

Articolo

# La combinazione di bromelina e acetilcisteina (BromAc) inattiva sinergicamente il SARS-CoV-2

Javed Akhter<sup>1,2,†</sup>, Grégory Quéromès<sup>3,†</sup>, Krishna Pillai<sup>2,†</sup>, Vahan Kepenekian<sup>1,4,†</sup>, Samina Badar<sup>1,5</sup>, Ahmed H. Mekkawy<sup>1,2,5</sup>, Emilie Frobert<sup>3,6,‡</sup>, Sarah J. Valle<sup>1,2,5,‡</sup> e David L. Morris<sup>1,2,5,\*,‡</sup>

- <sup>1</sup> Dipartimento di Chirurgia, St. George Hospital, Sydney, NSW 2217, Australia; Javed.Akhter@health.nsw.gov.au (J.A.); vahan.kepenekian@chu-lyon.fr (V.K.); samina.badar@unsw.edu.au (S.B.); z3170073@ad.unsw.edu.au (A.H.M.); sarah.valle@mucpharm.com (S.J.V.)
- <sup>2</sup> Mucpharm Pty Ltd., Sydney, NSW 2217, Australia; panthera6444@yahoo.com.au
- <sup>3</sup> CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Team VirPatH, Univ Lyon, Inserm, U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, ENS de Lyon, F-69007 Lyon, France; gregory.queromes@univ-lyon1.fr (G.Q.); emilie.frobert@chu-lyon.fr (E.F.)
- <sup>4</sup> Hospices Civils de Lyon, EMR 3738 (CICLY), Lyon 1 Université, F-69921 Lyon, Francia
- <sup>5</sup> Scuola clinica St. George & Sutherland, Università del Nuovo Galles del Sud, Sydney, NSW 2217, Australia
- <sup>6</sup> Laboratorio di Virologia, Istituto degli Agenti Infettivi (IAI), Hospices Civils de Lyon, Groupement Hospitalier Nord, F-69004 Lyon, Francia
- \* Corrispondenza: david.morris@unsw.edu.au; Tel.: +61-(02)-91132590
- † Questi autori hanno contribuito in egual misura a questo lavoro.
- ‡ Questi autori hanno contribuito in egual misura a questo lavoro.



**Citazione:** Akhter, J.; Quéromès, G.; Pillai, K.; Kepenekian, V.; Badar, S.; Mekkawy, A.H.; Frobert, E.; Valle, S.J.; Morris, D.L. The Combination of Bromelain and Acetylcysteine (BromAc) Synergistically Inactivates SARS-CoV-2. *Virus* **2021**, *13*, 425. <https://doi.org/10.3390/v13030425>

Redattori accademici:  
Kenneth Lundstrom e Alaa A. A. Aljabali

Ricevuto: 31 gennaio 2021  
Accettato: 1 marzo 2021  
Pubblicato: 6 marzo 2021

**Nota dell'editore:** MDPI rimane neutrale rispetto alle rivendicazioni giurisdizionali nelle mappe pubblicate e alle affiliazioni istituzionali.



**Copyright:** © 2021 dagli autori. Licenziario MDPI, Basilea, Svizzera. Questo articolo è un articolo ad accesso libero distribuito secondo i termini e le condizioni della licenza Creative Commons Attribuzione (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** L'infezione da coronavirus della sindrome respiratoria acuta grave (SARS-CoV-2) è causa di una pandemia mondiale, attualmente con limitate opzioni terapeutiche. La glicoproteina spike e la proteina envelope del SARS-CoV-2, che contengono ponti disolfuro per la stabilizzazione, rappresentano un bersaglio interessante in quanto sono essenziali per il legame con il recettore ACE2 nelle cellule ospiti presenti nella mucosa nasale. La bromelina e l'acetilcisteina (BromAc) hanno un'azione sinergica contro le glicoproteine attraverso la rottura dei legami glicosidici e dei legami disolfuro. Abbiamo cercato di determinare l'effetto di BromAc sulle proteine dello spike e dell'envelope e il suo potenziale di riduzione dell'infettività nelle cellule ospiti. Le proteine ricombinanti dello spike e dell'envelope del SARS-CoV-2 sono state distrutte da BromAc. I legami disolfuro delle proteine dello spike e dell'envelope sono stati ridotti dall'acetilcisteina. Nella coltura in vitro di virus interi sia wild-type che mutanti spike, il SARS-CoV-2 ha dimostrato un'inattivazione concentrazione-dipendente dal trattamento con BromAc ma non da agenti singoli. La sperimentazione clinica attraverso la somministrazione nasale in pazienti con infezione precoce da SARS-CoV-2 è imminente.

**Parole chiave:** SARS-CoV-2; bromelina; acetilcisteina; BromAc; riproposizione dei farmaci

## 1. Introduzione

Il coronavirus 2 della sindrome respiratoria acuta grave (SARS-CoV-2), recentemente emerso, è l'agente causale della malattia da coronavirus 2019 (COVID-19), che può variare da forme asintomatiche a forme gravi e letali con una sindrome da risposta infiammatoria sistemica. Al 21 febbraio 2021, sono stati segnalati oltre 111 milioni di casi confermati, con una mortalità complessiva stimata del 2,2% [1]. Attualmente sono pochi gli agenti terapeutici che si sono dimostrati utili nel ridurre la progressione della malattia nelle fasi iniziali e tardive [2]. Sebbene esistano fortunatamente molti candidati vaccini, la loro disponibilità diffusa per la vaccinazione potrebbe non essere immediata, la durata della protezione immunitaria potrebbe essere limitata [3,4] e l'efficacia dei vaccini potrebbe essere ridotta dalle nuove varianti del SARS-CoV-2. È quindi necessario continuare ad esplorare trattamenti efficaci.

Strutturalmente, il SARS-CoV-2 contiene proteine spike di superficie, proteine di membrana e proteine dell'involucro, oltre a nucleoproteine interne che impacchettano l'RNA. La proteina spike è un complesso glicoproteico omotrimerico con diversi ruoli svolti mediante



modifiche conformazionali dinamiche, basate in parte su legami disolfuro [5]. Consente l'infezione delle cellule bersaglio legandosi, tra l'altro, ai recettori dell'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE2) umano, che innescano la proteolisi da parte della serina proteasi transmembrana 2 (TMPRSS2), della furina e forse di altre proteasi, portando alla fusione tra virione e membrana della cellula ospite [6,7].

L'ingresso dei virus nelle cellule dei mammiferi, o "internalizzazione del virus", è un meccanismo chiave dell'infezione da virus involucri e si basa su cambiamenti conformazionali dinamici delle loro glicoproteine di superficie, mediati dalla riduzione dei legami disolfuro e regolati da ossidoreduttasi e proteasi della superficie cellulare [5,8-11]. È stato dimostrato che l'ingresso del SARS-CoV-2 nelle cellule ospiti inizia con la destabilizzazione della proteina spike attraverso una transizione meccanica allosterica, che induce un cambiamento conformazionale dallo stato chiuso "down" allo stato aperto "up" del dominio di legame al recettore (RBD) della proteina spike [12,13]. I cambiamenti conformazionali dell'RBD e il legame con il virus sono indotti da TMPRSS2 o dalla catepsina L, che innescano la transizione dallo stato di pre-fusione a quello di post-fusione [5,12,13]. L'energia liberata dalla riduzione del legame disolfuro aumenta la flessibilità della proteina, che è massima quando lo stato ridotto è completo [8], consentendo così la fusione delle membrane ospite-virus, altrimenti impossibile a causa delle forze repulsive di idratazione presenti prima della riduzione [5]. La bromelina è estratta principalmente dal gambo della pianta dell'ananas (*Ananas comosus*) e contiene una serie di enzimi che le conferiscono la capacità di idrolizzare i legami glicosidici nei carboidrati complessi [14]. Studi precedenti hanno indicato che la bromelina rimuove le proteine dello spike e dell'emoagglutinina del virus della foresta di Semliki, del virus Sindbis, del coronavirus gastrointestinale del topo, del virus dell'encefalomielite emoagglutinante e dei virus influenzali H1N1 [15,16]. Come molecola terapeutica, viene utilizzata per il debridement delle ustioni. L'acetilcisteina è un potente antiossidante che viene comunemente nebulizzato nelle vie aeree per l'accumulo di muco ed è anche utilizzato come agente epatoprotettivo in caso di overdose di paracetamolo. Soprattutto nel presente contesto, l'acetilcisteina riduce i legami disolfuro [17]. Inoltre, l'associazione delle proteine dello spike e dell'envelope attraverso i rispettivi motivi a tripla cisteina giustifica l'ipotesi di un impatto sulla stabilità del virione in seguito all'interruzione dei ponti disolfuro da parte dell'azione dell'acetilcisteina [18]. La combinazione di bromelina e acetilcisteina (BromAc) ha un effetto mucolitico sinergico che viene utilizzato nel trattamento dei tumori mucinosi [19,20] e come chemiosensibilizzante di diversi farmaci antitumorali [21]. Queste diverse azioni sono dovute alla capacità del BromAc di dispiegare le strutture molecolari di glicoproteine complesse, permettendo così il legame grazie all'elevata affinità tra RBD e ACE2.

Pertanto, nel presente studio ci siamo proposti di determinare se BromAc può interrompere l'integrità delle proteine dello spike e dell'envelope del SARS-CoV-2 e successivamente di esaminare il suo potenziale di inattivazione contro la replicazione in vitro di due ceppi virali, tra cui uno con un mutante dello spike alterato del nuovo sito di clivaggio S1/S2.

## 2. Materiali e metodi

### 2.1. I materiali

La bromelina API è stata prodotta da Mucpharm Pty Ltd (Kogarah, Australia) in polvere sterile. L'acetilcisteina è stata acquistata da Link Pharma (Cat# AUST R 170803; Warriewood, Australia). La proteina ricombinante dello spike SARS-COV-2 è stata ottenuta da SinoBiological (Cat# 40589-V08B1; Beijing, China). La proteina ricombinante dell'envelope è stata ottenuta da MyBioSource (Cat# MBS8309649; San Diego, CA, USA). Tutti gli altri reagenti sono stati forniti da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

### 2.2. Spike ricombinante ed elettroforesi su gel dell'involucro

Le proteine dello spike o dell'envelope sono state ricostituite in acqua distillata sterile secondo le istruzioni del produttore e le aliquote sono state congelate a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Due microgrammi e mezzo di proteine del picco o dell'involucro sono stati incubati con 50 o 100  $\mu\text{g/mL}$  di bromelina, 20  $\text{mg/mL}$  di acetilcisteina o una combinazione di entrambi in acqua Milli-Q. Il controllo non conteneva farmaci. Il controllo non conteneva farmaci. Il

---

volume totale di reazione è stato di 15  $\mu\text{L}$  ciascuno. Dopo 30 minuti di incubazione a 37  $^{\circ}\text{C}$ , sono stati aggiunti 5  $\mu\text{L}$  di tampone campione in ogni reazione. Un totale di 20  $\mu\text{L}$  di ogni reazione è stato

elettroforesi su una SDS-PAGE (Cat# 456-1095; Bio-Rad Hercules, CA, USA). I gel sono stati colorati con blu di Coomassie.

### 2.3. Rilevazione spettrale UV dei legami disolfuro nelle proteine dello spike e dell'envelope

Il metodo di Iyer e Klee per la misurazione del tasso di riduzione dei legami disolfuro è stato utilizzato per rilevare i legami disolfuro nelle proteine spike e envelope [22]. La proteina spike ricombinante del SARS-CoV-2 a una concentrazione di 3,0 µg/mL in soluzione salina tamponata con fosfato (PBS) (pH 7,0) contenente acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) 1 mM è stata incubata con 0, 10, 20, 40 e 50 µL di acetilcisteina (0,5 M), agitata a 0,5 mL di acetilcisteina.5 M), agitati a 37 °C per 30 minuti, seguiti da un'aggiunta equivalente di ditione (DTT) (0,5 M) e agitati per altri 30 minuti a 37 °C. La proteina spike è stata incubata in parallelo solo con DTT (0,5 M) come prima, senza acetilcisteina, e agitata a 37 °C per 30 minuti. L'assorbimento è stato poi letto a 310 nm. La rilevazione spettrale UV dei legami disolfuro nella proteina dell'envelope è stata eseguita in modo analogo.

### 2.4. Inattivazione del virus intero SARS-CoV-2 con BromAc

Nel pieno rispetto delle linee guida provvisorie dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) sulla biosicurezza relative alla malattia dei coronavirus, i test di inattivazione del virus intero SARS-CoV-2 sono stati eseguiti con un ceppo wild-type (WT) rappresentativo dei primi virus circolanti in Europa (numero di adesione GISAID EPI\_ISL\_578176). Un secondo ceppo di SARS-CoV-2 (indicato come ΔS), segnalato attraverso la sorveglianza genomica di routine nella regione Auvergne-Rhône-Alpes francese, è stata aggiunta ai test di inattivazione a causa di una rara mutazione nel sito di scissione del picco S1/S2 e della sua disponibilità in laboratorio (numero di accesso GISAID EPI\_ISL\_578177).

Questi test sono stati condotti con concentrazioni incrementali di Bromelina da sola (0, 25, 50, 100 e 250 µg/mL), Acetilcisteina da sola (20 mg/mL) e la reazione incrociata delle diverse concentrazioni di Bromelina combinate con una formulazione costante di 20 mg/mL di Acetilcisteina, contro due diluizioni di colture virali a  $10^{5,5}$  e  $10^{4,5}$  TCID<sub>50</sub>/mL. Dopo 1 ora di esposizione al farmaco a 37 °C, tutte le condizioni, compreso il controllo, sono state diluite 100 volte per evitare la citotossicità, inoculate in quadruplo su cellule Vero confluenti (CCL-81; ATCC®, Manassas, VA, USA) e incubate per 5 giorni a 36 °C con il 5% di CO<sub>2</sub>. Le cellule sono state mantenute in terreno minimo essenziale di Eagle (EMEM) con 2% di penicillina-streptomina, 1% di L-glutamina e 2% di siero fetale bovino inattivato. I risultati sono stati ottenuti mediante osservazioni giornaliere al microscopio ottico, un saggio di colorazione della lisi cellulare end-point e la reazione a catena della polimerasi a trascrizione inversa (RT-PCR) degli estratti di RNA del surnatante. In breve, il saggio di colorazione della lisi cellulare consisteva nell'aggiungere il colorante Neutral Red (Merck KGaA, Darmstadt, Germania) ai monostrati cellulari, incubare a 37 °C per 45 minuti, lavare con PBS e aggiungere etanolo citrato prima di misurare la densità ottica (OD) a 540 nm (Labsystems Multiskan Ascent Reader, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). La DO è direttamente proporzionale alle cellule vitali, quindi una bassa DO indica una lisi cellulare importante dovuta alla replicazione del virus. Inoltre, l'RNA dai surnatanti dei pozzetti è stato estratto con la workstation semiautomatica eMAG® (bioMérieux, Lyon, FR) e la SARS-CoV-2 RdRp IP2-targeted RdRp Institute Pasteur RT-PCR è stata eseguita su un sistema QuantStudio™ 5 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA, USA). I valori di riduzione log<sub>10</sub> (LRV) di La replicazione virale è stata calcolata in base alla differenza tra i pozzetti di trattamento e di controllo per condizione divisa per 3,3 (come  $1 \log_{10} \approx 3,3$  PCR Cycle thresholds (Ct)).

### 2.5. Cinetica di replicazione mediante analisi cellulare in tempo reale

Per confrontare la capacità di replicazione in vitro dei ceppi WT e ΔS SARS-CoV-2, la cinetica di replicazione è stata determinata misurando l'impedenza dell'elettrodo di sensori cellulari microelettronici sullo strumento xCELLigence Real-Time Cell Analyzer (RTCA) DP (ACEA Biosciences, Inc., San Diego, CA, USA). Le cellule Vero sono state

---

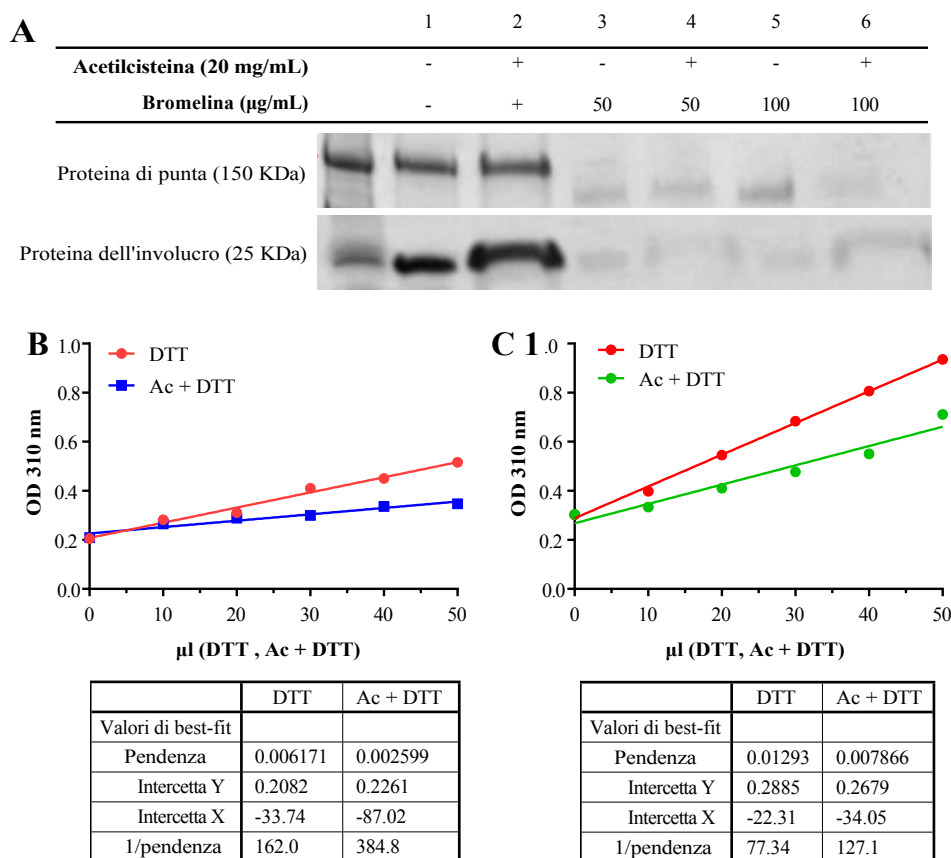
seminate a 20.000 cellule per pozzetto su un E-Plate 16 (ACEA Biosciences, Inc., San Diego, CA, USA) e incubate con le stesse condizioni di terreno descritte in precedenza a 36 °C con il 5% di CO<sub>2</sub>. Dopo 24 ore,

Gli isolati di coltura di SARS-CoV-2 sono stati inoculati in triplicato a una molteplicità di infezione di  $10^{-2}$ . Le finte infezioni sono state eseguite in quadruplo. I dati di impedenza elettronica (indice cellulare) sono stati raccolti continuamente a intervalli di 15 minuti per 6 giorni. L'analisi dell'area sotto la curva dell'indice cellulare normalizzato, stabilito al momento dell'inoculazione, è stata poi calcolata a intervalli di 12 ore. Ad ogni intervallo, la vitalità cellulare è stata determinata normalizzando rispetto al corrispondente controllo cellulare. I test di confronto multiplo Tukey sono stati utilizzati per confrontare ogni condizione su GraphPad Prism (software versione 9.0; San Diego, CA, USA).

### 3. Risultati

#### 3.1. Alterazione delle proteine della punta e dell'involucro del SARS-CoV-2

Il trattamento della proteina spike con la sola Acetilcisteina non ha mostrato alcuna alterazione della proteina, mentre le concentrazioni di Bromelina a 50 e 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e di BromAc a 50 e 100  $\mu\text{g}/20 \text{ mg}/\text{mL}$  hanno determinato un'alterazione della proteina (Figura 1A). Il trattamento con Acetilcisteina sulla proteina dell'involucro non ha alterato la proteina, mentre il trattamento con Bromelina a 50 e 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e BromAc a 50 e 100  $\mu\text{g}/20 \text{ mg}/\text{mL}$  ha provocato una frammentazione quasi completa e completa, rispettivamente (Figura 1A).



**Figura 1.** (A) La bromelina e l'acetilcisteina hanno un effetto sinergico sulla destabilizzazione della proteina spike e dell'envelope del SARS-CoV-2 (SARS-CoV-2). SDS-PAGE della proteina di punta S1 ricombinante del SARS-CoV-2 + subunità S2 (150 kDa) e proteina dell'involucro (25 kDa). Le proteine sono state trattate con 20 mg/mL di Acetilcisteina da sola, 100 e 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  di Bromelina da sola e una combinazione di 100 e 50  $\mu\text{g}/20 \text{ mg}/\text{mL}$  di BromAc. (B) Riduzione dei disolfuri della proteina spike ricombinante del SARS-CoV-2 da parte dell'Acetilcisteina. Il saggio differenziale tra Acetilcisteina (Ac) e Ditiotreitolo (DTT) per la riduzione dei legami disolfuro trovati sulla proteina spike indica che l'Acetilcisteina riduce il 42% dei legami disolfuro prima dell'aggiunta di DTT. I legami rimanenti vengono ridotti dalla DTT per produrre il cromogeno rilevato a 310 nm. (C) Riduzione dei disolfuri della proteina ricombinante dell'envelope della SARS-CoV-2 da parte dell'acetilcisteina. Il saggio differenziale tra Acetilcisteina (Ac) e Ditiotreitolo (DTT) per la riduzione dei legami disolfuro presenti sulla proteina dell'envelope indica che l'Acetilcisteina riduce il 40% dei





### 3.2. La rilevazione spettrale UV dimostra l'alterazione dei legami disolfuro nelle proteine dello spike e dell'envelope

La riduzione comparativa dei legami disolfuro sulla proteina spike tra DTT da sola e DTT con acetilcisteina ha dimostrato una differenza del 42% (Figura 1B), in base alla pendenza dei grafici [ $0,002599/0,006171$  ( $100$ ) = 42%]. L'acetilcisteina è stata quindi in grado di ridurre il 58% dei legami disolfuro nel campione, dopodiché i legami disolfuro rimanenti sono stati ridotti dalla DTT per produrre il cromogeno monitorato negli spettri. Analogamente, il saggio differenziale tra Acetilcisteina e DTT per la riduzione dei legami disolfuro trovati nella proteina dell'envelope [ $0,007866/0,01293$  ( $100$ ) = 60%] indica che l'Acetilcisteina riduce il 40% dei legami disolfuro prima dell'aggiunta di DTT (Figura 1C).

### 3.3. Potenziale inattivante in vitro del SARS-CoV-2 di bromelina, acetilcisteina e BromAc

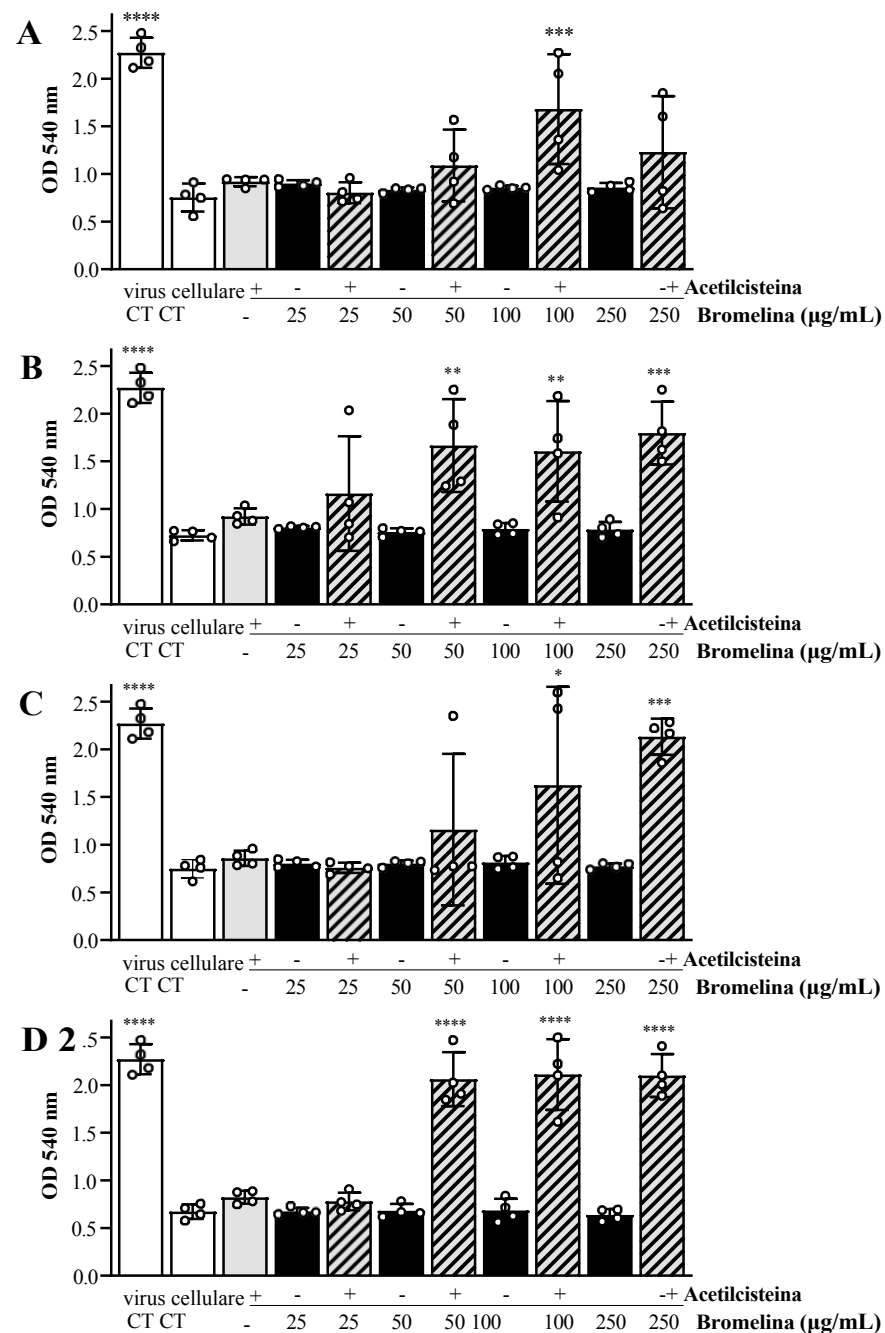
Per entrambi i ceppi di SARS-CoV-2 testati, i controlli del virus non trattati a  $10^{5,5}$  e  $10^{4,5}$  TCID<sub>50</sub> /mL hanno prodotto i tipici effetti citopatici (CPE) e non è stata osservata alcuna citotossicità per nessuna delle combinazioni di farmaci sulle cellule Vero. I risultati dei CPE ottici sono stati invariabilmente confermati dalla colorazione delle cellule Neutral Red. Complessivamente, i trattamenti con Bromelina e Acetilcisteina da soli non hanno mostrato alcuna inibizione virale, tutti con CPE paragonabile ai pozzetti di controllo del virus, mentre le combinazioni di BromAc hanno mostrato l'inattivazione del virus in modo dipendente dalla concentrazione (Figura 2). Il trattamento con titoli virali di  $10^{4,5}$  TCID<sub>50</sub> /mL (Figura 2B,D) ha prodotto un'inibizione più consistente della CPE in quadruplicato rispetto ai titoli virali di  $10^{5,5}$  TCID<sub>50</sub> /mL (Figura 2A,C).

In base alle linee guida per l'inattivazione del virus stabilite dall'OMS, un processo di inattivazione robusto e affidabile sarà in grado di ridurre la replicazione di almeno 4 log [ $\text{Log}_{10}$  reduction value (LRV) = (RT-PCR Ct trattamento - RT-PCR Ct controllo)/3,3; come  $1 \text{ log}_{10} \approx 3,3 \text{ Ct}$ ]. Pertanto, è stata eseguita la RT-PCR sugli estratti di RNA per misurare direttamente la replicazione del virus. Per il ceppo wild-type (WT) a  $10^{4,5}$  TCID<sub>50</sub> /mL, sono stati osservati LRV > 4 in 1 pozzetto su 4, 2 pozzetti su 4, 3 pozzetti su 4 e 4 pozzetti su 4 rispettivamente per 25, 50, 100 e 250 µg/20 mg/mL di BromAc (Figura 3). Vale la pena notare che a  $10^{5,5}$  TCID<sub>50</sub> /mL, gli LRV erano leggermente al di sotto della soglia, in media 3,3, con 3 su 4 pozzetti e 2 pozzetti su 4 per 100 e 250 µg/20 mg/mL di BromAc, rispettivamente (Tabella 1). Per il mutante della proteina spike ( $\Delta$ S) a  $10^{4,5}$  TCID<sub>50</sub> /mL, non è stato osservato alcun LRV > 4 per 25 µg/20 mg/mL di BromAc, ma è stato osservato in 4 pozzetti su 4 per 50, 100 e 250 µg/20 mg/mL di BromAc (Figura 3). Da notare che a  $10^{5,5}$  TCID<sub>50</sub> /mL, gli LRV erano leggermente inferiori alla soglia, in media 3,2, con 1 pozzetto su 4, 2 pozzetti su 4 e 4 pozzetti su 4 per 50, 100 e 250 µg/20 mg/mL di BromAc, rispettivamente (Tabella 1). Complessivamente, l'inattivazione in vitro della capacità di replicazione di entrambi i ceppi di SARS-CoV-2 è stata osservata in modo dose-dipendente, dimostrata soprattutto con 100 e 250 µg/20 mg/mL di BromAc contro  $10^{4,5}$  TCID<sub>50</sub> /mL di virus.

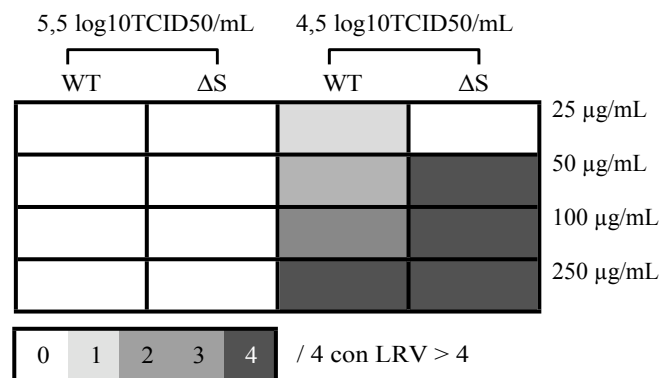
**Tabella 1.** Valori di riduzione log<sub>10</sub> (LRV) della replicazione virale in vitro 96 ore dopo il trattamento con BromAc su ceppi WT e  $\Delta$ S SARS-CoV-2 a titoli di 5,5 e 4,5 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub> /mL. Gli LRV sono stati calcolati con la seguente formula: LRV = (RT-PCR Ct del trattamento - RT-PCR Ct del virus di controllo)/3,3; come  $1 \text{ log}_{10} \approx 3,3 \text{ Ct}$ . Ogni replica è descritta. TCID<sub>50</sub> /mL = Dose infettiva mediana della coltura tissutale; WT = wild-type;  $\Delta$ S = mutante di punta S1/S2.

	BromAc (µg/20 mg/mL)	Virus Titer							
		5,5 log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /mL				4,5 log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /mL			
WT	25	0.033	0.104	0.250	0.213	0.463	0.356	4.390	0.173
	50	0.050	0.304	0.446	0.698	0.471	4.378	0.404	4.651
	100	3.415	3.323	0.360	3.313	4.418	4.463	0.423	4.508
	250	0.033	3.423	0.200	3.389	4.496	4.370	4.419	4.506
$\Delta$ S	25	0,010	0,153	NA	0,414	0.330	0.313	0.172	0.075
	50	3.252	0.297	0.278	0.275	4.762	4.612	4.618	4.571
	100	3.191	3.260	0.210	0.301	6.054	4.518	5.155	4.747
	250	3.287	3.298	3.308	3.308	4.333	4.302	4.410	4.361



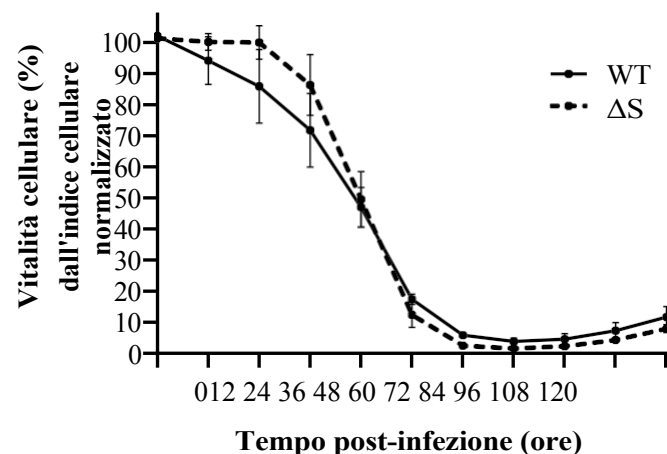


**Figura 2.** I saggi di lisi cellulare hanno dimostrato il potenziale di inattivazione in vitro dell'acetilcisteina e della bromelina combinate (BromAc) contro il SARS-CoV-2. La vitalità cellulare è stata misurata mediante colorazione con Neutral Red, dove la densità ottica (OD) è direttamente proporzionale alle cellule vitali. Una bassa OD indica un'importante lisi cellulare dovuta alla replicazione del virus. Il ceppo di SARS-CoV-2 wild-type (WT) a Titoli di 5,5 e 4,5 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub> /mL (A e B, rispettivamente) non hanno mostrato alcuna inibizione dell'effetto citopatico (CPE) per il trattamento con un singolo agente, rispetto alla condizione di controllo del virus con trattamento mock. Le combinazioni di BromAc sono state in grado di inibire la CPE, rispetto ai controlli delle cellule per la finta infezione. Il trattamento di una variante della proteina spike della SARS-CoV-2 (ΔS) con una mutazione alla giunzione S1/S2 a 5,5 e I titoli di 4,5 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub> /mL (C e D, rispettivamente) hanno mostrato risultati simili. Le barre rappresentano la media di ogni quadruplicato per condizione, illustrata dai cerchi bianchi. È stata formata un'ANOVA ordinaria a una via, utilizzando il controllo del virus per il finto trattamento come condizione di controllo (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ , \*\*\*  $p < 0,0005$ , \*\*  $p < 0,003$  e \*  $p < 0,05$ ).



**Figura 3.** Matrice di soglia dei valori di riduzione  $\log_{10}$  (LRV) della replicazione virale in vitro 96 ore dopo il trattamento con BromAc su ceppi WT e  $\Delta S$  SARS-CoV-2 a titoli di 5,5 e 4,5  $\log_{10}$ TCID<sub>50</sub>/mL. Gli LRV sono stati calcolati con la seguente formula:  $LRV = (RT-PCR \text{ Ct del trattamento} - RT-PCR \text{ Ct del virus di controllo})/3,3$ ; come  $1 \log_{10} \approx 3,3 \text{ Ct}$ . La matrice a gradiente di colore mostra il numero di quadruplicati per condizione che producono un LRV > 4, corrispondente a un'inattivazione robusta secondo l'OMS. WT = wild-type;  $\Delta S$  = mutante di punta S1/S2.

L'analisi cellulare in tempo reale ha dimostrato una cinetica di replicazione comparabile sia per le cellule WT che per quelle  $\Delta S$  SARS-CoV-2 (Figura 4). Non è stata osservata alcuna differenza significativa nella vitalità cellulare tra WT e  $\Delta S$  in qualsiasi momento. A partire da 48 ore dopo l'infezione, la vitalità delle cellule WT e  $\Delta S$  è risultata significativamente diversa rispetto alla finta infezione ( $p < 0,05$ ).



**Figura 4.** Capacità di replicazione di SARS-CoV-2 WT e  $\Delta S$  SARS-CoV-2 misurata mediante analisi cellulare in tempo reale. I punti dei dati corrispondono all'analisi dell'area sotto la curva dell'indice cellulare normalizzato (impedenza elettronica di RTCA stabilita al momento dell'inoculazione) a intervalli di 12 ore. La vitalità cellulare è stata poi determinata normalizzando rispetto al corrispondente controllo cellulare. WT = wild-type;  $\Delta S$  = mutante di punta S1/S2.

#### 4. Discussione

La combinazione di bromelina e acetilcisteina, BromAc, ha inibito sinergicamente l'infettività di due ceppi di SARS-CoV-2 coltivati su cellule Vero. La conferma delle proteine e le loro proprietà molecolari dipendono dalla loro integrità strutturale e geometrica, che dipende sia dai legami peptidici sia dai ponti disolfuro. L'acetilcisteina, in quanto buon agente riducente, tende a ridurre i ponti disolfuro e quindi ad alterare le proprietà molecolari della maggior parte delle proteine. Questa proprietà è stata ampiamente sfruttata nello sviluppo di diverse terapie (broncopneumopatia cronica ostruttiva, malattie allergiche delle vie aeree, fibrosi cistica, pseudomixoma peritonei, ecc. Più di recente, l'acetilcisteina è stata utilizzata nello sviluppo di terapie per le infezioni respiratorie, come l'influenza e le malattie da raffreddamento.

COVID-19 [28-30], dove l'integrità della proteina spike è fondamentale per l'infezione [12,13]. Un meccanismo d'azione ipotizzato potrebbe essere il dispiegamento della glicoproteina spike e la riduzione dei suoi legami disolfuro.

La proteina spike del SARS-CoV-2 è la chiave di volta del legame del virione con le cellule dell'ospite e rappresenta quindi un bersaglio terapeutico ideale. Un'azione meccanica diretta contro questa proteina spike è una strategia di trattamento diversa rispetto alla maggior parte dei farmaci antivirali esistenti, che impedisce l'ingresso del virus nelle cellule dell'ospite piuttosto che colpire la macchina di replicazione. La BromAc agisce come agente biochimico per distruggere le glicoproteine complesse. Le competenze enzimatiche multipotenti della bromelina, dominate dalla capacità di rompere i legami glicosidici, completano utilmente il forte potere dell'acetilcisteina di ridurre i legami disolfuro [17]. L'analisi della sequenza aminoacidica della glicoproteina spike del SARS-CoV-2 ha identificato diversi siti predeterminati in cui BromAc potrebbe agire in modo preferenziale, come il sito S2' ricco di legami disolfuro [31], insieme ad altri tre legami disolfuro nella RBD [32]. Parallelamente, il ruolo dello scudo glicosidico che ricopre l'apice, incline a essere rimosso da BromAc, è stato evidenziato come elemento di stabilizzazione delle transizioni conformazionali di RBD e come meccanismo di resistenza alla risposta immunitaria specifica [5,33,34].

Le cellule dei mammiferi presentano sulla loro superficie funzioni riduttive in grado di scindere i legami disolfuro e la regolazione di questo equilibrio tiolo-disolfuro si è dimostrata in grado di influenzare l'internalizzazione di diversi tipi di virus, tra cui il SARS-CoV-2 [8,35-38]. Sia l'ACE2 che le proteine spike possiedono legami disolfuro. Quando tutti i legami disolfuro della RBD della proteina spike sono stati ridotti a tioli, il legame del recettore ACE2 con la proteina spike è diventato meno favorevole [8]. È interessante notare che anche la riduzione dei legami disolfuro dell'ACE2 ha indotto una diminuzione del legame [8]. Inoltre, altri rapporti hanno suggerito che la bromelina da sola potrebbe inibire l'infezione da SARS-CoV-2 in cellule VeroE6 attraverso un'azione sui legami disolfuro [39,40]. Pertanto, la perdita di infettività del SARS-CoV-2 osservata dopo il pretrattamento con BromAc potrebbe essere correlata al dispiegamento cumulativo delle proteine dello spike e dell'envelope, con una significativa riduzione dei loro legami disolfuro da parte dell'acetilcisteina, dimostrata in vitro.

È interessante notare che un effetto simile del BromAc è stato osservato sia contro il SARS-CoV-2 WT che contro il SARS-CoV-2  $\Delta S$ . La principale differenza nelle sequenze aminoacidiche tra il SARS-CoV-2 e i precedenti SARS-CoV è l'inclusione di un sito di clivaggio della furina tra i domini S1 e S2 [41]. Questo sito distinto della proteina spike e il suo ruolo nello spill-over dell'ospite e nella fitness del virus sono oggetto di un ampio dibattito [41-44]. Da notare che  $\Delta S$ , che presenta una mutazione in questo nuovo sito di clivaggio S1/S2 e altera il motivo di clivaggio, non presenta differenze apparenti nella capacità di replicazione rispetto al ceppo WT. La sensibilità leggermente maggiore di  $\Delta S$  al trattamento con BromAc non è quindi dovuta a un bias di replicazione basale, ma la mutazione potrebbe forse essere coinvolta nel potenziamento del meccanismo d'azione di BromAc. Questi risultati suggeriscono comunque che, a partire da una dose soglia, BromAc potrebbe potenzialmente essere efficace sui ceppi mutanti spike. Questo potrebbe essere un chiaro vantaggio per BromAc rispetto ai meccanismi immunologici specifici di una vaccinazione spike-specifica [3,4].

Ad oggi sono state testate diverse strategie di trattamento, ma nessuna molecola ha dimostrato un chiaro effetto antivirale. Inoltre, data l'eterogeneità dell'esito della malattia nei pazienti affetti da COVID-19, la strategia terapeutica dovrebbe combinare diversi meccanismi di azione ed essere adattata allo stadio della malattia. Pertanto, la riproposizione del trattamento rimane una strategia ideale contro la COVID-19, in attesa di una sufficiente copertura vaccinale a livello mondiale [45,46]. In particolare, lo sviluppo di un trattamento precoce diretto per via nasale, in grado di ridurre l'infettività del paziente e di prevenire la progressione verso forme polmonari gravi, è supportato da un solido fondamento logico. Hou et al. hanno dimostrato che il primo sito di infezione è la mucosa nasofaringea, con un passaggio secondario ai polmoni tramite aspirazione [47]. In effetti, il modello di infettività delle cellule del tratto respiratorio ha seguito l'espressione del recettore ACE2, diminuendo dal tratto

---

respiratorio superiore al tessuto alveolare. Il rapporto per l'ACE2 era cinque volte superiore nel naso rispetto al tratto respiratorio distale [40]. Altri trattamenti di repurposing come antisettici nasali sono stati testati in vitro, come il Povidone-Iodio, che ha mostrato attività contro il SARS-CoV-2 [48]. Nel presente studio, abbiamo dimostrato il potenziale terapeutico in vitro del BromAc contro il SARS-CoV-2 con

una dose soglia efficiente a 100 µg/20 mg/mL. Poiché i modelli di sicurezza delle vie aeree animali in due specie non hanno mostrato alcuna tossicità (dati non pubblicati), l'obiettivo è testare l'amministrazione nasale del farmaco in uno studio clinico di fase I (ACTRN12620000788976). Questo trattamento potrebbe contribuire a mitigare le infezioni lievi e a prevenire l'infezione delle persone regolarmente a contatto con il virus, come gli operatori sanitari.

Sebbene i nostri risultati siano incoraggianti, ci sono alcuni punti da considerare riguardo a questa dimostrazione. Innanzitutto, le condizioni in vitro sono fisse e potrebbero essere diverse da quelle in vivo. Qualsiasi reazione enzimatica è influenzata dal pH dell'ambiente, a maggior ragione quando si tratta di reazioni redox come la riduzione del legame disolfuro [9]. Il pH della mucosa nasale è, in termini fisiologici, compreso tra 5,5 e 6,5 e aumenta nella rinite a 7,2-8,3 [49]. Anche l'età avanzata, spesso riscontrata nelle infezioni sintomatiche da SARS-CoV-2, induce un aumento del pH della mucosa nasale [49]. Una tale gamma di variazioni, che dipende dalle modificazioni tipicamente indotte da un'infezione virale, può mettere in discussione l'efficacia della nostra strategia di trattamento. Sono in corso ulteriori esperimenti in vitro per testare varie condizioni di pH, ma in ultima analisi solo gli studi clinici potranno valutare questo punto. I nostri esperimenti sono stati condotti su una linea cellulare di rene di scimmia nota per essere altamente permissiva nei confronti dell'infettività del SARS-CoV-2. Con la suddetta ipotesi di interruzione dell'equilibrio tiolo-disolfuro della lisi della proteina S, l'efficacia del BromAc sul SARS-CoV-2 non dovrebbe essere influenzata dal modello delle proteasi di membrana. La riproduzione di questo protocollo sperimentale con la linea cellulare epiteliale polmonare umana Calu-3 (ATCC® HTB-55™) consentirebbe di affrontare questi punti, poiché l'ingresso del virus è TMPRSS2-dipendente e indipendente dal pH, come nell'epitelio delle vie aeree, mentre l'ingresso del virus nelle cellule Vero è Cathepsin L-dipendente e quindi dipendente dal pH [50].

Complessivamente, i risultati ottenuti dal presente studio, insieme a quelli di altri studi complementari

Gli studi sulle proprietà di BromAc e sulla caratterizzazione del SARS-CoV-2 rivelano una forte indicazione che BromAc può essere sviluppato come agente terapeutico efficace contro il SARS-CoV-2.

## 5. Conclusioni

Attualmente non esiste un trattamento terapeutico adeguato per la SARS-CoV-2 precoce volto a prevenire la progressione della malattia. Il BromAc è in fase di sviluppo clinico da parte degli autori per i tumori mucinosi grazie alla sua capacità di alterare le strutture complesse delle glicoproteine. È stato esaminato il potenziale di BromAc sulle proteine dello spike e dell'envelope del SARS-CoV-2 stabilizzate da legami disolfuro ed è stato riscontrato che induce il dispiegamento delle proteine ricombinanti dello spike e dell'envelope riducendo i ponti disolfuro stabilizzatori. BromAc ha anche mostrato un effetto inibitorio su SARS-CoV-2 wild-type e spike mutant, inattivando la sua capacità di replicazione in vitro. Pertanto, BromAc potrebbe essere un agente terapeutico efficace per le infezioni precoci da SARS-CoV-2, nonostante le mutazioni, e persino avere un potenziale come profilassi nelle persone ad alto rischio di infezione.

**Contributi degli autori:** Concettualizzazione, J.A., K.P., S.J.V. e D.L.M.; metodologia, J.A., G.Q., K.P., S.B. e A.H.M.; validazione, J.A., G.Q., K.P., V.K., S.B. e A.H.M.; indagine, J.A., G.Q., K.P., V.K., S.B. e A.H.M.; stesura della bozza originale, G.Q., K.P., V.K., A.H.M., E.F. e S.J.V.; supervisione, D.L.M. e E.F.; gestione del progetto, S.J.V.; acquisizione dei fondi, S.J.V. e D.L.M. Tutti gli autori hanno letto e approvato la versione pubblicata del manoscritto.

**Finanziamento:** Questa ricerca è in parte finanziata da Mucpharm Pty Ltd., Australia.

**Dichiarazione di disponibilità dei dati:** Un preprint di questo manoscritto è stato archiviato su [www.biorxiv.org](http://www.biorxiv.org) (accesso il 31 gennaio 2021) a causa dell'emergenza di COVID-19.

**Conflitti di interesse:** David L. Morris è co-inventore e assegnatario della licenza per questo studio e direttore della società sponsor dello spin-off, Mucpharm Pty Ltd. Javed Akhter, Krishna Pillai e Ahmed Mekawy sono dipendenti della Mucpharm Pty Ltd. Sarah Valle è parzialmente impiegata da Mucpharm per lo sviluppo del cancro ed è sostenuta da una borsa di studio del programma di formazione alla ricerca del governo australiano. Vahan Kepenekian ringrazia la

---

Fondazione Nuovo Soldati per la sua borsa di studio ed è stato in parte sponsorizzato da Mucpharm Pty Ltd per lo stipendio.



## Riferimenti

1. Centro risorse per i coronavirus della John's Hopkins University. COVID-19 Dashboard del Center for Systems Science and Engineering (CSSE) della Johns Hopkins University (JHU). Disponibile online: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html> (consultato il 7 febbraio 2021).
2. Song, Y.; Zhang, M.; Yin, L.; Wang, K.; Zhou, Y.; Zhou, M.; Lu, Y. Trattamento del COVID-19: Near to a cure? - una rapida rassegna di farmacoterapie per il nuovo coronavirus. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2020**, *56*, 106080. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Zhu, F.C.; Guan, X.H.; Li, Y.H.; Huang, J.Y.; Jiang, T.; Hou, L.H.; Li, J.X.; Yang, B.F.; Wang, L.; Wang, W.J.; et al. Immunogenicità e sicurezza di un vaccino COVID-19 ricombinante con adenovirus di tipo 5 in adulti sani di età pari o superiore a 18 anni: A randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet* **2020**, *396*, 479-488. [[CrossRef](#)]
4. Folegatti, P.M.; Ewer, K.J.; Aley, P.K.; Angus, B.; Becker, S.; Belij-Rammerstorfer, S.; Bellamy, D.; Bibi, S.; Bittaye, M.; Clutterbuck, E.A.; et al. Sicurezza e immunogenicità del vaccino ChAdOx1 nCoV-19 contro la SARS-CoV-2: rapporto preliminare di uno studio controllato randomizzato di fase 1/2, in singolo cieco. *Lancet* **2020**, *396*, 467-478. [[CrossRef](#)]
5. Cai, Y.; Zhang, J.; Xiao, T.; Peng, H.; Sterling, S.M.; Walsh, R.M., Jr.; Rawson, S.; Rits-Volloch, S.; Chen, B. Stati conformazionali distinti della proteina spike del SARS-CoV-2. *Science* **2020**, *369*, 1586-1592. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Coutard, B.; Valle, C.; de Lamballerie, X.; Canard, B.; Seidah, N.G.; Decroly, E. La glicoproteina spike del nuovo coronavirus 2019-nCoV contiene un sito di clivaggio simile alla furina assente nei CoV dello stesso clade. *Antiviral Res.* **2020**, *176*, 104742. [[CrossRef](#)]
7. Vankadari, N.; Wilce, J.A. Il coronavirus emergente WuHan (COVID-19): Scudo glicanico e previsione della struttura della glicoproteina spike e della sua interazione con il CD26 umano. *Emerg. Microbes Infect.* **2020**, *9*, 601-604. [[CrossRef](#)]
8. Hati, S.; Bhattacharyya, S. Impact of Thiol-Disulfide Balance on the Binding of Covid-19 Spike Protein with Angiotensin-Converting Enzyme 2 Receptor. *ACS Omega* **2020**, *5*, 16292-16298. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Lavillette, D.; Barbouche, R.; Yao, Y.; Boson, B.; Cosset, F.L.; Jones, I.M.; Fenouillet, E. Significativa insensibilità al redox delle funzioni della glicoproteina spike del SARS-CoV: Confronto con l'envelope dell'HIV. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 9200-9204. [[CrossRef](#)]
10. Mathys, L.; Balzarini, J. Il ruolo delle ossidoreduttasi cellulari nell'ingresso virale e nello stress ossidativo associato all'infezione virale: Potenziali applicazioni terapeutiche. *Expert. Opin. Ther. Targets* **2016**, *20*, 123-143. [[CrossRef](#)]
11. Wrapp, D.; Wang, N.; Corbett, K.S.; Goldsmith, J.A.; Hsieh, C.-L.; Abiona, O.; Graham, B.S.; McLellan, J.S. Struttura crio-EM di il picco 2019-nCoV nella conformazione di prefusione. *Science* **2020**, *367*, 1260-1263. [[CrossRef](#)]
12. Moreira, R.A.; Guzman, H.V.; Boopathi, S.; Baker, J.L.; Poma, A.B. Determinazione quantitativa della stabilità meccanica nella nuova proteina spike del coronavirus. *Nanoscale* **2020**, *12*, 16409-16413. [[CrossRef](#)]
13. Moreira, R.A.; Guzman, H.V.; Boopathi, S.; Baker, J.L.; Poma, A.B. Characterization of Structural and Energetic Differences between Conformations of the SARS-CoV-2 Spike Protein. *Materials* **2020**, *13*, 5362. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Amini, A.; Masoumi-Moghaddam, S.; Morris, D.L. *Utility of Bromelain and N-Acetylcysteine in Treatment of Peritoneal Dissemination of Gastrointestinal Mucin-Producing Malignancies*; Springer: New York, NY, USA, 2016.
15. Schlegel, A.; Schaller, J.; Jentsch, P.; Kempf, C. Semliki Forest virus core protein fragmentation: Il suo possibile ruolo nel disassemblaggio del nucleocapside. *Biosci. Rep.* **1993**, *13*, 333-347. [[CrossRef](#)]
16. Greig, A.S.; Bouillant, A.M. Effetti di legame della concanavalina A su un coronavirus. *Can. J. Comp. Med.* **1977**, *41*, 122-126.
17. Pillai, K.; Akhter, J.; Chua, T.C.; Morris, D.L. Una formulazione per la lisi in situ della mucina secreta nello pseudomixoma peritonei. *Int. J. Cancer* **2014**, *134*, 478-486. [[CrossRef](#)]
18. Schoeman, D.; Fielding, B.C. Proteine dell'involucro dei coronavirus: Conoscenze attuali. *Virology* **2019**, *16*, 69. [[CrossRef](#)]
19. Pillai, K.; Akhter, J.; Morris, D.L. Valutazione di una nuova soluzione mucolitica per la dissoluzione del muco nello pseudomixoma peritonei: Uno studio ex vivo e in vitro. *Pleura Peritoneum* **2017**, *2*, 111-117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Valle, S.J.; Akhter, J.; Mekkawy, A.H.; Lodh, S.; Pillai, K.; Badar, S.; Glenn, D.; Power, M.; Liauw, W.; Morris, D.L. Un nuovo trattamento a base di bromelina e acetilcisteina (BromAc) in pazienti con tumori mucinosi peritoneali: Un primo studio di fase I sull'uomo. *Eur. J. Surg. Oncol.* **2021**, *47*, 115-122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Pillai, K.; Mekkawy, A.H.; Akhter, J.; Badar, S.; Dong, L.; Liu, A.I.; Morris, D.L. Potenzamento della potenza degli agenti chemioterapici mediante combinazione con bromelina e N-acetilcisteina: uno studio in vitro con cellule di cancro pancreatico ed epatico. *Am. J. Transl. Res.* **2020**, *12*, 7404-7419.
22. Iyer, K.S.; Klee, W.A. Misura spettrofotometrica diretta della velocità di riduzione dei legami disolfuro. La reattività dei legami disolfuro della lattalbumina bovina. *J. Biol. Chem.* **1973**, *248*, 707-710.
23. Zhang, Q.; Ju, Y.; Ma, Y.; Wang, T. La n-acetilcisteina migliora lo stress ossidativo e la risposta infiammatoria nei pazienti con polmonite acquisita in comunità: Uno studio controllato randomizzato. *Medicina* **2018**, *97*, 45. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Morgan, L.E.; Jaramillo, A.M.; Shenoy, S.K.; Raclawska, D.; Emezienna, N.A.; Richardson, V.L.; Hara, N.; Harder, A.Q.; NeeDell, J.C.; Hennessy, C.E. L'interruzione dei disolfuri inverte la disfunzione del muco nella malattia allergica delle vie aeree. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 1-9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Calzetta, L.; Rogliani, P.; Facciolo, F.; Rinaldi, B.; Cazzola, M.; Matera, M.G. La N-acetilcisteina protegge i bronchi umani modulando il rilascio di neurochinina A in un modello ex vivo di esacerbazione della BPCO. *Biomed Pharm.* **2018**, *103*, 1-8. [[CrossRef](#)]
26. Cazzola, M.; Calzetta, L.; Facciolo, F.; Rogliani, P.; Matera, M.G. Indagine farmacologica sull'attività antiossidante e anti-infiammatoria della N-acetilcisteina in un modello ex vivo di esacerbazione della BPCO. *Respir. Res.* **2017**, *18*, 26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

27. Suk, J.S.; Boylan, N.J.; Trehan, K.; Tang, B.C.; Schneider, C.S.; Lin, J.-M.G.; Boyle, M.P.; Zeitlin, P.L.; Lai, S.K.; Cooper, M.J. La n-acetilcisteina migliora la penetrazione nell'espettorato della fibrosi cistica e il trasferimento genico nelle vie aeree da parte di nanoparticelle di DNA altamente compattate. *Mol. Ther.* **2011**, *19*, 1981-1989. [[CrossRef](#)]
28. Suhail, S.; Zajac, J.; Fossum, C.; Lowater, H.; McCracken, C.; Severson, N.; Laatsch, B.; Narkiewicz-Jodko, A.; Johnson, B.; Liebau, J. Ruolo dello stress ossidativo nell'infezione da SARS-CoV (SARS) e SARS-CoV-2 (COVID-19): A Review. *Protein J.* **2020**, *39*, 1-13. [[CrossRef](#)]
29. De Flora, S.; Balansky, R.; La Maestra, S. Razionale per l'uso della N-acetilcisteina nella prevenzione e nella terapia adiuvante di COVID-19. *FASEB J.* **2020**, *34*, 13185-13193. [[CrossRef](#)]
30. Guerrero, C.A.; Acosta, O. Stress infiammatorio e ossidativo nell'infezione da rotavirus. *World J. Virol.* **2016**, *5*, 38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Walls, A.C.; Park, Y.J.; Tortorici, M.A.; Wall, A.; McGuire, A.T.; Veesler, D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell* **2020**, *181*, 281-292. e6. [[CrossRef](#)]
32. Li, W.; Zhang, C.; Sui, J.; Kuhn, J.H.; Moore, M.J.; Luo, S.; Wong, S.K.; Huang, I.C.; Xu, K.; Vasilieva, N.; et al. Determinanti recettoriali e virali dell'adattamento del SARS-coronavirus all'ACE2 umano. *EMBO J.* **2005**, *24*, 1634-1643. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Watanabe, Y.; Allen, J.D.; Wrapp, D.; McLellan, J.S.; Crispin, M. Analisi dei glicani sito-specifici dello spike del SARS-CoV-2. *Scienza* **2020**, *369*, 330-333. [[CrossRef](#)]
34. Casalino, L.; Gaieb, Z.; Goldsmith, J.A.; Hjorth, C.K.; Dommer, A.C.; Harbison, A.M.; Fogarty, C.A.; Barros, E.P.; Taylor, B.C.; McLellan, J.S. Beyond shielding: Il ruolo dei glicani nella proteina spike della SARS-CoV-2. *ACS Cent. Sci.* **2020**, *6*, 1722-1734. [[CrossRef](#)]
35. Ryser, H.; Levy, E.M.; Mandel, R.; DiSciullo, G.J. Inibizione dell'infezione da virus dell'immunodeficienza umana da parte di agenti che interferiscono con l'interscambio tiolo-disolfuro nell'interazione virus-recettore. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 4559-4563. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Kennedy, S.I. L'effetto degli enzimi sulle proprietà strutturali e biologiche del virus della foresta di Semliki. *J. Gen. Virol.* **1974**, *23*, 129-143. [[CrossRef](#)]
37. Schlegel, A.; Omar, A.; Jentsch, P.; Morell, A.; Kempf, C. Le proteine dell'involucro del virus Semliki Forest funzionano come canali protonici. *Biosci. Rep.* **1991**, *11*, 243-255. [[CrossRef](#)]
38. Compans, R.W. Posizione della glicoproteina nella membrana del virus Sindbis. *Nat. New Biol.* **1971**, *229*, 114-116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Sagar, S.; Rathinavel, A.K.; Lutz, W.E.; Struble, L.R.; Khurana, S.; Schnaubelt, A.T.; Mishra, N.K.; Guda, C.; Palermo, N.Y.; Broadhurst, M.J.; et al. La bromelina inibisce l'infezione da SARS-CoV-2 attraverso il bersaglio di ACE-2, TMPRSS2 e proteina spike. *Clin. Transl. Med.* **2021**, *11*, 2. [[CrossRef](#)]
40. Korber, B.; Fischer, W.M.; Gnanakaran, S.; Yoon, H.; Theiler, J.; Abfalterer, W.; Hengartner, N.; Giorgi, E.E.; Bhattacharya, T.; Foley, B. Tracking changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidenza che D614G aumenta l'infettività del virus COVID-19. *Cell* **2020**, *182*, 812-827. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Zhou, H.; Chen, X.; Hu, T.; Li, J.; Song, H.; Liu, Y.; Wang, P.; Liu, D.; Yang, J.; Holmes, E.C.; et al. Un nuovo Bat Coronavirus strettamente correlato al SARS-CoV-2 contiene inserzioni naturali nel sito di clivaggio S1/S2 della proteina Spike. *Curr. Biol.* **2020**, *30*, 2196-2203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Jaimes, J.A.; Millet, J.K.; Whittaker, G.R. Proteolytic Cleavage of the SARS-CoV-2 Spike Protein and the Role of the Novel S1/S2 Site. *iScience* **2020**, *23*, 101212.
43. Lau, S.Y.; Wang, P.; Mok, B.W.; Zhang, A.J.; Chu, H.; Lee, A.C.; Deng, S.; Chen, P.; Chan, K.H.; Song, W.; et al. Varianti attenuate del SARS-CoV-2 con delezioni alla giunzione S1/S2. *Emerg Microbes Infect* **2020**, *9*, 837-842. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Hoffmann, M.; Kleine-Weber, H.; Pohlmann, S. Un sito di clivaggio multibasico nella proteina Spike del SARS-CoV-2 è essenziale per l'infezione di cellule polmonari umane. *Mol. Cell* **2020**, *78*, 779-784. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Walsh, E.E.; Frenck, R.W., Jr.; Falsey, A.R.; Kitchin, N.; Absalon, J.; Gurtman, A.; Lockhart, S.; Neuzil, K.; Mulligan, M.J.; Bailey, R.; et al. Sicurezza e immunogenicità di due candidati vaccini Covid-19 a base di RNA. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *383*, 2439-2450. [[CrossRef](#)]
46. Andersen, P.I.; Ianevski, A.; Lysvand, H.; Vitkauskiene, A.; Oksenysh, V.; Bjoras, M.; Telling, K.; Lutsar, I.; Dumpis, U.; Irie, Y.; et al. Scoperta e sviluppo di agenti antivirali ad ampio spettro sicuri per l'uomo. *Int. J. Infect. Dis.* **2020**, *93*, 268-276. [[CrossRef](#)]
47. Hou, Y.J.; Okuda, K.; Edwards, C.E.; Martinez, D.R.; Asakura, T.; Dinno, K.H., 3rd; Kato, T.; Lee, R.E.; Yount, B.L.; Mascenik, T.M.; et al. La genetica inversa del SARS-CoV-2 rivela un gradiente di infezione variabile nel tratto respiratorio. *Cell* **2020**, *182*, 429-446.e14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Frank, S.; Brown, S.M.; Capriotti, J.A.; Westover, J.B.; Pelletier, J.S.; Tessema, B. Efficacia in vitro di un antisettico nasale a base di povidone e iodio per la rapida inattivazione del SARS-CoV-2. *JAMA Otolaryngol. Head Neck Surg.* **2020**, *146*, 1054-1058. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. England, R.J.; Homer, J.J.; Knight, L.C.; Ell, S.R. Misurazione del pH nasale: Un parametro affidabile e ripetibile. *Clin. Otolaryngol. Allied Sci.* **1999**, *24*, 67-68. [[CrossRef](#)]
50. Hoffmann, M.; Mosbauer, K.; Hofmann-Winkler, H.; Kaul, A.; Kleine-Weber, H.; Kruger, N.; Gassen, N.C.; Muller, M.A.; Drosten, C.; Pohlmann, S. La cloroquina non inibisce l'infezione delle cellule polmonari umane con SARS-CoV-2. *Nature* **2020**, *585*, 588-590. [[CrossRef](#)]