesen - der wissenschaftlichen Evidenz und dem Prinzip *„primum non nocere“* verpflichteten Vertreter der Gesundheitsberufe fast vier Jahre nach ihrer, als „Schock-Video“ herabgewürdigten Informationsinitiative zum Schutze der Bevölkerung - ein factchecking, das ja seit nunmehr fünf Jahren so *en vogue* ist, vorzunehmen.

Direkt zugeschaltet in diese PK ist der Leiter des Nationalen Zentrums für Globale Gesundheit an der Italienischen Obersten Gesundheitsbehörde (*Istituto Superiore della Sanità*), Dr. Maurizio Federico, der nachfolgend die erschütternden Ergebnisse seiner am 14. November im Wissenschaftsjournal „Vaccines“ veröffentlichten Studie präsentieren wird.

Zunächst gebe ich das Wort an den Pharmazeuten Dr. Hannes Loacker weiter.

RA DDr. Renate Holzeisen

Mitglied des Südtiroler Landtages – Membro del Consiglio della Prov. Autonoma di Bolzano



Präsentation Video EXPERIMENT AM MENSCHEN

Hannes Loacker: Einleitung und KURZREVUE

Herzlichen Dank an Landtagsabgeordnete Renate Holzeisen, dass sie uns heute die Möglichkeit gibt, einen wichtigen Beitrag für die Aufklärung und Aufarbeitung der Corona-Zeit leisten zu können. Frau Dr. Holzeisen hat uns von Beginn an tatkräftig unterstützt und gemeinsam haben wir, Seite an Seite, öffentlich Gesicht gezeigt, gewarnt und informiert, den Menschen geholfen und uns gesellschaftlich und auch politisch engagiert.

27. Februar 2021: Wir sind mitten im ersten Lockdown, der sog. Corona-Impfstoff ist seit 3 Monaten zugelassen und wird fleißig gespritzt. Acht Ärzte, zwei Pharmazeuten und ein Psychologe aus Südtirol und dem Trentino veröffentlichen das Video „5 brisante Fragen zur Corona-Impfung“. 11 Akademiker, welche auf über zwanzig Jahre erfolgreiche Berufserfahrung in der Behandlung zahlreicher Patienten zurückblicken können. Ihr Ziel ist es, fachkundig über Risiken und Alternativen zur Corona-Impfung zu informieren. Ihnen liegt der Schutz der Gesundheit am Herzen und sie sind bemüht, die Menschen in dieser schwierigen Zeit zu unterstützen und Alternativen zur sehr einseitigen Corona-Politik aufzuzeigen.

Das Video findet eine immens starke Verbreitung (um es krass zu formulieren: eine stark virale Verbreitung) durch die sozialen Medien und auch viel positive Rückmeldung und Zuspruch v.S. aller skeptischen und kritischen Stimmen im Lande. Doch die Woche nach der Veröffentlichung des Videos bricht über die Beteiligten ein medialer Sturm herein, welcher ihren Ruf und fachliche Reputation arg beschädigt. In den Südtiroler und Trentiner Medien wird eine beispiellose Diffamierungskampagne losgetreten. Hier nur einige wenige zentrale Aussagen in der Berichterstattung:

- „Unzumutbares Video - Südtiroler Ärzte und Apotheker verbreiten Falschmeldungen über die Corona-Impfungen.“
- „Die Ärzte im Anti-Impf-Video verstoßen gegen den hippokratischen Eid und ihre Aussagen sind wissenschaftlich nicht belegt.“
- „Sie gefährden alle Mitbürger, indem sie Unsicherheiten verbreiten.“

Sie sehen dort die Zeitungen liegen und können sich selbst ein Bild davon machen.

Im Oktober 2021 kommt dann der Green Pass und Schritt für Schritt werden alle, die sich nicht 2-3x wöchentlich sinnlos-unwissenschaftlichen PCR- oder Schnelltests unterziehen lassen, vom öffentlichen Leben ausgegrenzt. Man geht so weit, dass durch die 2G-Regelung oder den sog. Super Green Pass den Ungeimpften die Existenzgrundlage entzogen wird: Sie werden von der Arbeit suspendiert und verlieren ihren Gehalt. Mit dem Argument, dass einzig und allein die Impfung die weitere Ansteckung mit dem Virus und somit die Ausbreitung der Pandemie stoppen kann. Ich zitiere den damaligen Ministerpräsidenten Draghi: „*L'appello a non vaccinarsi significa appello a morire. Non ti vaccini, ti ammali, muori. Oppure: fai morire*“.

Wir hatten damals bereits mehrmals darauf hingewiesen, dass dieser Impfstoff keine sterile Immunität vermittelt, also nicht die Weitergabe bzw. Ansteckung verhindert, sondern bestenfalls nur den Krankheitsverlauf beim Geimpften selbst abschwächt. Wie auch die Zulassungsunterlagen der Hersteller und die dort angeführten genehmigten Indikationen oder



Anwendungsgebiete klar angeben*. Also kein Fremdschutz, bestenfalls Selbstschutz. Doch trotzdem werden die Menschen zur Spritzung getrieben, genötigt, gezwungen.

Heute sind wir hier, um ihnen nochmal zu versuchen klarzumachen, dass die Corona-Maßnahmen, welche die Politik beschlossen und durchgesetzt hatte, ein Verbrechen an der Menschheit war. Aushebelung des Rechtsstaates mit Einschränkung unserer Grundrechte vom Recht auf Bewegungsfreiheit oder Arbeit bis zum Recht der Unversehrbarkeit des eigenen Körper. Zensur und Diffamierung aller Andersdenkenden und die zur Gänze regierungstreue, komplett unkritische Impf-Propaganda, ohne jegliche öffentliche Diskussion. Ein Heer von sog. Faktencheckern, ohne jede journalistische oder sonstige Ausbildung, die auf beispiellos aberwitzige, fiese und auf Rufschädigung bedachte Art und Weise rechtschaffene und andersdenkende Bürger in den Medien und den sozialen Medien beleidigen und diskreditieren.

Heute sind wir hier, um Sie aufzufordern, Ihrer journalistischen Verantwortung nachzukommen, kritischer Hinterfragung, investigativer Sorgfalt, Liebe zur Wahrheit. Journalismus, in dem Pluralismus, Toleranz und kritisches Denken in Eigenverantwortung erwünscht sind. Freie und politisch unabhängige Medien, die dem Auftrag nachkommen, kompetent und souverän die Bevölkerung zu informieren, aufzuklären und aufzudecken. Journalismus, der sich seiner Aufgabe als vierte Gewalt im Staat bewusst ist.

Heute präsentieren wir Ihnen ein neues Video. Ein Video, das die Aussagen des ersten Videos bekräftigt. Denn wir stehen an einem kritischen Punkt: Sehr viele Informationen über Corona kommen ans Tageslicht, in unserem Land, in den Nachbarländern und weltweit. Und alles von dem, was wir damals gesagt haben, erweist sich heute als korrekt. 3 Jahre sind vergangen und trotzdem wird die volle Impfpropaganda weiter abgespielt und nichts anderes wird von der Politik und in den Medien übernommen. Daher haben wir entschieden, ein weiteres Video zu produzieren, das diese Situation dokumentiert.

Nach Corona können wir es nicht mehr der Politik überlassen, einfach so über unser Leben zu bestimmen. WIR NOI, inzwischen Sozialunion geworden, die Tausende Menschen erreicht, möchte, dass Politik und Medien alle inzwischen ersichtlich gewordenen Folgen von Impfung und Corona-Maßnahmen erkennt, daraus die nötigen Schlüsse zieht und Handlungen setzt, und endlich der Öffentlichkeit mitteilt.

Dazu dieses neue Video, siehe auf **wir-noi.com**

WIR NOI arbeitet Corona auf: heute sehen Sie Teil 2. Und wir werden nachlegen. Weitere Teile werden folgen.

* S.571 von [ZUSAMMENFASSUNG DER MERKMALE DES ARZNEIMITTELS](#) des Pfizer-Impfstoffes Comirnaty:

Was ist Comirnaty und wofür wird es angewendet?

Comirnaty ist ein Impfstoff zur Vorbeugung von COVID-19 (Coronavirus-Erkrankung-2019), das durch das SARS-CoV-2-Virus verursacht wird.

(...)

Der Impfstoff veranlasst das Abwehrsystem (die natürlichen Abwehrkräfte des Körpers), Antikörper und Blutzellen zu produzieren, die gegen das Virus wirken und so Schutz vor COVID-19 bieten.

(...)



**ZITATE DER PRESSEKONFERENZ am 04.12.24
CITATI DELLA CONFERENZA STAMPA, il 4/12/2024**

**ASSESSMENT REPORT 19 February 2021
EMA**

Zitat von RKI-Leaks, vorgelesen von Dr. Rudi SCHÖPF:

„Immer noch hohes Risiko, Vorgabe vom BMG (Anm.: Bundesministerium für Gesundheit): bis 1.Juli wird daran nichts geändert. Der Satz: „Die Anzahl der neu übermittelten Fälle ist aktuell rückläufig.“ soll angepasst werden ... Verstärkte Bewerbung der Teststrategie steht auf dem Plan ... Wie kann dem **politischen Wunsch nach verstärkter Testung entgegengekommen** werden?“
(JUNI 2020)

Citazione da RKI-Leaks, letta dal dott. Rudi SCHÖPF:

“Ancora rischio elevato, specifica il BMG (nota: Ministero della Salute): nulla sarà cambiato fino al 1° luglio. La frase: “Il numero di nuovi casi trasmessi è attualmente in calo” deve essere rivista al rialzo... Una maggiore promozione della strategia di test è all'ordine del giorno... **Come si può soddisfare la volontà politica di aumentare i test?**”. (GIUGNO 2020)

Zitat von RKI-Leaks, vorgelesen von Dr. Rudi SCHÖPF:

„Eine derartige Einflussnahme seitens des BMG (Anm.: Bundesministerium für Gesundheit) in RKI-Dokumente (Anm.: Robert-Koch-Institut) ist **ungewöhnlich**. Die Weisungsbefugnis des Ministers bei technischen Dokumenten des RKI wird derzeit rechtlich geprüft ... Die wissenschaftliche **Unabhängigkeit des RKI von der Politik ist insofern eingeschränkt**.“
(SEPTEMBER 2021)

Citazione da RKI-Leaks, letta dal dott. Rudi SCHÖPF:

“È **insolito** che il BMG (nota: Ministero della Salute) eserciti una tale influenza sui documenti dell'RKI (nota: Istituto Robert Koch). L'autorità del ministro di emanare istruzioni sui documenti tecnici dell'RKI è attualmente sottoposta a revisione legale... **L'indipendenza scientifica dell'RKI dalla politica è limitata a questo riguardo**”. (SETTEMBRE 2021)

Zitat von RKI-Leaks, vorgelesen von Dr. Heike MÜLLER:

„Pädiatrische Fachverbände stehen der Impfung von Kindern **zurückhaltend** gegenüber, Politik bereitet bereits Impfkationen vor.“ (MAI 2021)



Citazione da RKI-Leaks, letta dalla dottoressa Heike MÜLLER:

*“Le associazioni professionali pediatriche sono **riluttanti** a vaccinare i bambini, i politici stanno già preparando campagne di vaccinazione”. (MAGGIO 2021)*

Zitat von RKI-Leaks, vorgelesen von Dr. Heike MÜLLER:

„Gestern fand ein Treffen zwischen STIKO (Anm.: Ständige Impfkommission), PEI (Anm.: Paul-Ehrlich-Institut), BMG (Anm.: Bundesministerium für Gesundheit) statt. Thema war die Aussetzung von dem Moderna-Impfstoff in skandinavischen Ländern. Grund dafür war eine **erhöhte Anzahl an Myokarditis-Fällen v.a. unter jungen Menschen**. (OKTOBER 2021)

Citazione da RKI-Leaks, letta dalla dottoressa Heike MÜLLER:

*“Ieri si è svolto un incontro tra STIKO (nota: Comitato permanente per le vaccinazioni), PEI (nota: Istituto Paul Ehrlich) e il BMG (nota: Ministero della Salute) si è svolta ieri. Il tema era la sospensione del vaccino Moderna nei Paesi scandinavi. Il motivo è stato **l'aumento dei casi di miocardite, soprattutto tra i giovani**”. (OTTOBRE 2021)*

Zitat von RKI-Leaks, vorgelesen von Dr. Heike MÜLLER:

"Deutlich erhöhtes Myokarditis-Risiko nach Spikevax (Anm.: Moderna)."
(OKTOBER 2021)

Citazione da RKI-Leaks, letta dalla dottoressa Heike MÜLLER:

"Rischio significativamente aumentato di miocardite dopo Spikevax (nota: Moderna)." (OTTOBRE 2021)

Rapporto di valutazione (in inglese Assessment Report) dell'Autorità Europea del Farmaco (EMA) sul vaccino Covid-19 Comirnaty di Pfizer/BioNTech del 19 Febbraio 2021 – letto dal Dott. CAPPELLETTI:

“Conclusioni sull'efficacia clinica (del vaccino Comirnaty di Pfizer/BioNTech):

*È **probabile** che il vaccino protegga anche contro la Covid-19 grave, anche se questi eventi erano **rari negli studi** e statisticamente certe conclusioni **non possono essere tratte**.*

*Attualmente **non sappiamo se il vaccino protegge contro l'infezione asintomatica e non conosciamo il suo impatto sulla trasmissione virale**.*



La durata della protezione non è nota. ” (FEBBRAIO 2021)

**Bewertungsbericht der Europäischen Arzneimittelbehörde (EMA) über den Impfstoff Covid-19 Comirnaty von Pfizer/BioNTech vom 19. Februar 2021
- verlesen von Dr. Cappelletti:**

„Schlussfolgerungen zur klinischen Wirksamkeit (des Comirnaty-Impfstoffs von Pfizer/BioNTech):

Es ist **wahrscheinlich**, dass der Impfstoff auch vor schweren Covid-19 schützt, obwohl diese Ereignisse **in den Studien selten** waren und statistisch sichere Schlussfolgerungen **nicht gezogen werden können**.

Derzeit **wissen wir nicht, ob der Impfstoff vor asymptomatischen Infektionen schützt**, und **wir kennen seine Auswirkungen auf die Virusübertragung nicht**.

Auch die **Dauer des Schutzes ist unbekannt**.“ (FEBRUAR 2021)

Die Studie des Leiters des Nationalen Zentrums für Globale Gesundheit der Obersten Italienischen Gesundheitsbehörde, *Istituto Superiore della Sanità*, Dr. Maurizio Federico, zeigt:

- die Dysfunktionalität der sogenannten Covid-19-„Impfstoffe“, die in den Oberarmmuskel injiziert werden, für die Verhinderung der Virusinfektion über die Atemwege
- die Gefährlichkeit dieser experimentellen Substanzen, da die in den Nanolipiden verpackte mRNA über die Nanolipide jeden Teil des Körpers erreicht (Gehirn, Herz, Lymphknoten, Eierstöcke, Hoden, Lunge etc.), und die induzierte Produktion des Spike-Proteins (ein Toxin) in der Tat in Menge und Zeit unkontrollierbar ist
- Neben dem Risiko einer Herzmuskelentzündung und der Todesfolge (wie in der Packungsbeilage der so genannten Covid-19 mRNA-„Impfstoffe“ seit September 2023 angeführt – nur Landesrat Hubert Messner leugnet das weiterhin beharrlich) besteht das enorme Risiko von Autoimmun- und Krebserkrankungen.

In der Tat erleben wir in den letzten Jahren eine explosionsartige Zunahme der Fälle von so genanntem Turbokrebs und Autoimmunerkrankungen. Die Zahl der Totgeburten ist besorgniserregend.

<https://www.mdpi.com/2076-393X/12/11/1281>

Aus dem Beipackzettel der mRNA-COVID-19-„Impfstoffe“ geht offiziell bereits Folgendes hervor:

Es besteht ein erhöhtes Risiko von Myokarditis (Entzündung des Herzmuskels) und Perikarditis (Entzündung des Herzbeutels) nach der Impfung mit Comirnaty (siehe Abschnitt 4). Diese Erkrankungen können sich innerhalb weniger Tage nach der Impfung entwickeln und traten hauptsächlich innerhalb von 14 Tagen auf. Sie wurden häufiger nach der zweiten Impfung beobachtet und häufiger bei jüngeren Männern. Das Risiko einer Myokarditis und Perikarditis scheint bei Kindern von 5 bis 11 Jahren geringer zu sein als bei Kindern von 12 bis 17 Jahren. Die meisten Fälle von Myokarditis und Perikarditis erholen sich. In einigen Fällen war eine intensivmedizinische Versorgung erforderlich, und es wurden Fälle mit Todesfolge beobachtet. Nach der Impfung sollten Sie auf Anzeichen einer Myokarditis oder Perikarditis wie Atemnot, Herzklopfen und Thoraxschmerzen achten und sofort einen Arzt aufsuchen, wenn diese auftreten.

Wie bei jedem Impfstoff schützt Comirnaty möglicherweise nicht alle geimpften Personen und es ist nicht bekannt, wie lange Sie geschützt sind.

https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2024/20240926164132/anx_164132_de.pdf

The Immunologic Downsides Associated with the Powerful Translation of Current COVID-19 Vaccine mRNA Can Be Overcome by Mucosal Vaccines

Maurizio Federico 

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

Abstract: The action of mRNA-based vaccines requires the expression of the antigen in cells targeted by lipid nanoparticle–mRNA complexes. When the vaccine antigen is not fully retained by the producer cells, its local and systemic diffusion can have consequences depending on both the levels of antigen expression and its biological activity. A peculiarity of mRNA-based COVID-19 vaccines is the extraordinarily high amounts of the Spike antigen expressed by the target cells. In addition, vaccine Spike can be shed and bind to ACE-2 cell receptors, thereby inducing responses of pathogenetic significance including the release of soluble factors which, in turn, can dysregulate key immunologic processes. Moreover, the circulatory immune responses triggered by the vaccine Spike is quite powerful, and can lead to effective anti-Spike antibody cross-binding, as well as to the emergence of both auto- and anti-idiotypic antibodies. In this paper, the immunologic downsides of the strong efficiency of the translation of the mRNA associated with COVID-19 vaccines are discussed together with the arguments supporting the idea that most of them can be avoided with the advent of next-generation, mucosal COVID-19 vaccines.

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



Citation: Federico, M. The Immunologic Downsides Associated with the Powerful Translation of Current COVID-19 Vaccine mRNA Can Be Overcome by Mucosal Vaccines. *Vaccines* **2024**, *12*, 1281. <https://doi.org/10.3390/vaccines12111281>

Academic Editor: Pedro Plans-Rubió

Received: 11 October 2024

Revised: 11 November 2024

Accepted: 13 November 2024

Published: 14 November 2024



Copyright: © 2024 by the author. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

COVID-19 mRNA-based vaccines have been distributed to many people in both their original and current updated versions. Furthermore, mRNA technology is the basis of additional experimental vaccines as well as the latest generation of anticancer immunotherapies. Hence, it is mandatory to identify, monitor, and deeply analyze the most relevant unexpected events that this technology can produce in humans, even if these occur rarely.

Several features distinguish the mRNA-based COVID-19 vaccines from the “traditional” ones based on attenuated/inactivated viruses, subunit products, or recombinant products, which have been so useful for the elimination/containment of several infectious diseases. First, the vaccine formulation comprises lipidic nanoparticles (LNPs) complexed with mRNA molecules produced through the *in vitro* transcription process. Second, the immunogen is not part of the vaccine formulation, but it is expected to be synthesized by cells internalizing the mRNA/LNP complexes. This evidence justifies the more appropriate definition of prodrug (intended as a pharmacologically inactive substance that is converted in the body into a pharmacologically active drug) rather than vaccine [1]. Third, the immunogen (i.e., the viral protein Spike) is synthesized by target cells at very high levels and persists over time [2]. Fourth, the immunogen recognizes, binds, and activates a widespread signaling cell receptor, i.e., the angiotensin-converting enzyme (ACE)-2, and is stabilized in its prefusion conformation through two consecutive mutations to proline at amino acid positions 986 and 987, which do not negatively impact ACE-2 binding/activation. Hence, the abundance, diffusion, persistency, biologic activity, and stability of the immunogen are key points distinguishing mRNA-based COVID-19 vaccines.

In this paper, the most relevant consequences of both the overproduction of the Spike antigen after mRNA-based COVID-19 vaccination and the rather potent circulatory

immune response evoked are discussed. A comprehensive picture of all possible concerns would be of major utility for the development of safer and more targeted vaccines against SARS-CoV-2 and other airborne infectious agents. Among these, mucosal vaccines deserve some consideration given their action at the virus port of entry and the lack of unwanted systemic effects.

2. High and Persistent Levels of Circulating Spike After Vaccination

mRNA/lipidic nanoparticle (LNP) complexes can enter any cell type. Injection into the deltoid muscle favors their entry into muscle cells; however, the moderate inflammation induced by some lipidic components [3] can attract professional antigen-presenting cells (APCs) to the injection site. APCs can ingest the LNPs, undergo activation, and migrate to the lymph nodes [4]. Moreover, unquantifiable amounts of injected mRNA/LNP complexes escape cell internalization at the site of injection, thus entering into circulation. Consistently, biodistribution studies carried out by a manufacturer of COVID-19 mRNA vaccines highlighted the potential diffusion of intramuscularly injected LNPs in almost all tissues [5].

Both mRNA and vaccine Spike persist in the body for a long time after vaccination. A study carried out on autoptic samples from patients after COVID-19 vaccination demonstrated the persistence of the vaccine mRNA in bilateral axillary lymph nodes up to 30 days after vaccination [6]. Notably, vaccine mRNA was also found in both the heart ventricles up to 20 days after injection, and its presence correlated with myocardial injuries associated with an abnormally high number of myocardial macrophages. In another study, vaccine mRNA was found up to 60 days after the second dose in biopsies from ipsilateral axillary lymph nodes [2].

Part of the intracellularly expressed Spike remains exposed on the plasma membrane of target cells in its trimeric form, while a consistent fraction of it can shed and circulate. Accordingly, a median of 47 pg/mL of free Spike has been measured in the plasma of vaccinees 1–2 days after injection, with peaks of 174 pg/mL [2]. These levels of Spike in plasma appear surprisingly high, ranging, for instance, in the concentrations of inflammatory cytokines detected in subjects with acute systemic inflammation [7]. This evidence is of particular relevance given the high affinity of Spike for ACE-2, i.e., a widespread cell receptor involved in several key physiologic processes.

3. ACE-2: Summary of Functions, Distribution, and Signaling upon Spike Binding

ACE-2 is an 805-amino-acid-long, type I transmembrane protein with an extracellular glycosylated N-terminal region containing the carboxypeptidase domain whose function is removing single amino acids from the C-terminus of its substrates. ACE-2 is a key regulator of the renin–angiotensin–aldosterone system, which controls blood pressure. It catalyzes the conversion of angiotensin I, a decapeptide, to angiotensin 1–9, which can be converted to smaller, vasodilator angiotensin peptides (e.g., angiotensin 1–7) by ACE in the lungs. ACE-2 binds angiotensin II also, i.e., an octapeptide generated by ACE-driven cleavage of angiotensin I, to produce the vasodilator angiotensin 1–7. ACE-2 is also involved in the production of bradykinins, i.e., a group of peptides with potent vasodilator effects [8].

ACE-2 is expressed by a wide variety of cells including enterocytes, cardiomyocytes, renal tubules, vasculature, and ductal cells. Conversely, ACE-2 expression in respiratory tissues is limited to a small number of specialized cell types, i.e., type II alveolar cells and alveolar macrophages [9].

The interaction between ACE-2 and angiotensin II induces various signaling pathways ultimately leading to the release of several cytokines including IL-6, TNF- α , and TGF- β [10]. Notably, the effects of the interaction of ACE-2 with Spike recapitulate those described for it binding with its natural ligands [11]. In particular, in vascular endothelial cells, natural Spike generates a block of mitochondrial functions [12]; meanwhile, switching integrin $\alpha 5 \beta 1$ -dependent signaling leads to nuclear translocation of NF- κ B. These events ultimately induce the expression of VCAM-1, ICAM-1, coagulation factors, and the release

of $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, and IL-6 inflammatory cytokines [13]. Similar activation mechanisms have been reported for both macrophages and dendritic cells [14,15]. Importantly, natural Spike induces in both epithelial and endothelial cells the release of pleiotropic $\text{TGF-}\beta$ cytokine [16].

4. The SARS-CoV-2 Spike/ACE-2/ $\text{TGF-}\beta$ Axis in the Anti-Tumor Immune Surveillance and the Epithelial to Mesenchymal Transition

The binding of Spike with ACE-2 produces profound alterations in intracellular signaling with the activation of transcription factors and the release of several soluble factors. In particular, human vascular endothelial cells treated with Spike have been found to release both $\text{TGF-}\beta 1$ and $\text{TGF-}\beta 2$ [17], consistent with previous “in vivo” evidence suggesting a key role of $\text{TGF-}\beta$ in COVID-19 pathogenesis [18,19].

$\text{TGF-}\beta$, with its three isoforms, i.e., $-\beta 1$ to $-\beta 3$, is a key regulator of the adaptive immune response [20], acting, for instance, as an inhibitor of the antigen-presenting activity in dendritic cells (DCs) through the downregulation of major histocompatibility complex (MHC) molecules [21,22] (Figure 1). It also reduces the expression of IL-12 and co-stimulatory molecules such as CD40 in macrophages and CD80 , CD83 , and CD86 in DCs, as part of the regulatory mechanisms of APC-mediated immune cell activation [23,24].

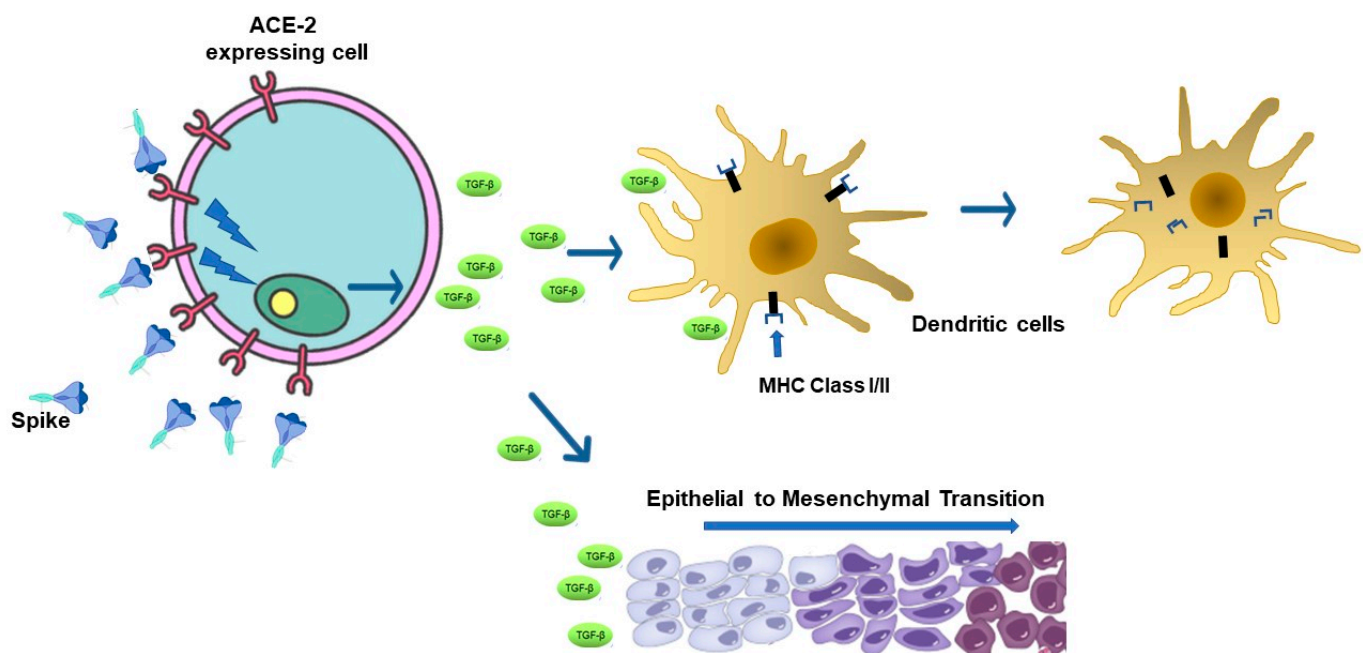


Figure 1. Bystander effects of Spike/ACE-2 binding. Free SARS-CoV-2 Spike protein binds ACE-2-expressing cells, thereby inducing intracellular signaling, leading to the release of soluble factors. Among these, $\text{TGF-}\beta$ is known to downregulate the antigen-presenting activity in APCs through MHC Class I/II downregulation. $\text{TGF-}\beta$ is also a major driver of the epithelial-to-mesenchymal transition that is the basis of the development of both solid tumors and metastasis.

$\text{TGF-}\beta$ can also interfere with the immune surveillance mechanisms controlling tumor cell growth. For instance, $\text{TGF-}\beta$ can induce the polarization of macrophages from M1 (marked by the release of inflammatory cytokines such as $\text{IL-1}\beta$, $\text{IFN-}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$, IL-12 , and IL-18) to M2 macrophages, secreting anti-inflammatory cytokines like IL-1ra and IL-10 , and characterized by multiple immunosuppressive properties of the tumor microenvironment [25]. On the other hand, $\text{TGF-}\beta$ is a major driver of the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) [26], which is the basis of the development of both solid tumors and metastasis. In this scenario, consistent results from the experimental work of two research groups raised the hypothesis that natural Spike can contribute to the EMT (Figure 1). In detail,

Lai and colleagues provided evidence that TGF- β -related signaling is part of the mechanism underlying the acquisition of a mesenchymal-like phenotype of Spike-expressing human breast cancer cells. Most importantly, they demonstrated that the number of lung metastases in mice inoculated with Spike-expressing 4T1 breast cancer cells increased compared to that induced by parental cells [27,28]. Ciszewski and colleagues observed that the treatment with recombinant, wild-type Spike of both HUVECs and HMEC-1 human endothelial cells induces the release of TGF- β associated with cell trans-differentiation. By investigating the underlying mechanism of action, they proved the involvement of the ACE-2/TGF- β /MRTF (myocardin-related transcription factor)- β axis in the observed EMT. Finally, the contribution of TGF- β in the Spike-related EMT was further corroborated by the demonstration that Spike-treated human endothelial cells failed to trans-differentiate in the presence of anti-TGF- β antibodies [17].

The results from these studies pose the question as to whether Spike can contribute to the EMT in humans. Even if no clinical data describing events associated with these pathological immune responses are available so far, the potential implications in terms of the safety of COVID-19 vaccines seem to manifest also considering the evidence that mRNA/LNPs can enter any kind of cell. For instance, the unfortunate entry of mRNA/LNP complexes into already emerged tumor cells may reproduce the conditions described by Lai and colleagues, thus representing a hazard in terms of the formation of metastases. On the other hand, pathogenetic bystander effects can be induced through the local production of high concentrations of Spike by normal cells targeted by the mRNA/LNPs and located in the vicinity of tumor cells, as described by Ciszewski and coll. For these reasons, expanding the studies to additional cell systems as well as to appropriate “in vivo” models appears mandatory considering the possibility that mRNA/LNP complexes circulate in the body after vaccination.

5. mRNA COVID-19 Vaccine-Induced Unspecific Immunity: Antibody Cross-Binding, Autoantibodies, Anti-Idiotypic Antibodies, and Ribosomal Frameshifting

The high levels of vaccine Spike produced after injection are associated with an extraordinarily potent circulatory immune response, with the production of high titers of anti-Spike antibodies. On the one hand, this outcome is considered an advantage in terms of antiviral protection; on the other hand, however, such powerful immunogenicity can be associated with relevant unwanted effects typically emerging in the presence of both high and persistent antigenic stimuli. These include the substantial binding of anti-Spike antibodies cross-reacting with “self” antigens with the induction of non-physiologic/pathogenetic processes, the emergence of autoantibodies, and the generation of anti-idiotypic antibodies. These events have been correlated with the emergence in vaccinees of pathologies like thrombocytopenia, myocarditis, various disturbances to the menstrual cycle, the re-emergence of latent infections, and post-COVID vaccine syndrome (PCVS).

Cross-reacting antibodies bind heterologous targets through the mechanism of molecular mimicry. Most likely, pathogenetic effects can be produced when sufficient amounts of them bind unspecific molecular targets acting in relevant biological processes. Through a computationally investigated analysis of the molecular mimicry between Spike and known human epitopes, it was reported that Spike shares immunogenic linear motifs with, among others, thrombopoietin (TQPLL) and tropomyosin alpha-3 (ELDKY) [29]. These findings appear relevant since the former is a key growth factor required for megakaryocytic differentiation and platelet production, and the latter is a structural component of cardiomyocytes. In another study, it was reported that Spike shares 41 minimal immune determinants with 27 human proteins specific to the female reproductive system relating to oogenesis, uterine receptivity, decidualization, and placentation [30].

Clinical studies provided evidence that the injection of COVID-19 mRNA vaccines can be associated with the production of autoantibodies, i.e., non-anti-Spike antibodies recognizing self-antigens, as a possible consequence of general immune dysregulation. For instance, Xu and colleagues [31] found neutralizing anti-type I interferon antibodies in 10%

of healthy vaccinated individuals, although with a limited sample size. In another study, 18% of patients developing PCVS have been found to produce autoantibodies against neurofilament subunits [32]. Even if, in some instances, autoantibodies may represent innocent bystanders, it is still unclear whether vaccination re-activates latent, pre-existing autoimmunity or induces the “de novo” generation of autoantibodies.

Molecular mimicry is also the basis of the effects of anti-idiotype antibodies (Figure 2).

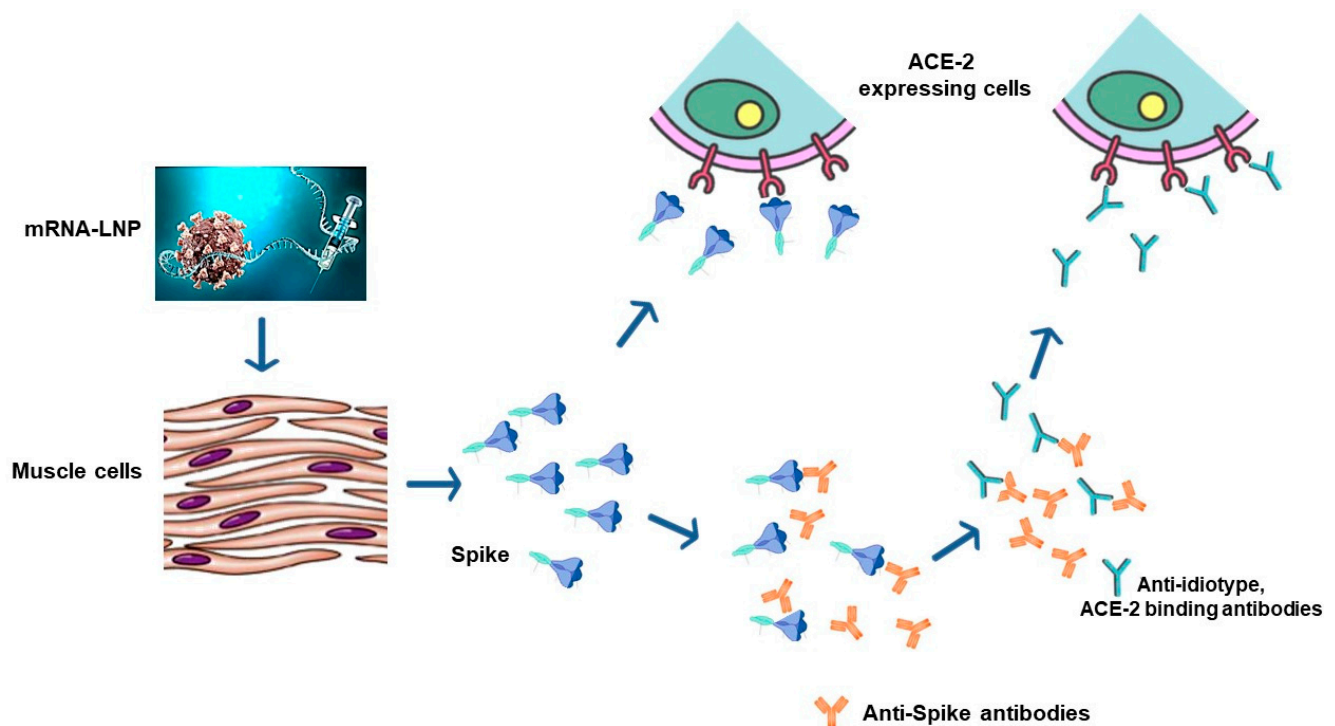


Figure 2. Generation of anti-idiotype antibodies after COVID-19 vaccination. The immune system can generate antibodies against the sequences of anti-Spike antibodies recognizing the Spike domain binding the ACE-2 receptor (receptor-binding domain, RBD). Through a mechanism of molecular mimicry, these antibodies (anti-idiotype antibodies) can bind ACE-2 just like the immunogenic Spike.

In the case that the immunogen is an antigen binding to a molecular partner, the immune system can react against the sequences within the induced anti-antigen antibodies that recognize the region of the antigen that binds its partner, e.g., in the case of Spike, the receptor-binding domain (RBD). Under physiologic conditions, this mechanism contributes to the control of the production of antigen-specific antibodies. However, in the presence of exceeding amounts of antigen-specific antibodies, as in the case of mRNA-based anti-COVID-19 vaccination, the consequent hyper-production of anti-idiotype antibodies can lead to effects mimicking those induced by the binding of Spike with ACE-2 [33]. Bellucci and colleagues have recently demonstrated the side effects associated with the production of ACE-2-binding anti-idiotype antibodies. In particular, they reported neurological clinical complications including radiculitis, myelitis, and Guillain-Barré syndrome in both SARS-CoV-2-infected and uninfected subjects injected with mRNA-based COVID-19 vaccines and developing anti-ACE-2 autoantibodies [34]. Regrettably, both autoantibodies and anti-idiotype antibodies are expected to persist beyond the duration of the anti-Spike immune response.

The recent discovery that the incorporation of N1-methyl-pseudouridine in place of the natural uridine residue in the backbone of vaccine-associated mRNA can induce a +1 ribosomal frameshifting added another layer of complexity in terms of the immune response induced by the vaccine. It was estimated that roughly 8% of the total translated products represent unknown proteins that are immunogenic in humans [35]. The autoimmune

potential of the aberrant protein products generated in this way represents an additional point that must be investigated further in depth.

6. Mucosal Vaccines: An Alternative Potentially Free of Systemic Side Effects

The COVID-19 battlefield is the respiratory system, where the ideal COVID-19 vaccine should develop its most effective immunologic and antiviral strength. Clinical data reported regarding current mRNA-based COVID-19 vaccines support the idea that the strong circulatory immune response is associated with antiviral immunity in the respiratory districts that is too limited [36].

Similarly to what has been demonstrated with natural infections [37], mucosal vaccines have the potential to elicit effective immune responses in the respiratory compartment through the induction of both neutralizing dimeric/secretory IgAs in the oronasopharyngeal district [38], and antiviral resident memory CD8⁺ T lymphocytes in the lower respiratory tract [39]. In this way, effective mucosal vaccines have the incomparable advantage of blocking the transmission chain of SARS-CoV-2 as well as other airborne viruses.

At present, two COVID-19 mucosal vaccines have been approved, and others are in clinical experimentation [40]. Of note, in no cases are these vaccines expected to induce robust systemic immune responses like those observed with current COVID-19 vaccines. However, suboptimal/weak systemic immunization should not be considered a functionally relevant disadvantage considering the compartmentalization of the respiratory immune system [41], which limits the access of neutralizing IgGs and antiviral immune cells from the circulatory district. Conversely, it represents an advantage in terms of a strong reduction in/lack of immunologic systemic effects induced by parenterally injected mRNA-based COVID-19 vaccines, including the production of undesirable circulatory anti-idiotypic antibodies.

7. Conclusions

Several experimental pieces of evidence support the idea that the Spike protein is produced abundantly and persists after mRNA COVID-19 vaccination. However, current mRNA-based COVID-19 vaccines recognize a series of relevant limitations including the rapid waning of the immune response, the inability to mount an effective immune response at the virus port of entry, and the reduced efficacy of updated formulations due to the phenomenon of original antigenic sin [42,43]. On the other hand, powerful mRNA translation coupled with Spike overproduction can lead to the dysregulation of ACE-2 signaling and cytokine production, antibody cross-reaction against unspecific molecular targets, the emersion of both auto- and anti-idiotypic antibodies, and immune responses of uncertain significance against unknown products. In addition, the cytokines produced after Spike/ACE-2 binding can unfavorably influence the fate of still “dormant” tumors and pre-existent autoimmune pathologies as well as chronic inflammation. For these reasons, the current indication of COVID-19 mRNA vaccines for the “fragile” population should be carefully re-evaluated in light of the typology of each specific fragility.

Notwithstanding the remarkable efficiency of antigen production, attempts to ameliorate the performance of these mRNA-based COVID-19 vaccines have been made in the direction of enforcing Spike production through the parenteral injection of self-replicating mRNA-based vectors [44]. Notably, the Japanese Ministry of Health has recently approved a clinical trial for testing the safety and effectiveness of a COVID-19 vaccine based on this technology [45]. This choice appears to be truly questionable given the above-described shortcomings induced by the exceeding production and persistence of circulatory Spike dictated by current mRNA-based COVID-19 vaccines. In this scenario, increasing the amounts and the persistence of circulating Spike is expected to exacerbate both cellular and immunologic side effects, but without acting on the most relevant functional limitation of these vaccines, i.e., their inability to elicit neutralizing immunity in the respiratory tracts due to the immune compartmentalization of the respiratory system. In addition, a too-

potent and persistent immunogenic stimulus is known to induce immunologic tolerance, as also reported in a couple of papers for current COVID-19 vaccines [46,47].

Conversely, a more plausible avenue to be paced is represented by the development of effective mucosal vaccines [48] given their ability to act at the virus port of entry and to avoid most of the systemic side effects observed in intramuscularly injected COVID-19 mRNA vaccines.

mRNA-based technology is currently attracting the interest of many scientists worldwide. In the case of COVID-19 vaccines, it seems more than reasonable that an adequate burden of investigations would be focused on the identification and analysis of unexpected events, with the obvious intent to render this prophylactic strategy safer and commensurate for use in a large number of healthy people.

Funding: This work was supported by the RiPrEI grant, no. Rip 001, from Ministry of Health, Rome, Italy.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: No new data have been created.

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

Conflicts of Interest: The author declares no conflicts of interest.

References

1. Cosentino, M.; Marino, F. Understanding the Pharmacology of COVID-19 mRNA Vaccines: Playing Dice with the Spike? *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 10881. [CrossRef] [PubMed]
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.; et al. Immune Imprinting, Breadth of Variant Recognition, and Germinal Center Response in Human SARS-CoV-2 Infection and Vaccination. *Cell* **2022**, *185*, 1025–1040.e14. [CrossRef] [PubMed]
3. Moghimi, S.M.; Simberg, D. Pro-Inflammatory Concerns with Lipid Nanoparticles. *Mol. Ther.* **2022**, *30*, 2109–2110. [CrossRef] [PubMed]
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.; et al. Visualization of Early Events in mRNA Vaccine Delivery in Non-Human Primates via PET-CT and near-Infrared Imaging. *Nat. Biomed. Eng.* **2019**, *3*, 371–380. [CrossRef] [PubMed]
5. EMA. Assessment Report Comirnaty Common Name: COVID-19 mRNA Vaccine (Nucleoside Modified). 2021. Available online: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/comirnaty-epar-public-assessment-report_en.pdf (accessed on 5 September 2024).
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*, 141. [CrossRef]
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.; et al. Plasma Inflammatory Cytokines and Chemokines in Severe Acute Respiratory Syndrome. *Clin. Exp. Immunol.* **2004**, *136*, 95–103. [CrossRef]
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. [CrossRef]
9. Hikmet, F.; Méar, L.; Edvinsson, Å.; Micke, P.; Uhlén, M.; Lindskog, C. The Protein Expression Profile of ACE2 in Human Tissues. *Mol. Syst. Biol.* **2020**, *16*, e9610. [CrossRef]
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*, 505–553. [CrossRef]
11. Ni, W.; Yang, X.; Yang, D.; Bao, J.; Li, R.; Xiao, Y.; Hou, C.; Wang, H.; Liu, J.; Yang, D.; et al. Role of Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) in COVID-19. *Crit. Care* **2020**, *24*, 422. [CrossRef]
12. Lei, Y.; Zhang, J.; Schiavon, C.R.; He, M.; Chen, L.; Shen, H.; Zhang, Y.; Yin, Q.; Cho, Y.; Andrade, L.; et al. SARS-CoV-2 Spike Protein Impairs Endothelial Function via Downregulation of ACE 2. *Circ. Res.* **2021**, *128*, 1323–1326. [CrossRef] [PubMed]
13. Robles, J.P.; Zamora, M.; Adan-Castro, E.; Siqueiros-Marquez, L.; de la Escalera, G.M.; Clapp, C. The Spike Protein of SARS-CoV-2 Induces Endothelial Inflammation through Integrin A5β1 and NF-KB Signaling. *J. Biol. Chem.* **2022**, *298*, 101695. [CrossRef] [PubMed]

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. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Winheim, E.; Rinke, L.; Lutz, K.; Reischer, A.; Leutbecher, A.; Wolfram, L.; Rausch, L.; Kranich, J.; Wratil, P.R.; Huber, J.E.; et al. Impaired Function and Delayed Regeneration of Dendritic Cells in COVID-19. *PLoS Pathog.* **2021**, *17*, e1009742. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Gracie, N.P.; Lai, L.Y.S.; Newsome, T.P. Cellular Signalling by SARS-CoV-2 Spike Protein. *Microbiol. Aust.* **2024**, *45*, 13–17. [\[CrossRef\]](#)
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*, 296. [\[CrossRef\]](#)
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.; et al. SARS-CoV-2 Spike Triggers Barrier Dysfunction and Vascular Leak via Integrins and TGF- β Signaling. *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 7630. [\[CrossRef\]](#)
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. Immunol.* **2021**, *10*, e1240. [\[CrossRef\]](#)
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*, 61. [\[CrossRef\]](#)
21. Battle, E.; Massagué, J. Transforming Growth Factor- β Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity* **2019**, *50*, 924–940. [\[CrossRef\]](#)
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*, 1095–1101. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
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*, 4567–4575. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
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*, 1589–1597. [\[CrossRef\]](#)
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*, 549–555. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
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*, 401. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
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.; et al. Epithelial-Mesenchymal Transition Induced by SARS-CoV-2 Required Transcriptional Upregulation of Snail. *Am. J. Cancer Res.* **2021**, *11*, 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.; et al. Hyperglycosylated Spike of SARS-CoV-2 Gamma Variant Induces Breast Cancer Metastasis. *Am. J. Cancer Res.* **2021**, *11*, 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.; et al. Potential Autoimmunity Resulting from Molecular Mimicry between SARS-CoV-2 Spike and Human Proteins. *Viruses* **2022**, *14*, 1415. [\[CrossRef\]](#)
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*, e13494. [\[CrossRef\]](#)
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*, e29137. [\[CrossRef\]](#)
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*, 394–396. [\[CrossRef\]](#)
33. Arlt, F.A.; Breuer, A.; Trampenau, E.; Boesl, F.; Kirchner, M.; Mertins, P.; Sánchez-Sendín, E.; Nasouti, M.; Mayrhofer, M.; Blüthner, M.; et al. 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. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
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. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
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.; et al. N1-Methylpseudouridylation of mRNA Causes +1 Ribosomal Frameshifting. *Nature* **2024**, *625*, 189–194. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
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.; et al. Respiratory Mucosal Immunity against SARS-CoV-2 after mRNA Vaccination. *Sci. Immunol.* **2022**, *7*, eadd4853. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
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.; et al. Respiratory Mucosal Immune Memory to SARS-CoV-2 after Infection and Vaccination. *Nat. Commun.* **2023**, *14*, 6815. [\[CrossRef\]](#)
38. Sun, B.; Wang, Q.; Zheng, P.; Niu, X.; Feng, Y.; Guan, W.; Chen, S.; Li, J.; Cui, T.; Deng, Y.; et al. An Intranasally Administered Adenovirus-Vectored SARS-CoV-2 Vaccine Induces Robust Mucosal Secretory IgA. *JCI Insight* **2024**, *9*, e180784. [\[CrossRef\]](#)

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. [\[CrossRef\]](#)
40. Rathore, A.P.S.; St. John, A.L. Promises and Challenges of Mucosal COVID-19 Vaccines. *Vaccine* **2023**, *41*, 4042–4049. [\[CrossRef\]](#)
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*, 97–108. [\[CrossRef\]](#)
42. Planas, D.; Bruel, T.; Grzelak, L.; Guivel-Benhassine, F.; Staropoli, I.; Porrot, F.; Planchais, C.; Buchrieser, J.; Rajah, M.M.; Bishop, E.; et al. Sensitivity of Infectious SARS-CoV-2 B.1.1.7 and B.1.351 Variants to Neutralizing Antibodies. *Nat. Med.* **2021**, *27*, 917–924. [\[CrossRef\]](#)
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.; et al. 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. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Oda, Y.; Kumagai, Y.; Kanai, M.; Iwama, Y.; Okura, I.; Minamida, T.; Yagi, Y.; Kurosawa, T.; Greener, B.; Zhang, Y.; et al. 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. *Lancet Infect. Dis.* **2024**, *24*, 351–360. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Dolgin, E. Self-Copying RNA Vaccine Wins First Full Approval: What's next? *Nature* **2023**, *624*, 236–237. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
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*, 991. [\[CrossRef\]](#)
47. Irrgang, P.; Gerling, J.; Kocher, K.; Lapuente, D.; Steininger, P.; Habenicht, K.; Wytöpil, M.; Beileke, S.; Schäfer, S.; Zhong, J.; et al. Class Switch toward Noninflammatory, Spike-Specific IgG4 Antibodies after Repeated SARS-CoV-2 mRNA Vaccination. *Sci. Immunol.* **2023**, *8*, eade2798. [\[CrossRef\]](#)
48. Zhu, F.; Huang, S.; Liu, X.; Chen, Q.; Zhuang, C.; Zhao, H.; Han, J.; Jaen, A.M.; Do, T.H.; Peter, J.G.; et al. Safety and Efficacy of the Intranasal Spray SARS-CoV-2 Vaccine dNS1-RBD: A Multicentre, Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 3 Trial. *Lancet Respir. Med.* **2023**, *11*, 1075–1088. [\[CrossRef\]](#)

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.

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- α e TGF- β [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- κ B. Questi eventi inducono infine l'espressione di VCAM-1, ICAM-1, di fattori di coagulazione e il rilascio di citochine infiammatorie TNF α , IL-1 β 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- β [16].

4. L'asse SARS-CoV-2 Spike/ACE-2/TGF- β 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- β nella patogenesi del COVID-19 [18, 19].

TGF- β , 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- β 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].

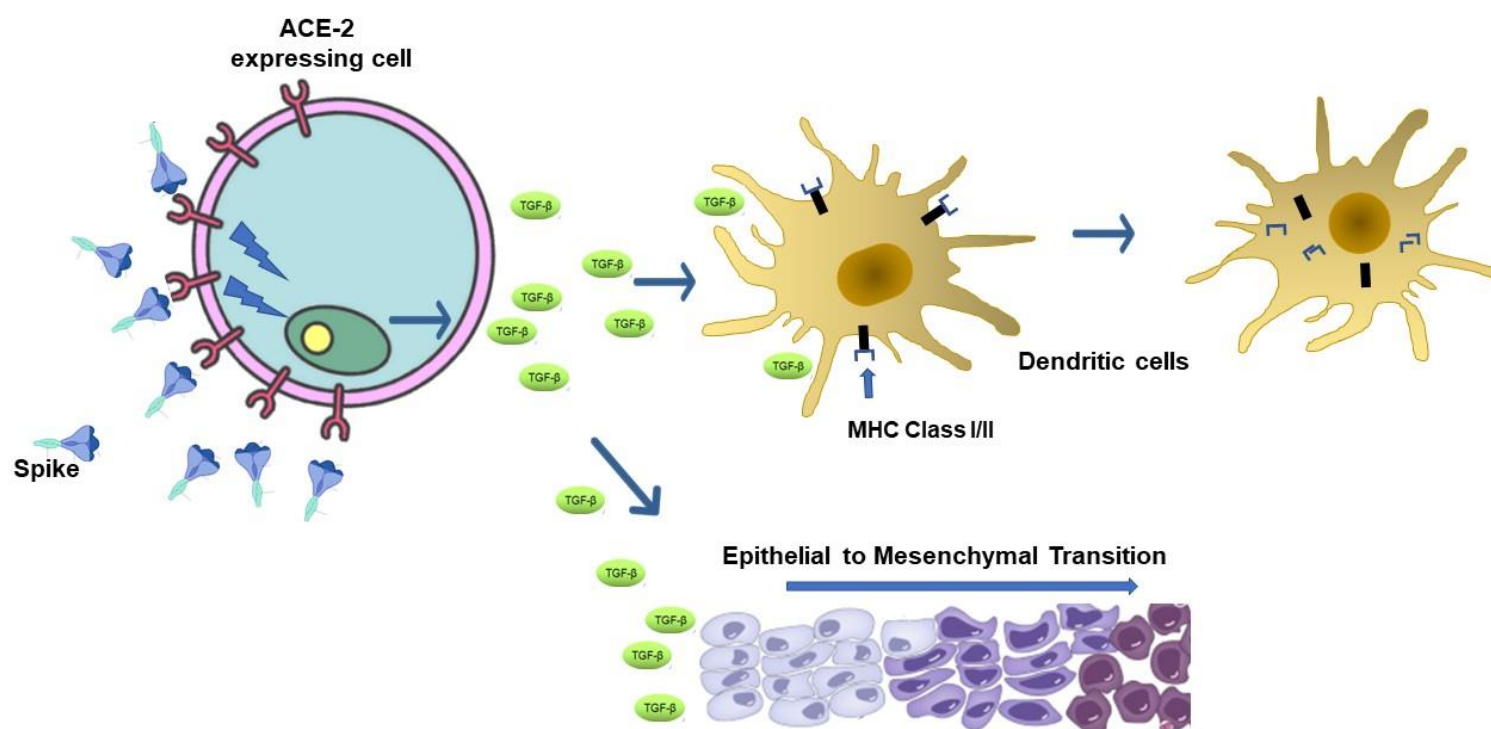


Figura 1. Effetti “bystander” del legame Spike/ACE-2. La proteina Spike di SARS-CoV-2 lega le cellule che esprimono ACE-2, inducendo così la segnalazione intracellulare che porta al rilascio di fattori solubili. Tra questi, è noto che il TGF- β riduce l'attività di presentazione dell'antigene nelle APC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

Il TGF- β può anche interferire con i meccanismi di sorveglianza immunitaria che controllano la crescita delle cellule tumorali. Ad esempio, il TGF- β può indurre la polarizzazione dei macrofagi da M1 (forma caratterizzata dal rilascio di citochine infiammatorie come IL-1 β , IFN- γ , TNF- α , 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- β 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- β 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- β associato alla trans-differenziazione (EMT) cellulare. Indagandone il meccanismo d'azione, hanno dimostrato il coinvolgimento dell'asse ACE-

2/TGF- β /MRTF (fattore di trascrizione correlato alla miocardina)- β nell'EMT osservato. Infine, il contributo del TGF- β 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- β [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)

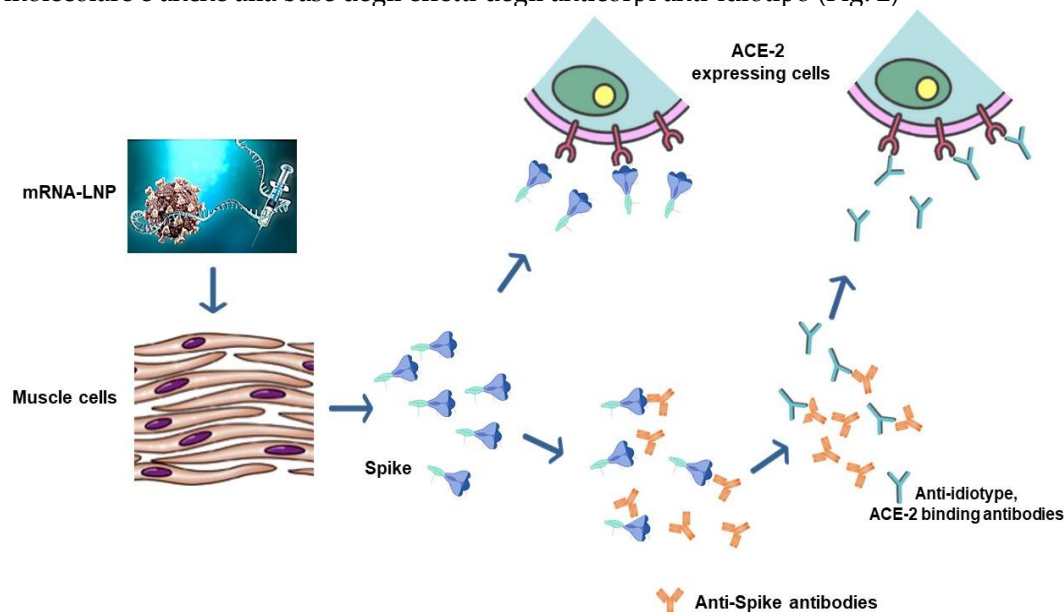


Figura 2. Generazione di anticorpi anti-idiotipo dopo la vaccinazione COVID-19. Il sistema immunitario può generare anticorpi contro le sequenze di anticorpi anti-Spike che riconoscono il dominio Spike che lega il recettore ACE-2 (receptor-binding domain, RBD). Attraverso un meccanismo di mimetismo molecolare, 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 rappresentano 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
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. Mulroney, 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.; Wytöpil, 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.

DISCLOSURES

***Maurizio Federico, direttore del Centro Nazionale per la Salute Globale
Istituto Superiore di Sanità***

***Analisi, opinioni e conclusioni relativi a questa presentazione
sono del tutto personali e non riflettono in alcun modo le posizioni
ufficiali sull'argomento dell'Istituto presso cui presto servizio.***

***L'intento di questa presentazione è quello di aprire la discussione su argomenti
troppo spesso trascurati e NON di partecipare a scontri politici a cui resto estraneo***

Nessun conflitto di interesse da dichiarare.

Perspective

The Immunologic Downsides Associated with the Powerful Translation of Current COVID-19 Vaccine mRNA Can Be Overcome by Mucosal Vaccines

Maurizio Federico

Special Issue

Efficacy, Immunogenicity and Safety of COVID-19 Vaccines and COVID-19 Vaccination Strategies

Edited by

Dr. Pedro Plans-Rubió



Perspective

Rethinking next-generation vaccines for coronaviruses, influenzaviruses, and other respiratory viruses

David M. Morens,¹ Jeffery K. Taubenberger,^{2,*} and Anthony S. Fauci¹¹Office of the Director, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892, USA²Viral Pathogenesis and Evolution Section, Laboratory of Infectious Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892, USA*Correspondence: taubenbergerj@niaid.nih.gov<https://doi.org/10.1016/j.chom.2022.11.016>

Table 1. Epidemiologic and immunologic parameters of selected human respiratory viruses and vaccines used to control them

Virus	Incubation period ^a	Marked viremia	Infection elicits long-term protective immunity	Re-infections are rare	Vaccines elicit long-term protective immunity	Vaccine type
Measles (to prodrome)	≈ 10 days	yes	yes	yes	yes	replicating
Mumps	≈ 16 days	yes	yes	yes	yes	replicating
Rubella	≈ 16 days	yes	yes	yes	yes	replicating
Smallpox ^b	≈ 12 days	yes	yes	yes	yes	replicating
VZV ^c	≈ 14 days	yes	yes	yes	yes	replicating
Endemic coronaviruses	≈ 5 days	no	no	no	no	none
Influenza virus	≈ 2 days	no	no	no	no	replicating, other
Parainfluenzaviruses	≈ 4 days	no	no	no	no	none
RSV	≈ 5 days	no	no	no	no	none
SARS-CoV-2	≈ 4 days	no ^d	no	no	no	non-replicating

respiratory, lower respiratory tract, and systemic vaccination^{14,76,134–147}; or optimized combinations of these. Attempting to control mucosal respiratory viruses with systemically administered non-replicating vaccines has thus far been largely unsuccessful, indicating that new approaches are needed. For example,

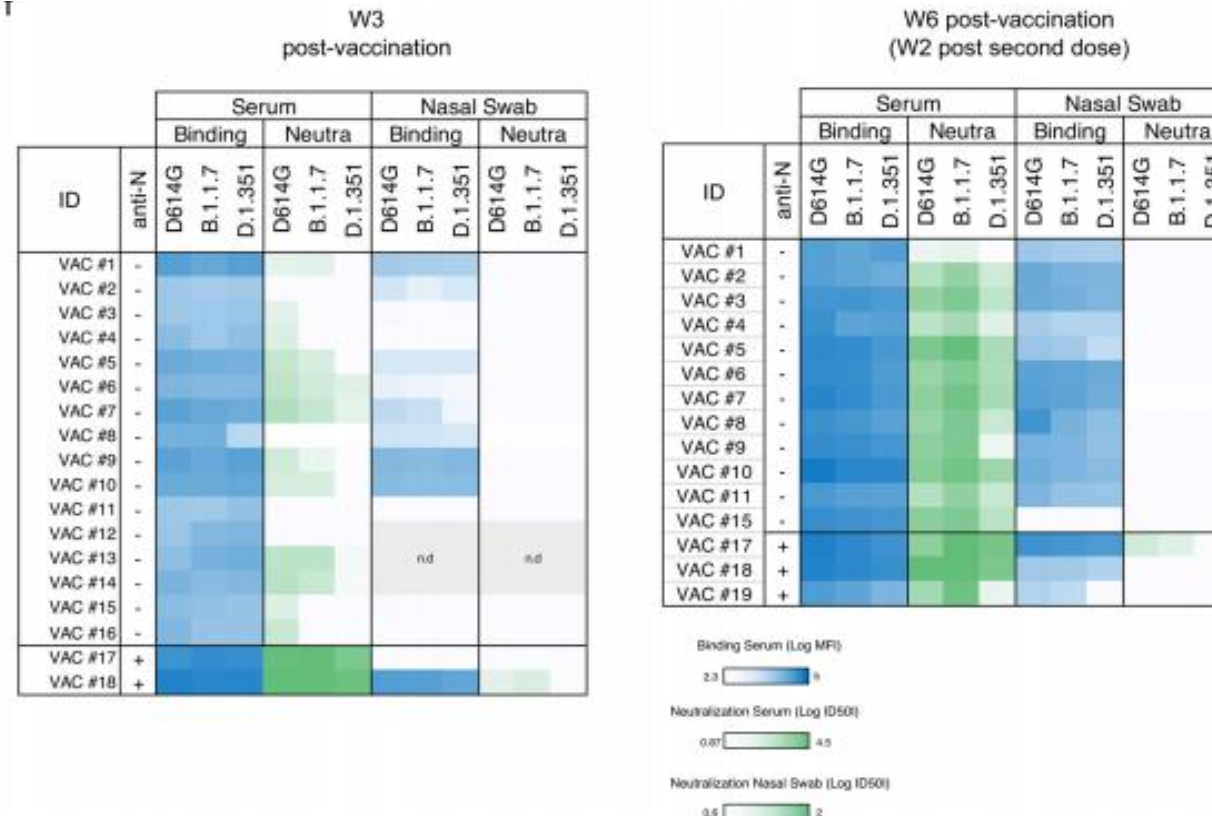
respiratory disease often reflects host genetic susceptibility factors.^{16,51,146,147}

PUBLIC HEALTH CONSIDERATIONS RELATING TO NEXT-GENERATION RESPIRATORY VACCINES MUST



Delphine Planas^{1,2,3,22}, **Timothée Bruel**^{1,2,3,22}, **Ludivine Grzelak**^{1,2,3,4}, **Florence Guivel-Benhassine**^{1,2,3}, **Isabelle Staropoli**^{1,2,3}, **Françoise Porrot**^{1,2,3}, **Cyril Planchais**⁵, **Julian Buchrieser**^{1,2,3}, **Maaran Michael Rajah**^{1,2,3,4}, **Elodie Bishop**^{1,2,3,4}, **Mélanie Albert**^{6,7}, **Flora Donati**^{6,7}, **Matthieu Prot**⁸, **Sylvie Behillil**^{6,7}, **Vincent Enouf**^{6,7}, **Marianne Maquart**⁹, **Mounira Smati-Lafarge**¹⁰, **Emmanuelle Varon**¹⁰, **Frédérique Schortgen**¹¹, **Layla Yahyaoui**¹², **Maria Gonzalez**¹³, **Jérôme De Sèze**^{14,15}, **Hélène Péré**¹⁶, **David Veyer**^{16,17}, **Aymeric Sève**¹⁸, **Etienne Simon-Lorière**¹⁸, **Samira Fafi-Kremer**^{19,20}, **Karl Stefic**^{9,21}, **Hugo Mouquet**⁵, **Laurent Hocqueloux**¹⁸, **Sylvie van der Werf**^{6,7,23}, **Thierry Prazuck**^{18,23} and **Olivier Schwartz**^{1,2,3,23} ✉

Delphine Planas^{1,2,3,22}, **Timothée Bruel**^{1,2,3,22}, **Ludivine Grzelak**^{1,2,3,4}, **Florence Guivel-Benhassine**^{1,2,3}, **Isabelle Staropoli**^{1,2,3}, **Françoise Porrot**^{1,2,3}, **Cyril Planchais**⁵, **Julian Buchrieser**^{1,2,3}, **Maaran Michael Rajah**^{1,2,3,4}, **Elodie Bishop**^{1,2,3,4}, **Mélanie Albert**^{6,7}, **Flora Donati**^{6,7}, **Matthieu Prot**⁸, **Sylvie Behillil**^{6,7}, **Vincent Enouf**^{6,7}, **Marianne Maquart**⁹, **Mounira Smati-Lafarge**¹⁰, **Emmanuelle Varon**¹⁰, **Frédérique Schortgen**¹¹, **Layla Yahyaoui**¹², **Maria Gonzalez**¹³, **Jérôme De Sèze**^{14,15}, **Hélène Péré**¹⁶, **David Veyer**^{16,17}, **Aymeric Sève**¹⁸, **Etienne Simon-Lorière**¹⁸, **Samira Fafi-Kremer**^{19,20}, **Karl Stefic**^{9,21}, **Hugo Mouquet**⁵, **Laurent Hocqueloux**¹⁸, **Sylvie van der Werf**^{6,7,23}, **Thierry Prazuck**^{18,23} and **Olivier Schwartz**^{1,2,3,23} ✉



Either low or absent anti-Spike immunity in lungs of vaccinees

July 19, 2022

Science Immunology

Current Issue First release papers Archive About

HOME > SCIENCE IMMUNOLOGY > FIRST RELEASE > RESPIRATORY MUCOSAL IMMUNITY AGAINST SARS-COV-2 FOLLOWING mRNA VACCINATION

REPORTS | CORONAVIRUS

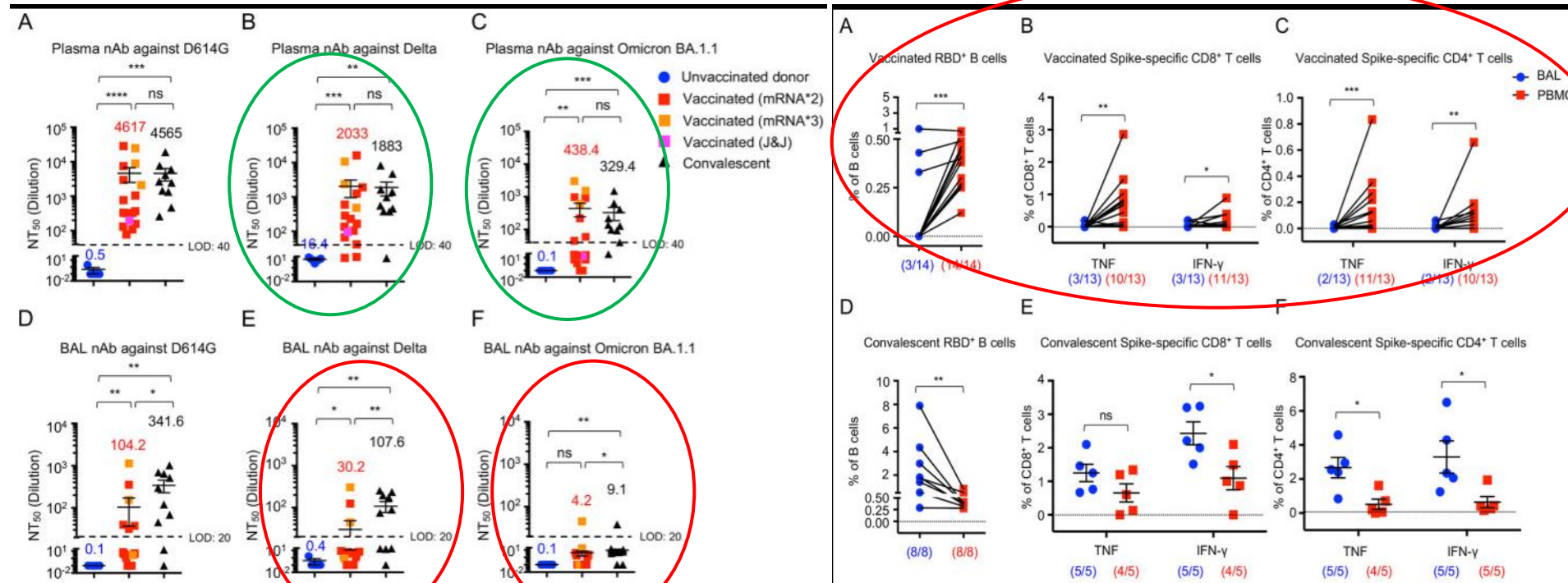


Respiratory mucosal immunity against SARS-CoV-2 following mRNA vaccination

JINYI TANG, CONG ZENG, THOMAS M. COX, CHAOFAN LI, YOUNG MIN SON, IN SU CHEON, YUE WU, SUPRIYA BEHL, JUSTIN J. TAYLOR, ...

JIE SUN, +18 authors, Authors Info & Affiliations

SCIENCE IMMUNOLOGY • 19 Jul 2022 • First Release • DOI:10.1126/sciimmunol.add4853



Vaccines designed to elicit respiratory immunity must deliver antigen to the lungs

nature
immunology

ARTICLES

<https://doi.org/10.1038/s41590-018-0260-6>

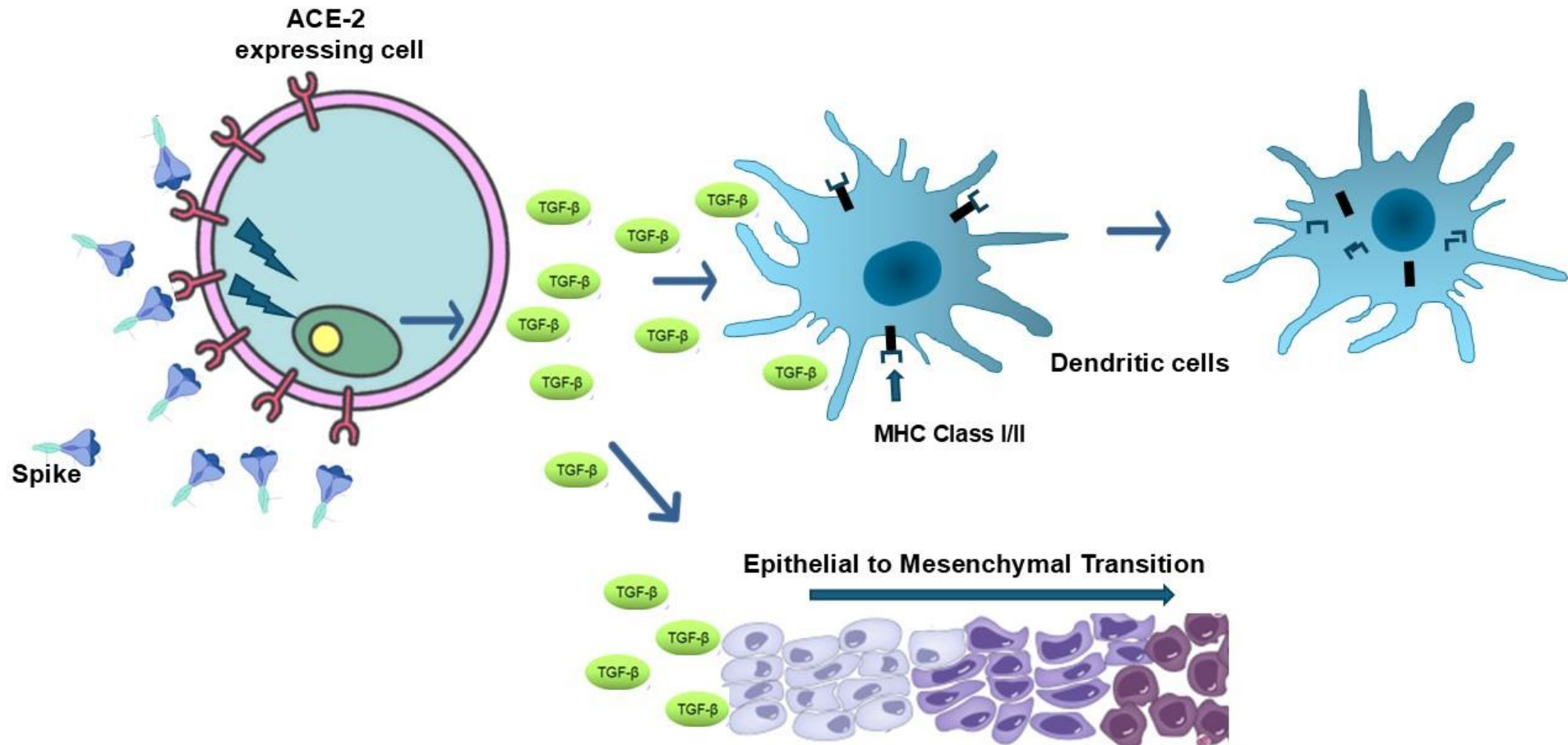
The establishment of resident memory B cells in the lung requires local antigen encounter

S. Rameeza Allie¹, John E. Bradley¹, Uma Mudunuru¹, Michael D. Schultz², Beth A. Graf², Frances E. Lund² and Troy D. Randall ^{1*}

Memory B cells are found in lymphoid and non-lymphoid tissues, suggesting that some may be tissue-resident cells. Here we show that pulmonary influenza infection elicited lung-resident memory B cells (BRM cells) that were phenotypically and functionally distinct from their systemic counterparts. BRM cells were established in the lung early after infection, in part because their placement required local antigen encounter. Lung BRM cells, but not systemic memory B cells, contributed to early plasmablast responses following challenge infection. Following secondary infection, antigen-specific BRM cells differentiated in situ, whereas antigen-non-specific BRM cells were maintained as memory cells. These data demonstrate that BRM cells are an important component of immunity to respiratory viruses such as influenza virus and suggest that vaccines designed to elicit BRM cells must deliver antigen to the lungs.

- *The development of lung immune memory is largely not influenced by events occurring in both peripheral circulation and lymphoid organs;*
- *Lymphocytes in lungs are maintained independently of the pool of circulating lymphocytes, and their continuous loss through intraepithelial migration towards airways is constantly replenished by homeostatic proliferation*

Bystander effects of the Spike/ACE-2 binding



COVID-19 vaccine-induced autoimmunity: auto-antibodies



OPEN ACCESS

EDITED BY
Anastas Dimitrov Pashov,
Bulgarian Academy of Sciences (BAS),
Bulgaria

REVIEWED BY
Nessr Abu Rached,
Ruhr University Bochum, Germany
Heinz Kohler,
Retired, Carlsbad, CA, United States

*CORRESPONDENCE
Christiana Franke
✉ christiana.franke@charite.de

†These authors have contributed equally to
this work

RECEIVED 21 March 2024
ACCEPTED 11 July 2024
PUBLISHED 02 August 2024

High serum prevalence of autoreactive IgG antibodies against peripheral nerve structures in patients with neurological post-COVID-19 vaccination syndrome

Friederike A. Arlt^{1,2†}, Ameli Breuer^{1†}, Elli Trampenau^{1,2}, Fabian Boesl¹, Marieluise Kirchner³, Philipp Mertins³, Elisa Sánchez-Sendín^{1,2}, Mahoor Nasouti^{1,2}, Marie Mayrhofer⁴, Martin Blüthner⁴, Matthias Endres^{1,2,5,6,7}, Harald Prüss^{1,2†} and Christiana Franke^{1*†}

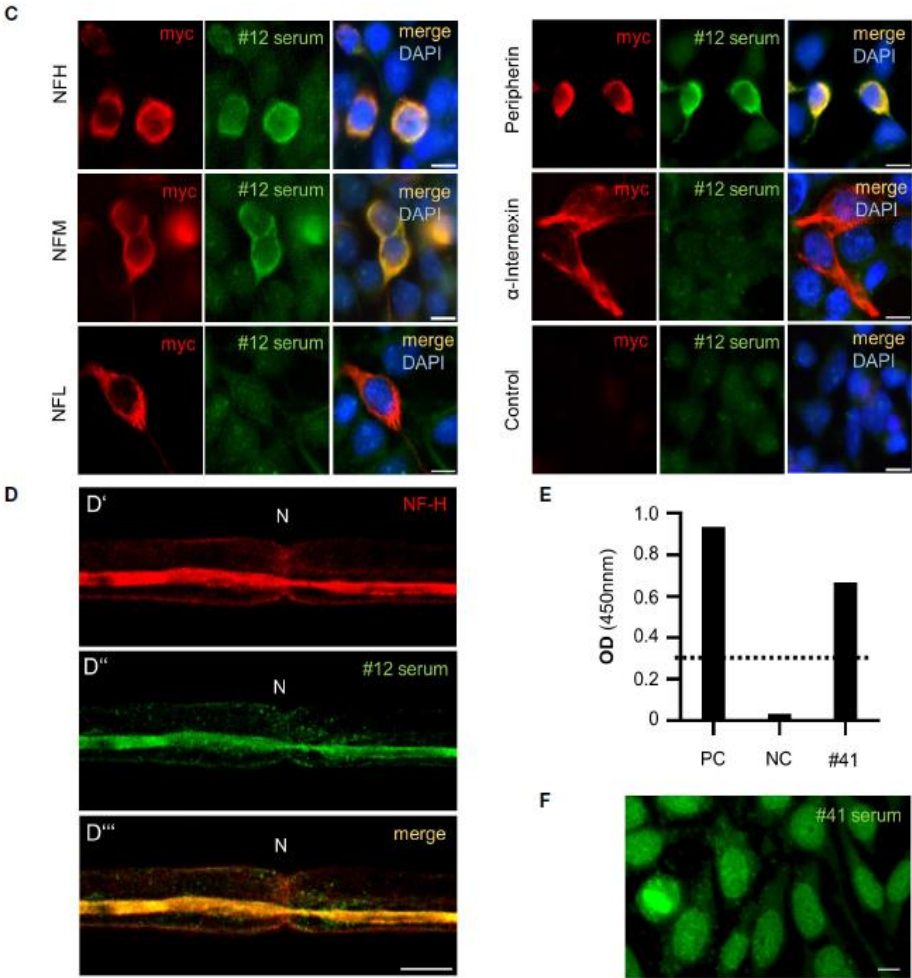


FIGURE 2

Antibody target identification and confirmation in PCVS sera. Volcano plot representing significantly enriched proteins (labeled in red) in patient #12 IgG IP (A) and patient #41 IgG IP (B) compared to a negative control; in A-B: the x-axis displays the log2-transformed fold change, and the y-axis represents the -log10-transformed p value. (C) Cell-based assays with patient #12 serum testing IgG reactivity against neurofilament subunits and control HEK293 cells. (D) Costaining of sciatic nerve teased fibers with a commercial NF-H antibody (D') and patient #12 serum (D'') showing clear signal overlap (D'''). (E) ELISA analysis of DFS-70 and patient #41 serum. PC: positive control serum. NC: negative control serum. The standard reference serum OD was 0.278 (dotted line). OD: optical density. (F) Hep2 staining of patient #41 serum resembling fine speckled nuclear staining typical of DFS-70 IgGs.



National Center for the Global Health

Un grazie e un saluto a tutti