

# in Farmacologia (<https://www.frontiersin.org/journals/176>)

Scopri  
 Abstract  
 introduzione  
 Materiali e Metodi  
 Risultati  
 Discussione  
 Dichiarazione sulla disponibilità dei dati  
 Contributi dell'autore  
 Finanziamento  
 Conflitto d'interesse  
 Ringraziamenti  
 Materiale supplementare  
 Riferimenti

frontiers

Increase the **discoverability** of your research

([https://spotlight.frontiersin.org/submit?utm\\_source=fweb&utm\\_medium=fjour&utm\\_campaign=rtlg\\_2020\\_gen](https://spotlight.frontiersin.org/submit?utm_source=fweb&utm_medium=fjour&utm_campaign=rtlg_2020_gen))

Suggerisci un argomento di ricerca > ([https://spotlight.frontiersin.org/submit?utm\\_source=fweb&utm\\_medium=fjour&utm\\_campaign=rtlg\\_2020\\_gen](https://spotlight.frontiersin.org/submit?utm_source=fweb&utm_medium=fjour&utm_campaign=rtlg_2020_gen))

Scarica l'articolo  
 esporta citazione



13.530  
 VISUALIZZAZIONI TOTALI

CONDIVIDERE SU

(<https://v>)



## Articolo di RICERCA ORIGINALE

Davanti. Farmacol., 17 giugno 2021 | https://doi.org/10.3389/fphar.2021.666600 (https://doi.org/10.3389/fphar.2021.666600)



# Lattoferrina contro SARS-CoV-2: prove *in vitro* e *in silico*

Elena Campione (https://www.frontiersin.org/people/u/1229470)<sup>1</sup>\*, Caterina Lanna<sup>1</sup>, Terenzio Cosio (https://www.frontiersin.org/people/u/1243924)<sup>1</sup>, Luigi Rosa (https://www.frontiersin.org/people/u/428503)<sup>2</sup>, Maria Pia Conte<sup>2</sup>, Federico Iacovelli (https://www.frontiersin.org/people/u/902320)<sup>3</sup>, Alice Romeo (https://www.frontiersin.org/people/u/1229917)<sup>3</sup>, Mattia Falconi (https://www.frontiersin.org/people/u/1228267)<sup>3</sup>, Claudia Del Vecchio<sup>4</sup>, Elisa Franchin<sup>4</sup>, Maria Stella Lia<sup>5</sup>, Marilena Minieri<sup>5</sup>, Carlo Chiaramonte<sup>6</sup>, Marco Ciotti<sup>7</sup>, Marzia Nuccetelli<sup>8</sup>, Alessandro Terrinoni<sup>5</sup>, Ilaria Iannuzzi<sup>9</sup>, Luca Coppeda<sup>9</sup>, Andrea Magrini<sup>9</sup>, Sergio Bernardini<sup>8</sup>, Stefano Sabatini<sup>10</sup>, Felice Rosapepe<sup>11</sup>, Pier Luigi Bartoletti<sup>12</sup>, Nicola Moricca<sup>10</sup>, Andrea Di Lorenzo<sup>13</sup>, Massimo Andreoni<sup>13</sup>, Loredana Sarmati<sup>13</sup>, Alessandro Miani<sup>14</sup>, Prisco Piscitelli<sup>15</sup>, Piera Valenti (https://www.frontiersin.org/people/u/428500)<sup>2</sup>† e Luca Bianchi (https://www.frontiersin.org/people/u/982850)<sup>1</sup>†

## Discussione

<sup>1</sup>Unità di Dermatologia, Dipartimento di Medicina dei Sistemi, Policlinico Universitario Tor Vergata, Roma, Italia

<sup>2</sup>Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive, Università di Roma "La Sapienza", Roma, Italia

<sup>3</sup>Dipartimento di Biologia, Gruppo di Bioinformatica Strutturale, Università degli Studi di Roma "Tor Vergata", Roma, Italia

<sup>4</sup>Dipartimento di Medicina Molecolare, Università di Padova, Padova, Italia

<sup>5</sup>Dipartimento di Medicina Sperimentale, Policlinico Universitario Tor Vergata, Roma, Italia

<sup>6</sup>Dipartimento di Statistica, Università di Roma Tor Vergata, Roma, Italia

<sup>7</sup>Unità di Virologia, Policlinico Universitario Tor Vergata, Roma, Italia

<sup>8</sup>Medicina di Laboratorio, Dipartimento di Medicina e Chirurgia Sperimentale, Policlinico Universitario Tor Vergata, Roma, Italia

<sup>9</sup>Dipartimento di Medicina del Lavoro, Università di Roma "Tor Vergata", Roma, Italia

<sup>10</sup>Spedale Villa dei Pini, Anzio, Italia

<sup>11</sup>Spedale Fineta Grande, Caserta, Italia

<sup>12</sup>Regione provinciale, Roma, Italia

<sup>13</sup>Unità di Malattie Infettive, Policlinico Universitario Tor Vergata, Roma, Italia

<sup>14</sup>Dipartimento di Scienze e Politiche Ambientali, Università degli Studi di Milano, Milano, Italia

<sup>15</sup>Cattedra UNESCO sull'Educazione alla Salute e lo Sviluppo Sostenibile, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli, Italia

La lattoferrina (Lf) è una glicoproteina cationica sintetizzata dalle ghiandole esocrine ed è presente in tutte le secrezioni umane. È anche secreto dai neutrofilii nei siti di infezione e infiammazione. Questa glicoproteina possiede attività antimicrobica grazie alla sua capacità di chelare due ioni ferrici per molecola, nonché di interagire con componenti di superficie anionici batterici e virali. Le caratteristiche cationiche di Lf si legano alle cellule, proteggendo l'ospite da lesioni batteriche e virali. La sua attività antinfiammatoria è mediata dalla capacità di entrare all'interno del nucleo delle cellule ospiti, inibendo così la sintesi dei geni delle citochine proinfiammatorie. In particolare, Lf down-regola la sintesi di IL-6, che è coinvolta nei disturbi dell'omeostasi del ferro e porta al sovraccarico di ferro intracellulare, favorendo la replicazione virale e l'infezione. La nota attività antivirale di Lf è stata dimostrata contro DNA, RNA e virus avvolti e nudi e, pertanto, Lf potrebbe essere efficace nel contrastare anche l'infezione da SARS-CoV-2. A questo scopo, ci siamo esibiti *in vitro*, dimostrando che Lf esercita un'attività antivirale contro SARS-COV-2 attraverso l'attaccamento diretto sia al SARS-CoV-2 che ai componenti della superficie cellulare. Questa attività variava in base alla concentrazione (100/500 µg/ml), alla molteplicità dell'infezione (0,1/0,01) e al tipo di cellula (cellule Vero E6/Caco-2). È interessante notare che i risultati *in silico* hanno fortemente supportato l'ipotesi di un riconoscimento diretto tra Lf e la glicoproteina spike S, che può quindi ostacolare l'ingresso virale nelle cellule. Queste osservazioni *in vitro* ci hanno portato a ipotizzare un potenziale ruolo supplementare di Lf nella gestione dei pazienti COVID-19.

## introduzione

Nel dicembre 2019, a Wuhan, in Cina, è stato osservato un gruppo di casi di polmonite. Questo cluster era correlato a un nuovo membro del *Betacoronavirus*, chiamato SARS-CoV-2, che possedeva oltre l'80% di identità per SARS-CoV e il 50% per MERS-CoV (Lu et al., 2020; Tian et al., 2020). I coronavirus sono virus sferici con involucro che possiedono un genoma di RNA a filamento singolo con senso positivo con una lunghezza compresa tra 26 e 32 kilobasi (Su et al., 2016). Il loro genoma codifica per 16 proteine non strutturali (Menachery et al., 2014), proteine accessorie (Forni et al., 2017) e quattro proteine strutturali fondamentali, in particolare glicoproteina spike (S), proteina del piccolo involucro, proteina della matrice e proteina nucleocapside (Lan et al., 2020). La glicoproteina S omotrimerica, che possiede glicani N-linked, si trova sull'involucro e comprende due subunità funzionali (S1 e S2) in ciascun monomero spike (Cui et al., 2019). Poiché gli omotrimeri delle glicoproteine S sono esposti sulla superficie virale, sono coinvolti sia nel legame dei recettori dell'ospite (S1) che nella fusione della membrana (S2) (Li, 2016; Lu et al., 2020). La microscopia crioelettronica (crio-EM) ha evidenziato le interazioni della proteina S con l'enzima di conversione dell'angiotensina 2 (ACE2) del recettore cellulare e la dissociazione del dominio S1 dopo il suo legame con le cellule ospiti, che porta alla transizione del dominio S2 a un stato conformazionale più stabile, fondamentale per la fusione della membrana (Gui et al., 2017; Yuan et al., 2017; Kirchdoerfer et al., 2018). Oltre a ACE2, i proteoglicani eparan solfato (HSPG) situati sulla superficie cellulare sono stati riconosciuti come altri siti di legame per SARS-CoV (Lang et al., 2011) e potrebbero essere importanti anche per SARS-CoV-2 nell'attaccamento precoce fase.



(https://www.frontiersin.org)

DIARI(HTTP

Ultimamente, Wrapp et al. ( Wrapp et al., 2020 ), ha identificato la prima struttura cryo-EM con risoluzione 3,5-Å del trimero SARS-CoV-2 S nella conformazione di prefusione. A causa della sua funzione critica nel decorso dell'infezione da SARS-CoV-2, la glicoproteina S è un bersaglio per la neutralizzazione di anticorpi, proteine e farmaci e la comprensione della sua struttura tridimensionale ci ha permesso di ottenere informazioni essenziali a livello atomico per la progettazione e lo sviluppo di molecole terapeutiche innovative ( Romeo et al., 2020 ).

Considerando l'ipotesi che l'immunità innata potrebbe suggerire possibili molecole con attività antivirale contro SARS-CoV-2, abbiamo evidenziato come i bambini, in cui l'immunità innata è più prominente ( Lang e Zhao, 2020 ), hanno meno probabilità di soffrire di COVID grave o critico -19 malattia rispetto agli adulti ( Rosa et al., 2017 ; Woodman et al., 2018 ). In effetti, evidenze preliminari hanno suggerito che il latte materno isolato da madri positive al COVID-19 non contiene particelle di SARS-CoV-2 ( Lang e Zhao, 2020 ).

La lattoferrina (Lf) è una glicoproteina della famiglia delle transferrine che possiede diverse funzioni ( Valenti e Antonini, 2005 ; Rosa et al., 2017 ). È sintetizzato dalle ghiandole esocrine e dai neutrofilii ed è presente nel latte umano e in tutte le secrezioni ( Valenti e Antonini, 2005 ; Rosa et al., 2017 ). Poiché questa proteina è uno dei fattori più importanti dell'immunità innata, costituendo una ben nota barriera contro i patogeni che colonizzano l'habitat materno e fetale ( Woodman et al., 2018 ), si può ipotizzare che possa anche fungere da potenziale nutraceutico agente in grado di contrastare l'infezione da SARS-CoV-2.

Infatti, due promettenti studi in vitro su SARS-CoV ( Lang et al., 2011 ) e su SARS-CoV-2 ( Hu et al., 2021 ) hanno dimostrato che Lf inibisce la fase iniziale dell'infezione da virus.

Lf ha quattro attività pleiotropiche: chelazione di due ioni ferrici per molecola, interazione con composti anionici, traslocazione nel nucleo e modulazione dell'infiammazione e dell'omeostasi del ferro. La capacità di Lf di chelare due ioni ferrici per molecola influenza la replicazione batterica e virale e ostacola la formazione di specie reattive dell'ossigeno ( Valenti e Antonini, 2005 ; Berlutti et al., 2011 ; Wakabayashi et al., 2014 ). Il legame di Lf ai componenti anionici di superficie, grazie alle sue caratteristiche cationiche, è associato alla protezione dell'ospite contro l'adesione e l'ingresso di batteri e virali ( Valenti e Antonini, 2005 ). Inoltre, l'ingresso di Lf nelle cellule e la sua traslocazione nel nucleo ( Ashida et al., 2004 ; Lepanto et al., 2019 ) è correlato alla sua funzione antinfiammatoria ( Suzuki et al., 2008 ; Liao et al., 2012 ; Kruzel et al., 2017 ). Inoltre, la capacità di Lf di ripristinare l'omeostasi del ferro, perturbata dall'infezione virale e dall'infiammazione ( Mancinelli et al., 2020 ), è associata alla sua capacità di chelare il ferro, diminuire il sovraccarico di ferro, diminuire i livelli di IL-6 e modulare le proteine del ferro. L'omeostasi del ferro è garantita dall'espressione di alcune proteine del ferro come la transferrina, la ferroportina, l'epcidina e la ferritina. I disturbi dell'omeostasi del ferro, indotti dall'infiammazione, aumentano la concentrazione intracellulare di ferro, favorendo così la replicazione virale ( Campione et al., 2020 ). Inoltre, Lf sembra modulare l'attivazione del plasminogeno e controllare la cascata della coagulazione con una notevole attività antitrombotica ( Zwirzitz et al., 2018 ), complicanza molto frequente dell'infezione da SARS-CoV-2 ( Marietta et al., 2020 ). Oltre a tutte queste capacità, Lf, come sopra riportato, inibisce la fase iniziale di SARS-CoV ( Lang et al., 2011 ) e SARS-CoV-2 ( Hu et al., 2021 ).

Pertanto, sulla base di queste informazioni, al fine di valutare la possibilità di utilizzare Lf nel trattamento clinico del COVID-19, abbiamo testato la sua attività antivirale in esperimenti *in vitro* per verificare se la sua attività fosse associata al legame delle particelle SARS-CoV-2 e/o di cellule di mammifero, analogamente a quanto osservato per altri virus ( Berlutti et al., 2011 ; Wakabayashi et al., 2014 ). Inoltre, la struttura del trimero SARS-CoV-2 S in conformazione di prefusione ( Wrapp et al., 2020 ) è stata utilizzata per effettuare un'analisi di docking molecolare proteina-proteina per confermare l'ipotesi di un'interazione diretta tra la glicoproteina S e la proteina Lf . La struttura della glicoproteina spike ( Wrapp et al., 2020 ) è stato completato utilizzando procedure di modellazione computazionale e utilizzato per prevedere i siti di interazione Lf. Inoltre, il complesso proteina-proteina selezionato ad alto punteggio è stato studiato strutturalmente attraverso la simulazione della dinamica molecolare classica (MD), mentre l'energia di interazione tra queste proteine è stata valutata utilizzando le energie della meccanica molecolare combinate con Born generalizzato e solvatazione del continuo dell'area di superficie (MM/GBSA ) metodo ( Genheden e Ryde, 2015 ).

## Materiali e metodi

### Attività antivirale *in vitro* della lattoferrina

Lf, estratto da latte bovino (bLf), possiede un'elevata omologia di sequenza e funzioni simili con Lf umano (hLf), ed è stato approvato come composto generalmente riconosciuto come sicuro (GRAS) dalla Food and Drug Administration degli Stati Uniti ( FDA Stati Uniti) e come integratore alimentare dall'Autorità europea per la sicurezza alimentare.

Per gli esperimenti *in vitro* , bLf altamente purificato è stato generosamente somministrato da Armor Proteines Industries (Francia). BLf è stato controllato tramite SDS-PAGE e colorazione con nitrato d'argento. La purezza di BLf era di circa il 98% e la sua concentrazione è stata confermata tramite spettroscopia UV secondo un coefficiente di estinzione di 15,1 (280 nm, soluzione all'1%). La saturazione di ferro di bLf utilizzata, determinata mediante spettroscopia ottica a 468 nm, era di circa il 7% secondo un coefficiente di estinzione di una soluzione all'1% di bLf completamente satura di ferro corrispondente a 0,54. La contaminazione da LPS di bLf, valutata tramite il test Limulus Amebocyte (kit Pyrochrome, PBI International, Italia), era  $0,6 \pm 0,05$  ng/mg di bLf. Prima di ogni *in vitro* test, la soluzione bLf è stata sterilizzata utilizzando un filtro Millex HV da 0,2  $\mu$ m a bassa ritenzione proteica (Millipore Corp., Bedford, MA, Stati Uniti).

### Colture cellulari e virus

Il Vero E6 derivato dal rene della scimmia verde africana e le cellule Caco-2 derivate dal carcinoma del colon umano sono state acquistate dall'American Type Culture Collection (ATCC). Le cellule sono state coltivate in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Euroclone, Milano, Italia) con il 10% di siero fetale bovino (FBS) (Euroclone, Milano, Italia) a 37°C in incubatori umidificati con il 5% di CO<sub>2</sub>. Il ceppo SARS-CoV-2, isolato da un campione nasofaringeo di un paziente positivo al COVID-19, è stato propagato in cellule Vero E6. I titoli SARS-CoV-2 sono stati ottenuti mediante analisi della dose infettiva di coltura tissutale (TCID<sub>50</sub>) al 50% in Vero E6 (metodo

(https://v



Spearman-Kärber) mediante punteggio microscopico. Tutti i saggi sono stati eseguiti infettando le cellule Vero E6 e Caco-2 con ceppo SARS-CoV-2 presso il Dipartimento di Medicina Molecolare dell'Università di Padova, secondo procedure di Biosafety Level 3 (BSL3), in accordo con i protocolli di contenimento del laboratorio approvati dall'Università di Padova.

## Saggio di citotossicità

La citotossicità è stata valutata incubando 100 e 500 µg di bLf, le concentrazioni utilizzate per esperimenti *in vitro*, in DMEM con il 10% di FBS per 72 ore a 37 ° C con cellule Vero E6 e Caco-2 in piastre da 96 pozzetti. La vitalità cellulare e la proliferazione sono state valutate mediante test MTT (Merck, Italia). Il test MTT è un test colorimetrico basato sulla riduzione di un sale di tetrazolio a formazano da parte di cellule metabolicamente attive. Il colorante formazan è stato valutato mediante assorbanza spettrofotometrica a 600 nm.

## Saggio di infezione

### SOMMARIO

Per il test dell'infezione, le cellule Vero E6 sono state seminate in piastre di coltura tissutale da 24 pozzetti a una concentrazione di  $1 \times 10^5$  cellule/pozzetto per 24 ore a 37°C in incubatori umidificati con il 5% di CO<sub>2</sub>, mentre le cellule Caco-2 sono state seminate ad una concentrazione di  $2 \times 10^5$  cellule/pozzetto per 48 h a 37°C in incubatori umidificati con il 5% di CO<sub>2</sub>. Per valutare la presunta inibizione dell'infezione da ceppo SARS-CoV-2 sulle cellule di scimmia Vero E6, sono stati utilizzati 100 µg/ml di bLf. Al contrario, la presunta attività antivirale contro il ceppo SARS-CoV-2 sulle cellule umane Caco-2 è stata studiata utilizzando non solo 100 ma anche 500 µg/ml di bLf. Al fine di studiare la presunta interazione di bLf con particelle virali e/o cellule ospiti, sono stati effettuati diversi approcci sperimentali sia nelle cellule Vero E6 che in quelle Caco-2. Per valutare se bLf può interferire con il tasso di infettività virale legando i componenti della superficie virale, una molteplicità di infezione (MOI) di 0,1 e 0,01 di SARS-CoV-2 è stata preincubata con bLf per 1 ora a 37°C in incubatori umidificati con 5% CO<sub>2</sub>. Le cellule sono state quindi infettate con queste sospensioni per 1 ora a 37°C in incubatori umidificati con 5% di CO<sub>2</sub>. Per valutare se bLf interferisce con l'attacco virale alle cellule ospiti, le cellule sono state preincubate in DMEM senza FBS con bLf per 1 ora a 37°C in incubatori umidificati con 5% di CO<sub>2</sub>. Le cellule sono state quindi lavate con soluzione salina tamponata con fosfato (PBS) e infettate con SARS-CoV-2 a un MOI di 0,1 e 0,01 per 1 ora a 37°C in incubatori umidificati con il 5% di CO<sub>2</sub>. Per valutare se bLf può interferire con i componenti della cellula ospite e virale, bLf è stato aggiunto insieme a SARS-CoV-2 a un MOI di 0,1 e 0,01 al monostrato cellulare per 1 ora a 37°C in incubatori umidificati con il 5% di CO<sub>2</sub>. Inoltre, la preincubazione di SARS-CoV-2 con bLf per 1 ora a 37°C è stata utilizzata per infettare il monostrato cellulare precedentemente pretrattato con bLf per 1 ora a 37°C.

Per quanto riguarda le cellule Vero E6, dopo ogni approccio sperimentale, le cellule sono state lavate con PBS, ricoperte con DMEM contenente lo 0,75% di carbossimetilcellulosa e il 2% di FBS e incubate per 48 ore a 37°C in incubatori umidificati con il 5% di CO<sub>2</sub>. Dopo 48 ore, le cellule sono state lavate, fissate con 5% di formaldeide per 10 minuti a temperatura ambiente e colorate con cristalviolett all'1% per 5 minuti. Il numero di placche è stato determinato dopo un lungo lavaggio.

Gli altri esperimenti di infezione sono stati condotti con cellule Caco-2. La morte cellulare significativa non è stata osservata fino a 7 giorni sulle cellule Caco-2 dopo l'infezione da SARS-CoV-2 a MOI 0,1 ( Chu et al., 2020 ). A questo proposito, dopo ogni procedura sperimentale, i monostrati cellulari sono stati sostituiti con DMEM con il 2% di FBS e dopo 6, 24 e 48 ore dopo l'infezione (hpi), i campioni di surnatante sono stati raccolti per l'estrazione dell'RNA e il reverse quantitativo in tempo reale test di trascrizione (rRT)-PCR di particelle virali. In breve, abbiamo lisato 200 µl di surnatante in un volume uguale di tampone di lisi NUCLEASE easyMAG (Biomerieux, Francia). Il rilevamento dell'RNA virale è stato analizzato mediante RT-PCR interna in tempo reale in conformità con il protocollo e i primer e le sonde progettati da Corman et al. ( Corman et al., 2020), prendendo di mira i geni che codificano per l'involucro SARS-CoV-2 (E) (E\_Sarbeco\_F, E\_Sarbeco\_R e E\_Sarbeco\_P1). Le analisi quantitative rRT-PCR sono state eseguite con 5 µl di acidi nucleici purificati in un volume finale di 25 µl, utilizzando il kit One-Step Real-Time (Thermo Fisher Scientific) ed eseguite su ABI 7900HT Fast Sequence Detection Systems (Thermo Fisher Scientific). I dati della soglia del ciclo (Ct) dai test rRT-PCR sono stati eseguiti per i geni E. Le copie equivalenti del genoma per ml sono state dedotte in base alla regressione lineare eseguita su curve standard di calibrazione.

## Metodi di ancoraggio proteico-proteico

La struttura della glicoproteina della punta SARS-CoV-2 in conformazione di prefusione è stata estratta da una procedura di raggruppamento utilizzata in un articolo precedentemente pubblicato ( Romeo et al., 2020 ). La struttura 3D delle forme difterriche di bLf e hLf, raffinate rispettivamente a una risoluzione di 2,8 e 2,2 Å, è stata scaricata dal database PDB (ID PDB: 1BLF ( Moore et al., 1997 ) e 1BoL ( Sun et al., 1999 )). L'analisi di docking proteina-proteina tra la glicoproteina spike modellata SARS-CoV-2 ( Romeo et al., 2020 ) e le strutture Lf è stata eseguita utilizzando l'algoritmo di docking Frodock ( Ramirez-Aportela et al., 2016). L'approccio di Frodock combina la proiezione dei termini di interazione in potenziali basati sulla griglia 3D e l'energia di legame sulla formazione complessa, che è approssimata come una funzione di correlazione composta da termini di van der Waals, elettrostatica e potenziale di desolvatazione. I minimi di interazione-energia sono identificati attraverso una rapida ed esaustiva ricerca di docking rotazionale combinata con una semplice scansione traslazionale ( Garzon et al., 2009 ). Entrambe le procedure di docking sono state eseguite utilizzando il server web di Frodock ( <http://frodock.chaconlab.org/> ( <http://frodock.chaconlab.org/> ) ).

## Dinamica Molecolare

Topologia e file di coordinate delle strutture di input sono stati ottenuti tramite il modulo tLeap del pacchetto AmberTools 19 ( Salomon-Ferrer et al., 2013 ). La glicoproteina spike e Lf sono state parametrizzate attraverso il campo di forza ff19SB e sono state inserite in una scatola rettangolare di molecole d'acqua TIP3P, imponendo una distanza minima di 12,0 Å dalle pareti della scatola, mentre la soluzione è stata neutralizzata aggiungendo 0,15 mol/L di ioni NaCl. Per rimuovere le interazioni steriche, tutte le strutture sono state sottoposte a quattro cicli di minimizzazione, ciascuno composto da 500 passaggi di minimizzazione della discesa più ripida seguiti da 1.500 passaggi



(https://www.frontiersin.org)

di minimizzazione del gradiente coniugato. Un vincolo iniziale di  $20.0 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$  è stato imposto agli atomi proteici e successivamente ridotto e rimosso nel ciclo di minimizzazione finale. I sistemi sono stati gradualmente riscaldati da 0 a 300 K in un

insieme NVT per un periodo di 2,0 ns utilizzando il termostato Langevin, imponendo un vincolo iniziale di  $0,5 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$  su ciascun atomo, che è stato ridotto ogni 500 ps al fine di rilassare lentamente il sistema. I sistemi sono stati simulati in un insieme isobarico-isotermico (NPT) per 2,0 ns, fissando una pressione di 1,0 atm utilizzando il barostato Langevin e imponendo la temperatura a 300 K. I legami covalenti che coinvolgono atomi di idrogeno sono stati vincolati utilizzando l'algoritmo SHAKE ( Ryckaert et al. , 1977 ). Sono stati eseguiti 30 ns di produzione tramite il pacchetto NAMD 2.13 MD ( Phillips et al., 2005), utilizzando un intervallo di tempo di 2,0 fs. Il metodo PME è stato applicato per tenere conto delle interazioni a lungo raggio, mentre è stato impostato un cutoff di 9,0 Å per le interazioni a corto raggio. Le coordinate del sistema sono state salvate ogni 1.000 passi.

## Analisi della traiettoria

La analisi della distanza è stata eseguita utilizzando il modulo distanza degli strumenti di analisi GROMACS 2020 ( Abraham et al., 2015 ), mentre la persistenza del legame idrogeno è stata valutata utilizzando il modulo hbonds accoppiato a codici scritti internamente. I contatti idrofobici sono stati identificati utilizzando le routine contact\_map e contact\_frequency della libreria Python mdtraj ( Mcgbon et al., 2015 ). Le analisi generalizzate di Born e Surface Area Continuum solvation (MM/GBSA) sono state eseguite utilizzando gli ultimi 15 ns delle traiettorie, attraverso l'MMPBSA. py.MPI come implementato nel software AMBER16 ( Case et al., 2016 ) su due nodi del cluster RENE HPC CRESCO6 ( Iannone et al., 2019). Le immagini dei complessi spike-Lf e spike CTD1-ACE2 sono state generate utilizzando il programma UCSF Chimera ( Pettersen et al., 2004 ).

Dichiarazione sulla

## Analisi statistica

Contributi dell'autore  
Per gli esperimenti *in vitro*, il numero di unità di formazione della placca (pfu)/ml di SARS-CoV-2 su cellule Vero E6 e il numero di copie di RNA SARS-CoV-2/ml su cellule Caco-2 in ciascun approccio sperimentale era rispetto a quelli di controllo (SARS-CoV-2 non trattati e cellule) nello stesso momento al fine di valutare le differenze statisticamente significative utilizzando i test *t di studenti spaiati*. I risultati sono stati espressi come valori medi  $\pm$  deviazione standard (DS) di tre esperimenti indipendenti. In ogni caso, un valore  $p \leq 0,05$  è stato considerato statisticamente significativo.

Ringraziamenti  
Materiale  
supplementare

## Risultati

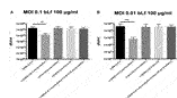
### La lattoferrina mostra proprietà antivirali nei modelli *in vitro*

Preliminarmente, sono state analizzate le dosi di bLf in forma nativa (7% di ferro saturato) corrispondenti a 100  $\mu\text{g/ml}$  per le cellule Vero E6 e a 100 e 500  $\mu\text{g/ml}$  per le cellule Caco-2 per rilevare la loro presunta citotossicità misurando la morfologia cellulare, la proliferazione e vitalità dopo 72 h di incubazione. Sia 100 che 500  $\mu\text{g/ml}$  di bLf non hanno esercitato alcun effetto citotossico (dati non mostrati).

Quindi, l'efficacia di diverse concentrazioni di bLf nell'inibizione dell'infezione da SARS-CoV-2 è stata testata su cellule Vero E6 e Caco-2 secondo diverse procedure sperimentali: I) controllo: SARS-CoV-2 non trattato e cellule; II) preincubazione di bLf con inoculo di virus per 1 h a 37°C prima dell'infezione cellulare; III) preincubazione di bLf con cellule per 1 ora a 37°C prima dell'infezione da virus; IV) bLf aggiunto insieme a SARS-CoV-2 al momento dell'infezione; e V) virus e cellule preincubate separatamente con bLf per 1 ora a 37°C prima dell'infezione.

I risultati ottenuti con le cellule Vero E6 sono mostrati nella Figura 1A (MOI 0,1) e 1B (MOI 0,01).

FIGURA 1



(https://www.frontiersin.org/files/Articles/666600/fphar-12-666600-HTML/image\_m/fphar-12-666600-g001.jpg)

**FIGURA 1.** Unità formanti placca (pfu)/ml di SARS-CoV-2 osservate in cellule Vero E6 infettate a una molteplicità di infezione (MOI) di 0,1 (A) e 0,01 (B) in presenza o assenza di 100  $\mu\text{g/ml}$  di lattoferrina bovina (bLf) secondo le seguenti procedure sperimentali: i) controllo: cellule SARS-CoV-2 e Vero E6 non trattate; ii) bLf preincubato con inoculo SARS-CoV-2 per 1 ora a 37°C prima dell'infezione cellulare; iii) cellule preincubate con bLf per 1 ora a 37°C prima dell'infezione da SARS-CoV-2; iv) bLf aggiunto insieme all'inoculo SARS-CoV-2 durante la fase di adsorbimento; e v) virus e cellule preincubate separatamente con bLf per 1 ora a 37°C prima dell'infezione. I dati rappresentano i valori medi di tre esperimenti indipendenti. Barre di errore: errore standard della media. La significatività statistica è indicata come segue: \*\*:  $p < 0,001$ , \*\*\*:  $p < 0,0001$  (test *t dello studente spaiato*).

Per quanto riguarda le cellule Vero E6, è stata osservata un'inibizione della replicazione SARS-CoV-2 di circa un log a MOI 0,1 e di circa due log a MOI 0,01 quando 100  $\mu\text{g/ml}$  di bLf sono stati preincubati per 1 ora con il virus prima dell'infezione rispetto alla SARS non trattata -Infezione da CoV-2 ( $p < 0,001$  e  $p < 0,0001$ , rispettivamente) ( Figure 1A,B ).

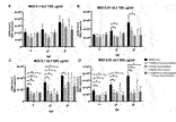
Al contrario, i dati illustrati nelle Figure 1A,B, indipendentemente dal MOI utilizzato, indicano che bLf, a questa concentrazione, non blocca l'infezione da SARS-CoV-2 quando viene preincubato con cellule Vero E6 o quando bLf viene aggiunto contemporaneamente a particelle e cellule virali al momento dell'infezione ( Figure 1A,B ). bLf è anche inefficace quando viene preincubato per 1 ora a 37°C separatamente con virus e cellule prima dell'infezione ( Figure 1A,B ).

L'efficacia di 100 e 500  $\mu\text{g/ml}$  di bLf contro SARS-CoV-2, analizzata nelle cellule Caco-2, è mostrata rispettivamente nelle Figure 2A, B (MOI 0,1) e nelle Figure 2C, D (MOI 0,01).

(https://v



(https://www.frontiersin.org)



(https://www.frontiersin.org/files/Articles/666600/fphar-12-666600-HTML/image\_m/fphar-12-666600-g002.jpg)

**FIGURA 2.** Copie di RNA/ml di SARS-CoV-2 osservate in supernatanti di cellule Caco-2 infettate a una molteplicità di infezione (MOI) di 0,1 (A,C) e 0,01 (B,D) in presenza o assenza di 100 µg/ml (A,B) e 500 µg/ml (C,D) di lattoferrina bovina (bLf) secondo le seguenti procedure sperimentali: i) controllo: cellule SARS-CoV-2 e Caco-2 non trattate; ii) bLf preincubato con inoculo SARS-CoV-2 per 1 ora a 37°C prima dell'infezione cellulare; iii) cellule preincubate con bLf per 1 ora a 37°C prima dell'infezione da SARS-CoV-2; iv) bLf aggiunto insieme all'inoculo SARS-CoV-2 durante la fase di adsorbimento; e v) virus e cellule preincubate separatamente con bLf per 1 ora a 37°C prima dell'infezione. I campioni di supernatante virale sono stati raccolti a 6, 24 e 48 ore dopo l'infezione (hpi). I carichi virali sono stati accertati con rRT-PCR quantitativa. I dati rappresentano i valori medi di tre esperimenti indipendenti. Barre di errore: errore standard della media. La significatività statistica è indicata come segue: \* :  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,001$  (test *t* per studenti non accoppiati).

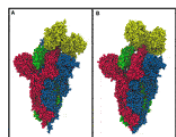
**SOMMARIO** Questo articolo riguarda le cellule Caco-2, a MOI 0,1, non sono state osservate differenze significative in tutte le condizioni sperimentali rispetto a quelle di controllo quando si utilizzava bLf a 100 µg/ml ( Figura 2A ). A MOI 0,01, è stata osservata un'inibizione della carica virale nei supernatanti a 24 hpi solo quando 100 µg/ml di bLf sono stati preincubati con l'inoculo virale e quando le cellule sono state preincubate con 100 µg/ml di bLf rispetto a quello di controllo ( $p < 0,05$ ) ( Figura 2B ). A 48 hpi, è stata osservata un'inibizione della carica virale solo quando le cellule sono state preincubate con bLf ( $p < 0,05$ ) ( Figura 2B ).

**Risultati** Quando bLf è stato utilizzato a una concentrazione di 500 µg/ml, è stata osservata una diminuzione della carica virale fino a 48 hpi quando l'inoculo virale è stato preincubato con bLf rispetto al gruppo di controllo, indipendentemente dal MOI utilizzato ( $p < 0,05$ ) ( Figura 2C,D ). Quando le cellule sono state preincubate con bLf, è stata osservata una diminuzione del carico SARS-CoV-2 fino a 24 hpi rispetto al controllo a MOI 0,1 ( $p < 0,001$  dopo 6 hpi e  $p < 0,05$  dopo 24 hpi) ( Figura 2C ), mentre a MOI 0,01 la diminuzione della carica virale è rimasta statisticamente significativa fino a 48 hpi rispetto al gruppo di controllo ( $p < 0,05$ ) ( Figura 2D ). Quando bLf è stato aggiunto insieme a SARS-CoV-2 durante la fase di adsorbimento è stata osservata una diminuzione della carica virale fino a 24 hpi rispetto all'infezione da SARS-CoV-2 non trattata, indipendentemente dal MOI utilizzato ( $p < 0,001$  dopo 6 hpi e  $p < 0,05$  dopo 24 hpi per MOI 0,1;  $p < 0,05$  dopo 6 e 24 hpi per MOI 0,01) ( Figure 2C, D ). Quando le cellule sono state preincubate con bLf e infettate con SARS-CoV-2 precedentemente preincubate con bLf, è stata osservata una diminuzione della carica virale fino a 24 hpi per MOI 0,1 rispetto all'infezione da SARS-CoV-2 non trattata ( $p < 0,001$  dopo 6 hpi e  $p < 0,05$  dopo 24 hpi per MOI 0,1) ( Figura 2C ), mentre a MOI 0,01 la diminuzione della carica virale è rimasta statisticamente significativa fino a 48 hpi rispetto all'infezione da SARS-CoV-2 non trattata ( $p < 0,05$ ) ( Figura 2D ).

## Risultati computazionali

La simulazione dell'aggancio molecolare suggerisce una potenziale interazione della struttura bLf con il dominio della glicoproteina spike CTD1 nella conformazione verso l'alto ( Figura 3A ). Le prime tre soluzioni ottenute dalla procedura di clustering di Frodock rappresentano oltre il 60% del totale dei complessi generati e sono quasi completamente sovrapponibili a quella mostrata nella Figura 3A . Partendo dalla prima soluzione di Frodock, abbiamo eseguito una simulazione MD classica lunga 30 ns per verificare la stabilità del complesso e verificare la presenza di interazioni persistenti tra le due proteine. Come mostrato nella figura supplementare S1A, la distanza tra i centri di massa di spike e bLf, calcolata in funzione del tempo, oscilla intorno al valore di 4,5 nm, indicando uno stretto contatto costante tra le due molecole. L'analisi MM/GBSA ha confermato l'elevata affinità del bLf per il dominio spike CTD1 ( Tabella Supplementare S1A ), mostrando un'energia di interazione di -28,02 kcal/mol. In particolare, i risultati di MM/GBSA hanno sottolineato che il termine di Van der Waals contribuisce principalmente all'energia di legame ( Tabella Supplementare S1A ).

FIGURA 3



(https://www.frontiersin.org/files/Articles/666600/fphar-12-666600-HTML/image\_m/fphar-12-666600-g003.jpg)

**FIGURA 3.** Rappresentazioni di riempimento dello spazio del miglior complesso molecolare ottenuto con Frodock tra la lattoferrina bovina (A) e umana (B) con la glicoproteina spike. I colori rosso, blu e verde rappresentano le catene di glicoproteine spike e mentre il giallo rappresenta le molecole di lattoferrina.

Un'analisi dettagliata della rete di interazione ha rivelato la presenza di 28 diverse interazioni, che persistono per oltre il 25% del tempo di simulazione, in accordo con l'elevata energia di interazione calcolata. In dettaglio, abbiamo trovato tre ponti salini, cinque legami idrogeno e 20 coppie di residui coinvolti nei contatti idrofobici ( lato sinistro della tabella supplementare S2 ).

Per verificare se alcuni dei residui di spike presi di mira dalla proteina bLf fossero coinvolti nel legame con ACE2, abbiamo confrontato la struttura media estratta dalla simulazione con la struttura del complesso del dominio ACE2/CTD1 (ID PDB: 6LZG ( Wang et al., 2020 )) ( Figura 4 ). Sorprendentemente, solo due residui di spike (Gly502 e Tyr505) sono stati condivisi tra le interfacce dei complessi ( lato sinistro della Tabella Supplementare S2 ), come valutato dall'ispezione delle strutture sovrapposte e dall'analisi dell'articolo ( Wang et al., 2020 ). Nonostante ciò, Lf mantiene la stessa posizione assunta dall'enzima ACE2, cioè al di sopra del dominio CTD1 in alto.

FIGURA 4

(https://www.frontiersin.org/files/Articles/666600/fphar-12-666600-HTML/image\_m/fphar-12-666600-g004.jpg)

(https://v



**FIGURA 4** . Confronto tra il miglior complesso di Frodock e la glicoproteina ACE2-spike (ID PDB: 6LZG). Le superfici solide rosse, blu e verdi rappresentano le tre diverse catene che compongono la glicoproteina spike. I nastri neri evidenziano il dominio CTD1 nella conformazione in alto. I nastri magenta e giallo rappresentano rispettivamente l'ACE2 (A) e la lattoferrina bovina (B) circondati da una rappresentazione trasparente della superficie molecolare, in modo da evidenziare le posizioni occupate nello spazio dalle diverse strutture.

Abbiamo eseguito la stessa analisi sul complesso hLf-spike valutato, ottenendo una posa di legame sovrapponibile a quella osservata per la proteina bovina ( Figura 3B ). Sebbene utilizzando la proteina umana si possa ancora osservare un contatto persistente e stretto tra le due molecole ( Figura Supplementare S1B ), l'analisi della rete di interazione ha indicato la presenza di un numero maggiore di interazioni (45 interazioni), in accordo con la maggiore interazione energia rivelata dall'approccio MM/GBSA (-48,25 kcal/mol, Tabella Supplementare S1B ). In dettaglio, abbiamo trovato 12 ponti salini, 10 legami idrogeno e 23 coppie di residui coinvolti nei contatti idrofobici ( Tabella Supplementare S2 lato destro), in accordo con la presenza di un termine di contributo elettrostatico negativo ( Tabella Supplementare S1B ). Confrontando la struttura media estratta dalla simulazione con la struttura del complesso di dominio ACE2/CTD1 (PDB ID: 6LZG ( Wang et al., 2020 )) ( Figura supplementare S2 ), abbiamo osservato che anche per hLf, solo due residui (Thr500 e Tyr505) sono stati condivisi tra le interfacce dei complessi ( tabella supplementare S2 a destra).

Questi risultati ci consentono di ipotizzare che, oltre al legame degli HSPG ( Lang et al., 2011 ), sia bLf che hLf dovrebbero essere in grado di ostacolare il riconoscimento della glicoproteina spike del recettore ACE2, impedendo al virus di entrare nelle cellule.

Risultati

Discussione

## Discussione

Dichiarazione sulla

responsabilità dei dati

In questo studio, abbiamo focalizzato la nostra attenzione sulla nota attività antivirale di Lf. L'attività antivirale *in vitro* di bLf contro

coronavirus RNA avvolti e nudi è stata ampiamente dimostrata ( van der Strate et al., 2001 ; Berlutti et al., 2011 ; Lang et al., 2011 ; Wakahara et al., 2014 ; Ng et al., 2015 ), mentre sono stati pubblicati alcuni articoli sulla sua efficacia *in vivo* contro l'infezione virale ( Lu et al., 1987 ; Tanaka et al., 1999 ; Okada et al., 2002 ; Hirashima et al., 2004 ; Ishibashi et al., 2005 ; Shin et al., 2005 ; Ueno et al., 2006 ; Egashira et al., 2007 ; Chen et al., 2008 ; Yen et al., 2011 ; Gualdi et al., 2013 ; Vitetta et al., 2013 ).

Ringraziamenti

La capacità di bLf di ostacolare l'infezione virale è generalmente attribuita al suo legame ai componenti anionici della superficie cellulare o alle particelle virali. bLf è in grado di legarsi in modo competitivo ai proteoglicani eparan solfato (HSPG), componenti della superficie della cellula ospite e identificati come siti di interazione iniziale per virus con involucro ( Spear, 2004 ; Sapp e Bienkowska-Haba, 2009 ), ostacolando così l'adesione e l'interiorizzazione di diversi virus ( Marchetti et al., 2004 ; Chien et al., 2008 ; Lang et al., 2011 ), incluso SARS-CoV-2 ( Hu et al., 2021 ). Inoltre, bLf può anche legarsi direttamente alle proteine di superficie delle particelle virali come il loop HIV V3 della gp120 ( Swart et al., 1996 ) e proteine dell'involucro HCV E2 ( Nozaki et al., 2003 ).

I risultati qui presentati mostrano che l'attività antivirale di bLf varia in base a diversi approcci sperimentali, linee cellulari, MOI e concentrazioni di bLf.

Infatti, la preincubazione di 100 µg/ml di bLf con monostrati Vero E6, infettati da SARS-CoV-2 a MOI 0,1 e 0,01, è risultata inefficace nell'inibire l'internalizzazione del virus ( Figura 1 ), diversamente da quanto osservato in Caco-2 celle a MOI 0,01 ( Figura 2B ).

La preincubazione di 100 µg/ml di bLf con SARS-CoV-2 ha mostrato un'attività antivirale significativamente più alta a MOI 0,01 rispetto a MOI 0,1 nelle cellule Vero E6 ( Figure 1A, B ), mentre un'attività antivirale significativa è stata osservata solo a MOI 0,01 in Cellule Caco-2 ( Figura 2B ). Nelle altre due condizioni sperimentali, 100 µg/ml di bLf non hanno mostrato alcuna attività antivirale significativa su entrambe le cellule Vero E6 e Caco-2 ( Figure 1, 2A, B ).

Diversamente da 100 µg/ml di bLf, la preincubazione di 500 µg/ml di bLf con cellule Caco-2 o particelle virali ha mostrato una maggiore diminuzione della carica virale a MOI 0,1 e 0,01 ( Figure 2C, D ). Negli altri due approcci sperimentali, 500 µg/ml di bLf erano significativamente efficaci contro SARS-CoV-2, anche se per diversi tempi di postinfezione e in misura diversa a seconda del MOI ( Figure 2C, D ).

I nostri risultati sperimentali indicano che bLf esercita la sua attività antivirale legandosi direttamente alle particelle SARS-CoV-2 o oscurando i loro recettori delle cellule ospiti. Inoltre, i risultati ottenuti attraverso gli approcci di docking molecolare e simulazione della dinamica molecolare supportano fortemente l'ipotesi di un riconoscimento diretto tra bLf e la glicoproteina spike. L'affinità tra le loro superfici molecolari, il gran numero di interazioni atomistiche rilevate e la loro persistenza durante la simulazione suggeriscono che è molto probabile che si verifichi questo riconoscimento e che bLf possa ostacolare il legame della punta al recettore ACE2, bloccando così l'ingresso del virus nelle cellule ospiti.

Presi insieme, questi risultati rivelano che, anche se il meccanismo d'azione definitivo deve ancora essere completamente studiato, le proprietà antivirali di bLf sono estendibili anche al virus SARS-CoV-2.

Questo studio fa parte del programma di ricerca GEFACOV2.0 coordinato dall'Università Tor Vergata di Roma.

## Dichiarazione sulla disponibilità dei dati

I contributi originali presentati nello studio sono inclusi nell'articolo/ Materiale supplementare e ulteriori domande possono essere indirizzate all'autore corrispondente.

## Contributi dell'autore

Concettualizzazione: EC, PV, LB, MF e AM; analisi formale: CC; indagine: EC, TC, LR, MC, FI, AR, CD, EF, ML, MM, MC, MN, AT, II, LC, AM, SB, NM, SS, AD, FR e PB; scrittura: bozza originale, CL, EC, LR, LB, PV, PP e MF; scrittura, revisione e modifica: EC, LB e PV.



Questo studio è parzialmente finanziato dal programma di ricerca GEFACOV2.0 coordinato dall'Università di Roma Tor Vergata e supportato anche dal contributo della "Fondazione Terzo Pilastro Internazionale", Presidente Prof. Emmanuele Francesco Maria Emanuele.

## Conflitto d'interesse

Gli autori dichiarano che la ricerca è stata condotta in assenza di rapporti commerciali o finanziari che possano essere interpretati come un potenziale conflitto di interessi.

### SOMMARIO

## Ringraziamenti

Astratto

Ringraziamo il Prof. Denis Mariano per l'editing in lingua inglese. Ringraziamo Biagio, Luigi e Martina per il supporto tecnico. Le risorse informatiche e il relativo supporto tecnico sono state fornite dall'infrastruttura CRESCO/ENEAGRID High Performance Computing.

L'infrastruttura di calcolo ad alte prestazioni CRESCO/ENEAGRID è finanziata dall'ENEA, l'Agenzia nazionale per le nuove tecnologie, l'energia e lo sviluppo economico sostenibile e da programmi di ricerca italiani ed europei, per informazioni consultare

<http://www.cresco.enea.it/english> (<http://www.cresco.enea.it/english>) .

Dichiarazione sulla  
disponibilità dei dati

## Materiale supplementare

Il materiale supplementare per questo articolo è disponibile online all'indirizzo:

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2021.666600/full#supplementary-material>

(<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2021.666600/full#supplementary-material>)

Materiale

supplementare

## Riferimenti

Riferimenti

Abraham, M. J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J. C., Hess, B., et al. (2015). GROMACS: High Performance Molecular Simulations through Multi-Level Parallelism from Laptops to Supercomputers. *SoftwareX* 1-2 (2), 19–25. doi:10.1016/j.softx.2015.06.001

**CrossRef Full Text** (<https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>) | **Google Scholar** ([https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as\\_sdt=0%2C5&q=GROMACS:+High+Performance+Molecular+Simulations+through+Multi-Level+Parallelism+from+Laptops+to+Supercomputers&btnG=](https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=GROMACS:+High+Performance+Molecular+Simulations+through+Multi-Level+Parallelism+from+Laptops+to+Supercomputers&btnG=))

Ashida, K., Sasaki, H., Suzuki, Y. A., and Lönnnerdal, B. (2004). Cellular Internalization of Lactoferrin in Intestinal Epithelial Cells. *Biometals* 17, 311–315. doi:10.1023/b:biom.0000027710.13543.3f

**PubMed Abstract** (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15222483/>) | **CrossRef Full Text** (<https://doi.org/10.1023/b:biom.0000027710.13543.3f>) | **Google Scholar** ([https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as\\_sdt=0%2C5&q=Cellular+Internalization+of+Lactoferrin+in+Intestinal+Epithelial+Cells&btnG=](https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=Cellular+Internalization+of+Lactoferrin+in+Intestinal+Epithelial+Cells&btnG=))

Berlutti, F., Pantanella, F., Natalizi, T., Frioni, A., Paesano, R., Polimeni, A., et al. (2011). Antiviral Properties of Lactoferrin-A Natural Immunity Molecule. *Molecules* 16, 6992–7018. doi:10.3390/molecules16086992

**PubMed Abstract** (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21847071/>) | **CrossRef Full Text** (<https://doi.org/10.3390/molecules16086992>) | **Google Scholar** ([https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as\\_sdt=0%2C5&q=Antiviral+Properties+of+Lactoferrin-A+Natural+Immunity+Molecule&btnG=](https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=Antiviral+Properties+of+Lactoferrin-A+Natural+Immunity+Molecule&btnG=))

Campione, E., Cosio, T., Rosa, L., Lanna, C., Di Girolamo, S., Gaziano, R., et al. (2020). Lactoferrin as Protective Natural Barrier of Respiratory and Intestinal Mucosa against Coronavirus Infection and Inflammation. *Ijms* 21, 4903. doi:10.3390/ijms21144903

**PubMed Abstract** (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32664543/>) | **CrossRef Full Text** (<https://doi.org/10.3390/ijms21144903>) | **Google Scholar** ([https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as\\_sdt=0%2C5&q=Lactoferrin+as+Protective+Natural+Barrier+of+Respiratory+and+Intestinal+Mucosa+against+Coronavirus+Infection+and+Inflammation&btnG=](https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=Lactoferrin+as+Protective+Natural+Barrier+of+Respiratory+and+Intestinal+Mucosa+against+Coronavirus+Infection+and+Inflammation&btnG=))

Case, D., Betz, R., Cerutti, D., Cheatham, T., Darden, T., Duke, R., et al. (2016). *Amber 2016*. San Fr: Univ. California.

Chen, H.-L., Wang, L.-C., Chang, C.-H., Yen, C.-C., Cheng, W. T. K., Wu, S.-C., et al. (2008). Recombinant Porcine Lactoferrin Expressed in the Milk of Transgenic Mice Protects Neonatal Mice from a Lethal challenge with Enterovirus Type 71. *Vaccine* 26, 891–898. doi:10.1016/j.vaccine.2007.12.013

**PubMed Abstract** (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18207613/>) | **CrossRef Full Text** (<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.12.013>) | **Google Scholar** ([https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as\\_sdt=0%2C5&q=Recombinant+Porcine+Lactoferrin+Expressed+in+the+Milk+of+Transgenic+Mice+Protects+Neonatal+Mice+from+a+Lethal+challenge+with+Enterovirus+Type+71&btnG=](https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=Recombinant+Porcine+Lactoferrin+Expressed+in+the+Milk+of+Transgenic+Mice+Protects+Neonatal+Mice+from+a+Lethal+challenge+with+Enterovirus+Type+71&btnG=))

Chien, Y.-J., Chen, W.-J., Hsu, W.-L., and Chiou, S.-S. (2008). Bovine Lactoferrin Inhibits Japanese Encephalitis Virus by Binding to Heparan Sulfate and Receptor for Low Density Lipoprotein. *Virology* 379, 143–151. doi:10.1016/j.virol.2008.06.017

**PubMed Abstract** (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18640695/>) | **CrossRef Full Text** (<https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.06.017>) | **Google Scholar** ([https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as\\_sdt=0%2C5&q=Bovine+Lactoferrin+Inhibits+Japanese+Encephalitis+Virus+by+Binding+to+Heparan+Sulfate+and+Receptor+for+Low+Density+Lipoprotein&btnG=](https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=Bovine+Lactoferrin+Inhibits+Japanese+Encephalitis+Virus+by+Binding+to+Heparan+Sulfate+and+Receptor+for+Low+Density+Lipoprotein&btnG=))

Chu, H., Chan, J. F.-W., Yuen, T. T.-T., Shuai, H., Yuan, S., Wang, Y., et al. (2020). Comparative Tropism, Replication Kinetics, and Cell Damage Profiling of SARS-CoV-2 and SARS-CoV with Implications for Clinical Manifestations, Transmissibility, and Laboratory Studies of COVID-19: an Observational Study. *The Lancet Microbe* 1, e14–e23. doi:10.1016/S2666-5247(20)30004-5

**PubMed Abstract** (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32835326/>) | **CrossRef Full Text** ([https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(20\)30004-5](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(20)30004-5)) | **Google Scholar** ([https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as\\_sdt=0%2C5&q=Comparative+Tropism,+Replication+Kinetics,+and+Cell+Damage+Profiling+of+SARS-CoV-2+and+SARS-CoV+with+Implications+for+Clinical+Manifestations,+Transmissibility,+and+Laboratory+Studies+of+COVID-19:+an+Observational+Study&btnG=](https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=Comparative+Tropism,+Replication+Kinetics,+and+Cell+Damage+Profiling+of+SARS-CoV-2+and+SARS-CoV+with+Implications+for+Clinical+Manifestations,+Transmissibility,+and+Laboratory+Studies+of+COVID-19:+an+Observational+Study&btnG=))

Corman, V. M., Landt, O., Kaiser, M., Molenkamp, R., Meijer, A., Chu, D. K., et al. (2020). Detection of 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV) by Real-Time RT-PCR. *Euro Surveill.* 25, 2000045. doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045

**PubMed Abstract** (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31992387/>) | **CrossRef Full Text** (<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>) | **Google Scholar** ([https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as\\_sdt=0%2C5&q=Detection+of+2019+Novel+Coronavirus+\(2019-nCoV\)+by+Real-Time+RT-PCR&btnG=](https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=Detection+of+2019+Novel+Coronavirus+(2019-nCoV)+by+Real-Time+RT-PCR&btnG=))

Cui, J., Li, F., and Shi, Z.-L. (2019). Origin and Evolution of Pathogenic Coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* 17, 181–192. doi:10.1038/s41579-018-0118-9

**PubMed Abstract** (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30531947/>) | **CrossRef Full Text** (<https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>) | **Google Scholar** ([https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as\\_sdt=0%2C5&q=Origin+and+Evolution+of+Pathogenic+Coronaviruses&btnG=](https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=Origin+and+Evolution+of+Pathogenic+Coronaviruses&btnG=))





Egashira, M., Takayanagi, T., Moriuchi, M., and Moriuchi, H. (2007). Does Daily Intake of Bovine Lactoferrin-Containing Products Ameliorate Rotaviral Gastroenteritis? *Acta Paediatr.* 96, 1242–1244. doi:10.1111/j.1651-2227.2007.00393.x  
 (https://www.frontiersin.org) (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17655624/) | [CrossRef Full Text](https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2007.00393.x) (https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2007.00393.x) | [Google Scholar](https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=Does+Daily+Intake+of+Bovine+Lactoferrin-Containing+Products+Ameliorate+Rotaviral+Gastroenteritis&btnG=)

DIARI(HTT

Forni, D., Cagliani, R., Clerici, M., and Sironi, M. (2017). Molecular Evolution of Human Coronavirus Genomes. *Trends Microbiol.* 25, 35–48. doi:10.1016/j.tim.2016.09.001  
 PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27743750/) | [CrossRef Full Text](https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.09.001) (https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.09.001) | [Google Scholar](https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=Molecular+Evolution+of+Human+Coronavirus+Genomes&btnG=)

Garzon, J. I., López-Blanco, J. R., Pons, C., Kovacs, J., Abagyan, R., Fernandez-Recio, J., et al. (2009). FRODOCK: a New Approach for Fast Rotational Protein-Protein Docking. *Bioinformatics* 25, 2544–2551. doi:10.1093/bioinformatics/btp447  
 PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19620099/) | [CrossRef Full Text](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp447) (https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp447) | [Google Scholar](https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=FRODOCK:+a+New+Approach+for+Fast+Rotational+Protein-Protein+Docking&btnG=)

Genheden, S., and Ryde, U. (2015). The MM/PBSA and MM/GBSA Methods to Estimate Ligand-Binding Affinities. *Expert Opin. Drug Discov.* 10, 449–461. doi:10.1517/17460441.2015.1032936

## SOMMARIO

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25835573/) | [CrossRef Full Text](https://doi.org/10.1517/17460441.2015.1032936) (https://doi.org/10.1517/17460441.2015.1032936) | [Google Scholar](https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=The+MM/PBSA+and+MM/GBSA+Methods+to+Estimate+Ligand-Binding+Affinities&btnG=)

Astratto  
 Gualdi, L., Mertz, S., Gomez, A. M., Ramilo, O., Wittke, A., and Mejias, A. (2013). Lack of Effect of Bovine Lactoferrin in Respiratory Syncytial Virus Replication and Clinical Disease Severity in the Mouse Model. *Antivir. Res.* 99, 188–195. doi:10.1016/j.antiviral.2013.05.013

Material e metodo (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23735300/) | [CrossRef Full Text](https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.05.013) (https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.05.013) | [Google Scholar](https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=Lack+of+Effect+of+Bovine+Lactoferrin+in+Respiratory+Syncytial+Virus+Replication+and+Clinical+Disease+Severity+in+the+Mouse+Model&btnG=)

Riproduzione  
 Discussion  
 Gui, M., Song, W., Zhou, H., Xu, J., Chen, S., Xiang, Y., et al. (2017). Cryo-electron Microscopy Structures of the SARS-CoV Spike Glycoprotein Reveal a Prerequisite Conformational State for Receptor Binding. *Cell Res* 27, 119–129. doi:10.1038/cr.2016.152

Disponibilità dei dati  
 PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28008928/) | [CrossRef Full Text](https://doi.org/10.1038/cr.2016.152) (https://doi.org/10.1038/cr.2016.152) | [Google Scholar](https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=Cryo-electron+Microscopy+Structures+of+the+SARS-CoV+Spike+Glycoprotein+Reveal+a+Prerequisite+Conformational+State+for+Receptor+Binding&btnG=)

Finanziamento  
 Hirashima, N., Orito, E., Ohba, K., Kondo, H., Sakamoto, T., Matsunaga, S., et al. (2004). A Randomized Controlled Trial of Consensus Interferon with or without Lactoferrin for Chronic Hepatitis C Patients with Genotype 1b and High Viral Load. *Hepatol. Res.* 29, 9–12. doi:10.1016/j.hepres.2004.01.002

Contributi  
 Ringraziamenti (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15135340/) | [CrossRef Full Text](https://doi.org/10.1016/j.hepres.2004.01.002) (https://doi.org/10.1016/j.hepres.2004.01.002) | [Google Scholar](https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=A+Randomized+Controlled+Trial+of+Consensus+Interferon+with+or+without+Lactoferrin+for+Chronic+Hepatitis+C+Patients+with+Genotype+1b+and+High+Viral+Load&btnG=)

Conflitti di interesse  
 Ringraziamenti  
 Hui, R., Meng, X., Zhang, F., Xiang, Y., and Wang, J. (2021). The *In Vitro* Antiviral Activity of Lactoferrin against Common Human Coronaviruses and SARS-CoV-2 Is Mediated by Targeting the Heparan Sulfate Co-receptor. *Emerging Microbes & Infections* 10 (1), 317–330. doi:10.1080/22221751.2021.1888660

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3936247/) | [CrossRef Full Text](https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1888660) (https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1888660) | [Google Scholar](https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=The+In+Vitro+Antiviral+Activity+of+Lactoferrin+against+Common+Human+Coronaviruses+and+SARS-CoV-2+Is+Mediated+by+Targeting+the+Heparan+Sulfate+Co-receptor&btnG=)

Conflitti di interesse  
 Iannone, F., Ambrosino, F., Bracco, G., De Rosa, M., Funel, A., Guarneri, G., Migliori, S., Palombi, F., Ponti, G., Santomauro, G., and Procacci, P. (2019). "CRESCO ENEA HPC Clusters: a Working Example of a Multifabric GPPS Spectrum Scale Layout," in 2019 International Conference on High Performance Computing & Simulation (HPCS), Dublin, Ireland, 1051–1052. doi:10.1109/HPCS48598.2019.9188135

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30356097/) | [CrossRef Full Text](https://doi.org/10.1109/HPCS48598.2019.9188135) (https://doi.org/10.1109/HPCS48598.2019.9188135) | [Google Scholar](https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=CRESCO+ENEA+HPC+Clusters:+a+Working+Example+of+a+Multifabric+GPPS+Spectrum+Scale+Layout&btnG=)

Conflitti di interesse  
 Ishibashi, Y., Takeda, K., Tsukidate, N., Miyazaki, H., Ohira, K., Dosakaakita, H., et al. (2005). Randomized Placebo-Controlled Trial of Interferon Alpha-2b Plus Ribavirin with and without Lactoferrin for Chronic Hepatitis C. *Hepatol. Res.* 32, 218–223. doi:10.1016/j.hepres.2005.03.018

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15936247/) | [CrossRef Full Text](https://doi.org/10.1016/j.hepres.2005.03.018) (https://doi.org/10.1016/j.hepres.2005.03.018) | [Google Scholar](https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=Randomized+Placebo-Controlled+Trial+of+Interferon+Alpha-2b+Plus+Ribavirin+with+and+without+Lactoferrin+for+Chronic+Hepatitis+C&btnG=)

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30356097/) | [CrossRef Full Text](https://doi.org/10.1038/s41598-018-34171-7) (https://doi.org/10.1038/s41598-018-34171-7) | [Google Scholar](https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=Stabilized+Coronavirus+Spikes+Are+Resistant+to+Conformational+Changes+Induced+by+Receptor+Recognition+or+Proteolysis&btnG=)

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30356097/) | [CrossRef Full Text](https://doi.org/10.1038/s41598-018-34171-7) (https://doi.org/10.1038/s41598-018-34171-7) | [Google Scholar](https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=Stabilized+Coronavirus+Spikes+Are+Resistant+to+Conformational+Changes+Induced+by+Receptor+Recognition+or+Proteolysis&btnG=)

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29163511/) | [CrossRef Full Text](https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01438) (https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01438) | [Google Scholar](https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=Lactoferrin+in+a+Context+of+Inflammation-Induced+Pathology&btnG=)

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29163511/) | [CrossRef Full Text](https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01438) (https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01438) | [Google Scholar](https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=Lactoferrin+in+a+Context+of+Inflammation-Induced+Pathology&btnG=)

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32225176/) | [CrossRef Full Text](https://doi.org/10.1038/s41586-020-2180-5) (https://doi.org/10.1038/s41586-020-2180-5) | [Google Scholar](https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=Structure+of+the+SARS-CoV-2+Spike+Receptor-Binding+Domain+Bound+to+the+ACE2+Receptor&btnG=)

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32225176/) | [CrossRef Full Text](https://doi.org/10.1038/s41586-020-2180-5) (https://doi.org/10.1038/s41586-020-2180-5) | [Google Scholar](https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=Structure+of+the+SARS-CoV-2+Spike+Receptor-Binding+Domain+Bound+to+the+ACE2+Receptor&btnG=)

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32425007/) | [CrossRef Full Text](https://doi.org/10.1631/jzus.B2000095) (https://doi.org/10.1631/jzus.B2000095) | [Google Scholar](https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=Can+SARS-CoV-2+Infected+Women+Breastfeed+after+Viral+Clearance?&btnG=)

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32425007/) | [CrossRef Full Text](https://doi.org/10.1631/jzus.B2000095) (https://doi.org/10.1631/jzus.B2000095) | [Google Scholar](https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=Can+SARS-CoV-2+Infected+Women+Breastfeed+after+Viral+Clearance?&btnG=)

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21887302/) | [CrossRef Full Text](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023710) (https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023710) | [Google Scholar](https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=Inhibition+of+SARS+Pseudovirus+Cell+Entry+by+Lactoferrin+Binding+to+Heparan+Sulfate+Proteoglycans&btnG=)

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21887302/) | [CrossRef Full Text](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023710) (https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023710) | [Google Scholar](https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=Inhibition+of+SARS+Pseudovirus+Cell+Entry+by+Lactoferrin+Binding+to+Heparan+Sulfate+Proteoglycans&btnG=)

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30987256/) | [CrossRef Full Text](https://doi.org/10.3390/molecules24071323) (https://doi.org/10.3390/molecules24071323) | [Google Scholar](https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=Lactoferrin+in+Aseptic+and+Septic+Inflammation&btnG=)

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30987256/) | [CrossRef Full Text](https://doi.org/10.3390/molecules24071323) (https://doi.org/10.3390/molecules24071323) | [Google Scholar](https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=Lactoferrin+in+Aseptic+and+Septic+Inflammation&btnG=)

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27578435/) | [CrossRef Full Text](https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042301) (https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042301) | [Google Scholar](https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=Structure,+Function,+and+Evolution+of+Coronavirus+Spike+Proteins&btnG=)

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27578435/) | [CrossRef Full Text](https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042301) (https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042301) | [Google Scholar](https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=Structure,+Function,+and+Evolution+of+Coronavirus+Spike+Proteins&btnG=)

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21887302/) | [CrossRef Full Text](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023710) (https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023710) | [Google Scholar](https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=Inhibition+of+SARS+Pseudovirus+Cell+Entry+by+Lactoferrin+Binding+to+Heparan+Sulfate+Proteoglycans&btnG=)

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21887302/) | [CrossRef Full Text](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023710) (https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023710) | [Google Scholar](https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=Inhibition+of+SARS+Pseudovirus+Cell+Entry+by+Lactoferrin+Binding+to+Heparan+Sulfate+Proteoglycans&btnG=)

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30987256/) | [CrossRef Full Text](https://doi.org/10.3390/molecules24071323) (https://doi.org/10.3390/molecules24071323) | [Google Scholar](https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=Lactoferrin+in+Aseptic+and+Septic+Inflammation&btnG=)

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30987256/) | [CrossRef Full Text](https://doi.org/10.3390/molecules24071323) (https://doi.org/10.3390/molecules24071323) | [Google Scholar](https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=Lactoferrin+in+Aseptic+and+Septic+Inflammation&btnG=)

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21887302/) | [CrossRef Full Text](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023710) (https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023710) | [Google Scholar](https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=Inhibition+of+SARS+Pseudovirus+Cell+Entry+by+Lactoferrin+Binding+to+Heparan+Sulfate+Proteoglycans&btnG=)

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21887302/) | [CrossRef Full Text](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023710) (https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023710) | [Google Scholar](https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=Inhibition+of+SARS+Pseudovirus+Cell+Entry+by+Lactoferrin+Binding+to+Heparan+Sulfate+Proteoglycans&btnG=)

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30987256/) | [CrossRef Full Text](https://doi.org/10.3390/molecules24071323) (https://doi.org/10.3390/molecules24071323) | [Google Scholar](https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=Lactoferrin+in+Aseptic+and+Septic+Inflammation&btnG=)

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30987256/) | [CrossRef Full Text](https://doi.org/10.3390/molecules24071323) (https://doi.org/10.3390/molecules24071323) | [Google Scholar](https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=Lactoferrin+in+Aseptic+and+Septic+Inflammation&btnG=)

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27578435/) | [CrossRef Full Text](https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042301) (https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042301) | [Google Scholar](https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=Structure,+Function,+and+Evolution+of+Coronavirus+Spike+Proteins&btnG=)

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27578435/) | [CrossRef Full Text](https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042301) (https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042301) | [Google Scholar](https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=Structure,+Function,+and+Evolution+of+Coronavirus+Spike+Proteins&btnG=)

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21887302/) | [CrossRef Full Text](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023710) (https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023710) | [Google Scholar](https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=Inhibition+of+SARS+Pseudovirus+Cell+Entry+by+Lactoferrin+Binding+to+Heparan+Sulfate+Proteoglycans&btnG=)

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21887302/) | [CrossRef Full Text](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023710) (https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023710) | [Google Scholar](https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=Inhibition+of+SARS+Pseudovirus+Cell+Entry+by+Lactoferrin+Binding+to+Heparan+Sulfate+Proteoglycans&btnG=)



(https://v



CrossRef Full Text (https://doi.org/10.1139/011-075) | Google Scholar (https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as\_sdt=0%2C5&q=Biocatalysis+and+Molecular+Impacts+of+Lactoferrin+on+Small+Intestine+Growth+and+Development+during+Early+Life+This+Article+Is+Part+of+the+Special+Issue+Entitled+Lactoferrin+and+Has+Undergone+the+Journal's+Usual+Peer+Review+Process&btnG=)

Lu, L., Hangoc, G., Oliff, A., Chen, L. T., Shen, R. N., and Broxmeyer, H. E. (1987). Protective Influence of Lactoferrin on Mice Infected with the Polycythemia-Inducing Strain of Friend Virus Complex. *Cancer Res.* 47, 4184–4188.

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3038309/) | Google Scholar (https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as\_sdt=0%2C5&q=Protective+Influence+of+Lactoferrin+on+Mice+Infected+with+the+Polycythemia-Inducing+Strain+of+Friend+Virus+Complex&btnG=)

Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., et al. (2020). Genomic Characterisation and Epidemiology of 2019 Novel Coronavirus: Implications for Virus Origins and Receptor Binding. *The Lancet* 395, 565–574. doi:10.1016/S0140-6736(20)30251-8

CrossRef Full Text (https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8) | Google Scholar (https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as\_sdt=0%2C5&q=Genomic+Characterisation+and+Epidemiology+of+2019+Novel+Coronavirus+Implications+for+Virus+Origins+and+Receptor+Binding&btnG=)

Mancinelli, R., Rosa, L., Cutone, A., Lepanto, M. S., Franchitto, A., Onori, P., et al. (2020). Viral Hepatitis and Iron Dysregulation: Molecular Pathways and the Role of Lactoferrin. *Molecules* 25, 1997. doi:10.3390/molecules25081997

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32344579/) | CrossRef Full Text (https://doi.org/10.3390/molecules25081997) | Google Scholar (https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as\_sdt=0%2C5&q=Viral+Hepatitis+and+Iron+Dysregulation+Molecular+Pathways+and+the+Role+of+Lactoferrin&btnG=)

Marchetti, M., Trybala, E., Superti, F., Johansson, M., and Bergström, T. (2004). Inhibition of Herpes Simplex Virus Infection by Lactoferrin Is Dependent on Interference with the Virus Binding to Glycosaminoglycans. *Virology* 318, 405–413. doi:10.1016/j.virol.2003.09.029

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14972565/) | CrossRef Full Text (https://doi.org/10.1016/j.virol.2003.09.029) | Google Scholar (https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as\_sdt=0%2C5&q=Inhibition+of+Herpes+Simplex+Virus+Infection+by+Lactoferrin+Is+Dependent+on+Interference+with+the+Virus+Binding+to+Glycosaminoglycans&btnG=)

Marietta, M., Coluccio, V., and Luppi, M. (2020). COVID-19, Coagulopathy and Venous Thromboembolism: More Questions Than Answers. *Intern. Emerg. Med.* 15, 1375–1387. doi:10.1007/s11739-020-02432-x

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32653981/) | CrossRef Full Text (https://doi.org/10.1007/s11739-020-02432-x) | Google Scholar (https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as\_sdt=0%2C5&q=COVID-19,+Coagulopathy+and+Venous+Thromboembolism:+More+Questions+Than+Answers&btnG=)

McGibbon, B., Beauchamp, K. A., Harrigan, M. P., Klein, C., Swails, J. M., Hernández, C. X., et al. (2015). MDTraj: A Modern Open Library for the Analysis of Molecular Dynamics Trajectories. *Biophysical J.* 109, 1528–1532. doi:10.1016/j.bpj.2015.08.015

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26488642/) | CrossRef Full Text (https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.08.015) | Google Scholar (https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as\_sdt=0%2C5&q=MDTraj+Modern+Open+Library+for+the+Analysis+of+Molecular+Dynamics+Trajectories&btnG=)

Moazan, M. D., Debbink, K., and Baric, R. S. (2014). Coronavirus Non-structural Protein 16: Evasion, Attenuation, and Possible Treatments. *Virus. Res.* 194, 191–199. doi:10.1016/j.virusres.2014.09.009

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25278144/) | CrossRef Full Text (https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.09.009) | Google Scholar (https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as\_sdt=0%2C5&q=Coronavirus+Non-structural+Protein+16:+Evasion,+Attenuation,+and+Possible+Treatments&btnG=)

Moore, S. A., Anderson, B. F., Groom, C. R., Haridas, M., and Baker, E. N. (1997). Three-dimensional Structure of Diferric Bovine Lactoferrin at 2.8 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* 274, 222–236. doi:10.1006/jmbi.1997.1386

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9398529/) | CrossRef Full Text (https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1386) | Google Scholar (https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as\_sdt=0%2C5&q=Three-dimensional+Structure+of+Diferric+Bovine+Lactoferrin+at+2.8+Å+Resolution&btnG=)

Ng, T. B., Cheung, R. C. F., Wong, J. H., Wang, Y., Ip, D. T. M., Wan, D. C. C., et al. (2015). Antiviral Activities of Whey Proteins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 6997–7008. doi:10.1007/s00253-015-6818-4

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26198883/) | CrossRef Full Text (https://doi.org/10.1007/s00253-015-6818-4) | Google Scholar (https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as\_sdt=0%2C5&q=Antiviral+Activities+of+Whey+Proteins&btnG=)

Nozaki, A., Ikeda, M., Naganuma, A., Nakamura, T., Inudoh, M., Tanaka, K., et al. (2003). Identification of a Lactoferrin-Derived Peptide Possessing Binding Activity to Hepatitis C Virus E2 Envelope Protein. *J. Biol. Chem.* 278, 10162–10173. doi:10.1074/jbc.M207879200

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12522210/) | CrossRef Full Text (https://doi.org/10.1074/jbc.M207879200) | Google Scholar (https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as\_sdt=0%2C5&q=Identification+of+a+Lactoferrin-Derived+Peptide+Possessing+Binding+Activity+to+Hepatitis+C+Virus+E2+Envelope+Protein&btnG=)

Okada, S., Tanaka, K., Sato, T., Ueno, H., Saito, S., Okusaka, T., et al. (2002). Dose-response Trial of Lactoferrin in Patients with Chronic Hepatitis C. *Jpn. J. Cancer Res.* 93, 1063–1069. doi:10.1111/j.1349-7006.2002.tb02484.x

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12359061/) | CrossRef Full Text (https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2002.tb02484.x) | Google Scholar (https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as\_sdt=0%2C5&q=Dose-response+Trial+of+Lactoferrin+in+Patients+with+Chronic+Hepatitis+C&btnG=)

Petersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., et al. (2004). UCSF Chimera?A Visualization System for Exploratory Research and Analysis. *J. Comput. Chem.* 25, 1605–1612. doi:10.1002/jcc.20084

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15264254/) | CrossRef Full Text (https://doi.org/10.1002/jcc.20084) | Google Scholar (https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as\_sdt=0%2C5&q=UCSF+Chimera?A+Visualization+System+for+Exploratory+Research+and+Analysis&btnG=)

Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., et al. (2005). Scalable Molecular Dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* 26, 1781–1802. doi:10.1002/jcc.20289

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16222654/) | CrossRef Full Text (https://doi.org/10.1002/jcc.20289) | Google Scholar (https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as\_sdt=0%2C5&q=Scalable+Molecular+Dynamics+with+NAMD&btnG=)

Ramírez-Aportela, E., López-Blanco, J. R., and Chacón, P. (2016). FRODOCK 2.0: Fast Protein-Protein Docking Server. *Bioinformatics* 32, 2386–2388. doi:10.1093/bioinformatics/btw141

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27153583/) | CrossRef Full Text (https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw141) | Google Scholar (https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as\_sdt=0%2C5&q=FRODOCK+2.0:+Fast+Protein-Protein+Docking+Server&btnG=)

Romeo, A., Iacovelli, F., and Falconi, M. (2020). Targeting the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein Prefusion Conformation: Virtual Screening and Molecular Dynamics Simulations Applied to the Identification of Potential Fusion Inhibitors. *Virus. Res.* 286, 198068. doi:10.1016/j.virusres.2020.198068

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32565126/) | CrossRef Full Text (https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198068) | Google Scholar (https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as\_sdt=0%2C5&q=Targeting+the+SARS-CoV-2+Spike+Glycoprotein+Prefusion+Conformation+Virtual+Screening+and+Molecular+Dynamics+Simulations+Applied+to+the+Identification+of+Potential+Fusion+Inhibitors&btnG=)

Rosa, L., Cutone, A., Lepanto, M., Paesano, R., and Valenti, P. (2017). Lactoferrin: A Natural Glycoprotein Involved in Iron and Inflammatory Homeostasis. *Ijms* 18, 1985. doi:10.3390/ijms18091985

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28914813/) | CrossRef Full Text (https://doi.org/10.3390/ijms18091985) | Google Scholar (https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as\_sdt=0%2C5&q=Lactoferrin+A+Natural+Glycoprotein+Involved+in+Iron+and+Inflammatory+Homeostasis&btnG=)

Ryckaert, J.-P., Cicotti, G., and Berendsen, H. J. C. (1997). Numerical Integration of the Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints: Molecular Dynamics of N-Alkanes. *J. Comput. Phys.* 23, 327–341. doi:10.1016/0021-9991(77)90098-5

CrossRef Full Text (https://doi.org/10.1016/0021-9991(77)90098-5) | Google Scholar (https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as\_sdt=0%2C5&q=Numerical+Integration+of+the+Cartesian+Equations+of+Motion+of+a+System+with+Constraints+Molecular+Dynamics+of+N-Alkanes&btnG=)





Salomon-Ferrer, R., Case, D. A., and Walker, R. C. (2013). An Overview of the Amber Biomolecular Simulation Package. *WIREs Comput. Mol. Sci.* 3, 198–210. doi:10.1002/wcms.1121

DIARI(HTTP

(https://www.frontiersin.org) CrossRef Full Text (https://doi.org/10.1002/wcms.1121) | Google Scholar (https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as\_sdt=0%2C5&q=An+Overview+of+the+Amber+Biomolecular+Simulation+Package&btnG=)

Sapp, M., and Bienkowska-Haba, M. (2009). Viral Entry Mechanisms: Human Papillomavirus and a Long Journey from Extracellular Matrix to the Nucleus. *FEBS J.* 276, 7206–7216. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07400.x

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19878308/) | CrossRef Full Text (https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07400.x) | Google Scholar (https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as\_sdt=0%2C5&q=Viral+Entry+Mechanisms:+Human+Papillomavirus+and+a+Long+Journey+from+Extracellular+Matrix+to+the+Nucleus&btnG=)

Shin, K., Wakabayashi, H., Yamauchi, K., Teraguchi, S., Tamura, Y., Kurokawa, M., et al. (2005). Effects of Orally Administered Bovine Lactoferrin and Lactoperoxidase on Influenza Virus Infection in Mice. *J. Med. Microbiol.* 54, 717–723. doi:10.1099/jmm.0.46018-0

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16014423/) | CrossRef Full Text (https://doi.org/10.1099/jmm.0.46018-0) | Google Scholar (https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as\_sdt=0%2C5&q=Effects+of+Orally+Administered+Bovine+Lactoferrin+and+Lactoperoxidase+on+Influenza+Virus+Infection+in+Mice&btnG=)

Sumariño (2004). Herpes Simplex Virus: Receptors and Ligands for Cell Entry. *Cell. Microbiol.* 6, 401–410. doi:10.1111/j.1462-5822.2004.00389.x

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15056211/) | CrossRef Full Text (https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00389.x) | Google Scholar (https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as\_sdt=0%2C5&q=Herpes+Simplex+Virus:+Receptors+and+Ligands+for+Cell+Entry&btnG=)

Suzuki, Y., Shi, W., Liu, J., Lai, A. C. K., Zhou, J., et al. (2016). Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends Microbiol.* 24, 490–502. doi:10.1016/j.tim.2016.03.003

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27012512/) | CrossRef Full Text (https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.03.003) | Google Scholar (https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as\_sdt=0%2C5&q=Epidemiology,+Genetic+Recombination,+and+Pathogenesis+of+Coronaviruses&btnG=)

Suzuki, Y., Baker, H. M., Shewry, S. C., Jameson, G. B., and Baker, E. N. (1999). Structure of Recombinant Human Lactoferrin Expressed in *Aspergillus Awamori*. *Acta Crystallogr. D Biol. Cryst.* 55, 403–407. doi:10.1107/S0907444998011226

PubMed Abstract (https://doi.org/10.1107/S0907444998011226) | Google Scholar (https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as\_sdt=0%2C5&q=Structure+of+Recombinant+Human+Lactoferrin+Expressed+in+Aspergillus+Awamori&btnG=)

Suzuki, Y. A., Wong, H., Ashida, K.-Y., Schryvers, A. B., and Lönnnerdal, B. (2008). The N1 Domain of Human Lactoferrin Is Required for Internalization by Caco-2 Cells and Targeting to the Nucleus. *Biochemistry* 47, 10915–10920. doi:10.1021/bi8012164

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18785755/) | CrossRef Full Text (https://doi.org/10.1021/bi8012164) | Google Scholar (https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as\_sdt=0%2C5&q=The+N1+Domain+of+Human+Lactoferrin+Is+Required+for+Internalization+by+Caco-2+Cells+and+Targeting+to+the+Nucleus&btnG=)

Swart, J., Kuipers, M. e., Smit, C., Pauwels, R., De Bèthune, M. p., De Clercq, E., et al. (1996). Antiviral Effects of Milk Proteins: Acylation Results in Polyanionic Compounds with Potent Activity against Human Immunodeficiency Virus Types 1 and 2 *In Vitro*. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 12, 769–775. doi:10.1089/aid.1996.12.769

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8738428/) | CrossRef Full Text (https://doi.org/10.1089/aid.1996.12.769) | Google Scholar (https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as\_sdt=0%2C5&q=Antiviral+Effects+of+Milk+Proteins:+Acylation+Results+in+Polyanionic+Compounds+with+Potent+Activity+against+Human+Immunodeficiency+Virus+Types+1+and+2+In+Vitro&btnG=)

Tanaka, K., Ikeda, M., Nozaki, A., Kato, N., Tsuda, H., Saito, S., et al. (1999). Lactoferrin Inhibits Hepatitis C Virus Viremia in Patients with Chronic Hepatitis C: a Pilot Study. *Jpn. J. Cancer Res.* 90, 367–371. doi:10.1111/j.1349-7006.1999.tb00756.x

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10363572/) | CrossRef Full Text (https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.1999.tb00756.x) | Google Scholar (https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as\_sdt=0%2C5&q=Lactoferrin+Inhibits+Hepatitis+C+Virus+Viremia+in+Patients+with+Chronic+Hepatitis+C:+a+Pilot+Study&btnG=)

Tian, X., Li, C., Huang, A., Xia, S., Lu, S., Shi, Z., et al. (2020). Potent Binding of 2019 Novel Coronavirus Spike Protein by a SARS Coronavirus-specific Human Monoclonal Antibody. *Emerging Microbes & Infections* 9, 382–385. doi:10.1080/22221751.2020.1729069

PubMed Abstract (https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1729069) | Google Scholar (https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as\_sdt=0%2C5&q=Potent+Binding+of+2019+Novel+Coronavirus+Spike+Protein+by+a+SARS+Coronavirus-specific+Human+Monoclonal+Antibody&btnG=)

Ueno, H., Sato, T., Yamamoto, S., Tanaka, K., Ohkawa, S., Takagi, H., et al. (2006). Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of Bovine Lactoferrin in Patients with Chronic Hepatitis C. *Cancer Sci.* 97, 1105–1110. doi:10.1111/j.1349-7006.2006.00274.x

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16984383/) | CrossRef Full Text (https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2006.00274.x) | Google Scholar (https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as\_sdt=0%2C5&q=Randomized,+Double-Blind,+Placebo-Controlled+Trial+of+Bovine+Lactoferrin+in+Patients+with+Chronic+Hepatitis+C&btnG=)

Valenti, P., and Antonini, G. (2005). Lactoferrin. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 2576–2587. doi:10.1007/s00018-005-5372-0

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16261253/) | CrossRef Full Text (https://doi.org/10.1007/s00018-005-5372-0) | Google Scholar (https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as\_sdt=0%2C5&q=Lactoferrin&btnG=)

van der Strate, B. W. A., Beljaars, L., Molema, G., Harmsen, M. C., and Meijer, D. K. F. (2001). Antiviral Activities of Lactoferrin. *Antiviral Res.* 52, 225–239. doi:10.1016/S0166-3542(01)00195-4

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11675140/) | CrossRef Full Text (https://doi.org/10.1016/S0166-3542(01)00195-4) | Google Scholar (https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as\_sdt=0%2C5&q=Antiviral+Activities+of+Lactoferrin&btnG=)

Vitetta, L., Coulson, S., Beck, S. L., Gramotnev, H., Du, S., and Lewis, S. (2013). The Clinical Efficacy of a Bovine Lactoferrin/whcy Protein Ig-Rich Fraction (Lf/IgF) for the Common Cold: a Double Blind Randomized Study. *Complement. Therapies Med.* 21, 164–171. doi:10.1016/j.ctim.2012.12.006

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23642947/) | CrossRef Full Text (https://doi.org/10.1016/j.ctim.2012.12.006) | Google Scholar (https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as\_sdt=0%2C5&q=The+Clinical+Efficacy+of+a+Bovine+Lactoferrin/whcy+Protein+Ig-Rich+Fraction+(Lf/IgF)+for+the+Common+Cold:+a+Double+Blind+Randomized+Study&btnG=)

Wakabayashi, H., Oda, H., Yamauchi, K., and Abe, F. (2014). Lactoferrin for Prevention of Common Viral Infections. *J. Infect. Chemother.* 20, 666–671. doi:10.1016/j.jiac.2014.08.003

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25182867/) | CrossRef Full Text (https://doi.org/10.1016/j.jiac.2014.08.003) | Google Scholar (https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as\_sdt=0%2C5&q=Lactoferrin+for+Prevention+of+Common+Viral+Infections&btnG=)

Wang, Q., Zhang, Y., Wu, L., Niu, S., Song, C., Zhang, Z., et al. (2020). Structural and Functional Basis of SARS-CoV-2 Entry by Using Human ACE2. *Cell* 181, 894–904. doi:10.1016/j.cell.2020.03.045

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32275855/) | CrossRef Full Text (https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.045) | Google Scholar (https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as\_sdt=0%2C5&q=Structural+and+Functional+Basis+of+SARS-CoV-2+Entry+by+Using+Human+ACE2&btnG=)

Woodman, T., Strunk, T., Patole, S., Hartmann, B., Simmer, K., and Currie, A. (2018). Effects of Lactoferrin on Neonatal Pathogens and Bifidobacterium Breve in Human Breast Milk. *PLoS One* 13, e0201819. doi:10.1371/journal.pone.0201819

PubMed Abstract (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30133470/) | CrossRef Full Text (https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201819) | Google Scholar (https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as\_sdt=0%2C5&q=Effects+of+Lactoferrin+on+Neonatal+Pathogens+and+Bifidobacterium+Breve+in+Human+Breast+Milk&btnG=)

Wrapp, D., Wang, N., Corbett, K. S., Goldsmith, J. A., Hsieh, C.-L., Abiona, O., et al. (2020). Cryo-EM Structure of the 2019-nCoV Spike in the Prefusion Conformation. *Science* 367, 1260–1263. doi:10.1126/science.abb2507

(https://v



PubMed Abstract (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32511295/>) | CrossRef Full Text (<https://doi.org/10.1126/science.abb2507>) | Google Scholar ([https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as\\_sdt=0%2C5&q=Cryo-EM+Structure+of+the+2019-nCoV+Spike+in+the+Prefusion+Conformation&btnG=](https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=Cryo-EM+Structure+of+the+2019-nCoV+Spike+in+the+Prefusion+Conformation&btnG=))

DIARI(HTTP

(<https://www.frontiersin.org>)  
 Yen, M. H., Chiu, C. H., Huang, Y. C., and Lin, T. Y. (2011). Effects of Lactoferrin-Containing Formula in the Prevention of Enterovirus and Rotavirus Infection and Impact on Serum Cytokine Levels: a Randomized Trial. *Chang Gung Med. J.* 34, 395–402.

PubMed Abstract (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21880194/>) | Google Scholar ([https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as\\_sdt=0%2C5&q=Effects+of+Lactoferrin-Containing+Formula+in+the+Prevention+of+Enterovirus+and+Rotavirus+Infection+and+Impact+on+Serum+Cytokine+Levels:+a+Randomized+Trial&btnG=](https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=Effects+of+Lactoferrin-Containing+Formula+in+the+Prevention+of+Enterovirus+and+Rotavirus+Infection+and+Impact+on+Serum+Cytokine+Levels:+a+Randomized+Trial&btnG=))

Yuan, Y., Cao, D., Zhang, Y., Ma, J., Qi, J., Wang, Q., et al. (2017). Cryo-EM Structures of MERS-CoV and SARS-CoV Spike Glycoproteins Reveal the Dynamic Receptor Binding Domains. *Nat. Commun.* 8, 15092. doi:10.1038/ncomms15092

PubMed Abstract (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28393837/>) | CrossRef Full Text (<https://doi.org/10.1038/ncomms15092>) | Google Scholar ([https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as\\_sdt=0%2C5&q=Cryo-EM+Structures+of+MERS-CoV+and+SARS-CoV+Spike+Glycoproteins+Reveal+the+Dynamic+Receptor+Binding+Domains&btnG=](https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=Cryo-EM+Structures+of+MERS-CoV+and+SARS-CoV+Spike+Glycoproteins+Reveal+the+Dynamic+Receptor+Binding+Domains&btnG=))

Zwirzitz, A., Reiter, M., Skrabana, R., Ohradnova-Repic, A., Majdic, O., Gutekova, M., et al. (2018). Lactoferrin Is a Natural Inhibitor of Plasminogen Activation. *J. Biol. Chem.* 293, 8600–8613. doi:10.1074/jbc.RA118.003145

PubMed Abstract (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29669808/>) | CrossRef Full Text (<https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003145>) | Google Scholar ([https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as\\_sdt=0%2C5&q=Lactoferrin+Is+a+Natural+Inhibitor+of+Plasminogen+Activation&btnG=](https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=Lactoferrin+Is+a+Natural+Inhibitor+of+Plasminogen+Activation&btnG=))

Astratto

**Keywords:** lactoferrin, COVID-19, SARS-CoV-2, spike, bovine lactoferrin

**Citation:** Campione E, Lanna C, Cosio T, Rosa L, Conte MP, Iacovelli F, Romeo A, Falconi M, Del Vecchio C, Franchin E, Lia MS, Minieri M, Chiamonte C, Ciotti M, Nuccetelli M, Terrinoni A, Iannuzzi I, Coppeda L, Magrini A, Bernardini S, Sabatini S, Rosapepe F, Bartoletti PL, Moricca N, Di Lorenzo A, Andreoni M, Sarmati L, Miani A, Piscitelli P, Valenti P and Bianchi R (2021) Lactoferrin Against SARS-CoV-2: *In Vitro* and *In Silico* Evidences. *Front. Pharmacol.* 12:666600. doi: 10.3389/fphar.2021.666600

Received: 10 February 2021; Accepted: 08 March 2021;

Discussed: 10 February 2021;

Published: 17 June 2021.

Dichiarazione sulla disponibilità dei dati: Piero Sesini (<https://loop.frontiersin.org/people/677058/overview>), University of Urbino Carlo Bo, Italy

Contributi dell'autore

Reviewed by:

Javier Arias-Diaz (<https://loop.frontiersin.org/people/1237266/overview>), Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Spain

Vadim B Vasilyev (<https://loop.frontiersin.org/people/423937/overview>), Institute of Experimental Medicine (RAS), Russia

Conflitto d'interesse

**Copyright** © 2021 Campione, Lanna, Cosio, Rosa, Conte, Iacovelli, Romeo, Falconi, Del Vecchio, Franchin, Lia, Minieri, Chiamonte, Ciotti, Nuccetelli, Terrinoni, Iannuzzi, Coppeda, Magrini, Bernardini, Sabatini, Rosapepe, Bartoletti, Moricca, Di Lorenzo, Andreoni, Sarmati, Miani, Piscitelli, Valenti and Bianchi. This is an open-access article distributed under the terms of the **Creative Commons Attribution License (CC BY)**. (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

**Correspondence:** Elena Campione, [elena.campione@uniroma2.it](mailto:elena.campione@uniroma2.it) (mailto:[elena.campione@uniroma2.it](mailto:elena.campione@uniroma2.it))

<sup>†</sup>These authors have contributed equally to this work and share senior authorship

**Disclaimer:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article or claim that may be made by its manufacturer is not guaranteed or endorsed by the publisher.

**2 Comments - Ederico Eder** (<https://loop.frontiersin.org/people/1363958/overview>) and **Coverus Fans** (<https://loop.frontiersin.org/people/1329153/overview>).



(<https://loop.frontiersin.org/people/1363958/overview>) **Ederico Eder** (<https://loop.frontiersin.org/people/1363958/overview>) <https://spinbot.biz/index.php#>

1:10 AM, 07 June 2021



(<https://loop.frontiersin.org/people/1329153/overview>) **Coverus Fans** (<https://loop.frontiersin.org/people/1329153/overview>) The virus that causes COVID-19 could have been circulating in other regions before it was identified in the central Chinese city of Wuhan at the end of 2019, a top expert at China's health authority said on Tuesday. <br><br>Liang Wannian, an expert with China's Health Commission, also told a press briefing at the end of a nearly one-month visit to Wuhan by a World Health Organization-led team that there had been no substantial spread of the virus in the city before the late 2019 outbreak.

3:58 AM, 07 June 2021

Write a comment...

Add

ANCHE LE PERSONE HANNO GUARDATO

**Fluvoxamina: una rassegna del suo meccanismo d'azione e del suo ruolo nel COVID-19 (/articles/10.3389/fphar.2021.652688/full)**

Vikas P. Sukhatme (<https://loop.frontiersin.org/people/1188211/overview>), Angela M. Reiersen (<https://loop.frontiersin.org/people/22271/overview>), Sharat J. Vayttaden (<https://loop.frontiersin.org/people/1214886/overview>) e Vidula V. Sukhatme

**Una prospettiva europea sul disturbo dell'elaborazione uditiva: conoscenza attuale e focus sulla ricerca futura (/articles/10.3389/fneur.2017.00622/full)**

Vasiliki (Vivian) Iliadou (<https://loop.frontiersin.org/people/428530/overview>), Martin Ptok, Helen Grech (<https://loop.frontiersin.org/people/479199/overview>), Ellen Raben Pedersen (<https://loop.frontiersin.org/people/479313/overview>), André Brechmann (<https://loop.frontiersin.org/people/66605/overview>), Naima Deggouj (<https://loop.frontiersin.org/people/495698/overview>), Christiane Kiese-Himmel (<https://loop.frontiersin.org/people/476084/overview>), Mariola Śliwińska-Kowalska, Andreas Nickisch (<https://loop.frontiersin.org/people/482218/overview>), Laurent Demanez, Evelyne Veuillet, Hung Thai-Van, Tony Sirimanna, Marina Callimachou (<https://loop.frontiersin.org/people/482273/overview>), Rosamaria Santarelli, Sandra Kuske, Jose Barajas, Miaden Hedjeveer (<https://loop.frontiersin.org/people/495645/overview>), Ozlem Konukseven (<https://loop.frontiersin.org/people/496512/overview>), Dorothy Veraguth, Tone Stokkerei Mattsson, Jorge Humberto Martins (<https://loop.frontiersin.org/people/479131/overview>) e Doris-Eva Bamiou (<https://loop.frontiersin.org/people/388136/overview>)

**Effetti acuti del pimobendan sulla funzione cardiaca nei cani con cardiomiopatia dilatativa indotta da tachicardia: uno studio crossover randomizzato, controllato con placebo (/articles/10.3389/fvets.2021.646437/full)**

Kaitlin Abbott-Johnson (<https://loop.frontiersin.org/people/1126827/overview>), Kursten V. Pierce (<https://loop.frontiersin.org/people/1248543/overview>), Steve Roof, Carlos L. del Rio (<https://loop.frontiersin.org/people/187793/overview>) e Robert Hamlin (<https://loop.frontiersin.org/people/35467/overview>)

**La biologia della lattoferrina, una proteina legante il ferro che può aiutare a difendersi da virus e batteri (/articles/10.3389/fimmu.2020.01221/full)**

(<https://www.frontiersin.org>)



Douglas B. Kell (<https://loop.frontiersin.org/people/673141/overview>), Eugene L. Heyden e Ethersia Pretorius (<https://loop.frontiersin.org/people/98961/overview>)  
ACCEDI (<https://www.frontiersin.org/people/login>) / REGISTRATI (<https://www.frontiersin.org/register>) — DI (<https://www.frontiersin.org/about/about-frontiers>) — DIARI (<https://www.frontiersin.org/about/about-frontiers>)

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.750460/full>  
**Microbiologia delle infezioni associate all'impianto: una sintesi delle attuali conoscenze**

Alessandra Oliva (<https://loop.frontiersin.org/people/437114/overview>), Maria Claudia Miele (<https://loop.frontiersin.org/people/1407264/overview>), Dania Al Ismail (<https://loop.frontiersin.org/people/1399202/overview>), Federica Di Timoteo (<https://loop.frontiersin.org/people/1399660/overview>), Massimiliano De Angelis (<https://loop.frontiersin.org/people/914971/overview>), Luigi Rosa (<https://loop.frontiersin.org/people/428503/overview>), Antimo Cutone (<https://loop.frontiersin.org/people/1377143/overview>), Mario Venditti, Maria Teresa Mascellino (<https://loop.frontiersin.org/people/823972/overview>), Piera Valenti (<https://loop.frontiersin.org/people/428500/overview>) e Claudio Maria Mastroianni (<https://loop.frontiersin.org/people/437075/overview>)



[https://spotlight.frontiersin.org/submit?utm\\_source=fweb&utm\\_medium=fjour&utm\\_campaign=rtlg\\_2020\\_gen](https://spotlight.frontiersin.org/submit?utm_source=fweb&utm_medium=fjour&utm_campaign=rtlg_2020_gen)

Suggerisci un argomento di ricerca > [https://spotlight.frontiersin.org/submit?utm\\_source=fweb&utm\\_medium=fjour&utm\\_campaign=rtlg\\_2020\\_gen](https://spotlight.frontiersin.org/submit?utm_source=fweb&utm_medium=fjour&utm_campaign=rtlg_2020_gen)

<https://www.frontiersin.org>

About Frontiers  
<https://www.frontiersin.org/about>  
Institutional Membership  
[https://www.frontiersin.org/about/Institutional\\_Membership](https://www.frontiersin.org/about/Institutional_Membership)  
Books  
[https://www.frontiersin.org/books/all\\_books](https://www.frontiersin.org/books/all_books)

News (<https://blog.frontiersin.org>)  
Frontiers' social media  
<https://blog.frontiersin.org/2013/11/01/frontiers-social-media-and-rss>  
Contact  
<https://www.frontiersin.org/about/contact>

Careers (<https://www.frontiersin.org/Careers>)  
Submit  
<https://www.frontiersin.org/submissioninfo>  
Notiziario  
<http://connect.frontiersin.org/subscriptions/subscribe>

Centro assistenza  
<https://frontiers.zendesk.com/hc/en-us>  
Termini & Condizioni  
<https://www.frontiersin.org/TermsandConditions.aspx>  
politica sulla riservatezza  
<https://www.frontiersin.org/legal/privacy-policy>

© 2007 - 2022 Frontiers Media SA Tutti i diritti riservati

