



Articolo

# Effetto in vitro dell'estratto acquoso della foglia di *Taraxacum officinale* sull'interazione tra il recettore della superficie cellulare ACE2 e la proteina spike D614 del SARS-CoV-2 e quattro mutanti

Hoai Thi Thu Tran <sup>1</sup>, Michael Gigl <sup>2</sup>, Nguyen Phan Khoi Le <sup>1</sup>, Corinna Dawid <sup>2</sup> e Evelyn Lamy <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Medicina Preventiva Molecolare, Centro Medico Universitario e Facoltà di Medicina, Università di Friburgo, 79108 Friburgo, Germania; hoai.tran@uniklinik-freiburg.de (H.T.T.T.); phan.khoi.nguyen.le@uniklinik-freiburg.de (N.P.K.L.)

<sup>2</sup> Chimica degli alimenti e scienze sensoriali molecolari, Università tecnica di Monaco, 85354 Freising, Germania; michael.gigl@tum.de (M.G.); corinna.dawid@tum.de (C.D.)

\* Corrispondenza: evelyn.lamy@uniklinik-freiburg.de; Tel.: +49-761-270-82150

**Abstract:** Ad oggi, si sono rapidamente diffuse nuove "varianti preoccupanti" del SARS-CoV-2. Tutte contengono mutazioni multiple nel sito di riconoscimento dell'ACE2 della proteina spike, rispetto alla sequenza originale di Wuhan. Tutte contengono mutazioni multiple nel sito di riconoscimento del recettore ACE2 della proteina spike, rispetto alla sequenza originale di Wuhan, il che desta grande preoccupazione, a causa del loro potenziale di fuga immunitaria. Qui riportiamo l'efficacia del tarassaco comune (*Taraxacum officinale*) nel bloccare l'interazione proteica dello spike SARS-CoV-2 con il recettore ACE2 umano. Ciò è stato dimostrato per le forme wild type e mutanti (D614G, N501Y e una miscela di K417N, E484K e N501Y) in cellule umane HEK293-hACE2 del rene e A549-hACE2-TMPRSS2 del polmone. Questo effetto è dovuto ai composti ad alto peso molecolare presenti nell'estratto acquoso. L'infezione delle cellule polmonari con particelle di lentivirus pseudotipate SARS-CoV-2 spike D614 e spike Delta (B.1.617.2) è stata efficacemente impedita dall'estratto, così come la secrezione di interleuchina 6 pro-infiammatoria innescata dal virus. Le moderne monografie erboristiche considerano l'uso di questa pianta medicinale sicuro. Pertanto, i risultati in vitro qui riportati dovrebbero incoraggiare ulteriori ricerche sulla rilevanza clinica e sull'applicabilità dell'estratto come strategia di prevenzione dell'infezione da SARS-CoV-2 in termini di profilassi non invasiva e orale post-esposizione.

**Parole chiave:** Inibitore del legame dell'ACE2; COVID-19; dente di leone; prevenzione della SARS-CoV-2; mutazione dello spike S1



controllare per aggiornamenti

**Citazione:** Tran, H.T.T.; Gigl, M.; Le, N.P.K.; Dawid, C.; Lamy, E. Effetto in vitro dell'estratto acquoso di foglie di *Taraxacum officinale* sull'interazione tra il recettore di superficie cellulare ACE2 e la SARS-CoV-2 Spike Protein D614 e quattro mutanti. *Pharmaceuticals* **2021**, *14*, 1055. <https://doi.org/10.3390/ph14101055>

Redattori accademici: Jean Jacques Vanden Eynde e Annie Mayence

Ricevuto: 20 settembre 2021

Accettato: 14 ottobre 2021

Pubblicato: 17 ottobre 2021

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



**Copyright:** © 2021 dagli autori.

Licenziatario 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/>).

## 1. Introduzione

Alla fine del 2019 è stata segnalata per la prima volta la malattia nota come Corona Virus Disease 2019 o COVID-19 [1]. È indotta dal coronavirus della sindrome respiratoria acuta grave 2 (SARS-CoV-2). Tosse secca, febbre, affaticamento, cefalea, mialgie e diarrea sono i sintomi comuni della malattia. Nei casi più gravi, le persone possono ammalarsi in modo critico con una sindrome da distress respiratorio acuto [2]. La superficie del virus SARS-CoV-2 è ricoperta da un gran numero di proteine S glicosilate, che consistono in due subunità, S1 e S2. La subunità S1 riconosce e si attacca al recettore carbosipeptidasi angiotensina- converting enzyme 2 (ACE2) ancorato alla membrana sulla superficie della cellula ospite attraverso il suo dominio di legame al recettore (RBD). La subunità S2 svolge un ruolo chiave nel mediare la fusione virus-cellula e, di concerto con la proteasi transmembrana ospite di tipo serinico 2 (TMPRSS2), promuove l'ingresso nella cellula [3]. Questa interazione tra il virus e la cellula ospite nel sito di ingresso è cruciale per l'insorgenza e la progressione della malattia.

Ad oggi, si sono diffuse rapidamente nuove varianti del SARS-CoV-2, Alpha (variante B.1.1.7), Beta (variante B.1.351) e Gamma (variante P.1). Delta (variante B.1.617.2) è emersa di recente e si è diffusa in modo esplosivo, sostituendo Alpha in tutto il mondo. La maggior parte di queste varianti condivide la mutazione N501Y nella proteina spike [4] e le varianti di SARS-CoV-2 con mutazioni della proteina spike

D614G sono ora globale. La variante Beta contiene, oltre alla D614G, altre mutazioni dello spike, tra cui  
predominanti a livello tre mutazioni

(K417N, E484K e N501Y) nella RBD [5]. I dati preliminari suggeriscono una possibile associazione tra l'aumento del tasso di mortalità osservato e la mutazione D614G e si ipotizza che un cambiamento conformazionale nella proteina spike determini una maggiore infettività [6]. I calcoli di perturbazione dell'energia libera per le interazioni delle mutazioni N501Y e K417N con il recettore ACE2 e con un anticorpo derivato da pazienti COVID-19 sollevano importanti interrogativi sulla possibile risposta immunitaria umana e sul successo dei vaccini già disponibili [7]. Inoltre, è stata segnalata una maggiore resistenza delle varianti Beta e Alfa alla neutralizzazione degli anticorpi; per la variante Beta ciò è dovuto in gran parte alla mutazione E484K nella proteina spike [8]. La variante Delta è stata associata a una malattia più grave, a un aumento della trasmissione e a infezioni dirompenti in individui vaccinati [9-12]. Liu et al. [13] hanno scoperto che la mutazione P681R della proteina spike aumenta l'elaborazione dello spike, il che porta a una maggiore fitness della SARS-CoV-2 rispetto alla variante Alpha.

L'interferenza con il sito di interazione tra la subunità S1 dello spike e l'ACE2 ha il potenziale per essere un bersaglio importante per la terapia o la prevenzione [14]. I composti di origine naturale possono offrire una certa protezione contro l'ingresso nelle cellule virali, senza o con pochi effetti collaterali. Qui riportiamo il potenziale inibitorio del tarassaco sul legame della proteina spike S1 RBD al recettore di superficie cellulare hACE2 e confrontiamo l'effetto della proteina spike originale D614 con le sue mutazioni D614G, N501Y e mix (K417N, E484K e N501Y).

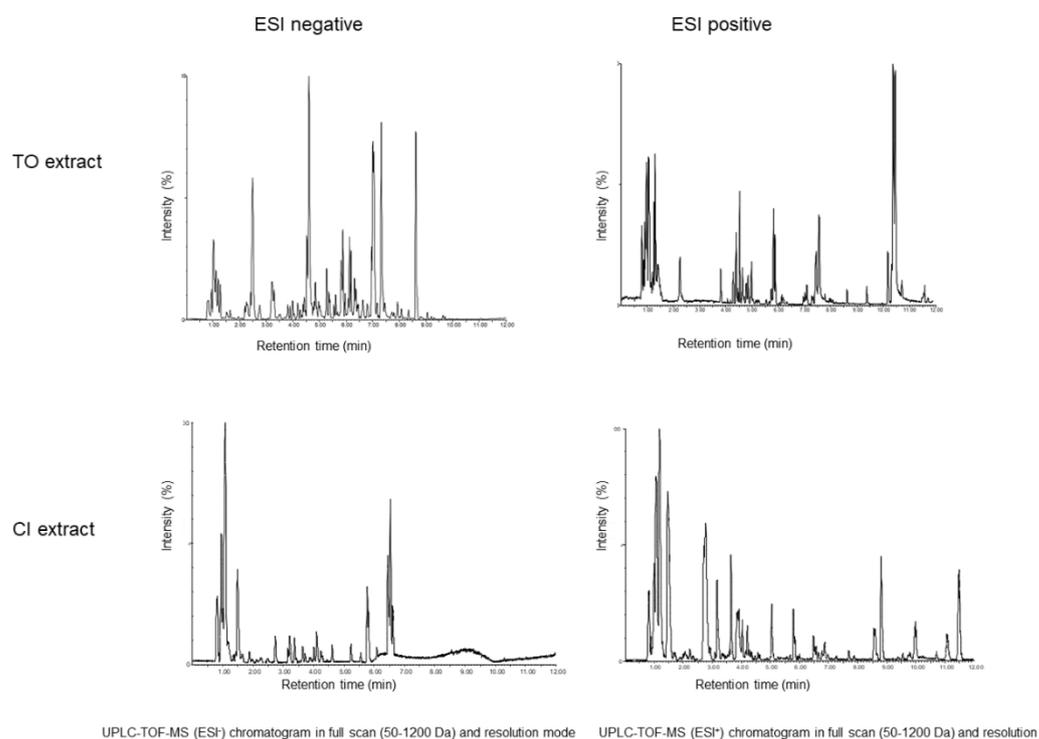
*Il Taraxacum officinale* (L.) Weber ex F.H.Wigg. (tarassaco comune) appartiene alla famiglia delle Asteraceae, sottofamiglia delle Cichorioideae, con molte varietà e microspecie. È un'erba perenne, ampiamente distribuita nelle zone temperate più calde dell'emisfero settentrionale, che abita i campi, i bordi delle strade e i siti rurali. La *T. officinale* viene consumata come alimento, ma anche utilizzata nella fitoterapia europea per le malattie del fegato, della cistifellea e del tratto digestivo o per le malattie reumatiche. Le moderne monografie erboristiche considerano l'uso della pianta sicuro e hanno valutato l'uso empirico di *T. officinale* per i calcoli biliari o le malattie delle vie biliari con esito positivo. Indicazioni terapeutiche per l'uso di

La *T. officinale* è elencata nelle monografie della Commissione tedesca E, della Cooperativa scientifica europea per la fitoterapia (ESCOP) [15,16] e della British Herbal Medicine Association [17]. La pianta contiene un'ampia gamma di sostanze fitochimiche, tra cui terpeni (lattoni sesquiterpenici come l'acido taraxinico e triterpeni), composti fenolici (acidi fenolici, flavonoidi e cumarine) e polisaccaridi [18]. Il composto fenolico preponderante è risultato essere l'acido cicorico (acido dicaffeoiltartarico). Gli altri costituenti sono gli acidi mono- e dicaffeoilchinici, i derivati dell'acido tartarico, i flavoni e i glicosidi flavonolici. Le radici, oltre a queste classi di composti, contengono elevate quantità di inulina [19]. Le forme di dosaggio includono decotti e infusi acquosi, succhi espressi di piante fresche e tinture idroalcoliche, nonché compresse rivestite di estratti essiccati applicate come monopreparati [20] ma anche componenti integrali di rimedi farmaceutici. Lo scopo di questo studio è stato quello di verificare se gli estratti acquosi di foglie di *T. officinale* e i suoi componenti ad alto peso molecolare bloccano l'interazione tra il recettore ACE2 e la proteina spike della SARS-CoV-2.

## 2. Risultati

### 2.1. Analisi chimica dell'estratto di foglie di *T. officinale*

L'impronta digitale basata sulla metabolomica dell'estratto di foglie di *T. officinale* e *Cichorium intybus* L. è stata eseguita mediante analisi UPLC-TOF-MS non mirata (Figura 1) e l'identificazione dei metaboliti putativi è stata effettuata mediante la ricerca nei database di modelli di frammentazione di massa e <sup>MS</sup>e accurati. Per l'annotazione provvisoria sono stati utilizzati FoodDB, Plant Metabolic Network, PlantCyc e Nature Chemistry. Sono stati identificati i composti più abbondanti di questi estratti sia in modalità ioni negativi (ESI-) sia in modalità ioni positivi (ESI+) (Tabelle supplementari S1-S4). I risultati sono principalmente in linea con i rapporti precedenti [18,19,21].

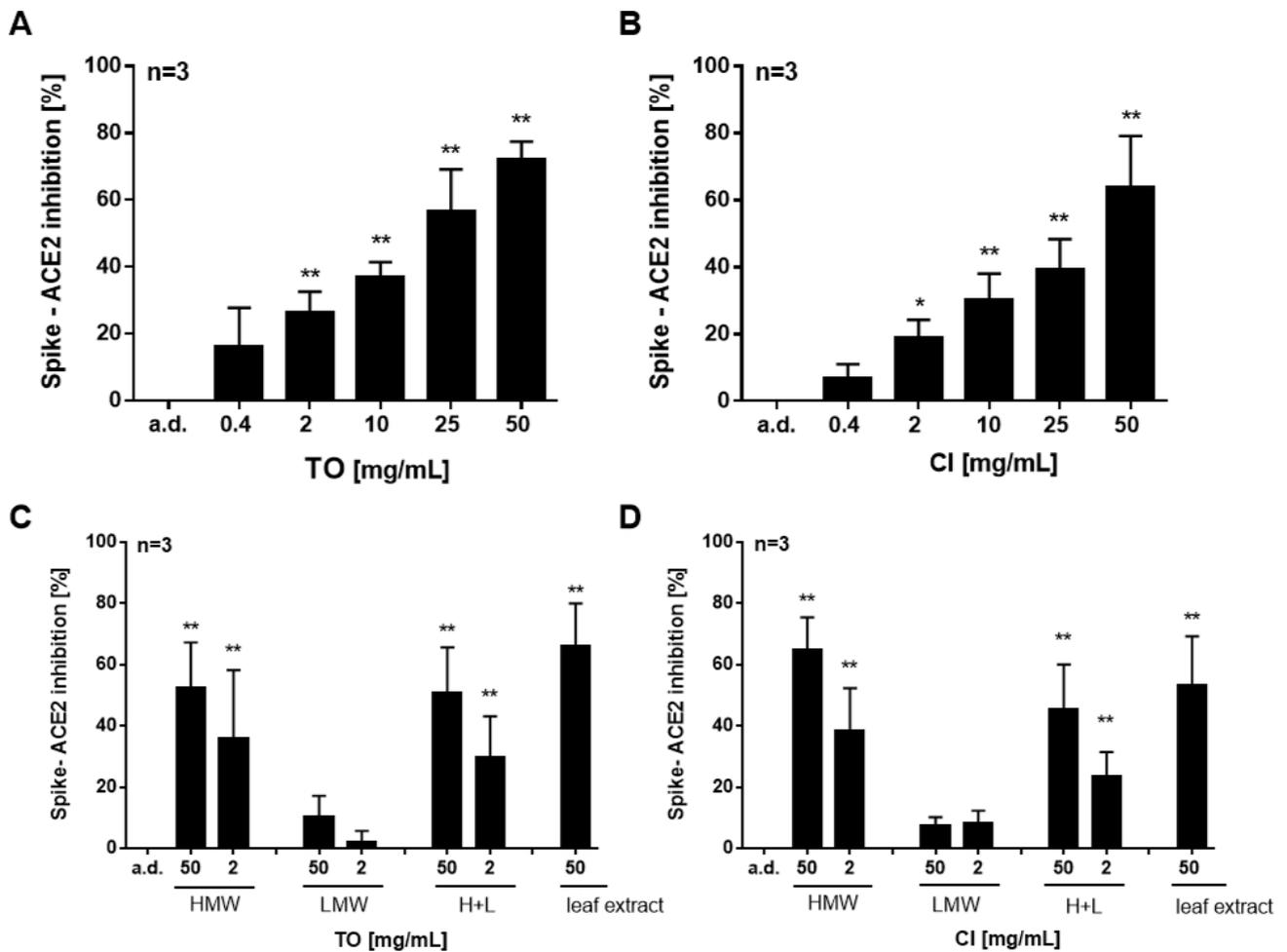


**Figura 1.** Analisi metabolica dell'estratto di foglie di *T. officinale* (TO) e *C. intybus* (CI) mediante UPLC-TOF-MS. Le misurazioni sono state effettuate in modalità ad alta risoluzione con ionizzazione elettrospray negativa (ESI-) e positiva (ESI+).

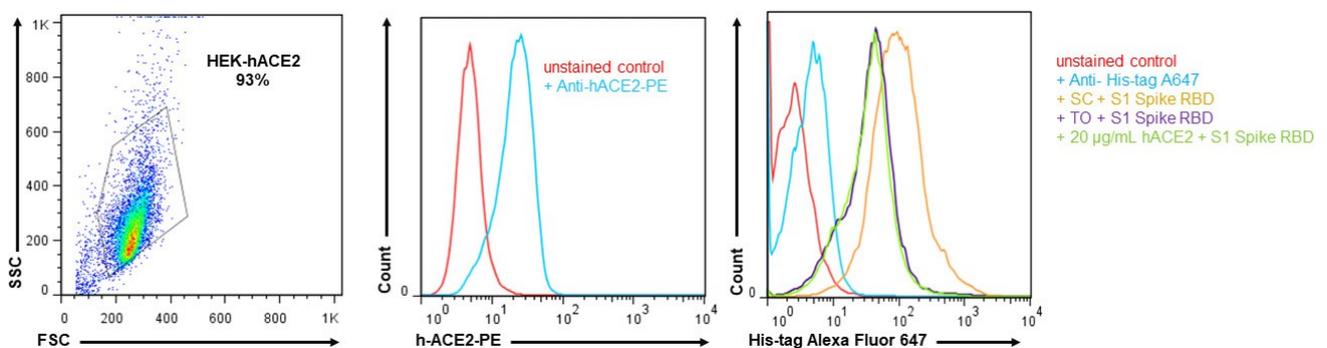
### 2.2. *T. officinale* inibisce il legame RBD-ACE2 di punta

Per prima cosa abbiamo studiato l'inibizione dell'interazione tra la proteina spike RBD del SARS-CoV-2 e l'ACE2 utilizzando estratti di foglie di *T. officinale*. Nella Figura 2A è riportata l'inibizione concentrazione-dipendente del legame Spike S1-ACE2 dopo il trattamento con l'estratto di *T. officinale* ( $EC_{50} = 14,9$  mg/mL). Anche gli estratti di *C. intybus*, un'altra pianta della famiglia delle Asteraceae, hanno mostrato un'inibizione del legame concentrazione-dipendente, ma con minore potenza ( $EC_{50} = 31,4$  mg/mL) (Figura 2B). Abbiamo quindi preparato due frazioni degli estratti, separandole in una frazione ad alto peso molecolare (>5kDa) e una a basso peso molecolare (<5kDa). Come si può vedere dalla Figura 2C-D, i composti bioattivi erano presenti soprattutto nella frazione HMW. Nella frazione LMW è stata osservata solo un'attività minore.

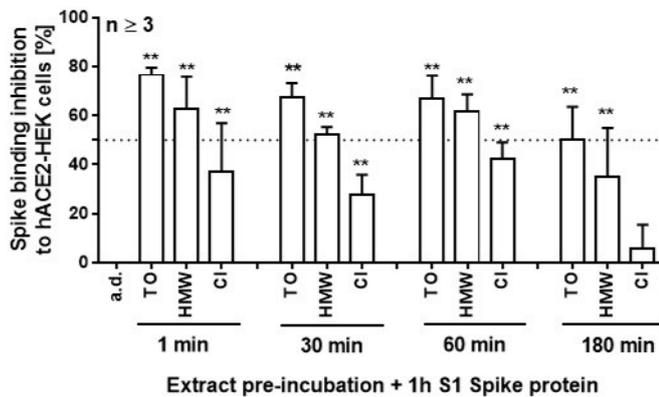
Utilizzando cellule HEK293 che sovraesprimono hACE2, è stato ulteriormente studiato il potenziale degli estratti nel bloccare il legame della spiga alle cellule. Come si evince dalla Figura 3, la pre-incubazione delle cellule con *T. officinale* per un minuto ha bloccato efficacemente il legame della spiga con il  $76,67\% \pm 2,9$  e la sua frazione HMW con il  $62,5 \pm 13,4\%$  rispetto al controllo con acqua. L'estratto di *C. intybus* è stato meno potente; l'inibizione del legame è stata osservata al  $37 \pm 20\%$  dopo 1 minuto.



**Figura 2.** Effetto degli estratti di *T. officinale* e *C. intybus* sull'inibizione di SARS-CoV-2-Spike-ACE 2. (A,B) Effetto dipendente dalla concentrazione degli estratti di *T. officinale* e *C. intybus* (CI). (A,B) Effetto dipendente dalla concentrazione degli estratti di *T. officinale* (TO) e *C. intybus* (CI). (C,D). Effetto delle frazioni dell'estratto di foglie di TO e CI. Gli estratti sono stati liofilizzati e successivamente è stato effettuato un frazionamento del peso molecolare. Il cut-off è stato fissato a 5 kDa (HMW > 5 kDa, LMW < 5kDa). H+L: frazioni HMW e LMW; come riferimento sono stati utilizzati 50 mg di foglie essiccate per mL di acqua. Sono state utilizzate quantità di frazioni HMW e LMW equivalenti alle foglie essiccate. L'inibizione del legame è stata valutata con la tecnica ELISA. Le barre rappresentano le medie + SD. Solvente di controllo: acqua distillata (a.d.); \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . La significatività della differenza è stata calcolata rispetto al controllo con solvente mediante ANOVA a una via.



**Figura 3. Cont.**

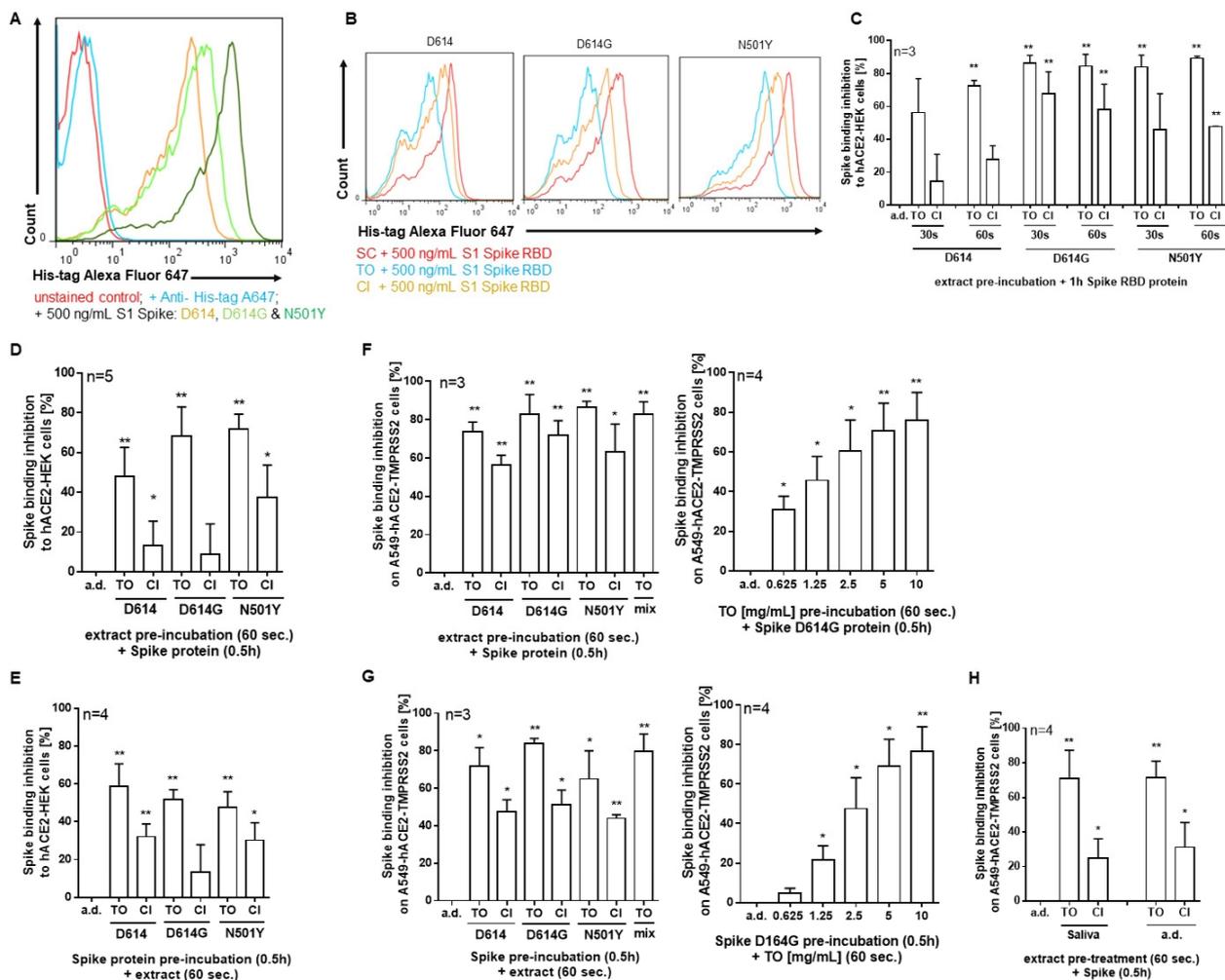


**Figura 3.** Inibizione del legame della proteina S1 spike alle cellule umane HEK293-hACE2 mediante preincubazione con l'estratto. Le cellule sono state pre-incubate per i tempi indicati con 10 mg/mL di *T. officinale* (TO), la sua frazione HMW, pari a 10 mg/mL di estratto (HMW), e 10 mg/mL di *C. intybus* (CI) o controllo con solvente (a.d.) e successivamente trattate con la proteina di picco S1 marcata His per 1 ora senza una fase di lavaggio intermedia a 4 °C. L'inibizione del legame è stata valutata mediante citometria a flusso.  $N = 3$ , le barre sono medie + SD. In alto a sinistra: citogramma di cellule HEK-hACE2 gated. Al centro: sovrapposizione di istogrammi rappresentativi dell'intensità di fluorescenza per l'espressione di superficie di ACE2. In alto a destra: sovrapposizione di istogrammi rappresentativi dell'intensità di fluorescenza per l'inibizione del legame di spike da parte degli estratti o di a.d.; controllo positivo: hACE2 solubile 20 µg/mL. Le cellule sono state colorate con anticorpo monoclonale coniugato anti-His-tag Alexa Fluor 647; \*\*  $p < 0,01$ . La significatività della differenza è stata calcolata rispetto al controllo con solvente mediante ANOVA a una via.

Il trattamento delle cellule con quantità uguali di spike D614 e delle sue varianti D614G e N501Y ha confermato una maggiore affinità di legame della proteina spike D614G (circa 1,5 volte) e N501Y (circa 3-4 volte) rispetto alla proteina spike D614 al recettore di superficie ACE2 delle cellule HEK293 (Figura 4A). Il pretrattamento con *T. officinale* ha bloccato rapidamente (entro 30 s) il legame dello spike al recettore di superficie dell'ACE2 (Figura 4B,C). Dopo 30 s, l'inibizione del legame con l'estratto di *T. officinale* era del  $58,2 \pm 28,7\%$  per D614, dell' $88,2 \pm 4,6\%$  per D614G e dell' $88 \pm 1,3\%$  per N501Y. Anche se per l'estratto di *C. intybus* è stata riscontrata un'inibizione del legame con la spiga, questa era inferiore di circa il 30-70% rispetto a *T. officinale*, a seconda della proteina della spiga analizzata. Quando il legame è stato studiato a 37 °C invece che a 4 °C, i risultati sono stati comparabili per *T. officinale*, ma ancora più deboli per l'estratto di *C. intybus* in questa linea cellulare (Figura 4D). Ci siamo anche chiesti se gli estratti potessero sostituire il legame del picco con il recettore di superficie dell'ACE2 nelle cellule umane. A tale scopo, abbiamo prima incubato le cellule con la proteina spike D614, D614G o N501Y e successivamente con gli estratti. Come si vede nella Figura 4D, *T. officinale* è stato in grado di rimuovere potentemente lo spike dal recettore (in media il 50%); *C. intybus* è stato molto più debole (in media il 25%). Abbiamo esteso i nostri esperimenti alle cellule umane A549-hACE2-TMPRSS2 e abbiamo potuto confermare i risultati osservati nelle cellule HEK293-hACE2 per *T. officinale* (Figura 4D-G). Questa linea cellulare è stata trasfettata in modo stabile con entrambi i geni ACE2 e TMPRSS2 umani e, curiosamente, in questo caso l'estratto di *C. intybus* è risultato più efficace rispetto alle cellule HEK-hACE2. Dopo il pretrattamento con l'estratto, l'inibizione del legame di spike alle cellule è stata compresa tra il  $73,5\% \pm 5,2$  (D614) e l' $86,3\% \pm 3,23$  (N501Y) per l'estratto di *T. officinale* e tra il  $56,1\% \pm 5,28$  (D614) e il  $63,07\% \pm 14,55$  (N501Y) per l'estratto di *C. intybus*. Già a 0,6 mg/mL, *T. officinale* ha bloccato significativamente il legame con la proteina spike D614G di circa il 40% (IC50 = 1,73 mg/mL). Quando le cellule sono state pre-incubate con la proteina spike prima del trattamento con l'estratto, i risultati sono stati comparabili per l'estratto di *T. officinale* per D614 e D614G, ma leggermente inferiori per N501Y (Figura 4C,D). Inoltre, in questo contesto, è stata testata una miscela di mutanti del picco N501Y, K417N e E484K; anche in questo caso, l'estratto di *T. officinale* ha bloccato il legame dell' $82,97\% \pm 6,31$  (estratto prima dell'incubazione) e del  $79,7\% \pm 9,15$  (estratto dopo l'incubazione). Gli estratti, incubati nella saliva umana per 30 minuti a 37 °C prima del trattamento cellulare, hanno avuto effetti comparabili sull'inibizione dello spike D614G (Figura 4H), indicando

---

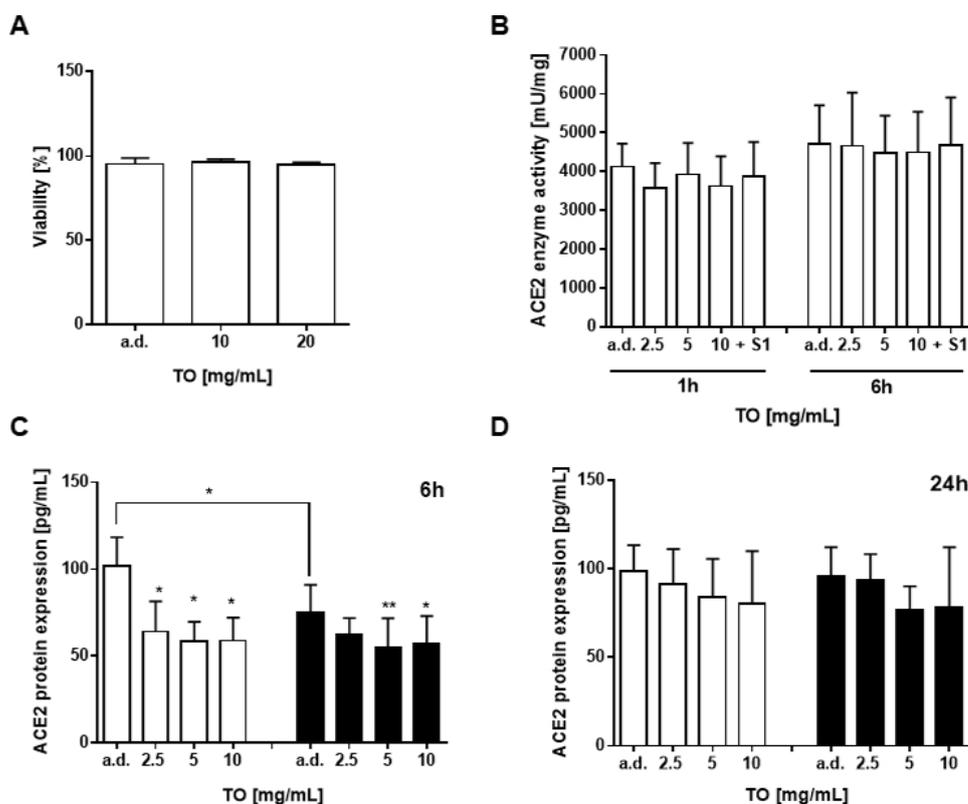
una buona stabilità dei composti bioattivi nella saliva.



**Figura 4.** Inibizione del legame dello spike D614 e dei suoi mutanti D614G, N501Y o mix (N501Y, K417N e E484K) alle cellule umane HEK293-hACE2 e A549-hACE2-TMPRSS2 mediante estratto prima o dopo l'incubazione. Sovrapposizione dell'istogramma dell'intensità di fluorescenza per (A) cellule HEK non colorate, controllo della colorazione (anti-His-tag Alexa Fluor 647) e cellule incubate con spike D614, D614G o N501Y marcati con His-tag per 1 ora a 4 °C. (B,C) cellule pre-incubate con controllo con solvente (a.d.), 10 mg/mL *T. officinale* (TO) o 10 mg/mL di *C. intybus* (CI) per 30-60 s, e poi trattate con proteine S1 spike D614, D614G o N501Y marcate con His-tag per 1 ora senza una fase di lavaggio intermedia a 4 °C. (D-G) Effetto dell'incubazione dell'estratto su cellule HEK o A549 prima o dopo l'incubazione con proteine spike D614, D614G, N501Y o mix (N501Y, K417N e E484K) marcate con His-tag a 37 °C. (H) Gli estratti vegetali sono stati incubati nella saliva di quattro donatori umani per 0,5 ore a 37 °C. Successivamente, le cellule sono state pretrattate con 5 mg/mL di estratti per 60 s a 37 °C prima dell'incubazione con la proteina spike D614 marcata con His-tag per 0,5 h a 37 °C. L'inibizione del legame dello spike con le cellule umane è stata valutata mediante analisi citometrica a flusso di cellule colorate con anticorpo monoclonale coniugato anti-His-tag Alexa Fluor 647. Le barre rappresentano le medie + SD; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . La significatività della differenza è stata calcolata rispetto al rispettivo spike controllo con solvente mediante ANOVA a una via.

### 2.3. *T. officinale* non interferisce con l'attività dell'enzima ACE2

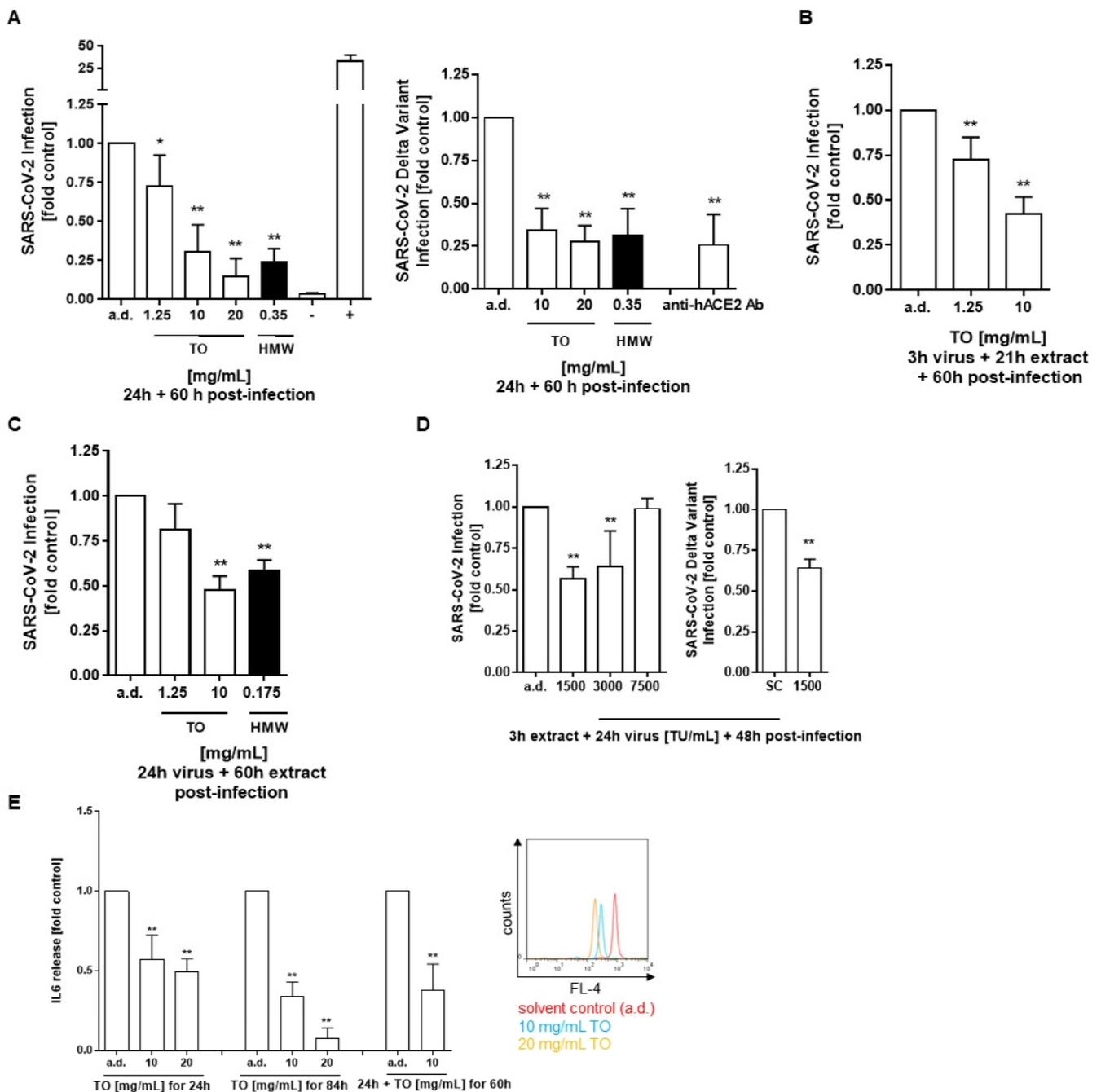
Per verificare se l'estratto di *T. officinale* interferisce con l'attività catalitica del recettore ACE2 o influisce sull'espressione della proteina ACE2, abbiamo trattato le cellule A549-hACE2-TMPRSS2 con l'estratto per 1-24 h prima della lisi cellulare e della rilevazione. Non è stata osservata alcuna perdita di vitalità cellulare dopo l'esposizione dell'estratto alle cellule per 84 h (Figura 5A). Non è stata rilevata alcuna riduzione dell'attività enzimatica dopo 1 o 24 ore (Figura 5B). Lo spike ha significativamente ridotto la proteina ACE2 dopo 6 ore (Figura 5C, barre nere), e questo è stato vero anche per l'estratto, sia da solo (Figura 5C, barre bianche) che in combinazione con lo spike (barre nere). Dopo 24 ore, questo effetto è stato abolito (Figura 5D).



**Figura 5.** Effetto dell'estratto di *T. officinale* sull'attività enzimatica e sull'espressione proteica dell'ACE2. (A) La vitalità delle cellule A549-hACE2-TMPRSS2 è stata determinata mediante colorazione cellulare con blu di tripan dopo 84 ore di esposizione all'estratto. (B) Le cellule sono state incubate con l'estratto TO o con 500 ng/mL di proteina S1 e analizzate per l'attività enzimatica con un kit di fluorescenza. (C,D) Le cellule sono state esposte per 6 h o 24 h all'estratto senza (barre bianche) o con (barre nere) 500 ng/mL di proteina S1 e analizzate per l'espressione della proteina ACE2 utilizzando un kit ELISA ACE2 umano; a.d.: controllo con solvente. Le barre rappresentano le medie + SD,  $N \geq 3$  esperimenti indipendenti; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . La significatività della differenza è stata calcolata rispetto al rispettivo controllo mediante ANOVA a una via.

#### 2.4. *T. officinale* blocca la trasduzione di lentivirus pseudotipizzati SARS-CoV-2 Spike D614 e Spike Delta (B.1.617.2)

Utilizzando un lentivirus pseudotipato SARS-CoV-2 spike D614 e spike Delta (B.1.617.2), abbiamo quindi studiato se l'estratto potesse bloccare l'ingresso del virus attraverso l'inibizione dello spike. Quando è stato pretrattato con l'estratto, la trasduzione del virus spike D614 è diminuita di circa l'85% a 20 mg/mL, che era nell'intervallo di inibizione osservato da 0,35 mg/mL dell'estratto HMW (Figura 6A, a sinistra). Come mostrato nella Figura 6A (a destra), è stata osservata una sostanziale riduzione dell'infezione da pseudovirus della variante Delta delle cellule polmonari anche in seguito al trattamento con estratti di *T. officinale* o con l'estratto HMW (72% a 20 mg/mL e 69% a 0,35 mg/mL, rispettivamente). L'anticorpo anti-hACE2, utilizzato come riferimento, ha bloccato la trasduzione del virus del 74% a 100  $\mu\text{g/mL}$ .



**Figura 6.** Inibizione della trasduzione virale delle cellule A549-hACE2-TMPRSS2 da parte dell'estratto di *T. officinale*. (A) Le cellule sono state pretrattate con

*T. officinale* (TO) o estratto HMW per 0,5 h prima dell'infezione con 7500 TU/mL SARS-CoV-2 spike D614 o variante Delta (B.1.617.2) per 24 h; (B,C) Le cellule sono state trasdotte con 7500 TU/mL di SARS-CoV-2 per (B) 3 h prima dell'aggiunta di TO per altre 21 h o (C) 24 h. Dopo la trasduzione, il terreno è stato scambiato con terreno fresco contenente TO o estratto HMW alle concentrazioni indicate e post-incubato per 60 h. (D) Le cellule sono state pretrattate con 40 mg/mL di TO per 3 h prima della trasduzione con il titolo virale indicato per 24 h. Successivamente, il terreno è stato scambiato con terreno fresco e incubato per altre 48 h. La luminescenza è stata quindi rilevata entro 1 h. 0,35 mg/mL di estratto HMW equivale a 20 mg/mL di estratto TO. Controllo di trasduzione: (-) controllo negativo: pseudovirione lentivirale calvo; (+) controllo positivo: lentivirus firefly luciferasi; controllo positivo dell'inibitore: anticorpo anti-hACE2 100 µg/mL. (E) L'analisi della secrezione delle citochine pro-infiammatorie IL-6 è stata effettuata dopo 24 ore di trasduzione del virus insieme all'estratto (a sinistra), dopo 24 ore + 60 ore di post-infezione con l'estratto (al centro) o dopo 60 ore di post-infezione con l'estratto (a destra) utilizzando l'analisi citometrica a flusso multiplexing. Solvente di controllo: acqua distillata (a.d.). N ≥ 3 esperimenti indipendenti; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . La significatività della differenza è stata calcolata rispetto al controllo con solvente mediante ANOVA a una via.

Per indagare su quale fase dell'infezione da pseudovirus SARS-CoV-2 fosse mirata dall'estratto, abbiamo trattato le cellule in diversi momenti, come prima (pre-trattamento), durante (co-trattamento) o dopo (post-trattamento) l'infezione virale. Nelle diverse condizioni di trattamento, il segnale luminescente prodotto dalla trasduzione del virus spike D614 è stato inibito con 10 mg/mL di estratto del 70%  $\pm$  16,7 (A), del 58%  $\pm$  9,6 (B) e del 53%  $\pm$  8,1 (C). Inoltre, abbiamo esaminato l'efficacia della prevenzione dell'infezione nelle cellule senza post-infezione. Dalla Figura 6D si evince che, a seconda della carica virale iniziale, l'infezione è diminuita del 43% a 1500 TU/mL e del 35% a 3000 TU/mL, mentre la variazione è stata minima a 7500 TU/mL. L'estratto vegetale ha raggiunto un'inibizione del 36% nelle cellule trasdotte con la variante SARS-CoV-2 spike Delta a 1500 TU/mL (Figura 6D, a destra). L'inibizione della trasduzione del virus da parte dell'estratto ha coinciso con una significativa soppressione della risposta infiammatoria innescata dal virus, determinata dalla diminuzione della secrezione della citochina pro-infiammatoria IL-6 nelle cellule A549-hACE2-TMPRSS2 (Figura 6E).

### 3. Discussione

Lo sviluppo di strategie di prevenzione e trattamento efficaci per le infezioni da SARS-CoV-2 rimane una sfida, poiché emergono nuove varianti che probabilmente sono più contagiose e in grado di sfuggire al sistema immunitario. Sebbene i primi vaccini abbiano ricevuto l'autorizzazione al commercio, permangono problemi di distribuzione e preoccupazioni sull'efficacia a lungo termine e sul rischio di reinfezione [22]. Sono già state segnalate infezioni da rottura del vaccino, in particolare la trasmissione con la variante Delta [9,11,12]. Ciò suggerisce un potenziale declino dell'effetto protettivo dei vaccini contro le infezioni da Sars-CoV-2 [23,24]. Le infezioni successive possono, tuttavia, essere più lievi della prima. Le vaccinazioni di richiamo per aumentare la risposta immunitaria possono essere la strategia migliore per ridurre il rischio. Oltre alla vaccinazione, il blocco dell'accessibilità del virus all'ACE2 legato alla membrana, recettore primario per l'ingresso nelle cellule bersaglio del SARS-CoV-2, rappresenta una strategia alternativa per la prevenzione della COVID-19. Esistono diversi approcci [25], ma naturalmente ognuna di queste strategie di trattamento presenta sfide fondamentali e traslazionali che devono essere superate per l'utilità clinica. Gli ostacoli tecnici includono il potenziale off-target, gli effetti indipendenti dall'ACE2, la stabilità o la tossicità [25]. I composti di origine naturale potrebbero essere una risorsa importante in questo senso, poiché sono già stati ben descritti e molti di essi sono stati ritenuti sicuri. Sebbene gli esperimenti di docking in silico abbiano suggerito diversi composti naturali comuni come inibitori dell'ACE2, per la maggior parte di essi non è stata finora dimostrata l'inibizione del legame con l'ACE2, il che potrebbe essere spiegato dalla mancanza di una copertura completa dei residui di legame dell'ACE2 da parte dei composti [26]. Tuttavia, per la glicirrizina, la nobiletina e la neoesperidina, il legame con l'ACE2 cade parzialmente all'interno della regione di contatto RBD e quindi è stato proposto di bloccare ulteriormente il legame di spike con l'ACE2 [20]. Lo stesso vale per gli inibitori sintetici dell'ACE2, come la *N*-(2-amminoetil)-1 aziridina-etanamina [27]. Al contrario, l'antibiotico lipoglicopeptidico dalbavancina è stato identificato sia come legante dell'ACE2 che come inibitore dello spike-ACE2 del SARS-CoV-2 [28]; l'infezione da SARS-CoV-2 è stata efficacemente inibita da questo composto sia nel topo che nel macaco rhesus. Inoltre, con un estratto idroalcolico di buccia di melograno, il blocco dell'interazione spike-ACE2 è stato dimostrato al 74%, per i suoi costituenti principali punicalagina al 64% e acido ellagico al 36%. Utilizzando un'infezione da lentivirus pseudotipato SARS-CoV-2 su cellule umane di rene-2, l'ingresso del virus è stato poi efficacemente bloccato dall'estratto di buccia [29]. Nel presente studio, abbiamo potuto dimostrare una potente inibizione della proteina ACE2-spike S1 RBD da parte degli estratti di *T. officinale* utilizzando un test libero da cellule e abbiamo confermato questo risultato dimostrando un'efficiente inibizione del legame con la superficie cellulare di ACE2 in due linee cellulari umane. Abbiamo osservato un legame più forte delle varianti D614G e N501Y al recettore di superficie dell'ACE2 delle cellule umane, ma tutte le varianti testate sono risultate sensibili all'inibizione del legame da parte del *T. officinale*, sia usato prima dell'esposizione alla proteina spike che dopo. Ad oggi, diversi studi indicano che la linea virale D614G è più infettiva del virus D614 [30]. Inoltre, la presenza di

---

mutazioni caratteristiche come N501Y determina una maggiore infettività rispetto al ceppo parentale, che potrebbe essere dovuta a una maggiore affinità di legame tra la proteina spike e l'ACE2 [31]. Pertanto, i nostri risultati sugli estratti di *T. officinale*

potrebbe essere importante, poiché con la progressione della pandemia emergeranno nuove varianti virali potenzialmente preoccupanti che potrebbero anche ridurre l'efficacia di alcuni vaccini o causare un aumento dei tassi di reinfezione. Come già accennato, un problema nello sviluppo di prodotti come la profilassi per l'infezione da SARS-CoV-2 o per rallentare la diffusione sistemica del virus è la selettività verso l'intrusione del virus con una bassa tossicità necessaria per l'ospite. Per le attuali indicazioni mediche, non sono stati riportati casi di sovradosaggio da *T. officinale* [15,17,20]. La dose raccomandata è di 4-10 g (circa 20-30 mg per mL di acqua calda) fino a tre volte al giorno (Commissione E e ESCOP). In base alle informazioni fornite dall'Agenzia Europea dei Medicinali, le controindicazioni all'uso di *T. officinale* sono l'ipersensibilità alla famiglia delle Asteraceae o ai loro composti attivi, le malattie del fegato e delle vie biliari, tra cui l'ostruzione del dotto biliare, i calcoli biliari e la colangite, o l'ulcera peptica attiva [20]. La pianta è una fonte significativa di potassio [32] e quindi viene data un'avvertenza a causa del possibile rischio di iperkaliemia. L'uso nei bambini di età inferiore ai 12 anni o durante la gravidanza e l'allattamento non è stato stabilito per mancanza di dati adeguati o sufficienti.

Mentre l'attività enzimatica dell'ACE2 non è stata influenzata dall'estratto di *T. officinale* nel presente studio, la proteina ACE2 è stata transitoriamente downregolata nella linea cellulare polmonare ACE2-sovrapposta. L'ACE2 svolge un ruolo chiave nell'infezione da SARS-CoV-2, quindi la riduzione dei livelli di ACE2 potrebbe teoricamente fornire una certa protezione iniziale [33]. Tuttavia, ciò potrebbe anche influire su importanti funzioni fisiologiche delle cellule. L'ACE2 è un'importante monocarbossipeptidasi zinco-dipendente della via renina-angiotensina, fondamentale per l'impatto sui sistemi cardiovascolare e immunitario. L'alterazione dell'equilibrio angiotensina II/angiotensina-(1-7), dovuta all'inibizione dell'attività enzimatica dell'ACE2 o alla diminuzione della sua proteina e alla presenza di una maggiore quantità di angiotensina II nel sistema, è riconosciuta come in grado di promuovere il danno polmonare nel contesto della malattia COVID-19 [34]. Pertanto, questa osservazione richiede maggiore attenzione negli studi in corso.

Si potrebbe ipotizzare che il polmone sia il bersaglio primario di interesse, ma l'mRNA e l'espressione proteica dell'ACE2 sono stati riscontrati nelle cellule epiteliali di tutti i tessuti orali, in particolare nella mucosa buccale, nel labbro e nella lingua [35]. Questi dati concordano con l'osservazione di una carica virale salivare molto elevata nei pazienti infettati da SARS-CoV-2 [36,37]. In quanto parte essenziale del tratto aerodigestivo superiore, si ritiene che la cavità orale svolga un ruolo fondamentale nella trasmissione e nella patogenicità del SARS-CoV-2. È molto probabile che la prevenzione della colonizzazione virale a livello della mucosa orale e faringea possa essere fondamentale per evitare un'ulteriore infezione ad altri organi e l'insorgenza della COVID-19 [38]. È stato quindi suggerito che i collutori virucidi commerciali, primo fra tutti il povidone-iodio, possano potenzialmente ridurre la carica virale della SARS-CoV-2 nelle persone infette [39,40], ma ad oggi non esistono studi clinici significativi [40]. Bloccare il legame del virus SARS-CoV-2 con le cellule del cavo orale con estratti di *T. officinale* potrebbe essere tollerabile per un consumatore, se necessario solo per periodi di tempo limitati (ad esempio, l'applicazione del prodotto dopo il contatto con persone infette o durante l'infezione). Esperimenti in vitro più rilevanti dal punto di vista fisiologico, da noi condotti, hanno dimostrato che solo brevi tempi di contatto con l'estratto di *T. officinale* sono necessari per bloccare efficacemente il legame dello spike di SARS-CoV-2 o per rimuovere lo spike già legato dalla superficie cellulare. Un'ulteriore prova della sua rilevanza è stata fornita dalla dimostrazione di un'efficace protezione del *T. officinale* contro l'infezione di cellule polmonari umane da parte dello spike D614 del SARS-CoV-2 e della variante Delta del virus pseudotipato. L'uso di virus pseudotipati non ci permette di valutare il contributo delle proprietà del virione, come le proteine di membrana o dell'involucro, al tropismo cellulare [35]. Tuttavia, i dati relativi agli pseudovirus sono considerati uno strumento utile per documentare l'importanza di ACE2 nelle fasi di ingresso nelle cellule mediate dalle proteine spike.

#### 4. Materiali e metodi

##### 4.1. Materiale vegetale

---

Lo studio è stato condotto utilizzando foglie essiccate di *T. officinale* (vom Achterhof, Uplengen, Germania; lotto n. 37259, B370244 e P351756). *C. intybus* è stato acquistato da Naturideen (Germania).

#### 4.2. Estrazione delle piante

Il materiale vegetale essiccato è stato pesato in una fiala di vetro ambrato (Carl Roth GmbH, Germania) e mescolato con acqua di grado HPLC (a.d.), a temperatura ambiente (RT). Gli estratti sono stati quindi incubati per 1 ora e centrifugati a 16.000 g (3 min, RT). Il surnatante è stato filtrato (0,22 µm) prima di essere utilizzato per gli esperimenti.

#### 4.3. Cromatografia liquida ad alta prestazione (UPLC)-Time-of-Flight (TOF)-Spettrometria di massa

Gli spettri di massa ad alta risoluzione sono stati registrati su uno spettrometro di massa Waters Synapt G2-S HDMS (Waters, Manchester, Regno Unito) accoppiato a un sistema Acquity UPLC core (Waters, Milford, MA, USA) composto da un gestore di solventi binari, un gestore di campioni e un forno per colonne. Per lo screening degli estratti, aliquote (5 µL) di tutti i campioni sono state iniettate nel sistema UPLC- TOF-MS utilizzando una colonna BEH C18 (150 mm × 2,1 mm, 1,7 µm, Waters), operata a una velocità di flusso di 0,4 mL/min a 45 °C. La separazione cromatografica è stata effettuata con un gradiente di acido formico acquoso (0,1%, A) e acetonitrile (0,1%, B). Il gradiente è iniziato con una miscela all'1% di B ed è stato mantenuto isocratico per 1 minuto, quindi è stato aumentato al 100% di B entro 9 minuti e mantenuto al 100% di B per un ulteriore minuto. Le misure sono state eseguite in modalità ad alta risoluzione con ionizzazione elettrospray negativa (ESI-) e positiva (ESI+). I parametri della sorgente ionica erano i seguenti: tensione del capillare +2,5 kV (ESI+) o -2,5 kV (ESI-), cono di campionamento 50 V, offset della sorgente 30 V, temperatura della sorgente 150 °C, desolvatazione temperatura 450 °C, gas del cono 2 L/h, flusso di gas del nebulizzatore 6,5 bar e gas di desolvatazione 850 L/h. L'elaborazione dei dati è stata gestita con MassLynx 4.1 (Waters) e Progenesis QI (Waters).

#### 4.4. Linee cellulari e condizioni di coltura

Le cellule di rene embrionale umano 293 (HEK293), che esprimono stabilmente hACE2, sono state fornite dal Prof. Dr. Stefan Pöhlmann (Göttingen, Germania). Le cellule sono state mantenute in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), ad alto contenuto di glucosio, integrato con 10% di siero fetale bovino (FBS), 100 U/mL di penicillina/streptomina e 50 µg/mL di zeocina (Life Technologies, Darmstadt, Germania). Le cellule umane A549-hACE2-TMPRSS2, generate dalla linea cellulare polmonare umana A549, sono state acquistate da InvivoGen SAS (Toulouse Cedex 4, Francia) e mantenute in DMEM, ad alto contenuto di glucosio, integrato con il 10% di FBS inattivato a caldo, 100 U/mL di penicillina/streptomina e 100 µg/mL di normocina, 0,5 µg/mL di puomicina e 300 µg/mL di igromicina. Per la subcoltura, tutte le cellule sono state prima risciacquate con soluzione salina tamponata con fosfato (PBS) e poi incubate con tripsina-EDTA allo 0,25% fino al distacco. Tutte le cellule sono state coltivate a 37 °C in un incubatore umidificato con atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub>/95% di aria.

#### 4.5. Analisi dell'inibizione dell'interazione SARS-CoV-2 Spike-ACE2 mediante ELISA e citometria a flusso

Per la rilevazione dell'inibizione dell'interazione SARS-CoV-2 Spike-ACE2 è stato utilizzato un kit di screening degli inibitori della SARS-CoV-2 disponibile in commercio (Cat#: 16605302, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Germania). Questo saggio ELISA colorimetrico misura il legame tra la proteina RBD dello spike SARS-CoV-2 immobilizzata e la proteina ACE2 umana biotinilata. La rilevazione colorimetrica viene effettuata utilizzando streptavidina-HRP seguita da incubazione con TMB. Un inibitore del SARS-CoV-2 (hACE2) è stato utilizzato come riferimento verificato del metodo. La percentuale di inibizione è stata calcolata rispetto al controllo con solvente (acqua distillata, a.d.).

L'espressione della superficie cellulare di ACE2 è stata determinata utilizzando un anticorpo umano coniugato con ACE2 PE (Bio-Techne GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Germania) e l'analisi citometrica a flusso. Per l'analisi del legame SARS-CoV-2 S1 Spike RBD-ACE2,  $2 \times 10^5$  cellule ( $5 \times 10^6$  cellule/mL) sono state pretrattate con estratti vegetali per diversi periodi di tempo. Quindi, 500 ng/mL di SARS-CoV-2 Spike S1 (Trenzyme GmbH, Konstanz,

Germania), spike S1 D614G, N50Y o una miscela di proteine ricombinanti K417N, E484K e N501Y (Sino Biological Europe GmbH, Eschborn, Germania) sono stati aggiunti a ciascun campione e i campioni sono stati ulteriormente incubati per 30-60 minuti. In un'altra impostazione, le cellule sono state pre-trattate con 500 ng/mL di proteina ricombinante SARS-CoV-2 Spike-His per 30 minuti prima dell'incubazione con l'estratto di pianta per

30-60 s a 4 °C o 37 °C. I campioni sono stati incubati in tampone PBS contenente il 5% di FBS. Le cellule sono state quindi lavate una volta con tampone PBS contenente l'1% di FBS a 500g, 5 minuti prima della colorazione con His-tag A647 mAb (Bio-Techne GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Germania) per 30 minuti a RT. Successivamente, le cellule sono state lavate due volte come descritto sopra. Le cellule sono state analizzate con un FACSCalibur (BD Biosciences, Heidelberg, Germania); sono stati acquisiti 10.000 eventi. L'intensità di fluorescenza mediana (MFI) di ciascun campione è stata determinata utilizzando il software FlowJo (Ashland, OR, USA). La % di inibizione del legame dei picchi è stata calcolata rispetto al controllo con solvente (acqua distillata, a.d.).

#### 4.6. Attività enzimatica dell'ACE2 umano e quantificazione della proteina

Le cellule A549-hACE2-TMPRSS2 ( $2 \times 10^5$ ) sono state seminate in una piastra a 24 pozzetti in terreno DMEM ad alto contenuto di glucosio, contenente il 10% di FBS inattivato a caldo, a 37 °C, 5% di CO<sub>2</sub>. Le cellule sono state poi trattate con l'estratto di *T. officinale* con/senza 500 ng/mL di proteina SARS-CoV-2 S1 Spike RBD per 1-24 h. Successivamente, le cellule sono state lavate con PBS e lisate. 25 µg di proteine sono stati utilizzati per la quantificazione della proteina ACE2 (kit ACE2 ELISA), 5 µg per l'attività enzimatica dell'ACE2 (ACE2 activity assay kit, Abcam, Cambridge, UK) secondo le istruzioni del produttore.

#### 4.7. Infezione di cellule A549-hACE2-TMPRSS2 con SARS-CoV-2 Spike D614 e variante Delta (B.1.617.2) di lentivirus pseudotipati

Le particelle di lentivirus pseudotipate SARS-CoV-2 spike D614 e variante Delta, prodotte con lo spike SARS-CoV-2 e lo spike SARS-CoV-2 B.1.617.2 variante (Accessione Genbank #QHD43416.1) come glicoproteine dell'envelope invece del comunemente usato VSV-G, sono state acquistate da BPS Bioscience, (Catalogo # 79942 e Catalogo #78215, rispettivamente, Biomol, Amburgo, Germania). Questi pseudovirioni contengono anche il gene della lucciola luciferasi guidato da un promotore CMV. In questo modo, l'ingresso cellulare mediato da spike può essere quantificato attraverso l'attività di reporter della luciferasi. Lo pseudovirione lentivirale bald (BPS Bioscience #79943), in cui non è espressa alcuna glicoproteina dell'envelope, è stato utilizzato come controllo negativo. Il lentivirus della lucciola luciferasi (Puromicina) di BPS Bioscience (catalogo n. 79692-P) è stato utilizzato come controllo positivo per la trasduzione. Questi virus esprimono costitutivamente la lucciola luciferasi sotto un promotore CMV. L'anticorpo anti-HACE2 (Biomol, NSJ-F49433) è stato usato come riferimento per il saggio di inibizione della trasduzione. Le cellule polmonari sono state seminate a  $1 \times 10^5$  cellule/cm<sup>2</sup> in una piastra a 96 pozzetti in DMEM contenente il 10% di FBS inattivato termicamente, 100 U/mL di penicillina/streptomina, 100 µg/mL di normocina, 0,5 µg/mL di puromicina e 300 µg/mL di igromicina e lasciate per una notte. Il terreno è stato sostituito con DMEM contenente il 10% di FBS inattivato a caldo e le cellule sono state pre-trattate con l'estratto di *T. officinale* in diversi momenti prima di aggiungere le particelle di lentivirus o viceversa. Dopo 24 ore di incubazione delle particelle virali, il terreno è stato rimosso mediante lavaggio con PBS, è stato aggiunto terreno fresco e le cellule sono state post-trasdotte con/senza l'aggiunta dell'estratto di *T. officinale*. La luminescenza è stata rilevata entro 1 ora utilizzando il reagente per luciferasi one-step di BPS seguendo il protocollo del produttore in un lettore multipiastra di Tecan (Tecan Group Ltd., Crailsheim, Germania); controllo del solvente: acqua distillata al 10% (a.d.).

#### 4.8. Quantificazione del rilascio di citochine con la tecnica delle microsferi Multiplex

Dopo 24 ore di trasduzione di lentivirus pseudotipati SARS-CoV-2 spike e 60 ore dopo l'infezione delle cellule A549-hACE2-TMPRSS2, i surnatanti sono stati raccolti e conservati a -80 °C fino all'analisi della secrezione di citochine utilizzando il kit di citochine umane MACSplex (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germania) secondo il protocollo del produttore. Le citochine al di sotto del limite di rilevazione di 3,2 pg/mL non sono state incluse nell'analisi.

#### 4.9. Frazionamento del peso molecolare da estratti vegetali

Gli estratti di foglie essiccate sono stati preparati aggiungendo acqua bidistillata (5

mL) al materiale vegetale (500 mg ciascuno). I campioni sono stati incubati al buio a temperatura ambiente (RT) per 60 minuti, seguiti da centrifugazione a 16.000 g per 3 minuti. I surnatanti sono stati raccolti e filtrati su membrana (0,45  $\mu\text{m}$ ), ottenendo gli estratti. Aliquote sono state liofilizzate per 48 ore per determinarne la resa in peso. Gli estratti sono stati poi ulteriormente separati

in una frazione ad alto peso molecolare (HMW) e in una a basso peso molecolare (LMW), utilizzando una provetta per centrifugazione con un inserto contenente un filtro di taglio del peso molecolare (5 kDa, Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Germania). Ogni frazione HMW è stata purificata mediante lavaggio con 20 mL di acqua, ottenendo le frazioni HMW e LMW. Le frazioni sono state liofilizzate, la loro resa è stata determinata in base al peso e conservata a -20 °C fino al momento dell'uso.

#### 4.10. Determinazione della vitalità cellulare mediante colorazione con Trypan Blue

La vitalità cellulare è stata valutata utilizzando il test di esclusione del colorante blu di tripan come descritto in precedenza [41]. In breve, le cellule A549-hACE2-TMPRSS2 sono state coltivate per 24 ore e poi esposte agli estratti o al controllo con solvente (a.d.) per 84 ore.

#### 4.11. Analisi statistica

I risultati sono stati analizzati con il software GraphPad Prism 6.0 (La Jolla, CA, USA). I dati sono presentati come medie +SD. La significatività statistica è stata determinata mediante il test ANOVA a una via seguito dalla correzione di Bonferroni. I valori  $p < 0,05$  (\*) sono stati considerati statisticamente significativi e  $< 0,01$  (\*\*\*) sono stati considerati altamente significativi.

## 5. Conclusioni

I candidati vaccini sviluppati mirano tutti a generare risposte anticorpali (e di cellule T) contro la proteina spike e le sequenze spike del ceppo iniziale di Wuhan sono servite come base [42]. Tuttavia, il SARS-CoV-2 muta costantemente durante la trasmissione continua tra gli esseri umani. La deriva antigenica del virus è chiaramente dimostrata dalla recente comparsa di nuove varianti. Il virus si sta evolvendo in modo tale da essere in grado di eludere gli attuali approcci terapeutici e profilattici mirati al picco virale. Un numero crescente di studi riporta già una ridotta efficacia degli anticorpi neutralizzanti contro la variante Delta del SARS-CoV-2 rispetto alla sua forma originale [43,44]. È interessante notare che il *T. officinale* ha mostrato un'efficacia solo leggermente inferiore contro il virus pseudotipato della variante Delta in vitro, e l'estratto della pianta ha anche dimostrato un'efficace inibizione del legame di quattro mutazioni rilevanti del picco con il recettore umano ACE2. Questo potrebbe essere un vantaggio importante nella prevenzione dell'infezione da SARS-CoV-2. I risultati incoraggiano quindi un'analisi più approfondita dell'efficacia di *T. officinales* e richiedono ora ulteriori prove cliniche di conferma.

**Materiale supplementare:** I seguenti sono disponibili online su <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ph14101055/s1>, Tabella S1: Analisi chimica dell'estratto di foglie di *T. officinale* utilizzando la modalità UPLC-TOF-MS a ioni negativi (ESI-), Tabella S2: Analisi chimica dell'estratto di foglie di *T. officinale* utilizzando la modalità UPLC-TOF-MS a ioni positivi (ESI+). Tabella S3: Analisi chimica dell'estratto di foglie di *C. intybus* utilizzando la modalità UPLC-TOF-MS a ioni negativi (ESI-), Tabella S4: Analisi chimica dell'estratto di foglie di *C. intybus* utilizzando la modalità UPLC-TOF-MS a ioni positivi (ESI+).

**Contributi degli autori:** Concettualizzazione, E.L.; metodologia, H.T.T.T.; M.G., E.L. e N.P.K.L.; validazione, E.L.; H.T.T.T.; M.G. e N.P.K.L.; analisi formale, E.L.; H.T.T.T. e M.G.; risorse, E.L. e C.D.; stesura-preparazione bozza originale, E.L.; stesura-revisione ed editing, E.L., H.T.T.T. e M.G.; supervisione e acquisizione dei fondi, E.L. e C.D. Tutti gli autori hanno letto e approvato la versione pubblicata del manoscritto.

**Finanziamento:** Il costo di elaborazione dell'articolo è stato finanziato dal Ministero della Scienza, della Ricerca e dell'Arte del Baden-Wuerttemberg e dall'Università di Friburgo nell'ambito del programma di finanziamento Open Access Publishing.

**Dichiarazione del comitato di revisione istituzionale:** Non applicabile.

**Dichiarazione di consenso informato:** Non applicabile.

**Dichiarazione di disponibilità dei dati:** I dati sono contenuti nell'articolo e nei materiali supplementari.

---

**Conflitti di interesse:** Gli autori non dichiarano alcun conflitto di interesse.

## Riferimenti

- Lu, R.; Zhao, X.; Li, J.; Niu, P.; Yang, B.; Wu, H.; Wang, W.; Song, H.; Huang, B.; Zhu, N.; et al. Caratterizzazione genomica ed epidemiologia di un nuovo coronavirus del 2019: Implicazioni per le origini del virus e il legame con i recettori. *Lancet* **2020**, *395*, 565-574. [CrossRef]
- Berlin, D.A.; Gulick, R.M.; Martinez, F.J. Severe Covid-19. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *383*, 2451-2460. [CrossRef] [PubMed]
- Huang, Y.; Yang, C.; Xu, X.F.; Xu, W.; Liu, S.W. Proprietà strutturali e funzionali della proteina spike della SARS-CoV-2: Potenziale sviluppo di farmaci antivirali per COVID-19. *Acta Pharmacol. Sin.* **2020**, *41*, 1141-1149. [CrossRef] [PubMed]
- Grubaugh, N.D.; Hodcroft, E.B.; Fauver, J.R.; Phelan, A.L.; Cevik, M. Azioni di sanità pubblica per il controllo delle nuove varianti della SARS-CoV-2. *Cell* **2021**, *184*, 1127-1132. [CrossRef]
- Zhou, D.; Dejnirattisai, W.; Supasa, P.; Liu, C.; Mentzer, A.J.; Ginn, H.M.; Zhao, Y.; Duyvesteyn, H.M.E.; Tuekprakhon, A.; Nutalai, R.; et al. Prove di evasione della variante B.1.351 del SARS-CoV-2 da sieri naturali e vaccinati. *Cell* **2021**, *184*, 2348-2361.e2346. [CrossRef]
- Becerra-Flores, M.; Cardozo, T. La mutazione G614 dello spike virale della SARS-CoV-2 presenta un tasso di mortalità più elevato. *Int. J. Clin. Pract.* **2020**, *74*, e13525. [CrossRef]
- Fratev, F. Le mutazioni N501Y e K417N nella proteina spike del SARS-CoV-2 alterano le interazioni con l'anticorpo derivato umano hACE2 e : A Free energy of perturbation study. *bioRxiv* **2020**. [CrossRef]
- Ho, D.; Wang, P.; Liu, L.; Iketani, S.; Luo, Y.; Guo, Y.; Wang, M.; Yu, J.; Zhang, B.; Kwong, P.; et al. Maggiore resistenza delle varianti B.1.351 e B.1.1.7 del SARS-CoV-2 di alla neutralizzazione anticorpale. *Res. Sq.* **2021**. [CrossRef]
- Brown, C.M.; Vostok, J.; Johnson, H.; Burns, M.; Gharpure, R.; Sami, S.; Sabo, R.T.; Hall, N.; Foreman, A.; Schubert, P.L.; et al. Focolaio di infezioni da SARS-CoV-2, comprese le infezioni da vaccino COVID-19, associato a grandi raduni pubblici - Contea di Barnstable, Massachusetts, luglio 2021. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2021**, *70*, 1059-1062. [CrossRef]
- Mlcochova, P.; Kemp, S.; Dhar, M.S.; Papa, G.; Meng, B.; Ferreira, I.A.T.M.; Datir, R.; Collier, D.A.; Albecka, A.; Singh, S.; et al. La replicazione e l'evasione immunitaria della variante Delta del SARS-CoV-2 B.1.617.2. *Nature* **2021**, in stampa. [CrossRef]
- Li, B.; Deng, A.; Li, K.; Hu, Y.; Li, Z.; Xiong, Q.; Liu, Z.; Guo, Q.; Zou, L.; Zhang, H.; et al. Infezione virale e trasmissione in un grande focolaio ben tracciato causato dalla variante Delta SARS-CoV-2. *medRxiv* **2021**. [CrossRef]
- Chia, P.Y.; Xiang Ong, S.W.; Chiew, C.J.; Ang, L.W.; Chavatte, J.-M.; Mak, T.-M.; Cui, L.; Kalimuddin, S.; Chia, W.N.; Tan, C.W.; et al. Cinetica virologica e sierologica delle infezioni da SARS-CoV-2 Delta variante vaccino-breakthrough: Uno studio di coorte multicentrico. *medRxiv* **2021**. [CrossRef]
- Liu, Y.; Liu, J.; Johnson, B.A.; Xia, H.; Ku, Z.; Schindewolf, C.; Widen, S.G.; An, Z.; Weaver, S.C.; Menachery, V.D.; et al. La mutazione Delta spike P681R aumenta la fitness della SARS-CoV-2 rispetto alla variante Alpha. *bioRxiv* **2021**. [CrossRef]
- Perrotta, F.; Matera, M.G.; Cazzola, M.; Bianco, A. Grave infezione respiratoria da SARS-CoV2: Il recettore ACE2 è importante? *Respir. Med.* **2020**, *168*, 105996. [CrossRef]
- ESCOP. "Taraxaci folium" e "taraxaci radix". *Monografie sugli usi medicinali delle droghe vegetali. European Scientific Cooperative on Phytotherapy*, 2a ed.; Thieme: Stoccarda, Germania, 2003; pp. 499-504.
- Blumenthal, M.; Busse, W.R.; Goldberg, A.; Gruenwald, J.; Hall, T.; Riggins, C.W.; Rister, R.S. (Eds.) "Dandelion herb" e "dandelion root with herb". In *The Complete German Commission E Monographs. Therapeutic Guide to Herbal Medicines*; American Botanical Council: Austin, TX, USA, 1998; pp. 118-120.
- Associazione britannica di medicina erboristica. "Foglia di dente di leone" e "radice di dente di leone". In *British Herbal Pharmacopoeia*; British Herbal Medicine Association: Bournemouth, Regno Unito, 1990; Volume 1, pp. 37-39.
- Gonzalez-Castejon, M.; Visioli, F.; Rodriguez-Casado, A. Diverse attività biologiche del tarassaco. *Nutr. Rev.* **2012**, *70*, 534-547. [CrossRef]
- Schutz, K.; Carle, R.; Schieber, A. Taraxacum-a review on its phytochemical and pharmacological profile. *J. Ethnopharmacol.* **2006**, *107*, 313-323. [CrossRef]
- Comitato per i medicinali vegetali (HMPC) dell'Agenzia europea per i medicinali (EMA). Rapporto di valutazione su *Taraxacum officinale* Weber ex Wigg., Folium. EMA/HMPC/579634/2008. 2009. Disponibile online: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-report/final-assessment-report-taraxacum-officinale-weber-ex-wigg-folium\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-report/final-assessment-report-taraxacum-officinale-weber-ex-wigg-folium_en.pdf) (consultato il 20 settembre 2021).
- Grauso, L.; Emrick, S.; de Falco, B.; Lanzotti, V.; Bonanomi, G. Il tarassaco comune: Una revisione dei suoi profili botanici, fitochimici e farmacologici. *Phytochem. Rev.* **2019**, *18*, 1115-1132. [CrossRef]
- Edridge, A.W.D.; Kaczorowska, J.; Hoste, A.C.R.; Bakker, M.; Klein, M.; Loens, K.; Jebbink, M.F.; Matsers, A.; Kinsella, C.M.; Rueda, P.; et al. L'immunità protettiva stagionale da coronavirus è di breve durata. *Nat. Med.* **2020**, *26*, 1691-1693. [CrossRef]
- Amit, S.; Gonen, T.; Regev-Yochay, G. Infezioni da virus Covid-19 negli operatori sanitari vaccinati. Risposta. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *385*. [CrossRef]
- Scobie, H.M.; Johnson, A.G.; Suthar, A.B.; Severson, R.; Alden, N.B.; Balter, S.; Bertolino, D.; Blythe, D.; Brady, S.; Cadwell, B.; et al. Monitoraggio dell'incidenza dei casi, delle ospedalizzazioni e dei decessi di COVID-19, in base allo stato di vaccinazione-13 giurisdizioni statunitensi, dal 4 aprile al 17 luglio, 2021. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2021**, *70*, 1284-1290. [CrossRef] [PubMed]
- Jia, H.; Neptune, E.; Cui, H. Targeting ACE2 per la terapia COVID-19: Opportunità e sfide. *Am. J. Respir Cell Mol. Biol.* **2020**. [CrossRef]
- Zhou, J.; Huang, J. Attuali scoperte sui componenti naturali con potenziale attività anti-2019-nCoV. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *8*, 589. [CrossRef] [PubMed]

27. Huentelman, M.J.; Zubcevic, J.; Hernandez Prada, J.A.; Xiao, X.; Dimitrov, D.S.; Raizada, M.K.; Ostrov, D.A. Scoperta di un nuovo inibitore dell'enzima di conversione dell'angiotensina 2 basata sulla struttura . *Hypertension* **2004**, *44*, 903-906. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Wang, G.; Yang, M.L.; Duan, Z.L.; Liu, F.L.; Jin, L.; Long, C.B.; Zhang, M.; Tang, X.P.; Xu, L.; Li, Y.C.; et al. La dalbavancina lega l'ACE2 per bloccare la sua interazione con la proteina spike del SARS-CoV-2 ed è efficace nell'inibire l'infezione da SARS-CoV-2 in modelli animali. *Cell Res.* **2021**, *31*, 17-24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Tito, A.; Colantuono, A.; Pirone, L.; Pedone, E.; Intartaglia, D.; Giamundo, G.; Conte, I.; Vitaglione, P.; Apone, F. L'estratto di buccia di melograno come inibitore del legame del picco SARS-CoV-2 al recettore ACE2 umano (in vitro): Una fonte promettente di nuovi farmaci antivirali . *Front. Chem.* **2021**, *9*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Korber, B.; Fischer, W.M.; Gnanakaran, S.; Yoon, H.; Theiler, J.; Abfalterer, W.; Hengartner, N.; Giorgi, E.E.; Bhattacharya, T.; Foley, B.; et al. Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidenza che D614G aumenta l'infettività del virus COVID-19. *Cell* **2020**, *182*, 812-827.e819. [[CrossRef](#)]
31. Santos, J.C.; Passos, G.A. L'elevata infettività del SARS-CoV-2 B.1.1.7 è associata a una maggiore forza di interazione tra Spike-ACE2 causata dalla mutazione virale N501Y. *bioRxiv* **2021**. [[CrossRef](#)]
32. Escudero, N.L.; De Arellano, M.L.; FERNÁNDEZ, S.; ALBARRACÍN, G.; Mucciarelli, S. Taraxacum officinale come fonte alimentare. *Alimenti vegetali Hum. Nutr.* **2003**, *58*, 1-10. [[CrossRef](#)]
33. Silveira, D.; Prieto-Garcia, J.M.; Boylan, F.; Estrada, O.; Fonseca-Bazzo, Y.M.; Jamal, C.M.; MAGALHÃES, P.O.; Pereira, E.O.; Tomczyk, M.; Heinrich, M. COVID-19: Is There Evidence for the Use of Herbal Medicines as Adjuvant Symptomatic Therapy? *Front. Pharmacol.* **2020**, *11*, 581840. [[CrossRef](#)]
34. Kuba, K.; Imai, Y.; Rao, S.A.; Gao, H.; Guo, F.; Guan, B.; Huan, Y.; Yang, P.; Zhang, Y.L.; Deng, W.; et al. Un ruolo cruciale di enzima convertitore dell'angiotensina 2 (ACE2) nel danno polmonare indotto dal coronavirus della SARS. *Nat. Med.* **2005**, *11*, 875-879. [[CrossRef](#)]
35. Zhong, M.; Lin, B.; Pathak, J.L.; Gao, H.; Young, A.J.; Wang, X.; Liu, C.; Wu, K.; Liu, M.; Chen, J.M.; et al. Le espressioni di ACE2 e Furin nelle cellule epiteliali orali possono facilitare l'infezione da COVID-19 per via respiratoria e fecale-orale. *Front. Med.* **2020**, *7*, 580796. [[CrossRef](#)]
36. To, K.K.-W.; Tsang, O.T.-Y.; Yip, C.C.-Y.; Chan, K.-H.; Wu, T.-C.; Chan, J.M.-C.; Leung, W.-S.; Chik, T.S.-H.; Choi, C.Y.-C.; Kandamby, D.H.; et al. Rilevamento consistente di un nuovo Coronavirus del 2019 nella saliva. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **2020**, *71*, 841-843. [[CrossRef](#)]
37. Yoon, J.G.; Yoon, J.; Song, J.Y.; Yoon, S.Y.; Lim, C.S.; Seong, H.; Noh, J.Y.; Cheong, H.J.; Kim, W.J. Significato clinico di un'alta carica virale di SARS-CoV-2 nella saliva. *J. Korean Med. Sci.* **2020**, *35*, e195. [[CrossRef](#)]
38. Wolfel, R.; Corman, V.M.; Guggemos, W.; Seilmaier, M.; Zange, S.; Muller, M.A.; Niemeyer, D.; Jones, T.C.; Vollmar, P.; Rothe, C.; et al. Valutazione virologica dei pazienti ospedalizzati con COVID-2019. *Nature* **2020**, *581*, 465-469. [[CrossRef](#)]
39. Seneviratne, C.J.; Balan, P.; Ko, K.K.K.; Udawatte, N.S.; Lai, D.; Ng, D.H.L.; Venkatachalam, I.; Lim, K.S.; Ling, M.L.; Oon, L.; et al. Efficacia dei collutori commerciali sulla carica virale di SARS-CoV-2 nella saliva: Studio di controllo randomizzato a Singapore. *Infection* **2020**, *2*, 305-311.
40. Carrouel, F.; Gonçalves, L.S.; Conte, M.P.; Campus, G.; Fisher, J.; Fraticelli, L.; Gadea-Deschamps, E.; Ottolenghi, L.; Bourgeois, D. Attività antivirale dei reagenti nei collutori contro la SARS-CoV-2. *J. Dent. Res.* **2021**, *100*, 124-132. [[CrossRef](#)]
41. Odongo, G.A.; Schlotz, N.; Herz, C.; Hanschen, F.S.; Baldermann, S.; Neugart, S.; Trierweiler, B.; Frommherz, L.; Franz, C.M.; Ngwene, B.; et al. Il ruolo della lavorazione delle piante per il potenziale preventivo del cancro del cavolo etiopico (Brassica carinata). *Food Nutr. Res.* **2017**, *61*, 1271527. [[CrossRef](#)]
42. Krammer, F. Vaccini contro la SARS-CoV-2 in fase di sviluppo. *Nature* **2020**, *586*, 516-527. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Planas, D.; Veyer, D.; Baidaliuk, A.; Staropoli, I.; Guivel-Benhassine, F.; Rajah, M.M.; Planchais, C.; Porrot, F.; Robillard, N.; Puech, J.; et al. Ridotta sensibilità della variante Delta del SARS-CoV-2 alla neutralizzazione anticorpale. *Nature* **2021**, *596*, 276-280. [[CrossRef](#)]
44. Liu, C.; Ginn, H.M.; Dejnirattisai, W.; Supasa, P.; Wang, B.; Tuekprakhon, A.; Nutalai, R.; Zhou, D.; Mentzer, A.J.; Zhao, Y.; et al. Ridotta neutralizzazione del SARS-CoV-2 B.1.617 da parte di vaccino e siero di convalescenza. *Cell* **2021**, *184*, 4220-4236.e4213. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]