

# Intranasal fusion inhibitory lipopeptide prevents direct-contact SARS-CoV-2 transmission in ferrets

Astrattoll contenimento della pandemia COVID-19 richiede la riduzione della trasmissione virale. L'infezione da SARS-CoV-2 viene avviata dalla fusione della membrana tra le membrane delle cellule virali e ospiti, mediata dalla proteina spike virale. Abbiamo progettato inibitori della fusione lipopeptidica che bloccano questo primo passaggio critico dell'infezione e, in base all'efficacia in vitro e alla biodistribuzione in vivo, abbiamo selezionato una forma dimerica per la valutazione in un modello animale. La somministrazione intranasale quotidiana ai furetti ha completamente impedito la trasmissione per contatto diretto di SARS-CoV-2 durante il co-stabulazione di 24 ore con animali infetti, in condizioni rigorose che hanno provocato l'infezione del 100% degli animali non trattati. Questi lipopeptidi sono altamente stabili e quindi possono facilmente tradursi in una profilassi intranasale sicura ed efficace per ridurre la trasmissione di SARS-CoV-2.

L'infezione da SARS-CoV-2 richiede la fusione della membrana tra l'involucro virale e la cellula ospite, sulla superficie cellulare o sulla membrana endosomiale. Il processo di fusione è mediato dalla glicoproteina transmembrana virale (S). Dopo l'attaccamento o l'assorbimento virale, i fattori dell'ospite innescano riarrangiamenti conformazionali su larga scala in S, inclusa una fase di ripiegamento che porta direttamente alla fusione della membrana e all'ingresso virale ( [1](#) - [3](#) ). Peptidi corrispondenti alla ripetizione heptad altamente

conservato (HR, [Fig. 1A](#)) dominio al C terminale della proteina S (peptidi HRC, [Fig. 1B](#)) può impedire questo ripiegamento e fusione di inibizione, impedendo l'infezione ([4](#) - [8](#)). I peptidi HRC formano gruppi a forma di fascio a sei eliche con la forma intermedia estesa del trimero della proteina S, interrompendo il riarrangiamento strutturale di S che guida la fusione della membrana ([4](#)) (vedere anche il film S1).

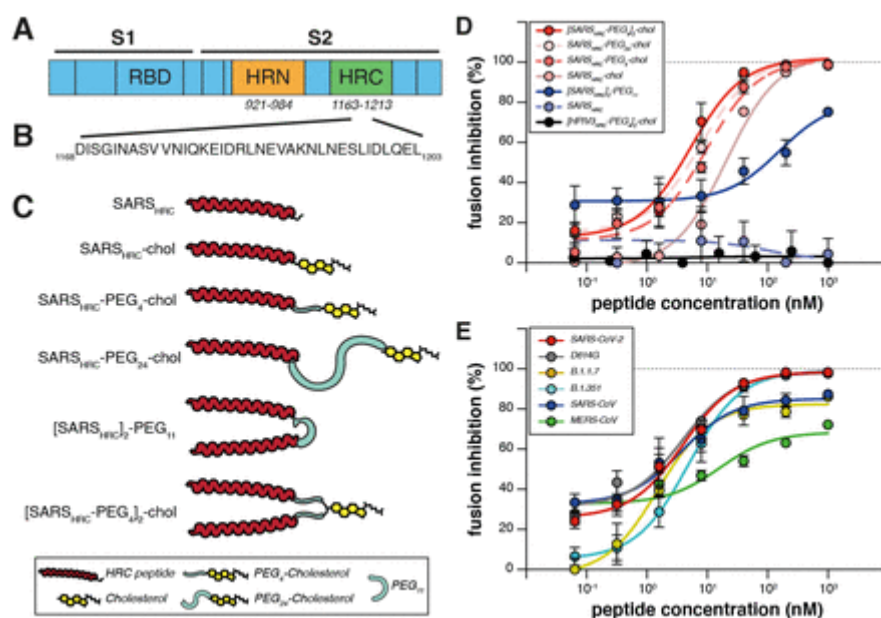


Fig. 1 Coniugati peptide-lipidici che inibiscono la fusione mediata da picco di SARS-CoV-2 (S). (A) I domini funzionali della proteina SARS-CoV-2 S: sono indicati il dominio di legame del recettore (RBD) e le ripetizioni heptad (HRN e HRC). (B) Sequenza dei peptidi derivati dal dominio HRC di SARS-CoV-2 S. (C) Forme monomeriche e dimeriche di peptidi inibitori di SARS-CoV-2 marcati con lipidi che sono stati valutati in saggi di fusione cellula-cellula. (D) Saggi di fusione cellula-cellula con diversi peptidi inibitori. La percentuale di inibizione è mostrata per sei diversi peptidi specifici per SARS-CoV-2 e un peptide di controllo specifico per HPIV-3 a concentrazioni crescenti. La percentuale di inibizione è stata calcolata come il rapporto tra le unità di luminescenza relativa in presenza di una concentrazione specifica di inibitore e le unità di luminescenza relativa in assenza di inibitore, corrette per la luminescenza di fondo.  $\% \text{ inibizione} = 100 \times [1 - (\text{luminescenza su } X - \text{sfondo}) / (\text{luminescenza in assenza di inibitore} - \text{sfondo})]$ . La differenza tra i risultati dei lipopeptidi [SARS HRC -PEG 4] 2- col e SARS HRC -PEG 4 -col è stata statisticamente significativa (ANOVA a due vie,  $P < 0.0001$ ). (E)

Attività inibitoria della fusione del [SARS HRC -PEG 4 ] peptide 2- colico contro le varianti emergenti di SARS-CoV-2 S, MERS-CoV-2 S e SARS-CoV S. Dati in (D) ed (E) sono medie  $\pm$  errore standard della media (SEM) da tre esperimenti separati con la curva che rappresenta un modello dose-risposta a quattro parametri.

Il nostro approccio nella progettazione di inibitori di fusione SARS-CoV-2 S-specifici si basa sul nostro lavoro precedente che ha dimostrato che la coniugazione lipidica di peptidi inibitori derivati da HRC aumenta notevolmente la potenza antivirale e l'emivita in vivo ( [9](#) , [10](#) ). Questi peptidi successo di inibizione parainfluenza virus umano di tipo 3 (HPIV-3), virus del morbillo, virus dell'influenza, ed infezione da virus Nipah ( [9](#) , [11](#) - [13](#) ). Inoltre, la combinazione di dimerizzazione e integrazione dei lipopeptidi nelle membrane cellulari protegge le vie respiratorie e previene la disseminazione sistemica dei lipopeptidi ( [14](#) ). I peptidi coniugati con lipidi somministrati per via intranasale agli animali hanno raggiunto alte concentrazioni sia nel tratto respiratorio superiore che in quello inferiore e il lipide potrebbe essere progettato per modulare l'entità del transito dal polmone al sangue e agli organi ( [9](#) , [14](#) ). Proponiamo un lipopeptide specifico per SARS-CoV-2 come antivirale candidato per la profilassi pre-esposizione e post-esposizione precoce per la trasmissione di SARS-CoV-2 nell'uomo.

Abbiamo recentemente descritto un inibitore monomero della fusione SARS-CoV-2 HRC-lipopeptide ( [4](#) ) contro SARS-CoV-2 con efficacia in vitro ed ex vivo superiore ai peptidi inibitori della fusione derivati da HRC precedentemente descritti ( [6](#) , [7](#) ). Per migliorare ulteriormente la potenza antivirale, abbiamo confrontato i derivati monomerici e dimerici del peptide HRC ( [Fig. 1C](#) ). [La Figura 1D](#) mostra la potenza antivirale in un saggio quantitativo di fusione cellula-cellula di quattro peptidi HRC a 36 amminoacidi derivati da SARS-CoV-2 S

monomerici e due dimerici ( [Fig. 1B](#), vedi anche figg. S1A e S3 per struttura e caratterizzazione), senza o con aggiunta di colesterolo. La dimerizzazione ha aumentato la potenza del peptide sia per i peptidi non lipidati che per le loro controparti lipidate ( [Fig. 1D](#) ). Un lipopeptide dimerico coniugato con colesterolo basato sul dominio HRC della proteina F HPIV-3, usato come controllo negativo, non ha inibito la fusione a nessuna concentrazione testata (linea nera in [Fig. 1D](#) , vedere fig. S1, B e C, per ulteriori controlli negativi). Tra i lipopeptidi monomerici, il peptide recante PEG<sub>24</sub> era il più potente. Il peptide dimerico coniugato con colesterolo ([SARS<sub>HRC</sub>-PEG<sub>4</sub>]<sub>2</sub>-col; linea rossa in [Fig. 1D](#)) era il lipopeptide più potente contro SARS-CoV-2 nel nostro gruppo. Questo peptide ha anche fortemente inibito la fusione mediata dalle proteine S di diverse varianti emergenti di SARS-CoV-2 [incluso D614G ( [15](#) )], le recenti varianti di preoccupazione B.1.1.7 e B.1.351 ( [16](#) , [17](#) ) e la S proteina di SARS-CoV e MERS-CoV ( [Fig. 1E](#) ). La proposta di ancoraggio del lipopeptide dimerico nella membrana della cellula ospite e le interazioni con la proteina virale S sono mostrate in fig. S2 e il film S1. Collettivamente, questi dati suggeriscono che il lipopeptide [SARS<sub>HRC</sub>-PEG<sub>4</sub>]<sub>2</sub>-col è equipaggiato per combattere una pandemia in evoluzione.

Per altri virus respiratori avvolti, abbiamo precedentemente dimostrato che sia i lipopeptidi dimerici ex vivo che in vivo (somministrati per via intranasale) mostravano una maggiore ritenzione nel tratto respiratorio rispetto ai composti monomerici ( [14](#) ). Qui, abbiamo confrontato la biodistribuzione locale e sistemica dei nostri lipopeptidi monomerici e dimerici più potenti (SARS<sub>HRC</sub>-PEG<sub>24</sub>-col e [SARS<sub>HRC</sub>-PEG<sub>4</sub>]<sub>2</sub>-col) a 1, 8 e 24 ore dopo l'inoculazione intranasale o l'iniezione sottocutanea in topi K18 hACE2 umanizzati ( [Fig. 2](#) e fig. S4). I due lipopeptidi hanno

raggiunto una concentrazione polmonare simile a 1 ora dopo la somministrazione intranasale (da  $\sim 1$  a  $2 \mu\text{M}$ ). A 8 e 24 ore, il dimerico  $[\text{SARS}_{\text{HRC}}\text{-PEG}_4]_2$ -colico è rimasto a livelli elevati nel polmone con un ingresso minimo nel sangue, ma il peptide monomero è entrato in circolazione e la concentrazione polmonare è diminuita ( [Fig. 2A](#) ). Il lipopeptide dimerico  $[\text{SARS}_{\text{HRC}}\text{-PEG}_4]_2$ -col è stato distribuito in tutto il polmone dopo somministrazione intranasale ( [Fig. 2B](#) ). Un test di tossicità cellulare (MTT) nelle cellule HAE primarie ha mostrato una tossicità minima anche dopo 6 giorni alle concentrazioni più alte testate ( $<20\%$  a  $100 \mu\text{M}$ ) e nessuna tossicità alle sue concentrazioni inibitorie di ingresso  $\text{IC}_{90}$  ( $\sim 35 \text{ nM}$ ) (fig. S5). La persistenza più lunga del tratto respiratorio di  $[\text{SARS}_{\text{HRC}}\text{-PEG}_4]_2$ -chol, insieme alla sua efficacia in vitro, ci ha portato a far progredire questo lipopeptide dimerico.

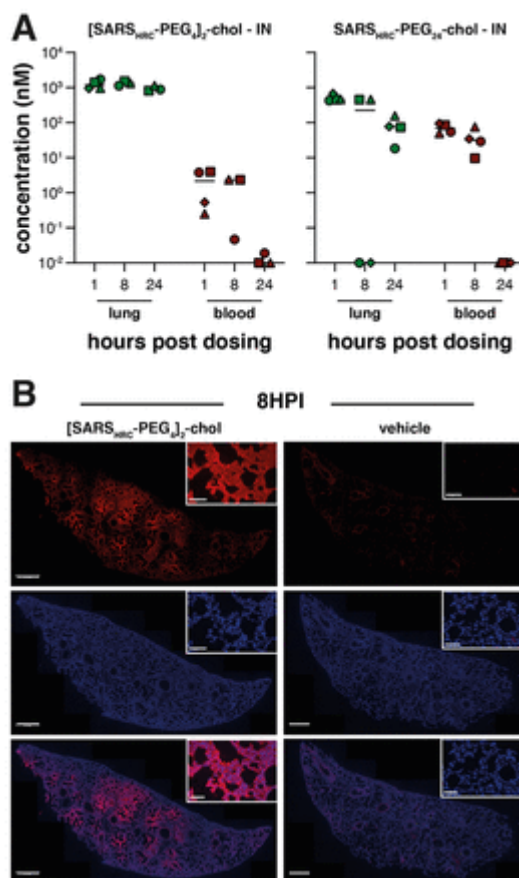


Fig. 2 Biodistribuzione dei peptidi  $[\text{SARS}_{\text{HRC}}\text{-PEG}_4]_2$ -col e  $\text{SARS}_{\text{HRC}}\text{-PEG}_{24}$

dopo somministrazione intranasale a topi. ( A ) La concentrazione di lipopeptidi ( asse y ) è stata misurata mediante ELISA in omogenati polmonari e campioni di plasma (trattati con peptidi n = da 3 a 4, mock n = 1). La mediana è indicata da una barra orizzontale. ( B ) Le sezioni polmonari di topi [SARS HRC -PEG 4 ]<sub>2</sub>-trattati col col (o con veicolo) sono state colorate con anticorpo anti-SARS-HRC (rosso) confermando un'ampia distribuzione di [SARS HRC -PEG 4 ]<sub>2</sub>-col nel polmone (8 ore dopo l'inoculazione, 8HPI). Barra della scala = 500 µm nella scansione della piastrina polmonare, 50 µm in ingrandimento, vengono mostrate immagini rappresentative e una scansione completa della piastrina. I nuclei sono stati controcolorati con DAPI (blu).

Il peptide principale, [SARS<sub>HRC</sub> -PEG 4 ]<sub>2</sub>-chol, è stato valutato per la sua capacità di bloccare l'ingresso di SARS-CoV-2 nelle cellule VeroE6 o nelle cellule VeroE6 che sovraesprimono la proteasi TMPRSS2, uno dei fattori ospiti che si ritiene facilitino l'ingresso virale alla membrana cellulare ( [2](#) ). Mentre la fusione virale nelle cellule VeroE6 si verifica prevalentemente dopo l'endocitosi, il virus entra nelle cellule che sovraesprimono TMPRSS2 per fusione sulla superficie cellulare, riflettendo la via di ingresso nelle cellule delle vie aeree ( [18](#) ). Questa differenza è evidenziata dall'efficacia della cloroquina contro l'infezione da SARS-CoV-2 nelle cellule Vero ma dal fallimento nelle cellule Vero che esprimono TMPRSS2 e nel polmone umano ( [19](#) ). Il [SARS<sub>HRC</sub> -PEG 4 ]<sub>2</sub> peptide colico sciolto in un tampone acquoso contenente il 2% di dimetilsolfossido (DMSO) ha inibito l'ingresso del virus dopo 8 ore con una IC<sub>50</sub> ~ 300 nM in VeroE6 e ~ 5 nM nelle cellule VeroE6-TMPRSS2 ( [Fig. 3A](#) ). Per rafforzare il potenziale traslazionale verso l'uso umano, il lipopeptide è stato riformulato in saccarosio anziché in DMSO, ottenendo una potenza in vitro equivalente ( [Fig. 3B](#) ). Un lipopeptide inibitore della fusione dimerica di controllo diretto contro l'infezione da HPIV-3 ha bloccato l'infezione da HPIV-3, ma non ha

inibito l'infezione da SARS-CoV-2. I dati di efficacia in vitro sono riassunti nella tabella S1.

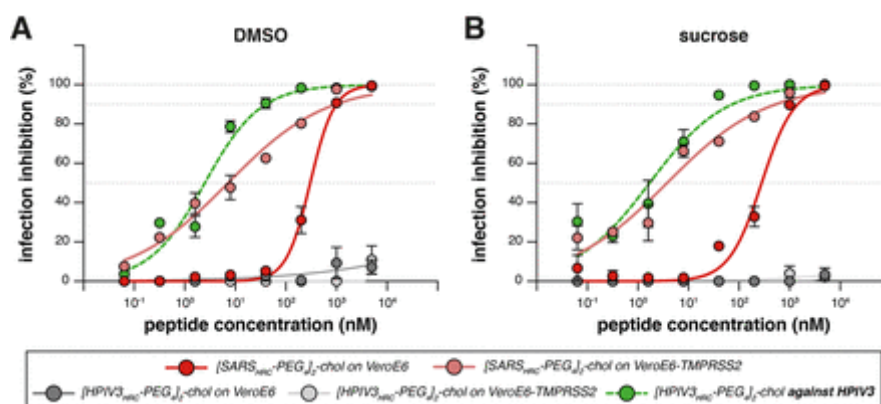


Fig. 3 Inibizione dell'ingresso infettivo di SARS-CoV-2 da parte dei peptidi [SARS HRC -PEG 4 ] 2 -col e [HPIV-3 HRC -PEG 4 ] 2 -col. ( A e B ) La percentuale di inibizione dell'infezione è mostrata sulle cellule VeroE6 e VeroE6-TMPRSS2 con concentrazioni crescenti di [SARS HRC -PEG 4 ] 2 -col (linee rosse) e [HPIV-3 HRC -PEG 4 ] 2 -col (linee grigie). Gli stock formulati con DMSO (A) e formulati con saccarosio (B) sono stati testati fianco a fianco. Viene mostrata la media  $\pm$  SEM di triplicati, le linee tratteggiate mostrano il 50% e il 90% di inibizione. Inoltre, la potenza di [HPIV-3 HRC -PEG 4 ] 2 -col è stata confermata dall'inibizione dell'ingresso infettivo HPIV-3 (linee verdi tratteggiate, eseguite su cellule Vero).

I furetti sono un modello ideale per valutare la trasmissione del virus respiratorio, sia per contatto diretto che per trasmissione di aerosol ( [20](#) , [21](#) ). I mustelidi sono altamente suscettibili all'infezione da SARS-CoV-2, come illustrato anche dai frequenti focolai di COVID-19 negli allevamenti di visoni. La trasmissione per contatto diretto di SARS-CoV nei furetti è stata dimostrata nel 2003 ( [22](#) ), e sia il contatto diretto che la trasmissione per via aerea sono state dimostrate nei furetti per SARS-CoV-2 ( [20](#) , [23](#) ). La trasmissione per contatto diretto nel modello di furetto è altamente riproducibile (trasmissione del 100% dal donatore agli animali accettori), ma i furetti mostrano segni clinici limitati. Dopo l'infezione tramite inoculazione o trasmissione diretta,

SARS-CoV-2 può essere facilmente rilevato e isolato dalla gola e dal naso e la replicazione virale porta alla sierconversione.

Per valutare l'efficacia di [SARS<sub>HRC</sub>-PEG<sub>4</sub>]<sub>2</sub>-col nel prevenire la trasmissione di SARS-CoV-2, ai furetti naïve è stato somministrato un dosaggio profilattico con il lipopeptide prima di essere co-alloggiati con furetti infetti da SARS-CoV-2. In questa configurazione, teoricamente può verificarsi la trasmissione attraverso più percorsi (aerosol, orofecale e graffi o morsi) e i furetti sono continuamente esposti a virus infettivi durante il periodo di co-housing, fornendo un rigoroso test per l'efficacia antivirale. Il disegno dello studio è mostrato in fig. S6. Tre furetti donatori (in grigio nel diagramma) sono stati inoculati per via nasale con  $5 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub> SARS-CoV-2 il giorno 0. Dodici furetti riceventi alloggiati separatamente sono stati trattati mediante gocce nasali con una preparazione simulata (rossa) o [SARS<sub>HRC</sub>-PEG<sub>4</sub>]<sub>2</sub>-col peptide (verde) 1 e 2 giorni dopo l'inoculazione (DPI) degli animali donatori. I peptidi [SARS<sub>HRC</sub>-PEG<sub>4</sub>]<sub>2</sub>-col per somministrazione intranasale sono stati sciolti a una concentrazione di 6 mg / ml in un tampone acquoso contenente il 2% di DMSO, somministrando una dose finale di 2,7 mg / kg ai furetti (450 µl, ugualmente diviso su entrambe le narici). Gli stock di peptidi e le diluizioni di lavoro avevano IC<sub>50</sub> simili, confermando che i furetti trattati con peptidi venivano dosati giornalmente con quantità comparabili (fig. S7, A e B). Sei ore dopo il secondo trattamento su 2 DPI, un furetto donatore infetto (altamente positivo per SARS-CoV-2 da RT-qPCR) è stato ospitato insieme a quattro furetti riceventi naïve (due trattati simulatamente, due trattati con peptidi). Dopo un periodo di trasmissione di 24 ore in tre gabbie di isolamento ABSL3 filtrate con HEPA e pressurizzate negativamente, il co-housing è stato interrotto e i



furetti donatori, simulati e trattati con peptidi sono stati alloggiati come gruppi separati. Ulteriori [SARS<sub>HRC</sub>-PEG<sub>4</sub>] trattamenti con 2- col peptidi sono stati somministrati ad animali riceventi su 3 e 4 DPI.

I carichi virali (rilevamento dei genomi virali mediante RT-qPCR) per gli animali donatori direttamente inoculati (grigio), animali finte trattati destinatario (rosso) e animali recipienti lipopeptide trattati (verdi) sono mostrate in [Fig. 4, A e B](#). Tutti i furetti donatori inoculati direttamente sono stati infettati in modo produttivo, come dimostrato dal rilevamento del genoma di SARS-CoV-2 in tamponi faringei e nasali, e hanno trasmesso il virus in modo efficiente e riproducibile a tutti i furetti accettori trattati con simulazione ([Fig. 4, A e B](#), curve rosse). L'infezione produttiva da SARS-CoV-2 non è stata rilevata nella gola o nel naso di nessuno degli animali riceventi trattati con peptidi ([Fig. 4, A e B](#), curve verdi). È stato rilevato un leggero aumento della carica virale nei campioni raccolti a 3 DPI (alla fine del co-housing), confermando che gli animali trattati con peptidi erano esposti a SARS-CoV-2. Nella [Fig. 4C](#) l'area sotto la curva (AUC) mostra l'impressionante differenza tra gli animali trattati con simulazione e quelli trattati con peptidi. Nessun virus infettivo è stato isolato dai furetti trattati con lipopeptidi, mentre il virus infettivo è stato rilevato in tutti i furetti trattati con simulazione ([Fig. 4D](#)). I dati sull'isolamento del virus sono correlati con il rilevamento del genoma ([Fig. 4E](#)).

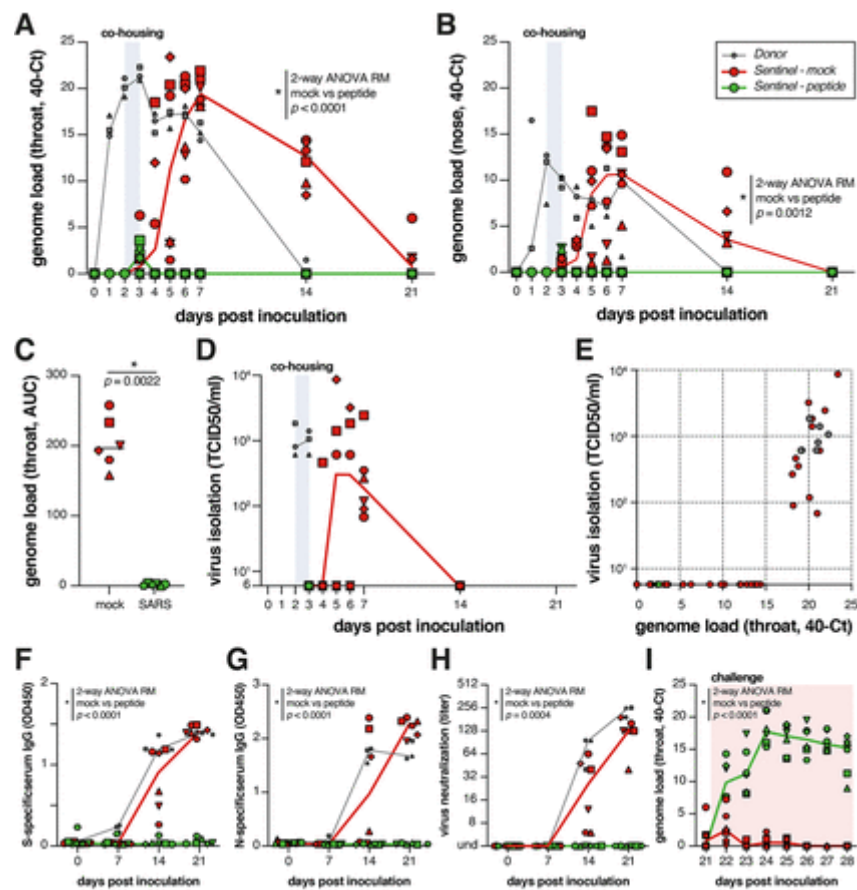


Fig. 4 [SARS HRC -PEG 4] 2 -chol previene la trasmissione di SARS-CoV-2 in vivo. ( A e B ) Cariche virali rilevate nei tamponi faringei (A) e nasali (B) mediante RT-qPCR. ( C ) Confronto dell'area sotto la curva (AUC) dai carichi del genoma riportati in B per sentinelle trattate con mock e peptidi. ( D ) Cariche virali rilevate nei tamponi faringei mediante isolamento del virus su VeroE6. ( E ) Correlazione tra cariche virali nella gola rilevata tramite RT-qPCR e isolamento del virus. La presenza di anticorpi anti-S ( F ) o anti-N ( G ) è stata determinata mediante test IgG ELISA. La presenza di anticorpi neutralizzanti è stata determinata in un test di neutralizzazione del virus ( H ). Gli anticorpi neutralizzanti il virus vengono visualizzati come fattore di diluizione sierica endpoint che blocca la replicazione di SARS-CoV-2. L'inoculazione diretta di SARS-CoV-2 su animali trattati con peptidi o simulati ha portato a un'infezione produttiva solo negli animali precedentemente trattati con peptidi ( I ), in assenza di anticorpi S-specifici, N-specifici e neutralizzanti. Animali donatori mostrati in grigio, animali trattati in modo fittizio in rosso, animali trattati con peptidi in verde. I simboli corrispondono ai singoli animali (definiti nella fig. S6). I grafici a linee in (A), (B), (D) e (F) a (I) collegano la mediana dei singoli animali per punto temporale. I gruppi trattati con mock e peptidi sono stati confrontati tramite misure ANOVA a due vie ripetute [(A), (B) e da (F) a (I)] o test di Mann-Whitney (C).

La sieroconversione si è verificata in furetti donatori e 6/6 animali trattati con simulazioni di 21 DPI, ma in nessuno degli animali riceventi trattati con peptidi, come dimostrato dal test di immunoassorbimento legato all'enzima IgG S e N specifico (ELISA) e dalla neutralizzazione del virus ( [Fig.4, da F a H](#) ). Il successo dell'infezione challenge ha confermato che la replicazione del virus nell'ospite era stata completamente bloccata dal trattamento [SARS<sub>HRC</sub>-PEG<sub>4</sub>]<sub>2</sub>-chol ( [Fig. 4I](#) e fig. S8) e che nessuno degli animali peptidici era protetto, mentre il mock -Gli animali trattati (che si erano sieroconvertiti) erano tutti protetti. Collettivamente, questi dati mostrano che la somministrazione profilattica intranasale del [SARS<sub>HRC</sub>-PEG<sub>4</sub>]<sub>2</sub> peptide colico aveva protetto 6/6 furetti dalla trasmissione e dall'infezione produttiva.

Alla luce della persistenza del lipopeptide dimerico nel polmone murino ( [Fig. 2](#) e fig. S4), abbiamo valutato il potenziale per una singola somministrazione di lipopeptide formulato con saccarosio in un esperimento di trasmissione del furetto due ore prima del co-housing per prevenire o ritardare l'infezione. In questo esperimento, abbiamo utilizzato un lipopeptide dimerico specifico per HPIV-3 come finto controllo (figura S9). Sebbene la formulazione di saccarosio abbia prodotto risultati promettenti in vitro su piccola scala ( [Fig. 3B](#) ), la formulazione su scala più ampia ha prodotto una dissoluzione incompleta. Di conseguenza, il saccarosio formulato [SARS<sub>HRC</sub>-PEG<sub>4</sub>]<sub>2</sub>-il lipopeptide colico è stato somministrato a una concentrazione sostanzialmente inferiore rispetto all'esperimento con il lipopeptide formulato con DMSO (fig. S7, C e D). Tuttavia, il lipopeptide SARS-CoV-2 ha fornito un livello di protezione significativo rispetto al gruppo di controllo HPIV-3 e quattro animali su sei trattati con lipopeptide SARS-

CoV-2 sono stati protetti dalle infezioni. Questo esperimento suggerisce che la profilassi pre-esposizione a somministrazione singola è promettente, mentre la formulazione e il regime di dosaggio ottimali sono un'area di sperimentazione in corso.

Il peptide intranasale [SARS<sub>HRC</sub>-PEG<sub>4</sub>]<sub>2</sub>-col presentato in questo studio è la prima profilassi riuscita che impedisce la trasmissione di SARS-CoV-2 in un modello animale rilevante, fornendo una protezione completa durante un periodo di 24 ore di intenso contatto diretto. Approcci paralleli per prevenire la trasmissione che mirano all'interazione tra S e ACE2 si sono dimostrati promettenti in vitro [ad esempio, l'approccio della "miniproteina" ([24](#))]. Il lipopeptide qui descritto agisce sul dominio S2 dopo l'eliminazione di S1 (fig. S2 e film S1) ed è complementare alle strategie che prendono di mira le funzioni di S1 o mantengono S nella sua conformazione pre-fusione, ad esempio nanobodies sintetici ([25](#), [26](#)). I lipopeptidi inibitori della fusione potrebbero essere utilizzati per la profilassi pre e post esposizione in combinazione con queste strategie e in combinazione con trattamenti [ad esempio, analoghi dei ribonucleosidi ([27](#))] che riducono la replicazione in un individuo infetto trattato. Una combinazione di farmaci che prendono di mira diversi aspetti del ciclo di vita virale è probabilmente l'ideale per questo virus in rapida evoluzione. Da notare, il lipopeptide [SARS<sub>HRC</sub>-PEG<sub>4</sub>]<sub>2</sub>-col è ugualmente attivo contro diverse varianti emergenti di SARS-CoV-2 incluso il D614G così come le recenti varianti di preoccupazioni (B.1.1.7 e B.1.351). Il [SARS<sub>HRC</sub>-PEG<sub>4</sub>]<sub>2</sub>-colpeptide ha una lunga durata, non necessita di refrigerazione e può essere facilmente somministrato, rendendolo particolarmente adatto al trattamento di popolazioni difficili da raggiungere. Questo è fondamentale nel

contesto del COVID-19, che ha raggiunto tutte le comunità con l'onere che ricade in modo sproporzionato sulle comunità a basso reddito o altrimenti emarginate. Questo inibitore della fusione lipopeptidica HRC è fattibile per il progresso per l'uso umano e dovrebbe facilmente tradursi in uno spray nasale sicuro ed efficace o in un inibitore della fusione somministrato per inalazione per la profilassi SARS-CoV-2, a supporto del contenimento della pandemia COVID-19 in corso.

## Riferimenti e note

1. ↵

1. F. Li

*, Struttura, funzione ed evoluzione delle proteine spike del coronavirus . Annu. Rev. Virol. 3 , 237 - 261 ( 2016 ). doi: 10.1146 / annurev-virology-110615-042301 pmid: 27578435*

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

2. ↵

1. M. Hoffmann ,

2. H. Kleine-Weber ,

3. S. Schroeder ,

4. N. Krüger ,

5. T. Herrler ,

6. S. Erichsen ,

7. TS Schiergens ,

8. G. Herrler ,

9. N.-H. Wu ,

10. A. Nitsche ,

11. MA Müller ,

12. C. Drosten ,

### 13. S. Pöhlmann

*, L'ingresso delle cellule SARS-CoV-2 dipende da ACE2 e TMPRSS2 ed è bloccato da un inibitore della proteasi clinicamente testato .*

*Cella 181 , 271 - 280.e8 ( 2020 ). doi: 10.1016 / j.cell.2020.02.052*

*pmid: 32142651*

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

#### 3. ↵

1. Y. Wan ,
2. J. Shang ,
3. R. Graham ,
4. RS Baric ,
5. F. Li

*, Riconoscimento dei recettori da parte del nuovo coronavirus di Wuhan: un'analisi basata su studi strutturali decennali sul coronavirus SARS . J. Virol. 94 , e00127-20 ( 2020 ). doi: 10.1128 / JVI.00127-20 pmid: 31996437*

[Testo completo astratto / GRATUITOGoogle Scholar](#)

#### 4. ↵

1. VK Fuorilegge ,
2. FT Bovier ,
3. MC Mears ,
4. MN Cajimat ,
5. Y. Zhu ,
6. MJ Lin ,
7. A. Addetia ,
8. NAP Lieberman ,
9. V. Peddu ,

10. X. Xie ,
11. P.-Y. Shi ,
12. AL Greninger ,
13. SH Gellman ,
14. DA Bente ,
15. A. Moscona ,
16. M. Porotto

*, Inibizione dell'ingresso di coronavirus in vitro ed ex vivo da parte di un peptide coniugato con lipidi derivato dal dominio HRC della glicoproteina spike SARS-CoV-2 . MBio 11 , e01935-20 ( 2020 ). doi: 10.1128 / mBio.01935-20 pmid: 33082259*

[Testo completo astratto / GRATUITO Google Scholar](#)

5. 1. S. Xia ,
2. L. Yan ,
3. W. Xu ,
4. AS Agrawal ,
5. A. Algaissi ,
6. CK Tseng ,
7. Q. Wang ,
8. L. Du ,
9. W. Tan ,
10. IA Wilson ,
11. S. Jiang ,
12. B. Yang ,
13. L. Lu

*, Un inibitore della fusione pan-coronavirus che prende di mira il dominio HR1 del picco di coronavirus umano . Sci. Adv. 5 ,*

*eaav4580 ( 2019 ). doi: 10.1126 / sciadv.aav4580 pmid: 30989115*

[Testo completo GRATUITO Google Scholar](#)

6. ↵

1. S. Xia ,
2. M. Liu ,
3. C. Wang ,
4. W. Xu ,
5. Q. Lan ,
6. S. Feng ,
7. F. Qi ,
8. L. Bao ,
9. L. Du ,
10. S. Liu ,
11. C. Qin ,
12. F. Sun ,
13. Z. Shi ,
14. Y. Zhu ,
15. S. Jiang ,
16. L. Lu

*, Inibizione dell'infezione da SARS-CoV-2 (precedentemente 2019-nCoV) da parte di un inibitore della fusione pan-coronavirus molto potente che prende di mira la sua proteina spike che ospita un'elevata capacità di mediare la fusione di membrana . Ris. Cella 30 , 343 - 355 ( 2020 ). doi: 10.1038 / s41422-020-0305-x pmid: 32231345*

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

7. ↵

1. Y. Zhu ,



2. D. Yu ,
3. H. Yan ,
4. H. Chong ,
5. Y. He

*, Progettazione di potenti inibitori della fusione di membrana contro SARS-CoV-2, un coronavirus emergente con elevata attività fusogena . J. Virol. 94 , e00635-20 ( 2020 ). doi: 10.1128 / JVI.00635-20 pmid: 32376627*

[Testo completo astratto / GRATUITO Google Scholar](#)

8. ←

1. X. Wang ,
2. S. Xia ,
3. Q. Wang ,
4. W. Xu ,
5. W. Li ,
6. L. Lu ,
7. S. Jiang

*, Inibitori della fusione del coronavirus ad ampio spettro per combattere COVID-19 e altre malattie emergenti del coronavirus . Int. J. Mol. Sci. 21 , 3843 ( 2020 ). doi: 10.3390 / ijms21113843 pmid: 32481690*

[CrossRef Pub Med Google Scholar](#)

9. ←

1. M. Porotto ,
2. B. Rockx ,
3. CC Yokoyama ,
4. A. Talekar ,

5. I. Devito ,
6. LM Palermo ,
7. J. Liu ,
8. R. Cortese ,
9. M. Lu ,
10. H. Feldmann ,
11. A. Pessi ,
12. A. Moscona

*, Inibizione dell'infezione da virus Nipah in vivo: mirare a una fase iniziale dell'attivazione della fusione del paramixovirus durante l'ingresso virale . PLOS Pathog. 6 , e1001168 ( 2010 ). doi: 10.1371 / journal.ppat.1001168 pmid: 21060819*

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

10. ↵

1. A. Pessi ,
2. A. Langella ,
3. E. Capitò ,
4. S. Ghezzi ,
5. E. Vicenzi ,
6. G. Poli ,
7. T. Ketas ,
8. C. Mathieu ,
9. R. Cortese ,
10. B. Horvat ,
11. A. Moscona ,
12. M. Porotto

*, Una strategia generale per dotare i peptidi derivati dalle proteine di fusione naturali di una potente attività antivirale . PLOS ONE 7 , e36833 ( 2012 ). doi: 10.1371 / journal.pone.0036833 pmid: 22666328*

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

11. ←

1. TN Figueira ,
2. DA Mendonça ,
3. D. Gaspare ,
4. MN Melo ,
5. A. Moscona ,
6. M. Porotto ,
7. MARB Castanho ,
8. AS Veiga

*, Collegamenti meccanicistici struttura-stabilità-funzione nell'azione del virus anti-morbillo delle nanoparticelle peptidiche derivatizzate dal tocoferolo . ACS Nano 12 , 9855 - 9865 ( 2018 ). doi: 10.1021 / acsnano.8b01422 pmid: 30230818*

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

- 12.
1. TN Figueira ,
  2. MT Augusto ,
  3. K. Rybkina ,
  4. D. Stelitano ,
  5. MG Noval ,
  6. OE Harder ,
  7. AS Veiga ,
  8. D. Huey ,
  9. CA Alabi ,

10. S. Biswas ,
11. S. Niewiesk ,
12. A. Moscona ,
13. NC Santos ,
14. MARB Castanho ,
15. M. Porotto

*, Efficace targeting in vivo del virus dell'influenza attraverso un peptide tandem inibitore di fusione / penetrazione cellulare ancorato alla membrana plasmatica . Bioconjug. Chem. 29 , 3362 - 3376 ( 2018 ). doi: 10.1021 / acs.bioconjchem.8b00527 pmid: 30169965*

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

13. ←

1. C. Mathieu ,
2. MT Augusto ,
3. S. Niewiesk ,
4. B. Horvat ,
5. LM Palermo ,
6. G. Sanna ,
7. S. Madeddu ,
8. D. Huey ,
9. MARB Castanho ,
10. M. Porotto ,
11. NC Santos ,
12. A. Moscona

*, L' attività antivirale ad ampio spettro per i paramixovirus è modulata dalle proprietà biofisiche dei peptidi inibitori della fusione*

. *Sci. Rep.* 7, 43610 ( 2017 ). doi: 10.1038 / srep43610 pmid: 28344321

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

14. ↵

1. TN Figueira ,
2. LM Palermo ,
3. AS Veiga ,
4. D. Huey ,
5. CA Alabi ,
6. NC Santos ,
7. JC Welsch ,
8. C. Mathieu ,
9. B. Horvat ,
10. S. Niewiesk ,
11. A. Moscona ,
12. MARB Castanho ,
13. M. Porotto

*, L'efficacia in vivo dei peptidi derivati dalla proteina di fusione del virus del morbillo è modulata dalle proprietà di autoassemblaggio e residenza sulla membrana . J. Virol. 91 , e01554-16 ( 2016 ). doi: 10.1128 / JVI.01554-16 pmid: 27733647*

[Testo completo astratto / GRATUITOGoogle Scholar](#)

15. ↵

1. L. Zhang ,
2. CB Jackson ,
3. H. Mou ,
4. A. Ojha ,
5. H. Peng ,

6. BD Quinlan ,
7. ES Rangarajan ,
8. A. Pan ,
9. A. Vanderheiden ,
10. MS Suthar ,
11. W. Li ,
12. T. Izard ,
13. C. Rader ,
14. M. Farzan ,
15. H. Choe

*, La mutazione D614G della proteina spike SARS-CoV-2 aumenta la densità e l'infettività dei picchi virionici . Nat. Commun. 11 , 6013 ( 2020 ). doi: 10.1038 / s41467-020-19808-4 pmid: 33243994*

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

16. ←

1. A. Muik ,
2. A.-K. Wallisch ,
3. B. Sängler ,
4. KA Swanson ,
5. J. Mühl ,
6. W. Chen ,
7. H. Cai ,
8. D. Maurus ,
9. R. Sarkar ,
10. Ö. Türeci ,
11. PR Dormitzer ,
12. U. Şahin

*, Neutralizzazione dello pseudovirus B.1.1.7 della linea SARS-CoV-2 da parte dei sieri umani indotti dal vaccino BNT162b2 . Science eabg6105 ( 2021 ). doi: 10.1126 / science.abg6105 pmid: 33514629*  
[AstrattoGoogle Scholar](#)

17. ←

K. Wu, AP Werner, JI Moliva, M. Koch, A. Choi, GBE Stewart-Jones, H. Bennett, S. Boyoglu-Barnum, W. Shi, BS Graham, A. Carfi, KS Corbett, RA Seder, DK Edwards, il vaccino mRNA-1273 induce anticorpi neutralizzanti contro mutanti spike dalle varianti globali di SARS-CoV-2. bioRxiv 2021.01.25.427948 [Preprint]. 25 gennaio 2021. <https://doi.org/10.1101/2021.01.25.427948> .

18. ←

1. AZ Mykytyn ,
2. TI Breugem ,
3. S. Riesebosch ,
4. D. Schipper ,
5. PB van den Doel ,
6. RJ Rottier ,
7. MM Lamers ,
8. BL Haagmans

*, L'ingresso di SARS-CoV-2 negli organoidi delle vie aeree umane è mediato dalla serina proteasi e facilitato dal sito di scissione multibasica . eLife 10 , e64508 ( 2021 ). doi: 10.7554 / eLife.64508 pmid: 33393462*

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

19. ←

1. M. Hoffmann ,
2. K. Mösbauer ,

3. H. Hofmann-Winkler ,
4. A. Kaul ,
5. H. Kleine-Weber ,
6. N. Krüger ,
7. NC Gassen ,
8. MA Müller ,
9. C. Drosten ,
10. S. Pöhlmann

*, La cloroquina non inibisce l'infezione delle cellule polmonari umane con SARS-CoV-2 . Nature 585 , 588 - 590 ( 2020 ). doi: 10.1038 / s41586-020-2575-3 pmid: 32698190*

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

20. ↵

1. M. Richard ,
2. A. Kok ,
3. D. de Meulder ,
4. TM Bestebroer ,
5. MM Lamers ,
6. NMA Okba ,
7. M. Fentener van Vlissingen ,
8. B. Rockx ,
9. BL Haagmans ,
10. MPG Koopmans ,
11. RAM Fouchier ,
12. S. Herfst

*, SARS-CoV-2 viene trasmesso per contatto e per via aerea tra i furetti . Nat. Commun. 11 , 3496 ( 2020 ). doi: 10.1038 / s41467-*



020-17367-2 pmid: 32641684

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

21. ↵

1. VJ Munster ,
2. E. de Wit ,
3. JMA van den Brand ,
4. S. Herfst ,
5. EJA Schrauwen ,
6. TM Bestebroer ,
7. D. van de Vijver ,
8. CA Boucher ,
9. M. Koopmans ,
10. GF Rimmelzwaan ,
11. T. Kuiken ,
12. ADME Osterhaus ,
13. RAM Fouchier

*, Patogenesi e trasmissione del virus influenzale di origine suina 2009 A (H1N1) nei furetti . Science 325 , 481 - 483 ( 2009 ). doi: 10.1126 / science.1177127 pmid: 19574348*

[Testo completo astratto / GRATUITOGoogle Scholar](#)

22. ↵

1. BE Martina ,
2. BL Haagmans ,
3. T. Kuiken ,
4. RAM Fouchier ,
5. GF Rimmelzwaan ,
6. G. Van Amerongen ,
7. JSM Peiris ,

8. W. Lim ,

9. ADME Osterhaus

, *Infezione da virus SARS di gatti e furetti* . *Nature* 425 , 915 ( 2003 ).

doi: 10.1038 / 425915a pmid: 14586458

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

23. ←

1. YI Kim ,

2. S.-G. Kim ,

3. S.-M. Kim ,

4. E.-H. Kim ,

5. S.-J. Parco ,

6. K.-M. Yu ,

7. J.-H. Chang ,

8. EJ Kim ,

9. S. Lee ,

10. MAB Casel ,

11. J. Uhm ,

12. SM. Canzone ,

13. HW Jeong ,

14. VD Lai ,

15. Y. Kim ,

16. BS Chin ,

17. J.-S. Parco ,

18. K.-H. Chung ,

19. S.-S. Foo ,

20. H. Poo ,

21. I.-P. Mo ,

22. O.-J. Lee ,

23. RJ Webby ,

24. JU Jung ,

25. YK Choi

*, Infezione e rapida trasmissione di SARS-CoV-2 nei furetti . Cell Host Microbe 27 , 704 - 709.e2 ( 2020 ). doi: 10.1016 / j.chom.2020.03.023 pmid: 32259477*

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

24. ←

1. L. Cao ,

2. I. Goreschnik ,

3. B. Coventry ,

4. Custodia JB ,

5. L. Miller ,

6. L. Kozodoy ,

7. RE Chen ,

8. L. Carter ,

9. Pareti AC ,

10. Y.-J. Parco ,

11. E.-M. Strauch ,

12. L. Stewart ,

13. MS Diamond ,

14. D. Veessler ,

15. D. Baker

*, Progettazione de novo di inibitori della miniproteina SARS-CoV-2 picomolari . Science 370 , 426 - 431 ( 2020 ). doi: 10.1126 / science.abd9909 pmid: 32907861*

[Testo completo astratto / GRATUITOGoogle Scholar](#)

25. ←

M. Schoof, B. Faust, RA Saunders, S. Sangwan, V. Rezelj, N. Hoppe, M. Boone, CB Billesbølle, C. Puchades, CM Azumaya, HT Kratochvil, M. Zimanyi, I. Deshpande, J. Liang, S. Dickinson, HC Nguyen, CM Chio, GE Merz, MC Thompson, D. Diwanji, K. Schaefer, AA Anand, N. Dobzinski, BS Zha, CR Simoneau, K. Leon, KM White, US Chio, M. Gupta, M. Jin, F. Li, Y. Liu, K. Zhang, D. Bulkeley, M. Sun, AM Smith, AN Rizo, F. Moss, AF Brilot, S. Pourmal, R. Trenker, T. Pospiech, S. Gupta, B. Barsi-Rhyne, V. Belyy, AW Barile-Hill, S. Nock, Y. Liu, NJ Krogan, CY Ralston, DL Swaney, A. García-Sastre, M. Ott, M. Vignuzzi, QCRG Structural Biology Consortium, P. Walter, A. Manglik, un nanobody sintetico ultra potente neutralizza SARS-CoV-2 bloccando Spike in una conformazione inattiva. bioRxiv 2020.08.08. 23846 [Preprint]. Il 17 agosto 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.08.08.238469> .

26. ←

1. M. Schoof ,
2. B. Faust ,
3. RA Saunders ,
4. S. Sangwan ,
5. V. Rezelj ,
6. N. Hoppe ,
7. M. Boone ,
8. CB Billesbølle ,
9. C. Puchades ,
10. CM Azumaya ,
11. HT Kratochvil ,
12. M. Zimanyi ,
13. I. Deshpande ,

14. J. Liang ,
15. S. Dickinson ,
16. HC Nguyen ,
17. CM Chio ,
18. GE Merz ,
19. MC Thompson ,
20. D. Diwanji ,
21. K. Schaefer ,
22. AA Anand ,
23. N. Dobzinski ,
24. BS Zha ,
25. CR Simoneau ,
26. K. Leon ,
27. KM bianco ,
28. US Chio ,
29. M. Gupta ,
30. M. Jin ,
31. F. Li ,
32. Y. Liu ,
33. K. Zhang ,
34. D. Bulkley ,
35. M. Sun ,
36. AM Smith ,
37. AN Rizo ,
38. F. Moss ,
39. AF Brilot ,
40. S. Pourmal ,
41. R. Trenker ,

42. T. Pospiech ,
43. S. Gupta ,
44. B. Barsi-Rhyne ,
45. V. Belyy ,
46. AW Barile-Hill ,
47. S. Nock ,
48. Y. Liu ,
49. NJ Krogan ,
50. CY Ralston ,
51. DL Swaney ,
52. A. García-Sastre ,
53. M. Ott ,
54. M. Vignuzzi ,
55. P. Walter ,
56. A. Manglik ; Consorzio di biologia strutturale QCRG

*, Un nanobody sintetico ultrapotente neutralizza SARS-CoV-2 stabilizzando Spike inattivo . Science 370 , 1473 - 1479 ( 2020 ). doi: 10.1126 / science.abe3255 pmid: 33154106*

[Testo completo astratto / GRATUITO Google Scholar](#)

27. ←

1. RM Cox ,
2. JD Wolf ,
3. RK Plemper

*, L'analogo del ribonucleoside MK-4482 / EIDD-2801 somministrato terapeutivamente blocca la trasmissione di SARS-CoV-2 nei furetti . Nat. Microbiol. 6 , 11 - 18 ( 2021 ). doi: 10.1038 / s41564-020-00835-2 pmid: 33273742*

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

28. ↵

1. TA Halgren ,
2. BL Bush

*, Il campo di forza molecolare di Merck (MMFF94). Estensione e applicazione . Abstr. Pap. Am. Chem. Soc. 212 , 2-Comp ( 1996 ).*

[Google Scholar](#)

29. 1. RB Best ,
2. X. Zhu ,
3. J. Shim ,
4. PEM Lopes ,
5. J. Mittal ,
6. M. Feig ,
7. AD Mackerell Jr

*., Ottimizzazione del campo di forza della proteina all-atomo CHARMM additivo mirato a migliorare il campionamento degli angoli  $\varphi$ ,  $\psi$  e di  $\chi_2$  diedri della catena laterale  $\chi_1$  e  $\chi_2$ . J. Chem. Teoria Comput. 8 , 3257 - 3273 ( 2012 ). doi: 10.1021 / ct300400x pmid: 23341755*

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

30. 1. SJ Marrink ,
2. HJ Risselada ,
3. S. Yefimov ,
4. DP Tieleman ,
5. AH de Vries

*, Il campo di forza MARTINI: modello a grana grossa per simulazioni biomolecolari . J. Phys. Chem. B 111 , 7812 - 7824 ( 2007 ). doi: 10.1021 / jp071097f pmid: 17569554*

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

31. 1. Y. Cai ,  
2. J. Zhang ,  
3. T. Xiao ,  
4. H. Peng ,  
5. SM Sterling ,  
6. RM Walsh Jr. ,  
7. S. Rawson ,  
8. S. Rits-Volloch ,  
9. B. Chen

*, Distinti stati conformazionali della proteina spike SARS-CoV-2 . Science 369 , 1586 - 1592 ( 2020 ). doi: 10.1126 / science.abd4251 pmid: 32694201*

[Testo completo astratto / GRATUITOGoogle Scholar](#)

32. 1. S. Hakansson-McReynolds ,  
2. S. Jiang ,  
3. L. Rong ,  
4. M. Caffrey

*, Struttura della soluzione della sindrome respiratoria acuta grave-coronavirus eptad ripetere 2 dominio nello stato di prefusione . J. Biol. Chem. 281 , 11965 - 11971 ( 2006 ). doi: 10.1074 / jbc.M601174200 pmid: 16507566*

[Testo completo astratto / GRATUITOGoogle Scholar](#)

33. 1. GJ van Doornum ,



2. M. Schutten ,
3. J. Voermans ,
4. GJ Guldemeester ,
5. HG Niesters

*, Sviluppo e implementazione dell'amplificazione degli acidi nucleici in tempo reale per la rilevazione di infezioni da enterovirus rispetto alla coltura rapida di vari campioni clinici . J. Med. Virol. 79 , 1868 - Anno 1876 ( 2007 ). doi: 10.1002 / jmv.21031 pmid: 17935176*

[CrossRefPubMedWeb of ScienceGoogle Scholar](#)

34. ←

1. VM Corman ,
2. O. Landt ,
3. M. Kaiser ,
4. R. Molenkamp ,
5. A. Meijer ,
6. DKW Chu ,
7. T. Bleicker ,
8. S. Brünink ,
9. J. Schneider ,
10. ML Schmidt ,
11. DGJC Mulders ,
12. BL Haagmans ,
13. B. van der Veer ,
14. S. van den Brink ,
15. L. Wijsman ,
16. G. Goderski ,
17. J.-L. Romette ,
18. J. Ellis ,

19. M. Zambon ,
20. M. Peiris ,
21. H. Goossens ,
22. C. Reusken ,
23. MPG Koopmans ,
24. C. Drosten

*, Rilevamento del nuovo coronavirus del 2019 (2019-nCoV) mediante RT-PCR in tempo reale . Euro Surveill. 25 , 2000045 ( 2020 ). doi: 10.2807 / 1560-7917.ES.2020.25.3.2000045 pmid: 31992387*

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

**Ringraziamenti:** Ringraziamo JS Orange, SG Kernie, M. Lamers, E. Verveer, A. Mykytyn e M. Koopmans per i loro contributi a questo studio. **Finanziamento:** questo lavoro è stato sostenuto da finanziamenti del National Institutes of Health (AI146980, AI121349 e NS091263 a MP, AI114736 a AM, HHSN272201400008C a SH), Sharon Golub Fund presso la Columbia University Irving Medical Center (CUIMC), Children's Health Innovation Nucleation Fund del Dipartimento di Pediatria del CUIMC e un premio COVID-19 dell'Harrington Discovery Institute all'AMAM è la Sherie L. Morrison Professor of Immunology. **Contributi dell'autore:** Concettualizzazione: RDdV, SHG, CAA, RLdS, AM, MP Analisi formale: RDdV, KSS, FTB, CP, NVD, CAA, RLdS, AM, MP Acquisizione di fondi: BLH, RLdS, AM, MP Investigazione: RDdV, KSS, FTB , CP, JK, DN, KNS, SH, JD-B., SB, GM, NVD, SHG, CAA, RLdS, AM, MP Risorse: BLH, BR, NVD, CAA, RLdS, AM, MP Supervisione: RLdS, NVD, CAA, AM, MP Visualization: RDdV, KS, FTB, JK, GM, NVD, SHG, CAA, AM, MP Writing - bozza originale: RDdV, RLdS, AM, MP Writing - versione finale: tutti i coautori forniti feedback

alla bozza finale. **Interessi in competizione:** RDdV, FTB, RLdS, AM e MP sono elencati come inventori di [SARS<sub>HRC</sub>-PEG<sub>4</sub>]<sub>2</sub>-chol su una domanda di brevetto provvisoria che copre i risultati riportati in questo manoscritto. **Disponibilità di dati e materiali:** tutti i dati sono disponibili nel manoscritto o nei materiali supplementari. I materiali sono disponibili da MTA con i Trustees della Columbia University, NYC. Questo lavoro è concesso in licenza in base a una licenza Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0), che consente l'uso, la distribuzione e la riproduzione senza restrizioni con qualsiasi mezzo, a condizione che il lavoro originale sia citato correttamente. Per visualizzare una copia di questa licenza, visitare <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. Questa licenza non si applica a figure / foto / opere d'arte o altri contenuti inclusi nell'articolo che sono accreditati a terzi; ottenere l'autorizzazione dal titolare dei diritti prima di utilizzare tale materiale. I reagenti sono disponibili presso gli autori corrispondenti in base a un accordo materiale con la Columbia University.