

# “Meccanismi Patogenetici del COVID e Vaccini per SARS-CoV-2”

**Sergio Abrignani**

- Istituto Nazionale Genetica Molecolare “*Romeo ed Enrica Invernizzi*”, Milano
- Cattedra di immunologia, Università degli Studi di Milano

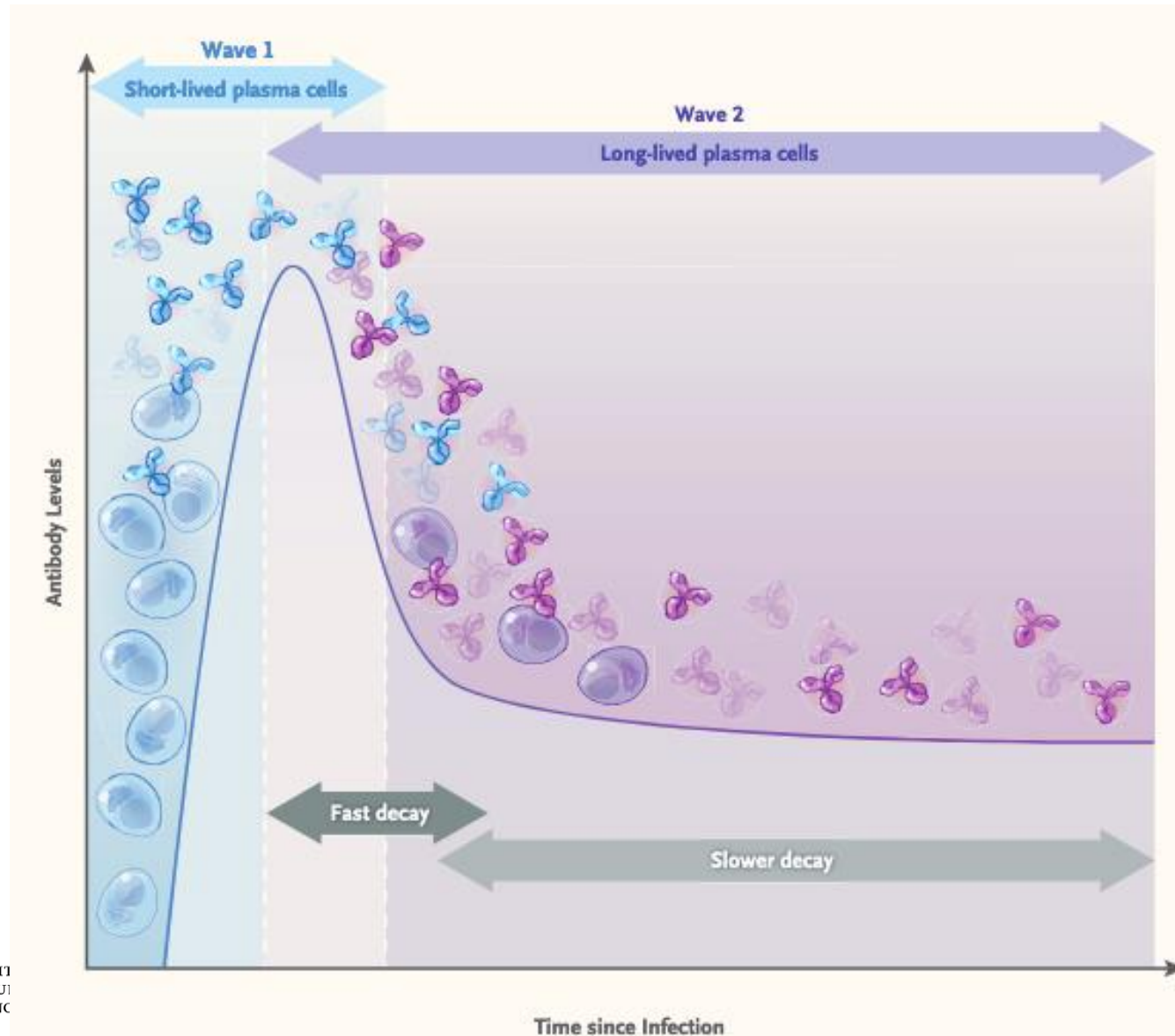
4 febbraio 2021

# We are understanding how human immune system responds to an acute viral infection

- For the first time, we are studying with incredible depth immune responses occurring in an acute viral infection in man.
- Studies on Sars-Cov2 are misled by studies on chronic infections (HBV, HCV, HIV, HPV, EBV etc)
- Eventually, old immunological concepts are now benchmarking assessment of immune responses in covid patients

# It is normal to have a sizeable drop in Ab titres few months after infection resolution

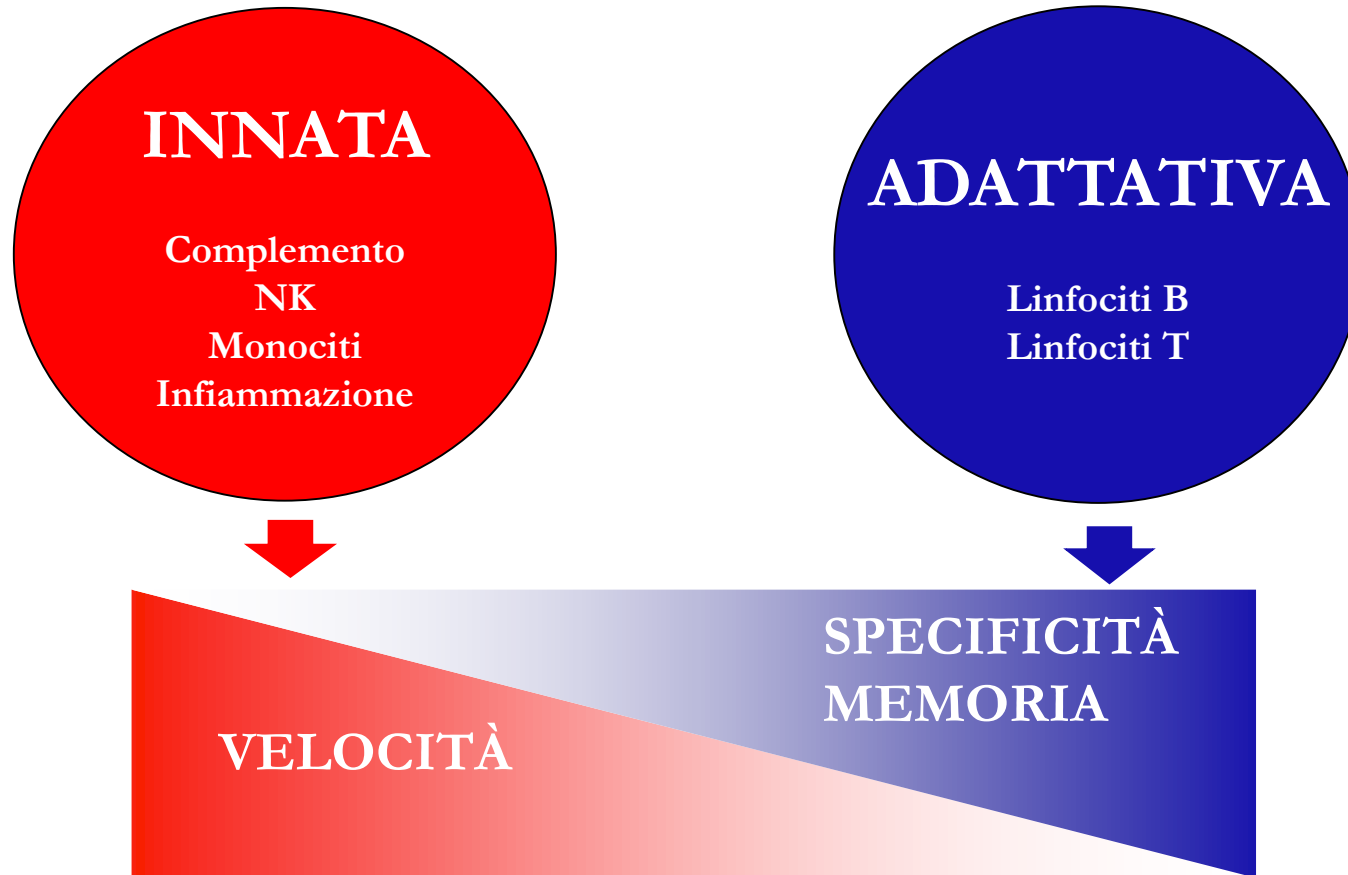
Antibody responses peak few weeks after infection, and decline fast in 1-2 months when short-lived plasma cells disappear and Ab memory responses are kept by long-lived plasma cells



# SARS-CoV-2 è il coronavirus responsabile del Covid-19

- È moderatamente/molto infettivo ( $R_0$  è 2.5-3.5).
- Causa il 100% di infezioni acute, nessun caso cronico. La maggioranza delle infezioni (soprattutto in giovani e adulti) è asintomatica
- Il 99% dei soggetti infettati risolve l'infezione entro 2-8 settimane (se in terapia, il tempo di risoluzione è inversamente proporzionale alle dosi di cortisone)
- 0.5-1% di soggetti infettati, principalmente pazienti fragili, muore.
- Abbiamo solo farmaci sintomatologici: Anti-trombotici, anti-infiammatori, ossigeno. Ma da oggi anche anticorpi specifici che sono efficaci nelle fasi iniziali, virus dipendenti, della malattia.
- La risoluzione o le sue complicanze maggiori sono entrambe dovute a diverse componenti della risposta immunitaria.
- Due vaccini a base di RNA e uno a base di vettori virali sono già disponibili e almeno altri 3 sono in arrivo entro un anno.

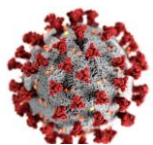
# Le due risposte del sistema immunitario



I vaccini si basano sulla risposta immunitaria adattativa

# Infezione da SARS-Cov2 e COVID-19, la malattia che essa può causare

Infezione da SARS-CoV-2



60%  
asintomatici

40%  
sintomatici

Decorso Covid-19

Fase Virus-dipendente

Risposta immunitaria  
**ADATTATIVA**  
Risoluzione (entro 2-3 settimane)

Buona efficacia  
degli  
**anticorpi  
monoclonali**

Risposta immunitaria  
**INNATA**

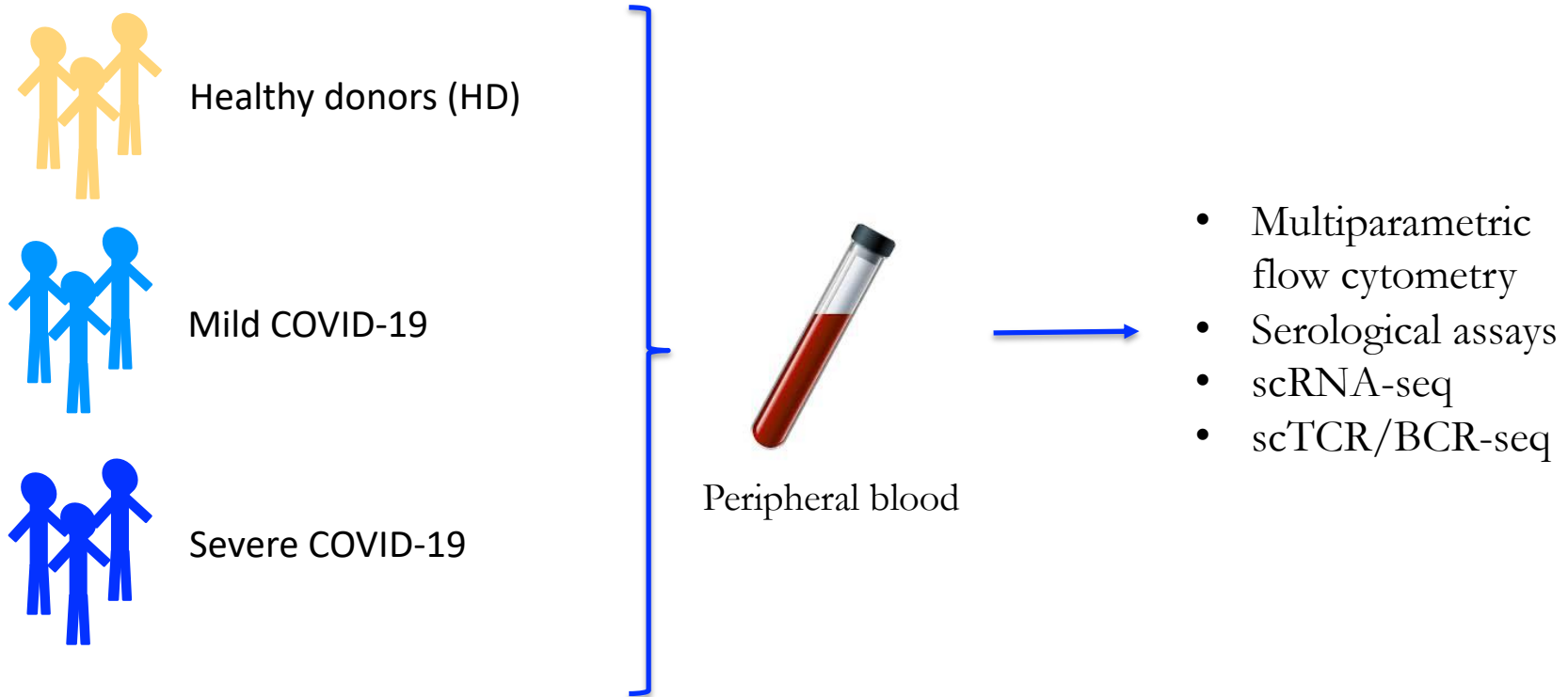
1. Tempesta citochinica
2. CID
3. Insufficienza multiorgano
4. Complicanze sistemiche

Fase Virus-indipendente

# Covid Disease Immunoediting

- The great majority (about 99%) of patients resolve infection within 2-6 weeks, because of virus-dependent «appropriate» adaptive (T & B) immune responses that is suppressed by steroids.
- A minority (about 1%) of patients develop a severe lung disease, and about 1% will die of multiorgans failure, likely because of virus-independent «inappropriate» overexcited innate immune responses
- Is there room for immunotherapy of severe Covid-19?  
Assess course of disease in Autoimmune or Cancer patients treated with immunotherapies

We performed **integrated phenotypic, transcriptional and repertoire analyses at single-cell resolution** on healthy donors, mild and severe patients' PBMCs, during the acute phase of the disease, recovery and we are following up over time.



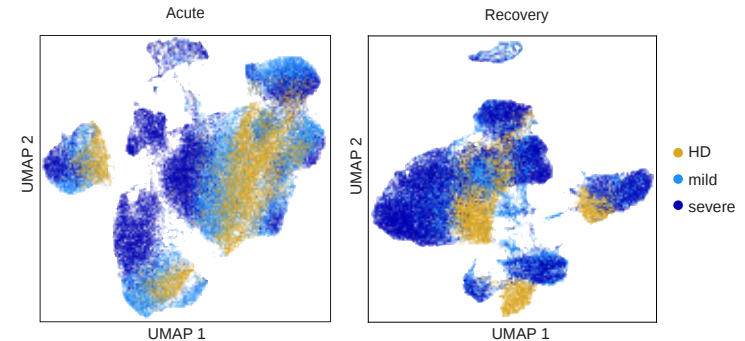
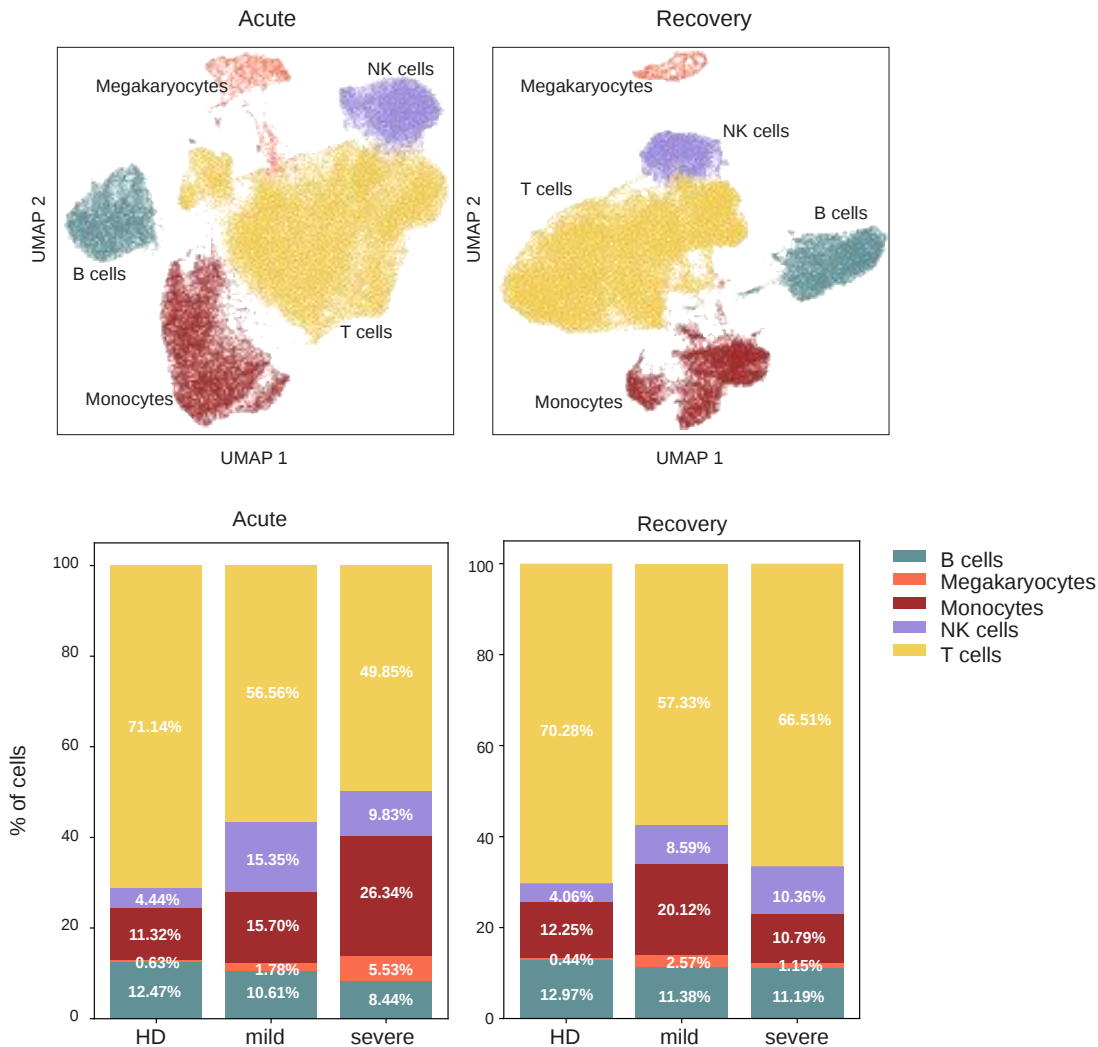
## *Strenght of the study: Single T-cell analyses*

We are assessing in peripheral T and B cells:

- 1) Cell phenotypes
- 2) Effector Functions
- 3) Clonal expansion/size
- 4) TcR & BcR Repertoire
- 5) Antigen specificty

*Weakness of the study: we do not have tissutal cells*

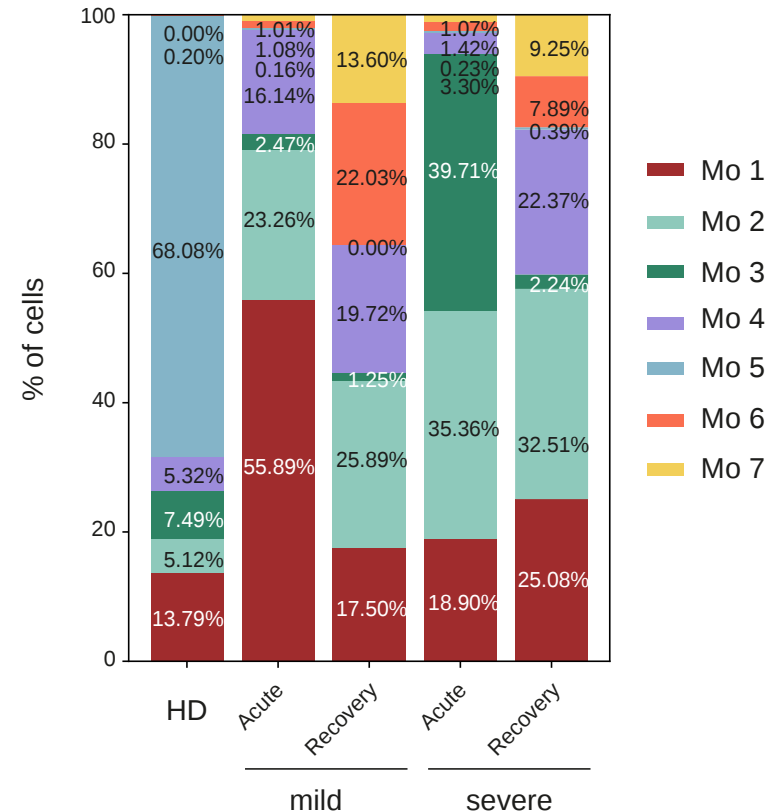
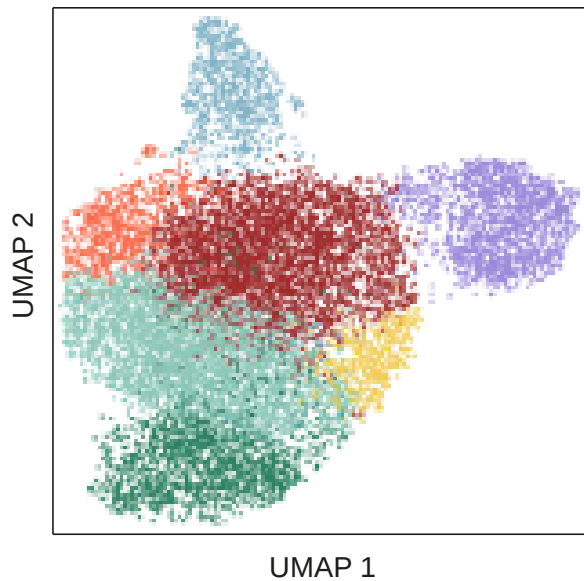
# scRNA-seq in total PBMCs identifies the main circulating immune cell populations



COVID-19 disease causes a graded transcriptional change from HD to mild and severe patients in acute phase that persist upon recovery.

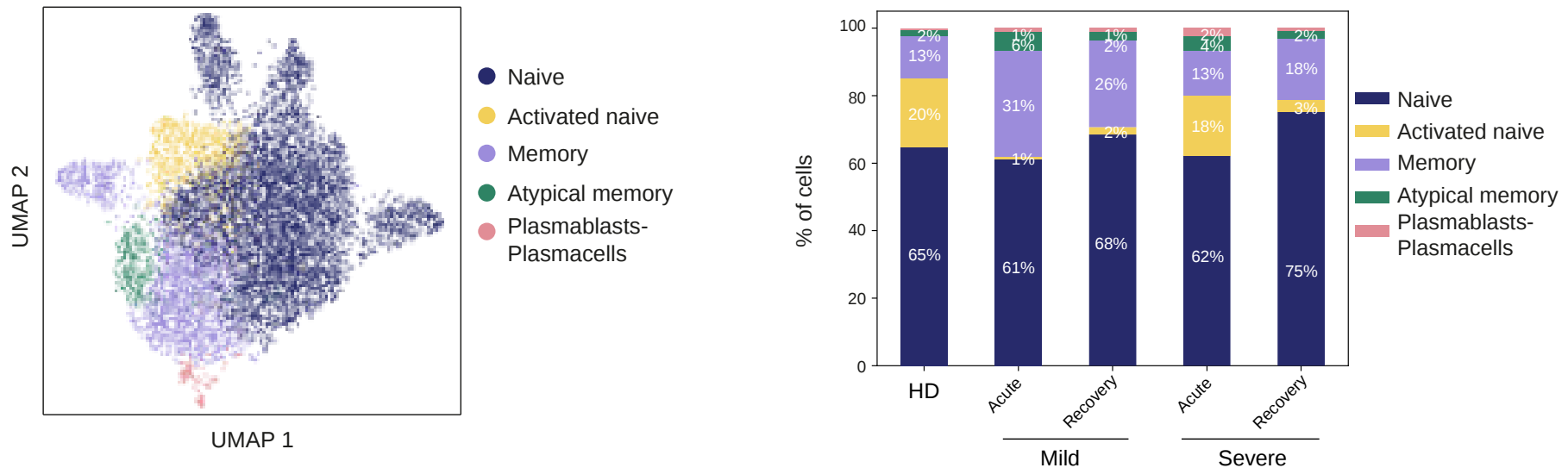
**During acute phase T cells are reduced in COVID-19 patients, while monocytes and megakaryocytes increase their relative abundance.**

# Transcriptional analysis of peripheral monocytes identifies clusters enriched in specific patients' cohorts



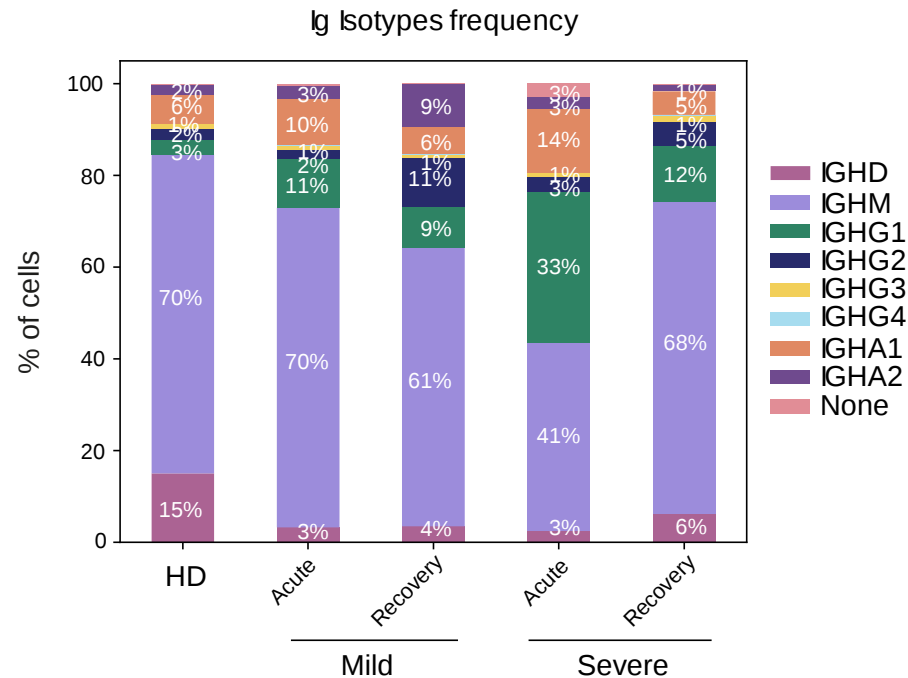
During acute phase **mild and severe COVID-19 patients are characterized by the prevalence of monocytes clusters 1 and 3 respectively**. Cluster 1 is defined by high expression of HLA-II genes, while cluster 3 by the induction of a type I IFN response.

# Transcriptional analysis reveals six B cell subpopulations



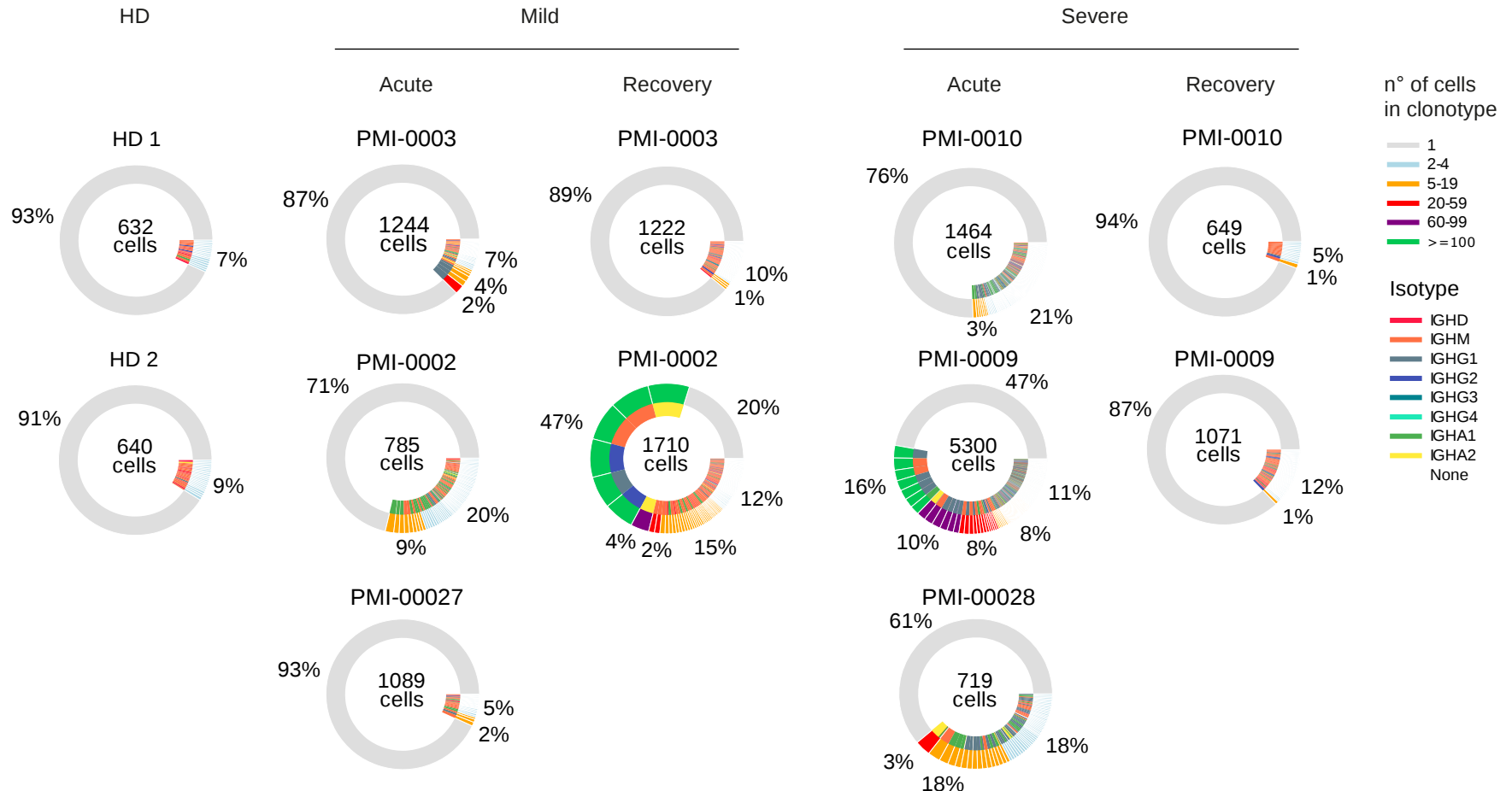
Mild COVID-19 patients have increased abundance of memory B lymphocytes. During the acute immune response, B cells from COVID-19 patients were also characterized by the **enrichment of an atypical memory population**

# Single-cell BCR sequencing describes immunoglobulin isotype abundance



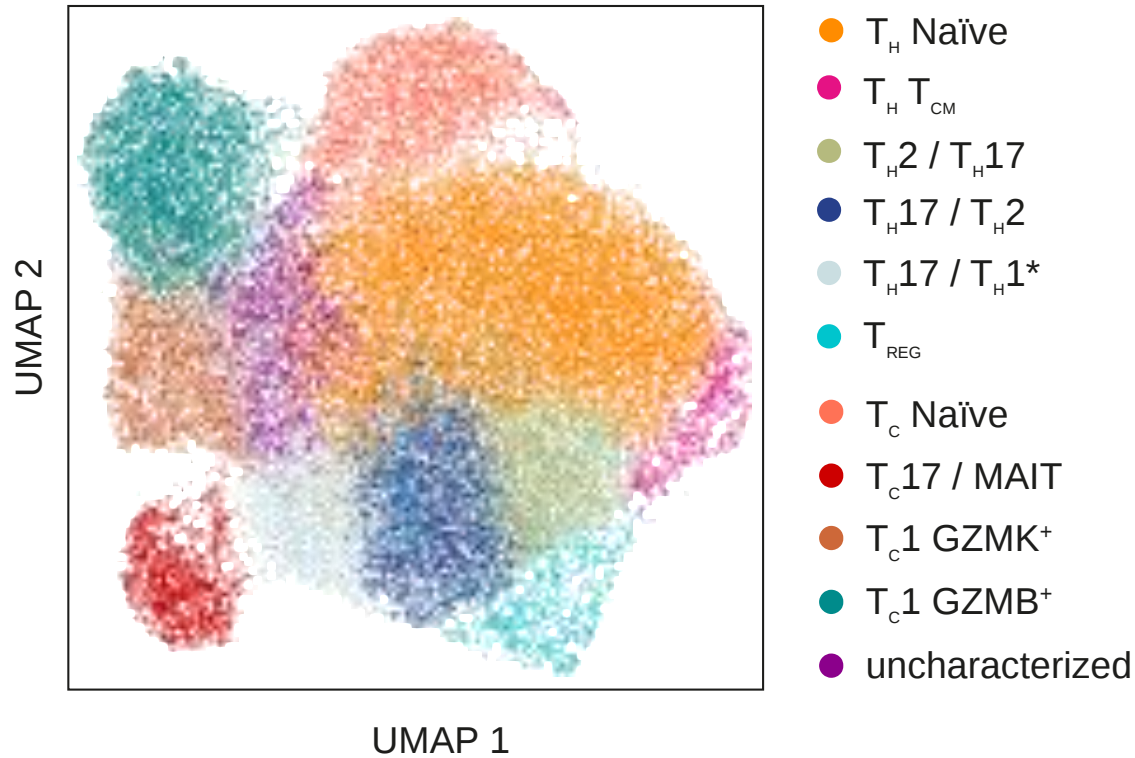
**IgM is the dominant isotype across all conditions. IgG1 and IgA1 increase in mild and severe COVID-19 patients in acute phase, while IgG2 increase upon recovery.**

# Clonal expansion in peripheral B cells in COVID-19 patients

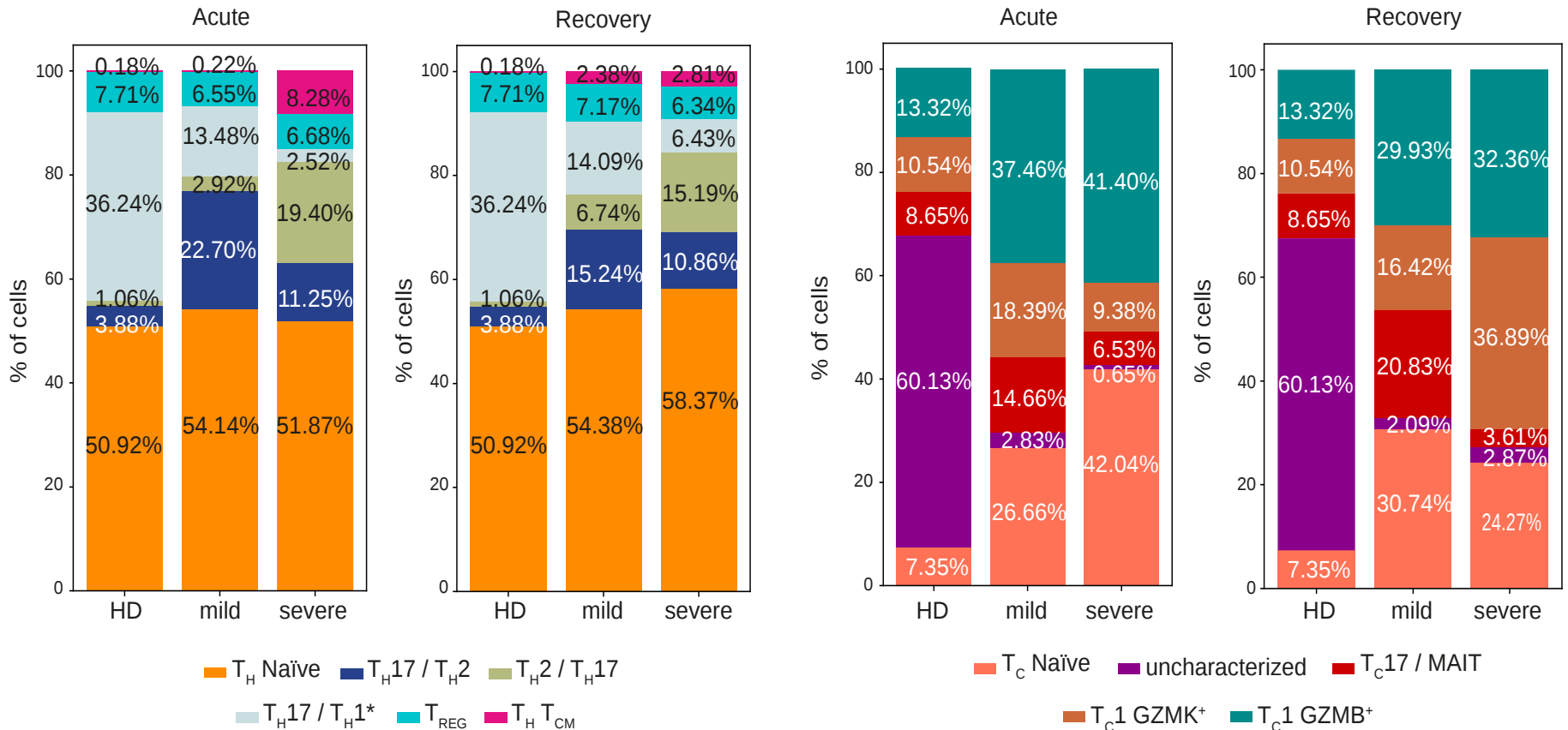


Clonal expansion in peripheral blood is higher in severe patients in acute phase and is overall reduced upon recovery, when they probably compartmentalise to lymphoid organs

# Transcriptional analysis identifies 11 T cell clusters (6 CD4<sup>+</sup> and 5 CD8<sup>+</sup>)

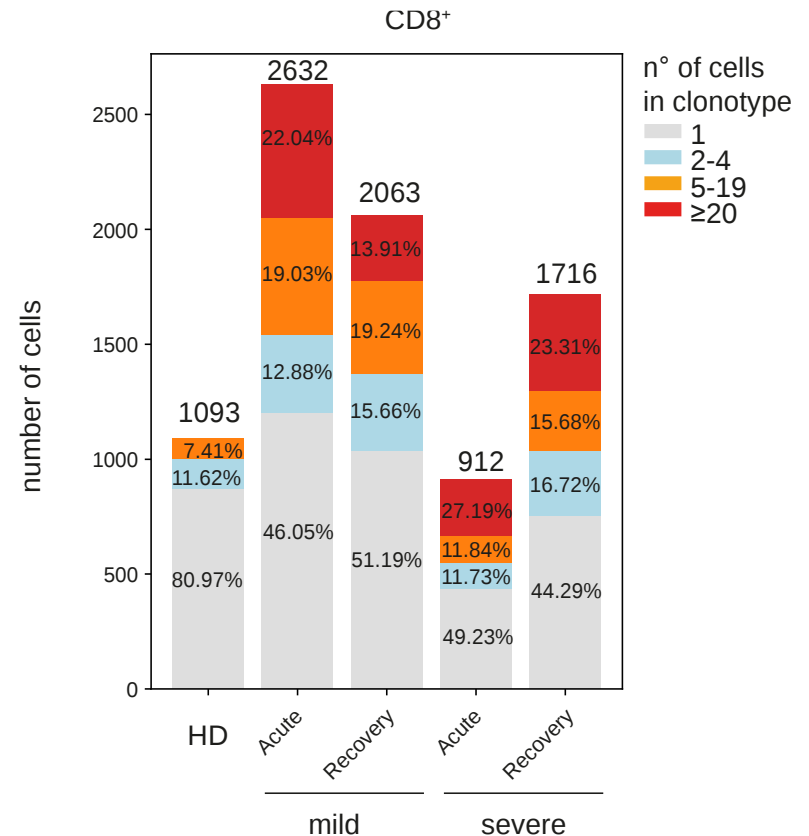
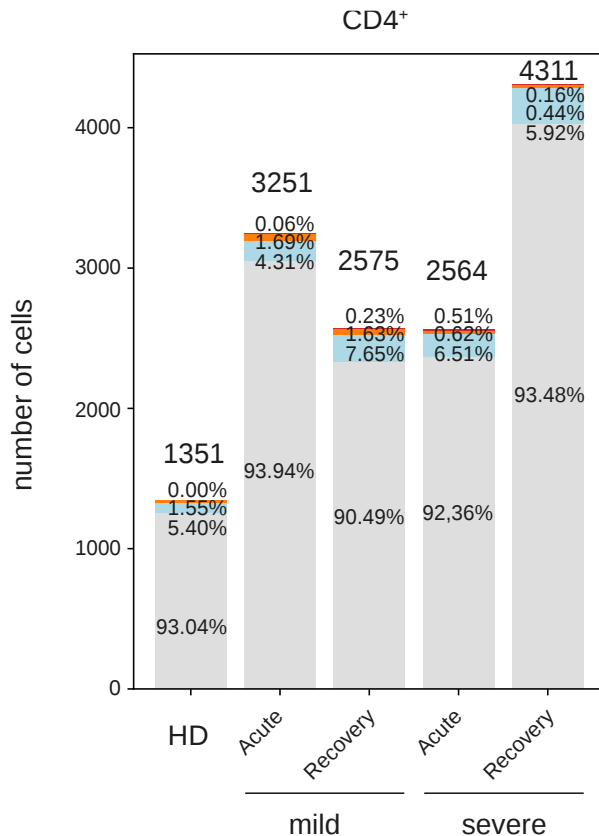


# T cell landscape is remodeled in COVID-19 patients

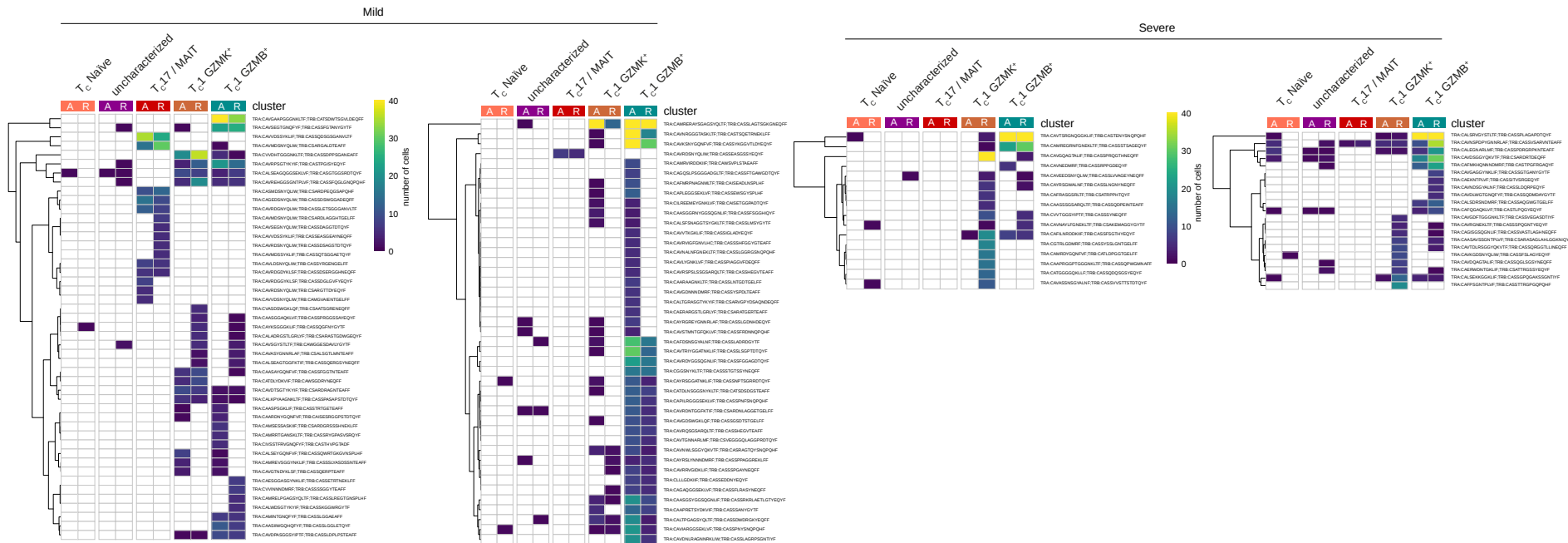


The CD4<sup>+</sup> are skewed toward a T<sub>H</sub>2 response, with the appearance of a new T<sub>CM</sub> subset. The CD8<sup>+</sup> are characterized by GZMB<sup>+</sup> and GZMK<sup>+</sup> cells, while T<sub>C</sub>17/MAIT cells are enriched in mild patients.

# Single-cell TCR sequencing highlights high CD8<sup>+</sup> and limited CD4<sup>+</sup> clonal expansion in PBMCs of COVID-19 patients



# Highly expanded CD8<sup>+</sup> clonotypes are maintained from acute to recovery phase



Some clonotypes have promiscuous identity as they are shared among different subsets

# Interim results from patients' peripheral blood

- Remodeling of the T and B cell populations
- Antibody response is mainly directed to N and RBD, and sera from severe patients have higher neutralising activity
- **Single-cell transcriptional analysis reveals that monocytes from severe COVID-19 patients have high expression of type I IFN response and reduced HLA-II genes**
- **scRNA-seq shows increase of memory B lymphocytes in mild patients in acute phase.** There is polyclonal expansion of B cells
- **CD8<sup>+</sup> cells are characterized by an increased in GZMK<sup>+</sup> cells and T<sub>C</sub>17/MAIT and scTCR-seq reveals that T cell clonal expansion occurs primarily in the CD8<sup>+</sup> populations with expanded clones maintained from acute to recovery phases**
- There is a CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>2-skewed response in severe COVID-19 and **TcRs scRNA-seq of CD4<sup>+</sup> T cells show limited clonal expansion and promiscuous effector functions**

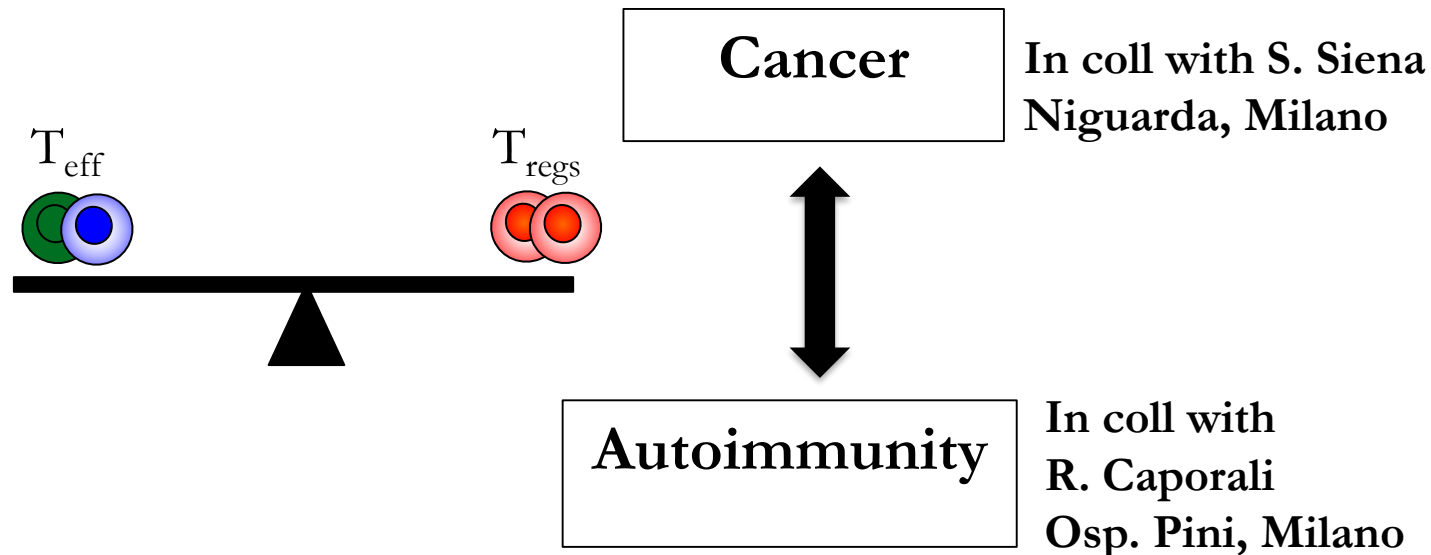
# What's next

- 1) Assess duration of memory responses
- 2) Assess Ag specificity of the clonally expanded B, CD4 and CD8 lymphocytes
- 3) Try to investigate Tissue immune responses in Lung biopsies from Covid-19 patients

# SARS-Cov2 pathogenesis thought by immunotherapy

We are assessing immune responses to Sars-Cov2 occurring in autoimmune or cancer patients treated with immunoregulatory drugs:

- 1) Autoimmune pts: Anti-TNF, IL1, IL6, IL23 etc
- 2) Tumor patients: Anti-CTLA4, PD1, PDL1



# **Abbiamo bisogno di un vaccino anti-Covid19 perchè:**

- Anche se l'incidenza dovesse temporaneamente diminuire, senza misure di contenimento si avrà in futuro una situazione pandemica fuori controllo.
- Non sparirà da solo come ha fatto SARS-CoV-1.
- La maggioranza degli individui infettati (50-60%) è asintomatica.
- È molto improbabile che farmaci antivirali possano eradicare l'infezione, la cureranno bene.

## **Sapevamo che sarebbe stato relativamente facile fare il vaccino perchè:**

- Si tratta di un'infezione acuta che viene risolta spontaneamente in alcune settimane grazie alla risposta immunitaria indotta dall'infezione.
- Non esiste una forma cronica di Covid19 (quantunque l'uso di steroidi, molto utili negli stadi complicati dell'infezione, dati negli stadi precoci allunghi i tempi della risoluzione, passando da settimane a mesi).
- Il virus muta relativamente poco rispetto all'influenza o ad altri virus.

**La risposta immunitaria è protettiva perchè induce:**

- Anticorpi neutralizzanti, prodotti da linfociti B
- Linfociti T CD4 pro-infiammatori
- Linfociti T CD8 killer

**Tutti i più di 300 vaccini in sviluppo, vogliono indurre anticorpi, contro la proteina Spike, capaci di neutralizzare il legame del virus al recettore ACE2 sulle cellule umane.**

**La risposta linfocitaria T CD4 gioca un ruolo fondamentale nell'innescare di qualsiasi risposta immunitaria efficace**

## **In caso di infezione, la risposta immunitaria precedentemente indotta da un vaccino può:**

- 1) Prevenire l'infezione nella maggior parte degli individui (immunità sterilizzante): nessun segno di infezione.
- 2) Impedire la progressione verso la malattia permettendo un'infezione asintomatica o paucisintomatica (immunità da malattia). Non si blocca la trasmissione.
- 3) Non fare niente nella maggior parte degli individui.
- 4) Potenziare la malattia in alcuni pazienti.

# Tre tipi di vaccini antiCovid in Europa

10 gennaio 2020  
Sequenza del virus



Gene  
sintetico



Prototipo  
di vaccino

1-2 settimane

3-4 settimane

2-3 mesi

mRNA

vettori virali

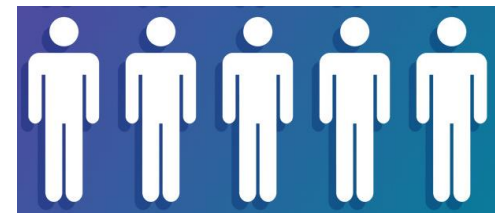
proteine  
ricombinanti  
e adiuvanti

2-3 mesi

3-4 mesi

6 mesi

Studi clinici



Tutti i candidati vaccini  
dopo 2-6 mesi sono  
andati in prove cliniche

# Cosa c'è da studiare nei vaccinati nella fase 4 cioè nella fase post-registrazione emergenziale

- 1) Durata della risposta immunitaria (richiamo?).
- 2) Stabilire l'immunogenicità e l'efficiacia nei diversi gruppi di età.
- 3) Stabilire l'immunogenicità e l'efficacia in anziani con multi-morbilità.
- 4) Determinare quali vaccini inducono immunità sterilizzante e/o immunità da malattia.
- 5) Determinare l'effetto richiamo delle vaccinazioni in soggetti che si sono precedentemente infettati con il virus in modo sintomatico o asintomatico

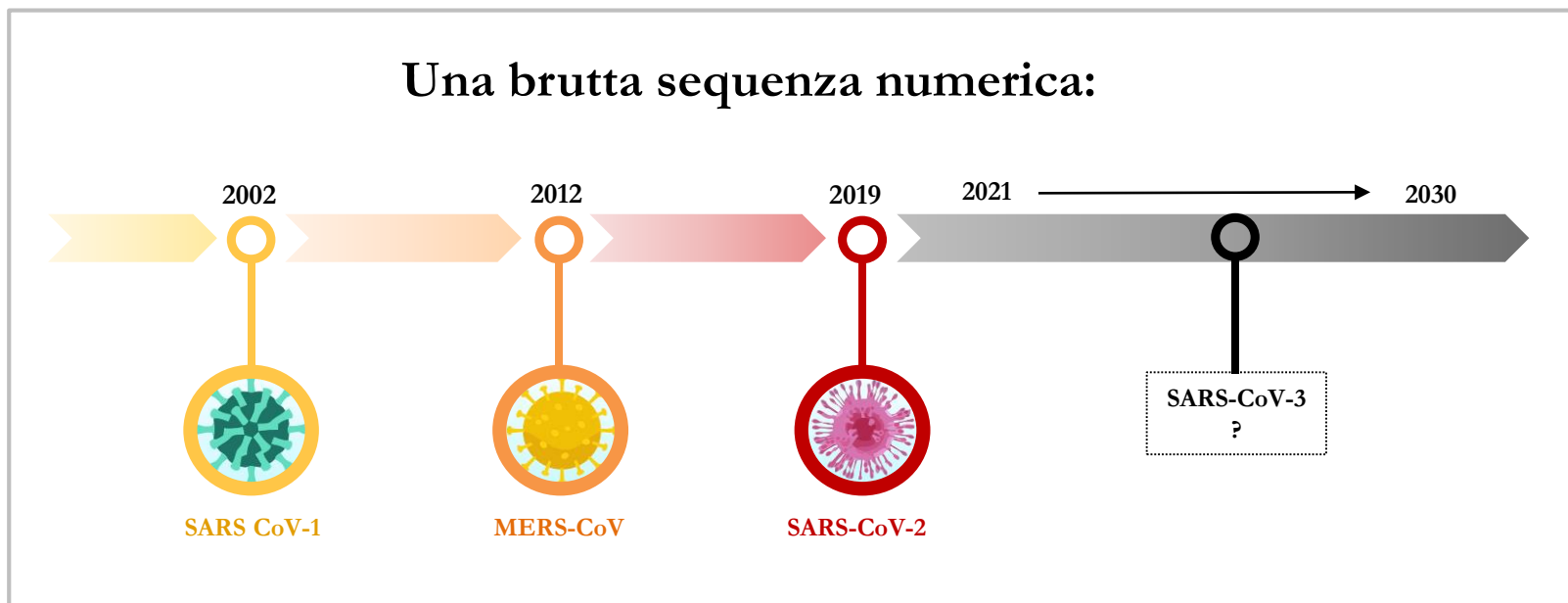
# Conclusioni

- 1) I vaccini a RNA contro Covid-19 sono efficacissimi (94-95%).
- 2) Il vaccino Novavax a Proteine ricombinanti è efficacissimo (89%).
- 3) I vaccino a Adenovirus sono abbastanza efficaci (60-70%)
- 4) I vaccini a RNA già stati iniettati in circa 20 milioni di persone nel mondo. Sono estremamente sicuri, causando solo poche decine di reazioni allergiche non-mortalità per milioni di vaccinati.
- 5) Mai come in questa pandemia vi è una chiarissima differenza nel rapporto rischio beneficio della vaccinazione verso l'infezione. Infatti a metà febbraio 2021 dopo un anno di pandemia (nonostante due mesi di lock-down e quattro mesi di zone colorate) saranno morti circa 90 mila italiani.
- 6) Quindi, mai come in questo caso vi è una chiara indicazione all'obbligatorietà di un vaccino. Con l'obbligo del vaccino anti-covid, nei prossimi 2 anni, l'Italia avrà il beneficio di risparmiarsi centinaia di migliaia di morti correndo il rischio di avere qualche centinaio di reazioni allergiche serie ma non-mortalità, facilmente controllabili da qualsiasi buon medico vaccinatore.

## L'Italia dovrebbe farsi promotrice in Europa di un grande progetto vaccinale PanCoronavirus

Dobbiamo sviluppare un vaccino contro tutti i coronavirus passati, presenti e futuri (vaccino Pan-Coronavirus), per essere pronti ad un prossimo probabile salto di specie di un nuovo Coronavirus nei prossimi anni.

Il vaccino Pan-Coronavirus dovrà indurre una memoria immunitaria contro le sequenze conservate fra tutti i Beta-Coronavirus.



# Istituto Nazionale Genetica Molecolare – INGM “Romeo and Enrica Invernizzi”



## INGM:

**Renata Grifantini**

**Samuele Notarbartolo**

**Francesca Granucci**

**Valeria Bevilacqua**

**Serena Curti**

**Anna Putignano**

**Andrea Gobbin**

**Mauro Bombaci**

**Tanya Fabbris**

**Maria Lucia Sarnicola**

**Paola Gruarin**

**Riccardo Rossi**

**Valeria Ranzani**

**Jens Geginat**

**Maria Cristina Crosti**

**Cristina Manara**

**Elisa Pesce**

**Eugenia Galeota**

**Andrea Favalli**

**Marilena Mancino**

**Antonio Lanzavecchia**

## IRCCS Policlinico,

### Milano:

**Blood bank**

**Daniele Prati**

**Infectious diseases**

**A. Gori**

**A. Bandera**

## Ospedale Niguarda

**Salvatore Siena**

## Ospedale Pini

**Roberto Caporali**

## Funding:

