

26. Ottobre

## Il punto sulla risposta agli attuali vaccini: ermeneutica dei risultati, considerazioni e conclusioni

*La vita è corta,  
senza vaccini ancora di più*

È universalmente assodato che gli **attuali vaccini** contro il coronavirus 2 (SARS-CoV-2) per la sindrome respiratoria acuta grave, in particolare la vaccinazione **a base di mRNA**, possono indurre una **robusta immunità umorale e cellulare e prevenire gravi malattie causate da SARS-CoV-2**. Tuttavia, **la protezione contro l'infezione e la trasmissione da asintomatica a lieve**, in particolare dopo l'esposizione a SARS-CoV-2 varianti preoccupanti (VOC), mediante la vaccinazione con **mRNA** è **piuttosto limitata**. Le ragioni di ciò sono poco definite.

In particolare, la maggior parte degli studi disponibili è stata condotta utilizzando il sangue per determinare gli **anticorpi circolanti** e **l'immunità dei linfociti B e T** dopo la vaccinazione. Tuttavia, SARS-CoV-2 entra nell'ospite prevalentemente attraverso il tratto respiratorio. Di conseguenza, gli anticorpi della mucosa respiratoria e i **linfociti T e B di memoria residenti nei tessuti** sono probabilmente tra i **primi responder** durante l'ingresso del virus, e quindi si ritiene che siano essenziali per la protezione contro l'instaurarsi di infezioni virali dopo la vaccinazione o una precedente esposizione virale.

Il team di **Jinyi Tang** del **Carter Immunology Center, University of Virginia** ha nei giorni scorsi pubblicato un report che definisce l'immunità umorale e cellulare della **mucosa respiratoria** dopo la vaccinazione dell'mRNA COVID-19 o un'infezione naturale per comprendere meglio le caratteristiche della protezione mediata dal vaccino o dall'infezione contro l'infezione da SARS-CoV-2.

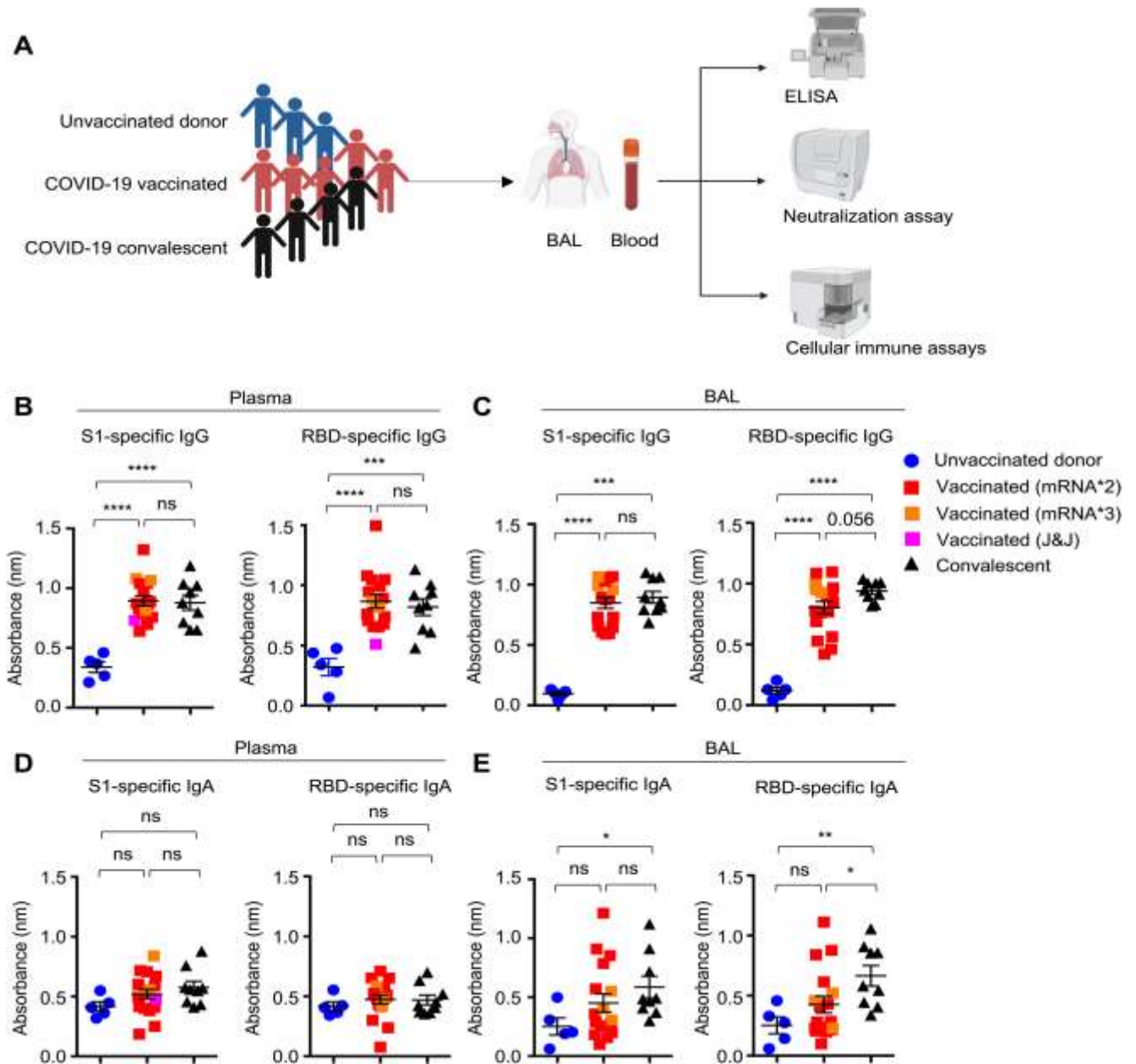
**Tang J et Respiratory mucosal immunity against SARS-CoV-2 after mRNA vaccination. *Sci Immunol.* 2022 Oct 28;7(76):eadd4853.**

Inoltre, è importante ricordare che il **sottogenere SARS-CoV-2 Omicron** sfugge facilmente alla neutralizzazione degli **anticorpi** provocata dal vaccino e dall'infezione. Al momento non è chiaro se le risposte anticorpali neutralizzanti della mucosa efficaci possano essere indotte dalla vaccinazione e/o dall'infezione naturale e in che misura ciò potrebbe proteggere dall'infezione da SARS-CoV-2.

Anche se precedenti studi hanno esaminato l'immunità cellulare e umorale indotta dal vaccino COVID-19 nella mucosa nasale (vedi **BADEKER**), tuttavia, è ancora controverso se **l'immunizzazione intramuscolare** dell'mRNA possa indurre anticorpi neutralizzanti significativi e l'espansione di **cellule T e B residenti nei tessuti del "distretto nasale"** a causa della quantità limitata di fluidi/cellule che possono essere campionate in **lavaggi nasali o tamponi nasali**. Pertanto, l'attuale comprensione dell'immunità della mucosa indotta dal vaccino COVID-19 nel tratto respiratorio rimane in gran parte "sfuggente". (vedi **Badeker**)

Il lavoro di **Tang** ha analizzato il liquido di lavaggio broncoalveolare (BAL) e il sangue di **donatori sani non vaccinati**, individui **vaccinati contro COVID-19** e **pazienti ricoverati in ospedale**. Ha inoltre esaminato gli **anticorpi leganti e neutralizzanti della mucosa** e le risposte delle **cellule T e B** residenti nei tessuti in quei soggetti.

La tabella riassume come i **convalescenti COVID-19** hanno mostrato livelli di *IgG*, *IgA* e *IgG* specifici per Spike più elevati in maniera significativa, ma non livelli di *IgM* specifici per S nel sangue, rispetto a quelli degli individui vaccinati. Risultati simili sono stati trovati nel BAL. È importante sottolineare che, e coerentemente con i risultati delle *IgA* specifiche per S1 o RBD, è stato osservato un livello significativo di *IgA* specifiche per S sia nel BAL che nel sangue di individui convalescenti ma non vaccinati. Insieme, questi risultati hanno rivelato che, contrariamente all'infezione naturale, la vaccinazione COVID-19 non ha provocato forti risposte *IgA* nel tratto respiratorio nella coorte analizzata.



### Risposte anticorpali sistemiche e respiratorie nei convalescenti COVID-19 e negli individui vaccinati.

( A ) Schema delle coorti reclutate (  $n = 5$  per i donatori non vaccinati,  $n = 19$  per gli individui vaccinati e  $n = 10$  per i convalescenti ospedalizzati COVID-19) e procedure sperimentali. Le figure sono state create con BioRender. ( da B a E ) Livelli di IgG ( B e C ) o IgA ( D ed E ) che legano SARS-CoV-2 S1 o RBD nel plasma e nel liquido BAL di donatori non vaccinati (  $n = 5$  ), individui vaccinati contro COVID-19 (  $n = 17$  ), o convalescenti (  $n = 9$  ). Un individuo che riceve Johnson & Johnson è indicato in rosa nel gruppo vaccinato. Tre individui che ricevono il richiamo (BNT162b2 o mRNA-1273) sono indicati come arancioni nel gruppo vaccinato. I dati da (B) a (E) sono mezzi  $\pm$  SEM. Le differenze statistiche sono state determinate mediante ANOVA unidirezionale e i valori di  $P$  sono indicati da ns, non significativi (  $P > 0,05$  ); \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ; e \*\*\*\*  $P < 0,0001$ .

Inoltre, utilizzando un *modello murino*, il lavoro ha confrontato l'immunità mucosa indotta dalla vaccinazione intramuscolare omogenea con mRNA rispetto alla vaccinazione intramuscolare con mRNA più l'immunizzazione di richiamo con un vettore di adenovirus intranasale.

I risultati hanno evidenziato come *solide risposte immunitarie umorali e cellulari della mucosa sono state suscitate nel polmone dall'infezione naturale e dalla vaccinazione con mRNA più la vaccinazione mediata da adenovirus, ma non dalla sola vaccinazione con mRNA.*

**In sintesi:** questi risultati hanno rivelato che, contrariamente all'infezione naturale, la vaccinazione COVID-19 **non ha provocato** forti risposte *IgA nel tratto respiratorio nella coorte analizzata.*

### **Ermeneutica dei risultati, conclusioni e considerazioni**

La vaccinazione con *mRNA* COVID-19 ha suscitato livelli di *anticorpi neutralizzanti almeno paragonabili a quelli dei convalescenti COVID-19 nella circolazione*, ma ha generato *IgA mucose notevolmente inferiori e risposte anticorpali neutralizzanti contro le varianti SARS-CoV-2 D614G, Delta e Omicron BA.1.1 rispetto a quelle dei convalescenti*, indicando così che *l'entità complessiva delle risposte anticorpali della mucosa è subottimale dopo la vaccinazione.*

I risultati sono in linea con quelli ottenuti da diversi studi clinici recenti di grandi dimensioni che hanno rivelato come la vaccinazione con *mRNA* è *relativamente meno efficiente* nella protezione contro le infezioni rispetto alla precedente infezione naturale durante l'onda delta

Da notare, la variante *Omicron BA.1.1* è sfuggita quasi completamente all'attività di neutralizzazione del BAL di individui vaccinati o precedentemente infetti. Inoltre, il lavoro fornisce prove convincenti che la vaccinazione con *mRNA*, nel mondo reale, **non induce** una significativa espansione di cellule *B* e *T* memory *mRNA* specifiche nei tessuti del distretto nasale.

Pertanto, nonostante l'induzione di una robusta immunità umorale e cellulare circolante, *gli attuali vaccini mRNA COVID-19 probabilmente non provocano livelli sufficienti di immunità mucosa nel tratto respiratorio inferiore umano* che sarebbero necessari per l'eliminazione immediata della variante infettiva di *Omicron BA.1.1* a prevenire così l'instaurarsi di infezioni.

Tale nozione è coerente con il fatto che il sottolignaggio *Omicron* continua a diffondersi a un ritmo rapido nelle regioni con alti tassi di vaccinazione e/o precedente infezione naturale.

Tuttavia questi dati non contestano l'idea che i vaccini attuali siano altamente efficaci nel prevenire il ricovero e la morte.

*La prevenzione della malattia grave dopo l'infezione è conferita principalmente dai linfociti T e B memory. A tal fine, gli epitopi delle cellule T CD8 all'interno della proteina Omicron Spike rimangono conservati come quelli dei ceppi ancestrali. Pertanto, anche se Omicron è in grado di violare la difesa dell'anticorpo neutralizzante della mucosa per causare l'infezione, il reclutamento di cellule T memory circolanti indotte dal vaccino durante l'infezione rivoluzionaria da SARS-CoV-2 consente una protezione che limita l'ulteriore diffusione virale, prevenendo lo sviluppo di malattie gravi dopo infezione.*

*Pertanto questi dati suggeriscono che l'immunità umorale della mucosa è particolarmente vulnerabile e sensibile alla fuga immunitaria da parte di Omicron BA.1.1 e di altre sottolinee.*

**È quindi abbastanza probabile che l'attuale strategia vaccinale, anche se potenziata con ulteriori booster, non raggiunga "l'immunità di gregge" o prevenga l'insorgenza di nuove infezioni o reinfezioni con futuri COV, in particolare quelli con proprietà immuno-evasive come il sottolignaggio Omicron.**

Utilizzando un modello di immunizzazione del topo, il team ha dimostrato che la sola vaccinazione sistemica con mRNA induce risposte anticorpali di neutralizzazione della mucosa respiratoria **deboli**, in particolare contro SARS-CoV-2 *Omicron BA.1.1*; tuttavia, una combinazione di vaccinazione sistemica con mRNA e immunizzazione con *adenovirus-S* della mucosa induce forti risposte anticorpali neutralizzanti non solo contro il virus ancestrale ma anche contro la variante *Omicron BA.1.1*.

Lo studio supporta la tesi secondo cui gli attuali vaccini COVID-19 sono altamente efficaci contro lo sviluppo di malattie gravi, probabilmente attraverso il reclutamento di risposte delle cellule B e T circolanti durante la reinfezione, ma offrono una protezione limitata contro l'infezione rivoluzionaria, in particolare dal sottolignaggio

Questi dati pongono un momento di riflessione nelle prossime campagne vaccinali

L'analisi di questi dati suggerisce che un vaccino di richiamo SARS-CoV-2 della mucosa potrebbe essere necessario per ottenere un'immunità e una protezione più robuste dalla reinfezione da future varianti.

A tal fine, il team ha condotto un esperimento di prova con *mRNA+Ad5-S* che ha provocato una forte immunità cellulare nel tratto respiratorio e un convincente incremento delle *IgA mucosali* Associati ad una marcata neutralizzazione contro *Omicron BA.1.1*.

L'impiego di un adenovirus mucoso pone problemi di sicurezza se applicato su larga scala. Tuttavia i dati del **Clinical Trial Center, Zhongnan Hospital of Wuhan University** confermano come una strategia di richiamo della mucosa a base di *Ad5-S* negli individui vaccinati si è rivelata sicura e ha indotto risposte anticorpali plasmatiche più forti.

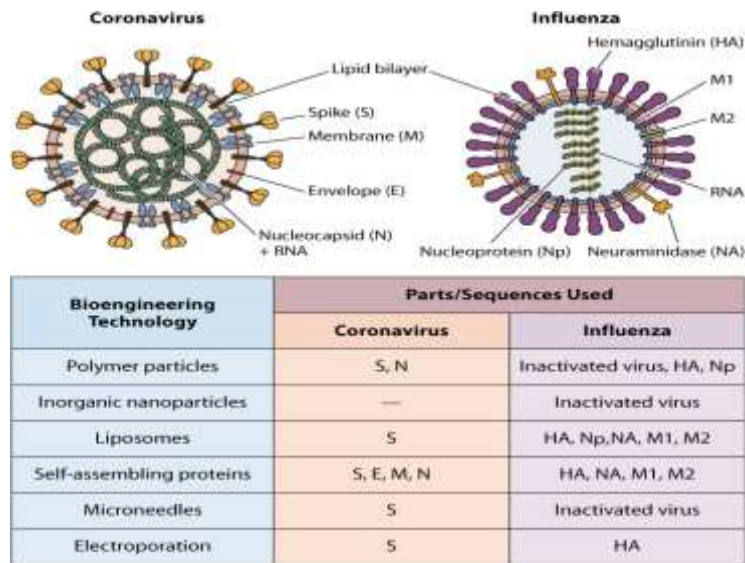
*Ad5-nCoV aerosolizzato* è ben tollerato e due dosi di *Ad5-nCoV aerosolizzato* hanno suscitato risposte anticorpali neutralizzanti, simili a una dose di iniezione intramuscolare. Una vaccinazione di richiamo per aerosol a 28 giorni dopo la prima iniezione intramuscolare ha indotto forti IgG e risposte anticorpali neutralizzanti. L'efficacia e il rapporto costo-efficacia della vaccinazione aerosol dovrebbero essere valutati in studi futuri.

**Wu S et al. *Safety, tolerability, and immunogenicity of an aerosolised adenovirus type-5 vector-based COVID-19 vaccine (Ad5-nCoV) in adults: preliminary report of an open-label and randomised phase 1 clinical trial. Lancet Infect Dis. 2021 Dec;21(12):1654-1664.***

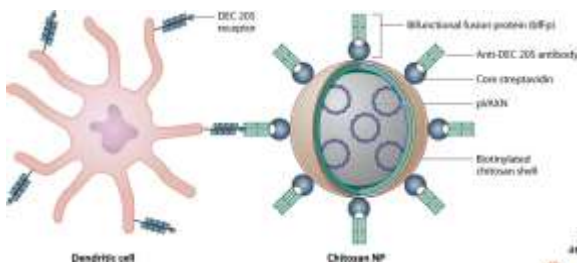
Per integrare gli effetti dei vaccini attualmente disponibili La tabella che segue riporta alcune *strategie di bioingegneria* come l'uso di particelle polimeriche, liposomi e particelle simili a virus nello sviluppo di vaccini contro l'influenza e i coronavirus e la fattibilità dell'adozione di queste tecnologie per uso clinico. presentazione dell'antigene intensificata, formulazioni più sicure e immunogenicità più robusta.

Sono riportate le tecniche e i materiali di bioingegneria utilizzati per sintetizzare diversi potenti vaccini, approvati o in fase di sperimentazione, contro la malattia di coronavirus 2019 (COVID-19)

e sono allo studio anche i vaccini contro l'influenza, la SARS e la sindrome respiratoria del Medio Oriente (MERS).

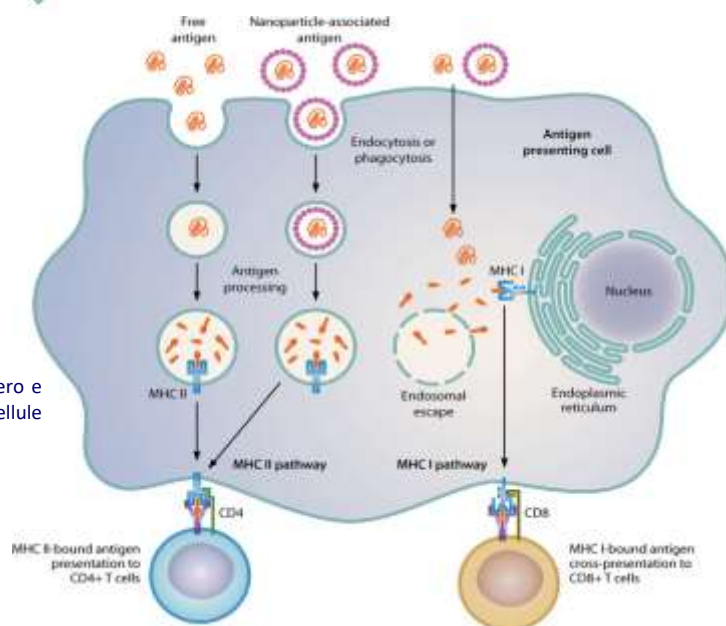


Pertanto, un vaccino adenovirale di richiamo ha potenzialmente una grande rilevanza traslazionale e clinica. In alternativa, le nuove piattaforme vaccinali emergenti come le nanoparticelle simili a virus che possono fornire una forte attività adiuvante e una presentazione prolungata dell'antigene in vivo, possono anche essere un approccio promettente per aumentare l'immunità neutralizzante della mucosa contro Omicron o futuri COV.



Progettazione di una nanoparticella a base di chitosano avente il vaccino incapsulato con DNA plasmidico (pDNA) che codifica per la proteina SARS-CoV N (pVAXN) e la proteina di fusione bifunzionale funzionalizzata in superficie per un migliore targeting delle cellule dendritiche.

Elaborazione e presentazione dell'antigene libero e associato alle nanoparticelle da parte delle cellule presentanti l'antigene (APC).



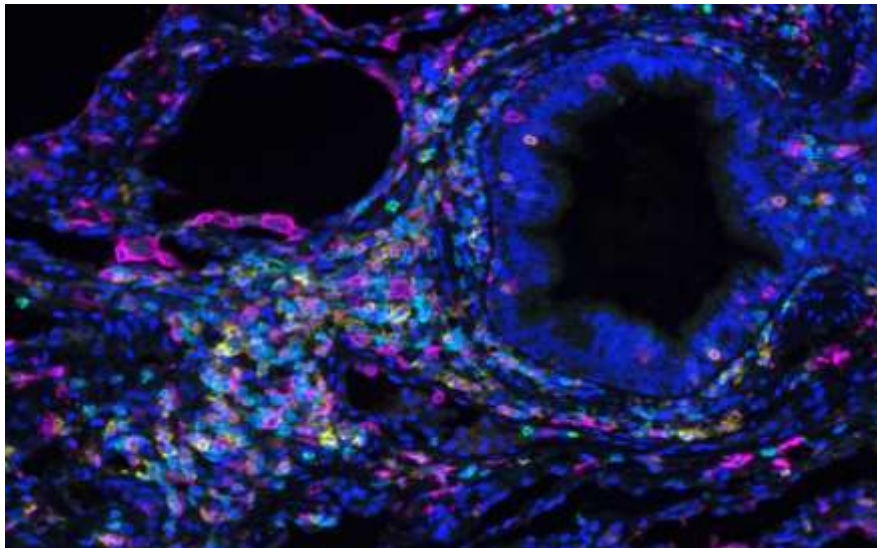


Al momento non è noto se ciò sia dovuto alle forti risposte IgA specifiche per RBD presenti nella mucosa respiratoria dopo un'infezione naturale o all'immunizzazione di richiamo Ad5-S della mucosa. Pertanto, le IgG o IgA antigene-specifiche locali prodotte in situ nel tratto respiratorio dopo l'infezione virale possono fornire attività neutralizzanti migliori rispetto a quelle diffuse esclusivamente dal sangue dopo l'immunizzazione sistemica. Inoltre, il danno persistente, l'infiammazione o la deposizione cronica di antigene nel polmone possono facilitare ulteriormente lo sviluppo di risposte anticorpali neutralizzanti locali dopo un'infezione naturale.

*Iyer S et al. Bioengineering Strategies for Developing Vaccines against Respiratory Viral Diseases. Clin Microbiol Rev. 2022 Jan 19;35(1):e0012321.*

Lo studio del *team di Tang* ha il suo limite intrinseco nella invasività della procedura BAL che impedisce di reclutare un'ampia coorte di partecipanti allo studio.

Tuttavia, il lavoro fornisce prove critiche che descrivono in dettaglio l'immunità umorale e cellulare della mucosa dopo la vaccinazione nel tratto respiratorio ed evidenzia l'importanza di concentrarsi sull'immunità della mucosa indotta dal vaccino e sostiene la necessità di una strategia di richiamo della mucosa oltre all'approccio attuale dei vaccini intramuscolari COVID-19.



Organizzazione spaziale delle cellule immunitarie nel polmone. I linfociti T (blu e arancioni) si raggruppano intorno alle vie aeree principali a destra, ma non intorno alle minuscole sacche d'aria dove i gas vengono scambiati nel sangue. Credito: Stuart Weisberg  
[Per inquadrare il ruolo della mucosa nasale in allegato il report](#)

### **Tissues, not blood, are where immune cells function.**

Può essere utile da Badeker

20 gennaio Somministrazione parenterale o mucosale ?

27.Febbraio Vaccini senza ago

7aprile Vaccini senza ago: le IgA e la "tolleranza invisibile" secondo Mestecky

22Aprile Veicolazione attraverso la mucosa orale

18 Maggio I candidati per un vaccino anti-covid intranasale: Orf6

28 Agosto E' vero che la protezione dei vaccini sta progressivamente calando?: le cinque domande senza risposta che tutti si fanno

17. Dicembre Omicron che fare? Tattiche e strategie vaccinali possibili

7.Luglio Quanti anticorpi anti spike mi restano ancora?

27.Luglio Nasal Vaccine: lightning speed to counter COVID-19

Farber DL.

## **Tissues, not blood, are where immune cells function.**

*Nature. 2021 May;593(7860):506-509*

All'inizio della pandemia, il mio team ha notato qualcosa di sorprendente. Quando le persone erano gravemente malate di COVID-19 e utilizzavano un ventilatore, i risciacqui quotidiani dei tubi di plastica nelle loro trachee contenevano cellule immunitarie dalle vie aeree. Più sorprendentemente, ciò che era in questi campioni delle vie aeree era molto diverso da ciò che era stato trovato nel sangue dello stesso paziente.

Le cellule delle vie aeree stavano producendo alti livelli di citochine, fattori che reclutano cellule immunitarie come le cellule T in un sito del tessuto e promuovono l'infiammazione. Al contrario, i campioni di sangue corrispondenti erano a basso contenuto di cellule T, ma ad alto contenuto di altre cellule immunitarie chiamate monociti, che mostravano schemi insoliti di recettori sulla superficie cellulare. Campioni polmonari di pazienti deceduti mostravano monociti e un altro tipo di cellula immunitaria (macrofagi) raggruppati nelle minuscole sacche d'aria del polmone; questo è associato al danno che caratterizza il COVID-19 grave. Gli insoliti recettori ci suggerivano che i monociti circolanti nel sangue fossero stati sia alterati che evocati dalle citochine prodotte nelle vie aeree. Se non avessimo raccolto campioni sia delle vie aeree che del sangue, non avremmo messo insieme questi pezzi.

Come mostra questo esempio, la pandemia ha rivelato importanti lacune nella nostra comprensione del sistema immunitario umano. Una delle più grandi sono le reazioni nei tessuti, nei siti di infezione e dove si manifesta la malattia.

Le cellule immunitarie sono spesso indicate come globuli bianchi. Ma la maggior parte, compreso oltre il 95% dei linfociti T, risiede e funziona nei tessuti, in particolare negli organi linfoidi - come il midollo osseo, la milza e i linfonodi - e nelle superfici di barriera, come la pelle, l'intestino e le mucose. Sebbene l'infezione con il coronavirus SARS-CoV-2 porti a cellule T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> specifiche del virus che sono rilevabili nel sangue per mesi o più, non è chiaro cosa significhi la loro presenza nel sangue circolante per l'immunità tissutale in i polmoni - o altrove.

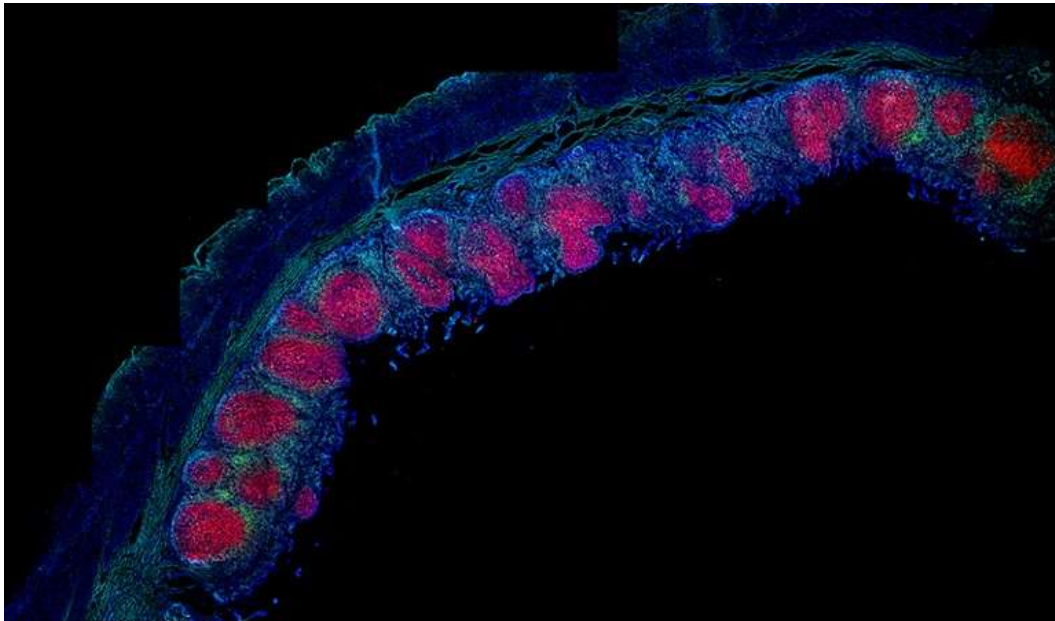
Alcune cellule immunitarie non si trovano mai nel sangue. (O meglio, in molti casi, non sappiamo se non riescono a entrare in circolo o se cambiano le loro proprietà quando lo fanno.) Alcuni, come i macrofagi, derivano direttamente da cellule progenitrici fetali per maturare in tessuti come il polmoni, fegato e milza. Altri, come i linfociti T della memoria, si sviluppano da linfociti T attivati che migrano nei tessuti dopo l'adescamento nei linfonodi durante un'infezione. Queste cellule T che fissano i tessuti occupano una residenza a lungo termine nei tessuti e possono sviluppare proprietà distinte in ciascuno.

Per comprendere appieno il sistema immunitario, i ricercatori devono comprendere l'immunità respiratoria, intestinale e cutanea e come ciascuno interagisce con i linfonodi vicini. Ciò significa espandere il supporto e le infrastrutture per ottenere i tessuti: stringere alleanze con medici, biobanche, ospedali e agenzie di approvvigionamento di organi donatori. Qui descrivo come realizzare tale ricerca e cosa si può imparare.

I modelli murini di infezione, autoimmunità, cancro e malattie infiammatorie sono estremamente preziosi per comprendere il sistema immunitario. Gli studi sui topi di solito campionano gli organi colpiti e i linfonodi associati, ma raramente il sangue, a causa dei piccoli volumi coinvolti. Questi studi specifici del sito hanno rivelato processi fondamentali, ad esempio che l'infezione

respiratoria con un virus spinge le cellule dendritiche (che presentano antigeni) a migrare dai polmoni ai linfonodi adiacenti, dove innescano le cellule T virus-specifiche, come CD4 + cellule T helper.

Questo priming promuove le cellule B a differenziare e produrre anticorpi; CD8 citotossico. Vengono anche prodotte cellule T che migrano verso il polmone per uccidere le cellule infette e prevenire la diffusione virale. Una volta che un'infezione è stata eliminata, una piccola popolazione di questi linfociti T e B di memoria specifici del virus persiste nei tessuti, pronta a lanciare rapidamente risposte protettive se l'agente patogeno viene incontrato di nuovo.



Le cellule immunitarie nell'intestino sono organizzate spazialmente: i linfociti B produttori di anticorpi (rossi) sono circondati da linfociti T (azzurro). Credito: Takashi Senda

Studi sui topi hanno anche dimostrato che, per virus sito-specifici come l'influenza o il papillomavirus umano, la memoria immunologica è mantenuta da set dedicati di cellule T di memoria nel sito pertinente. Questi linfociti T di memoria "residenti nei tessuti" si trovano nei polmoni per i virus respiratori, nella pelle per i patogeni cutanei o nel tratto riproduttivo femminile per le infezioni genitali. Inoltre, queste cellule di memoria residenti possono proteggere dalle infezioni e possono essere generate da vaccini che colpiscono tessuti specifici, come i vaccini antinfluenzali intranasali.

Nell'uomo, non è pratico seguire una risposta immunitaria dall'inizio di un'infezione allo sviluppo della memoria immunologica. Non è sempre chiaro dove inizia un'infezione o quando, e il campionamento del tessuto rilevante nel tempo non è semplice.

Tuttavia, gli esseri umani hanno sangue in abbondanza, che può essere raccolto regolarmente. Il sangue contiene tutti i principali lignaggi delle cellule immunitarie, oltre agli anticorpi circolanti e alle citochine secrete. Questo approccio è stato prezioso per monitorare le risposte immunitarie in tempo reale e per comprendere la formazione e la funzione degli anticorpi e dell'infiammazione.

Per SARS-CoV-2, l'esame del sangue ha aiutato a tenere traccia delle risposte alle infezioni e ai vaccini e a trovare i correlati di malattie gravi. Ma gran parte della storia è ancora sconosciuta, perché la maggior parte dell'azione immunitaria è nei tessuti.



Gli studi immunitari sui tessuti hanno portato a terapie. Nelle malattie autoimmuni come l'artrite reumatoide, una pletora di marcatori infiammatori aumenta nel siero del sangue. Quando i ricercatori hanno esaminato in modo specifico il liquido sinoviale che riempie gli spazi tra le articolazioni di una persona, hanno scoperto livelli elevati della citochina TNF- $\alpha$ , che alla fine è stata trovata per avviare questa malattia. Ora, i bloccanti anti-TNF- $\alpha$  sono tra i farmaci più comunemente prescritti per l'artrite reumatoide e altre malattie infiammatorie e sono tremendamente efficaci nel trattamento dei sintomi.

Allo stesso modo, l'esame delle cellule immunitarie nei tumori che sono stati asportati chirurgicamente o sottoposti a biopsia ha rivelato cellule T funzionalmente inattive che non sono riuscite a rimuovere le cellule malate. Ciò ha portato all'idea che molti tumori possono evitare le difese immunitarie. Tali studi hanno fornito la motivazione per le immunoterapie tumorali che hanno rivoluzionato i trattamenti per alcuni tumori della mammella, del polmone, del colon e altri.

Il nostro lavoro e quello di altri indica che la composizione delle cellule immunitarie è distinta nei diversi tessuti, con variazioni tessuto-specifiche nell'espressione genica, nelle vie metaboliche e nella regolazione funzionale. La definizione di queste proprietà potrebbe indirizzare le terapie alle risposte immunitarie dei tessuti, ma ciò richiede prima l'esame dei tessuti.

Molti campioni di tessuto da individui viventi possono essere raccolti durante le cure mediche di routine. Ad esempio, le biopsie e gli interventi chirurgici elettivi consentono la raccolta di tessuti malati e sani (vedi "Tessuti umani per l'immunologia"). Negli interventi chirurgici dalle tonsillectomie alla rimozione del tumore, i linfonodi vengono rimossi ed eliminati. I cardiocirurghi in genere rimuovono ed eliminano il timo. Le procedure per bypassare lo stomaco e l'intestino rimuovono i tessuti intestinali ricchi di cellule immunitarie e linfonodi associati all'intestino. Tali campioni sono particolarmente utili per mostrare l'organizzazione spaziale delle cellule immunitarie in questi tessuti, che possono suggerire come i tipi cellulari comunicano e si influenzano a vicenda.

### **Donna L. Farber**

è professoressa di scienze chirurgiche, microbiologia e immunologia presso la Columbia University Irving Medical Center di New York City, New York, USA.

