

Articolo

# Effetto degradativo della nattochinasasi sulla proteina spike del SARS-CoV-2

Takashi Tanikawa <sup>1,\*</sup>, Yuka Kiba <sup>2,†</sup>, James Yu <sup>3</sup>, Kate Hsu <sup>3</sup>, Shinder Chen <sup>3</sup>, Ayako Ishii <sup>4</sup>, Takami Yokogawa <sup>2</sup>, Ryuichiro Suzuki <sup>5</sup>, Yutaka Inoue <sup>1</sup> e Masashi Kitamura <sup>2,\*</sup>

- <sup>1</sup> Laboratorio di Gestione Nutri-Farmacoterapeutica, Facoltà di Farmacia, Facoltà di Farmacia e Scienze Farmaceutiche, Università Josai, Saitama 350-0295, Giappone
- <sup>2</sup> Laboratorio di Farmacognocica, Scuola di Farmacia, Facoltà di Farmacia e Scienze Farmaceutiche, Università Josai, Saitama 350-0295, Giappone
- <sup>3</sup> Contek Life Science Co., Ltd., Taipei City 100007, Taiwan
- <sup>4</sup> CellMark Japan, Tokyo 102-0071, Giappone
- <sup>5</sup> Laboratorio di Prodotti Naturali e Fitochimica, Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Facoltà di Farmacia e Scienze Farmaceutiche, Università Josai, Saitama 350-0295, Giappone
- \* Corrispondenza: tanikawa@josai.ac.jp (T.T.); kitamura@josai.ac.jp (M.K.)
- † Questi autori hanno contribuito in egual misura a questo lavoro.

**Abstract:** La malattia da coronavirus 2019 (COVID-19), causata dal coronavirus 2 della sindrome respiratoria acuta grave (SARS-CoV-2), è emersa come una pandemia e ha inflitto enormi danni alla vita delle persone e all'economia di molti Paesi del mondo. Tuttavia, gli agenti terapeutici contro la SARS-CoV-2 rimangono poco chiari. Il SARS-CoV-2 ha una proteina spike (proteina S), il cui clivaggio è essenziale per l'ingresso del virus. La nattochinasasi è prodotta dal *Bacillus subtilis* var. *natto* ed è benefica per la salute umana. In questo studio, abbiamo esaminato l'effetto della nattochinasasi sulla proteina S del SARS-CoV-2. Quando i lisati cellulari trasfettati con la proteina S sono stati incubati con la nattochinasasi, la proteina S è stata degradata in modo dipendente dalla dose e dal tempo. L'analisi di immunofluorescenza ha mostrato che la proteina S sulla superficie cellulare veniva degradata quando la nattochinasasi veniva aggiunta al terreno di coltura. I nostri risultati suggeriscono quindi che la nattochinasasi ha un potenziale per l'inibizione dell'infezione da SARS-CoV-2 attraverso la degradazione della proteina S.

**Parole chiave:** SARS-CoV-2; nattochinasasi; COVID-19



**Citazione:** Tanikawa, T.; Kiba, Y.; Yu, J.; Hsu, K.; Chen, S.; Ishii, A.; Yokogawa, T.; Suzuki, R.; Inoue, Y.; Kitamura, M. Effetto degradativo della Nattochinasasi sulla proteina spike del SARS-CoV-2.

*Molecole* **2022**, *27*, 5405. <https://doi.org/10.3390/molecules27175405>

Editore accademico: Maria José U. Ferreira

Ricevuto: 14 luglio 2022

Accettato: 23 agosto 2022

Pubblicato: 24 agosto 2022

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



**Copyright:** © 2022 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

La malattia da coronavirus 2019 (COVID-19), causata dal coronavirus 2 della sindrome respiratoria acuta grave (SARS-CoV-2), si è diffusa in tutto il mondo. La pandemia COVID-19 ha colpito oltre 437 milioni di persone e ha causato più di 6,3 milioni di morti (<https://covid19.who.int/>, consultato il 4 luglio 2022). L'ingresso del SARS-CoV-2 nelle cellule ospiti è mediato dalla proteina spike transmembrana (proteina S), che forma omotrimeri che si estendono dall'involucro virale. La proteina S viene elaborata e attivata dalle proteasi cellulari, tra cui la proteina serina transmembrana 2 (TMPRSS2), la cathepsina e la furina. Comprende due subunità funzionali, S1 e S2; la subunità S1 del SARS-CoV-2 avvia il legame virus-recettore interagendo con il recettore della cellula ospite umana, l'enzima di conversione dell'angiotensina 2 (ACE2), mentre la subunità S2 partecipa alla fusione virale con la cellula bersaglio, consentendo l'ingresso del virus [1]. Il dominio di legame al recettore (RBD) della subunità S1 è responsabile del legame con ACE2. Il clivaggio della proteina S avviene al confine tra le subunità S1 e S2.

Attualmente, molti Paesi sono impegnati nello sviluppo di vaccini per la protezione dall'infezione da SARS-CoV-2, per cui il numero di infezioni da SARS-CoV-2 è diminuito. Tuttavia, sono state segnalate numerose varianti di SARS-CoV-2, compresi ceppi con epitopi mutati del vaccino [2,3]. La vaccinazione potrebbe non proteggere completamente



Infezione da SARS-CoV-2 perché il numero di pazienti con COVID-19 è in aumento dopo la vaccinazione. È quindi importante sviluppare nuovi trattamenti per le infezioni da SARS-CoV-2. Il natto è un popolare alimento tradizionale giapponese a base di soia fermentata dal *Bacillus subtilis* var. *natto*. La nattochinasasi si trova nel natto [4] ed è uno dei più importanti enzimi extracellulari prodotti dal *B. subtilis* var. *natto* [5]. La nattochinasasi è composta da 275 aminoacidi e ha una dimensione di circa 28 kDa [6,7]. La nattochinasasi inattiva l'inibitore 1 dell'attivatore del plasminogeno e aumenta la fibrinolisi [8]. Inoltre, diminuisce i livelli plasmatici di fibrinogeno, fattore VII, citochine e fattore VIII [9]. La nattochinasasi ha la più alta capacità di sciogliere i coaguli tra gli anticoagulanti naturali conosciuti [10]. Uno studio clinico ha dimostrato che il consumo orale di nattochinasasi non è associato ad alcun effetto negativo [11]. Pertanto, la nattochinasasi è ora considerata un enzima efficiente, sicuro ed economico che ha attirato l'attenzione negli studi sui farmaci trombolitici [12,13]. Inoltre, la nattochinasasi viene utilizzata nel trattamento di alcuni tumori [14,15].

Uno studio recente ha rivelato che l'estratto di natto inibisce l'infezione da herpesvirus bovino 1 (BHV-1) e SARS-CoV-2 [16]. Questi risultati indicano che la proteasi dell'estratto di natto potrebbe essere efficace contro l'infezione da SARS-CoV-2. In questo studio, abbiamo voluto indagare se l'inibizione dell'infezione da SARS-CoV-2 da parte dell'estratto di natto sia causata dalla nattochinasasi derivata da *B. subtilis* var. *natto*.

## 2. Risultati e discussione

### 2.1. Effetti degradativi della nattochinasasi sulla proteina spike di SARS-CoV-2 in vitro

Per prima cosa abbiamo verificato se la nattochinasasi contenuta nell'estratto di natto fosse in grado di degradare la proteina S della SARS-CoV-2. La proteina S del SARS-CoV-2 svolge un ruolo importante nel recettore ACE2 della cellula ospite durante le prime fasi dell'infezione [17]. Dopo aver mescolato il lisato cellulare della proteina S con una serie di diluizioni di 4 volte della nattochinasasi (32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 500 ng/mL, 125 ng/mL, 31,25 ng/mL e 7,8125 ng/mL), è stato eseguito il Western blotting. L'intera lunghezza della proteina S (subunità S1 e S2) e la subunità S2 sono apparse come bande quando il lisato cellulare di espressione della proteina S è stato incubato con D-PBS a concentrazioni di nattochinasasi di 500 ng/mL, 125 ng/mL, 31,25 ng/mL e 7,8125 ng/mL (Figura 1A). Successivamente, abbiamo verificato se la nattochinasasi degrada la proteina S in modo tempo-dipendente. Il lisato è stato quindi incubato con 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  di nattochinasasi per 10-180 minuti. La proteina S del SARS-CoV-2 è stata degradata dalla nattochinasasi dopo 60-180 minuti di incubazione, ma non dopo 10 e 30 minuti di incubazione (Figura 1B). Pertanto, la nattochinasasi ha degradato la proteina S in modo dipendente dalla dose e dal tempo.

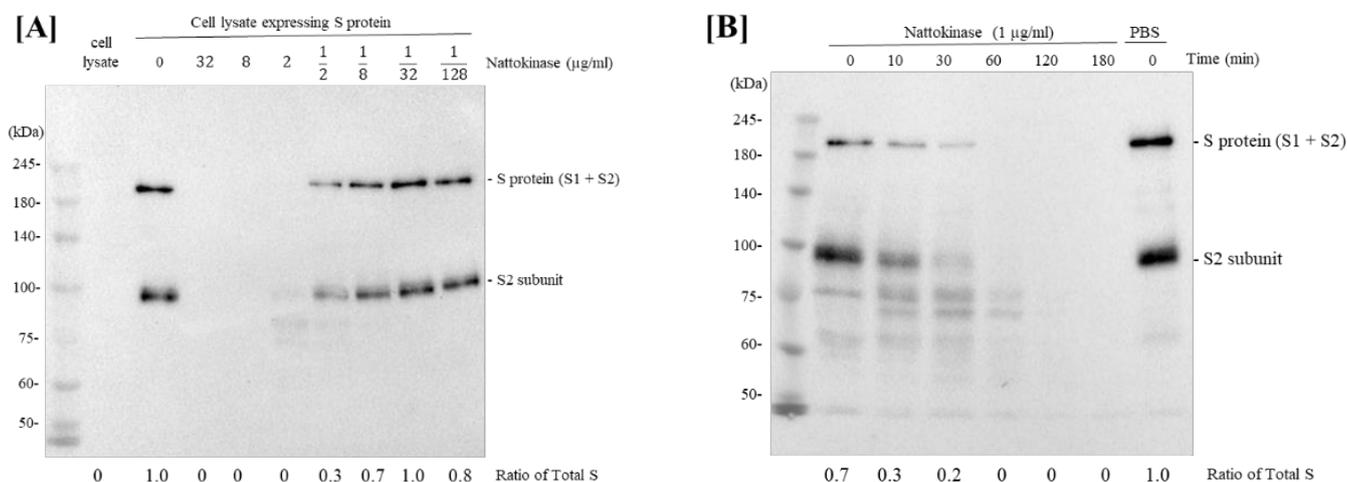
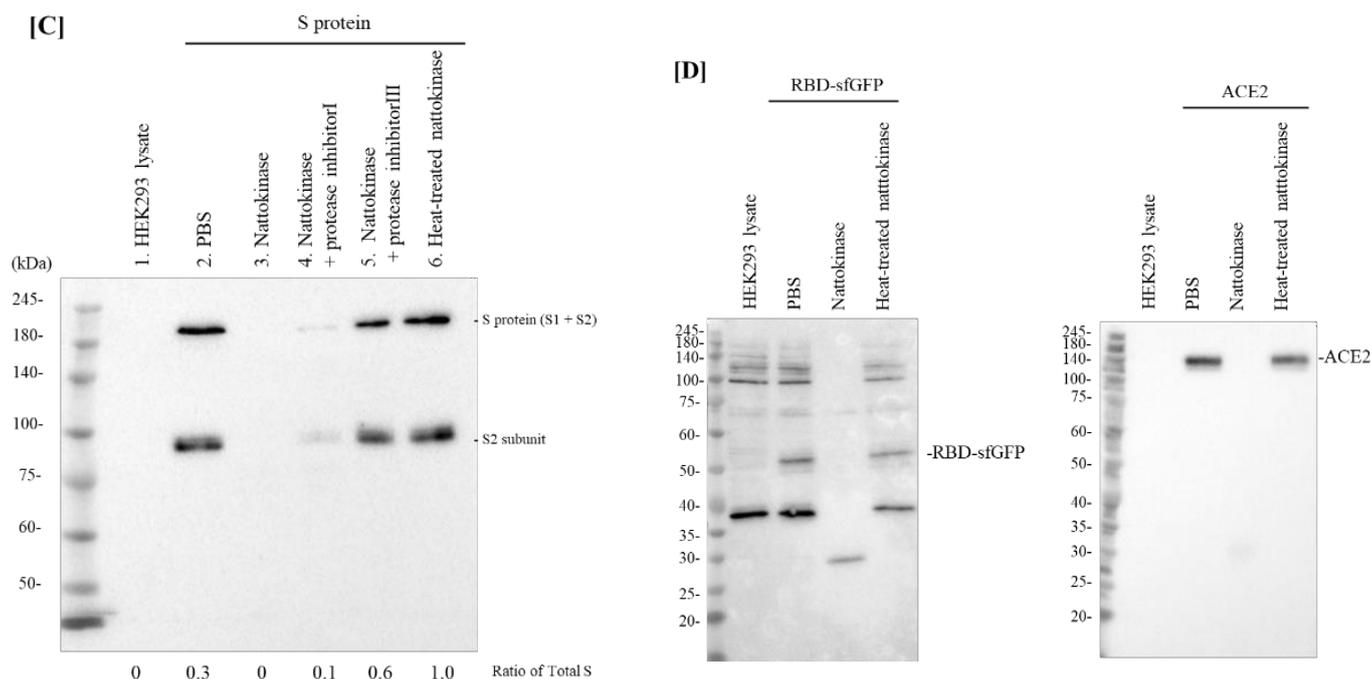


Figura 1. Cont.

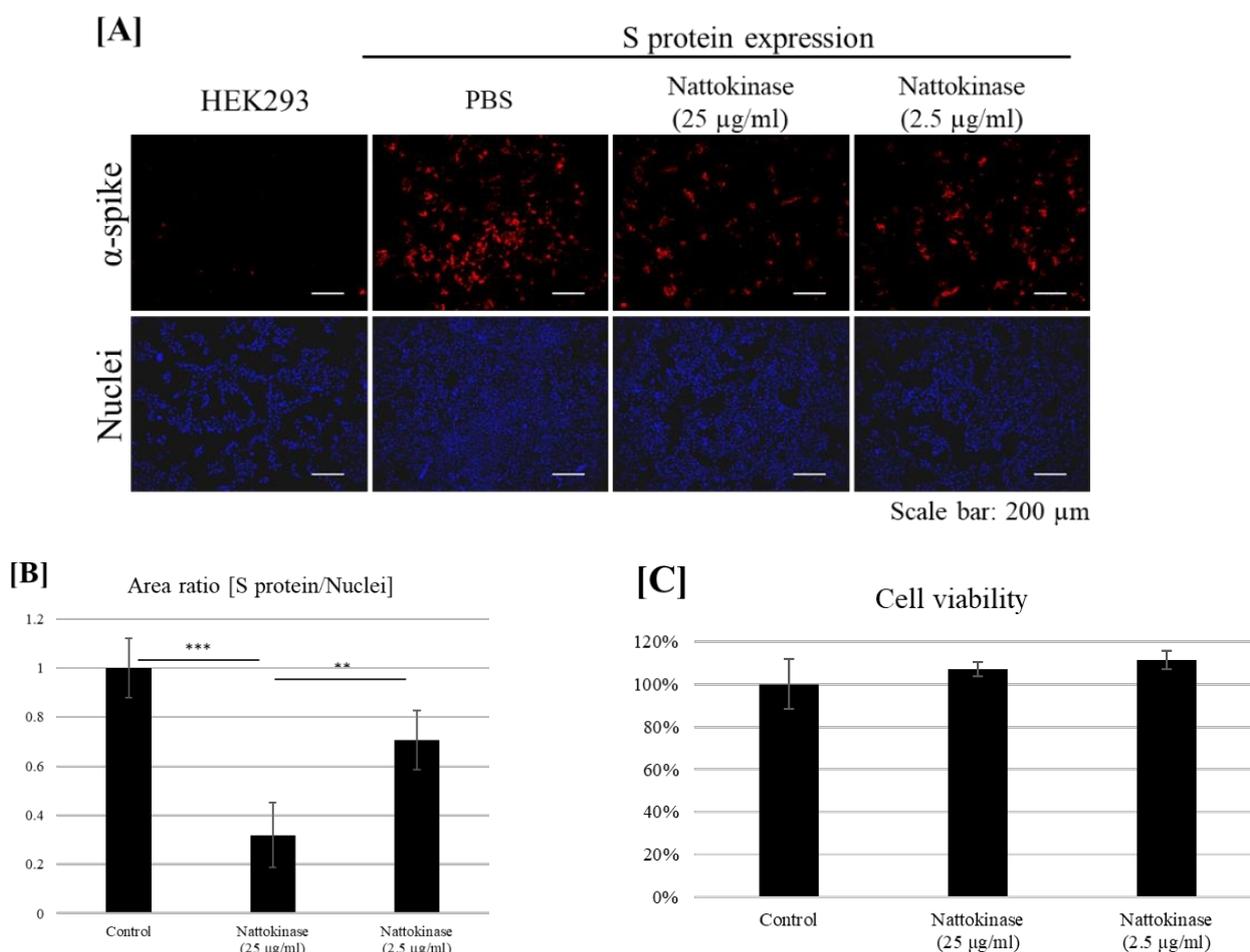


**Figura 1.** (A) Effetti degradativi della nattochinasin in modo dose-dipendente. La nattochinasin diluita in serie (32 µg/mL, 8 µg/mL, 2 µg/mL, 500 ng/mL, 125 ng/mL, 31,25 ng/mL e 7,8125 ng/mL) è stata mescolata con il lisato cellulare di espressione della proteina S e incubata. L'intera lunghezza della proteina S (subunità S1 e S2) e la subunità S2 sono state rilevate rispettivamente come bande superiori e inferiori. Il rapporto di S totale è stato indicato come la quantità relativa di proteina S (proteina S + proteina S2). (B) Effetti degradativi della nattochinasin in modo tempo-dipendente. Il lisato cellulare di espressione della proteina S è stato incubato con 1 µg/mL di nattochinasin per 0, 10, 30, 60, 120 e 180 minuti. (C) Effetti del trattamento termico o degli inibitori delle proteasi. Corsia 1: lisato HEK293; corsia 2: Lisato HEK293 (proteina S); corsia 3: HEK293 (proteina S) + nattochinasin (5 µg/mL); corsia 4: HEK293 (proteina S) + nattochinasin (5 µg/mL) + inibitore della proteasi I; corsia 5: HEK293 (proteina S) + nattochinasin (5 µg/mL) + inibitore della proteasi III; corsia 6: HEK293 (proteina S) + nattochinasin trattata termicamente (5 µg/mL). (D) Effetto degradativo sulla RBD della proteina S e dell'ACE2. I plasmidi codificanti RBD della proteina S e ACE2 sono stati trasfettati rispettivamente in cellule HEK293. I lisati cellulari sono stati incubati con nattochinasin (7,5 µg/mL) e nattochinasin trattata termicamente (7,5 µg/mL) ed è stato eseguito il Western blotting.

Per confermare se l'effetto degradativo della nattochinasin è dovuto all'attività enzimatica, la nattochinasin è stata trattata con riscaldamento o con un cocktail di inibitori della proteasi. Quando la nattochinasin è stata riscaldata a 100 °C per 5 minuti, l'effetto degradativo della nattochinasin è stato perso (Figura 1C, corsia 6). Inoltre, la perdita delle bande di proteine S da parte della nattochinasin è stata bloccata con l'aggiunta di inibitori della proteasi (Figura 1C, corsie 4 e 5). Rispetto al cocktail di inibitori proteici I, il cocktail proteico III, composto da AEBSF HCl (4-(2-aminoetil) benzenesulfonil fluoruro cloridrato), aprotinina, che è un inibitore irreversibile della serina proteasi, e leupeptina, che è una cisteina-proteasi, ha chiaramente bloccato l'attività della nattochinasin. La nattochinasin ha gli stessi aminoacidi conservati, Ser-His-Asp (Asp<sup>32</sup>, His<sup>64</sup> e Ser<sup>221</sup>), che sono membri della famiglia delle serin-proteasi subtilisina [6,18]. La struttura cristallina della nattochinasin è quasi identica a quella della subtilisina E di *B. subtilis* DB104 [19]. Questo risultato è coerente con quello di un precedente rapporto secondo cui la nattochinasin è una serina proteasi. Abbiamo anche valutato gli effetti degradativi della nattochinasin utilizzando lisati cellulari che esprimono RBD e ACE2. Quando sono stati incubati 7,5 µg/mL di nattochinasin e lisato cellulare, le bande di RBD e ACE2 sono andate perse (Figura 1D).

## 2.2. Effetti degradativi della Nattochinasasi sulla proteina Spike del SARS-CoV-2 sulla superficie cellulare trasfettata

Successivamente, abbiamo esaminato se la nattochinasasi degrada la proteina S sulla superficie cellulare trasfettata. La proteina S è stata trasfettata con le cellule HEK293. Le cellule trasfettate sono state incubate con nattochinasasi per 9 ore. La proteina S sulla superficie cellulare è stata rilevata utilizzando un anticorpo anti-proteina S senza permeabilizzazione cellulare (Figura 2A). La proteina S è stata rilevata nelle cellule trasfettate. Quando le cellule trasfettate sono state trattate con nattochinasasi, la proteina S sulla superficie cellulare è diminuita. Quando le cellule sono state trattate con 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  di nattochinasasi, il rapporto tra l'area positiva della proteina S e l'area positiva del nucleo è diminuito rispettivamente di circa 0,3 e 0,7 (Figura 2B). L'effetto degradativo della nattochinasasi è stato osservato in assenza di citotossicità (Figura 2C). L'analisi Western blotting ha mostrato che la quantità di proteina S totale non è cambiata tra i trattamenti con nattochinasasi e quelli di controllo (Figura supplementare; Figura S1). Questi risultati indicano che la nattochinasasi degrada la proteina S del SARS-CoV-2 in un intervallo di concentrazione non tossico.



**Figura 2.** (A) Effetto degradativo della nattochinasasi sulla proteina S sulla superficie cellulare. Spike-pcDNA3.1 è stato trasfettato con cellule HEK293 e incubato per 9 ore. Dopo l'incubazione, la nattochinasasi (25 e 2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) è stata aggiunta al terreno di coltura e ulteriormente incubata per 13 ore. Le cellule sono state fissate e sono state eseguite analisi di immunofluorescenza. La proteina S sulla superficie cellulare è stata colorata con l'anticorpo anti-spike protein (rosso) e il nucleo è stato colorato con DAPI (blu). (B) Rapporto tra area della proteina S e area positiva del nucleo. Sono state acquisite tre immagini per campione e sono state calcolate le aree positive di proteina S/nucleo. I dati sono mostrati come media + SD e il valore  $p$  è stato determinato mediante analisi della varianza (ANOVA) a una via con il test post-hoc di Tukey utilizzando il software R (R-3.3.3 per Windows) (\*\*  $p < 0,01$ ); \*\*\*  $p < 0.001$ ). (C) La vitalità cellulare è stata valutata mediante saggio MTT. La nattochinasasi

---

indicata è stata aggiunta al terreno di coltura e incubata per 13 ore; è stato eseguito il saggio MTT.

In questo studio, abbiamo dimostrato che l'attività proteasica della nattochinasi contribuisce alla degradazione delle proteine S. La nattochinasi ha un effetto degradante non solo sulle proteine S ma anche sull'ACE2 nelle cellule ospiti. La specificità proteasica della nattochinasi sarebbe bassa, perché anche la GAPDH, una proteina housekeeping, è stata degradata simultaneamente nella valutazione in vitro della nattochinasi mescolata al lisato cellulare (Figura supplementare; Figura S2). D'altra parte, quando viene aggiunta alle cellule, non mostra alcun effetto sulla vitalità cellulare e ci si aspetta che agisca come agente protettivo sulla superficie cellulare. Per comprendere gli effetti della proteolisi è necessaria un'ulteriore analisi dei prodotti di degradazione della nattochinasi mediante spettrometria di massa.

La nattochinasi possiede una potente attività di degradazione della proteina S della SARS-CoV-2 e ha dimostrato di esercitare effetti antiaterosclerotici, lipidici, antipertensivi, antitrombotici, fibrinolitici, neuroprotettivi, antiaggreganti e anticoagulanti [20]. I pazienti con ipertensione e comorbidità cardiovascolari possono facilmente ammalarsi di COVID-19 [21]. A causa della comparsa di numerose varianti del SARS-CoV-2, compresi ceppi con epitopi mutati bersaglio del vaccino, la vaccinazione da sola potrebbe non proteggere completamente dall'infezione da SARS-CoV-2. La nattochinasi e gli estratti di natto hanno il potenziale per essere sviluppati come farmaci di nuova generazione per la prevenzione e il trattamento della COVID-19.

### 3. Materiali e metodi

#### 3.1. I materiali

La nattochinasi è stata ottenuta da Contek Life Science Co., Ltd. (Taipei City, Taiwan). L'attività della nattochinasi era di 60.000 FU/g (FU, unità di fibrinolisi). I cocktail di inibitori delle proteasi I e III sono stati acquistati da FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation (Osaka, Giappone). Il plasmide di espressione (pcDNA3.1-SARS2-Spike C9 con tag al C-terminale, pcDNA3.1-hACE2 e pcDNA3-SARS-CoV-2-S-RBD-sfGFP) è stato acquistato da Ad-gene (Watertown, MA, USA). Le cellule HEK293 (JCRB9068) sono state ottenute dalla JCRB Cell Bank (Osaka, Giappone).

#### 3.2. Coltura cellulare e Western Blotting

Le cellule HEK293 sono state coltivate a una densità di  $3,5 \times 10^5$  cellule/mL in DMEM integrato con 10% FBS, L-glutamina, 100 U/mL penicillina e 100 µg/mL streptomina per una notte. Le cellule sono state trasfettate con ciascun plasmide (pcDNA3.1-SARS2-Spike, pcDNA3-SARS-CoV-2-S-RBD-sfGFP, o pcDNA3.1-hACE2) e incubate per 22 h. Dopo l'incubazione, le cellule coltivate sono state raschiate e lavate con soluzione fisiologica tamponata con fosfato di Dulbecco (D-PBS) fredda. È stata eseguita la conta delle cellule e al precipitato cellulare è stato aggiunto il tampone xTractor (Takara Bio Inc., Shiga, Giappone). I lisati cellulari sono stati centrifugati a  $1300 \times g$  per 10 minuti a 4 °C e il surnatante è stato trasferito in nuove provette e conservato a -80 °C fino all'uso. La concentrazione proteica è stata determinata mediante saggio proteico con acido bicinchoninico (BCA) utilizzando un kit di saggio BCA (Takara). Dieci microlitri di nattochinasi e 10 µL di lisato cellulare (1 µg/mL) sono stati incubati a 37 °C per 1 h. Quando sono stati utilizzati gli effetti degli inibitori della proteasi, i set di cocktail di inibitori della proteasi I e III sono stati diluiti 10 volte con D-PBS e una soluzione di cocktail di inibitori della proteasi di 10 µL è stata aggiunta alla miscela di nattochinasi e lisato cellulare. Sono stati caricati volumi uguali della miscela di reazione ed è stato eseguito il Western blotting. Gli anticorpi primari comprendevano l'anticorpo monoclonale di topo anti-rodopsina (C9) (1D4) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), l'anticorpo monoclonale di topo anti-GAPDH (FUJIFILM Wako), l'anticorpo monoclonale di topo anti-GFP tag (Proteintech, Rosemont, IL, USA) e l'anticorpo anti-ACE2 (Proteintech). Gli anticorpi secondari comprendono anticorpi di capra anti-topo coniugati con HRP (Proteintech).

#### 3.3. Test di immunofluorescenza

Le cellule HEK293 sono state coltivate a una densità di  $3,5 \times 10^5$  cellule/mL in una camera a 8 pozzetti in DMEM integrato con 10% FBS, L-glutamina, 100 U/mL di penicillina e 100 µg/mL di streptomina. Le cellule sono state trasfettate con

---

pcDNA3.1-SARS2-Spike e incubate per 9 h. Dopo l'incubazione, le cellule sono state trattate con i campioni, incubate per 13 h e fissate in paraformaldeide al 4% per 30 min. Dopo l'incubazione con SARS-CoV/SARS-CoV-2

(1A9) (GeneTex, CA, USA) per 1 h, è stato incubato con anticorpo di capra anti-mouse coniugato con Cy3 per 1 h. I vetrini sono stati colorati con DAPI Fluoromount-G e osservati con un microscopio a fluorescenza (BZ-X710, Keyence, Osaka, Giappone). Le aree positive per la proteina S e quelle positive per il nucleo sono state calcolate utilizzando il software di analisi allegato al BZ-X710 (BZ-X Analyzer). La vitalità cellulare è stata valutata con il test del 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT). Le cellule sono state coltivate in piastre di coltura a 24 pozzetti. Dopo l'incubazione a 37 °C per 24 ore, i campioni sono stati aggiunti a ciascun pozzetto e incubati per altre 13 ore. Le cellule sono state sospese in 500 µL di DMEM contenente 500 µg/mL di MTT. Dopo un'incubazione di 3 ore a 37 °C, sono stati aggiunti 500 µL di isopropanolo contenente 4 mM HCl per dissolvere la formazana MTT. L'assorbanza è stata misurata a 570 nm con un lettore di micropiastre.

#### 4. Conclusioni

In questo studio abbiamo dimostrato che la nattochinasi, una serina proteasi, degrada la proteina S di SARS-CoV-2. Per verificare se la nattochinasi contenuta nell'estratto di natto potesse inibire l'infezione da SARS-CoV-2, abbiamo analizzato la degradazione della proteina S mescolando il lisato cellulare di espressione della proteina S e la nattochinasi in modo dipendente dalla dose e dal tempo. La RBD della proteina S si lega alla porzione distale della membrana della proteina ACE2. È stato riportato che l'estratto di natto inibisce l'infezione da SARS-CoV-2 in cellule Vero E6 attraverso la degradazione della RBD [16]. Abbiamo dimostrato che la degradazione della proteina S da parte della nattochinasi era bloccata da trattamenti con calore o inibitori proteici. I nostri dati suggeriscono che l'attività proteasica della nattochinasi svolge un ruolo fondamentale nella degradazione della proteina S. Nel complesso, questi risultati supportano l'idea che l'inibizione dell'infezione da SARS-CoV-2 da parte dell'estratto di natto sia dovuta alla degradazione della proteina S da parte della nattochinasi. Pertanto, i nostri dati indicano che la nattochinasi e gli estratti di natto hanno effetti potenziali sull'inibizione dell'ingresso nella cellula ospite del SARS-CoV-2 attraverso la degradazione della proteina S.

**Materiali supplementari:** Le seguenti informazioni di supporto possono essere scaricate all'indirizzo: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/molecules27175405/s1>, Figura S1: l'effetto dell'aggiunta di nattochinasi al terreno di coltura delle cellule esprimenti la proteina S è stato valutato mediante Western blotting; Figura S2: effetti degradativi della GAPDH in vitro.

Figura S1: l'effetto dell'aggiunta di nattochinasi al terreno di coltura delle cellule esprimenti la proteina S è stato valutato mediante Western blotting; Figura S2: effetti degradativi della GAPDH in vitro.

**Contributi degli autori:** Concettualizzazione e supervisione, T.T., J.Y., K.H., S.C., A.I., T.Y., R.S., Y.I. e M.K.; Metodologia, tutti gli autori; analisi Western blot e immunofluorescenza, T.T., Y.K. e M.K.; stesura-preparazione bozza originale, T.T. e M.K.; stesura-revisione ed editing, tutti gli autori. Tutti gli autori hanno letto e approvato la versione pubblicata del manoscritto.

**Finanziamento:** Questa ricerca non ha ricevuto alcun

finanziamento esterno. **Dichiarazione del comitato di revisione**

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

**informato:** Non applicabile.

**Dichiarazione di disponibilità dei dati:** I dati utilizzati per supportare questi risultati sono stati inclusi in questo articolo. Ulteriori informazioni sono disponibili su richiesta presso gli autori corrispondenti.

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

#### Riferimenti

1. Alsobaie, S. Comprendere la biologia molecolare della SARS-CoV-2 e della pandemia COVID-19: A Review. *Infect. Drug Resist.* **2021**, *14*, 2259–2268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Bayati, A.; Kumar, R.; Francis, V.; McPherson, P.S. Il SARS-CoV-2 infetta le cellule dopo l'ingresso virale tramite endocitosi mediata da clatrina. *J. Biol. Chem.* **2021**, *296*, 100306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Bestle, D.; Heindl, M.R.; Limburg, H.; Van Lam van, T.; Pilgram, O.; Moulton, H.; Stein, D.A.; Hards, K.; Eickmann, M.; Dolnik,

- 
- O.; et al. TMPRSS2 e furina sono entrambi essenziali per l'attivazione proteolitica del SARS-CoV-2 nelle cellule delle vie aeree umane. *Life Sci. Alliance* **2020**, *3*, e202000786. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Sumi, H.; Hamada, H.; Tsushima, H.; Mihara, H.; Muraki, H. Un nuovo enzima fibrinolitico (nattochinasi) nel formaggio vegetale Natto; un alimento di soia tipico e popolare nella dieta giapponese. *Experientia* **1987**, *43*, 1110-1111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  5. Dabbagh, F.; Negahdaripour, M.; Berenjian, A.; Behfar, A.; Mohammadi, F.; Zamani, M.; Irajie, C.; Ghasemi, Y. Nattokinase: Produzione e applicazione. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 9199-9206. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

6. Nakamura, T.; Yamagata, Y.; Ichishima, E. Sequenza nucleotidica del gene della subtilisina NAT, aprN, del *Bacillus subtilis* (natto). *Biosci. Biotech. Bioch.* **1992**, *56*, 1869-1871. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Urano, T.; Ihara, H.; Umemura, K.; Suzuki, Y.; Oike, M.; Akita, S.; Tsukamoto, Y.; Suzuki, I.; Takada, A. L'enzima profibrinolitico subtilisina NAT, purificato da *Bacillus subtilis*, taglia e inattiva l'inibitore dell'attivatore del plasminogeno di tipo 1. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 24690-24696. [[CrossRef](#)]
8. Suzuki, Y.; Kondo, K.; Matsumoto, Y.; Zhao, B.Q.; Otsuguro, K.; Maeda, T.; Tsukamoto, Y.; Urano, T.; Umemura, K. L'integrazione alimentare di soia fermentata, il natto, sopprime l'ispessimento intimale e modula la lisi dei trombi murali dopo lesione endoteliale nell'arteria femorale di ratto. *Life Sci.* **2003**, *73*, 1289-1298. [[CrossRef](#)]
9. Hsia, C.H.; Shen, M.C.; Lin, J.S.; Wen, Y.K.; Hwang, K.L.; Cham, T.M.; Yang, N.C. La nattochinasasi riduce i livelli plasmatici di fibrinogeno, fattore VII e fattore VIII in soggetti umani. *Nutr. Res.* **2009**, *29*, 190-196. [[CrossRef](#)]
10. Weng, Y.; Yao, J.; Sparks, S.; Wang, K.Y. Nattokinase: Un agente antitrombotico orale per la prevenzione delle malattie cardiovascolari. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 523. [[CrossRef](#)]
11. Kim, J.Y.; Gum, S.N.; Paik, J.K.; Lim, H.H.; Kim, K.C.; Ogasawara, K.; Inoue, K.; Park, S.; Jang, Y.; Lee, J.H. Effetti della nattochinasasi sulla pressione sanguigna: Uno studio randomizzato e controllato. *Hypertens. Res.* **2008**, *31*, 1583-1588. [[CrossRef](#)]
12. Wu, C.; Gao, C.; Lü, S.; Xu, X.; Wen, N.; Zhang, S.; Liu, M. Costruzione di nanocompositi di dendrimeri di polisina che trasportano nattokinasi e loro applicazione nella trombolisi. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2018**, *106*, 440-449. [[CrossRef](#)]
13. Lampe, B.J.; English, J.C. Valutazione tossicologica della nattochinasasi derivata dal *Bacillus subtilis* var *natto*. *Food Chem. Toxicol.* **2016**, *88*, 87-99. [[CrossRef](#)]
14. Kou, Y.; Feng, R.; Chen, J.; Duan, L.; Wang, S.; Hu, Y.; Zhang, N.; Wang, T.; Deng, Y.; Song, Y. Sviluppo di un complesso nattochinasasi-acido polisialico per il trattamento avanzato dei tumori. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2020**, *145*, 105241. [[CrossRef](#)]
15. Yan, Y.; Wang, Y.; Qian, J.; Wu, S.; Ji, Y.; Liu, Y.; Zeng, J.; Gong, A. L'estratto grezzo di Nattokinase inibisce la crescita del carcinoma epatocellulare nei topi. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *29*, 1281-1287. [[CrossRef](#)]
16. Oba, M.; Rongduo, W.; Saito, A.; Okabayashi, T.; Yokota, T.; Yasuoka, J.; Sato, Y.; Nishifuji, K.; Wake, H.; Nibu, Y.; et al. L'estratto di natto, un alimento giapponese a base di soia fermentata, inibisce direttamente le infezioni virali, compresa la SARS-CoV-2, in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2021**, *570*, 21-25. [[CrossRef](#)]
17. Smaoui, M.R.; Yahyaoui, H. Unraveling the stability landscape of mutations in the SARS-CoV-2 receptor-binding domain. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 9166. [[CrossRef](#)]
18. Carter, P.; Wells, J.A. Dissezione della triade catalitica di una serina proteasi. *Nature* **1988**, *332*, 564-568. [[CrossRef](#)]
19. Yanagisawa, Y.; Chatake, T.; Naito, S.; Ohsugi, T.; Yatagai, C.; Sumi, H.; Kawaguchi, A.; Chiba-Kamosida, K.; Ogawa, M.; Adachi, T.; et al. Determinazione della struttura a raggi X e deuteroazione della nattochinasasi. *J. Synchrotron Radiat.* **2013**, *20 Pt 6*, 875-879. [[CrossRef](#)]
20. Chen, H.; McGowan, E.M.; Ren, N.; Lal, S.; Nassif, N.; Shad-Kaneez, F.; Qu, X.; Lin, Y. Nattokinase: A Promising Alternative in Prevention and Treatment of Cardiovascular Diseases. *Biomark. Insights* **2018**, *13*, 1177271918785130. [[CrossRef](#)]
21. Cancarevic, I.; Malik, B.H. Infezione da SARS-CoV-2 (COVID 19) in pazienti ipertesi e con malattie cardiache. *Cureus* **2020**, *12*, e8557. [[CrossRef](#)]