

UNIVERSITÁ DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di Ricerca in

Immunologia, Immunopatologia Sperimentale e Comparata

Ciclo XXIII

**ATTIVITÀ ANTIMICROBICA,
ANTIVIRALE ED IMMUNOMODULANTE
DI PEPTIDI ANTICORPALI**

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Attilio Corradi

Tutor:

Chiar.mo Prof. Valter Magliani

Dottorando:

Tecla Ciociola

2008 - 2010

Alla mia famiglia

Ad Antonio

Indice

Introduzione	9
Peptidi antimicrobici naturali	11
AMP nell'uomo	15
Catelicidine	15
Defensine	15
Espressione e regolazione.....	18
Funzione degli AMP	20
Meccanismi dell'attività antimicrobica diretta.....	21
Proprietà immunomodulanti.....	26
AMP nelle malattie infettive.....	29
AMP come molecole immunomodulanti nelle malattie infiammatorie.....	31
AMP e malattie della cute	32
AMP e malattie respiratorie	33
AMP e malattie intestinali.....	34
AMP in altre patologie	35
AMP come strumento terapeutico	36
Conclusioni.....	38
Gli anticorpi quali nuovi agenti antimicrobici	40
Anticorpi ed immunoprotezione	42
Anticorpi microbici.....	43
Anticorpi e loro ingegnerizzazione	44
Anticorpi ricombinanti.....	45
Anticorpi come farmaci.....	47
Anticorpi antitumorali.....	48
Anticorpi antinfettivi.....	49
Anticorpi ingegnerizzati	51
Sistemi killer di lievito	52
Teoria della vaccinazione anti-idiotipica	53
Anticorpi monoclonali e ricombinanti microbici	57
Peptidi antimicrobici, antivirali, antitumorali derivati da anticorpi.....	59
Peptide killer multifunzionale derivato da scFv H6.....	61
Potenziale biologico estrinseco di CDR anticorpali.....	68
Scopo	73

Indice

Materiali e metodi	77
Terreni e reagenti	77
Ceppi microbici e linee cellulari	80
Banca Dati e programmi informatici	81
Valutazione dell'attività microbica <i>in vitro</i> di peptidi anticorpali selezionati	81
Attività <i>in vitro</i> dei peptidi nei confronti di ceppi batterici.....	81
Attività <i>in vitro</i> dei peptidi nei confronti di <i>C. albicans</i>	82
Attività <i>in vitro</i> dei peptidi nei confronti di <i>C. neoformans</i>	83
Attività <i>in vitro</i> dei peptidi nei confronti di <i>M. furfur</i>	83
Attività <i>in vitro</i> dei peptidi nei confronti di <i>A. fumigatus</i>	84
Attività <i>in vitro</i> dei peptidi nei confronti di <i>S. cerevisiae</i> caspofungina resistente	84
Attività candidacida <i>in vitro</i> dei peptidi nel tempo (<i>time killing</i>).....	85
Attività <i>in vitro</i> dei peptidi nei confronti di HIV-1.....	85
Valutazione dell'attività terapeutica <i>in vivo</i> di peptidi anticorpali selezionati	87
Attività terapeutica <i>in vivo</i> in un modello di infezione sperimentale sistemica.....	87
Attività terapeutica <i>in vivo</i> in un modello di infezione sperimentale mucosale.....	87
Valutazione dell'attività immunomodulante <i>in vitro</i> di peptidi anticorpali selezionati su cellule immunitarie umane e murine	88
Separazione cellulare	88
Produzione citochinica	89
Legame e <i>uptake</i> dei peptidi alle cellule	89
Studio del network delle proteine di segnale a seguito dell'interazione con i peptidi selezionati.....	90
Pathway PI3K-Akt	90
Espressione di TLR-4 rilevata mediante analisi citofluorimetrica.....	90
Estrazione delle proteine, quantificazione e Western Blotting	91
Real-time RT-PCR (qRT-PCR).....	91
Pathway Dectina-1	92
Espressione di Dectina-1 rilevata mediante analisi citofluorimetrica.....	92
Estrazione delle proteine, quantificazione e Western Blotting	93
Valutazione dell'attività citotossica <i>in vitro</i> di peptidi anticorpali selezionati nei confronti di cellule di melanoma	93
Valutazione degli effetti citotossici <i>in vitro</i> dei peptidi selezionati	94
Valutazione delle proprietà autoaggreganti dei peptidi selezionati	95

Risultati	97
Peptidi Fc	97
Analisi bioinformatica.....	97
Attività microbica <i>in vitro</i> dei peptidi anticorpali selezionati	104
Attività microbica <i>in vitro</i> dei peptidi anticorpali selezionati nei confronti di ceppi fungini	104
Attività microbica <i>in vitro</i> dei peptidi anticorpali selezionati nei confronti di ceppi batterici.....	109
Attività <i>in vitro</i> dei peptidi anticorpali selezionati nei confronti di HIV	112
Attività terapeutica <i>in vivo</i> dei peptidi anticorpali selezionati	115
Attività terapeutica <i>in vivo</i> in un modello di infezione sperimentale sistemica.....	115
Attività terapeutica <i>in vivo</i> in un modello di infezione sperimentale mucosale.....	116
Attività immunomodulante <i>in vitro</i> di peptidi anticorpali selezionati su cellule immunitarie umane	118
Attività citotossica <i>in vitro</i> di peptidi anticorpali selezionati nei confronti di cellule di melanoma	122
Effetti citotossici <i>in vitro</i> dei peptidi selezionati	124
Proprietà autoaggreganti dei peptidi selezionati.....	126
Peptidi CDR	135
Attività immunomodulante <i>in vitro</i> di CDR selezionati su cellule immunitarie murine	135
Attività terapeutica <i>in vivo</i> in un modello di infezione sperimentale sistemica	145
Discussione	147
Conclusioni.....	153
Bibliografia.....	159

Introduzione

L'introduzione e l'uso estensivo degli antibiotici e di altri agenti antinfettivi da più di 60 anni, insieme alla disponibilità di vaccini sicuri ed efficaci, hanno determinato un drastico cambiamento dell'andamento e dell'incidenza delle malattie infettive. Alla fine degli anni '60 del secolo scorso lo straordinario successo degli approcci terapeutici ed immunoprofilattici ed il miglioramento delle condizioni igieniche, di salute e socio-economiche delle popolazioni aveva portato la comunità scientifica e medica a dichiarare vinta la guerra nei confronti delle malattie infettive. Come conseguenza, le industrie farmaceutiche hanno notevolmente rallentato la ricerca e lo sviluppo di nuovi farmaci antinfettivi, concentrando i propri interessi sulle malattie non infettive (1, 2). Tuttavia, questa visione ottimistica è stata successivamente smentita dal drammatico incremento dell'incidenza e prevalenza di agenti infettivi emergenti o ri-emergenti, spesso caratterizzati da resistenza intrinseca o acquisita nei confronti di agenti antinfettivi. Molti fattori non previsti o sottovalutati, quali globalizzazione, movimenti internazionali di merci ed individui, cambiamenti climatici ed altri, hanno contribuito a questa sconfitta, facilitando la diffusione di agenti infettivi e dei loro vettori in nuove aree del mondo con seri rischi per la salute pubblica.

E' stato stimato che il 60% dei patogeni umani emergenti sono di provenienza animale e molti di essi, veicolati da alimenti o vettori, sono stati in grado di adattarsi al nuovo ospite mutando o superando la barriera di specie (3-6). Il quadro è stato ulteriormente complicato dalla recente potenziale minaccia di deliberata diffusione di agenti infettivi come armi biologiche e bioterroristiche, quali *Bacillus anthracis* e virus del vaiolo (7).

D'altra parte, l'esplosione della epidemia dell'AIDS, l'invecchiamento della popolazione e l'aumento di individui immunodepressi hanno determinato un cospicuo aumento del già numeroso numero di nuovi patogeni, in particolare opportunisti. I recenti straordinari progressi in campo economico e medico, soprattutto nei paesi ricchi ed industrializzati, hanno determinato un significativo aumento delle aspettative di vita e la possibilità di sopravvivenza ad individui precedentemente destinati a morte certa. Paradossalmente, questo sta ponendo nuove problematiche per la salute pubblica, in quanto anziani, individui sottoposti a trapianto o con tumori o infettati dal virus dell'immunodeficienza acquisita (HIV), neonati prematuri o sotto peso, o individui con difese compromesse o diminuite sono più frequentemente colpiti da infezioni gravi. Nuovi e vecchi agenti infettivi (batteri, miceti, protozoi e soprattutto virus) continuano a rendersi responsabili di morbilità e mortalità, cosicché le malattie infettive rimangono ancora una delle principali cause di morte nel mondo. Dal 1980 più di 90 nuove

Introduzione

specie patogene sono state riportate per la prima volta nell'uomo e si può prevedere con certezza che il loro numero aumenterà ancora di più nel prossimo futuro (8). Inoltre, l'incidenza di microrganismi e virus multiresistenti è in aumento, rendendo inefficaci molte delle attuali strategie di intervento; questi agenti rappresentano una minaccia a livello mondiale e sono stati associate ad elevata mortalità e a fallimenti terapeutici (9-14).

Nonostante la urgente richiesta di nuovi farmaci antinfettivi, il loro sviluppo da parte dell'industria farmaceutica ha subito un notevole rallentamento; ad esempio, dal 1960 in poi sono state introdotte solo 4 nuove classi di agenti antibatterici, mentre la maggior parte di quelli utilizzati in terapia sono stati derivati, mediante modificazioni chimiche, da molecole ben conosciute, scoperte precedentemente. Gli agenti antivirali hanno rappresentato una eccezione, soprattutto in seguito alla comparsa e diffusione dell'infezione da HIV. Dopo le prime segnalazioni di casi di AIDS nel 1981 e l'identificazione di HIV quale agente eziologico nel 1983, gli studi condotti in tutto il mondo con grande profusione di risorse e mezzi hanno portato alla scoperta, approvazione ed uso clinico di diversi farmaci anti-HIV, che al momento comprendono: inibitori della trascrittasi inversa (ad es. zidovudina e efavirenz), della proteasi (indinavir), della fusione (enfuvirtide), dell'integrasi (raltegravir) e antagonisti di CCR5 (maraviroc). L'introduzione delle terapie antivirali di combinazione ha determinato un drammatico aumento della aspettativa di vita dei pazienti infettati da HIV, trasformando l'infezione, almeno nei paesi industrializzati, in una malattia cronica curabile (15).

Tuttavia, più in generale, c'è una carenza di nuovi agenti antinfettivi, dovuta a problemi economici e scientifici (16). Infatti, a parte alcune infezioni croniche, la maggior parte delle malattie infettive acute richiede trattamenti di breve durata, mentre il largo uso di antibiotici ad ampio spettro, utilizzabili da un maggior numero di pazienti, ha determinato l'insorgenza di resistenze con una notevole abbreviazione dei tempi di commercializzazione di tali farmaci. Anche l'elevato tasso di fallimento dei programmi di sviluppo clinico rappresenta una delle cause principali della mancata produttività dell'industria farmaceutica (17). I ricavi delle aziende farmaceutiche si sono ridotti e oggi è difficile per un nuovo antibiotico riuscire a produrre guadagni superiori ai costi della sua ricerca e sviluppo, contribuendo alla scarsità di nuovi agenti commercializzati negli ultimi anni. Questo ha anche portato l'industria a privilegiare lo sviluppo di farmaci più redditizi attivi nei confronti di malattie croniche, quali ipercolesterolemia, cancro, malattie neurologiche, autoimmuni o cardiovascolari (18, 19).

Lo sviluppo di efficaci strategie antinfettive preventive e terapeutiche è quindi ancora di grande attualità e, malgrado le restrizioni finanziarie, piccole compagnie e laboratori di

ricerca hanno tentato di colmare le carenze occupandosi di nuovo di antinfettivi. Recentemente, c'è stata perciò una vera e propria esplosione di segnalazioni sugli approcci per lo screening di nuove classi di farmaci caratterizzati da nuovi meccanismi d'azione. Poiché più dei due terzi degli antibatterici attualmente utilizzati sono prodotti naturali o loro derivati semisintetici, notevoli sforzi sono stati fatti e sono in corso per scoprire nuove molecole antimicrobiche e/o strutture di base per la loro sintesi in nicchie ecologiche poco esplorate, come l'ambiente marino, o gruppi batterici particolari (20-22). Sulla base del sequenziamento di genomi microbici, dello screening di librerie di composti sintetici, della progettazione di farmaci e di altri approcci di bioinformatica, sono state identificate nuove molecole, alcune delle quali in fase di sviluppo clinico; anche se questi approcci non hanno ancora consentito la produzione di nuovi antibiotici, hanno tuttavia contribuito ad identificare nuovi bersagli ed a chiarire nuovi meccanismi d'azione di tali potenziali agenti antimicrobici (23-25).

In questo scenario, proteine e peptidi provenienti da diverse fonti da molti anni hanno suscitato interesse come potenziali sostituti dei tradizionali agenti antinfettivi; tra di essi, particolare attenzione è stata rivolta soprattutto a peptidi antimicrobici naturali, caratteristici dell'immunità innata, e, più recentemente a peptidi di derivazione anticorpale.

Peptidi antimicrobici naturali

Le proprietà antimicrobiche di secrezioni umane e siero sono ben note da molti anni (26) e la descrizione della presenza di una attività antimicrobica ad ampio spettro in cellule del sangue risale al 1957 (27). Successivamente, la produzione di peptidi antimicrobici (AMP) è stata rilevata in fagociti (28) e negli insetti (29), e due defensine (AMP con tre cisteine legate tra loro) sono state purificate da macrofagi polmonari di coniglio (30). Da allora, centinaia di piccole proteine e peptidi sono state isolate e caratterizzate da tutte le specie studiate, appartenenti a quasi tutti i regni e classi, nell'ambito di batteri, funghi, animali e piante. Tali molecole difensive dell'immunità innata, evolutivamente antiche e conservate, dovrebbero avere avuto un ruolo fondamentale nel successo evolutivo dei complessi organismi pluricellulari. Infatti, la co-evoluzione di ospiti e patogeni ha portato alla selezione di una varietà di meccanismi di sopravvivenza dell'ospite, atti a proteggerlo dalla costante interazione con microrganismi contagiosi (31). Attualmente, è disponibile in rete un database, nel quale sono riportati circa 2000 AMP di origine diversa (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>).

Introduzione

Sebbene molti AMP mantengano alcune caratteristiche comuni, come le piccole dimensioni (12-50 amminoacidi), la presenza di cariche positive (generalmente da +2 a +9) e una struttura anfipatica (32, 33), una precisa classificazione è difficile a causa della loro considerevole variabilità. In base a composizione amminoacidica, dimensione e struttura conformazionale, gli AMP possono essere divisi in diverse categorie (**Figura 1**): strutture ad α elica (catelicidine umane), strutture a foglietto β (β *sheet*) stabilizzate da ponti disolfuro (defensine umane), strutture estese (indolicidina, un AMP bovino) o strutture *loop* con un ponte disolfuro (defensine cicliche di macaco rhesus) (34, 35).

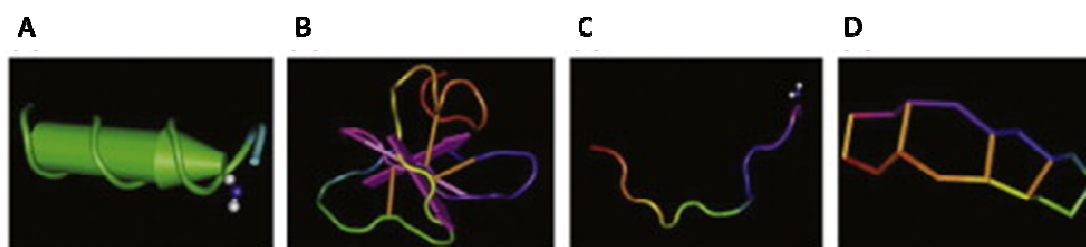


Figura 1. Strutture di peptidi antimicrobici (AMP) selezionati. Gli AMP sono presenti in un'ampia varietà di strutture conformazionali, come peptidi con strutture ad α elica, peptidi con strutture a foglietto β stabilizzate da ponti disolfuro o peptidi con strutture estese o *loop*. **(A)** α elica. Struttura in Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) del *core* peptidico della catelicidina LL-37 legato a micelle detergenti (PDB ID: 2FBS). **(B)** foglietto β . Struttura 2D-NMR della defensina hBD2 in soluzione (PDB ID: 1FQQ). **(C)** Struttura estesa. Struttura NMR del peptide bovino antimicrobico indolicidina legato a micelle di dodecilfosfocolina (DPC) (PDB ID: 1G89). **(D)** Struttura *loop*. Struttura 3D di una defensina ciclica di leucociti di macaco rhesus (PDB ID: 1HVZ). PDB ID: ID della struttura peptidica nella banca dati proteica Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) (35).

La famiglia dei peptidi lineari con conformazione ad α elica risulta essere ben caratterizzata, dato che la maggior parte dei peptidi antimicrobici conosciuti appartiene a questo gruppo e include molecole rinvenute in un'ampia varietà di organismi molto distanti dal punto di vista evolutivo, dagli insetti all'uomo. Ne sono un esempio le cecropine isolate per la prima volta nel 1980 dalla falena notturna *Hyalophora cecropia*, da cui hanno assunto il nome, e successivamente studiate in *Drosophila melanogaster* (36), caratterizzate da una regione ammino-terminale (N-terminale) fortemente basica e da una porzione carbossi-terminale (C-terminale) idrofobica, unite da una "cerniera" costituita per lo più da residui di glicina e/o prolina. Studi di dicroismo circolare (37) e di NMR (38) hanno evidenziato che entrambe le regioni formano delle α eliche anfipatiche, dalle quali probabilmente deriva l'attività biologica. Queste caratteristiche sono comuni ad altri peptidi della stessa categoria strutturale,

tra i quali andropina (39) e ceratotossine (40) derivanti da insetti, e bombinina H (41), dermaseptina (39) e magainine derivanti dalla pelle di diversi anfibi (42). Anche in mammiferi sono prodotti diversi peptidi antimicrobici lineari con struttura ad α elica che appartengono alla famiglia delle catelicidine (43, 44).

I peptidi con strutture **lineari** contengono una elevata percentuale di amminoacidi specifici, come le apidecine ricche in prolina e arginina (45) derivanti dall'emolinfa delle api, la drosocina di *Drosophila* ad elevato contenuto in proline (46), il peptide PR-39 dei neutrofili suini (47) e le bactenecine bovine ricche in prolina e arginina (48, 49), acantoscurrena ad alto contenuto di glicina (50) e peptidi salivari ricchi di istidina, comprese le istatine umane ad attività antifungina (51). Le bactenecine-5 e -7 sono state isolate dai neutrofili bovini, dove vengono immagazzinate nei granuli citoplasmatici (52). È stato suggerito che possano adottare una conformazione anfipatica in ambienti idrofobici. Oltre all'attività antibatterica, possono inibire anche la replicazione del virus *Herpes simplex* (53). Altro componente di questo gruppo è l'indolicidina bovina che presenta 5 residui di triptofano su 13 residui complessivi (54).

I maggiori rappresentanti dei peptidi con strutture a **foglietto β** sono le defensine presenti nell'emolinfa degli insetti (55), nei fagociti di molti mammiferi, compreso l'uomo (56), ed anche in piante. Sono peptidi compatti, caratterizzati da tre foglietti β antiparalleli stabilizzati da tre legami disolfuro che conferiscono rigidità alla struttura, che sono stati sintetizzati e sono disponibili commercialmente. A questa classe appartengono anche tachiplessine isolate da un granchio marino (57) e protegrine, peptidi di 16-18 amminoacidi contenenti 2 ponti di solfuro (58).

I peptidi con struttura ad **ansa (loop)** presentano un solo legame disolfuro preferenzialmente nella regione C-terminale. Dopo la bactenecina, il primo peptide di questo gruppo costituito da 12 amminoacidi ed isolato dai neutrofili bovini (59), altri peptidi simili quali le epcidine (60), sono stati isolati da pesci e mammiferi, tra cui l'uomo; altri sono derivati da artropodi, come tanatina (61), tachiplessina (57), gomesina (62), e le protegrine (58), isolate originariamente da leucociti porcini ed appartenenti alla più ampia famiglia delle catelicidine. Queste ultime presentano uno spettro di attività antimicrobica ed antivirale particolarmente ampio nei confronti di batteri gram-negativi e -positivi, funghi filamentosi e lieviti ed alcuni virus, tra cui HIV-1. Anche le epidecine hanno un ampio spettro di attività nei confronti di batteri, funghi filamentosi e lieviti, compresi patogeni umani. Altri esempi sono rappresentati da peptidi derivanti da diverse specie di rana, quali brevinine, esculentine e ranalexina (63). Purtroppo, questi peptidi nonostante presentino un'interessante attività

Introduzione

antimicrobica, spesso sono associati ad una notevole attività emolitica, che ne impedisce un eventuale impiego terapeutico.

Vi sono peptidi derivanti da polipeptidi di **dimensioni** maggiori caratterizzati da altre funzioni biologiche, come i peptidi derivanti dal polipeptide inibitorio gastrico (GIP) (64). A questo gruppo appartengono peptidi ad attività antibatterica che rappresentano porzioni di ormoni proteici, noti per funzioni completamente diverse, come il tripeptide KPV presente all'estremità C-terminale dell'ormone stimolante gli α -melanociti (α -MSH), capace di inibire *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e HIV-1 (65) a concentrazioni picomolari (66). Ne sono esempi anche la buforina II (67), derivata dalla proteina istonica 2A, la lattoferrina (68) derivante dalla lattoferrina, i frammenti di lattoalbumina (69), ovoalbumina e emoglobina (70), tra cui Hb33-61 della catena α di emoglobina bovina, attivo a concentrazioni micromolari nei confronti di batteri gram-positivi e funghi (71).

Sono conosciuti anche peptidi antimicrobici **anionici**, di piccole dimensioni, prodotti a concentrazioni micromolari nei fluidi bronco-alveolari e nelle cellule epiteliali delle vie respiratorie (72, 73), che richiedono zinco come cofattore per l'attività antimicrobica e sono attivi nei confronti di batteri gram-negativi e -positivi. La dermicidina, secreta dalle ghiandole sudoripare dell'uomo e dotata di ampio spettro d'azione, ne è un esempio (74).

L'enorme variabilità di sequenza dei peptidi che si osserva in natura, anche in specie tra loro strettamente correlate, rappresenta molto probabilmente l'adattamento a specifiche popolazioni microbiche presenti nella particolare nicchia ecologica occupata. Anche singole sostituzioni amminoacidiche infatti possono influenzare in maniera drammatica l'attività biologica di ciascun peptide. Nonostante l'elevata variabilità strutturale e di sequenza, la caratteristica che accomuna la maggior parte di queste molecole è la loro natura anfipatica. Infatti, la presenza di regioni altamente polari, caratterizzate spesso da una carica netta positiva, e di altre fortemente idrofobiche conferisce al peptide le caratteristiche chimico-fisiche necessarie per l'interazione con la membrana cellulare dei microrganismi, primo passo verso la loro neutralizzazione e/o uccisione.

Gli AMP sono espressi principalmente sulle barriere primarie degli organismi, quali cute e mucose, prevenendo la colonizzazione dei tessuti dell'ospite da parte di patogeni (34). Inoltre, questi peptidi sono conservati in granuli all'interno dei fagociti e sono coinvolti nell'uccisione dei microrganismi fagocitati (33, 75).

Recentemente sono stati individuati nuovi effetti biologici degli AMP, quali neutralizzazione di endotossine, attività chemotattica, proprietà immunomodulanti, induzione dell'angiogenesi

e della guarigione di ferite (76, 77). Così queste molecole ancestrali risultano essere componenti cruciali dell'immunità innata e possibili candidati per nuovi approcci terapeutici.

AMP nell'uomo

Catelicidine

La struttura delle catelicidine include una regione N-terminale altamente conservata chiamata dominio *cathelin-like* e un peptide C-terminale, con proprietà antimicrobiche, la cui sequenza è altamente variabile sia intra- sia inter-specie (78). Nell'uomo vi è un singolo gene per la catelicidina (CAMP) localizzato sul cromosoma 3. CAMP codifica per il peptide cationico antimicrobico-18 (hCAP18), di 170 amminoacidi, precursore inattivo della catelicidina (79). La proteina contiene due ponti disolfuro tra i residui di cisteina C85-C96 e C107-C124 (80) e il nome deriva dalla capacità di inibire la proteasi catepsina L. Le catelicidine sono considerate una famiglia di proteine contenenti cisterna, inibitrici di proteasi e dotate di attività antimicrobica (81).

L'espressione di hCAP18 è stata inizialmente rilevata nelle cellule del midollo osseo (82) e nei cheratinociti nel corso di malattie infiammatorie (82, 83). hCAP18 è processato nei neutrofili attivati in posizione C-terminale dall'azione di proteasi seriniche, come proteinasi 3, con rilascio di un peptide bioattivo lungo 37 amminoacidi contenente due leucine N-terminali, chiamato LL-37 (84). In alcuni tessuti, LL-37 secreta può essere ulteriormente processata in peptidi più piccoli come RK-30 e KS-30, che continuano ad esibire proprietà antimicrobiche (85). hCAP18/LL-37 è prodotto da molti tipi cellulari, ma principalmente da cellule mieloidi, neutrofili, mastociti e monociti, in cui le catelicidine sono conservate nei granuli (79, 82, 86). Gli enterociti del colon, le cellule epiteliali del tratto urinario e respiratorio (naso e polmoni compresi) e i cheratinociti costituiscono un'altra importante fonte di questo peptide (83, 87, 88).

Defensine

Le defensine sono peptidi cationici con peso molecolare che varia da 3,5 a 4,5 KDa e contengono un motivo α - β costituito da una α elica e due filamenti β antiparalleli, stabilizzati da tre ponti disolfuro con sei residui di cisteina altamente conservati, dal cui allineamento si classificano come α -defensine, β -defensine e θ -defensine (89). I geni codificanti per le α - e β -defensine sono localizzati nel locus p23 del cromosoma 8 (90).

Le α -defensine sono lunghe da 29 a 35 amminoacidi, con ponti disolfuro caratteristici tra le cisteine 1-6, 2-4 e 3-5. Nell'uomo sono state individuate sei α -defensine, quattro delle quali

Introduzione

esprese nei granuli dei neutrofilo e riconducibili a peptidi umani dei neutrofilo (HNP-1, 2, 3, 4) (91). Le α -defensine 5 e 6 (HD5 e HD6) sono esprese nelle cellule di Paneth dell'intestino tenue (92) e nelle cellule epiteliali del tratto urogenitale femminile (93).

Le β -defensine sono caratterizzate da tre ponti disolfuro tra le cisteine 1-5, 2-4 e 3-6 e la loro lunghezza varia da 36 a 42 amminoacidi (89, 91). Nell'uomo sono prodotte dalle cellule epiteliali e ad oggi si conoscono sei β -defensine (hBD-1-6), sebbene analisi genomiche suggeriscano che possano essere più numerose (94, 95). hBD-1 è espressa costitutivamente nelle cellule epiteliali del tratto respiratorio e genitale (96, 97); hBD-2 è stata isolata dalle squame psoriasiche ed è espressa nella cute e negli epitelio urinario, gastrointestinale e respiratorio (89); hBD-3, isolata da cute psoriasica, è la principale defensina cationica (98); espressa in diverse superfici epiteliali, che si trova in elevate concentrazioni nella saliva e nei fluidi cervicovaginali (99). Mentre hBD-4 è stata rilevata in testicoli, stomaco e utero (100), hBD-5 e hBD-6 sono rilevate in particolare nell'epididimo (101).

Le θ -defensine sono peptidi ciclici di 18 amminoacidi simili alla lectina espressi in leucociti di primati non umani, quali rhesus θ -defensine-1 (RTD-1), RTD-2 e RTD-3. Sebbene siano stati trovati RNA trascritti omologhi al gene rhesus θ -defensine (DEFT) anche nell'uomo, questi trascritti contengono un codone di stop nella sequenza segnale a monte (UPS), impedendo così la successiva traduzione (102).

In **Tabella 1** sono elencate le principali caratteristiche della catelicidina e delle defensine.

Tabella 1. Le caratteristiche principali di catelicidina e defensine.

AMP	Origine	Regolazione e induzione	Attività antimicrobica	Effetti pleiotropici
α elica, catelicidina				
LL-37	Cellule epiteliali: intestino, tratto urinario, tratto respiratorio, cute. Leucociti: neutrofili, monociti, mastociti e cellule mieloidi.	Costitutiva e inducibile da: VD3 (cheratinociti, monociti, neutrofili); LPS (effetti sinergici con VD3); acido butirrico (colonociti).	Attività ad ampio spettro. Specialmente attivo nei confronti di: <i>Shigella</i> sp, <i>Streptococcus</i> di Gruppo A e B, <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> .	Induzione di agenti chemotattici. Riduzione della trascrizione di molecole proinfiammatorie. Attività chemotattica diretta. Angiogenesi.
Ricchi in cisteina				
α-defensine				
HNP-1,2,3,4	Granuli azzurrofilari dei neutrofili.	Espressione costitutiva.	Attività ad ampio spettro nei confronti di batteri gram-negativi e -positivi. Attività antivirale (Adenovirus).	HNP-1,2,3 aumentano l'espressione di TNF e IL-1 nei monociti. Attività chemotattica.
HD-5,6 (criptidine)	Cellule di Paneth e cellule epiteliali del tratto urogenitale femminile.	Espressione costitutiva. Prodotti batterici (muramil dipeptide).	Difesa contro patogeni ingeriti oralmente (<i>E. coli</i> , <i>S. typhimurium</i>).	Sconosciuti.
β-defensine				
HBD-1	Cellule epiteliali dei polmoni e del tratto urinario.	Espressione costitutiva.	Attività ad ampio spettro.	Attività chemotattica. Produzione di citochine.
HBD-2	Cellule epiteliali di cute, polmoni, intestino e tratto urogenitale.	Espressione inducibile da: IL-1 α , IL-1 β , batteri gram-negativi e -positivi, TNF, <i>C. albicans</i> , LPS, LAM.	Attività ad ampio spettro. <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>C. albicans</i> , <i>M. tuberculosis</i> .	Attività chemotattica. Produzione di citochine.
HBD-3	Diverse superfici epiteliali. Elevate concentrazioni in saliva e tamponi vaginali.	Espressione inducibile.	Attività ad ampio spettro. <i>S. aureus</i> , <i>Pityrosporum ovale</i> , HIV.	Espressione di citochine e chemochine a livelli maggiori di quelli osservati per HBD-1,2,4.
HBD-4	Testicoli, utero e stomaco.	Espressione inducibile.	Attività ad ampio spettro.	Attività chemotattica. Produzione di citochine.

HD, defensine umane; HBD, β -defensine umane; HIV, virus dell'immunodeficienza umana; HNP, peptidi di neutrofili umani; LAM, lipoarabinomannano; LL-37, catelicidina; LPS, lipopolisaccaride; IL, interleuchina; TNF, fattore di necrosi tumorale; VD3, colecalciferolo.

Introduzione

Espressione e regolazione

L'espressione degli AMP è strettamente regolata sia a livello trascrizionale che post-trascrizionale. Inoltre, gli AMP sono espressi come pro-peptidi con successivo processamento proteolitico, dipendente anche dall'espressione di appropriate proteasi, che porta al rilascio del peptide biologicamente attivo. Recenti osservazioni hanno mostrato che l'espressione costitutiva di AMP è sotto stretto controllo ambientale e influenzata dall'età e dalla maturazione sessuale. Per esempio, una elevata espressione costitutiva di *cathelin-related antimicrobial peptide* (CRAMP) è stata osservata nell'epitelio dell'intestino tenue di topi neonati, sito in cui la catelicidina non è normalmente espressa nell'adulto. La presenza del peptide è limitata alle prime due settimane dalla nascita e gradualmente scompare con l'aumento della proliferazione delle cellule staminali e la migrazione delle cellule epiteliali lungo l'asse cripta-villo. In questo contesto, CRAMP conferisce ai neonati protezione nei confronti del patogeno enterico *Listeria monocytogenes*, indicando che l'espressione di CRAMP potrebbe regolare la colonizzazione batterica e l'omeostasi intestinale (103). Un altro esempio di controllo dello sviluppo è rappresentato da Bin1b, una β -defensina epididimo-specifica del ratto, con attività antimicrobica, espressa ad elevati livelli durante la maturazione sessuale e *up*-regolata da processi infiammatori (104, 105). Bin1b si lega alla testa degli spermatozoi in differenti regioni dell'epididimo con vari tipi di legame, inducendo la progressiva mobilità negli spermatozoi immaturi e immobili. Negli adulti, l'espressione di molti AMP è fortemente aumentata in seguito a lesioni o infezioni, oppure gli AMP sono conservati in elevata concentrazione nei granuli intracellulari come precursori inattivi. L'induzione di AMP spesso coinvolge segnali mediati da recettori come TLR o risponde al rilascio di citochine proinfiammatorie. Nei cheratinociti, hBD-1 è espressa costitutivamente, mentre hBD-2, -3 e -4 sono inducibili. In particolare, nelle colture di cellule epiteliali l'espressione di hBD-2 può essere stimolata dai ligandi TLR, tumor necrosis factor (TNF)- α , interleuchina (IL)-1 α , IL-1 β , interferone (IFN)- γ o forbolo miristato acetato (106), batteri gram-negativi e -positivi, *C. albicans*, *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, LPS e LAM (35, 107, 108). L'espressione di hBD-2 aumenta in presenza di diversi prodotti batterici in seguito all'interazione con TLR-2 o -4 (109). TLR-2 riconosce proteoglicani batterici e LAM, mentre TLR-4 riconosce LPS e acido lipoteicoico (110).

Invece, l'espressione della catelicidina nell'uomo è indotta in maniera minore direttamente da TLR o da citochine, mentre dipende piuttosto da acetilazione istonica, azione del recettore della Vitamina D e modulazione dell'azione della stessa in diversi tessuti. Il gene CAMP è il

bersaglio diretto del complesso vitamina D/recettore (111), per la presenza di un *Vitamin D Response Element* (VDRE) nel promotore del gene CAMP. La vitamina D3 (VD3) è un potente induttore dell'espressione delle catelicidine umane, principalmente in cheratinociti, neutrofili e monociti (112). Nelle cellule epiteliali del colon, il principale induttore di LL-37 è il butirrato, un acido grasso a catena corta prodotto dalla normale popolazione microbica residente (112, 113), un inibitore della iston-deacetilasi che promuove un incremento dell'acetilazione istonica nelle cellule con conseguente produzione di LL-37 (114). In altri tipi cellulari, quali quelli delle ghiandole sudoripare, l'espressione di LL-37 è costitutiva (115). Recenti studi indicano che IL-17 e IL-22 sono importanti regolatori dell'espressione di hBD 2, hBD-3 e LL-37 sulla superficie mucosale (116, 117). Queste citochine si legano a recettori sulla porzione basolaterale delle cellule epiteliali, le quali secernono AMP sulla superficie apicale dove si verifica l'attacco microbico. IL-17 e IL-22 sono prodotte dai linfociti Th17, un sottogruppo di linfociti T recentemente descritti, residenti nella sottomucosa dove sono attivati dalle cellule dendritiche, e giocano un ruolo chiave nel coordinare l'immunità epiteliale nei confronti di patogeni extracellulari (118). Di recente, è stato dimostrato che diverse immunodeficienze primarie umane, inclusa la sindrome da iper-IgE, dipendono da una deficienza di Th17 (119-121).

Introduzione

Funzione degli AMP

Gli AMP possono essere caratterizzati da una attività antimicrobica diretta e/o da proprietà immunomodulanti; altre funzioni complementari sembrano coinvolte nel ruolo fondamentale degli AMP nel controllo delle infezioni e di diverse malattie infiammatorie, come schematizzato nella **Figura 2**.

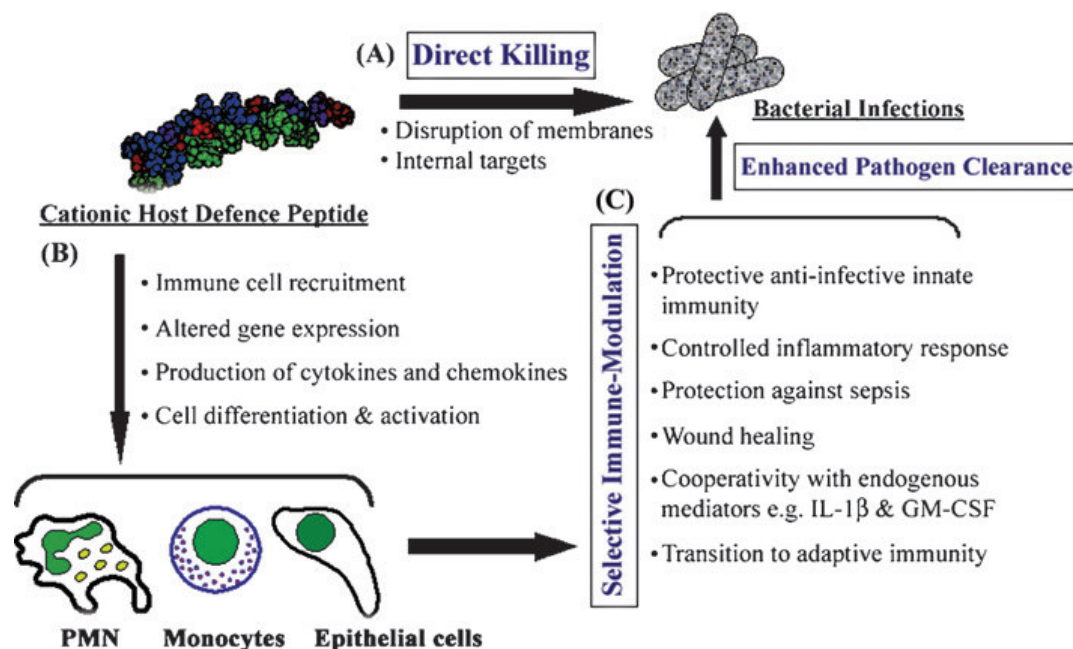


Figura 2. Proprietà anti-infettive degli AMP. Gli AMP proteggono dai patogeni o per diretta azione antimicrobica o stimolando selettivamente le risposte del sistema immunitario. **(A)** Gli AMP presenti in elevate concentrazioni o altamente resistenti al sale esibiscono proprietà antimicrobiche dirette mediante la distruzione della membrana batterica o avendo come bersaglio componenti cellulari dei patogeni. **(B)** Molti AMP inducono una varietà di risposte nelle cellule dell'immunità innata dell'ospite, quali monociti/macrofagi, leucociti polimorfonucleati e cellule epiteliali. Essi alterano l'espressione genica delle cellule dell'ospite e inducono la produzione di chemochine e citochine, promuovono il reclutamento delle cellule immunitarie nel sito di infezione e influenzano l'attivazione e differenziazione cellulare. **(C)** L'immunomodulazione selettiva da parte di questi peptidi determina induzione delle risposte dell'immunità innata con protezione nei confronti delle infezioni, selettiva soppressione delle risposte proinfiammatorie con protezione contro la sepsi, induzione della guarigione di ferite e successivo inizio e polarizzazione dell'immunità adattativa. L'effetto complessivo degli AMP è quello di promuovere l'efficacia ottimale nei confronti delle infezioni e di bilanciare la risposta immunomodulante senza esacerbare quella pro-infiammatoria (122).

Meccanismi dell'attività antimicrobica diretta

L'esatto meccanismo con cui gli AMP esibiscono le loro proprietà antimicrobiche è ancora sconosciuto, ma è generalmente accettato che gli AMP cationici interagiscano mediante forze elettrostatiche con la regione idrofilica dei fosfolipidi carica negativamente sulle membrane batteriche, causandone la distruzione (123). La differenza strutturale esistente tra le membrane cellulari degli eucarioti superiori e le membrane di procarioti e funghi (**Figura 3**) spiega l'elevata selettività d'azione dei peptidi antimicrobici, che presentano un'affinità maggiore per le membrane delle cellule microbiche, rispetto a quelle delle cellule ospiti. Le membrane batteriche infatti sono ricche di fosfolipidi anionici come la fosfatidilserina ed il fosfatidilglicerolo a differenza delle cellule eucariotiche caratterizzate da un elevato contenuto di fosfolipidi zwitterionici, quali fosfatidilcolina, sfingomieline e fosfatidiletanolamina. Inoltre, la presenza di colesterolo nelle membrane di cellule eucariotiche, assente invece in quelle procariotiche, conferisce una certa resistenza alla membrana, ostacolando l'azione del peptide. Un altro fattore importante per la selettività è il valore del potenziale di membrana: un potenziale più negativo all'interno, tipico delle cellule batteriche, facilita l'interazione del peptide con lo strato lipidico. Un modello che spiega l'attività di gran parte dei peptidi antimicrobici è quello proposto da Shai-Matsuaki-Huang (SMH) e riportato in **Figura 4** (124-127).

Tale modello ipotizza, soprattutto per i peptidi ad α elica, che inizialmente, con un basso rapporto peptide/lipidi, vi sia un'interazione diretta ed aspecifica del peptide con la membrana, guidata da forze elettrostatiche ed idrofobiche. Quando tale rapporto aumenta, i peptidi cominciano a orientarsi in modo perpendicolare alla membrana fino al completo inserimento nel doppio strato fosfolipidico, con il dislocamento dei lipidi e l'alterazione della membrana stessa. Superato un certo rapporto soglia tra la concentrazione dei peptidi e la concentrazione dei lipidi di membrana (126), si formerebbero veri e propri pori nella membrana dovuti all'aggregazione dei monomeri di peptidi nel doppio strato fosfolipidico. Questi canali comporterebbero un abbassamento del gradiente protonico, la fuoriuscita di metaboliti essenziali, il blocco della produzione di ATP e il rallentamento di altri processi metabolici, fino all'inevitabile morte cellulare.

Introduzione

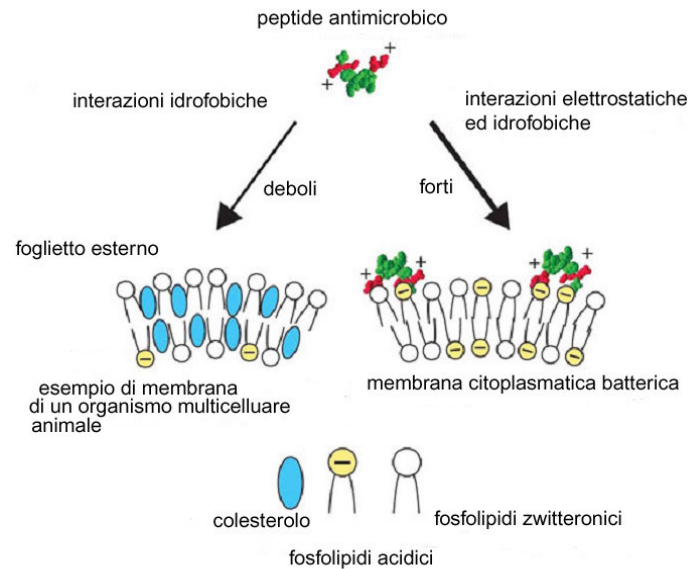


Figura 3. Le membrane bersaglio dei peptidi antimicrobici. La differente composizione delle membrane batteriche ne determina la specificità d'interazione. Modificato da (33).

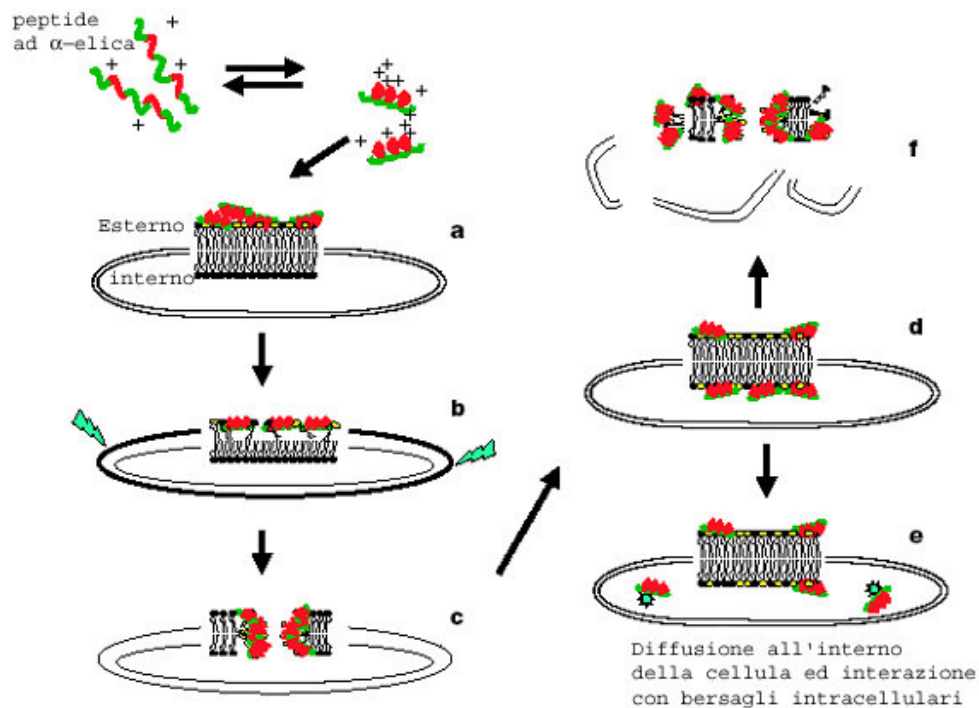


Figura 4. Il meccanismo d'azione dei peptidi antimicrobici spiegato secondo il modello Shai-Matsuzaki-Huang. (a) I peptidi ricoprono il foglietto esterno della membrana cellulare. (b) Il peptide si integra nella membrana provocandone l'assottigliamento e una tensione tra i due foglietti. (c) Fase di transizione in cui si formano dei veri e propri buchi attraverso la membrana. (d) Trasporto dei lipidi e dei peptidi nel foglietto interno della membrana. (e) Diffusione dei peptidi all'interno della cellula e possibile interazione con target intracellulari. (f) Rottura della membrana in piccoli frammenti. I lipidi con le teste arancioni sono acidi o carichi negativamente, mentre i lipidi con le teste nere non hanno carica. Modificato da (33).

Vi sono diversi meccanismi d'azione proposti e i più ampiamente accettati sono il modello *barrel-stave* e il modello *carpet* (128) (**Figura 5**). Secondo il modello *barrel-stave* i peptidi si legano alla membrana attraversandola e formando un lume centrale. Questo tipo di poro transmembrana è unico ed è inducibile da alameticina, la quale adotta una conformazione ad α elica, si lega, forma gli aggregati e si inserisce nel doppio strato fosfolipidico. Le regioni idrofobiche si allineano con il core lipidico della membrana e le regioni idrofiliche formano la parte interna del poro (129). Cambiamenti nella composizione lipidica possono modulare l'equilibrio di aggregazione del peptide e il numero di peptidi nell'aggregato (130) (**Figura 5/A**).

Secondo il modello *carpet* i peptidi si accumulano sulla superficie del doppio strato lipidico (131), come nel caso di ovispirina (132) che si orienta in modo parallelo alla superficie della membrana (133). I peptidi si legano elettrostaticamente alle teste anioniche dei fosfolipidi in numerosi punti ricoprendo la superficie della membrana come un "tappeto". Ad elevate concentrazioni i peptidi portano alla distruzione della membrana in maniera simile a detergenti, determinando eventualmente la formazione di micelle (125, 134) (**Figura 5/B**).

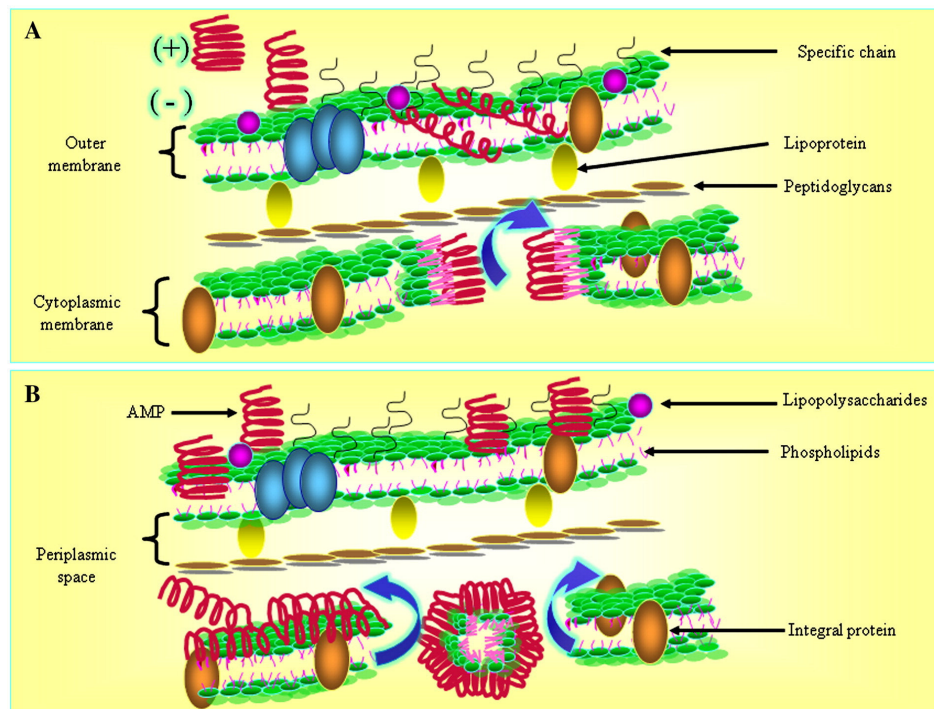


Figura 5. Modalità d'azione degli AMP. (A) Modello *barrel-stave*. I peptidi si legano alla membrana cellulare e successivamente si inseriscono nel core idrofobico della membrana formando un poro, con fuoriuscita del materiale citoplasmatico e morte della cellula. (B) Modello *carpet*. I peptidi si legano ai fosfolipidi della superficie esterna della membrana cellulare; il successivo allineamento dei monomeri peptidici ed il loro riorientamento attraverso il core idrofobico della membrana determina la rottura del doppio strato lipidico (135).

Introduzione

È stato proposto anche un meccanismo *toroidal-pore*, in cui i peptidi si aggregano e si inseriscono perpendicolarmente alla membrana inducendo un ripiegamento continuo dello strato lipidico con formazione di un poro la cui parte interna è formata dalle regioni idrofiliche dei peptidi associate ai gruppi polari fosfolipidici. Questo tipo di poro transmembrana è indotto da magainine (136), protegrine (129) e mellitina (137). Nella formazione del poro toroidale le facce polari dei peptidi si associano con le teste polari dei lipidi (138). I lipidi in queste aperture si piegano rispetto alla normale struttura lamellare e connettono i due strati della membrana, formando un poro toroidale delimitato sia dai peptidi sia dalle teste lipidiche. I pori toroidali indotti da magainina sono più larghi e hanno una maggiore variabilità nella dimensione del poro rispetto a quelli indotti da alameticina (129).

Altri meccanismi suggeriti includono la formazione di canali ionici e l'attivazione o il blocco di bersagli intracellulari dopo permeabilizzazione della membrana batterica (128, 139).

Alcuni peptidi, come defensine, brevinine, magainine, hanno dimostrato una attività antifungina, nella maggior parte dei casi in seguito a permeabilizzazione della membrana citoplasmatica e/o lisi cellulare (140). Anche l'attività antifungina dell'indolicina è stata riferita a una alterazione della struttura della membrana citoplasmatica per interazione con il doppio strato lipidico (141), a differenza di quanto avviene nei confronti dei batteri dove questo peptide penetra all'interno della cellula e agisce sulle sintesi macromolecolari. Le istatine salivari si legano ad un recettore sulla membrana fungina, penetrando nel citoplasma e hanno come bersaglio i mitocondri, mentre per altre molecole il meccanismo dell'azione antifungina non è stato ancora perfettamente chiarito (123). È stato suggerito che formazione di canali ionici e di pori transmembrana e la rottura estesa della membrana non rappresentino tre modalità d'azione completamente differenti, ma invece una graduazione continua dello stesso fenomeno (142).

Non sempre l'interazione aspecifica del peptide con la membrana è sufficiente a neutralizzare o uccidere la cellula; in alcuni casi infatti, il peptide è in grado di attivare processi letali come l'attivazione di idrolasi o enzimi degradativi della parete cellulare (143) o di entrare nel citoplasma interagendo con specifici bersagli intracellulari (144) (**Figura 6**). Ne è un esempio la buforina II, isolata dal rospo *Bufo bufo*, la quale una volta penetrata nella cellula microbica grazie alla cerniera interna di prolina, si accumula all'interno del citoplasma e sembrerebbe interferire con la sintesi degli acidi nucleici (145). Vi sono inoltre casi in cui il peptide lega con elevata affinità una specifica componente della membrana, come ad esempio la nisina, peptide con anelli di lantionina prodotto da batteri del genere *Lactococcus*, che interagisce con il Lipide II del proteoglicano della parete batterica (146).

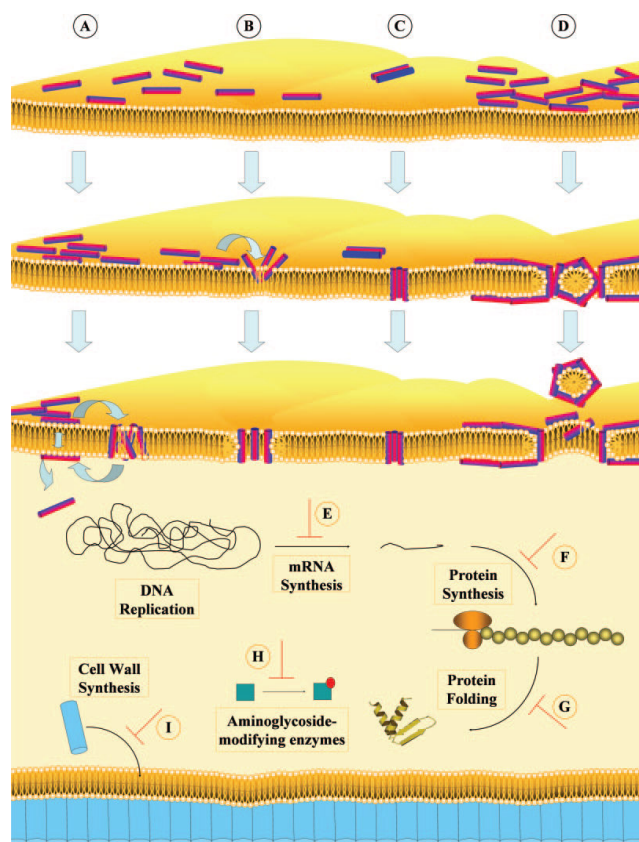


Figura 6. Meccanismi d’azione dei peptidi antibatterici. Sono rappresentati: membrana batterica come doppio strato lipidico giallo, peptidi come cilindri con le regioni idrofiliche colorate in rosso e quelle idrofobiche in blu, molecole di peptidoglicano associate alla parete cellulare come cilindri viola. Da A a D sono indicati i modelli per spiegare i meccanismi della permeabilizzazione della membrana. Nel modello “aggregato” (A) i peptidi sono riorientati per attraversare la membrana come aggregato micellare di peptidi e lipidi, senza alcun particolare orientamento. (B) Modello del poro toroidale: i peptidi si inseriscono perpendicolare al piano del doppio strato, con le regioni idrofile associate con i gruppi della testa dei fosfolipidi e quelle idrofobiche associate al core lipidico. In questo processo, anche la membrana si curva verso l’interno in modo tale che anche il doppio strato si allinei al poro. (C) Modello *barrel-stave*: i peptidi sono inseriti in orientamento perpendicolare al piano del doppio strato, con le regioni idrofiliche dei peptidi di fronte al lume del poro e le regioni idrofobiche che interagiscono con il doppio strato lipidico. (D) Modello *carpet*: i peptidi si aggregano paralleli al doppio strato lipidico, rivestendo le aree locali in modo simile a un tappeto. Ad una determinata concentrazione soglia, questo determina un’attività simile a un detergente, causando la formazione di micelle e pori della membrana. I meccanismi d’azione dei peptidi che non agiscono da permeabilizzanti della membrana batterica sono rappresentate nelle figure da E a I. I peptidi antimicrobici buforina II, pleurocidina e dermaseptina hanno tutti dimostrato di inibire la sintesi di DNA e RNA ai loro valori di MIC senza destabilizzare la membrana (E). La sintesi proteica è un altro bersaglio macromolecolare dei peptidi antibatterici come indolicidina e PR-39 (F). Diversi peptidi antibatterici hanno dimostrato di agire su altri bersagli intracellulari, quali alcune attività enzimatiche. L’attività ATPasica di DnaK, un enzima coinvolto nel *folding* delle proteine assistito da chaperoni, è il bersaglio della pirocidina (G), mentre è stata dimostrata anche l’inibizione degli enzimi coinvolti nella modificazione degli amminoglicosidi (H). I peptidi antimicrobici possono avere come bersaglio anche la formazione di componenti strutturali, come la parete cellulare (I). I lantibiotici come nisina e mersacidina possono legare ed inibire, rispettivamente, la transglicosilazione del lipide II, che è necessaria per la sintesi del peptidoglicano (123).

Introduzione

E' stata anche postulata la possibilità che un peptide antimicrobico uccida microrganismi di una stessa specie o di specie diverse utilizzando più meccanismi d'azione. Questo *multi-hit process* (147) sarebbe il risultato di un fenomeno di cooperazione tra fattori fisiologici diversi come la fase di crescita del patogeno o la presenza di agenti antimicrobici esterni, rendendo più difficile la messa a punto di efficienti meccanismi di difesa da parte del patogeno.

Molecole appartenenti alle diverse categorie di peptidi cationici hanno dimostrato proprietà antivirali, in particolare nei confronti di virus dotati di pericapside, sia a DNA sia a RNA. L'attività antivirale appare spesso correlata all'inibizione dei processi di adsorbimento e di ingresso dei virus nelle cellule, oppure è il risultato di un effetto diretto sul pericapside virale, mentre alcuni peptidi che vengono internalizzati possono influenzare i meccanismi antivirali cellulari e bloccare l'espressione di geni virali (123).

Proprietà immunomodulanti

Come discusso precedentemente, gli AMP possono esplicare funzioni multiple, relativamente alla loro capacità di distruggere le membrane. Essi sono in grado di conferire protezione nei confronti di una varietà di patogeni e di agire come agenti citotossici nei confronti di certi tipi di cellule tumorali. Gli studi condotti inizialmente su questi peptidi sono stati fortemente orientati su una interpretazione della loro funzione quali "antibiotici naturali", per cui questa visione parziale sulla attività antimicrobica diretta, implicita anche nel termine "AMP", ha forse ritardato la scoperta di loro altri ruoli nell'immunità.

La minima concentrazione inibente (MIC) degli AMP nei confronti di microrganismi *in vitro* è in genere molto più elevata della concentrazione fisiologica del peptide *in vivo* in condizioni di riposo. Ad esempio, la concentrazione di LL-37 o di β -defensine è meno di 2 $\mu\text{g/ml}$ nelle mucose, mentre la MIC di LL-37 *in vitro* per *Escherichia coli* è 32 $\mu\text{g/ml}$. Come gli AMP possano esplicare la loro funzione antimicrobica *in vivo* anche a basse concentrazioni può essere chiarito con diverse possibili spiegazioni. Essi possono agire sinergicamente con altre classi di AMP, come nel caso di LL-37 in grado di interagire con BD2, lisozima e lattoferrina, o essere prodotti ed accumulati localmente a concentrazioni sufficientemente al di sopra della MIC, come nel caso di situazioni di infiammazione. Ulteriori evidenze indicano che alcuni AMP possono conferire protezione attraverso meccanismi indiretti e non semplicemente dall'azione diretta sui microrganismi. Essi possono agire come potenti regolatori dell'immunità, alterando l'espressione genica dell'ospite, agendo come chemochine e/o inducendo la produzione di chemochine, inibendo la produzione di citochine proinfiammatorie indotte da LPS o da ialuronano, promuovendo la guarigione delle ferite e

modulando la risposta delle cellule dendritiche o dei linfociti T della risposta immunitaria adattativa (**Figura 7**).

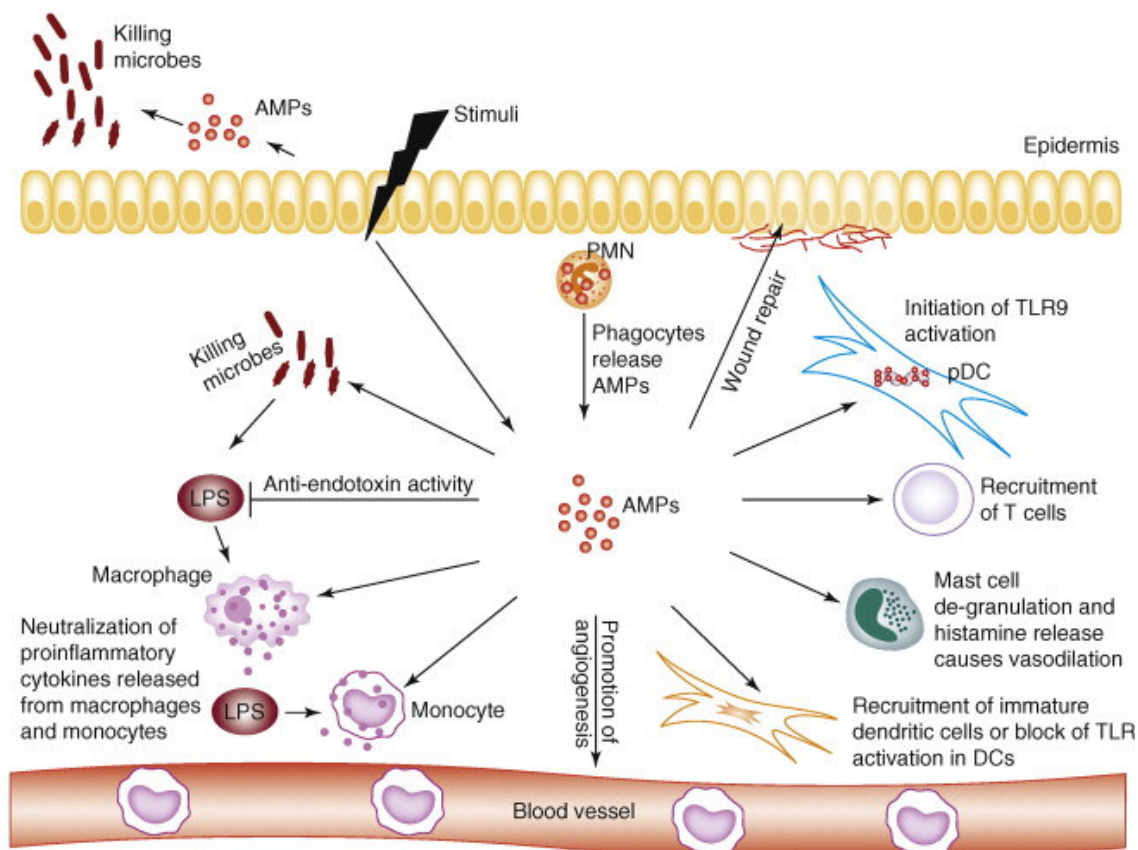


Figura 7. Molteplici funzioni dei peptidi antimicrobici nelle difese dell'ospite. Gli AMP inducono una varietà di risposte nelle cellule dell'immunità innata dell'ospite come monociti, macrofagi, neutrofil e nelle cellule epiteliali. Essi alterano l'espressione genica nelle cellule dell'ospite, inducono la produzione di chemochine e citochine, promuovono il reclutamento dei leucociti nel sito di infezione, influenzano la differenziazione e l'attivazione cellulare e bloccano o attivano la segnalazione mediata da TLR. L'immunomodulazione selettiva mediata da AMP determina risposte dell'immunità innata, protezione nei confronti delle infezioni, controllo selettivo dell'infiammazione, promuovendo inoltre la guarigione di ferite ed avvio delle risposte immunitarie adattative. Abbreviazioni: DC, cellule dendritiche; LPS, lipopolisaccaride; pDC, cellule dendritiche plasmacitoidi; PMN, leucociti polimorfonucleati; TLR, *Toll-like receptor* (35).

Introduzione

Nello specifico, la catelicidina esibisce una azione chemoattrattiva diretta su monociti, neutrofili e linfociti T CD4+ mediante interazione con il *formyl-peptide receptor-like 1* (FPRL-1), un recettore complessato a proteina G (GPCR) espresso in queste cellule (148), che sembra coinvolto nel promuovere l'angiogenesi da parte di LL-37 (149). La catelicidina, inoltre, induce trascrizione e rilascio di chemochine come IL-8 e di proteine chemoattrattive dei monociti 1 e 3 (MCP-1, MCP-2), favorendo il reclutamento di differenti cellule del sistema immunitario richieste per eliminare i microrganismi invasori (150). Inoltre, la catelicidina induce il rilascio di istamina da parte dei mastociti, un processo che aumenta la permeabilità vascolare favorendo così l'infiltrazione dei neutrofili nel tessuto infiammato (151).

La catelicidina è capace di legare LPS bloccando il rilascio di TNF- α (152) e può inibire la trascrizione di citochine proinfiammatorie e di molecole, quali lo stesso TNF- α , ossido nitrico e fattori tissutali, indotti da LPS e acido lipoteicoico in monociti e macrofagi, suggerendo un possibile ruolo di LL-37 nella risoluzione dei processi infiammatori (153, 154). Queste caratteristiche fanno pensare alla catelicidina come ad un potenziale agente terapeutico per la sepsi indotta da batteri gram-negativi e per lo shock settico.

Le defensine, come le catelicidine, hanno proprietà chemoattrattive nei confronti di differenti tipi cellulari, come monociti, linfociti T e cellule dendritiche (DC) (35). hBD-1, hBD-2 e hBD-3 inducono chemiotassi nei linfociti T e nelle DC immature legandosi direttamente al recettore chemochinico CCR6 (155). Nei mastociti, hBD-2 induce la migrazione e la degranolazione mediante il pathway sensibile alla tossina pertossica e fosfolipasi C-dipendente, suggerendo il coinvolgimento di un altro GPCR (156).

Le β -defensine, soprattutto hBD-3, inducono la produzione di diverse chemochine e citochine come MCP-1, proteina infiammatoria macrofagica 3- α (MIP-3), RANTES, IL-6, IL-10, proteina IFN-inducibile 10, TNF- α e IL-1, principalmente nei cheratinociti (157, 158). A basse concentrazioni, le α -defensine inducono la proliferazione dei fibroblasti e delle cellule epiteliali delle vie aeree (159, 160), suggerendo la loro partecipazione ai processi di guarigione e/o rimodellamento delle vie aeree durante le malattie infiammatorie. Catelicidine e defensine sono capaci di indurre cambiamenti fenotipici e funzionali delle DC; mentre la catelicidina aumenta la capacità di presentare l'antigene favorendo la risposta Th1 (161), hBD-2 promuove la maturazione delle DC attraverso meccanismi mediati da TLR-4 (162).

Gli AMP hanno mostrato di giocare un ruolo importante nella guarigione delle ferite e nell'angiogenesi e catelicidine e defensine hBD-2 e hBD-3 aumentano rapidamente nelle ferite contribuendo alla guarigione. LL-37 promuove il rilascio metalloproteinasi-dipendente

di HB-EGF, il quale si lega e avvia la fosforilazione di EGFR, con successiva attivazione di STAT1 e STAT3. Questa trans-attivazione di EGFR induce la migrazione dei cheratinociti richiesti per la ripitelizzazione della ferita (163). LL-37 è anche un importante fattore nella proliferazione e nella formazione di strutture simili a vasi, inducendo angiogenesi funzionale importante per la neovascolarizzazione delle ferite cutanee attraverso attivazione diretta di FPRL-1, espresso sulle cellule endoteliali (149). La presenza di LL-37 è legata a effetti anti-fibrotici utili per la normale guarigione delle ferite, attraverso l'inibizione dell'espressione del collagene in fibroblasti del derma (35). Nel caso delle defensine, un recente studio ha mostrato che hBD-2 stimola migrazione, proliferazione e formazione dei tubi capillari delle cellule endoteliali nelle ferite, portando a una accelerazione della guarigione delle stesse (164). L'induzione dell'angiogenesi attraverso l'uso di AMP può rappresentare una nuova modalità di trattamento per migliorare la guarigione delle ferite e contrastare malattie come i processi ischemici.

Gli AMP di mammifero hanno un ruolo cruciale nella regolazione della risposta infiammatoria TLR-dipendente. Studi di dermatite allergica da contatto in modelli di topo mostrano che le catelicidine inibiscono l'induzione delle citochine rilasciate nelle DC e nei macrofagi mediata da TLR-4 e CD44 (90, 91).

Tutte queste osservazioni indicano che gli AMP hanno un ruolo importante nel regolare e bilanciare la risposta infiammatoria nei confronti di microrganismi e la loro generale capacità di influenzare molteplici fasi dell'attivazione cellulare dell'ospite porta a concludere che alcuni AMP non solo sono coinvolti nel sopprimere la crescita microbica incontrollata, ma riescono a modificare l'infiammazione anche nell'uomo.

In questo modo gli AMP possono essere considerati come un ponte tra immunità innata e adattativa. Tutte queste funzioni favoriscono la risoluzione dell'infezione e potenzialmente l'inversione dell'infiammazione dannosa, complementando l'azione antimicrobica diretta.

AMP nelle malattie infettive

In vitro, molti AMP agiscono nei confronti di differenti tipi di microrganismi, inclusi batteri gram-negativi e -positivi, protozoi, funghi e alcuni virus. Questo è particolarmente vero per AMP di mammiferi che hanno la massima efficienza nei confronti di specifici gruppi di microrganismi rilevanti nei tessuti dove gli AMP sono espressi. È ben documentato che la catelicidina esercita una importante azione antibatterica sulla cute nei confronti di *Streptococcus* di Gruppo A e esperimenti *in vitro* hanno mostrato una diminuzione degli effetti

Introduzione

antimicrobici nei confronti di *E. coli*, *S.* di Gruppo B e *S. aureus*, dovuta ad un aumento della concentrazione di sali nel terreno di crescita (165).

Nei modelli di infezione sperimentale di *Shigella* in coniglio, la somministrazione di butirrato di sodio diminuisce la carica batterica e migliora i segni clinici, coincidendo con l'aumentata espressione di LL-37 (166). Invece, nelle biopsie intestinali di pazienti affetti da *Shigella* è stata osservata una riduzione dell'espressione di LL-37 (167) (**Figura 8**).

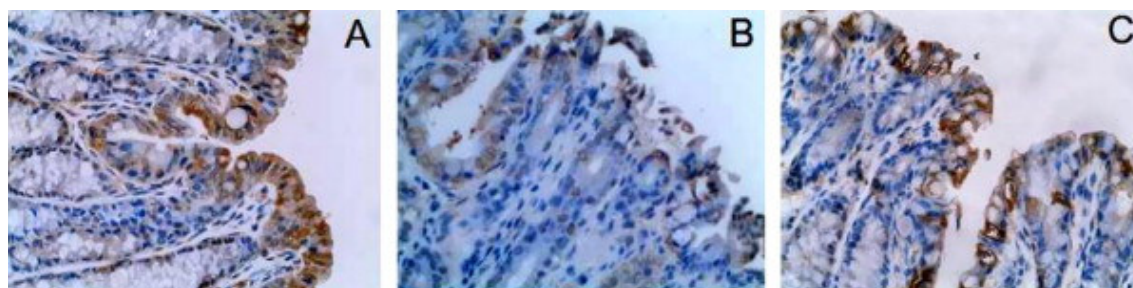


Figura 8. Colorazione immunoistochimica della catelicidina CAP-18 in sezioni di colon di coniglio in paraffina. Tutte le sezioni sono state contro-colorate con ematossilina (blu/viola). (A) Immuno-reattività di CAP-18 (marrone) in conigli sani principalmente localizzata all'epitelio superficiale. (B) In conigli infettati con *Shigella*, gli epiteli superficiali e delle cripte mostrano una drastica riduzione della colorazione di CAP-18 con occasionale erosione del rivestimento epiteliale. (C) Ritorno della colorazione di CAP-18 sull'epitelio superficiale in conigli infettati trattati con butirrato (168).

Le α -defensine HNP-1, HNP-2 e HNP-3 esibiscono una potente attività antivirale *in vitro* nei confronti di adenovirus e, in misura minore, di papilloma virus (HPV), virus erpetico, virus influenzale e citomegalovirus (CMV). Inoltre, HNP-4 inibisce l'infezione da HIV-1 *in vitro* (169). Inoltre, le β -defensine possono sopprimere l'infezione virale in diversi modi, come distruzione del pericapside virale, interazione con le glicoproteine virali e i recettori, con inibizione dell'ingresso del virus nella cellula, interferenza con i pathway di segnali cellulari richiesti per la replicazione virale (169). In particolare, hBD-3 è un antagonista di CXCR4, uno dei co-recettori di HIV e in questo modo potrebbe prevenire l'infezione, inibendo la replicazione virale (170). Le β -defensine hanno attività nei confronti di batteri gram-negativi e -positivi, virus e funghi. hBD-2 ha mostrato attività antimicrobica *in vitro* nei confronti di *Pseudomonas aeruginosa* ed *E. coli* (107). hBD-3 ha una potente attività antibatterica nei confronti di *S. aureus*, mentre hBD-2 ha un effetto non significativo, ma sinergico se usato con altri AMP (171). hBD-1, hBD-2 e hBD-3 hanno importanti attività antifungine nei

confronti di *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* (172). *In vitro*, l'infezione di macrofagi alveolari umani con *M. tuberculosis* induce l'espressione di hBD-2, suggerendo un ruolo nella patogenesi della tubercolosi polmonare umana (173).

AMP come molecole immunomodulanti nelle malattie infiammatorie

Un difetto nella regolazione del rilascio di AMP da parte del sistema di difesa innato può causare una graduale e permanente invasione batterica con attivazione del processo infiammatorio. E' interessante la relazione esistente con l'immunità adattativa, considerato che gli AMP possono reclutare cellule effettrici ed amplificare le risposte immuni acquisite (Figura 9).

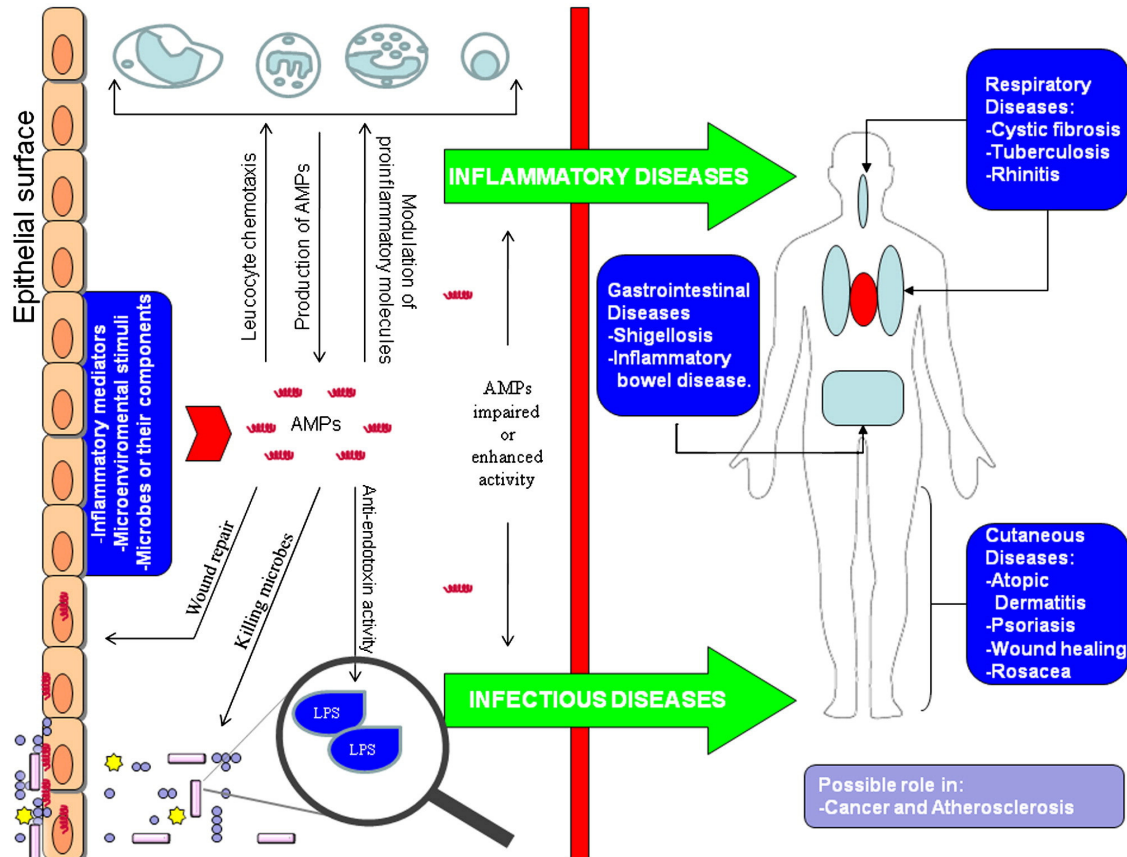


Figura 9. Funzione degli AMP nelle malattie infiammatorie. Diversi tipi cellulari sono attivati da microrganismi e mediatori dell'infiammazione, causando la produzione e il rilascio di AMP. Questi peptidi hanno differenti funzioni, tra cui attività antimicrobica e modulazione della risposta infiammatoria. Uno squilibrio nell'attività degli AMP determina lo sviluppo di infezioni o di malattie infiammatorie (135).

Introduzione

AMP e malattie della cute

Il ruolo degli AMP è stato ampiamente studiato in due patologie della cute, dermatite atopica e psoriasi. I pazienti con psoriasi esprimono elevati livelli di LL-37 e hBD-2 (174), rispetto a pazienti con dermatite atopica, i quali hanno un' aumentata sensibilità per le infezioni cutanee da *Staphylococcus*. Elevati livelli di LL-37 nella psoriasi possono anche promuovere infiammazioni indesiderate (**Figura 10**), con un meccanismo probabilmente mediato dalla formazione di un complesso tra LL-37 e frammenti di DNA rilasciato da cellule danneggiate, in grado di attivare TLR-9 nelle cellule dendritiche plasmocitoidi (pDC), promuovendo la produzione di interferoni di tipo I (IFN- α). Tali IFN innescano la maturazione locale di DC mieloidi (mDC) con attivazione di Th1 o Th17 e produzione di IFN- γ , IL-22 e IL-17, che a loro volta determinano una aumentata espressione di LL-37 ed un meccanismo retroattivo di mantenimento dell'infiammazione psoriasica (35, 175). La presenza di AMP, quindi, può diventare un'arma a doppio taglio in quanto può esacerbare la risposta infiammatoria e portare a malattia.

Pazienti con acne rosacea mostrano un insolito aumento della concentrazione di LL-37 sulla cute, sotto forma di prodotti proteolitici anomali presenti solo in tali pazienti, probabilmente in seguito ad una aumentata attività di serin-preteasi del derma presenti nella sede di infiammazione (176). E' stato dimostrato che la vitamina D3 (VD3) è in grado di indurre l'espressione della catelicidina determinando un rilancio dell'uso di VD3 in dermatologia (177). L'impatto clinico di tale uso in pazienti con dermatite atopica richiede, tuttavia, ulteriori conferme, in quanto, anche se la somministrazione topica o sistemica di LL-37 o la sua induzione on VD3 può essere utilizzata per migliorare i segni clinici in alcune malattie, un suo costante aumento potrebbe determinare l'insorgenza di infiammazione cronica, come avviene nel caso di psoriasi e rosacea.

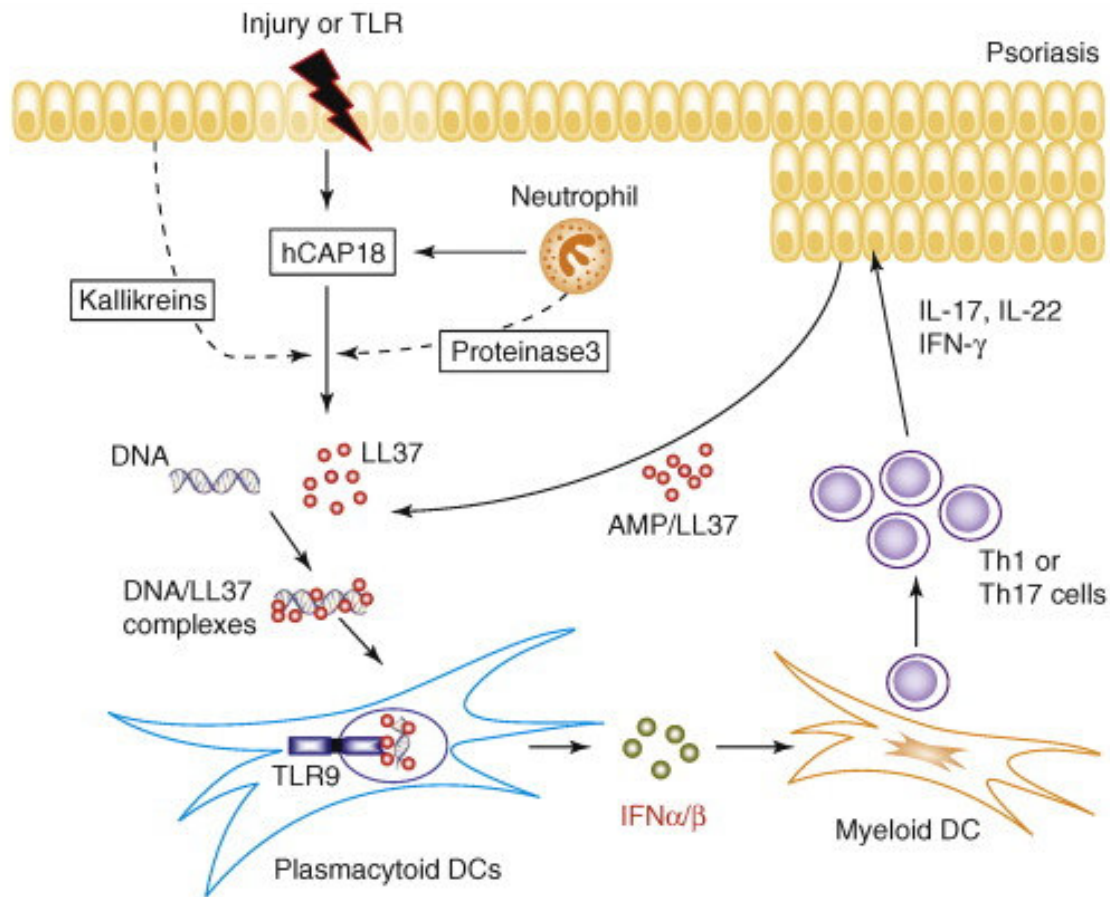


Figura 10. Modello di inizio e mantenimento dell'infiammazione cutanea autoimmune mediata da LL-37 nella psoriasi. Le lesioni della cute e le infezioni inducono una rapida espressione della catelicidina hCAP-18 nei cheratinociti o nei neutrofili infiltrati. Il peptide maturo LL-37 è scisso dal precursore hCAP-18 da callicreine o proteinasi 3. Successivamente, LL-37 si combina con il DNA rilasciato dalle cellule danneggiate per formare un complesso, che attiva TLR9 nelle cellule pDC con produzione di IFN di tipo I (IFN α e β). Questi ultimi innescano la maturazione locale di mDC con attivazione di Th1 o Th17 autoreattivi e conseguente produzione di IFN- γ , IL-22 e IL-17. La produzione sostenuta di IL-22 e IL-17 induce l'espressione di LL-37 che forma un circuito di retroazione nel mantenere l'infiammazione nella psoriasi (35).

AMP e malattie respiratorie

L'epitelio respiratorio è la superficie più estesa del corpo umano a contatto con l'ambiente esterno, esposto a un grande numero e tipo di patogeni. Per prevenire le infezioni, l'apparato respiratorio conta su molti sistemi di difesa, uno dei quali è la produzione di defensine e catelicidine da parte di cellule epiteliali e infiammatorie (178). La fibrosi cistica è una malattia polmonare dovuta a un'alterazione dei canali del cloro che a loro volta inducono un aumento nella salinità del liquido alveolare. Elevate concentrazioni saline aboliscono l'attività

Introduzione

antibatterica di hBD-2 e questo potrebbe spiegare le ricorrenti infezioni batteriche nei polmoni di questi pazienti (179).

Aumentati livelli di defensine sono stati riportati in diverse malattie polmonari, quali fibrosi polmonare idiopatica, proteinosi alveolare, sindrome acuta da distress respiratorio, trapianto di polmone e panbronchiolite (180, 181). L'esatto ruolo delle defensine in questi disturbi polmonari non è stato chiarito, ma esse potrebbero essere coinvolte nella modulazione della risposta infiammatoria.

hBD-1 e hBD-2 sono espresse nell'epitelio nasale (182, 183). Poiché in pazienti con rinite allergica è stata osservata una significativa riduzione dell'mRNA per TLR-2 nella mucosa nasale, è stato suggerito che questo potrebbe determinare una riduzione dell'espressione di hBD-2 nella mucosa nasale di tali pazienti (184). D'altra parte è stato recentemente dimostrato che l'mRNA di psoriasina e catelicidina, due AMP, è ridotto nelle cellule epiteliali uncinatate di pazienti con rinosinusite cronica (CRS) (185) e che i livelli di psoriasina sono ridotti nel fluido di lavaggio nasale di pazienti con rinite allergica (186). Queste osservazioni confermano l'ipotesi che pazienti con rinite allergica o con CRS siano più suscettibili a infezioni a causa di una disfunzione della barriera epiteliale e/o a bassi livelli di AMP. Non si conosce ancora se hBD-1 e/o hBD-2 siano coinvolti in queste malattie.

Il fumo di tabacco è associato a livelli significativamente ridotti di hBD-2 nei liquidi di lavaggio faringeo e nell'espettorato di pazienti con polmonite acuta e l'esposizione dell'epitelio delle vie aeree al fumo di tabacco *in vitro* inibisce l'induzione di hBD-2 da parte di batteri (187). L'esposizione al fumo sembrerebbe sopprimere l'induzione delle difese epiteliali antibatteriche dell'ospite, determinando un'aumentata suscettibilità dei fumatori alle infezioni. Tale meccanismo potrebbe essere importante nella patogenesi della polmonite, della malattia polmonare ostruttiva cronica e forse del cancro. In questo scenario, sarebbe interessante documentare l'impatto dell'inquinamento sull'integrità dell'epitelio e sull'espressione di AMP e correlarlo alla frequenza delle infezioni respiratorie.

AMP e malattie intestinali

Il morbo di Crohn è associato a una debole induzione di hBD-2 e hBD-3 causata da un minor numero di copie del gene nel locus genico delle β -defensine sul cromosoma 8 (188); inoltre, è stata descritta una difettosa espressione delle α -defensine HD-5 e HD-6 nelle cellule di Paneth di pazienti affetti da malattia di Crohn a sede ileale (92, 189). Tali osservazioni supportano una delle ipotesi eziologiche per questa malattia, che potrebbe avere inizio con una infezione batterica intestinale accompagnata da una reazione infiammatoria auto-propagata nella mucosa di individui geneticamente suscettibili. Una difettosa produzione di α -defensine nella

malattia di Crohn a sede ileale è stata osservata in pazienti con mutazioni nel gene NOD2 (*nucleotide-binding oligomerization domain protein 2*) e particolarmente in pazienti con ridotta espressione dei fattori di trascrizione 4 dei linfociti T (TCF4) (189).

Diversamente dai pazienti affetti da colite di Crohn, gli individui affetti da colite ulcerosa attiva mostrano un' aumentata espressione di hBD-2 e hBD-3 (190). Questo è un altro esempio di come la presenza di AMP può essere un' arma a doppio taglio, perché una loro diminuita produzione può portare a un' aumentata colonizzazione da parte di agenti infettivi, ma una loro elevata produzione può esacerbare la risposta infiammatoria e portare a malattia.

AMP in altre patologie

Gli AMP possono essere coinvolti nella patogenesi dell'aterosclerosi, essendo stati rilevati nelle placche ateromatose del circolo coronarico e cerebrale, sebbene non sia ancora chiaro se la loro aumentata espressione sia benefica o nociva per la parete vascolare (191, 192). Le defensine sono anche coinvolte nella cattura e degradazione delle lipoproteine nell'endotelio e nell'attività antifibrinolitica (193, 194). D'altra parte studi animali hanno suggerito che le defensine umane prodotte dai neutrofili (HNP) possano causare una disfunzione endoteliale nelle arterie coronariche porcine, diminuendo la vasodilatazione endotelio-dipendente (195). Un ruolo degli AMP nell'aterosclerosi è anche stato suggerito dall'aumentata espressione di TLR nelle lesioni aterosclerotiche. L'attivazione di questi recettori può portare alla sintesi e al rilascio di AMP e di citochine infiammatorie, suggerendo che il blocco dei TLR o degli AMP possa ridurre la progressione dell'aterosclerosi (196). D'altra parte, elevati livelli plasmatici di α -defensine (HNP 1-3) proinfiammatorie e pro-aterogene sono stati rilevati in pazienti diabetici di tipo 1 affetti da malattie cardiovascolari (CVD). Le α -defensine plasmatiche potrebbero perciò servire da marcatori di rischio clinico per CVD e mortalità in tali pazienti, anche se ulteriori studi saranno necessari per determinare se gli AMP siano la causa o la conseguenza di tali processi infiammatori (197).

AMP hanno mostrato attività citotossica nei confronti di cellule cancerose, con tre possibili meccanismi: lisi della membrana cellulare, attivazione di un pathway apoptotico estrinseco e inibizione dell'angiogenesi (77). Molte ricerche condotte in questo campo si sono incentrate sull'effetto citotossico di cecropine e magainine nei confronti di cellule di melanoma, tumore al seno ed ai polmoni, linfomi e leucemie, ma altri AMP, quali defensine, catelicidina e lattoferricina, sono in fase di studio (198). Ulteriori studi saranno necessari per determinare la sicurezza degli AMP nel trattamento del cancro.

Introduzione

AMP come strumento terapeutico

L'aumentata resistenza agli antibiotici e l'emergenza di nuovi patogeni ha portato a una urgente necessità per approcci alternativi nel trattamento delle infezioni. Le molecole immunomodulanti che non sono rivolte direttamente al patogeno, ma piuttosto aumentano o alterano selettivamente i meccanismi di difesa dell'ospite, sono dei candidati interessanti per uno sviluppo a fini terapeutici. I peptidi naturali cationici di difesa dell'ospite possono incentivare la risposta immunitaria innata e modulare selettivamente la risposta infiammatoria indotta dal patogeno. Poiché gli AMP sono capaci di uccidere rapidamente un ampio spettro di agenti infettivi e modulare sia l'immunità innata che adattativa, considerevoli sforzi sono stati fatti per sfruttare le loro potenzialità terapeutiche.

La somministrazione di VD3 per indurre LL-37 è attualmente saggiata nel trattamento delle malattie della cute; l'efficacia della somministrazione di probiotici o butirrato, per indurre AMP intestinali in risposta ad infezioni o a malattie infiammatorie gastrointestinali, è ampiamente documentata in modelli animali. Nell'uomo sono in corso studi clinici per valutare l'efficacia del butirrato nel trattamento della shigellosi (87).

Un interessante approccio è stato descritto usando metodi di terapia genica. In un modello di xenotrapianto di fibrosi cistica, il trasferimento mediato da adenovirus del gene per LL-37 ne induce una elevata espressione ripristinando l'attività battericida mucosale (199). Una analoga terapia genica a livello cutaneo si è dimostrata più efficace della somministrazione di catelicidina sintetica nel trattamento delle infezioni di ferite da ustione (200). Questa è una nuova e promettente area di ricerca con un notevole potenziale per il trattamento di patologie con alterata produzione o disfunzione di AMP, come malattie parodontali, morbo di Crohn e fibrosi cistica.

L'induzione di AMP endogeni con agenti stimolanti somministrati per via topica o sistemica sembra essere un'opzione di trattamento sicura ed economica, evitando sia gli effetti secondari prodotti da analoghi sintetici sia la difficoltà di distribuirli integri al sito d'azione desiderato.

Peptidi ad attività antimicrobica o antivirale possono essere purificati da fonti naturali o sintetizzati in laboratorio e un sistema particolarmente efficace per l'individuazione di nuove molecole biologicamente attive consiste nell'utilizzo di librerie combinatoriali. L'impiego di questa metodologia offre il principale vantaggio di permettere la rapida selezione di molecole nell'ambito di una libreria che può contenere decine di milioni di composti diversi (201, 202). Alla luce della loro emergente selettiva attività immunomodulante, sono state proposte almeno tre possibili applicazioni degli AMP (122). AMP che non presentano attività

microbicide diretta, ma piuttosto proteggono dalle infezioni per le loro selettive attività immunomodulanti, possono essere impiegati in terapie efficaci nei confronti di infezioni, anche sostenute da patogeni emergenti e multiresistenti. Inoltre, dato che AMP possono avere potenti proprietà anti-infiammatorie, ma selettivamente modulare e/o mantenere certe risposte immunitarie dell'ospite, potrebbero essere utilizzati nella terapia di disturbi infiammatori acuti, indotti o cronici. Infine, poichè queste proprietà immunomodulanti possono influenzare l'inizio e la polarizzazione della risposta adattativa (161, 203, 204), AMP potrebbero essere sviluppati come potenziali adiuvanti. Limitazioni al loro sviluppo sono essenzialmente dovute alla scarsa conoscenza della loro farmacodinamica e tossicologia, inclusa la potenziale immunotossicità, ai problemi relativi all'aggregazione dei peptidi e alla loro possibile labilità alle proteasi; tali aspetti potrebbero essere risolti in fase di sintesi degli AMP, includendo amminoacidi inusuali, non-peptidici o enantiomeri D, apportando modificazioni chimiche o migliorando la formulazione del possibile farmaco. Diversi studi hanno già sperimentalmente dimostrato la potenzialità di tali approcci, come nel caso di batteriemie sperimentali in topo da *P. aeruginosa* efficacemente trattate con un peptide ingegnerizzato *de novo* somministrato per via intraperitoneale (205) o nel caso di infezioni sperimentali da *S. aureus* trattate mediante somministrazione intravenosa di D,L- α -peptidi ciclici, dimostratisi molto stabili nel siero e resistenti alle proteasi (206).

Anche l'elevato costo di produzione dei peptidi tende a limitare la sperimentazione e lo sviluppo di loro varianti, stimolando la ricerca, come nuovi antibiotici, di peptidi naturali contenenti amminoacidi non convenzionali, quali i peptaiboli (<http://www.cryst.bbk.ac.uk/peptaibol/home.shtml>), di composti peptidomimetici (207) e di polimeri di N-alchilglicine noti come peptoidi (208).

In **Tabella 2** sono elencati alcuni peptidi attualmente saggiati in studi clinici e preclinici (209). Ad esempio la plectasina, prima defensina isolata da un fungo, l'ascomicete saprofitico *Pseudoplectania nigrella* trovato nelle foreste di pini dell'Europa settentrionale, con un elevato grado di similarità di sequenza e strutturale con defensine di invertebrati e piante, è ben tollerata a dosi elevate ed ha evidenziato una efficacia comparabile a vancomicina e penicillina in modelli animali di peritonite batterica e polmonite causate da *S. pneumoniae*. La similarità della plectasina alle defensine degli invertebrati sembra confermare altre evidenze che legano le defensine delle piante e degli insetti a un comune gene ancestrale. Tale peptide è stato prodotto su larga scala e con la purezza richiesta per una somministrazione terapeutica, utilizzando un sistema altamente efficace di espressione proteica in *Aspergillus oryzae* (210).

Introduzione

Tabella 2. Peptidi antimicrobici sviluppati per usi terapeutici.

Peptide	Company	Classe peptidica	Uso clinico
MBI-226	Migenix	Analogo dell'indolicidina	Trattamento di infezioni ematiche correlate a catetere.
MX-594AN	Migenix	Basato sull'indolicidina	Trattamento topico dell' <i>acne vulgaris</i> .
PG-1	Intrabiotics	Protegrina	Trattamento delle infezioni peritoneali causate da <i>P. aeruginosa</i> e <i>S. aureus</i> . Trattamento della polmonite.
Plectasin	Novozymes	Defensina	Attività microbica nei confronti di batteri resistenti agli antibiotici.
P-113	Dermegen	Derivato dall'istatina	Usato come collutorio per il trattamento di placca e gengivite.

Conclusioni

Oltre alla loro azione antimicrobica, gli AMP hanno dimostrato differenti effetti biologici, ognuno coinvolto nel controllo di infezioni e malattie infiammatorie, caratteristiche che rendono questi peptidi appetibili come strumenti terapeutici. La sintesi di AMP e lo sviluppo di analoghi possono fornire alternative utili per il loro utilizzo nell'uomo. Un altro interessante approccio è l'induzione della produzione endogena di questi peptidi, evitando la possibile tossicità, reazioni sistemiche avverse e la difficoltà di distribuirli integri al sito d'azione desiderato.

Gli AMP possono essere usati per migliorare malattie, quali fibrosi cistica o morbo di Crohn, connesse all'assenza o alla non attività di peptidi endogeni. Tuttavia, la stretta regolazione di questi peptidi dovrebbe essere considerata, dato che elevate e persistenti quantità possono portare a processi infiammatori cronici, come è stato dimostrato per psoriasi e rosacea.

D'altra parte, l'aumentata incidenza di infezioni batteriche antibiotico-resistenti è una delle più grandi sfide della medicina moderna (211). Esiste una evidente esigenza per nuovi trattamenti efficaci e sicuri e gli AMP potrebbero diventare utili strumenti terapeutici, dato che hanno mostrato di essere attivi nei confronti di infezioni non solo batteriche, ma anche virali e fungine. Inoltre, la loro attività antimicrobica è estesa in diverse direzioni grazie alle loro proprietà multifunzionali e questo rende più difficile lo sviluppo di resistenze nei

microrganismi. Diversi meccanismi sono stati descritti in merito alla resistenza microbica agli AMP. Per esempio, *Shigella* sp. rilascia DNA plasmidico che inibisce l'espressione di peptidi antimicrobici nelle cellule epiteliali o nei monociti (167) e questo aiuta i batteri a evadere le funzioni degli AMP. Un'altra strategia usata dai microrganismi per evadere gli effetti degli AMP è cambiare la composizione della loro membrana cellulare. Vi sono esempi di specie resistenti dei generi *Morganella* e *Serratia*, che possiedono una membrana esterna a bassa densità di lipidi acidi in grado di impedire il legame dei peptidi. Altre specie secernono proteasi in grado di distruggere i peptidi come nel caso di *Porphyromonas gingivalis* o *S. aureus*, il quale secerne proteasi V8 per inattivare il peptide LL-37 (212). Anche se queste alterazioni tendono a diminuire la suscettibilità dei microrganismi agli AMP e a contribuire alla loro patogenicità, l'espressione degli AMP continua a fornire protezione nei confronti delle infezioni. Esistono diverse teorie in grado di spiegare la loro efficacia nell'immunità dei mammiferi. In primo luogo, gli elevati costi per i microrganismi di sviluppare ed esprimere geni per la resistenza, precludono modificazioni che portano alla resistenza totale. Inoltre, la stretta regolazione dell'espressione degli AMP nei siti d'infezione, determina una loro concentrazione estremamente elevata *in vivo* che non può essere completamente superata dai microrganismi (213, 214). Questo, insieme alla simultanea produzione di una varietà di differenti AMP, impedisce la colonizzazione e la crescita microbica (103). Bisogna considerare che gli organismi multicellulari producono contemporaneamente più peptidi appartenenti a classi strutturali diverse, pertanto la resistenza ad una particolare classe di peptidi può non essere sufficiente alla sopravvivenza del microrganismo.

Sebbene molto resta da studiare circa la fisiologia di questi peptidi, l'ampio spettro degli AMP unito alle loro caratteristiche multifunzionali rende questi peptidi le uniche molecole naturali che possono essere sfruttate per lo sviluppo di strategie terapeutiche, indipendenti o in associazione con farmaci esistenti, per molteplici malattie umane (135).

Gli anticorpi quali nuovi agenti antimicrobici

Gli anticorpi (Ab) o immunoglobuline (Ig) sono glicoproteine utilizzate per diverse applicazioni biotecnologiche, mediche e di ricerca di base, grazie alla loro elevata specificità che permette loro, potenzialmente, il riconoscimento di ogni tipo di molecola bersaglio. Negli ultimi decenni, gli Ab sono emersi come una nuova classe di agenti terapeutici antigene (Ag)-mediati in diversi ambiti clinici, inclusi oncologia, malattie infettive, infiammazione cronica, malattie autoimmuni e cardiovascolari e trapianti (215). Gli Ab si sono evoluti nei vertebrati come un sofisticato e versatile meccanismo di difesa dell'ospite nei confronti dei patogeni (216). La peculiare architettura molecolare eterodimerica è responsabile delle loro specifiche caratteristiche fisico-chimiche e funzionali. In molte specie animali, come mostrato in **Figura 11**, gli Ab esistono come una o più copie di una unità tetramerica a forma di Y composta da quattro polipeptidi, due catene pesanti (H) di circa 450-550 amminoacidi e due catene leggere (L) di 250 amminoacidi, legate da ponti disolfuro. Le catene H e L sono composte da regioni variabili (V_H e V_L) e costanti (C_H e C_L) ripiegate in unità funzionali chiamate domini, rispettivamente coinvolte nel riconoscimento dell'Ag e nelle funzioni effettrici. V_H e V_L sono composte da 110-130 amminoacidi, differiscono in sequenza negli Ab prodotti da linfociti B diversi e formano due siti di legame dell'Ag, uno all'estremità di ciascun braccio dell'Ab. Ciascuna V_H e V_L è suddivisa in tre regioni determinanti la complementarità (CDR), altamente variabili in sequenza e lunghezza ($L_{1,2,3}$ e $H_{1,2,3}$) ed in quattro regioni cornice ($FR_{1,2,3,4}$) con sequenza amminoacidica più conservata. Mentre i CDR vengono direttamente a contatto con il determinante antigenico o epitopo, le regioni FR formano una struttura a foglietto β che agisce come una impalcatura per mantenere i CDR nella giusta posizione di interazione con l'epitopo attraverso legami deboli, così da assicurare la specificità di legame (217, 218).

Un Ab bivalente monomero può essere scisso dall'enzima papaina, generando due identici frammenti monovalenti di legame per l'Ag (Fab) e un frammento cristallizzabile (Fc) determinante la classe anticorpale (isotipo), responsabile di alcune rilevanti attività biologiche dell'Ab, in parte attivate dopo che il Fab si è legato al suo corrispondente Ag. Fc può influenzare la distribuzione tissutale dell'Ab, la capacità di attraversare la placenta, il trasporto nelle secrezioni, l'emivita nel siero, l'attivazione del pathway del complemento e il legame differenziale a vari tipi cellulari.

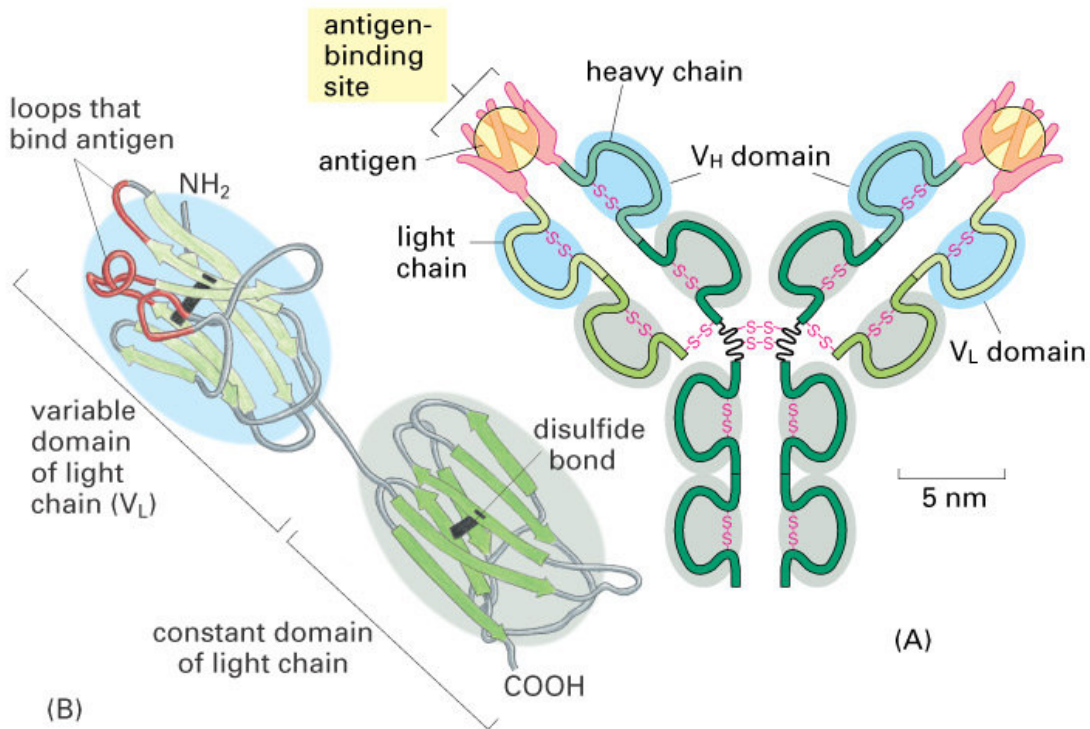


Figura 11. Struttura di un anticorpo. Un Ab ha una forma a Y e presenta due siti identici di legame per l'Ag, uno su ogni braccio della Y. **(A)** Disegno schematico di una tipica molecola di Ab. La proteina è composta da quattro catene polipeptidiche (due catene pesanti e due catene leggere) tenute insieme da legami disolfuro. Ogni catena è costituita da diversi domini differenti, ombreggiati in blu o grigio. **(B)** Disegno a nastro di una singola catena leggera. In evidenza in rosso i CDR (Figura 4-27 *Essential Cell Biology* © Garland Science 2010).

Le differenze strutturali nei siti di legame per l'Ag (paratopi) sono responsabili della specificità e affinità dell'Ab, ossia dello specifico riconoscimento del relativo determinante antigenico e della forza dell'interazione. La regione C, tuttavia, influenza la struttura secondaria dei siti di legame per l'Ag ed i parametri cinetici e termodinamici della loro interazione con l'Ag. Pertanto, identiche regioni V possono differire nel legame per l'Ag, nella fine specificità e nel riconoscimento idiotipico (Id) a seconda dell'isotipo dell'Ab (219). La capacità degli Ab di riconoscere centinaia di miliardi di differenti epitopi è essenzialmente dovuta agli speciali processi di diversificazione di un limitato numero di geni codificanti gli Ab durante lo sviluppo dei linfociti B. Le regioni V sono codificate da diversi set di segmenti genici, variabile (V), di giunzione (J) e di diversità (D), mentre le regioni C sono codificate da un più limitato numero di geni. Durante l'iniziale differenziazione dei linfociti B nel midollo

Introduzione

osseo, i segmenti genici VDJ codificanti V_H ed i geni codificanti V_L e J_L , precedentemente dispersi lungo il genoma, sono riorganizzati in modo ordinato prima nei linfociti pro-B poi nei pre-B (220). Infine, le regioni V e C sono unite insieme e l'Ab è espresso sulla superficie cellulare come recettore dei linfociti B per generare il repertorio anticorpale primario. Questo assicura la generazione di più di 10^7 Ab specifici e consente ai linfociti B di evitare l'apoptosi e di migrare verso gli organi linfoidi secondari, dove possono produrre Ab IgM a bassa affinità. Dopo l'incontro con i corrispondenti Ag, i linfociti B sono stimolati ad iniziare un processo di maturazione caratterizzato da proliferazione, differenziazione e migrazione verso la zona oscura dei centri germinali. A questo stadio, i linfociti B attivati possono esprimere in grande quantità citidin-deaminasi indotta dall'attivazione (AID), avviando così una ulteriore processazione molecolare dei geni Ig che può aumentare la variabilità degli Ab e l'efficienza della risposta umorale. Il danno iniziato da AID è processato da diversi meccanismi, che sono particolarmente soggetti ad errori e possono introdurre mutazioni puntiformi e sostituzioni di amminoacidi nelle regioni V, determinando ipermutazione somatica. Solitamente sono selezionati cloni di linfociti B ad elevata affinità, che producono Ab mutati con elevata affinità per l'Ag. Successivi cicli di mutazione e selezione possono essere responsabili del progressivo aumento di affinità dell'Ab, un fenomeno chiamato "maturazione dell'affinità" (221-223). Nei linfociti B centroblastici, meccanismi simili mediano il cambio di classe immunoglobulinica (*switch* isotipico), conferendo un nuovo isotipo e nuove caratteristiche funzionali all'Ab senza alterarne la specificità per l'Ag (224, 225).

Anticorpi ed immunoprotezione

In fase di differenziazione terminale in plasmacellule, i linfociti B acquisiscono la capacità di produrre e secernere elevati livelli di Ab secretori o sierici che, a seconda di quantità, specificità ed isotipo, possono giocare un rilevante ruolo nella immunoprotezione. Interferendo con il legame al recettore e con l'ingresso nella cellula, gli Ab possono neutralizzare agenti infettivi e fattori microbici, come virus e esotossine, evitando così la cito-patogenicità/tossicità. Gli Ab possono anche interagire con le adesine associate alla virulenza, prevenendo la colonizzazione. Sebbene la protezione dalle infezioni dipenda da una complessa interrelazione tra i differenti rami del sistema immunitario innato e adattativo, gli Ab possono giocare un ruolo cruciale. Questa evidenza è attestata dall'immunoprotezione acquisita dal feto grazie al trasferimento materno di IgG attraverso la placenta o dagli effetti terapeutici e di profilassi ottenuti negli adulti attraverso la somministrazione passiva di Ab. Significativamente, l'efficacia clinica di tutti gli attuali vaccini (poliomielite, difterite, tetano e altri) è basata sulla stimolazione della produzione di Ab neutralizzanti secretori o sierici.

Dopo il legame, alcuni Ab catalitici (CAb) possono catalizzare reazioni chimiche coinvolgendo l'Ag come substrato o promuovendone la scissione. CAb naturali sono stati rilevati in individui sani o prevalentemente in pazienti affetti da malattie autoimmuni e sembra possano giocare un ruolo nella protezione nei confronti delle infezioni e molecole tossiche endogene o nella patogenesi di malattie autoimmuni (226).

Una volta che il Fab lega l'Ag, alcuni Ab possono essere proteggenti reclutando, attraverso la loro porzione Fc, altre componenti del sistema immunitario, quali complemento, fagociti e/o cellule *natural killer* (NK). Così, l'intervento degli Ab può determinare differenti effetti antimicrobici e antivirali, quali neutralizzazione, aumentata fagocitosi, uccisione all'interno dei fagociti, aggregazione, rimozione facilitata dei patogeni dalla circolazione, citotossicità cellulare anticorpo-dipendente (ADCC), citotossicità dipendente dal complemento (CDC), che possono determinare l'esito dell'interazione ospite-patogeno (227, 228). Inoltre, la dimostrazione che Ab monoclonali (mAb) diretti nei confronti di diversi patogeni intracellulari batterici e fungini sono proteggenti, suggerisce che gli Ab possano facilitare la risposta immunitaria cellulo-mediata nei confronti di questi patogeni, promuovendo *uptake*, processamento e presentazione per una rapida attivazione dei linfociti T (229, 230).

Anticorpi microbici

Più recentemente è stata rilevata una attività microbica diretta come nuova funzione degli Ab, suggerendo l'esistenza di una famiglia di Ab con attività antibiotica, chiamati "antibiocorpi" (231). Paradigmatici tra di essi sono Ab microbici rappresentanti l'immagine interna del sito attivo di una tossina killer prodotta dal lievito *Pichia anomala* (*PaKT*), caratterizzata da un ampio spettro di attività antimicrobica, comprendente microrganismi patogeni eucarioti e procarioti. Antibiocorpi o Ab killer (KAb) sono stati rilevati in diverse condizioni sperimentali e naturali. In seguito a vaccinazione idiopica (Id) parenterale o intravaginale con un mAb neutralizzante *PaKT* (mAb KT4), KAb anti-Id sierici o secretori sono stati prodotti in differenti modelli animali (coniglio, topo, ratto). I KAb anti-Id purificati per affinità con mAb KT4 sono candidacidi *in vitro* e conferiscono immunoprotezione passiva nei topi nei confronti di candidosi sistemica e vaginale, suggerendo che l'immunizzazione Id possa essere un potenziale approccio vaccinale (232). Significativamente, i KAb sono stati anche rilevati in fluidi vaginali animali e umani in seguito a infezioni sperimentali o naturali da parte di cellule di *C. albicans* recanti il recettore per *PaKT* (*PaKTR*), costituito da β -1,3-D-glucano. Sebbene la loro rilevanza clinica debba ancora essere valutata, i KAb potrebbero essere parte del repertorio anticorpale prodotto in seguito a infezione o immunizzazione con microrganismi dotati di *PaKTR*; il loro rilevante coinvolgimento nella

Introduzione

immunoprotezione può essere attestato dalla significativa protezione anti-*Candida* realizzabile dal loro trasferimento passivo ad animali naïve (233). I KAb anti-Id, anche in formato monoclonale (mAb) o ricombinante (rAb), sono capaci di competere con PaKT per il legame a PaKTR sulle cellule microbiche, di esercitare un'attività microbica ad ampio spettro *in vitro* e una significativa attività terapeutica nei confronti di infezioni sperimentali quando trasferiti passivamente ad animali naïve normali o immunodeficienti (234-240). L'attività microbica *in vitro* dei KAb può essere neutralizzata specificamente da mAb KT4 e da laminarina, un β -1,3-D-glucano solubile, suggerendo che un β -glucano simile possa essere coinvolto, interamente o in parte, o agire come un surrogato mimetico della struttura di PaKTR. In *C. albicans*, i PaKTR della parete cellulare appaiono preferenzialmente espressi sulla superficie delle cellule gemmanti e particolarmente sui tubuli germinativi, dove i β -1,3-D-glucani sono temporaneamente esposti durante la neo-sintesi della parete cellulare (241).

Il ruolo immunoprotettivo degli Ab anti- β -glucano è stato confermato (242-244). Ab ottenuti dall'immunizzazione con un vaccino costituito da laminarina coniugata al tossoide difterico sono protettivi nei confronti di candidosi vaginale e sistemica e di aspergillosi disseminata. Ab anti- β -1,3-D-glucano policlonali e monoclonali mostrano un'attività fungicida *in vitro* ad ampio spettro, comprensiva di *C. albicans*, *Aspergillus fumigatus* e *Cryptococcus neoformans*, e conferiscono una protezione passiva quando trasferiti ad animali non immunizzati (243, 244).

Anticorpi e loro ingegnerizzazione

La peculiare genetica, l'architettura modulare ed i progressi tecnologici hanno permesso la manipolazione e l'ingegnerizzazione molecolare di Ab per la generazione di nuovi potenti strumenti, principalmente per scopi terapeutici. La produzione di mAb murini anzitutto consente di avere a disposizione Ab caratterizzati da assoluta riproducibilità, specificità e illimitata disponibilità (244). I mAb murini rappresentano anche un prezioso strumento per la ricerca di base e, nei laboratori clinici, per scopi terapeutici e diagnostici. Considerato che la tradizionale tecnologia degli ibridomi è un processo molto lungo e laborioso, nuove strategie alternative sono state utilizzate per semplificare e aumentare la produttività della produzione di mAb, come l'automazione nella produzione di ibridomi, la generazione di mAb senza l'utilizzo di ibridomi e saggi di *microarray* di Ag per lo screening di Ab (245).

Per superare alcune limitazioni terapeutiche, i mAb murini sono stati umanizzati attraverso diversi approcci. I domini C sono stati rimpiazzati dai corrispondenti domini C umani generando Ab chimerici, CDR murini sono stati trapiantati in Ab umani o mAb umani sono

stati direttamente prodotti in topi transgenici (246, 247). Queste strategie hanno portato a una significativa riduzione dell'immunogenicità anticorpale e, conseguentemente, della risposta anti-Ab dell'ospite, che può indurre reazioni avverse e limitare in modo critico l'efficacia terapeutica.

Anticorpi ricombinanti

Lo sviluppo delle tecnologie di “display” del DNA ricombinante (*phage-*, *ribosome-*, *yeast-*, *bead-display*) e la disponibilità di vari sistemi di produzione cellulari (batteri, lieviti, funghi filamentosi, linee cellulari, animali e piante transgenici) hanno permesso l'ingegnerizzazione degli Ab dimensionandoli in frammenti più piccoli. Pur conservando la specificità per il target dell'intero Ab, questi frammenti possono essere prodotti più facilmente e in modo più economico per applicazioni diagnostiche e terapeutiche (248-251). In particolar modo, il *phage-display* e l'espressione funzionale in *E. coli* hanno consentito la generazione di librerie e la selezione di frammenti anticorpali, proponendosi quale metodo più potente per produrre Ab ricombinanti. Una sovrabbondanza di frammenti e molecole derivati da Ab sono stati prodotti in differenti formati, caratterizzati da differente peso molecolare, affinità, specificità e valenza (252-256). Molti di loro, privi della regione Fc, sono carenti delle funzioni effettrici, mentre mantengono la specificità per l'Ag dell'intero Ab.

Uno dei formati più consolidati è il frammento variabile a singolo filamento (scFv), la cui dimensione è essenzialmente ridotta alla parte dell'Ab legante l'Ag. Le catene V_H e V_L sono legate insieme da un connettore polipeptidico flessibile (*linker*) che previene la dissociazione e facilita il loro appaiamento, permettendo che l'originale specificità di legame per l'Ag sia mantenuta in un singolo polipeptide. La generazione e la selezione dei scFv e di altri rAb consente il simultaneo recupero del DNA codificante il frammento anticorpale selezionato, che può essere facilmente sequenziato e mutato allo scopo di migliorare il legame per l'Ag o altre caratteristiche. Per superare alcune limitazioni connesse alla monovalenza delle molecole derivate dagli Ab, i scFv sono stati direttamente cross-legati in formati multimerici (*diabody*, *triabody* o *tetrabody*) o mediante due domini C (*minibody*). L'ingegnerizzazione ha aumentato l'affinità funzionale e l'avidità o anche ampliato la specificità degli Ab ricombinanti, mediante il legame di molecole con la stessa o differente specificità di legame, come nei *diabody* bi-specifici e i Fab, e migliorato le loro caratteristiche fisico-chimiche, come la farmacocinetica, principalmente a causa dell'incremento del peso molecolare.

Le osservazioni che in alcune specie animali (camelidi e squali) e in alcune malattie umane possono essere prodotte catene H o domini V_H o V_L isolati che esibiscono ancora le proprietà di legare l'Ag, hanno portato alla produzione di piccoli frammenti leganti l'Ag, chiamati

Introduzione

domini anticorpali (dAb). Rispetto agli Ab, i dAb, costituiti dai tre CDR capaci ancora di conferire specificità ed elevata affinità di legame con l'Ag, mostrano solitamente proprietà biofisiche favorevoli, quali solubilità e stabilità alla temperatura, e sono stati proposti per scopi terapeutici (257). A causa della frequente tendenza ad aggregare, dei bassi livelli di espressione, della scarsa solubilità e stabilità, si è tentato di rendere i dAb umani e murini simili a quelli dei camelidi, rimpiazzando ad esempio alcuni residui critici con quelli frequentemente trovati nei domini VHH dei cammelli, e estendendo la lunghezza dei *loop* dei loro CDR H₃, per aumentarne stabilità, solubilità ed espressione in cellule di mammifero (258).

Differenti rAb sono stati ulteriormente ingegnerizzati mediante legame ad una vasta gamma di altre molecole, come radionuclidi, farmaci citotossici, tossine, enzimi e liposomi. La coniugazione può comportare importanti funzioni ausiliarie principalmente deputate ad aumentare l'efficacia terapeutica e la distribuzione ottimale nei tessuti bersaglio evitando effetti collaterali indesiderati (259-261). La dimensione inferiore rispetto agli Ab interi può conferire agli rAb alcune rilevanti proprietà, quali riconoscimento come bersaglio di epitopi critici difficili da raggiungere per l'intero Ab, miglior penetrazione nei tessuti con una specifica distribuzione delle molecole terapeutiche, riduzione della vita media *in vivo* quando è essenziale una rapida *clearance*, effettiva espressione intracellulare (come *intrabody*) o facilitata internalizzazione (come *transbody*) per bloccare o modulare la funzione di molecole bersaglio in diversi compartimenti intracellulari (262-264). A causa della mancanza delle porzioni Fc e del relativo riciclo mediato da recettore, nei mammiferi i rAb hanno una emivita in circolo molto breve e sono soggetti a filtrazione renale. Una loro prolungata emivita plasmatica può essere ottenuta mediante pegilazione, coniugazione ad albumina sierica e fusione ad altre regioni Fc o a regioni C complete. Principalmente per la terapia del cancro, la fusione a lipidi o a enzimi può essere usata per dirigere i liposomi trasportanti il farmaco o per attivare pro-farmaci, rispettivamente (265).

Sebbene la maggior parte dei rAb non abbiano la porzione Fc, molte IgG approvate come Ab terapeutici l'hanno conservata e agiscono mediante ADCC e CDC. Così, l'ingegnerizzazione della regione Fc, come ad esempio razionale selezione e mutazione delle Fc da inserire nelle molecole finali, è stata usata per modulare le proprietà farmacocinetiche e le funzioni effettrici degli Ab terapeutici (256, 266). Inoltre, IgG intere non glicosilate della specificità desiderata sono state espresse in *E. coli* legate alla membrana interna, permettendo un'appropriata selezione come Ab "*E-clonali*" (267). Complessivamente, Ab caratterizzati da

elevata specificità e plasticità sono sempre più considerati come agenti terapeutici o prototipi di nuovi farmaci.

Anticorpi come farmaci

L'uso degli Ab come agenti terapeutici risale alla fine del diciannovesimo secolo, quando la somministrazione di siero immune cominciò ad essere usata per proteggere uomo ed animali da una varietà di malattie infettive, come il tetano e la difterite (268, 269). Lo sviluppo degli antibiotici, la difficoltà nella produzione e somministrazione degli Ab e, in particolar modo, i significativi effetti collaterali associati alla sieroterapia, incluse le reazioni allergiche e le malattie da siero, portarono ad abbandonare ampiamente la terapia basata sugli Ab. Tuttavia, Ab policlonali, ottenuti in genere da donatori umani o animali iperimmuni, sono ancora usati in medicina, in particolare per la neutralizzazione di virus e tossine batteriche, per la terapia sostitutiva in pazienti con deficit di Ig, per il trattamento di alcune emergenze mediche, quali avvelenamento da morsi di serpente o punture di ragno ed intossicazione da digossina, digitossina e tossine vegetali, per i quali è assolutamente necessaria una immunoprotezione immediata. Per ridurre al minimo l'antigenicità della regione Fc, gli Ab da animali iperimmuni sono spesso digeriti con proteasi e i Fab purificati usati al posto dell'Ab intero (270).

L'avvento delle tecnologie basate su mAb e rAb ha portato a una rinascita delle terapie basate sugli Ab, per lo più al di fuori del campo delle malattie infettive (271). In particolare, la crescente conoscenza dei principali pathway cellulari nell'induzione e nella progressione dei tumori, nonché in immunologia, ha portato all'approvazione di vari mAb non modificati o ingegnerizzati per il trattamento del cancro, di malattie autoimmuni, di rigetto del trapianto e di altre condizioni cliniche. Nel giugno 1986, la *Food and Drug Administration* (FDA) ha approvato il primo mAb non modificato (Orthoclone OKT3, Muromonab-CD3), una IgG2a murina diretta nei confronti del *cluster* di differenziazione (CD) 3, componente superficiale dei linfociti T umani, come agente immunosoppressivo per la profilassi del rigetto acuto del trapianto d'organo (272).

In seguito, centinaia di mAb e rAb sono stati usati per applicazioni biotecnologiche e biomediche, in particolare rivolte a terapie mirate. Il mercato ora è invaso da numerosi prodotti approvati per uso clinico con un crescente successo economico e molti altri sono attualmente in fase di sviluppo pre-clinico e clinico o sono stati descritti sperimentalmente in letteratura (273-275). Oggi, gli Ab costituiscono la seconda più grande classe di biofarmaci dopo i vaccini ed è stato calcolato che le terapie con Ab potrebbero avere ampia utilità nei confronti di circa 3.200 dei 5.200 potenziali bersagli farmacologici nell'uomo (276).

Introduzione

Attualmente i mAb disponibili sono definiti usando suffissi diversi, come “umab” (mAb umani), “momab” (mAb murini), “ximab” (mAb chimerici) e “zumab” (mAb umanizzati).

Il primo ximAb (ReoPro, Abciximab), che si lega al recettore della glicoproteina IIb/IIIa, è stato approvato nel dicembre 1994 come anticoagulante piastrinico in angioplastica coronarica e, più recentemente, è stato valutato con successo come farmaco trombolitico (277, 278).

Anticorpi antitumorali

Nel 1977, l'approvazione di Rituximab (Rituxan, un mAb IgG1k) ha aperto la strada all'uso degli Ab nella terapia di vari tipi di tumore (279-283). La terapia del cancro mediata da Ab è essenzialmente basata su Ag bersaglio, preferenzialmente espressi sulle cellule maligne, che possono giocare ruoli importanti nella trasduzione del segnale e nel trasporto ionico o come recettori di superficie, in modo da bloccare o sregolare alcuni pathway di sopravvivenza vitali, promuovendo l'apoptosi e mediando risposte ADCC o CDC. Anche altre molecole tumorali, come i fattori angiogenici, possono essere usate come bersaglio.

Differenti CD cellulari sono tra i bersagli preferiti degli Ab terapeutici nelle neoplasie ematologiche. Tra gli Ab approvati, Rituximab ha come bersaglio CD20, una proteina transmembrana che si esprime principalmente sui linfociti pre-B e B maturi, ma anche nella maggior parte dei linfomi non Hodgkin. Alemtuzumab (Campath) ha come bersaglio CD52, un Ag ancorato a glicosilfosfatidilinositolo (GPI) espresso sui linfociti B e T normali e maligni e su alcune cellule epiteliali del tratto genitale maschile, ed è stato approvato nel 2001 per il trattamento della leucemia linfocitica cronica a cellule B (284). Diversi nuovi mAb diretti nei confronti delle cellule linfoidi sono stati sviluppati nei confronti di CD20 e altri CD, come CD2, CD19, CD22, CD23, CD30, CD40, CD74 e CD80, e valutati in studi preclinici e in prove cliniche nei confronti di neoplasie ematologiche che esprimono CD (285-287). Molti dei loro effetti sono dovuti all'induzione di apoptosi nelle cellule maligne bersaglio, a una risposta CDC dipendente da Fc, al coinvolgimento del sistema immunitario cellulare mediante l'interazione del dominio Fc con i recettori Fcγ e conseguente risposta ADCC, nonché all'espressione indotta di chemochine che possono attrarre neutrofili, macrofagi e cellule NK (288). Più recentemente, un nuovo meccanismo di morte cellulare indipendente dal complemento simile all'oncosi, che comporta la perdita di integrità della membrana, è stato dimostrato per un mAb anti-N-glicolil ganglioside (GM3) attivo nei confronti del tumore ma non di cellule normali (289). Altri bersagli riconosciuti della terapia anti-cancro mediata da Ab sono le interazioni tra recettore/fattore di crescita e/o la *down*-regolazione dell'espressione del recettore, come nella terapia dei tumori solidi, quali

quelli della mammella, della testa e collo, colon-rettale, del polmone non a piccole cellule e nei gliomi (290-293). Una modulazione della risposta immunitaria anomala da parte dei mAb terapeutici è stata studiata in molte altre condizioni, come nei disturbi neurologici, nei disturbi clinici mediati da IgE, nelle malattie infiammatorie croniche (Ab anti-TNF- α nell'artrite reumatoide, psoriasi, malattia di Crohn e altri) (294-298).

Per migliorare l'attività terapeutica e superare le resistenze, gli Ab sono stati modificati per veicolare sostanze tossiche o immunomodulanti, ingegnerizzati per legare epitopi multipli (Ab bi-specifici) o anche per acquisire nuove attività catalitiche (abzimi). Alcuni di essi, coniugati con α - o β -radioisotopi, come ^{90}Y -ibritumomab e ^{131}I -tositumomab, sono stati approvati per il trattamento delle neoplasie ematopoietiche recidive o refrattarie, mentre altri sono stati adottati per radioterapia ed *imaging* (299-302). Potenti molecole citotossiche, come la calicheamicina che si lega al solco minore del DNA (Gemtuzumab ozogamicin anti-CD33), tossine batteriche e vegetali (ad esempio, tossina difterica e ricina), fotosensibilizzanti, citochine ed altri agenti antitumorali sono stati coniugati ad Ab specifici per Ag di superficie cellulari associati ai tumori per veicolare i propri composti tossici/modulanti alle cellule tumorali (303-305). La coniugazione potrebbe aumentare gli effetti antitumorali degli Ab e ridurre gli effetti sistemici collaterali dei farmaci citotossici (259). Infine, gli approcci terapeutici sono stati basati sulla concomitante somministrazione di Ab diversi, spesso in associazione con chemioterapici convenzionali (306). L'ampio successo degli Ab terapeutici è dovuto essenzialmente alla loro capacità di interferire con le interazioni recettore-ligando, di veicolare selettivamente un "carico utile", o di modulare l'interazione tra specifiche cellule (215).

Anticorpi antinfettivi

La maggior parte degli Ab terapeutici sono al di fuori del campo delle malattie infettive. Tra i 355 mAb che sono entrati in studi clinici tra il 1980 e la metà del 2005, solo 46 sono rivolti a un agente infettivo. Lo sviluppo di alcuni è stato interrotto, mentre altri sono in diverse fasi di studio clinico (pochi in Fase III). Solo un mAb (Palivizumab, Synagis) è stato brevettato, nel 1998, per l'immunoprofilassi delle infezioni da virus respiratorio sinciziale (RSV) in pazienti pediatrici ad alto rischio, come i neonati ed i prematuri (307, 308). Più recentemente, per migliorare ulteriormente la protezione anti-RSV, sono stati prodotti la seconda (Motavizumab) e terza (Numax-YTE) generazione di Ab, attualmente in fase di studio clinico (309). Pochi altri mAb sono ora in fase di sviluppo pre-clinico e clinico, la maggior parte per la profilassi post-esposizione e per il trattamento di infezioni virali acute e croniche. L'ancora significativa efficacia degli approcci tradizionali, come vaccini e farmaci antinfettivi, la

Introduzione

necessità di somministrazione parenterale e la produzione complicata e costosa, hanno probabilmente contribuito a confinare i mAb in applicazioni di nicchia.

Negli ultimi anni, tuttavia, l'aumento drammatico di nuove malattie virali, di infezioni fungine rischiose per la vita, di minacce bioterroristiche (ad esempio *B. anthracis*) e di infezioni batteriche da ceppi/specie resistenti agli antibiotici (ad esempio, stafilococchi resistenti alla meticillina), ha rinnovato l'interesse nella terapia antinfettiva basata sugli Ab (310, 311). L'immunoterapia basata su Ab, citochine e fattori di crescita potrebbe essere combinata con la convenzionale terapia antibiotica portando ad ipotizzare una terza età della terapia antimicrobica (312). Anche se, concettualmente, gli Ab dovrebbero essere più efficaci se usati come agenti profilattici nei confronti di infezioni virali acute e tossine batteriche, il loro utilizzo combinato con composti terapeutici più convenzionali come terapia adiuvante o la loro coniugazione diretta a farmaci antimicrobici potrebbero aumentarne l'efficacia terapeutica con minori effetti collaterali in molte altre malattie infettive (313, 314). In particolare, le cellule dell'ospite infettate da virus o i microbi stessi possono essere specificamente riconosciuti da Ab armati con diversi agenti citotossici, quali tossine, farmaci o radioisotopi e così, potenzialmente, fornire nuove opzioni per la terapia antinfettiva (315-317). La riconosciuta eziologia infettiva di diversi tumori umani, quali il carcinoma epatocellulare associato al virus dell'epatite B e C ed il cancro cervicale associato al papilloma virus, ha recentemente proposto il loro trattamento con mAb radiomarcanti specificamente diretti nei confronti di antigeni virali espressi sulle cellule del tumore (318, 319).

Sono stati prodotti pochi rAb antinfettivi. Tra questi, Efungumab (Mycograb) è un scFv ricombinante umano anti-proteina da shock termico (Hsp) 90 fungina, che mostra una diretta attività inibente *in vitro* nei confronti di numerose specie di *Candida* e un significativo effetto sinergico *in vitro* con agenti antifungini più convenzionali (amfotericina B) e in studi pre-clinici e clinici anche nei confronti di altri rilevanti agenti patogeni fungini, come *C. neoformans* (320-322). Alla luce dell'emergenza di Hsp90 come bersaglio terapeutico per il trattamento del cancro, Mycograb è entrato in uno studio clinico in combinazione con Docetaxel in pazienti con cancro mammario metastatico o recidivante (323). Aurograb è un rAb umano avente come bersaglio *S. aureus*, compresi ceppi meticillina-resistenti (MRSA) e vancomicina-intermedi (VISA), che sono recentemente emersi come causa di infezioni pericolose per la vita in tutto il mondo. Aurograb è attualmente saggiato in sperimentazioni cliniche, in combinazione con vancomicina per valutare la sua efficacia nei confronti di infezione da MRSA (324).

Altri rAb umani sono stati riportati esplicare attività antifungina. Tra questi, una IgG1 intera ricombinante anti-mannano conferisce resistenza nei confronti di candidosi sperimentale ematogena diffusa nel topo, promuovendo opsonizzazione, fagocitosi ed uccisione delle cellule di *C. albicans* (325). dAb umani che hanno come bersaglio due elementi di virulenza di *C. albicans* rilevanti per l'adesione, una mannoproteina di 65kDa e la aspartil proteinasi-2 secreta, hanno mostrato una spiccata attività protettiva nei confronti di candidosi vaginale sperimentale (326). Un scFv anti-Id KAb ha dimostrato una diretta attività microbica ad ampio spettro *in vitro*, comprendente *Candida* sp., *M. tuberculosis*, cocchi Gram-positivi e Streptococchi orali resistenti agli antibiotici (234, 237-239). KAb scFv anti-Id ha mostrato un significativo effetto terapeutico nei confronti di candidosi vaginale sperimentale sia quando somministrato come molecola solubile sia quando prodotto *in situ* da batteri commensali umani colonizzanti adeguatamente ingegnerizzati (*S. gordonii*) (234, 327).

Anticorpi ingegnerizzati

Gli Ab, specialmente nei loro vari formati ricombinanti, hanno sempre avuto un profondo impatto sul trattamento di alcune condizioni cliniche e possono rappresentare strumenti promettenti per scopi terapeutici nei confronti di molte malattie infettive e non infettive. La ricerca in questo campo, tuttavia, ha evidenziato problematiche relative a tecnologie, immunogenicità, farmacocinetica, distribuzione e tossicità. L'attuale produzione di rAb per la terapia umana viene ottenuta in linee cellulari di mammiferi per garantire le corrette modificazioni post-traduzionali, glicosilazione in particolare, anche se nuove strategie hanno consentito modelli di glicosilazione simili a quelli umani e una più efficiente produzione ad alto livello anche in altri sistemi di espressione (250, 328). Gli Ab, anche di origine umana, umanizzati o privi della regione Fc, possono scatenare una risposta anti-Ab nell'ospite trattato, che può limitare l'efficacia terapeutica; inoltre, essi possono essere eliminati rapidamente dal circolo e presentare una significativa tossicità. Gli effetti collaterali, inoltre, possono essere direttamente collegati al bersaglio molecolare eventualmente presente anche nei tessuti normali, i quali possono essere inibiti o modulati dallo specifico Ab, anche se in molti casi gli effetti indesiderati possono essere attribuiti ad altri agenti chemioterapici somministrati contemporaneamente (329-331).

Gli Ab devono mantenere una struttura tridimensionale per la loro funzione, le loro grandi dimensioni impediscono loro di penetrare facilmente nei tumori solidi e la loro produzione può essere problematica e costosa. Vi sono, tuttavia, diversi esempi di Ab umanizzati caratterizzati da attività sui tumori solidi, ridotta immunogenicità ed aumentata emivita nel siero (332-334). Ab glicovarianti e nuovi *scaffold* proteici sono stati attivamente studiati, in

Introduzione

alternativa agli Ab interi, per migliorare l'attività biologica dell'Ab, semplificarne la produzione, ridurre i costi e conferire nuove proprietà, come ad esempio una maggiore capacità di penetrazione nella massa tumorale (335, 336).

Ci sono quindi molti argomenti convincenti per indagare peptidi sintetici più semplici e stabili per sostituire gli Ab in alcune applicazioni, nonostante tali molecole raramente presentino elevate affinità e specificità tipiche di un buon Ab. Recenti osservazioni sulle attività biologiche di peptidi sintetici derivati da Ab, tuttavia, hanno aperto nuove inaspettate prospettive in questo campo.

Sistemi killer di lievito

Le esotossine (tossine killer, KT) prodotte da lieviti, grazie alla loro notevole attività microbica, sono oggetto di grande interesse quale potenziale fonte di nuovi composti ad attività antimicrobica. Il fenomeno killer può essere definito come la capacità di ceppi di lieviti di produrre KT, verso le quali essi stessi sono immuni, in grado di uccidere altri lieviti o microrganismi sensibili, che presentano specifici recettori parietali (KTR) (337). La produzione di tossine con attività microbica è un fenomeno diffuso in natura e potrebbe rappresentare un modello di competizione biologica paragonabile alla produzione di batteriocine nei batteri (338). Numerose specie di lievito sono in grado di produrre KT e tra di esse *Saccharomyces cerevisiae*, *Ustilago maydis*, *Kluyveromyces lactis* e lieviti del genere *Candida*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Torulopsis* e *Williopsis*, caratterizzate da diversi determinanti genetici, quali RNA a doppio filamento, DNA plasmidico o geni nucleari, acquisiti orizzontalmente o verticalmente (232).

Le KT sono proteine spesso glicosilate, secrete nell'ambiente extracellulare, che possono esplicare diversi meccanismi d'azione nei vari sistemi, quali aumento della permeabilità di membrana agli ioni (*S. cerevisiae*), induzione della rottura endonucleotidica di RNA a singolo filamento e DNA a singolo e doppio filamento (*U. maydis*), inibizione dell'adenilato ciclasi (*K. lactis*), interazione con β -glucani sulla superficie di cellule sensibili (*P. anomala* e *W. mrakii*) (339). Nella maggior parte dei casi il meccanismo di azione delle KT prevede l'interazione con specifici KTR presenti sulla parete cellulare dei lieviti sensibili. Tale struttura varia durante le diverse fasi del ciclo cellulare: mediante microscopia elettronica a scansione, in una cellula adulta allo stato stazionario la parete appare bistratificata, con uno strato più interno trasparente ed amorfo ed uno esterno caratterizzato da fibrille che si dispongono perpendicolarmente alla superficie cellulare. Le fibrille risultano costituite da

mannoproteine, mentre lo strato interno amorfo è prevalentemente costituito da β -glucani spesso complessati a molecole di chitina.

Tra le KT, particolare interesse hanno suscitato quelle prodotte da *P. anomala*, glicoproteine codificate da geni nucleari, per la loro attività microbica ad ampio spettro nei confronti di lieviti, muffe, batteri aerobi e anaerobi, actinomiceti aerobi, lieviti lipofili. Tale KT fu la prima ad essere dimostrata poter esplicare una attività letale nei confronti di microrganismi patogeni eucarioti e procarioti tassonomicamente non correlati (340). Essa sembra interagire con un KTR costituito da β -1,3-glucani, polimeri polisaccaridici parietali coinvolti nella definizione della morfologia e del mantenimento dell'equilibrio osmotico cellulare. Cellule di *C. albicans* in fase germinativa, non ancora rivestite dello strato di mannoproteine, risultano più sensibili a tale KT, rispetto a cellule adulte.

Teoria della vaccinazione anti-idiotipica

L'attività antimicrobica ad ampio spettro delle KT ne aveva suggerito la potenzialità quali nuovi farmaci antibiotici, in alternativa a quelli tradizionali, caratterizzati da una progressiva perdita di efficacia a causa dell'insorgenza di fenomeni di resistenza. Si ritiene, infatti, che i bersagli molecolari di queste tossine siano componenti costitutivi fondamentali, estremamente conservati, delle cellule microbiche. Tuttavia la somministrazione parenterale delle KT quali agenti terapeutici comporta alcuni decisivi svantaggi, in quanto esse sono glicoproteine fortemente antigeniche, tossiche e molto labili in condizioni di temperatura e pH fisiologici. E' stato osservato ad esempio uno scompenso nell'omeostasi e nel bilancio elettrolitico dei fluidi intestinali in ratto dopo perfusione con una KT di *P. anomala* ATCC 96603 (*PaKT*) (341).

Per questi motivi, sarebbe stato utile produrre composti dotati della stessa efficacia e spettro d'azione, ma nello stesso tempo privi di effetti indesiderati. Secondo la teoria del network idiotipico formulata da Jerne nel 1974 (342), nel corso di una risposta immunitaria nei confronti di un Ag vengono prodotti Ab specifici, che a loro volta stimolano la produzione di Ab anti-idiotipici (anti-Id), che possono rappresentare l'immagine interna dell'Ag. Anche se l'Ab anti-Id deve essere considerato non tanto l'esatta riproduzione topologica della struttura antigenica, bensì una sua riproduzione funzionale, vi sono dati cristallografici che evidenziano come un certo Ab possa interagire con il proprio Ag e con il corrispondente Ab anti-Id mediante gli stessi residui amminoacidici (342). Per questo Ab anti-Id possono essere considerati immagine interna dell'Ag stesso ed essere direttamente utilizzati come vaccini o a volte essere in grado anche di mimare l'attività biologica dell'Ag. Vaccini anti-Id possono

Introduzione

anche rappresentare un approccio alternativo alle tradizionali terapie anti-cancro, in quanto possono essere prodotti come immagine interna di Ag superficiali presenti nei tumori e stimolare risposte anti-tumorali specifiche (343, 344).

Attraverso l'approccio del network idiotipico è stato possibile riprodurre l'attività antimicrobica di *PaKT*, come schematizzato in **Figura 12**.

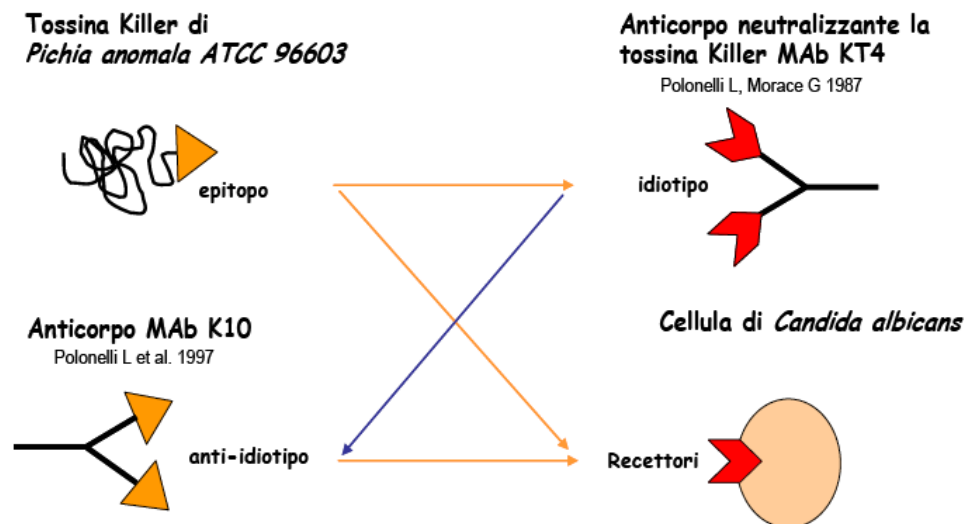


Figura 12. Schema della teoria del network idiotipico applicato al sistema della tossina killer di *Pichia anomala* ATCC 96603.

Estratti crudi di *PaKT* sono stati utilizzati per immunizzare topi, per produrre mAb che reagissero in maniera specifica con la tossina. Tra questi, è stata isolata una IgG1, mAb KT4, in grado di neutralizzare l'attività antimicrobica di *PaKT*, mimando in qualche modo il legame della tossina stessa al *PaKTR* parietale dei microrganismi sensibili. Si poteva perciò considerare mAb KT4 come l'immagine interna del recettore, essenzialmente costituito da β -1,3-D-glucano, e quindi potenzialmente utilizzabile come vaccino Id.

Analogamente Ab anti-Id avrebbero potuto mimare *PaKT*, comportandosi da Ab killer caratterizzati da attività antibiotica (antibiocorpi). Studi di immunizzazione con mAb KT4 in conigli e topi hanno dimostrato l'effettiva capacità di stimolare la produzione di Ab anti-Id *PaKT*-simili (*PaKTA*b) in grado di conferire una protezione ad ampio spettro nei confronti di diversi microrganismi (345-347). Tali Ab policlonali, quando usati come sonda immunologica, mostrano una differenziale reattività in immunofluorescenza con cellule di *C. albicans* e di mammifero. Gli specifici KTR si trovano esclusivamente sulla superficie

delle cellule microbiche e sono preferenzialmente localizzati sui tubuli germinativi e sulle cicatrici di *budding*, dove i β -1,3-D-glucani sono ancora esposti sulla superficie prima di essere rivestiti dallo strato più esterno di mannoproteine (**Figura 13**). Inoltre, i *PaK*TAbs esibiscono attività fungicida nei confronti di cellule di *C. albicans*, costituendo la prima dimostrazione che gli Ab possono uccidere direttamente un microrganismo in assenza di complemento o cellule effettrici.

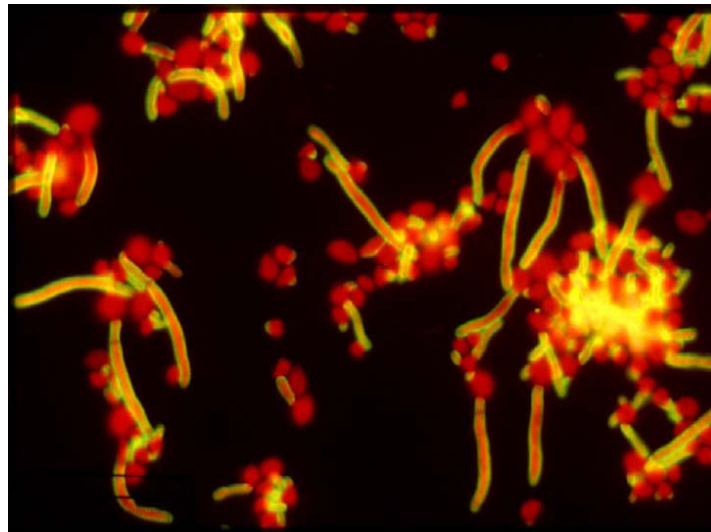


Figura 13. Studi di immunofluorescenza con anticorpi su cellule di *C. albicans*. La figura mostra il legame di mAb K10 biotinilato ai recettori presenti lungo i filamenti delle cellule di *C. albicans* in fase di germinazione. Lo stesso risultato è stato ottenuto utilizzando un Ab ricombinante (scFv H6). Il segnale è stato rilevato mediante una sonda di streptavidina complessata alla fluoresceina (348).

Attraverso il network idiotipico poteva essere ipotizzato un duplice approccio antinfettivo, basato sulla possibilità di mimare *PaKT* o *PaKTR*, rispettivamente: una terapia anti-Id, somministrando *PaK*TAbs direttamente in animali infettati, ed una vaccinazione Id, immunizzando con mAb KT4 per ottenere la produzione *in vivo* di *PaK*TAbs in grado di proteggere l'animale da infezioni sperimentali (232). È stato dimostrato che l'immunizzazione parenterale con mAb KT4 protegge ratti da candidosi sistemica sperimentale rispetto ad animali di controllo infettati e non immunizzati. Analogamente, Ab anti-Id prodotti in seguito ad immunizzazione intravaginale con mAb KT4, sono in grado di proteggere ratte da candidosi vaginale sperimentale. Significativamente, i fluidi vaginali di tali ratte, contenenti IgA secretorie *PaK*TAbs, sono in grado di conferire protezione passiva nei confronti di contro candidosi vaginale, quando somministrati ad animali naïve.

Introduzione

La somministrazione intravaginale e intragastrica di ceppi sensibili a *PaKT* in ratti immunizzati per via intravaginale con mAb KT4, produce in modo significativo un effetto *booster* nella produzione di *PaKTA*b. Così, il sistema immunitario riconosce l'Id di mAb KT4 come *PaKTR* (233). Coerentemente, l'immunizzazione di topi con cellule di *C. albicans* trattate con ditiotreitolo (DTT) e proteinasi K prolunga la sopravvivenza e previene l'invasione renale rispetto a immunizzazioni con cellule di lievito non trattate. Solo cellule di *C. albicans* prive di mannoproteine di superficie e che espongono β -1,3-D-glucano (*PaKTR*) sono risultate protettive (242).

Queste osservazioni hanno portato alla produzione di un vaccino antimicotico "universale" basato su β -1,3-D-glucano. La laminarina (Lam), un β -1,3-D-glucano solubile derivato da un'alga, è stata selezionata per dimostrare il potenziale transfiletico di un vaccino in grado di stimolare la produzione di Ab diretti nei confronti di un componente della parete cellulare immutabile e critico per la vitalità, condiviso da tutti gli agenti patogeni fungini. La vaccinazione con Lam coniugata con un tossoide difterico (CRM) ha indotto una significativa protezione anti-*Candida* mediata da Ab in un modello murino sperimentale di infezione disseminata. Specifici Ab anti- β -glucano conferiscono una protezione passiva a topi naïve nei confronti di candidosi disseminata. Ab prodotti in seguito a vaccinazione intravaginale in ratte con il coniugato Lam-CRM hanno notevolmente accelerato la risoluzione di una infezione vaginale con *C. albicans*. Ab anti β -glucano sono coinvolti nell'immunoprotezione e hanno conferito una protezione passiva quando trasferita in topi naïve nei confronti di candidosi vaginale, paragonabile all'effetto terapeutico esercitato, nelle stesse condizioni sperimentali, da fluconazolo. *In vitro*, la crescita di *C. albicans* e *A. fumigatus* è stata significativamente ridotta dagli Ab anti- β -1,3-D-glucano, e la vaccinazione Lam-CRM ha significativamente prolungato la sopravvivenza di topi sperimentalmente infettati per via sistemica con *A. fumigatus* (243). Un mAb specifico per β -1,3-D-glucano inibisce la crescita e la formazione della capsula in differenti ceppi di *C. neoformans* (244).

Un corollario intrigante del fenomeno idiotipico killer di *P. anomala* era l'esistenza di Ab naturali umani simili a *PaKT*. *PaKTA*b specifici per *PaKTR* dovrebbero essere prodotti, tra gli altri, negli individui infettati da microrganismi sensibili a *PaKT*. In effetti, nelle secrezioni vaginali di donne con candidosi vaginale o colonizzate da *Candida* sp. è stata rilevata la presenza di *PaKTA*b, in grado di proteggere ratte mediante trasferimento passivo da candidosi vaginale sperimentale. Questa è stata la prima dimostrazione che Ab naturali umani anti-KTR possono svolgere un ruolo nella difesa immunitaria antinfettiva (233).

È stato inoltre osservato che questi Ab anti-Id hanno attività microbica anche su microrganismi diversi e non correlati a *C. albicans*, come ad esempio *Pneumocystis carinii*, agente opportunistico in AIDS (349), e un ceppo multiresistente di *M. tuberculosis*, superando così lo spettro di attività di farmaci antibatterici convenzionali (237).

Anticorpi monoclonali e ricombinanti microbicidi

Al fine di ottenere una illimitata disponibilità e un'assoluta riproducibilità dei reagenti, i PaKTAbs sono stati prodotti in formato monoclonale (PaKTmAb) e ricombinante a singolo filamento (PaKTscFv), utilizzando le metodologie disponibili degli ibridomi e del *phage display*, rispettivamente.

Sono stati così ottenuti mAb K10 (una IgM, P.M. 960 KDa) e scFv H6 (P.M. 27 KDa), quest'ultimo costituito da V_H e V_L legate da un peptide *linker* sintetico di 15 amminoacidi in grado di conferire la flessibilità necessaria per una conformazione biologicamente attiva. Come mostrato in **Figura 14**, la libreria anticorpale fagica, ottenuta esprimendo scFv sulla superficie di singole particelle fagiche, è stata sottoposta a ripetute selezioni nei confronti di mAb KT4, verificando la specificità di legame mediante saggi ELISA. Ciò ha consentito l'isolamento di scFv H6 per la sua elevata attività anti-*Candida* sia *in vitro* sia *in vivo*.

Come PaKT, i PaKTAbs nei diversi formati hanno mostrato un'attività microbica ad ampio spettro, anche quando privi della regione Fc. PaKTmAb e PaKTscFv proteggevano ratte nei confronti di candidosi vaginale sperimentale e l'effetto terapeutico era superiore a quello del fluconazolo nelle stesse condizioni sperimentali (234). PaKTmAb inibisce *in vitro* la germinazione conidiale di *A. fumigatus* e si è dimostrato terapeutico in un modello murino di aspergillosi invasiva (240). Un aerosol di PaKTmAb protegge ratti da pneumocistosi sperimentale con una attività terapeutica simile, nelle stesse condizioni sperimentali, a quella di pentamidina, un farmaco convenzionale anti-*Pneumocystis* (349).

PaKTmAb e PaKTscFv hanno mostrato notevole attività *in vitro* nei confronti di *S. mutans* e in un modello *ex vivo*, realizzato per indagare le potenzialità di farmaci di inibire formazione o riproduzione di placca dentale in condizioni controllate (239).

PaKTscFv è stato inoltre impiegato per lo sviluppo di nuove strategie di somministrazione di farmaci a livello delle mucose, mediante espressione come prodotto di fusione sulla superficie del batterio commensale *S. gordonii*, generalmente riconosciuto come sicuro e colonizzante le mucose. Cellule di *S. gordonii* ricombinanti che esprimono PaKTscFv sulla superficie hanno mostrato attività *in vitro* nei confronti di *C. albicans*. I surnatanti di *S. gordonii* secernenti PaKTscFv hanno mostrato *in vitro* una attività candidacida significativamente inibita da mAb KT4. Tutti i ceppi di *S. gordonii* ricombinanti, in particolare quelli secernenti PaKTscFv,

Introduzione

sono stati in grado di colonizzare la mucosa vaginale di ratte e di esercitare un'attività protettiva nei confronti di candidosi vaginale sperimentale, anche superiore a quella terapeutica del fluconazolo. Questo tipo di approccio risulta molto promettente, dato che permette di superare l'ostacolo del pH particolarmente acido di questo distretto, aumentando la biodisponibilità del farmaco nelle mucose (327).

Si può, quindi, affermare che mAb e rAb rappresentano l'immagine interna di *PaKT*, conservandone le caratteristiche funzionali, in quanto riconoscono lo stesso recettore sulla parete cellulare di *C. albicans*, esercitando un analogo effetto antimicrobico.

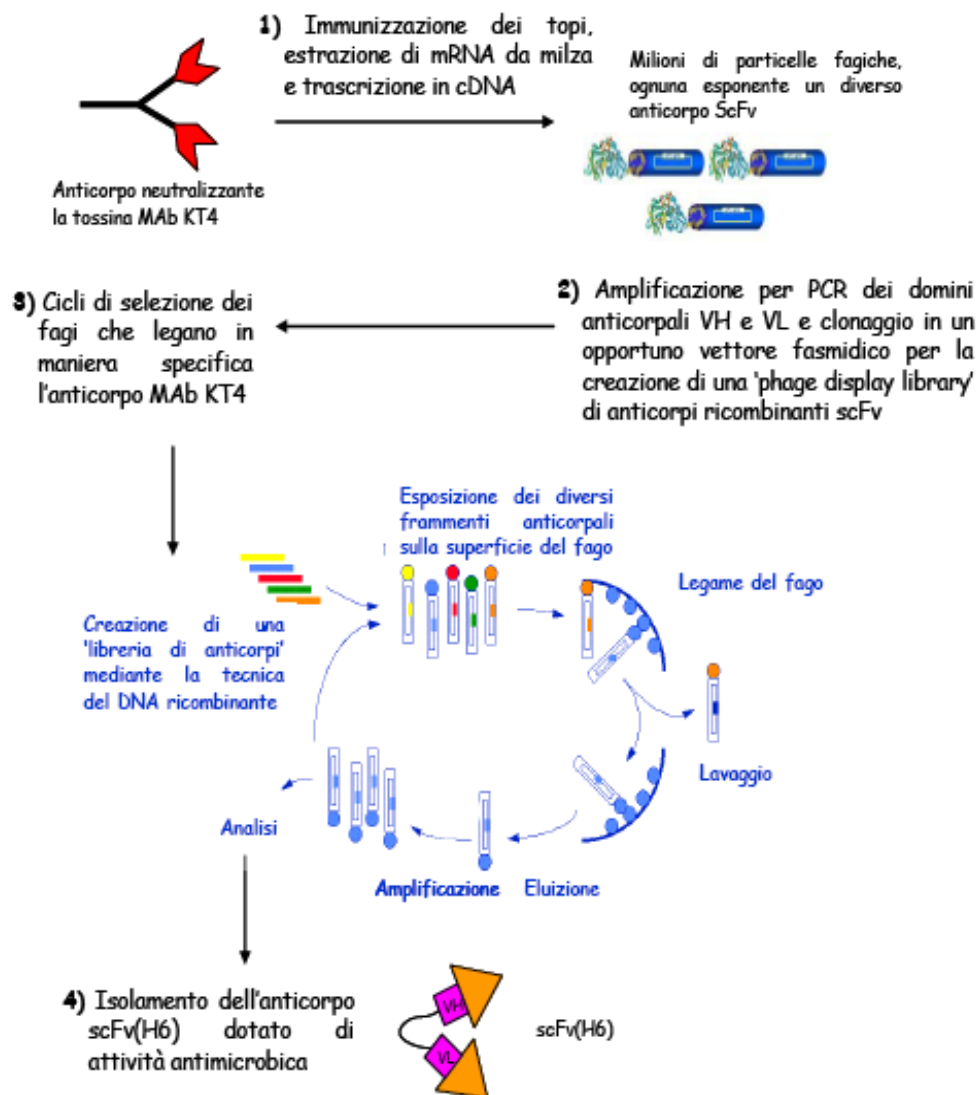


Figura 14. Schema dell'ottenimento dell'anticorpo anti-idiotipico ricombinante scFv H6.

Peptidi antimicrobici, antivirali, antitumorali derivati da anticorpi

Nel tentativo di ridurre ulteriormente la dimensione degli Ab, sono stati prodotti Ab a singolo dominio, costituiti da un dominio V_H , in grado di mantenere la capacità di legame per l'Ag, sebbene spesso scarsamente solubili e difficili da ottenere. La caratterizzazione di Ab naturali contenenti solo catene H, come i VHH nei camelidi e i nuovi recettori per l'Ag (IgNAR) negli squali, ha permesso di avere una visione critica della base strutturale della loro stabilità, solubilità e possibilità di ingegnerizzazione di versioni autonome di tradizionali domini V_H con proprietà biofisiche favorevoli. Anche se le sei sequenze CDR di un Ab agiscono in modo cooperativo nel riconoscimento di un Ag, CDR H_3 è emersa come la regione più diversificata in lunghezza e sequenza e sembra svolgere un ruolo prevalente nel legame con l'Ag, contribuendo alla maggior parte dei contatti superficiali con l'Ag (350). Sulla base della constatazione che la specificità dell'Ab è determinata da un numero limitato di residui (351), sono stati sintetizzati piccoli peptidi derivati dalle sequenze di CDR H_3 , in grado non solo di mantenere la capacità di legare l'Ag, ma anche di mostrare attività biologiche analoghe agli Ab. Alcuni di loro ("microAb"), provenienti da mAb neutralizzanti, hanno mostrato di neutralizzare *in vitro* la replicazione di HIV-1 o *in vivo* l'infezione da RSV (352-354). Un peptide tirosin-solfato è stato in grado di legare la glicoproteina virale gp120 ed inibire l'infezione da HIV-1 (355). Peptidi di derivazione anticorpale hanno mostrato di poter esplicare attività antitumorale *in vitro* e *in vivo*, come nel caso di un piccolo peptide esociclico mimetico anti-recettore 2 del fattore di crescita epidermico umano (HER2/neu), razionalmente progettato e funzionalmente simile a un mAb anti-HER2/neu, e nel caso delle "feromonicine", proteine di fusione costituite da piccoli mimetici anticorpali (CDR H_1 e L_3 collegati da V_H FR₂, tutti derivati da uno specifico mAb) fusi alla colicina batterica Ia (356). Questi peptidi riescono a penetrare nei tessuti tumorali meglio degli Ab parentali (357). È interessante notare che peptidi CDR H_3 , isolati da librerie fagiche mediante selezione con un Ab umano anti-emoagglutinina influenzale (HA), hanno mostrato omologia di sequenza con HA (358). Rispetto ai peptidi corrispondenti ai CDR H_3 , si hanno minori conoscenze sulle attività biologiche di altri CDR e sequenze cornici saggiati come peptidi isolati. Effetti clinici e meccanismo d'azione di un peptide (hCDR1), basato sulla sequenza del CDR₁ di un mAb umano anti-DNA sono stati recentemente riportati (359). hCDR1 è stato suggerito come un potenziale candidato per il trattamento specifico del lupus eritematoso sistemico, una malattia autoimmune caratterizzata dalla produzione di Ab nei confronti di Ag nucleari con danni multi-organo. La *up*-regolazione di linfociti T regolatori CD4⁺CD25⁺, associata ad una ridotta secrezione di IFN- γ proinfiammatorio, a un'aumentata espressione del fattore di crescita

Introduzione

trasformante-beta (TGF- β), una citochina immunosoppressiva, e ad una riduzione dell'apoptosi, sembra contribuire agli effetti benefici del trattamento con hCDR1 (359). In realtà, hCDR1 *down*-regola la fosforilazione di Akt, con conseguente *up*-regolazione dei fattori di crescita dei linfociti T Egr-2 e Egr-3, e inibizione della secrezione di IFN- γ che è necessario per il mantenimento del lupus eritematoso sistemico (360).

Le numerose modalità di ottenimento di frammenti e peptidi anticorpali fino ad oggi descritte sono schematicamente riassunte in **Figura 15**.

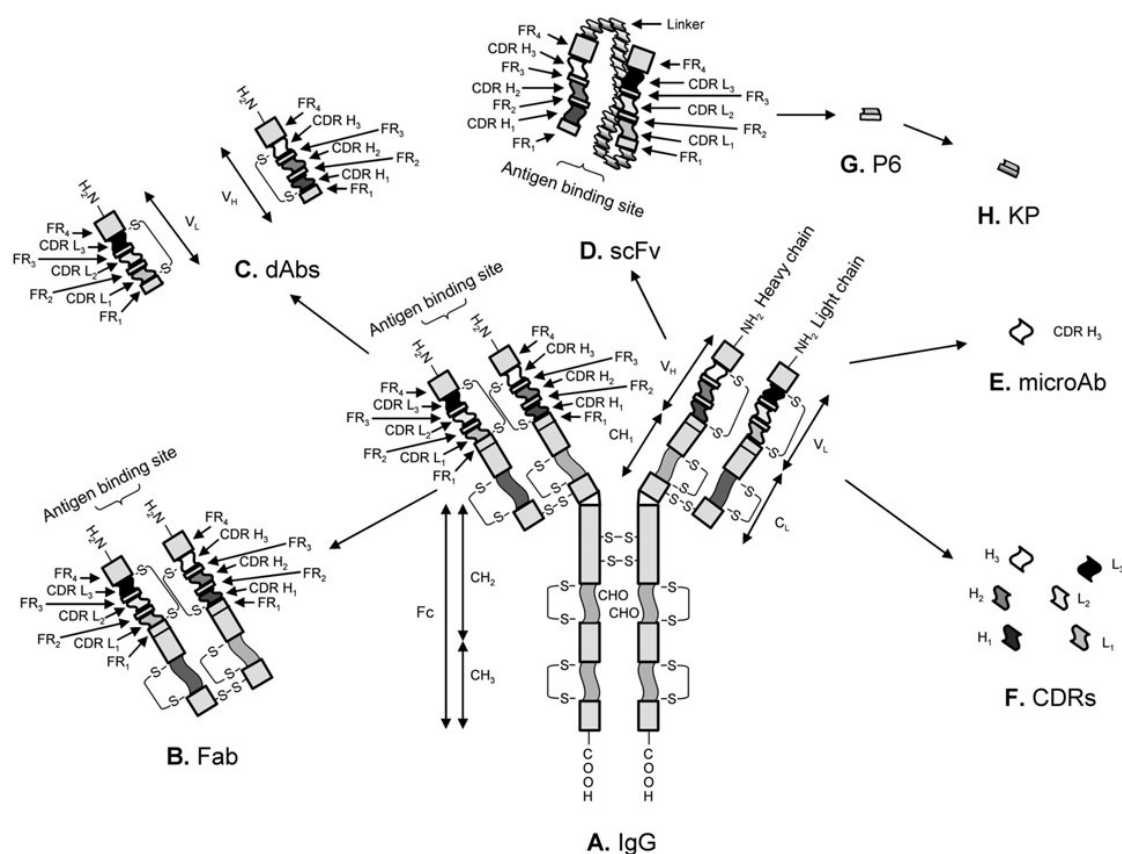


Figura 15. Rappresentazione schematica di una IgG intera monomerica e di alcuni costrutti bioattivi derivati dagli Ab. **(A)** IgG: regioni variabili (V_H, V_L), che conferiscono specificità di legame per l'Ag. C_L, C_H: domini costanti; CDR (1, 2 e 3): domini ipervariabili, chiamati anche regioni determinanti la complementarità; S-S: ponti disolfuro; Fc: frammento cristallizzabile; CHO: glicani legati a Fc. **(B)** Fab: frammento legante l'Ag (~57 kDa), formato dalla catena L e dai primi due domini della catena H. **(C)** dAb: singolo dominio anticorpale (~11-15 kDa), formato da V_H o V_L isolati di un Ab. **(D)** scFv: frammento variabile a singolo filamento (~27 kDa), costituito da V_H fuso a V_L grazie a un *linker* polipeptidico flessibile. **(E)** microAb, formati da peptidi derivati da CDR H₃. **(F)** Peptidi CDR, peptidi sintetici rappresentanti ciascun CDR. **(G)** P6 (EKVTMTCSAS), peptide sintetico contenente i primi tre amminoacidi del CDR L₁ (SAS) di un scFv killer. **(H)** KP (AKVTMTCSAS), peptide killer, ottimizzato mediante *alanine scanning* da P6 (361).

Peptide killer multifunzionale derivato da scFv H6

Nel tentativo di stabilire la possibile correlazione tra la sequenza amminoacidica di un KAb anti-Id ricombinante (scFv H6) e la sua attività candidacida, i peptidi corrispondenti ai 6 CDR e più di 200 decapeptidi parzialmente sovrapponibili, rappresentanti l'intera regione V, sono stati sintetizzati e saggiati *in vitro* nei confronti di *C. albicans*, selezionato come microrganismo modello sensibile (234). Tutti i peptidi corrispondenti ai CDR hanno mostrato attività candidacida e, tra questi, CDR H₃ si è dimostrato il più attivo su base molare e grazie a saggi di *alanine (A) scanning* si è riusciti a migliorarne l'attività. Un decapeptide, denominato P6 (EKVTMTCSAS), comprendente in posizione C-terminale i primi tre amminoacidi del CDR L₁ (SAS), ha dimostrato la più elevata attività candidacida. L'ottimizzazione attraverso *alanine scanning* ha consentito di ottenere il peptide killer KP (AKVTMTCSAS, PM: 998,2 Da), con una A al posto dell'acido glutammico (E) in posizione 1 N-terminale ed un punto isoelettrico (PI) pari 8,2 (362). KP, a concentrazioni micromolari, ha mostrato un significativo aumento dell'attività candidacida, che poteva essere inibita da β -1,3-D-glucano in modo dose-dipendente. La capacità di KP di interferire con KAb nel legame a cellule di *C. albicans* germinanti ha confermato le precedenti osservazioni, secondo cui l'attività di PaKT e dei suoi derivati immunologici dipende dall'interazione con PaKTR. La presenza dei tre amminoacidi C-terminali del CDR L₁ è critica, come attestato dalla notevole perdita di attività indotta dalla loro rimozione dal peptide.

L'ampio spettro di attività antimicrobica e le addizionali proprietà biologiche di KP sono state oggetto di recenti review (231, 241, 348, 363-365). KP rappresenta il primo peptide ingegnerizzato che mantiene l'attività microbica dell'Ab nativo attraverso interazioni con specifici recettori sulle cellule microbiche bersaglio. Studi *in vitro* di *time-killing* hanno dimostrato che KP presenta una rapida attività candidacida e, in esperimenti *in vivo*, un significativo effetto terapeutico nei confronti di candidosi sperimentale vaginale in ratte e sistemica in topo causate da ceppi di *C. albicans* sensibili o resistenti al fluconazolo. L'effetto terapeutico esercitato in animali normalmente immunocompetenti o con immunodeficienza combinata grave (SCID) ha suggerito che KP non sembra richiedere alcuna partecipazione determinante dell'immunità adattativa dell'ospite. KP ha dimostrato una potente attività microbica *in vitro* nei confronti di alcuni patogeni fungini, tra cui *C. albicans*, anche aderente come biofilm sulla superficie di dischi di resina acrilica usati per protesi dentarie, *C. neoformans*, causa di infezioni gravi in individui immunocompromessi, e *Paracoccidioides brasiliensis*, agente della micosi sistemica prevalente in Sud America, così come nei confronti di un gran numero di isolati orali di *Candida* sp., a prescindere dalla loro eventuale resistenza

Introduzione

ad agenti antifungini convenzionali (234). Inoltre, KP ha mostrato una significativa attività anti-batterica *in vitro* ad ampio spettro, anche nei confronti di ceppi multiresistenti, e una attività di *killing* nei confronti di rilevanti patogeni protozoari, quali *Leishmania major*, *L. infantum* e *Acanthamoeba castellanii* (348, 366, 367). I dati *in vitro* sono stati confermati dai risultati *in vivo*, in cui KP ha mostrato un potente effetto terapeutico, in animali normali o immunocompromessi, nei confronti di tutte le infezioni sperimentali saggiate finora, quali candidosi vaginale e sistemica, criptococcosi disseminata e paracoccidioidomicosi (234, 368, 369). KP sintetico esibisce attività antimicrobica *in vitro* anche nei confronti di rilevanti agenti fitopatogeni batterici (*P. syringae* e *Erwinia carotovora*) e fungini (*Botrytis cinerea* e *Fusarium oxysporum*). L'espressione di KP in *Nicotiana benthamiana*, utilizzando un vettore derivato dal virus X della patata, ha prodotto particelle virali chimeriche che presentavano una forma attiva del peptide, in grado di esplicare una attività antimicrobica *in vitro* nei confronti degli stessi fitopatogeni, così come di patogeni umani (*S. aureus* e *C. albicans*). Piante esprimenti KP hanno mostrato una maggiore resistenza ad infezioni sperimentali con *P. syringae* pv. *tabaci* (370).

KP ha mostrato attività antivirale nei confronti di due rilevanti agenti virali quali HIV-1 e virus influenzale A. In modelli *in vitro* ed *ex vivo* di infezioni esogene ed endogene da HIV-1, KP ha inibito, a concentrazioni micromolari, la replicazione virale di un ceppo linfocitotropico X4 ed uno monocitotropico R5 in cellule mononucleate di sangue periferico (PBMC) con un'attività maggiore rispetto a zidovudina. Sulla base della similarità di sequenza con diversi segmenti nella poliproteina dell'*envelope* gp160 di HIV-1, nota per contribuire al legame con CD4 e alla scelta dei corecettori CCR, KP induce una *down-regolazione* dell'espressione di CCR5 sulla superficie cellulare. Così l'attività anti-HIV-1 da parte di KP sembra essere mediata dalla *down-regolazione* e/o dal blocco sterico dell'interazione gp120-corecettori (371).

Nel caso del virus influenzale A, KP è stato in grado di inibire la replicazione di diversi ceppi, due dei quali aviari (H7N1 e H7N3) e due umani (un ceppo H1N1 neurotropo umano adattato al topo ed un isolato clinico H3N2 amantadina-resistente). KP ha inibito la fase tardiva della moltiplicazione virale, mediante riduzione delle proteine tardive, incluse le loro forme glicosilate ed, in particolare, le proteine di membrana M1 e HA. A causa del loro fondamentale ruolo nella moltiplicazione virale, la mancanza di queste proteine potrebbe essere la principale causa dell'inibizione della produzione di particelle virali mature. Il trattamento con KP di topi sperimentalmente infettati migliora notevolmente la sopravvivenza e diminuisce in modo significativo i titoli virali polmonari, senza alcun apparente effetto

tossico, in modo simile a quanto osservato nelle stesse condizioni sperimentali con amantadina, un ben noto agente antivirale (372). Al contrario, KP non ha mostrato nessuna attività antivirale *in vitro* nei confronti di molti altri virus a DNA e RNA (371).

Oltre all'attività antimicrobica e antivirale, KP ha mostrato di possedere proprietà immunomodulanti. Valutando l'interazione con le diverse popolazioni di cellule immunitarie murine, KP ha mostrato di legarsi selettivamente a DC e, in misura minore, ai macrofagi. Il legame è mediato da specifici recettori della superficie cellulare, come il complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) di classe II, CD16/32, e i recettori Sign-R1 (*Specific ICAM-3 Grabbing Non-Integrin*). Il trattamento con KP produce cambiamenti fenotipici e funzionali sulle DC, come aumentata espressione di CD8- α , CD80, CD40, e ridotta espressione di CD86 e MHC-I e II. Ciò potrebbe migliorare la loro capacità di attivare e/o modulare reattività e proliferazione dei linfociti T, contribuendo probabilmente all'effetto terapeutico di KP in modelli sperimentali di infezione, col risultato di suscitare una risposta immunitaria antimicrobica cellulo-mediata ottimale (373).

Nel complesso, KP sembra essere il primo peptide derivato da un Ab anti-Id caratterizzato da effetti immunomodulatori così come da attività inibenti *in vitro* e terapeutiche *in vivo* nei confronti di microrganismi patogeni eucariotici e procariotici, HIV-1 e virus influenzale A, mediate da differenti meccanismi d'azione. Le attività antimicrobiche e antivirali sono indipendenti dai meccanismi di resistenza ad altri agenti antinfettivi convenzionali. KP ha dimostrato di essere fungicida *in vitro* nei confronti di tutti i mutanti genici dell'intera collezione di ceppi deleti di *S. cerevisiae* (Euroscarf, Francoforte, Germania), compresi i ceppi resistenti ai tradizionali farmaci antifungini, quali caspofungina e fluconazolo, avvalorando così la non vitalità di mutanti resistenti a KP (374).

Sebbene il preciso meccanismo antimicrobico non sia stato ancora identificato, KP è in grado di causare in cellule di *C. albicans* importanti alterazioni (rigonfiamento della parete cellulare, collasso della membrana plasmatica, condensazione e frammentazione del materiale nucleare), simili a quelle osservate con agenti apoptotici classici, come l'acido acetico, come mostrato in **Figura 16**. Studi preliminari, effettuati con mutanti di *C. albicans* e DNA microarray, hanno dimostrato che la risposta allo stress ossidativo e il trasporto ionico all'interno della cellula di lievito possono essere coinvolti nel meccanismo d'azione di KP (348). KP e P6, sintetizzati utilizzando gli stessi residui amminoacidici in forma D, piuttosto che in conformazione L, conservavano ancora l'attività candidacida *in vitro* (362, 369).

KP è in grado di dimerizzare attraverso la formazione di un ponte disolfuro e tale caratteristica potrebbe supportare le sue caratteristiche fisico-chimiche e l'attività biologica.

Introduzione

KP in forma liofilizzata è molto stabile e solubile in acqua e la dimerizzazione, in condizioni non riducenti, non pregiudica l'attività candidacida, come attesta la maggiore attività *in vitro* di KP sintetizzato in forma dimerica (375).



Figura 16. Effetti citotossici di KP su cellule di *C. albicans*, evidenziati mediante microscopia elettronica a trasmissione (TEM). Le cellule di lievito sono state trattate con KP (sinistra) o con un peptide *scramble*, non attivo (SP, destra). Le principali alterazioni osservate sono state rigonfiamento della parete cellulare con uno strato centrale elettrondenso, collasso della membrana plasmatica, condensazione cromatinica e frammentazione nucleare. Le cellule trattate con SP sono risultate identiche a cellule di controllo non trattate (non mostrate) (348).

Nell'ingegnerizzazione di KP, la sostituzione con alanina dell'acido glutammico in posizione N-terminale, massimizza l'attività del peptide, probabilmente in seguito al fatto che il vicino residuo di lisina (K) resta libero per l'interazione all'interno della forma dimerica. Come valutato con il programma BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), la sequenza di P6 sembra essere sorprendentemente diffusa nelle catene κ di Ig con diverse specificità. Sequenze simili, localizzate nella stessa posizione e contenenti i primi 3 amminoacidi del CDR L₁, sono presenti in molti altri Ab umani, bovini, di topo, coniglio e ratto. Pertanto, apparentemente, si tratta di una sequenza abbastanza conservata presente nelle famiglie di catene κ indipendentemente dalla specificità dell'Ab. Come tutte le sequenze cornice, P6, e di conseguenza KP, dovrebbero strutturarsi in una configurazione β ; in **Figura 17** vengono mostrati un modello delle loro strutture in configurazione β , con localizzazione polarizzata dei residui di serina/treonina (S/T), e le potenziali sostituzioni amminoacidiche rilevate in simili peptidi anticorpali di diverse specie animali. Tutti questi peptidi mantengono la stessa

distribuzione di amminoacidi idrossilati intercalati da residui idrofobici, con una localizzazione di tutti gli amminoacidi idrossilati su un lato e degli amminoacidi più idrofobici sul lato opposto.

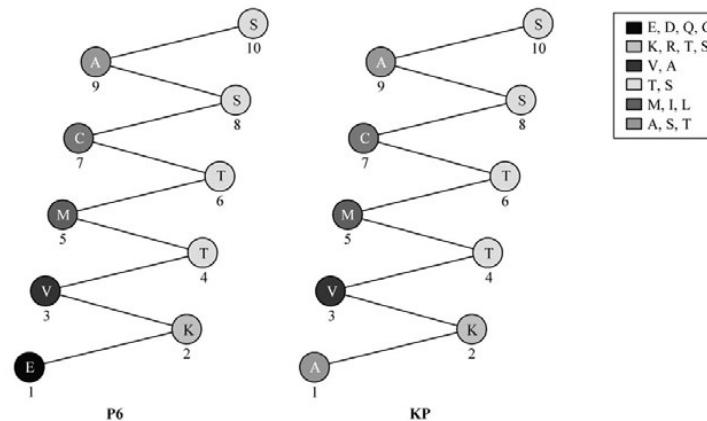


Figura 17. Distribuzione degli amminoacidi nei decapeptidi P6 e KP in configurazione β e localizzazione polarizzata dei residui di serina/treonina (S/T). All'interno del riquadro in alto a destra sono mostrate le più comuni sostituzioni amminoacidiche, rispetto a P6, rilevate in 125 analoghi peptidici di derivazione anticorpale provenienti da differenti specie animali, che mantengono la stessa distribuzione di amminoacidi idrossilati (361).

KP è stato ipotizzato interagire preferenzialmente con laminarina, un β -1,3-D-glucano con struttura lineare poco ramificata. I β -1,3-D-glucani si aggregano attraverso la formazione di numerosi legami idrogeno tra i gruppi idrossilici (OH) di molecole vicine, così da eliminare acqua e risultare insolubili. In **Figura 18** è raffigurata una teorica, ma plausibile interazione tra KP e β -1,3-D-glucano, attraverso la formazione di legami idrogeno che coinvolgono gruppi OH. Il legame di KP a una struttura ripiegata, come il postulano, un β -1,6-glucano solubile che forma strutture piuttosto ramificate, comporterebbe un minor numero di legami idrogeno, spiegando così la maggiore affinità di KP per laminarina. La facile dimerizzazione di KP attraverso legami S-S duplicherebbe la struttura β aumentando il numero di legami idrogeno condivisi dal peptide e dai gruppi OH del β -glucano. I dimeri di KP mostrano la capacità di interagire con altri dimeri di KP e di auto-aggregarsi spontaneamente, a seconda della concentrazione, per formare una struttura reversibile simile a idrogel, un processo catalizzato da β -1,3-D-glucani solubili o esposti sulla superficie di cellule di *C. albicans* (375). Quando KP si aggrega, lo strato più esterno diventa più labile ed i peptidi possono

Introduzione

staccarsi come conseguenza dell'idratazione. La formazione dell'idrogel provvede a fornire protezione contro le proteasi e ad assicurare un lento rilascio del peptide attivo nel tempo.

Il motivo per cui il legame di KP con un glucano superficiale parietale possa causare un tale effetto devastante nella cellula bersaglio, non è conosciuto. Interazioni di KP con altri ligandi tra cui proteine/peptidi, come le proteine accessorie necessarie per la sintesi di β -1,3-D-glucano, non possono essere escluse. Nella parete cellulare di lieviti, i β -1,3-D-glucani sono attaccati attraverso ponti di β -1,6-glucani a proteine tronche ancorate a GPI e a molte altre proteine, come adesine, che si muovono verso la superficie cellulare attaccate a β -1,3-D-glucano (376). Il legame a β -1,3-D-glucano può attivare la produzione di specie reattive dell'ossigeno, come il perossido d'idrogeno, iniziando una cascata che porta ad effetti apoptotici. Sulla base di questo modello, KP potrebbe interagire con una serie di strutture polisaccaridiche, compresi α -1,3-glucani lineari, che potrebbero fornire abbastanza gruppi OH reattivi per l'interazione con le unità S/T della conformazione β del peptide. Questo potrebbe almeno in parte spiegare l'ampio spettro di attività di KP.

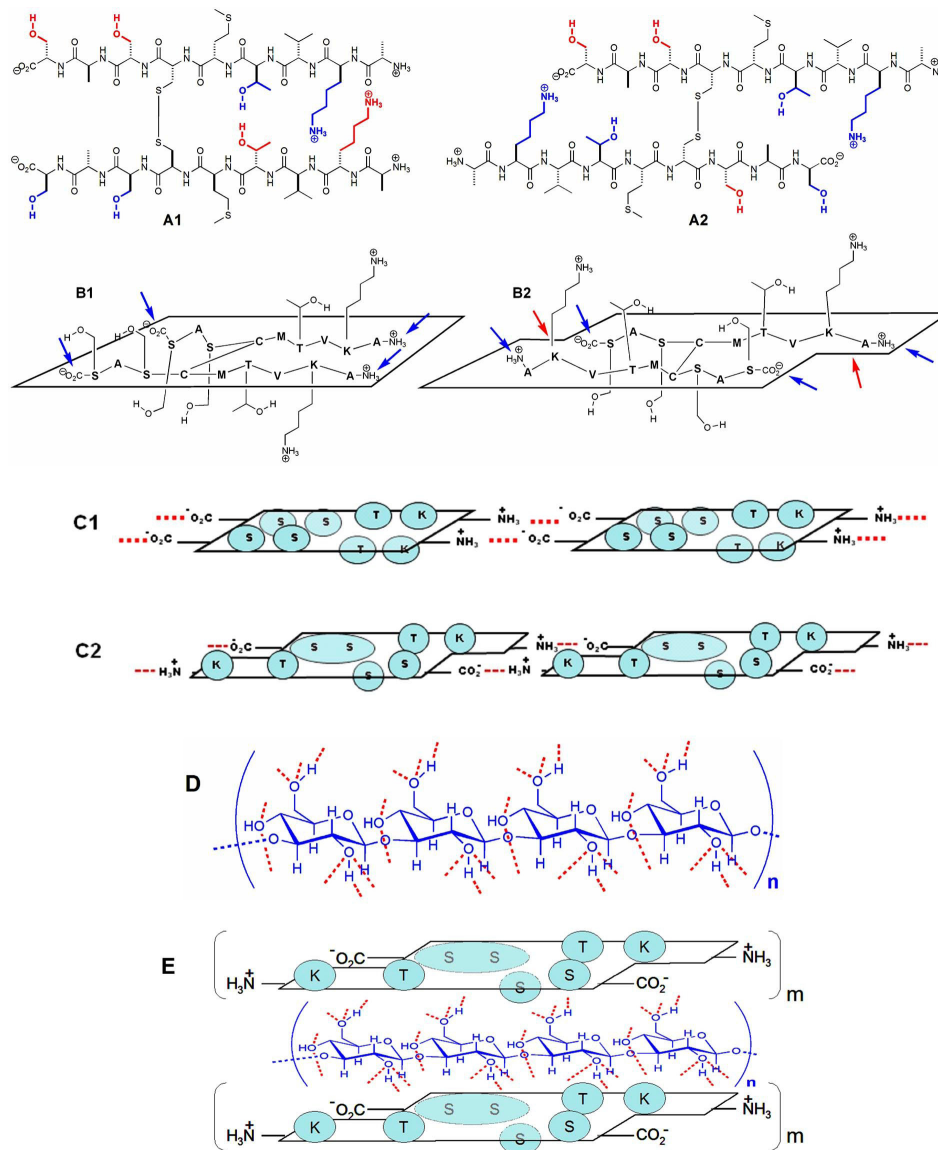


Figura 18. Strutture molecolari di dimeri di KP paralleli e antiparalleli e β -1,3-glucani: un possibile modello di interazione. **(A)** Struttura molecolare della conformazione parallela (A1) e antiparallela (A2) del dimero KP; le catene laterali colorate in rosso e in blu indicano, rispettivamente, le posizioni dei gruppi sotto o sopra il piano del foglietto β . **(B)** Localizzazione spaziale dei gruppi idrofili relativamente al piano del foglietto β per entrambi i dimeri di KP paralleli (B1) e antiparalleli (B2). In entrambi i casi, il piano del foglietto β è definito dai piani di ciascun legame peptidico. Le frecce blu indicano i gruppi coinvolti nelle interazioni elettrostatiche intermolecolari complementari tra i dimeri di KP (B1, B2). In B2, le frecce rosse indicano dove preferenzialmente si formano i legami idrogeno intermolecolari addizionali per formare una struttura peptidica sopramolecolare 2D. **(C)** Rappresentazione della struttura peptidica sopramolecolare 2D dei dimeri di KP paralleli e antiparalleli in cui i residui degli amminoacidi idrofili (S, T) sono disponibili per formare legami H con il β -1,3-glucano. Viene presa in considerazione anche la lisina (K) che si ritiene possa interagire con β -1,3-glucano mediante possibili interazioni intermolecolari ione-dipolo. **(D)** Struttura molecolare e pattern dei legami H del β -1,3-glucano disponibili per l'interazione con i dimeri di KP per formare una struttura sopramolecolare 3D per intercalazione di strutture peptidiche e glucaniche. **(E)** Rappresentazione dell'ipotetica struttura 3D formata dall'interazione di β -1,3-glucano e dimeri di KP antiparalleli mediante legami H intermolecolari tra KP e glucano (361).

Introduzione

Potenziale biologico estrinseco di CDR anticorpali

Come precedentemente descritto, tutti i CDR e la maggior parte dei decapeptidi derivati dal KAb anti-Id ricombinante si sono rivelati in grado di esplicare un'attività candidacida *in vitro*. Tra l'altro, il frammento P6 selezionato è stato rilevato nella sequenza di diversi rAb, caratterizzati da diverse specificità, depositati in banche dati. Sulla base di tali osservazioni e come prova di concetto del potenziale estrinseco di frammenti anticorpali, sono stati sintetizzati i CDR derivanti dalla sequenza di Ab ben caratterizzati: due mAb murini (C7 e pc42) e uno umano (HuA). mAb C7, una IgM polireattiva prodotta nei confronti di una mannoproteina da stress della parete cellulare di *C. albicans*, ha dimostrato di esercitare *in vitro* tre differenti funzioni anti-*Candida* (inibizione della germinazione e dell'adesione e diretto effetto fungicida). *In vitro*, l'attività killer di mAb C7 è stata osservata anche nei confronti di altri agenti fungini, quali *C. lusitaniae*, *C. neoformans*, *A. fumigatus* e *Scedosporium prolificans*. mAb C7 ha dimostrato di reagire con la sequenza *agglutinine-like* (Als) 3, una glicoproteina della superficie cellulare di lievito coinvolta nell'adesione alle superfici ospiti, e con la proteina Nup88 del complesso del poro nucleare, sovraespressa in una serie di tumori umani. mAb C7 ha dimostrato di essere protettivo in un modello murino di candidosi sistemica e ha dimostrato una attività antitumorale *in vitro* (377). mAb pc42 è una IgM, diretta nei confronti di un peptide sintetico contenente l'Ag superficiale del virus dell'epatite B e l'epitopo per i linfociti T-helper della proteina circumsporozoite di *Plasmodium falciparum*, che condivide i CDR H₁ e H₂ con mAb C7. HuA è una IgM specifica per la componente difucosilica dell'Ag del gruppo A sanguigno umano, rappresentativo di Ab ampiamente diffusi nella popolazione, che non condivide nessuna omologia di CDR né con mAb C7 né con mAb pc42. L'attività biologica di tutti i CDR sintetizzati chimicamente, è stata valutata in diversi sistemi: a) attività candidacida *in vitro* e *in vivo* in un modello murino di candidosi sistemica; b) attività anti-HIV-1 *in vitro* in un modello di PBMC stimolati con fitoemoagglutinina ottenuti da soggetti sani e infettati in modo esogeno con ceppi HIV-1 R5 o X4 e *ex vivo* in un modello di PBMC ottenuti da pazienti infettati con HIV-1 R5; c) attività antitumorale *in vitro* (citotossica e anti-angiogenica) nei confronti di cellule di melanoma murine ed umane e *in vivo* in un modello murino di colonizzazione da melanoma metastatico (378). Come riassunto in **Tabella 3**, tutti i CDR C7, principalmente L₁, L₃, e H₂, hanno dimostrato attività candidacida *in vitro*. Oltre ad H₂ di pc42, condiviso con mAb C7, anche L₁ e L₂ di pc42 e L₃ di HuA hanno dimostrato attività candidacida. Il trattamento di topi infettati con L₁ C7 e H₁ e H₂ C7/pc42 ha protetto gli animali da candidosi sistemica con aumento del tempo di sopravvivenza e

diminuzione della carica fungina renale; in particolare, alcuni animali trattati con L₁ C7 sono risultati completamente protetti. *In vitro* l'attività candidacida di L₁ e L₂ pc42 e L₃ HuA può essere neutralizzata da β -1,3/1,6-glucano. Un peptide dedotto dalla complementarità con H₂ C7 si è dimostrato funzionalmente simile ad una sequenza N-terminale di Als3. Queste osservazioni suggeriscono il possibile coinvolgimento di queste strutture associate alla virulenza come bersagli molecolari dei CDR in *C. albicans*.

Alcuni CDR (H₁ C7/pc42, L₃ HuA, L₁ pc42) inibiscono la replicazione *ex vivo* di HIV-1 R5 in PBMC, come valutato dalla produzione dell'Ag p24 rispetto a colture non trattate (**Tabella 3**). Risultati simili sono stati osservati in PBMC sperimentalmente infettati con il ceppo R5, mentre solo H₃ C7 è stato in grado di bloccare la replicazione virale di HIV-1 X4, dimostrando che l'effetto dei peptidi è dipendente dal fenotipo di HIV-1, probabilmente per interazione tra i peptidi CDR e i corecettori chemochinici CCR5 e CXCR4. Alcuni dei CDR ad elevata attività antivirale hanno mostrato di condividere importanti motivi amminoacidici con la trascrittasi inversa (L₃ HuA) e la proteina REV (L₁ pc42) di HIV-1, suggerendo un potenziale ruolo come inibitori di queste attività enzimatiche.

Due CDR isolati (L₁ HuA e H₂ C7/pc42) hanno dimostrato di essere attivi *in vitro* nei confronti di cellule di melanoma (**Tabella 3**); H₂ C7/pc42, previsto contenere una regione anfipatica β (Eisenberg) corrispondente alla sequenza C-terminale SYNQKFK, inibiva quasi dieci volte di più di L₁ HuA. L'osservata attività pro-apoptotica, apparentemente, dipendeva dal legame di H₂ a un recettore superficiale che specificamente riconosce la sequenza C-terminale; il peptide SYNQKFK isolato non è apoptotico di per sé, ma può competere con H₂ C7/pc42 e inibirne la citotossicità in cellule di melanoma. Entrambi i peptidi CDR causano apoptosi caspasi-dipendente, non solo in cellule di melanoma, ma anche in cellule leucemiche HL-60. Mentre H₃ C7 compete con mAb C7 per il legame alla fosfatidilcolina, il probabile ligando del mAb sulle cellule di melanoma, H₂ C7/pc42 sembra non farlo. I CDR C7, H₂, L₁, L₂ e L₃ a concentrazioni più elevate, inibiscono in modo specifico la germinazione di cellule endoteliali della vena ombelicale umana (HUVEC). Così, i CDR degli stessi mAb sono in grado di inibire sia la crescita delle cellule tumorali sia la motilità delle cellule endoteliali sia la formazione del tubulo. Inoltre, entrambi i peptidi nella loro forma più stabile ammidata in C-terminale, somministrati a topi, sono stati in grado di aumentare significativamente il tempo di sopravvivenza e diminuire la colonizzazione polmonare da parte delle cellule di melanoma. Alcuni CDR C7 hanno dimostrato attività inibente nei confronti di ulteriori agenti patogeni microbici e virali, quali *C. neoformans*, *A. fumigatus*, *S. prolificans*, *P. aeruginosa*, MRSA e

Introduzione

virus influenzale A, e di linee di cellule tumorali, quali cellule umane HeLa (carcinoma epitelioide della cervice), CEM (leucemia) e Hs294T (melanoma).

L'ingegnerizzazione mediante *alanine scanning* di H₁ e H₂ C7/pc42, data la loro attività differenziale antimicrobica, antivirale e antitumorale, è stata effettuata nel tentativo di stabilire la rilevanza funzionale di ogni singolo residuo amminoacidico per l'attività biologica. Come riassunto in **Tabella 4**, mentre la maggior parte delle sostituzioni non ha avuto effetti significativi, alcune sembrano aver migliorato o abolito l'attività; ad esempio, la sostituzione di F (fenilalanina) o dell'ultima K con A in H₂ ha comportato rispettivamente un aumento dell'attività candidacida o una sostanziale perdita di attività. I derivati A-sostituiti di H₁ C7 hanno dimostrato un aumento (A al posto della terza tirosina Y) o una diminuzione (A al posto della prima glicina G o dell'ultima istidina H degli effetti inibenti anti-HIV-1. Così, a prescindere dalla specificità dell'Ab nativo, i CDR sintetici isolati possono mostrare differenziali effetti antimicrobici, antivirali e antitumorali. I peptidi ingegnerizzati, ottenuti da una sostituzione con A di sequenze bioattive di CDR, e utilizzati come surrogati di mutazioni puntiformi naturali, hanno mostrato un'ulteriore aumentata, inalterata o diminuita attività differenziale antimicrobica, antivirale e/o antitumorale. Gli effetti inibenti osservati coinvolgono principalmente la linea germinale codificante CDR1 e CDR2 delle catene L e H. In conclusione si può affermare che CDR e frammenti della regione variabile, indipendente dalla specificità dell'Ab nativo, possono influenzare la risposta immunitaria antimicrobica, con modalità che ricordano quelle delle molecole dell'immunità innata. Inoltre, l'alta frequenza di frammenti anticorpali bioattivi, che non mostrano omologia di sequenza con altri peptidi naturali antimicrobici, e i recenti progressi nello sviluppo di peptidi bioattivi, nell'ingegnerizzazione peptidica e nell'ottimizzazione chimica, associati alla scoperta di nuovi meccanismi d'azione, suggeriscono che gli Ab possono rappresentare una fonte illimitata per la ricerca di nuovi agenti terapeutici antimicrobici, antivirali ed antitumorali.

Tabella 3. Attività inibente *in vitro* e/o *ex vivo* di CDR sintetici nei confronti di *C. albicans*, HIV-1 e cellule murine di melanoma B16F10-Nex2.

Peptidi CDR	Sequenza (Dalton)	Attività inibente nei confronti di				
		<i>C. albicans</i> *	HIV-1**			B16F10-Nex2***
			a	b	c	
L ₁ C7	KSSQSLNSGNQKNYLT (1882,1)	+++	±	±	-	-
L ₂ C7	WASTRES (835,9)	+	±	+	±	-
L ₃ C7	NDYSYPRSR (1157,2)	+++	+	±	-	-
H ₁ C7/pc42	GYMH (669,8)	+	+	±	-	-
H ₂ C7/pc42	YISCYNGATSYNQKFK (1887,1)	+++++	±	-	-	++++
H ₃ C7	ARQGVRRGAMD (1117,2)	+	-	-	++	-
L ₁ pc42	YRASKSVSTSGYSYMH (1824,0)	+++++	+++	+	-	-
L ₂ pc42	LVSNLES (760,8)	+++++	-	-	-	-
L ₃ pc42	QHIRELTRSE (1268,4)	++	-	-	-	-
H ₃ pc42	PNPLKAM (769,9)	±	-	±	-	-
L ₁ HuA	RASQSVSSYLA (1168,2)	-	+	±	-	+++
L ₂ HuA	DASNRAT (733,7)	-	±	-	-	-
L ₃ HuA	QQRSNWPRS (1158,2)	++++	++	+	-	-
H ₁ HuA	SYTFH (653,6)	±	±	++	-	-
H ₂ HuA	VLAYDGSYQHYADSVKG (1873,0)	-	+	++	-	-
H ₃ HuA	GQTTVTKIDEDY (1369,4)	±	±	-	-	-

*% inibizione di crescita: ++++++ 100% a 6,25 µg/ml; +++++ 100% a 25 µg/ml; ++++ 100% a 50 µg/ml; +++ 90-100% a 100 µg/ml; ++ 70-89% a 100 µg/ml; + 40-69% a 100 µg/ml; ± <40% a 100 µg/ml; - nessuna inibizione a 100 µg/ml.

**% attività inibitoria a 10 µg/ml: +++ >90%; ++ 70-90%; + 40-69%; ± <40%; - nessuna inibizione. a) PBMC infettati in modo endogeno da R5; b) PBMC infettati in modo esogeno da R5; c) PBMC infettati in modo esogeno da X4.

***inibizione di crescita di cellule murine di melanoma (EC₅₀, concentrazione efficace 50%, moli/litro): ++++ EC₅₀ = 5,35×10⁻⁵; +++ EC₅₀ = 7,20×10⁻⁴; - nessuna inibizione.

Introduzione

Tabella 4. Attività inibitente *in vitro* e/o *ex vivo* di derivati alaninici (asd) da CDR sintetici selezionati nei confronti di *C. albicans*, HIV-1 e cellule murine di melanoma B16F10-Nex2.

Peptidi CDR	Sequenza	Attività inibitente nei confronti di		
		<i>C. albicans</i> *	HIV-1**	B16F10-Nex2***
H ₁ C7/pc42	GYVMH		+	
asd	G1A		-	
	Y2A		+	
	Y3A		++	
	M4A		+	
	H5A		-	
H ₂ C7/pc42	YISCYNGATSYNQKFK	+++++		5,35×10 ⁻⁵
asd	Y1A	+++		7,14×10 ⁻⁵
	I2A	+++		7,35 ×10 ⁻⁵
	S3A	+++++		6,49 ×10 ⁻⁵
	C4A	+++		6,75 ×10 ⁻⁵
	Y5A	+++		7,35 ×10 ⁻⁵
	N6A	+++++		7,69 ×10 ⁻⁵
	G7A	++++		6,32 ×10 ⁻⁵
	T9A	+++++		6,02 ×10 ⁻⁵
	S10A	++++		1,19 ×10 ⁻⁴
	Y11A	+		1,13 ×10 ⁻⁴
	N12A	+++		1,25 ×10 ⁻⁴
	Q13A	+++++		1,28 ×10 ⁻⁴
	K14A	+++		3,84 ×10 ⁻⁴
	F15A	+++++		1,00 ×10 ⁻³
	K16A	-		8,70 ×10 ⁻⁵

*% inibizione di crescita: ++++++ 100% a 6,25 µg/ml; +++++ 100% a 25 µg/ml; ++++ 100% a 50 µg/ml; +++ 90-100% a 100 µg/ml; ++ 70-89% a 100 µg/ml; + 40-69% a 100 µg/ml; ± <40% a 100 µg/ml; - nessuna inibizione a 100 µg/ml.

**% attività inibitoria a 10 µg/ml in un modello *ex vivo* di PBMC infettati in modo endogeno da R5: +++ >90%; ++ 70-90%; + 40-69%; ± <40%; - nessuna inibizione.

***inibizione di crescita di cellule murine di melanoma (EC₅₀, concentrazione efficace 50%, moli/litro).

Scopo

Il progetto complessivo di dottorato si è proposto di studiare le potenzialità immunoterapeutiche ed immunomodulanti di peptidi naturali e sintetici e, più in particolare, le attività antimicrobica, antivirale ed immunomodulante di peptidi di derivazione anticorpale.

Come precedentemente descritto, gli Ab sono molecole glicoproteiche formate da due catene L e due catene H legate da ponti disolfuro, caratterizzate da regioni C e V, queste ultime comprendenti sei CDR, tipicamente conformati ad ansa, che costituiscono il sito combinatorio per l'Ag.

Le correlazioni tra sequenza amminoacidica e struttura terziaria delle Ig sono state intensivamente studiate per definire l'importanza dei singoli domini, definendo strutture canoniche nei tre CDR appartenenti alla catena L (L₁, L₂ e L₃) e dei primi due CDR della catena H (H₁ e H₂). Il terzo CDR della catena H (H₃) è caratterizzato da una grande varietà di sequenze e lunghezze, per cui per esso non è stata definita alcuna struttura canonica. Significativamente, CDR H₃ svolge un ruolo cruciale nel mediare il riconoscimento dell'Ag, variando talvolta la propria conformazione in seguito al legame antigenico; gli altri CDR sono variamente impegnati nell'incremento della specificità. I CDR sono separati da regioni cornice, alcuni residui delle quali possono essere coinvolti nel legame con l'Ag.

La constatazione che la specificità anticorpale è determinata da un limitato numero di residui amminoacidici ha consentito la sintesi di piccoli peptidi derivati da CDR ancora in grado di esplicitare le proprietà di legame e le funzioni dell'intero Ab. Studi clinici hanno evidenziato la scarsa tossicità e l'elevata efficienza di Ab, stimolando la ricerca di loro derivati per lo sviluppo di farmaci innovativi.

Importanti osservazioni sperimentali effettuate negli ultimi anni presso la Sezione di Microbiologia del Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio dell'Università di Parma hanno consentito di dimostrare che peptidi sintetici derivati dalla sequenza della regione V di Ab, indipendentemente dalla loro specificità di legame per l'Ag, possono esplicitare diverse attività biologiche. In particolare, sulla base della sequenza della regione V di un rAb anti-Id a singolo filamento (scFv H6), immagine interna di una tossina killer di lievito caratterizzata dall'ampio spettro di attività microbica, sono stati sintetizzati i peptidi rappresentanti i 6 CDR ed una serie di decapeptidi parzialmente sovrapposti per riprodurre l'intera porzione V dell'Ab. Molti dei peptidi ottenuti, saggiati *in vitro* nei confronti di *C. albicans*, si sono dimostrati candidacidi e quindi mimotopi funzionali della tossina killer. Uno di essi, un decapeptide (P6, EKVTMTCSAS) contenente in posizione C-terminale i

Scopo

primi tre amminoacidi (SAS) del CDR₁ della catena L, aveva dimostrato una elevata attività *in vitro*, ulteriormente incrementata dalla sostituzione, mediante *alanine scanning*, del primo amminoacido (glutammato, E) con alanina (A). Il decapeptide ottenuto, denominato KP (“killer peptide”, AKVTMTCSAS) si è dimostrato possedere una implementata attività *in vitro* anche nei confronti di altri importanti agenti patogeni fungini, batterici, protozoari (362, 366-369, 379, 380) e virali (371, 372). KP, inoltre, era in grado di esplicare una attività terapeutica nei confronti di importanti infezioni sperimentali, quali candidosi, criptococchi, paracoccidiodomicosi ed influenza (362, 368, 369, 372), nonché una attività immunomodulante nei confronti di DC (373). La disponibilità della sequenza ha consentito di poter esprimere KP in piante di tabacco (*N. benthamiana*) in forma attiva anche nei confronti di fitopatogeni (370). Queste osservazioni hanno consentito di ipotizzare nuovi approcci terapeutici nei confronti di rilevanti malattie infettive (43, 348, 363, 364).

Più recentemente, è stato dimostrato che anche peptidi sintetici corrispondenti a CDR di Ab non correlati, indipendentemente dalla loro specificità, possono esplicare in modo differenziale attività antifungina (*C. albicans*), antivirale (HIV-1) e/o antitumorale (cellule di melanoma) *in vitro*, *ex vivo* e/o *in vivo*. La sostituzione mediante *alanine scanning* di ciascun residuo amminoacidico, rappresentativa di mutazioni puntiformi, ha mostrato di riflettersi in una incrementata, inalterata o ridotta attività biologica (378).

L'elevata frequenza di peptidi bioattivi basati sulla sequenza di CDR anticorpali, che oltretutto potrebbero essere ulteriormente ingegnerizzati per aumentarne l'attività biologica, sembrerebbe suggerire che le Ig possano rappresentare una fonte pressoché illimitata di peptidi potenzialmente attivi nei confronti di agenti infettivi e cellule tumorali ed utilizzabili per la messa a punto di nuovi agenti antinfettivi ed antitumorali.

Sulla base di tali esperienze ed utilizzando approcci sperimentali simili, nel corso del dottorato si è ritenuto di valutare la potenziale attività antimicrobica, antivirale ed immunomodulante di frammenti anticorpali derivati dalla porzione costante (Fc); in particolare, sono stati sintetizzati e valutati peptidi corrispondenti a quelli rilasciati, nel tempo di emivita, in seguito a digestione proteolitica di Ab con enzimi fisiologici, quali catepsine, tripsina e chimotripsina.

La prima fase è consistita nella ricerca delle sequenze corrispondenti alla porzione Fc delle Ig in Banca Dati, nella selezione di tre sequenze comuni alle Fc delle maggiori classi di Ig (IgG, IgM e IgA) e nell'analisi di tali sequenze mediante l'utilizzo di diversi programmi informatizzati.

La ricerca è stata quindi finalizzata all'ottenimento di sequenze generate da tagli di enzimi fisiologici in zone di Fc altamente conservate, in modo da saggiare peptidi quantitativamente rappresentativi per attività antimicrobica, antivirale e/o immunomodulante, utilizzando diversi approcci metodologici precedentemente ampiamente sperimentati. Si è ritenuto di effettuare la selezione dei peptidi di interesse per ciascuna classe di Ig (IgG1, IgM, IgA) anche in funzione di ulteriori parametri, quali la lunghezza del peptide generato, il punto isoelettrico e l'alternanza di amminoacidi idrofobici/idrofilici. Tali parametri sono stati presi in considerazione in quanto è stato riconosciuto che l'interazione, sia ionica sia idrofobica/idrofilica, di corti peptidi con pareti cellulari o membrane plasmatiche di microrganismi o con virus è di fondamentale importanza per eventuali effetti antimicrobici e/o antivirali. Come riferimento, è stato utilizzato il peptide KP, caratterizzato da un punto isoelettrico (pI) pari a 8,23, e quindi carico positivamente a pH fisiologico, e da una perfetta e molto caratteristica alternanza di amminoacidi idrofobici ed idrofilici nella sua sequenza.

Si è previsto di sottoporre i peptidi selezionati a saggi di attività biologica, in particolare antimicrobica, antivirale ed immunomodulante, analizzando, innanzitutto, l'attività antimicrobica *in vitro*, determinando in modo del tutto preliminare i valori di EC₅₀ (concentrazione di peptide in grado di uccidere il 50% delle cellule saggiate) per i peptidi risultati maggiormente attivi nei confronti dei singoli ceppi batterici e fungini di interesse, inclusi ceppi caspofungina resistenti. Inoltre, si è previsto di valutare l'attività terapeutica *in vivo* dei peptidi sia in un modello murino di infezione sistemica letale, causata da un ceppo altamente virulento di *C. albicans*, sia in un modello di infezione mucosale vaginale di topo. Sulla base di precedenti dati sperimentali sul rapporto struttura-funzione, che hanno rivelato la proprietà di KP di autoaggregare, in modo spontaneo e reversibile, in strutture organizzate fibrillari simili a idrogel, catalizzata da β -1,3-glucano solubile (375), si è ritenuto di valutare, mediante studi in Dicroismo Circolare (CD), le proprietà auto-aggreganti dei peptidi selezionati.

Si è previsto di valutare l'attività antitumorale *in vitro* dei peptidi nei confronti di una linea cellulare di melanoma, i loro eventuali effetti citotossici *in vitro* con differenti saggi, e le proprietà antivirali *in vitro* dei peptidi selezionati, in particolare nei confronti di ceppi di HIV-1 linfocitotropici IIIB (X4) e monocitotropici BaL (R5).

Parallelamente, ci si è proposti di proseguire uno studio precedentemente descritto sulle attività biologiche dei CDR di tre mAb (C7, pc42, HuA) con differenti specificità (378). In tale studio era stato dimostrato che, indipendentemente dalla specificità dell'Ab di provenienza, i diversi CDR potevano esplicare *in vitro*, *ex vivo* e/o *in vivo* attività differenziali

Scopo

antifungina, anti-HIV-1 ed anti-melanoma, ulteriormente modificabili mediante *alanine scanning*. In particolare, per valutare se CDR selezionati potessero avere un qualche effetto immunomodulante, stimolando risposte immunitarie cellulari protettive, ci si è proposti di studiare l'attività immunomodulante *in vitro* ed *in vivo* dei CDR di due mAb, per alcuni dei quali (CDR di mAb HuA) era già stata valutata l'attività anticancerogena. I due mAb considerati (mAb HuA umano e mAb MoA murino) sono stati selezionati in quanto diretti nei confronti dello stesso epitopo polisaccaridico (difucosilico) del gruppo sanguigno umano A (381, 382). Pur possedendo identica reattività antigenica, i due mAb sono caratterizzati da diverse sequenze amminoacidiche, rappresentando diversi modi con cui uno stesso epitopo può essere riconosciuto dal sistema immunitario (381).

Obiettivo teorico del progetto di ricerca è la comprensione del razionale evolutivo e fisiologico dell'attività di peptidi delle regioni V e Fc di Ig nell'omeostasi immunitaria antimicrobica, antivirale e antitumorale.

La facile produzione ed i bassi costi associati a corti peptidi sintetici rappresentanti porzioni di Ig potrebbero offrire significativi vantaggi rispetto ad Ab monoclonali e ricombinanti, per l'identificazione ed il razionale sviluppo di una nuova generazione di potenziali agenti terapeutici antinfettivi (antimicrobici ed antivirali) e/o antitumorali, biologicamente attivi e terapeutici, caratterizzati da innovativi meccanismi d'azione. Tali peptidi potrebbero, inoltre, essere facilmente ingegnerizzati e stabilizzati nei confronti della proteolisi mediante incorporazione di amminoacidi non naturali o altre modificazioni senza inficiarne l'attività biologica.

Obiettivo pratico del progetto di ricerca è lo sviluppo di peptidi anticorpali caratterizzati da attività antimicrobica, antivirale, antitumorale e/o immunomodulante che, unitamente alla comprensione del relativo meccanismo d'azione, potrebbe precludere alla generazione di nuove classi di farmaci antinfettivi e antineoplastici.

Materiali e metodi

Terreni e reagenti

Nello studio sono stati utilizzati i seguenti terreni di coltura:

- Sabouraud Dextrose Agar (SDA, *Fluka*, Sigma-Aldrich), per la coltivazione di funghi patogeni e non patogeni.

Composizione: agar, 15 g/l
 D-glucosio, 40 g/l
 peptone, 10 g/l
 pH finale, $5,6 \pm 0,2$ (37°C)

Dissolvere 65 g in 1 litro di acqua distillata. Autoclavare a 121°C per 15 minuti. Non surriscaldare. Mescolare bene prima di distribuirlo in capsule di Petri sterili (20 ml/piastra).

- Sabouraud Dextrose Agar Tween-20, per la coltivazione di *Malassezia furfur*.
 DSA addizionato con 10 ml/l di Tween-20 prima della sterilizzazione.
- Terreno 199 (M199, Sigma-Aldrich), per la filamentazione di *C. albicans*.
 Versione liquida completa della formulazione originale M199 pubblicata da Morgan (383).

- *Yeast Peptone Dextrose* brodo (YPD), per la propagazione di lieviti.

Composizione: estratto di lievito (*Fluka*, Sigma-Aldrich), 10 g/l
 D-glucosio (*Fluka*, Sigma-Aldrich), 20 g/l
 peptone (*Fluka*, Sigma-Aldrich), 20 g/l

Dissolvere in 1 litro di acqua distillata. Autoclavare a 121°C per 15 minuti.

- Mueller Hinton brodo (MH, *Fluka*, Sigma-Aldrich), per la coltivazione di batteri.

Composizione: estratto di carne, 2 g/l
 idrolisato di caseina, 17,5 g/l
 amido, 1,5 g/l
 pH finale, $7,3 \pm 0,2$ (25°C)

Dissolvere 23 g in 1 litro di acqua distillata. Autoclavare a 121°C per 15 minuti.

- Mueller Hinton Agar (MHA, *Fluka*, Sigma-Aldrich).

MH addizionato di 17 g/l di agar.

Materiali e metodi

Dissolvere 38 g in 1 litro di acqua distillata. Autoclavare a 121°C per 15 minuti. Mescolare bene prima di distribuirlo in capsule di Petri sterili (20 ml/piastra).

- RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) supplementato con il 10% di siero di vitello fetale (FCS), 1% di glutammina e 1% di penicillina/streptomicina, per la coltura di leucociti normali e neoplastici umani.
- *Eagle's Minimum Essential Medium* (MEM) addizionato al 10% di FCS e 1% di penicillina/streptomicina, per colture cellulari.
- *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM, Sigma-Aldrich) supplementato con 10% FBS, 1% glutammina, 1% di penicillina/streptomicina e 1% di sodio piruvato, per colture cellulari.

Nello studio sono stati utilizzati i seguenti reagenti:

- AlamarBlue (Biosource International, Inc.), colorante acquoso sicuro e non tossico usato per saggiare vitalità e proliferazione cellulare.
- Trypan Blue (Sigma-Aldrich), colorante in grado di colorare selettivamente cellule morte.
- Bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), reagente usato per il saggio colorimetrico standard di vitalità cellulare.
- Tampone fosfato (PBS), soluzione salina per il mantenimento costante del pH.

Composizione: NaCl (*Fluka*, Sigma-Aldrich), 8 g/l
KCl (*Fluka*, Sigma-Aldrich), 0,2 g/l
Na₂HPO₄ (*Fluka*, Sigma-Aldrich), 1,15 g/l
KH₂PO₄ (*Fluka*, Sigma-Aldrich), 0,259 g/l

Dissolvere in 1 litro di acqua distillata. Portare a pH pari a 7,4. Sterilizzare per filtrazione o autoclavare a 121°C per 15 minuti.

- Soluzione 1% di Triton X-100 (TX-100, Sigma-Aldrich), tensioattivo non ionico usato come controllo positivo di lisi cellulare.

Nello studio sono stati utilizzati i peptidi derivanti dalle regioni costanti, i peptidi rappresentanti i CDR di mAb HuA e MoA (381), nonché un decapeptide sintetico irrilevante, dimostrato in studi precedenti privo di attività candidacida ed immunomodulante (362, 373), usato come controllo negativo.

Tutti i peptidi, sintetizzati chimicamente e le cui sequenze sono riportate in **Tabella 5**, sono stati solubilizzati in DMSO (Sigma-Aldrich) alla concentrazione di 20 mg/ml al netto del contenuto peptidico e successivamente portati alle concentrazioni desiderate con H₂O, ad eccezione di quelli utilizzati per gli studi in dicroismo circolare, sciolti esclusivamente in H₂O.

Tabella 5. Sequenze dei peptidi anticorpali oggetto dello studio.

Peptidi		Sequenza	
CDR	H ₁	HuA	SYTFH
		MoA	SYWIN
	H ₂	HuA	VLAYDGSYQHYADSVKG
		MoA	DIYPGSGITNYNEKFKS
	H ₃	HuA	GQTTVTKIDEDY
		MoA	GQYGNLWFAY
	L ₁	HuA	RASQSVSSYLA
		MoA	RASQDINNYLN
	L ₂	HuA	DASNRAT
		MoA	YTSRLHS
	L ₃	HuA	QQRSNWPRS
		MoA	QQGNTLPWT
Fc	H4L		HEAL
	N10K		NQVSLTCLVK
	S8K		SLSLSPGK
	G7R		GFPSVLR
	Q6W *		QIQVSW
	Q8R *		QIQVSWLR
	T11F		TCRVDHRGLTF
<i>Scramble</i>	SP		MSTAVSKCAT

* Peptidi sintetizzati in forma acetilata in N-terminale

Materiali e metodi

Ceppi microbici e linee cellulari

Per i saggi di sensibilità *in vitro* e per le infezioni sperimentali *in vivo* sono stati utilizzati diversi ceppi batterici e fungini, nonché virus.

Batteri (American Type Culture Collection, ATCC)

- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, Gram-positivo
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, Gram-negativo
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853, Gram-negativo
- *Escherichia coli* ATCC 25922, Gram-negativo

Funghi

- *Candida albicans* SC5314, il cui genoma è stato sequenziato presso lo *Stanford DNA Sequencing and Technology Center* (384, 385).
- *C. albicans* CA-6, ceppo altamente virulento descritto in precedenza (386), utilizzato per infezioni sistemiche sperimentali.
- *C. albicans* SA40, ceppo sensibile al fluconazolo isolato da un'infezione vaginale umana e mantenuto in collezione presso l'Istituto Superiore di Sanità di Roma.
- *C. albicans* AIDS68, ceppo resistente al fluconazolo isolato da un'infezione vaginale umana e mantenuto in collezione presso l'Istituto Superiore di Sanità di Roma.
- *C. albicans* MGUM/CASR4, ceppo di isolamento clinico resistente alla caspofungina fornito dall'Università di Milano.
- *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* 6995, ceppo capsulato di sierotipo A (387).
- *Malassezia furfur* 101, isolato clinico ottenuto dalla collezione fungina dell'Università Parma.
- *Aspergillus fumigatus* ATCC MYA-1163
- *Saccharomyces cerevisiae* YGR032W, ceppo delecto nel gene codificante la proteina FSK2 (subunità 1,3- β -D-glucano sintetasi).

Virus

- HIV-1 IIIB (X4): ceppo linfocitotropico
- HIV-1 BaL (R5): ceppo monocitotropico

Linee cellulari

- Cellule del sistema immunitario umano e murino

- CHO33T, HeLa ADA e HeLa LAI, esprimono costitutivamente la glicoproteina gp120 sulla loro superficie
- LLC-MK2, *Rhesus monkey kidney epithelial cells*.
- B16F10-Nex2, cellule di melanoma murine.
- SKmel28 e SKmel25, cellule di melanoma umane.

Banca Dati e programmi informatici

La ricerca delle sequenze corrispondenti alla porzione Fc delle classi maggiormente rappresentative delle Ig umane e la selezione di tre sequenze comuni alle Fc dei principali isotipi di Ab (IgG, IgM e IgA) è avvenuta utilizzando la Banca Dati PIR “*Protein Information Resource*” (<http://pir.georgetown.edu/>).

Ciascuna di tali sequenze è stata analizzata, mediante l'utilizzazione di diversi programmi informatizzati quali:

BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/>)

PeptideCutter (<http://expasy.org/tools/peptidecutter/>) con enzimi Tripsina e/o Chimotripsina

The Sequence Manipulation Suite 2 (<http://www.bioinformatics.org/sms2/index.html>)

ExPASy Proteomics tools (www.expasy.org/tools/): Compute pI/MW; ProtParam; MW, pI, Titration curve

La selezione dei peptidi di interesse per ciascuna classe di Ig (IgG1, IgM, IgA) è stata effettuata anche in funzione di ulteriori parametri, quali la lunghezza del peptide generato, enzima proteolitico coinvolto, percentuale di taglio, amminoacidi conservati, punto isoelettrico e alternanza di amminoacidi idrofobici/idrofilici lungo la sequenza.

Valutazione dell'attività microbica *in vitro* di peptidi anticorpali selezionati

Attività *in vitro* dei peptidi nei confronti di ceppi batterici

Le valutazioni dell'attività microbica *in vitro* dei peptidi selezionati nei confronti di ceppi batterici sono state effettuate mediante saggi convenzionali di determinazione di Unità Formanti Colonia (CFU), come precedentemente descritto (362).

I saggi, eseguiti in triplo a scopo statistico, sono stati effettuati prelevando una singola colonia del ceppo in esame, sviluppatasi su MHA dopo incubazione per 24 ore a 37°C, e

Materiali e metodi

risospendendo le cellule in 2 ml di soluzione fisiologica (bioMérieux Italia S.p.A.) fino a raggiungere una torbidità di 0,5 McFarland. Dopo opportune diluizioni in MH brodo e successivamente in H₂O, approssimativamente 3×10² cellule sono state sospese in H₂O con opportune e diverse concentrazioni (µg/ml) di ciascun peptide in 100 µl di volume finale, con successiva incubazione per 5 ore a 37°C. Come controlli di crescita sono stati utilizzati gli stessi inoculi di cellule in presenza di diluente (H₂O), ma in assenza di peptide.

Dopo il periodo d'incubazione, tutte le sospensioni fungine sono state seminate su MHA e, dopo 24 ore di incubazione a 37°C, sono state determinate le CFU, utilizzando lo strumento *aCOLyte Colony Counter* (PBI International). Le percentuali di inibizione della crescita sono state calcolate secondo la seguente formula:

$$\% \text{ inibizione della crescita} = 100 - \frac{\text{N}^\circ \text{ CFU in presenza di peptide}}{\text{N}^\circ \text{ CFU del controllo}} \times 100$$

La significatività statistica delle differenze tra i gruppi sperimentali e di controllo è stata valutata mediante test *t* di Student.

Attività *in vitro* dei peptidi nei confronti di *C. albicans*

Le valutazioni dell'attività microbica *in vitro* dei peptidi selezionati nei confronti di ceppi di *C. albicans* sono state effettuate mediante saggi di CFU.

I saggi, eseguiti in triplo a scopo statistico, sono stati effettuati prelevando una singola colonia del ceppo in esame, sviluppatasi su SDA dopo incubazione per 24 ore a 37°C, e incubando le cellule di *C. albicans* in terreno 199 per un'ora in agitazione (150 rpm) a 37°C. Dopo opportuna conta al microscopio con un emocitometro Kova® (HYCOR BIOMEDICAL Inc.), approssimativamente 3×10² cellule sono state sospese in H₂O con opportune e diverse concentrazioni (µg/ml) di ciascun peptide in 100 µl di volume finale, con successiva incubazione per 6 ore a 37°C. Come controlli di crescita sono stati utilizzati gli stessi inoculi di cellule in presenza di diluente (H₂O), ma in assenza di peptide.

Dopo il periodo d'incubazione, tutte le sospensioni fungine sono state seminate su SDA e, dopo 24 ore di incubazione a 37°C, sono state determinate le CFU, utilizzando lo strumento *aCOLyte Colony Counter* (PBI International). Le percentuali di inibizione della crescita sono state calcolate secondo la formula riportata precedentemente.

La significatività statistica delle differenze tra i gruppi sperimentali e di controllo è stata valutata mediante test *t* di Student.

Attività *in vitro* dei peptidi nei confronti di *C. neoformans*

Le valutazioni dell'attività microbica *in vitro* dei peptidi selezionati nei confronti del ceppo *C. neoformans* 6995 sono state effettuate mediante saggi di CFU.

I saggi, eseguiti in triplo a scopo statistico, sono stati effettuati prelevando una singola colonia del ceppo in esame, sviluppatasi su SDA dopo incubazione per 24 ore a 37°C, e risospendendo le cellule in terreno 199. Dopo opportuna conta al microscopio con un emocitometro Kova®, approssimativamente 3×10^2 cellule sono state sospese in H₂O con opportune e diverse concentrazioni (µg/ml) di ciascun peptide in 100 µl di volume finale, con successiva incubazione per 6 ore a 37°C. Come controlli di crescita sono stati utilizzati gli stessi inoculi di cellule in presenza di diluente (H₂O), ma in assenza di peptide.

Dopo il periodo d'incubazione, tutte le sospensioni fungine sono state seminate su SDA e, dopo 48 ore di incubazione a 37°C, sono state determinate le CFU, utilizzando lo strumento *aCOLyte Colony Counter* (PBI International). Le percentuali di inibizione della crescita sono state calcolate secondo la formula precedentemente riportata.

La significatività statistica delle differenze tra i gruppi sperimentali e di controllo è stata valutata mediante test *t* di Student.

Attività *in vitro* dei peptidi nei confronti di *M. furfur*

Le valutazioni dell'attività microbica *in vitro* dei peptidi selezionati nei confronti del ceppo *M. furfur* 101 sono state effettuate mediante saggi di CFU.

I saggi, eseguiti in triplo a scopo statistico, sono stati effettuati prelevando una singola colonia del ceppo in esame, sviluppatasi su SDA-Tween20 dopo incubazione per 24 ore a 30°C. Dopo opportuna conta al microscopio con un emocitometro Kova®, approssimativamente 3×10^2 cellule sono state sospese in H₂O con opportune e diverse concentrazioni (µg/ml) di ciascun peptide in 100 µl di volume finale, con successiva incubazione per 6 ore a 30°C. Come controlli di crescita sono stati utilizzati gli stessi inoculi di cellule in presenza di diluente (H₂O), ma in assenza di peptide.

Dopo il periodo d'incubazione, tutte le sospensioni fungine sono state seminate su SDA-Tween20 e, dopo 72 ore di incubazione a 30°C, sono state determinate le CFU, utilizzando lo strumento *aCOLyte Colony Counter* (PBI International). Le percentuali di inibizione della crescita sono state calcolate secondo la formula precedentemente riportata.

La significatività statistica delle differenze tra i gruppi sperimentali e di controllo è stata valutata mediante test *t* di Student.

Materiali e metodi

Attività *in vitro* dei peptidi nei confronti di *A. fumigatus*

Le valutazioni dell'attività microbica *in vitro* dei peptidi selezionati nei confronti del ceppo *A. fumigatus* ATCC MYA-1163 sono state effettuate mediante saggi di CFU.

I saggi, eseguiti in triplo a scopo statistico, sono stati effettuati prelevando i conidi del ceppo in esame da una colonia, sviluppatasi su SDA dopo incubazione per 5 giorni a 30°C. Dopo opportuna conta al microscopio con un emocitometro Kova®, approssimativamente 3×10^2 conidi sono stati sospesi in H₂O con 100 µg/ml di ciascun peptide in 100 µl di volume finale, con successiva incubazione per 16 ore a 30°C. Come controlli di crescita sono stati utilizzati gli stessi inoculi di conidi in presenza di diluente (H₂O), ma in assenza di peptide.

Dopo il periodo d'incubazione, tutte le sospensioni fungine sono state seminate su SDA e, dopo 72 ore di incubazione a 30°C, sono state determinate le CFU, utilizzando lo strumento *aCOLyte Colony Counter* (PBI International). Le percentuali di inibizione della crescita sono state calcolate secondo la formula precedentemente riportata.

La significatività statistica delle differenze tra i gruppi sperimentali e di controllo è stata valutata mediante test *t* di Student.

Attività *in vitro* dei peptidi nei confronti di *S. cerevisiae* caspofungina resistente

Le valutazioni dell'attività microbica *in vitro* dei peptidi selezionati nei confronti di *S. cerevisiae* YGR032W, ceppo delecto nel gene codificante la proteina FSK2 (subunità β-1,3-D-glucano sintetasi) e quindi resistente a caspofungina, sono state effettuate mediante saggi di CFU.

I saggi, eseguiti in triplo a scopo statistico, sono stati effettuati prelevando una singola colonia del ceppo in esame, sviluppatasi su SDA dopo incubazione per 24 ore a 37°C. Dopo opportuna conta al microscopio con un emocitometro Kova®, approssimativamente 3×10^2 cellule sono state sospese in H₂O con opportune e diverse concentrazioni (µg/ml) di ciascun peptide in 100 µl di volume finale, con successiva incubazione per 6 ore a 30°C. Come controlli di crescita sono stati utilizzati gli stessi inoculi di cellule in presenza di diluente (H₂O), ma in assenza di peptide.

Dopo il periodo d'incubazione, tutte le sospensioni fungine sono state seminate su SDA e, dopo 48 ore di incubazione a 37°C, sono state determinate le CFU, utilizzando lo strumento *aCOLyte Colony Counter* (PBI International). Le percentuali di inibizione della crescita sono state calcolate secondo la formula precedentemente riportata.

La significatività statistica delle differenze tra i gruppi sperimentali e di controllo è stata valutata mediante test *t* di Student.

Attività candidacida *in vitro* dei peptidi nel tempo (*time killing*)

Le valutazioni dell'attività candidacida *in vitro* nel tempo dei peptidi selezionati nei confronti del ceppo *C. albicans* SC5314 sono state effettuate mediante saggi di CFU.

I saggi, eseguiti in triplo a scopo statistico, sono stati effettuati prelevando una singola colonia del ceppo in esame, sviluppatasi su SDA dopo incubazione per 24 ore a 37°C, e incubando le cellule di *C. albicans* in terreno 199 per un'ora in agitazione (150 rpm) a 37°C. Dopo opportuna conta al microscopio con un emocitometro Kova®, approssimativamente 3×10^2 cellule sono state sospese in H₂O con un'opportuna concentrazione di ciascun peptide in 100 µl di volume finale, rispettivamente con 20 µg/ml e 5 µg/ml per N10K e T11F, con successiva incubazione a 37°C. Come controlli di crescita sono stati utilizzati gli stessi inoculi di cellule in presenza di diluente (H₂O), ma in assenza di peptide.

Tutte le sospensioni fungine sono state seminate su SDA dopo tempi diversi d'incubazione, precisamente dopo 30, 90, 150, 210, 300 e 360 minuti, e sono state determinate le CFU, dopo 24 ore di incubazione a 37°C, utilizzando lo strumento *aCOLyte Colony Counter* (PBI International). Le percentuali di inibizione della crescita sono state calcolate secondo la formula riportata precedentemente.

Attività *in vitro* dei peptidi nei confronti di HIV-1

In collaborazione con il gruppo di ricerca del Dr. Claudio Casoli del Dipartimento di Scienze Cliniche L. Sacco, Sezione di Malattie Infettive e di Immunopatologia dell'Università di Milano, sono stati intrapresi saggi finalizzati a valutare la potenziale attività *in vitro* dei peptidi selezionati nei confronti del virus HIV-1.

Inizialmente, è stata determinata la vitalità cellulare mediante saggio AlamarBlue.

Cellule mononucleate (PBMC), ottenute dal sangue periferico di individui sani, sono state mantenute in coltura alla concentrazione di 2×10^6 /ml, in piastre da 96 pozzetti in terreno RPMI 1640 supplementato con il 10% di FCS, 1% di glutammina e 20 UI/ml di interleuchina-2 ricombinante (rIL-2), per 24 ore prima del trattamento con i peptidi; questi ultimi sono stati aggiunti a concentrazioni crescenti (1, 10 e 20 µg/ml), con successiva incubazione per 24 ore. Il reagente AlamarBlue (Biosource International, Inc.) è stato aggiunto al 10% v/v con successiva incubazione per 4 ore a 37°C. L'assorbanza è stata misurata con un lettore di piastre ELISA (Tecan Sunrise Absorbance Reader) alle lunghezze

Materiali e metodi

d'onda di 570 e 595 nm. AlamarBlue aggiunto al terreno RPMI completo è stato usato come bianco.

Per verificare le attività anti-HIV-1 dei peptidi in esame, è stata effettuata una infezione *in vitro* applicando due diversi approcci sperimentali. PBMC da tre donatori sani sono stati purificati mediante centrifugazione in gradiente di densità su Ficoll, mescolati in pool e coltivati in terreno RPMI 1640 (10% FBS, 1% glutammina e 1% di penicillina/streptomicina). Prima dell'infezione le cellule sono state stimulate per 24 ore con Fitoemagglutinina (PHA 5 mg/ml) e dopo con rIL-2 (20 UI/ml).

Nel primo protocollo, PBMC sono stati infettati con il virus HIV IIIB (X4) o BaL (R5) (0,5 m.o.i) per due ore, lavati due volte e coltivati in piastre da 96 pozzetti per 12 giorni in presenza dei peptidi (10 µg/ml), aggiunti insieme a rIL-2 ogni 4 giorni.

Nel secondo protocollo, invece, PBMC sono stati pre-incubati per due ore a 37°C con i peptidi (10 µg/ml), infettati con HIV IIIB o BaL (0,5 m.o.i) per due ore, lavati due volte e coltivati per 12 giorni, aggiungendo rIL-2 (20 UI/ml) ogni 4 giorni. In entrambi i protocolli, PBMC sono raccolti ai giorni 8 e 12 dall'infezione. La replicazione virale è stata valutata misurando la concentrazione dell'antigene p24 nei sopranatanti colturali mediante *HIV p24 ELISA Ultrasensitive detection kit* (PerkinElmer, Inc.).

Per verificare un effetto di adesione superficiale mediato dai peptidi nelle cellule infette o in quelle normali, PBMC da tre donatori sani sono stati purificati mediante centrifugazione in gradiente di densità su Ficoll, mescolati in pool e coltivati in terreno RPMI 1640 (10% FBS, 1% glutammina e 1% di penicillina/streptomicina). Le cellule sono state seminate alle concentrazioni di 5×10^5 , 3×10^5 e 1×10^5 /ml in piastre da 96 pozzetti per 7 giorni in presenza di rIL-2 (20 UI/ml) e dei peptidi (10 µg/ml). I peptidi e la rIL-2 sono stati aggiunti anche dopo 4 giorni di coltura. Al settimo giorno di coltura le cellule sono state osservate al microscopio per analizzare l'effetto di aggregazione.

È stata valutata l'attitudine alla formazione di sincizi di cellule CD4+ trattate con peptidi rispetto a controlli non trattati. Linee cellulari CHO33T, HeLa ADA e HeLa LAI, che esprimono costitutivamente la glicoproteina gp120 sulla loro superficie, sono state seminate alla concentrazione di $2,5 \times 10^5$ /pozzetto in piastre da 6 pozzetti e coltivate per 24 ore in terreno MEM ad elevato contenuto di glucosio (10% FBS, 1% glutammina, 1% di penicillina/streptomicina, 1% di sodio piruvato; G418 è stato aggiunto alla coltura cellulare CHO33T). Il giorno dopo, i linfociti T CD4+ da tre donatori sani sono stati isolati mediante selezione positiva (Miltenyi Biotec Inc.), riuniti insieme e co-coltivati in terreno completo RPMI 1640 alla concentrazione di 1×10^6 /pozzetto con le linee cellulari CHO33T e HeLa in

presenza dei peptidi (10 µg/ml). Cellule non trattate sono state utilizzate come controlli. La formazione di sincizi è stata osservata dopo 18 ore di incubazione a 37°C.

Valutazione dell'attività terapeutica *in vivo* di peptidi anticorpali selezionati

Attività terapeutica *in vivo* in un modello di infezione sperimentale sistemica

L'attività terapeutica dei peptidi è stata verificata in un modello murino di infezione sistemica letale causata da un ceppo altamente virulento di *C. albicans*. In particolare, gruppi di 8 topi Balb/c femmine di 8 settimane (Harlan Nossan Laboratories, Italia) sono stati infettati per via intravenosa con inoculo di 2×10^6 o 5×10^5 cellule di *C. albicans* CA-6 in 100 µl di soluzione salina, per valutare rispettivamente la sopravvivenza dei topi e la carica fungina renale, e trattati per via intraperitoneale con 50 µg o 100 µg, rispettivamente dei peptidi N10K e MoA V_HCDR3, 1, 24 e 48 ore dopo l'infezione. Come controllo negativo e positivo sono stati utilizzati gruppi di animali non trattati o ugualmente trattati con un peptide già dimostratosi inattivo nei confronti di *C. albicans* o privo di attività immunomodulante (SP o V_LCDR3) o con il peptide KP (362). La sopravvivenza degli animali infettati è stata monitorata per 30 giorni e negli animali morti è stata verificata la presenza di *C. albicans* nel rene. Le curve di sopravvivenza dei topi infettati sono state analizzate mediante il Mantel-Cox Logrank test. La quantificazione della crescita fungina è stata saggiata dopo 5, 7 e 12 giorni dall'infezione, piastrando diluizioni seriali dell'omogenato di rene su SDA. La significatività statistica delle differenze tra i gruppi sperimentali e di controllo è stata stabilita mediante test *t* di Student.

Attività terapeutica *in vivo* in un modello di infezione sperimentale mucosale

Sono state valutate le potenziali proprietà terapeutiche a livello mucosale dei peptidi N10K e T11F in un modello di infezione sperimentale vaginale in topi causata da ceppi altamente virulenti di *C. albicans*, in collaborazione con il gruppo di ricerca della Prof.ssa Flavia De Bernardis del Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate dell'Istituto Superiore di Sanità di Roma. In particolare, 0,02 mg di estradiolo benzoato (Estradiolo, Amsa Farmaceutici srl, Roma, Italia) in 100 µl di soluzione salina sono stati iniettati per via sottocutanea in topi Balb/c femmine (18-21 giorni; Charles River Calco, Italia) 48 ore prima dell'inoculo con *Candida* e in seguito settimanalmente. Gli animali sono stati infettati per via

Materiali e metodi

intravaginale con un inoculo di 10^6 cellule di lievito in 20 μ l di soluzione salina per i due differenti ceppi di *C. albicans* saggiati, SA40 e AIDS 68, quest'ultimo fluconazolo resistente. L'inoculo è stato dispensato nella cavità vaginale mediante una siringa dotata di un puntale multiuso calibrato (Combitip; PBI, Milano, Italia). Le cellule di lievito sono state precedentemente cresciute in YPD brodo a 28°C in agitazione (200 rpm), recuperate dopo centrifugazione, lavate, contate e risospese alla concentrazione desiderata in soluzione salina. I peptidi N10K e T11F sono stati somministrati per via intravaginale alla concentrazione di 20 μ g 1, 24 e 48 ore dopo l'infezione. Il numero di cellule nel fluido vaginale è stato contato coltivando 100 μ l di campioni vaginali, recuperati dal lavaggio della cavità vaginale mediante aspirazione di 100 μ l di soluzione salina sterile, ripetuta quattro volte, alle diluizioni seriali di fattore 10 su SDA contenente cloramfenicolo (50 mg/ml). Le CFU sono state contate dopo un'incubazione per 48 ore a 28°C. La carica fungina è stata monitorata a diversi intervalli di tempo, in particolare ai giorni 1, 2, 5, 7, 14, 21, 28 e al tempo zero come controllo.

Valutazione dell'attività immunomodulante *in vitro* di peptidi anticorpali selezionati su cellule immunitarie umane e murine

Sono state valutate le potenziali proprietà immunomodulanti dei peptidi selezionati nei confronti di cellule immunitarie umane e murine, in collaborazione con il gruppo di ricerca della Prof.ssa Anna Vecchiarelli del Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche, Sezione di Microbiologia, dell'Università di Perugia.

Separazione cellulare

PBMC, monociti e leucociti polimorfonucleati neutrofilari peritoneali (PMN) umani sono stati recuperati da sangue ottenuto da donatori sani, tramite centrifugazione su gradiente di densità attraverso l'utilizzo di Ficoll-Hypaque. Cellule dendritiche (DC) immature sono state ottenute mediante trattamento dei monociti per 5-6 giorni con GM-CSF e hrIL-4 (Biosource, Camarillo, CA). Macrofagi sono stati ottenuti da monociti (MDM) mediante trattamento dei monociti umani per 5 giorni con *recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* umano specifico per i macrofagi (Biosource). PMN e macrofagi (PM) murini sono stati ottenuti rispettivamente dopo 1 o 4 giorni di trattamento intraperitoneale con 1 ml di una soluzione acquosa al 10% di Tioglicolato (Difco) non contaminato da endotossina. DC e linfociti CD4+ murini sono stati separati partendo dalle milze di topi BALB/c (Harlan Nossan Laboratories) mediante l'utilizzo di mAb N-418 o L3T4 coniugato a microbiglie (Miltenyi Biotec) e separati magneticamente secondo le istruzioni del produttore.

Produzione citochinica

PBMC o PMN (tutti alla concentrazione di 5×10^6 /ml) umani, recuperati da sangue ottenuto da donatori sani tramite centrifugazione su gradiente di densità attraverso l'utilizzo di Ficoll-Hypaque, sono stati incubati in terreno RPMI 1640 addizionato di 10% FCS per 18 ore o 6 ore rispettivamente in presenza o in assenza (NS) di LPS, di un controllo negativo (NC: peptide SP) o dei peptidi (tutti alla concentrazione di 10 μ g/ml) a 37°C e 5% CO₂. Dopo incubazione, il supernatante colturale è stato raccolto e saggiato per la presenza di citochine TNF- α e IL-6 mediante specifici test ELISA (Biosource).

Inoltre, PM (5×10^6 /ml) murini sono stati coltivati come descritto sopra in presenza o in assenza di wortmannina (4 nM) o SB203580 (0,2 mM) (entrambi da Sigma). Dopo incubazione, i supernatanti sono stati raccolti e saggiati per i livelli di TNF- α mediante specifici saggi ELISA.

La produzione di citochine è stata verificata anche in PBMC umani incubati 30 minuti in presenza o in assenza (NS) di SP o peptidi (alla concentrazione di 10 μ g/ml). Dopo incubazione, i PBMC sono stati stimolati per 18 ore con LPS (10 μ g/ml) o CA-6 inattivata al calore (h.i.) (E/T 1:10) e i livelli di IL-12p40 e IL-6 sono stati determinati nei supernatanti mediante opportuni saggi ELISA.

Il titolo citochinico è stato calcolato in riferimento a curve standard, costruite con quantità conosciute di citochine ricombinanti.

Legame e *uptake* dei peptidi alle cellule

L'*uptake* dei peptidi da parte delle diverse cellule immunitarie è stato valutato mediante analisi della coordinazione temporale e spaziale del legame e dell'endocitosi dei peptidi. Allo scopo sono stati utilizzati peptidi biotinilati (b-peptidi), dopo aver verificato che essi erano in grado di esercitare un'attività fungicida comparabile a quella degli originali, mediante saggi comparativi di CFU. Come controlli, sono stati utilizzati peptidi SP non coniugati a biotina o biotinilati (b-SP). È stato preventivamente verificato che il trattamento delle cellule con i peptidi o i b-peptidi non influenzi la vitalità cellulare (98% in tutte le determinazioni, come valutato mediante l'utilizzo di MTT o Trypan Blue).

In particolare, per quanto riguarda il legame dei peptidi alle molecole di superficie cellulare, DC, PM, PMN e CD4+ murini sono stati incubati in terreno completo a 37°C e 5% CO₂ per un'ora con il peptide b-V_HCDR3 murino o b-SP. Per evidenziare il pool totale dei peptidi internalizzati, le cellule sono state fissate con una soluzione di formalina al 4% per 5 minuti, lavate, permeabilizzate per 5 minuti a temperatura ambiente (Ta) con PBS allo 0,1% di

Materiali e metodi

saponina (Sigma). Dopo incubazione, le cellule sono state marcate con un mAb specifico per la biotina coniugato al fluorocromo FITC (isotipo IgG1 di topo) (Miltenyi Biotec) con incubazione per 20 minuti in ghiaccio e analizzate con il citofluorimetro FACScan (BD Biosciences). La presenza dei peptidi all'interno delle cellule è stata calcolata sottraendo alla quantità totale di peptide evidenziata, la quantità di quello legato alla superficie cellulare. Come controllo sarà utilizzato il corrispondente b-SP. I dati sono riportati come intensità media di fluorescenza (MFI) o percentuale di cellule positive.

Studi di microscopia a fluorescenza sono stati condotti incubando PM murini per un'ora a 37°C e 5% CO₂ con b-V_HCDR3 murino o b-SP (entrambi a 10 µg/ml) in terreno completo. Dopo incubazione, le cellule sono state fatte reagire con un mAb specifico per la biotina marcato con FITC in presenza di Blue di Evans (StemCell Technologies Inc.) come contrasto, e successivamente esaminate al microscopio a fluorescenza (Carl Zeiss Jena).

Studio del network delle proteine di segnale a seguito dell'interazione con i peptidi selezionati

Pathway PI3K-Akt

È stata analizzata l'attivazione del pathway che coinvolge PI3K-Akt, in seguito all'interazione delle cellule immunitarie con i peptidi. Akt fosforilato attiva diversi fattori di trascrizione che traslocano nel nucleo e mediano l'attivazione e/o l'inibizione dell'espressione di vari geni bersaglio determinando sopravvivenza cellulare, crescita cellulare e proliferazione.

Espressione di TLR-4 rilevata mediante analisi citofluorimetrica

PM murini (1×10^6 /ml) sono stati incubati in presenza o assenza di MoA V_HCDR3, LPS o SP (tutti a 10 µg/ml) in terreno completo a 37°C e 5% CO₂ per un'ora. Dopo incubazione, le cellule sono state fissate con formalina al 4% per 5 minuti a Ta, lavate, permeabilizzate per 5 minuti con PBS allo 0,1% di saponina, lavate e incubate per 20 minuti a 4°C con 0,5 µg/10⁶ cellule di un mAb specifico per TLR-4 coniugato al fluorocromo R-ficoeritrina (RPE) (isotipo di ratto IgG2a) (Chemicon Int.). Dopo incubazione, le cellule sono state lavate due volte con PBS allo 0,1% di saponina, risospese in TF e analizzate mediante citofluorimetro FACScan (BD Biosciences).

Inoltre, PM murini (1×10^6 /ml) sono stati coltivati per un'ora in terreno completo a 37°C e 5% CO₂ con MoA V_HCDR3, LPS o SP (tutti a 10 µg/ml) in presenza o assenza di 0,5 µg/ml di un mAb specifico per TNF-α (isotipo IgG di criceto armeno) (BioLegend). Dopo incubazione, le cellule sono state fissate, permeabilizzate, lavate e incubate per 20 minuti con un mAb specifico

per TLR-4 coniugato a RPE. Le cellule sono state poi lavate due volte con PBS allo 0,1% di saponina e analizzate mediante citofluorimetro FACScan. I dati sono espressi come percentuale di cellule positive e la colorazione delle cellule con Ab irrilevanti come controllo negativo è stata utilizzata per ottenere i valori di fondo di fluorescenza.

Estrazione delle proteine, quantificazione e Western Blotting

PM murini (3×10^6 /ml) sono stati incubati per un'ora in presenza o in assenza di wortmannina (4 nM) e MoA V_HCDR3, LPS o SP (tutti a 10 µg/ml) in terreno completo a 37°C e 5% CO₂. Dopo incubazione, le cellule sono state lavate e lisate con il reagente di estrazione delle proteine di mammifero (M-PER) in presenza di inibitori delle proteasi e delle fosfatasi (tutti Pierce). La concentrazione delle proteine è stata determinata mediante *BCA protein Assay Reagent* (Pierce). I lisati (30 µg) sono poi stati separati mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide al 10% di sodio dodecil-solfato (SDS-PAGE), trasferiti su una membrana di nitrocellulosa (Pierce) per un'ora a 100 V in un sistema di blottaggio (Bio-Rad, Hercules, CA), per eseguire un'analisi Western Blot, e le membrane sono state poi incubate tutta la notte con Ab policlonali di coniglio specifici per fosfo-Akt (pAkt; diluizione 1/1000) e fosfo-IkBa (pIkBa; diluizione 1/1000) (entrambi Cell Signalling Technology) e un Ab policlonale di ratto specifico per TLR-4 (diluizione 1/200) (Santa Cruz Biotechnology Inc.). La determinazione è stata eseguita con un appropriato Ab secondario coniugato ad HRP, seguita dalla rilevazione mediante *ChemiLucent Trial* (Chemicon Int.). Le bande immunoreattive sono state visualizzate con lo strumento Chemidoc (Bio-Rad).

L'*immunoblotting* con Ab policlonali di ratto specifici per Akt, IkBa e actina (Cell Signalling Technology), tutti diluiti 1/1000, sono stati usati come controlli di carico interno, per garantire equivalenti quantità di proteina in ogni linea.

Real-time RT-PCR (qRT-PCR)

L'espressione dei geni che codificano per citochine proinfiammatorie, come TNF- α , o che codificano per recettori PRR, come TLR-4, è stata analizzata mediante real-time PCR (RT-PCR). PM murini (1×10^6 /ml) sono stati coltivati per un'ora in terreno completo a 37°C e 5% CO₂ con MoA V_HCDR3, LPS o SP (tutti a 10 µg/ml) in presenza o assenza di 0,5 µg/ml di un mAb specifico per TNF- α (isotipo IgG di criceto armeno). Dopo incubazione, le cellule sono state lisate con Trizol (Invitrogen), per estrarre l'RNA totale. La reazione di trascrittasi inversa (RT) è stata eseguita mediante l'utilizzo di trascrittasi inversa del virus della leucemia murina Moloney (M-MLV RT), come indicato dal produttore (Invitrogen), utilizzando i primer selezionati con il programma Beacon Designer (Bio-Rad), elencati in **Tabella 6**.

Materiali e metodi

RT-PCR quantitativa è stata eseguita in piastre PCR da 96 pozzetti utilizzando *SYBR green* (BioRad). Per la reazione di RT-PCR sono stati utilizzati 100 ng/μl di RNA e i cDNA sono stati normalizzati rispetto al gene di controllo interno GADPH. I cloni TNF-α, TLR-4 e GADPH da utilizzare come standard sono stati preparati mediante PCR dai cDNA derivati da PM, clonati nel vettore p-Drive (Qiagen) e verificati mediante analisi di sequenza. Il DNA plasmidico è stato diluito 10 volte e la concentrazione di partenza per le diluizioni seriali era di 10⁸ copie del gene/ml. Le condizioni di amplificazione sono state le stesse per gli mRNA di TNF-α, TLR-4 e GADPH saggiati: 3 minuti a 95°C, 40 cicli di 10 secondi a 95°C e 30 secondi a 62°C. Per la curva di *melting*, le condizioni di amplificazione sono state: 1 minuto a 50°C e 90 cicli di 10 secondi a 50°C. Gli esperimenti sono stati condotti usando iCycler IQ Multicolor Real-time PCR Detection System (BioRad).

Tabella 6. Sequenze dei primer utilizzati per la RT-PCR quantitativa.

Gene	Primer forward (5'-3')	Primer reverse (5'-3')	bp
GADPH	GCCTCCGTGTTCTACCC	CAGTGGGCCCTCAGATGC	117
TNF-α	CGCTCTTCTGTCTACTGAACTTCG	GATGATCTGAGTGTGAGGGTCTGG	115
TLR-4	CACTGTTCTTCTCCTGCCTGAC	AGGGACTTTGCTGAGTTTCTGATC	104

Primer disegnati con il programma Beacon Designer (Bio-Rad) e forniti da Invitrogen; bp: lunghezza in coppie di basi del frammento ottenuto.

Pathway Dectina-1

Espressione di Dectina-1 rilevata mediante analisi citofluorimetrica

È stata valutata l'espressione superficiale di Dectina-1 in PBMC umani, incubati per 30 minuti in presenza o assenza (NS) di un ceppo di *C. albicans* inattivato al calore (h.i. CA-6) (E/T 1:10), di SP o dei peptidi (tutti alla concentrazione di 10 μg/ml) in terreno completo a 37°C e 5% CO₂. Dopo incubazione, le cellule sono state fissate con formalina al 4% per 5 minuti a Ta, lavate, permeabilizzate per 5 minuti con PBS allo 0,1% di saponina, lavate e incubate per 20 minuti a 4°C con un mAb specifico per Dectina-1 coniugato a RPE (isotipo di ratto IgG2a) (Chemicon Int.). Dopo incubazione, le cellule sono state lavate due volte con PBS allo 0,1% di saponina, risospese in TF e l'espressione superficiale è stata analizzata mediante citofluorimetro FACScan (BD Biosciences).

Estrazione delle proteine, quantificazione e Western Blotting

La modulazione delle proteine coinvolte nel pathway di attivazione di Dectina-1 da parte del peptide N10K, è stata valutata anche mediante Western Blotting, come descritto precedentemente.

PBMC umani (3×10^6 /ml) sono stati incubati per 30 minuti in presenza o assenza di SP o N10K (entrambi alla concentrazione di 10 μ g/ml) o di piceatannolo (100 μ M) in terreno completo a 37°C e 5% CO₂. Dopo incubazione, le cellule sono state stimolate con o senza Zymosan per 5, 15 o 30 minuti, lavate e lisate con M-PER in presenza di inibitori delle proteasi e delle fosfatasi (tutti Pierce). La concentrazione delle proteine è stata determinata tramite il kit *BCA protein Assay Reagent* (Pierce). I lisati (30 μ g) sono poi stati separati mediante SDS-PAGE 10%, trasferiti su una membrana di nitrocellulosa (Pierce) per un'ora a 100 V in un sistema di blottaggio (Bio-Rad), per eseguire un'analisi Western Blot, e le membrane sono state poi incubate tutta la notte con Ab policlonali di coniglio specifici per fosfo-pSyk (pSyk; diluizione 1/1000) e fosfo-IkBa (pIkBa; diluizione 1/1000) (entrambi Cell Signalling Technology) e un Ab policlonale di ratto specifico per CARD-9 (diluizione 1/200) (Santa Cruz Biotechnology Inc.). La determinazione è stata eseguita con un appropriato Ab secondario coniugato ad HRP, seguita dall'utilizzo del kit *ChemiLucent Trial* (Chemicon Int.). Le bande immunoreattive sono state visualizzate con lo strumento Chemidoc (Bio-Rad). *Immunoblotting* con Ab policlonali di ratto specifici per Syk, IkBa e actina (Cell Signalling Technology), tutti diluiti 1/1000, sono stati usati come controlli di carico interno, per garantire equivalenti quantità di proteina in ogni linea.

Valutazione dell'attività citotossica *in vitro* di peptidi anticorpali selezionati nei confronti di cellule di melanoma

Le potenziali proprietà antitumorali dei peptidi selezionati sono state valutate *in vitro* nei confronti della linea cellulare di melanoma murino B16F10-Nex2, in collaborazione con il gruppo di ricerca del Prof. Luiz R. Travassos del Dipartimento di Microbiologia, Immunologia e Parassitologia, Sezione di Oncologia Sperimentale, dell'Università Federale di San Paolo, Brasile.

Le cellule di melanoma murino B16F10-Nex2 (UNIFESP) sono state coltivate a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂ in terreno RPMI-1640 pH 7,2, addizionato con HEPES 10 mM, bicarbonato di sodio 24 mM, gentamicina 40 mg/l e FCS 10%.

I peptidi selezionati e un peptide *scramble* (SP), usato come controllo negativo, sono stati diluiti in modo scalare da 1 mM a 0,05 mM in terreno RPMI addizionato con 10% FCS e

Materiali e metodi

incubato con cellule B16F10-Nex2 (alla concentrazione di 5×10^3 cellule/pozzetto) in 100 μ l per pozzetto per 12 ore a 37°C. Ciascun peptide è stato saggiato in triplo a scopo statistico. Dopo 12 ore, l'attività citotossica dei peptidi è stata determinata valutando la vitalità cellulare con Trypan Blue.

Valutazione degli effetti citotossici *in vitro* dei peptidi selezionati

La citotossicità dei peptidi è stata valutata sia mediante saggio colorimetrico MTT sia mediante saggio emolitico. Gli effetti dei peptidi selezionati sulla vitalità cellulare è stata determinata mediante saggio colorimetrico MTT. Cellule LLC-MK2 sono state coltivate in terreno MEM addizionato al 10% di FBS, 100 U/ml di penicillina e 100 μ g/ml di streptomicina a 37°C in atmosfera umida al 5% di CO₂. Le cellule sono state seminate in triplo in pozzetti di piastre microtiter da 96 alla concentrazione di $1,5 \times 10^5/cm^2$ corrispondente a 5×10^4 cellule per pozzetto (100 μ l) e coltivate per 24 ore. Diluizioni seriali dei peptidi in terreno addizionato al 2% di FBS sono state in seguito aggiunte alle cellule e incubate per 24 ore a 37°C. Le cellule sono state successivamente trattate con MTT (50 μ g/pozzetto), e incubate per altre 2 ore a 37°C. Dopo solubilizzazione dei sali di formazano con isopropanolo acidificato (5% HCl 1M) in agitazione per 5 minuti, l'assorbanza di ciascun pozzetto è stata misurata a 540 e 620 nm. La vitalità cellulare è stata espressa come rapporto percentuale T/C dove T rappresenta la media dell'assorbanza delle cellule trattate con i peptidi e C la media dell'assorbanza dei controlli.

Per la valutazione della tossicità dei peptidi mediante saggio emolitico si è seguito un protocollo descritto in letteratura (388). I saggi sono stati condotti in doppio e sono stati eseguiti in volume finale di 400 μ l, con globuli rossi di tacchino al 2,5% in tampone fosfato (PBS) e i peptidi alla concentrazione desiderata. Come controlli negativi e positivi sono stati utilizzati rispettivamente PBS e una soluzione 1% TX-100. I campioni sono stati incubati a 37°C in agitazione (100 rpm) e, dopo 30 minuti, 2 e 24 ore, i campioni sono stati centrifugati a 800 g per 10 minuti, recuperando 100 μ l di sopranatante. La lettura dell'assorbanza è stata effettuata in piastre da 96 pozzetti a 540 e 620 nm. Tutti i valori sono stati rapportati al controllo in PBS in una scala percentuale che va dal 100% (assenza di lisi) allo 0% (lisi con TX-100).

Valutazione delle proprietà autoaggreganti dei peptidi selezionati

Le proprietà autoaggreganti dei peptidi sono state valutate mediante studi di Dicroismo Circolare (CD), effettuati in collaborazione con la dott.ssa Thelma A. Pertinhez della Sezione di Chimica e Biochimica Strutturale del Dipartimento di Medicina Sperimentale, presso il Centro Interdipartimentale Misure “Giuseppe Casnati” (CIM), dell’Università di Parma.

Soluzioni acquose dei peptidi N10K e T11F sono state allestite alla concentrazione di 100 μM , partendo da soluzioni stock iniziali rispettivamente di 1,8 mM e 1,5 mM (2 mg/ml); tali soluzioni sono state mantenute a 4°C, a diversi tempi, prima della lettura con uno spettropolarimetro Jasco J-715 (JASCO International Co. Ltd.), collegato a un sistema di termoregolazione Peltier PTC-348WI per il controllo della temperatura. Gli spettri CD (grafici dell’ellitticità θ in funzione della lunghezza d’onda) sono stati acquisiti a 20°C a lunghezze d’onda da 190 a 250 nm (lontano UV), come media di 4 determinazioni, usando cuvette in quarzo da 1 mm (Hellma, type 100-QS, match 284). Dopo aver apportato la correzione basale, la misura di ellitticità θ (mdeg) è stata convertita in ellitticità media molare per residuo $[\theta]$ ($\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$) secondo la seguente formula:

$$[\theta] = \frac{\theta}{10 \times l \times c \times n}$$

l: cammino ottico (cm)
c: concentrazione (M)
n: numero di residui del peptide

La cinetica di aggregazione del peptide N10K in soluzione acquosa 100 μM (soluzione stock 1,8 mM) è stata monitorata registrando gli spettri CD a diversi intervalli di tempo, da 1 a 570 minuti, a 20°C. Allo stesso modo, sono stati registrati gli spettri nel tempo di una soluzione peptidica 100 μM a 20 e 37°C e di soluzioni acquose 100 μM di peptide appena preparate, dopo aggiunta di laminarina 500 μM (Sigma) o di cellule di *C. albicans* ($\sim 5 \times 10^7/\text{ml}$).

Successivamente, è stata seguita la denaturazione termica di una soluzione 100 μM del peptide N10K (soluzione stock 1,8 mM), da 20 a 90°C, con riscaldamento del tubo polarimetrico di 1°C/min, monitorando a 201 nm, lunghezza d’onda alla quale corrisponde una banda positiva per strutture a foglietto β ed una negativa per strutture denaturate. Sono stati registrati i profili spettrali completi a lunghezze d’onda da 190 a 250 nm sia a 20°C che a 90°C; inoltre è stata osservata la reversibilità dell’aggregazione, monitorando l’attività dicroica al diminuire della temperatura di 10°C per volta, partendo da 90°C fino a 20°C. È stata così stabilita la temperatura di *melting* (T_m), ovvero la temperatura alla quale metà dei peptidi si trovano nello stato di aggregazione a foglietto β e metà in quello denaturato.

Materiali e metodi

È stata effettuata anche la denaturazione termica di una soluzione 100 μM del peptide N10K (soluzione stock 1,8 mM) in presenza di laminaria 500 μM , nelle condizioni descritte in precedenza.

Risultati

Peptidi Fc

Analisi bioinformatica

La ricerca delle sequenze corrispondenti alla porzione Fc delle Ig è stata effettuata utilizzando la Banca Dati PIR “*Protein Information Resource*”. Successivamente, si è proceduto alla comparazione delle sequenze presenti nelle classi maggiormente rappresentative delle Ig umane ed alla selezione di tre sequenze comuni alle Fc delle maggiori classi di Ig (IgG, IgM e IgA), come riportate di seguito in formato FASTA.

IgG1:

```
>P01857 IGHG1_HUMAN Ig gamma-1 chain C region [Homo sapiens]
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSQSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
```

IgM:

```
>P01871 MUC_HUMAN Ig mu chain C region [Homo sapiens]
GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITFSWKYKNNSDISSTRGFPSVL
RGGKYAATSQVLLPSKDVMQGTDEHVVCKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVSFVPPR
DGFFGNPRSKSLICQATGFSRQIQVSWLREGKQVGSVTTDQVQAEAKESGPTTYKVT
STLTIKESDWLSQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMCPDQDTAIRVFAIPPSFASIFLTKS
TKLTCVLDLTTYDSVTISWTRQNGEAVKTHTNISESHPNATFSAVGEASICEDDWSNGE
RFTCTVTHDLPSPKQTI SRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTGFSPA
DVFVQWMQRGQPLSPEKYVT SAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEEWNTGETYTCVVAHEA
LPNRVTERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY
```

IgA:

```
>P01876 IGHA1_HUMAN Ig alpha-1 chain C region [Homo sapiens]
ASPTSPKVFPLSLCSTQPDGNVVIACLQGGFFPQEPLSVTWSESGQGV TARNFPPSQDAS
GDLYTTSSQLTLPATQCLAGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVPVPCVPSTPPTPSPSTPPTPSP
SCCHPRLSLHRPALEDLLLGSEANLTCTLTGLRDASGVTFWTWTPSSGKSAVQGPPELDL
GCYSVSSVLPGCAEPWNHGKTFCTAAYPESKTPLTATLSKSGNTFRPEVHLLPPPSEEL
ALNELVTLTCLARGFSPKDVLVRLWQGSQELPREKYL TWASRQEPSQGTTFFAVTSILRV
AAEDWKKGDTFSCMVGHEALPLAFTQKTIDRLAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY
```

Risultati

Ciascuna di tali sequenze è stata analizzata, mediante l'utilizzazione di diversi programmi informatizzati, quali BLAST, ClustalW, PeptideCutter con enzimi Tripsina e/o Chimotripsina, The Sequence Manipulation Suite 2 e ExPASy Proteomics tools (Compute pI/MW; ProtParam; MW, pI, Titration curve), e secondo criteri predeterminati.

La ricerca attraverso BLAST è stata utilizzata per comprendere le relazioni di ogni sequenza di interesse con ogni altra sequenza nota di proteine e per stabilire se le singole sequenze selezionate per ciascun isotipo immunoglobulinico fossero specifiche della porzione Fc degli Ab. Il programma è stato utilizzato anche per valutare se i singoli peptidi individuati potessero essere potenzialmente prodotti dalla digestione enzimatica della porzione Fc degli Ab; in questo modo è stato possibile definire la loro appartenenza specifica ed esclusiva alla famiglia delle Ig.

Nella fase successiva, utilizzando il programma ClustalW, è stata effettuata una serie di allineamenti multipli di tali sequenze con altre appartenenti ad Ig umane ed animali. Il rationale alla base di questa operazione è stato quello di individuare, all'interno delle sequenze di Fc delle varie classi di Ig, zone molto conservate dal punto di vista evolutivo.

Successivamente, le sequenze individuate sono state sottoposte all'analisi del programma *PeptideCutter* di ExPASy, ottenendo così una panoramica dei possibili siti di taglio degli enzimi fisiologici tripsina e/o chimotripsina nelle sequenze peptidiche individuate e delle relative percentuali di taglio.

La ricerca è stata quindi finalizzata all'ottenimento di sequenze prodotte da tagli di enzimi fisiologici in zone di Fc altamente conservate, in modo da poter valutare le attività antimicrobica, antivirale e/o immunomodulante di peptidi quantitativamente rappresentativi, utilizzando diversi approcci metodologici precedentemente ampiamente sperimentati. La selezione dei peptidi di interesse per ciascuna classe di Ig (IgG1, IgM, IgA) è stata effettuata anche in funzione di ulteriori parametri, quali la lunghezza del peptide prodotto, il punto isoelettrico e l'alternanza di amminoacidi idrofobici/idrofilici. Tali parametri sono stati presi in considerazione in quanto è noto che l'interazione, sia ionica sia idrofobica/idrofilica, di corti peptidi con pareti cellulari o membrane plasmatiche di microrganismi o con virus sembra essere di fondamentale importanza per eventuali effetti antimicrobici e/o antivirali. Come riferimento, è stato utilizzato il peptide KP, caratterizzato da un punto isoelettrico (pI) pari a 8,23, e quindi carico positivamente a pH fisiologico, e da una perfetta e molto caratteristica alternanza di amminoacidi idrofobici ed idrofilici nella sua sequenza.

La ricerca, eseguita secondo i seguenti parametri:

Lunghezza del peptide (valutando solo peptidi costituiti al massimo da 11 amminoacidi, in modo da ridurre i costi di sintesi e purificazione)

Enzima proteolitico (Tripsina e/o Chimotripsina)

Percentuale di taglio

Residui conservati (Ig umane e/o di altri organismi)

Punto isoelettrico (\leq / $>$ di 8,23)

Andamento idrofobico/idrofilico (\pm alternato)

ha permesso la selezione dei peptidi riportati in **Tabella 7**, da sottoporre successivamente ai saggi di attività biologica. In Tabella sono anche elencate le principali caratteristiche dei peptidi selezionati, quali Peso Molecolare (PM) espresso in Dalton (Da), Indice di Instabilità (II), carica netta a pH fisiologico, posizione amminoacidica e dominio immunoglobulinico di appartenenza, ricavate utilizzando i software Compute pI/MW, ProtParam, MW, pI, Titration curve di ExPASy.

In **Figura 19** viene evidenziata la posizione dei peptidi selezionati all'interno delle tre sequenze comuni alle Fc delle maggiori classi di Ig (IgG, IgM e IgA), riportate in formato FASTA, mentre in **Figura 20** sono analogamente riportate in modo schematico le posizioni dei peptidi utilizzati per i saggi biologici (H4L, N10K, T11F) lungo la sequenza delle rispettive Ig (IgG1, IgM, IgA). In **Figura 21** è mostrata una rappresentazione strutturale del cristallo in forma dimerica della porzione Fc di una IgG1 umana. Nella struttura tridimensionale della proteina, mostrata a nastri e colorata per catena, sono evidenziati i peptidi H4L e N10K all'interno di ogni singola catena polipeptidica, mostrati a bastoncini con lo scheletro colorato a seconda della struttura e i residui colorati CPK (schema di colori utilizzato nei primi modelli fisici delle molecole ed è parte di un set standardizzato *open source*, non proprietario chiamato *DRuMS Color Schemes*). Dalle analisi effettuate è emerso che il peptide H4L (aa 429-432) presenta una struttura *random coil* localizzata in un *loop* esposto verso l'esterno, mentre il peptide N10K (aa 361-370) è localizzato in un foglietto β e possiede una spiccata struttura β .

Tabella 7. Caratteristiche generali dei peptidi utilizzati che ne hanno determinato la selezione.

Peptide	Isotipo	Taglio	%	Alternanza fob/fil	pI	Conservazione	# aa	PM (Da)	II	Carica netta	Posizione
HEAL	/	/	/	+-	pH 5,12	++	4	468,51	ND	-	IgG1: 312-315 CH3 IgM: 418-421 CH4 IgA: 317-320 CH3
NQVSLTCLVK	IgG1	Tryp+Tryp	81,4	-	pH 8.23	+	10	1104,33	10,30	+	244-253 CH3
SLSLSPGK	IgG1	Tryp	100	+	pH 9.01	+	8	787,91	53,06	+	323-330 CH3
GFPSVLR	IgM	Tryp+Tryp	100	-	pH 10.01	-	7	774,92	91,11	+	55-61 CH1
QIQVSW	IgM	Tryp+Chym	87,1	++	pH 5.47	-	6	759,86	-4,23	0	144-149 CH2
QIQVSWLR	IgM	Tryp+Tryp	100	+	pH 10.01	-	8	1029,21	38,83	+	144-151 CH2
TCRVDHRGLTF	IgM	Chym+Chym	63,5	+	pH 8.27	-	11	1157,31	-14,52	+	197-207 CH2

I peptidi elencati in Tabella sono stati caratterizzati per isotipo immunoglobulinico, enzima proteolitico coinvolto e percentuale di taglio % (HEAL è comune a tutte le Ig umane, non prodotto da taglio con enzimi), punto isoelettrico **pI**, numero di amminoacidi **# aa**, alternanza in sequenza di amminoacidi idrofobici/idrofilici e conservazione dal punto di vista evolutivo, classificazione che va da ++ (perfetta alternanza di amminoacidi idrofobici/idrofilici/altamente conservato) a - (alternanza casuale di amminoacidi idrofobici/idrofilici/non conservato), Peso Molecolare espresso in Dalton (Da) **PM**, Indice di Instabilità (stabile con II < 40) **II**, carica netta a pH fisiologico, posizione amminoacidica e dominio immunoglobulinico di appartenenza; ND, non determinabile; CH1, CH2, CH3, CH4, dominio immunoglobulinico costante 1, 2, 3, 4.

Risultati

IgG1:

>P01857 IGHG1_HUMAN Ig gamma-1 chain C region [Homo sapiens]
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGG
PSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
LTK**NOVSLTCLVK**GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSQSV**HEAL**HNHYTQK**SLSLSPGK**

IgM:

>P01871 MUC_HUMAN Ig mu chain C region [Homo sapiens]
GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITFSWKYKNSDISSTR**GFPSVL**
RGGKYAATSQVLLPSKDVMQGTDEHVVCKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVSFVPPR
DGFFGNPRSKSKLICQATGFSR**QIQVSWLRE**GKQVGSVTTDQVQAEAKESGPTTYKVT
STLTIKESDWLSQSMF**TCRVDHRGLTF**QONASSMCVPDQDTAIRVFAIPPSFASIFLTKS
TKLTCLVTDLTTYDSVTISWTRQNGEAVKTHTNISESHPNATFSAVGEASICEDDWSGE
RFTCTVTHDLPSPKQTI SRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTGFSPA
DVFVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEWNTGETYTCVVA**HEA**
LPNRVTERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY

IgA:

>P01876 IGHA1_HUMAN Ig alpha-1 chain C region [Homo sapiens]
ASPTSPKVFPLSLCSTQPDGNVVIACLVQGFPPQEPLSVTWSESGQGVARNFPSPQDAS
GDLYTTSSQLTLPATQCLAGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVPCVPSTPPTPSPSTPPTPSP
SCCHPRLSLHRPALEDLLGSEANLTCTLTGLRDASGVTFWTWTPSSGKSAVQGPPELDL
GCYSVSSVLPGCAEPWNHGKTFCTAAYPESKTPLTATLSKSGNTFRPEVHLLPPPSEEL
ALNELVTLTCLARGFSPKDVLRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGTTFFAVTSILRV
AAEDWKKGDTFSCMV**HEAL**PLAFTQKTIDRLAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY

Figura 19. Posizione dei peptidi selezionati all'interno delle tre sequenze comuni alle Fc delle maggiori classi di Ig (IgG, IgM, IgA), riportate in formato FASTA.

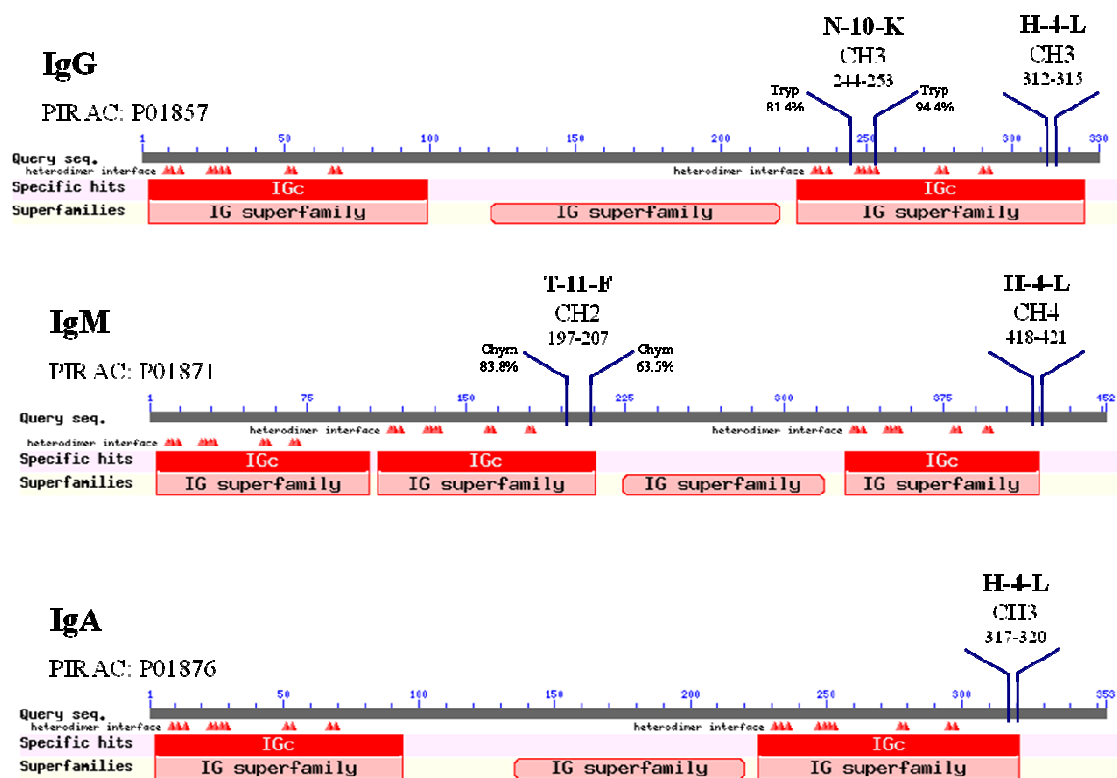


Figura 20. Posizione dei peptidi utilizzati per i saggi biologici nelle diverse immunoglobuline. Rappresentazione dei domini immunoglobulinici per ogni isotipo, con codice di accesso PIR, aminoacidi coinvolti nella formazione dell'eterodimero, posizione dei peptidi selezionati con i rispettivi enzimi di taglio e percentuali.

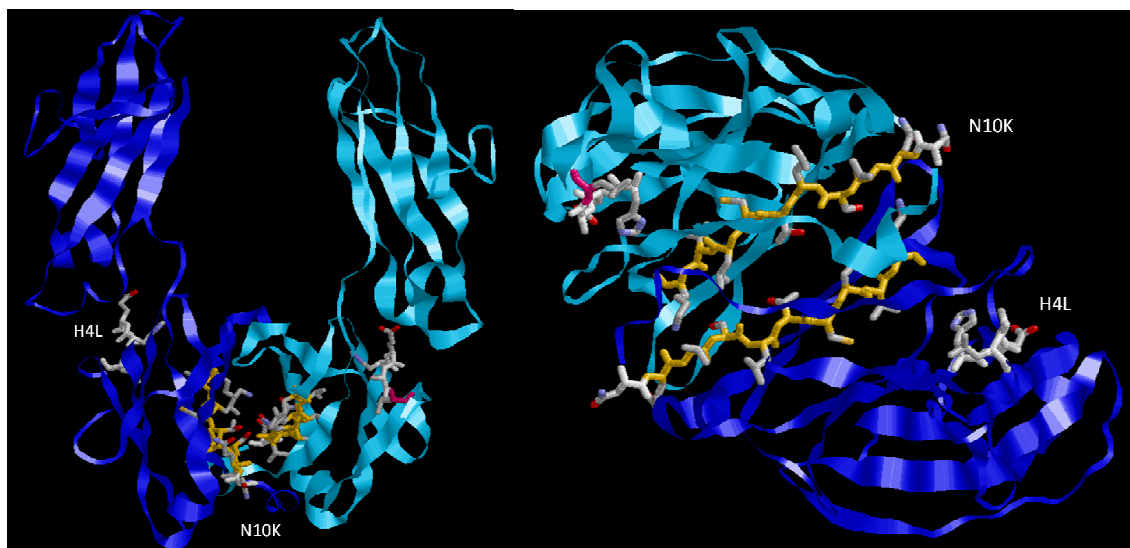


Figura 21. Riproduzione strutturale dei peptidi H4L e N10K all'interno della porzione Fc di una IgG1 umana (PDB ID: 1H3X). Le due catene polipeptidiche sono rappresentate come nastri nei colori blu e azzurro. I peptidi H4L e N10K sono evidenziati a bastoncini con colori CPK per i residui e di struttura per lo scheletro (H4L, *random coil* in grigio; N10K, *filamento-β* in giallo).

PDB ID: ID della struttura peptidica nella banca dati proteica Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>).

Risultati

Attività microbica *in vitro* dei peptidi anticorpali selezionati

Tutti i peptidi selezionati appartenenti alla porzione Fc sono stati sintetizzati in adeguate quantità e sottoposti a valutazione della attività microbica *in vitro* nei confronti di differenti ceppi microbici, procariotici ed eucariotici, mediante saggi di determinazione di Unità Formanti Colonia (CFU).

Ogni singolo saggio è stato eseguito in triplo a scopo statistico e i risultati sono riportati come numero di CFU rappresentative di esperimenti multipli.

Le cellule del ceppo in esame sono state incubate in assenza o in presenza delle diverse concentrazioni dei peptidi selezionati e successivamente sono state determinate le CFU corrispondenti con le rispettive percentuali di inibizione rispetto al controllo.

Attività microbica *in vitro* dei peptidi anticorpali selezionati nei confronti di ceppi fungini

Inizialmente, è stata valutata l'attività dei peptidi in esame a due diversi tempi dalla solubilizzazione (1 e 15 giorni), nei confronti di un ceppo fungino di riferimento, *C. albicans* SC5314. Come riportato in **Tabella 8**, dai risultati è emerso che alcuni peptidi, ed in particolare N10K, hanno mostrato una più o meno incrementata attività nel tempo, dopo 15 giorni dalla solubilizzazione. Tali risultati sono stati spiegati successivamente con studi di dicroismo circolare, in cui è stata evidenziata la capacità di N10K di aggregare in strutture a foglietto β . Nel corso dello studio sono stati riscontrati numerosi problemi di solubilità per i peptidi Q6W e Q8R, per cui si è deciso di non proseguire i saggi delle attività biologiche con tali peptidi.

Per i peptidi N10K (NQVSLTCLVK) e T11F (TCRVDHRGLTF), mostratisi maggiormente attivi nell'analisi preliminare *in vitro* nei confronti di due ceppi di lievito, *C. albicans* SC5314 e *C. neoformans* 6995, si è ritenuto di intraprendere in via del tutto preliminare, la determinazione dei valori di EC_{50} , ovvero la concentrazione di peptide in grado di uccidere il 50% delle cellule saggiate. I risultati dell'attività antifungina nei confronti di *C. albicans* di *C. neoformans* sono mostrati rispettivamente in **Figura 22** e in **Figura 23**. L'attività anti-*Candida* del peptide N10K alla concentrazione di 20 $\mu\text{g/ml}$ poteva essere completamente abolita in presenza di laminarina (β -1,3-glucano solubile) alla concentrazione di 150 $\mu\text{g/ml}$ (dati non mostrati), indicando che il legame ai β -glucani presenti nella parete cellulare dei lieviti sembra costituire una fase critica per l'attività antifungina del peptide, come precedentemente riportato per KP (389).

Tabella 8. Attività fungicida dei peptidi selezionati.

Peptide		<i>Candida albicans</i> SC5314	
100 µg/ml		% inibizione 1 g	% inibizione 15 g
H4L	HEAL	79,65	85,78
N10K	NQVSLTCLVK	81,73	98,85
S8K	SLSLSPGK	43,03	53,30
G7R	GFPSVLR	35,58	37,93
Q6W	Ac-QIQVSW	5,50	65,09
Q8R	Ac-QIQVSWLR	77,92	28,45
T11F	TCRVDHRGLTF	99,83	100,00

Il peptide N10K, in grassetto, ha mostrato una differente attività nel tempo, incrementata dopo 15 giorni di solubilizzazione. I risultati dei peptidi Ac-QIQVSW e Ac-QIQVSWLR non sono stati ritenuti attendibili per evidenti problemi di solubilità.

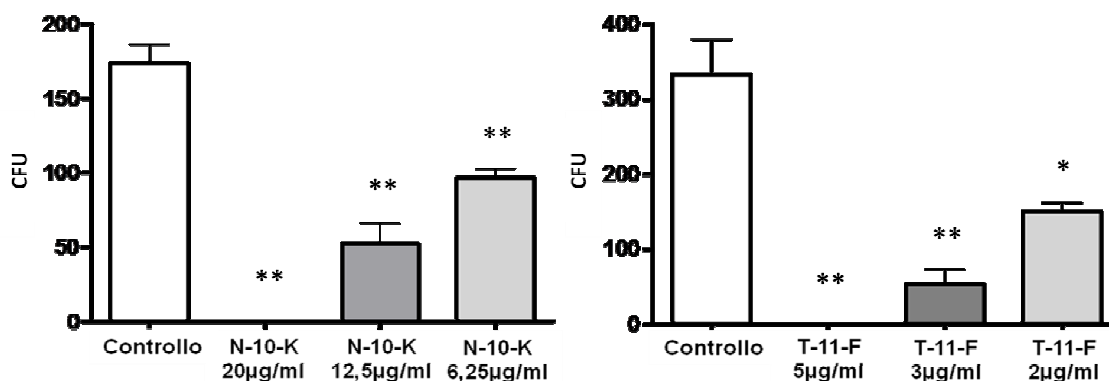


Figura 22. Attività *in vitro* dei peptidi N10K e T11F nei confronti del ceppo *C. albicans* SC5314. L'attività microbica è stata valutata mediante un convenzionale saggio di CFU. Le cellule di *C. albicans* sono state incubate a 37°C per 6 ore in presenza del peptide N10K alle concentrazioni di 20, 12,5 e 6,25 µg/ml, o del peptide T11F alle concentrazioni di 5, 3 e 2 µg/ml, o in acqua distillata come controllo di crescita. Dopo il periodo di incubazione, la sospensione cellulare è stata seminata su piastre di SDA, incubate a 37°C e osservate per la determinazione delle CFU dopo 24 ore (*P< 0,05, **P< 0,005, test *t* di Student).

Risultati

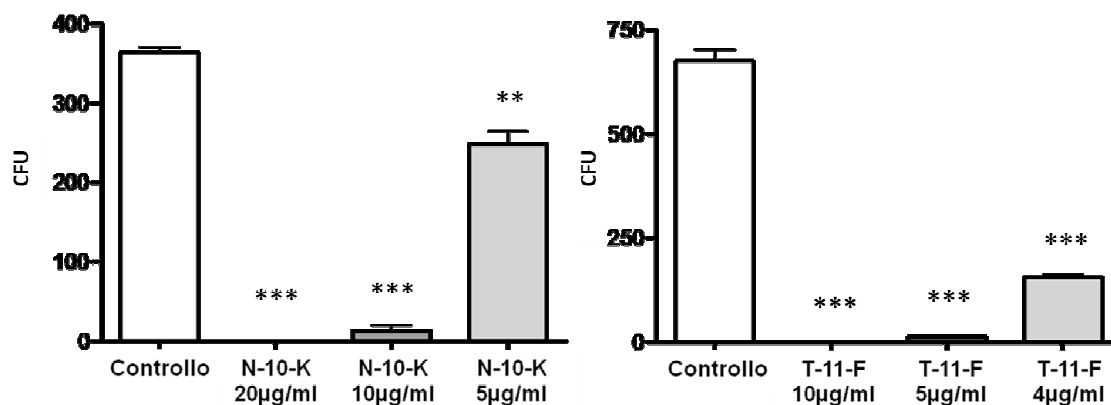


Figura 23. Attività *in vitro* dei peptidi N10K e T11F nei confronti del ceppo *C. neoformans* 6995. L'attività microbica è stata valutata mediante un convenzionale saggio di CFU. Le cellule di *C. neoformans* sono state incubate a 37°C per 6 ore in presenza del peptide N10K alle concentrazioni di 20, 10 e 5 µg/ml, o del peptide T11F alle concentrazioni di 10, 5 e 4 µg/ml, o in acqua distillata come controllo di crescita. Dopo il periodo di incubazione, la sospensione cellulare è stata seminata su piastre di SDA, incubate a 37°C e osservate per la determinazione delle CFU dopo 48 ore (**P< 0,005, ***P< 0,0001, test *t* di Student).

Ulteriori saggi di CFU hanno permesso di valutare l'attività candidacida nel tempo, alla concentrazione predefinita di 20 µg/ml per il peptide N10K e 5 µg/ml per il peptide T11F. Le sospensioni fungine incubate in presenza dei peptidi sono state seminate su SDA a intervalli di tempo di 30 minuti. I risultati hanno mostrato che il peptide N10K determina il 100% di attività fungicida dopo circa 6 ore, mentre per il peptide T11F lo stesso effetto si ottiene già dopo 30 minuti di incubazione (dati non mostrati).

L'attività microbica *in vitro* dei peptidi N10K e T11F è stata valutata anche nei confronti di ceppi fungini caspofungina-resistenti. In particolare, cellule di *C. albicans* MGUM/CASR4, un ceppo di isolamento clinico resistente a caspofungina fornito dall'Università di Milano, sono state esposte a differenti concentrazioni di entrambi i peptidi, 20 e 10 µg/ml per il peptide N10K e 5 e 2 µg/ml per il peptide T11F, mostrando una sensibilità dose-dipendente (**Figura 24/A**). Inoltre, entrambi i peptidi sono stati saggati alle concentrazioni di 20 e 10 µg/ml e 20, 10 e 5 µg/ml, rispettivamente, nei confronti di cellule di *S. cerevisiae* YGR032W, ceppo delecto nel gene codificante la proteina FSK2 (subunità dell'enzima β-1,3-D-glucano sintetasi), mostrando anche in questo caso una attività microbica dose-dipendente (**Figura 24/B**).

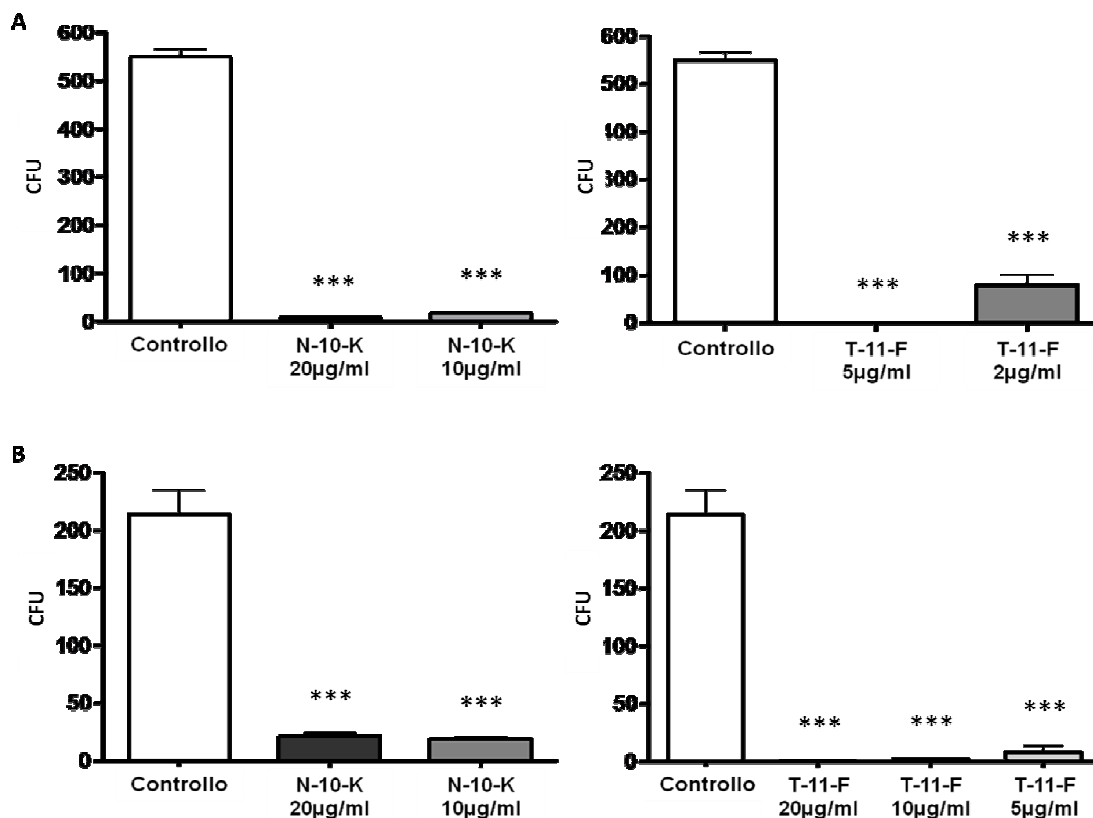


Figura 24. Attività *in vitro* dei peptidi N10K e T11F nei confronti di ceppi caspofungina-resistenti. L'attività microbica *in vitro* dei peptidi N10K e T11F è stata verificata mediante saggi di CFU. **(A)** Cellule di *C. albicans* MGUM/CASR4 caspofungina resistente, ceppo di isolamento clinico fornito dall'Università di Milano, sono state incubate a 37°C per 6 ore in presenza dei peptidi N10K e T11F rispettivamente alle concentrazioni di 20, 10 µg/ml e 5, 2 µg/ml. **(B)** Cellule di *S. cerevisiae* YGR032W, ceppo delecto nel gene codificante la proteina FSK2 (subunità dell'enzima β-1,3-D-glucano sintetasi), sono state incubate a 37°C per 6 ore in presenza dei peptidi N10K e T11F rispettivamente alle concentrazioni di 20, 10 µg/ml e 20, 10, 5 µg/ml. La differenza tra le CFU delle cellule trattate con il peptide e il rispettivo controllo, è risultata statisticamente significativa (***)P < 0,0001, test *t* di Student).

È stata valutata l'attività antifungina *in vitro* dei peptidi N10K e T11F nei confronti dei ceppi *M. furfur* 101 e *A. fumigatus* ATCC MYA-1163. In particolare, cellule di *M. furfur* sono state esposte a differenti concentrazioni di entrambi i peptidi, 10, 8 e 3 µg/ml per il peptide N10K e 2, 1 e 0,5 µg/ml per il peptide T11F, mostrando una sensibilità dose-dipendente (**Figura 25**). Parallelamente, cellule di *A. fumigatus* sono state esposte alla concentrazione di 100 µg/ml per entrambi i peptidi selezionati, mostrando una ridotta, pur se ancora significativa, sensibilità (**Figura 26**).

Risultati

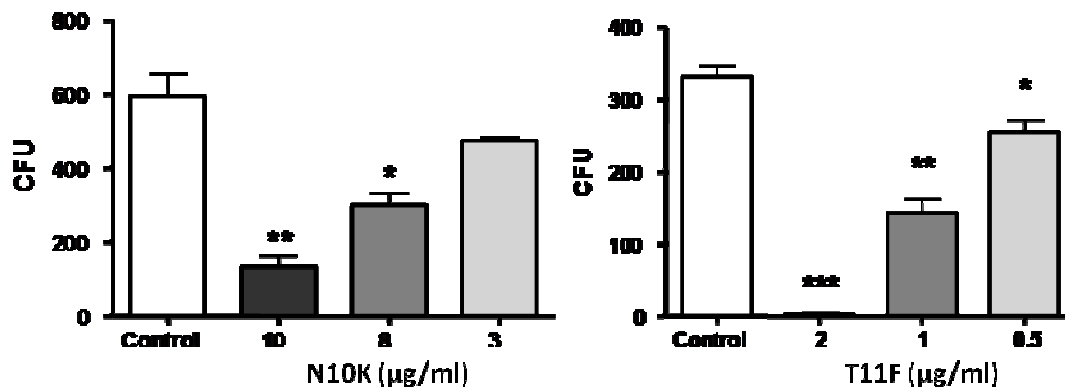


Figura 25. Attività *in vitro* dei peptidi N10K e T11F nei confronti del ceppo *M. furfur* 101. L'attività microbica dei peptidi è stata valutata in un convenzionale saggio di CFU. Cellule di *M. furfur* sono state incubate a 30°C per 6 ore in presenza dei peptidi N10K e T11F alle concentrazioni 10, 8 o 3 µg/ml e 2, 1 o 0,5 µg/ml, rispettivamente, o in acqua distillata come controllo di crescita. Dopo il periodo di incubazione, le sospensioni cellulari sono state seminate su SDA addizionato di Tween-20 (1%), successivamente incubate a 30°C e osservate per la determinazione delle CFU dopo 72 ore (*P < 0,05, **P < 0,005, ***P < 0,0001, test *t* di Student).

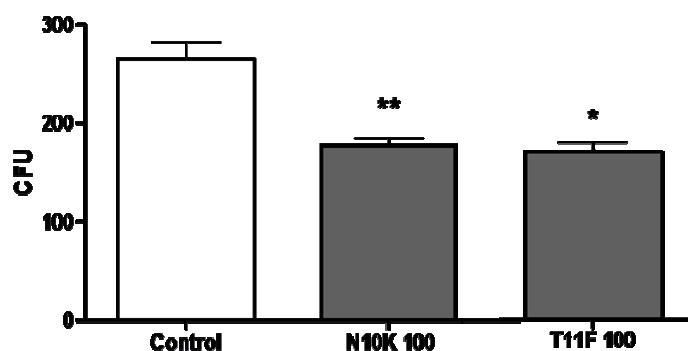


Figura 26. Attività *in vitro* dei peptidi N10K e T11F nei confronti del ceppo *A. fumigatus* ATCC MYA-1163. L'attività microbica dei peptidi è stata valutata in un convenzionale saggio di CFU. Cellule di *A. fumigatus* sono state incubate a 30°C per 18 ore in presenza dei peptidi N10K e T11F alla concentrazione di 100 µg/ml, o in acqua distillata come controllo di crescita. Dopo il periodo di incubazione, le sospensioni cellulari sono state seminate su SDA, successivamente incubate a 30°C e osservate per la determinazione delle CFU dopo 72 ore (*P < 0,05, **P < 0,005, test *t* di Student).

Inoltre, è stata analizzata l'attività antimicrobica *in vitro* del peptide H4L, comune a tutte le porzioni dei diversi isotipi delle Ig, nei confronti dei ceppi fungini descritti precedentemente. In particolare, cellule di *C. albicans* SC5314, *C. neoformans* 6995, *M. furfur* 101 e *A. fumigatus* ATCC MYA-1163, sono state esposte alla concentrazione di 100 µg/ml del peptide H4L, dimostrandosi sensibili al peptide (**Figura 27**).

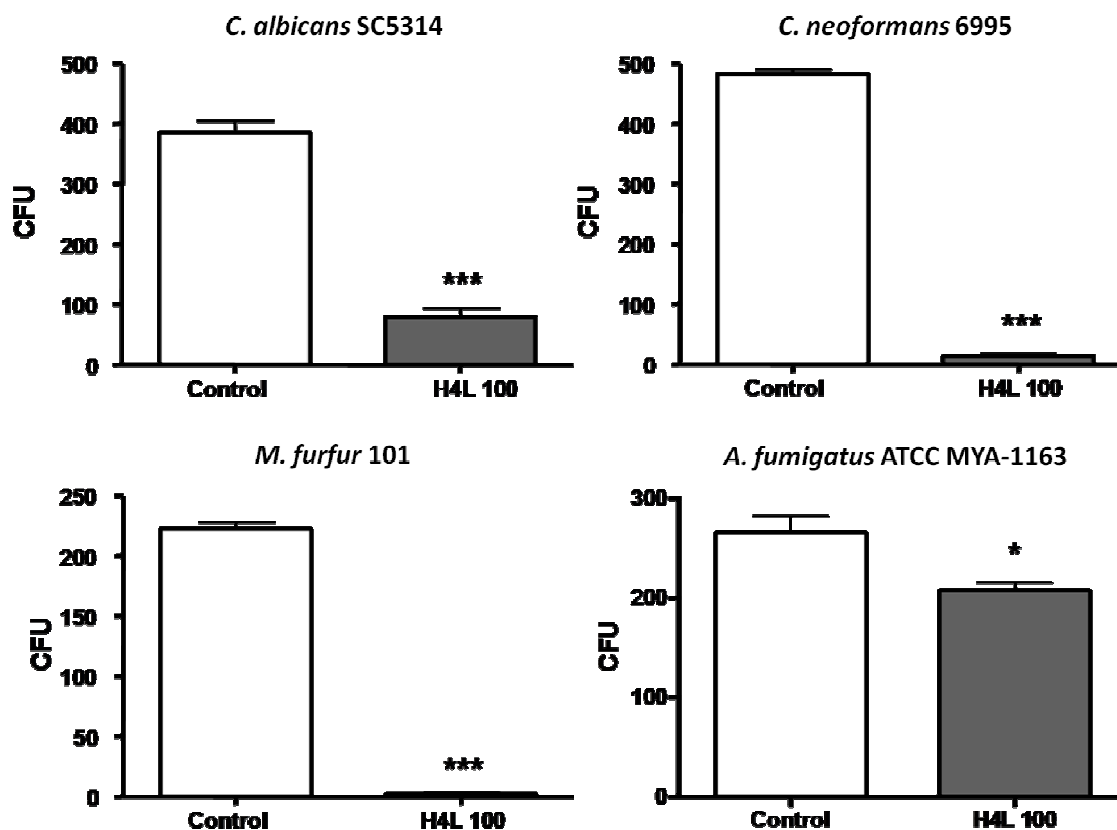


Figura 27. Attività *in vitro* del peptide H4L nei confronti di differenti ceppi fungini. L'attività microbica del peptide è stata valutata in un convenzionale saggio di CFU. Cellule di *C. albicans*, *C. neoformans*, *M. furfur* e *A. fumigatus* sono state incubate in presenza del peptide H4L alla concentrazione di 100 µg/ml o in acqua distillata come controllo di crescita. Dopo il periodo di incubazione, le sospensioni cellulari sono state seminate su SDA, successivamente incubate e osservate per la determinazione delle CFU (* $P < 0,05$, *** $P < 0,001$, test *t* di Student).

Attività microbica *in vitro* dei peptidi anticorpali selezionati nei confronti di ceppi batterici

È stata analizzata l'attività antimicrobica *in vitro* dei due peptidi risultati maggiormente attivi in saggi precedenti, N10K e T11F, e del peptide H4L, comune a tutte le porzioni dei diversi isotipi delle Ig nei confronti di ceppi batterici di interesse, quali *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa* ed *E. coli*. Per tutti i ceppi in esame i peptidi saggati hanno mostrato una differente attività dose-dipendente.

Cellule di *S. aureus* ATCC 29213 (**Figura 28**), *K. pneumoniae* ATCC 700603 (**Figura 29**), *P. aeruginosa* ATCC 25853 (**Figura 30**) e *E. coli* ATCC 25922 (**Figura 31**), sono state esposte a differenti concentrazioni di entrambi i peptidi N10K e T11F e alla concentrazione di

Risultati

100 µg/ml del peptide H4L (Figura 32), mostrando nel primo caso una sensibilità dose-dipendente.

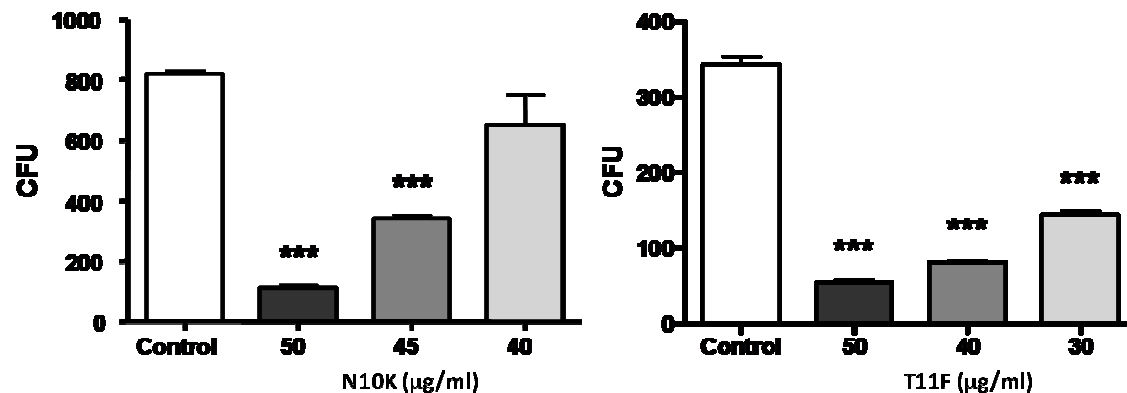


Figura 28. Attività *in vitro* dei peptidi N10K e T11F nei confronti del ceppo *S. aureus* ATCC 29213. L'attività microbica dei peptidi è stata valutata in un convenzionale saggio di CFU. Cellule di *S. aureus* sono state incubate a 37°C per 5 ore in presenza dei peptidi N10K e T11F alle concentrazioni rispettivamente di 50, 45 o 40 µg/ml e 50, 40 o 30 µg/ml, o in acqua distillata come controllo di crescita. Dopo il periodo di incubazione, le sospensioni cellulari sono state seminate su MHA, successivamente incubate a 37°C e osservate per la determinazione delle CFU dopo 24 ore (***P < 0,001, test *t* di Student).

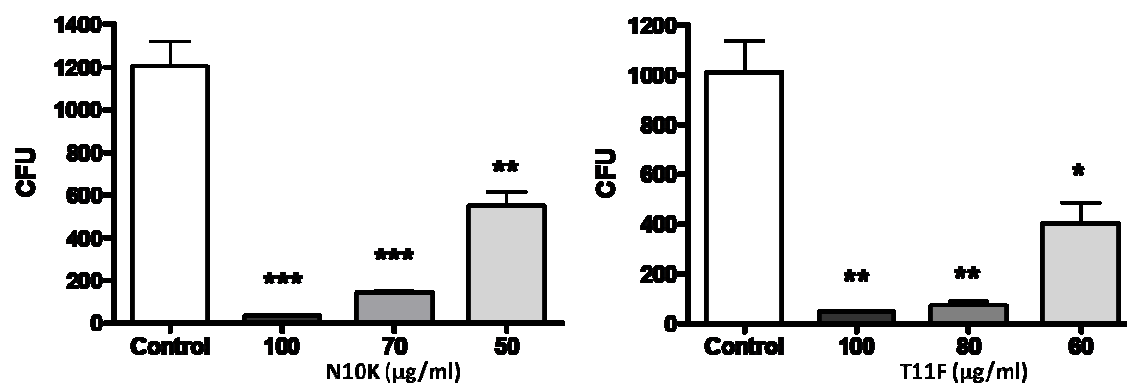


Figura 29. Attività *in vitro* dei peptidi N10K e T11F nei confronti del ceppo *K. pneumoniae* ATCC 700603. L'attività microbica dei peptidi è stata valutata in un convenzionale saggio di CFU. Cellule di *K. pneumoniae* sono state incubate a 37°C per 5 ore in presenza dei peptidi N10K e T11F alle concentrazioni rispettivamente di 100, 70 o 50 µg/ml e 100, 80 o 60 µg/ml, o in acqua distillata come controllo di crescita. Dopo il periodo di incubazione, le sospensioni cellulari sono state seminate su MHA, successivamente incubate a 37°C e osservate per la determinazione delle CFU dopo 24 ore (*P < 0,05, **P < 0,005, ***P < 0,001, test *t* di Student).

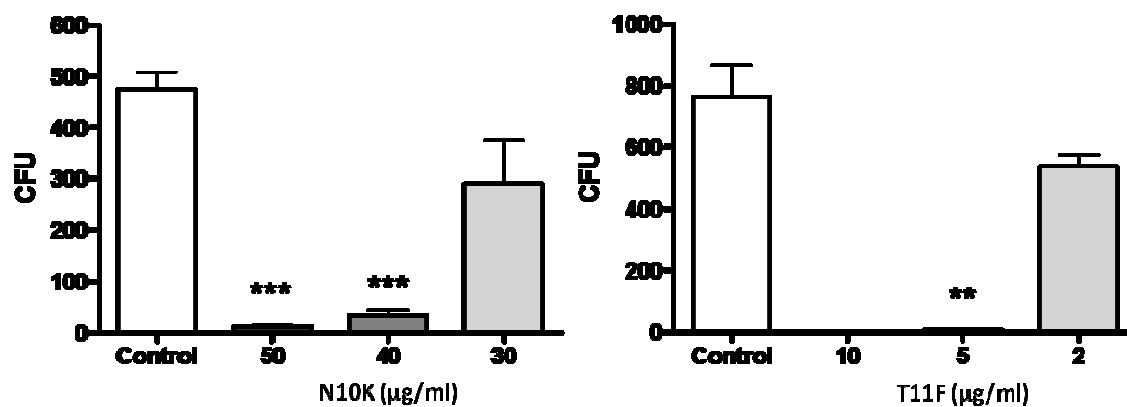


Figura 30. Attività *in vitro* dei peptidi N10K e T11F nei confronti del ceppo *P. aeruginosa* ATCC 25853. L'attività microbica dei peptidi è stata valutata in un convenzionale saggio di CFU. Cellule di *P. aeruginosa* sono state incubate a 37°C per 5 ore in presenza dei peptidi N10K e T11F alle concentrazioni rispettivamente di 50, 40 o 30 µg/ml e 10, 5 o 2 µg/ml, o in acqua distillata come controllo di crescita. Dopo il periodo di incubazione, le sospensioni cellulari sono state seminate su MHA, successivamente incubate a 37°C e osservate per la determinazione delle CFU dopo 24 ore (**P< 0,005, ***P< 0,001, test *t* di Student).

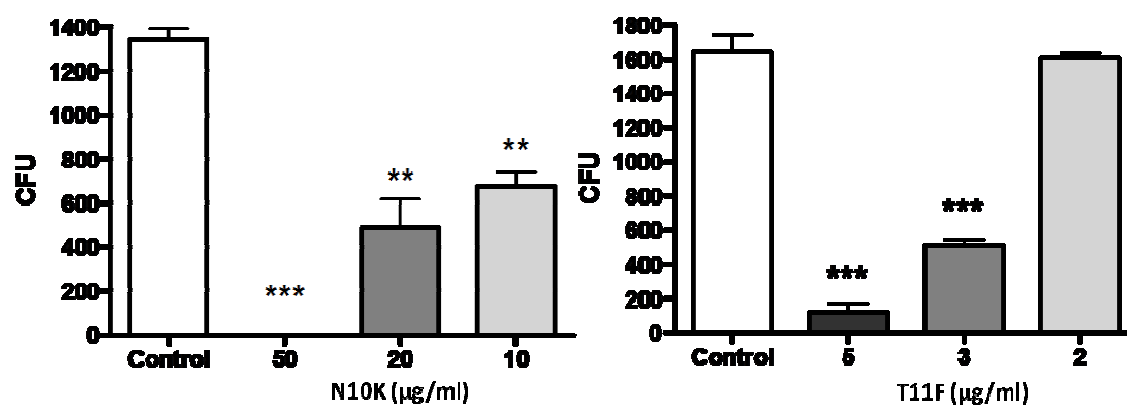


Figura 31. Attività *in vitro* dei peptidi N10K e T11F nei confronti del ceppo *E. coli* ATCC 25922. L'attività microbica dei peptidi è stata valutata in un convenzionale saggio di CFU. Cellule di *E. coli* sono state incubate a 37°C per 5 ore in presenza dei peptidi N10K e T11F alle concentrazioni rispettivamente di 50, 20 o 10 µg/ml e 5, 3 o 2 µg/ml, o in acqua distillata come controllo di crescita. Dopo il periodo di incubazione, le sospensioni cellulari sono state seminate su MHA, successivamente incubate a 37°C e osservate per la determinazione delle CFU dopo 24 ore (**P< 0,005, ***P< 0,001, test *t* di Student).

Risultati

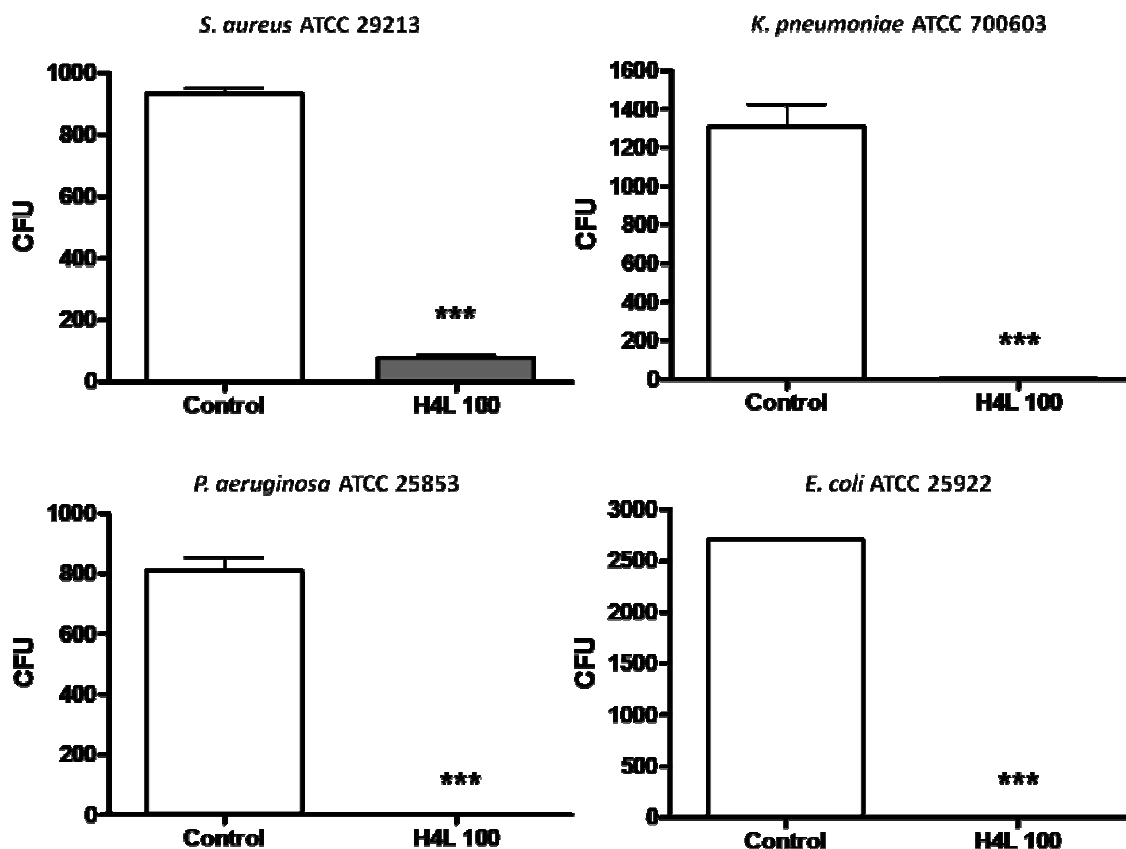


Figura 32. Attività *in vitro* del peptide H4L nei confronti di differenti ceppi batterici. L'attività microbica del peptide è stata valutata in un convenzionale saggio di CFU. Cellule di *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* ed *E. coli* sono state incubate a 37°C per 5 ore in presenza del peptide H4L alla concentrazione di 100 µg/ml o in acqua distillata come controllo di crescita. Dopo il periodo di incubazione, le sospensioni cellulari sono state seminate su MHA, successivamente incubate a 37°C e osservate per la determinazione delle CFU dopo 24 ore (***) $P < 0,001$, test *t* di Student).

Attività *in vitro* dei peptidi anticorpali selezionati nei confronti di HIV

In collaborazione con il gruppo di ricerca del Dr. Claudio Casoli del Dipartimento di Scienze Cliniche L. Sacco, Sezione di Malattie Infettive e di Immunopatologia dell'Università di Milano, sono stati intrapresi saggi finalizzati a valutare la potenziale attività *in vitro* dei peptidi N10K, T11F e H4L nei confronti di HIV-1.

Inizialmente è stata valutata la potenziale citotossicità dei peptidi di interesse, a concentrazioni crescenti (1, 10 e 20 µg/ml), nei confronti di cellule mononucleate (PBMC), ottenute dal sangue periferico di individui sani. La vitalità cellulare è stata determinata mediante saggio con AlamarBlue, effettuando misure dell'assorbanza a 570 e 595 nm. Nessuno dei peptidi saggiati ha dimostrato effetti citotossici nei confronti dei PBMC quando

saggiato a concentrazioni nel range 1-20 µg/ml; in relazione a tale osservazione, le dosi inferiore ed intermedia sono state selezionate per tutti gli esperimenti.

L'attività anti-HIV-1 è stata valutata utilizzando due diversi approcci sperimentali *in vitro*. In entrambi i casi, PBMC da donatori sani sono stati purificati e stimolati per 24 ore con Fitoemagglutinina (PHA) e, dopo l'infezione, con rIL-2.

Il primo protocollo prevedeva di infettare i PBMC con un ceppo linfocitotropico HIV IIIB (X4) o un ceppo monocitotropico BaL (R5), con successiva coltivazione per 12 giorni aggiungendo il peptide in esame insieme a rIL-2 ogni 4 giorni. Il secondo protocollo prevedeva la pre-incubazione dei PBMC con il peptide in esame e la successiva infezione con HIV IIIB o BaL. In entrambi i protocolli, i PBMC sono stati raccolti dopo 8 e 12 giorni dall'infezione. La replicazione virale è stata valutata misurando la concentrazione dell'antigene p24 nei soprannatanti colturali mediante uno specifico saggio ELISA e una sua riduzione in seguito a trattamento con i peptidi è stata considerata significativa quando superiore al 50%.

Nei ripetuti saggi di infezione *in vitro*, il peptide N10K ha mostrato una significativa attività inibente nei confronti di entrambi i ceppi virali, quando impiegato alle concentrazioni di 1 e 10 µg/ml. Nessuna differenza marcata è stata notata negli effetti indotti dalle due concentrazioni. Rispetto ai controlli non trattati, una rilevante inibizione del virus è stata osservata ancora dopo 8 giorni di infezione ed ha continuato a persistere anche al 12esimo giorno di coltura in PBMC trattati con il peptide ogni 4 giorni dopo l'infezione (**Figura 33/A**). Nel protocollo di pre-incubazione, la riduzione della replicazione virale del ceppo X4 è risultata significativa solo al giorno 8 di infezione, mentre per il ceppo ceppo R5 la replicazione virale è sembrata normale ad entrambi i tempi (**Figura 33/B**).

Invece, gli altri peptidi saggiati non hanno mostrato effetti così marcati sulla replicazione virale come N10K. Infatti, il peptide H4L somministrato alle cellule prima dell'infezione virale sembrava controllare la replicazione di HIV IIIB solo durante i primi 8 giorni di coltura e il peptide T11F ha mantenuto bassa la replicazione di BaL fino all'ottavo giorno dell'infezione solo se addizionato ogni 4 giorni dopo l'infezione (**Figura 33**).

Risultati

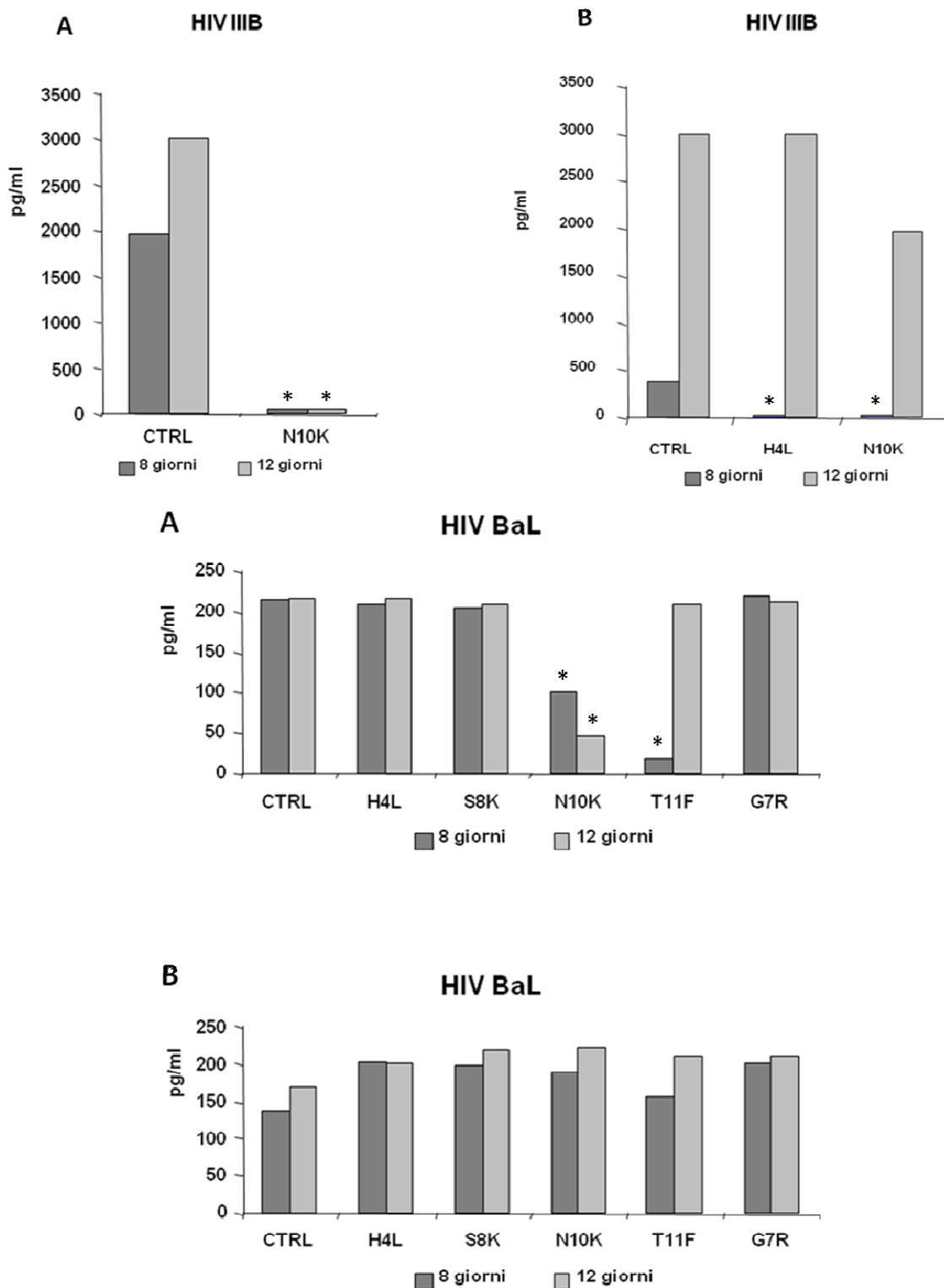


Figura 33. Attività *in vitro* dei peptidi selezionati nei confronti di HIV-1. **(A)** Infezione da HIV *in vitro* e successivo trattamento delle cellule con i peptidi ogni 4 giorni. **(B)** Pre-trattamento delle cellule con i peptidi e successiva infezione con HIV. (errore $\pm 10\%$; * $p < 0.05$ rispetto ai controlli).

È interessante notare che PBMC infettati, osservati al microscopio, appaiono formare dei *cluster* dopo il trattamento con N10K. Per verificare se il peptide N10K fosse in grado di indurre un effetto di adesione superficiale solo nelle cellule infette o anche in quelle normali, PBMC da donatori sani sono stati purificati e coltivati a diverse concentrazioni per 7 giorni in presenza di rIL-2 e dei peptidi. Al settimo giorno di coltura le cellule sono state osservate al microscopio ed è stato interessante notare che l'attitudine all'aggregazione in *cluster* era esclusiva di PBMC infettati e trattati con N10K, non essendo parallelamente osservata nei PBMC di controllo infettati e non trattati o trattati con gli altri peptidi, o nei PBMC non infetti trattati con N10K.

Per quanto riguarda il possibile meccanismo d'azione con cui il peptide N10K esplica la sua attività antivirale, in primo luogo è stata valutata l'attitudine alla formazione di sincizi da parte di linfociti T CD4+ trattati con N10K, rispetto a controlli non trattati. Linee cellulari CHO33T, HeLa ADA e HeLa LAI, che esprimono costitutivamente la glicoproteina gp120 di HIV sulla loro superficie, sono state co-coltivate, in presenza dei peptidi, con linfociti T CD4+, ottenuti da donatori sani. Cellule non trattate sono state utilizzate come controlli. La formazione di sincizi, osservata dopo incubazione per 18 ore a 37°C, era evidente sia nei controlli sia nei campioni trattati, escludendo una attività inibente di N10K sull'interazione tra recettore CD4 e gp120.

I risultati ottenuti con analisi di citometria a flusso sulla linea cellulare U937, dopo colorazione con annexina-V/propidio ioduro, consentirebbero di escludere l'induzione di effetti apoptotici/necrotici.

Attività terapeutica *in vivo* dei peptidi anticorpali selezionati

Attività terapeutica *in vivo* in un modello di infezione sperimentale sistemica

L'attività terapeutica del peptide N10K è stata verificata in un modello murino di infezione sistemica letale causata da un ceppo altamente virulento di *C. albicans*. In particolare, gruppi di topi Balb/c femmine di 8 settimane sono stati infettati per via endovenosa con inoculo di 2×10^6 cellule di *C. albicans* CA-6 e trattati per via intraperitoneale con 50 µg di peptide N10K 1, 24 e 48 ore dopo l'infezione. Come controllo negativo e positivo sono stati utilizzati gruppi di animali ugualmente trattati con un peptide già dimostratosi inattivo nei confronti di *C. albicans* (SP) o con il peptide KP (362). La sopravvivenza degli animali infettati è stata monitorata per 60 giorni e negli animali morti è stata verificata la presenza di *C. albicans* nel rene. Le curve di sopravvivenza dei topi infettati sono state analizzate mediante Mantel-Cox Logrank test e le differenze tra i gruppi sperimentali e di controllo sono risultate significative

Risultati

con un tempo di sopravvivenza mediana, ovvero tempo in cui il 50% degli individui sopravvive, di 4 giorni per il peptide KP e 3,5 giorni per il peptide N10K, rispetto ai 2 giorni del controllo (Figura 34).

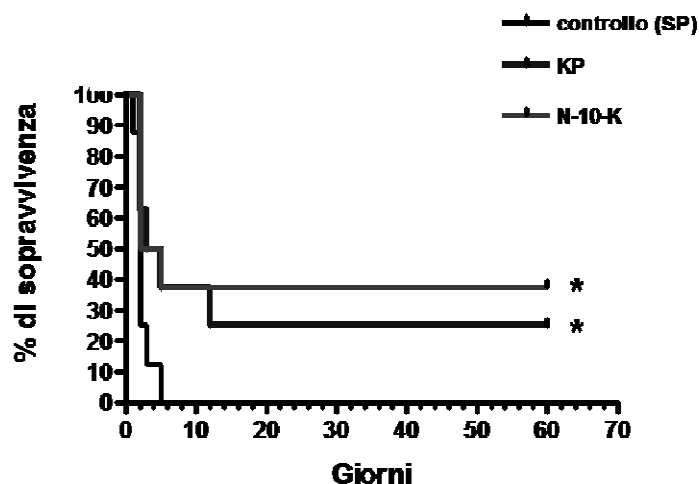


Figura 34. Percentuale di sopravvivenza dei topi Balb/c in un modello murino di infezione sistemica letale causata da un ceppo altamente virulento di *C. albicans*. Gli animali sono stati trattati con N10K (50 µg/dose) mediante somministrazione intraperitoneale dopo 1, 24 e 48 ore dall'infezione. Nei topi morti è stata verificata la presenza di *C. albicans* nell'organo bersaglio (rene). Gruppi di topi trattati con il peptide KP o con il peptide irrilevante SP sono stati utilizzati come controlli. Il confronto delle curve di sopravvivenza dei topi infettati è stato effettuato mediante Mantel-Cox Logrank test e le differenze tra i gruppi sperimentali (N10K e KP) e di controllo (SP) sono risultate significative (* $P < 0,05$), con tempo di sopravvivenza mediana di 4 giorni per KP e 3,5 giorni per N10K, rispetto ai 2 giorni del peptide di controllo.

Attività terapeutica *in vivo* in un modello di infezione sperimentale mucosale

In **Figura 35** sono riportati i risultati del trattamento in un modello di candidosi vaginale murino. Gli animali sono stati infettati per via intravaginale con cellule di *C. albicans* SA40 o *C. albicans* AIDS68 e successivamente trattati con 20 µg dei peptidi N10K, T11F e SP, come controllo negativo, in confronto a controlli infettati e non trattati. Come si può osservare in **Figura 35/A**, gli animali trattati con i peptidi N10K e T11F sono guariti dall'infezione molto più rapidamente rispetto agli animali non trattati o trattati con SP. La riduzione del numero di CFU, derivanti dalla semina di campioni di fluido vaginale, si è dimostrata significativa già a partire dal primo giorno dopo l'infezione, rispetto ai controlli. Questo dato è particolarmente interessante perché evidenzia come il trattamento con i peptidi selezionati sia in grado di accelerare l'eliminazione vaginale del fungo nell'arco di 2-3 giorni dall'inizio dell'infezione.

Questo periodo è considerato particolarmente critico per il decorso della malattia, dal momento che è proprio nei primi giorni di infezione che dalle cellule fungine vengono prodotte numerose ife e secreti enzimi particolarmente critici per il processo infettivo, come l'aspartil-proteinasi (390).

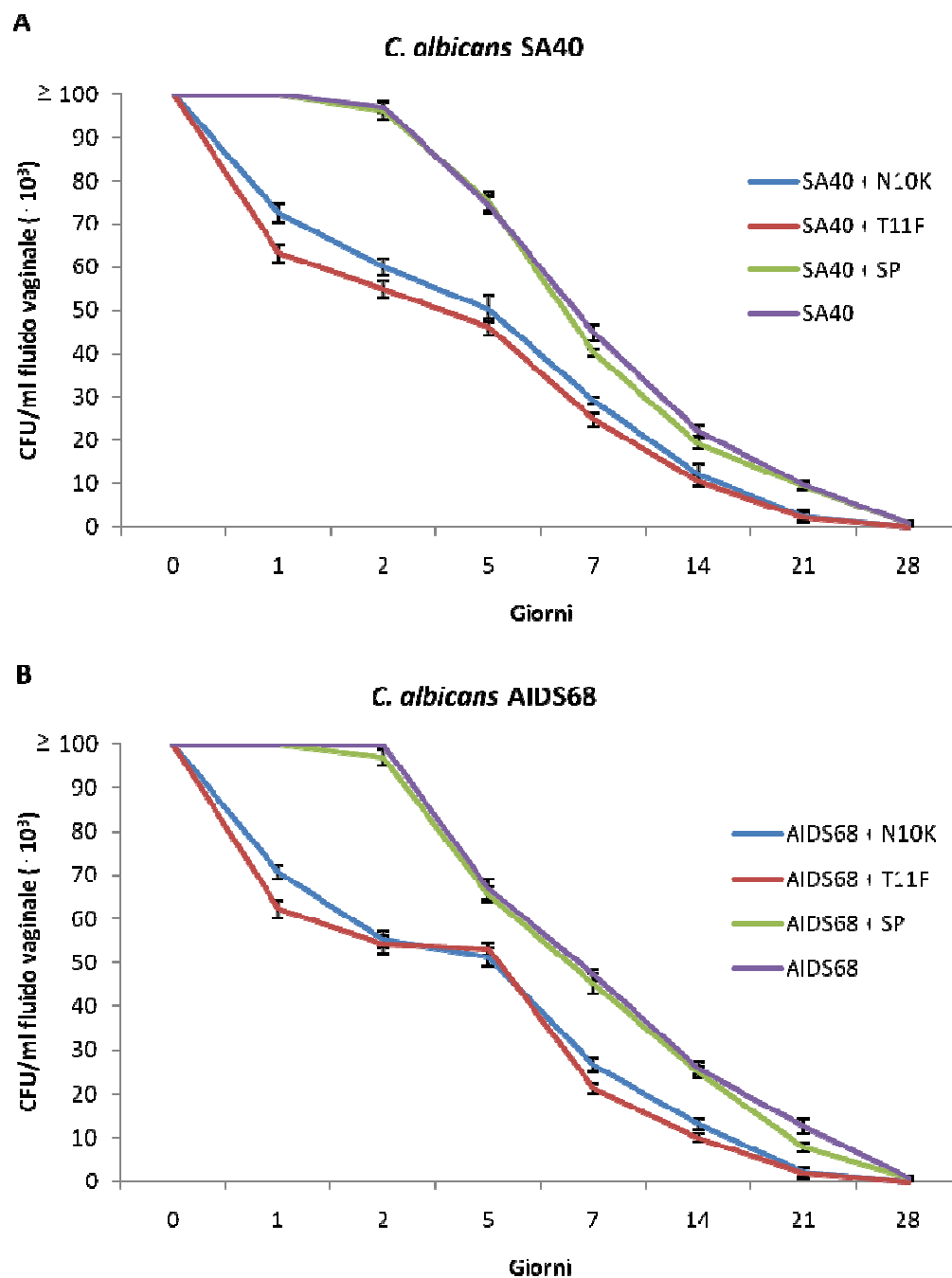


Figura 35. Colonizzazione vaginale con un ceppo di *C. albicans* SA40 fluconazolo sensibile (A) e con un ceppo di *C. albicans* AIDS 68 fluconazolo resistente (B) in topi Balb/c trattati per via intravaginale con 20 μ g dei peptidi N10K o T11F. Per ogni gruppo è mostrato l'andamento della carica fungina nei fluidi di lavaggio vaginale prelevati ai diversi giorni. Il peptide SP è stato usato come controllo negativo dell'attività terapeutica.

Risultati

A conferma della loro notevole attività terapeutica, i peptidi selezionati si sono dimostrati analogamente efficaci anche nei confronti di infezioni sostenute da *C. albicans* AIDS 68, un ceppo resistente al trattamento con fluconazolo (**Figura 35/B**).

Attività immunomodulante *in vitro* di peptidi anticorpali selezionati su cellule immunitarie umane

Sono state valutate le potenziali proprietà immunomodulanti *in vitro* dei peptidi selezionati nei confronti di cellule del sistema immunitario umano, in collaborazione con il gruppo di ricerca della Prof.ssa Anna Vecchiarelli del Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche, Sezione di Microbiologia, dell'Università di Perugia.

È stata analizzata principalmente la capacità di tutti i peptidi sintetici selezionati di stimolare la produzione di citochine da parte di diverse popolazioni cellulari umane, quali monociti, neutrofili e PBMC. Un peptide sintetico irrilevante precedentemente riconosciuto incapace di stimolare le cellule immunitarie è stato utilizzato come controllo negativo (NC) (373).

A tale scopo monociti umani o neutrofili umani peritoneali (PMN) (alla concentrazione di 10×10^6 /ml) sono stati incubati per 18 ore o 6 ore, rispettivamente, in presenza o assenza (NS) di LPS, NC o dei peptidi (tutti alla concentrazione di 10 μ g/ml). Dopo incubazione, il supernatante colturale è stato raccolto e saggiato per la presenza di citochine mediante specifici saggi ELISA. I risultati riportati in **Figura 36/A** hanno consentito di dimostrare che il peptide sintetico N10K è in grado di indurre nei monociti, ma non nei neutrofili, una significativa *up*-regolazione della produzione di IL-6, ma non di TNF- α . Altri peptidi o NC non hanno influenzato la produzione di citochine da parte di tali cellule. La produzione di citochine è stata verificata anche in PBMC incubati 30 minuti in presenza o assenza (NS) di NC o N10K (entrambi alla concentrazione di 10 μ g/ml). Dopo incubazione, i PBMC sono stati stimolati per 18 ore con LPS (10 μ g/ml) o con *C. albicans* CA-6 inattivata al calore (h.i. CA-6, con E/T 1:10) e i livelli di IL-12p40 e IL-6 sono stati determinati nei supernatanti mediante opportuni saggi ELISA, risultando statisticamente significativi per N10K (**Figura 36/B**). Nel sistema sperimentale, LPS è stato utilizzato come controllo positivo.

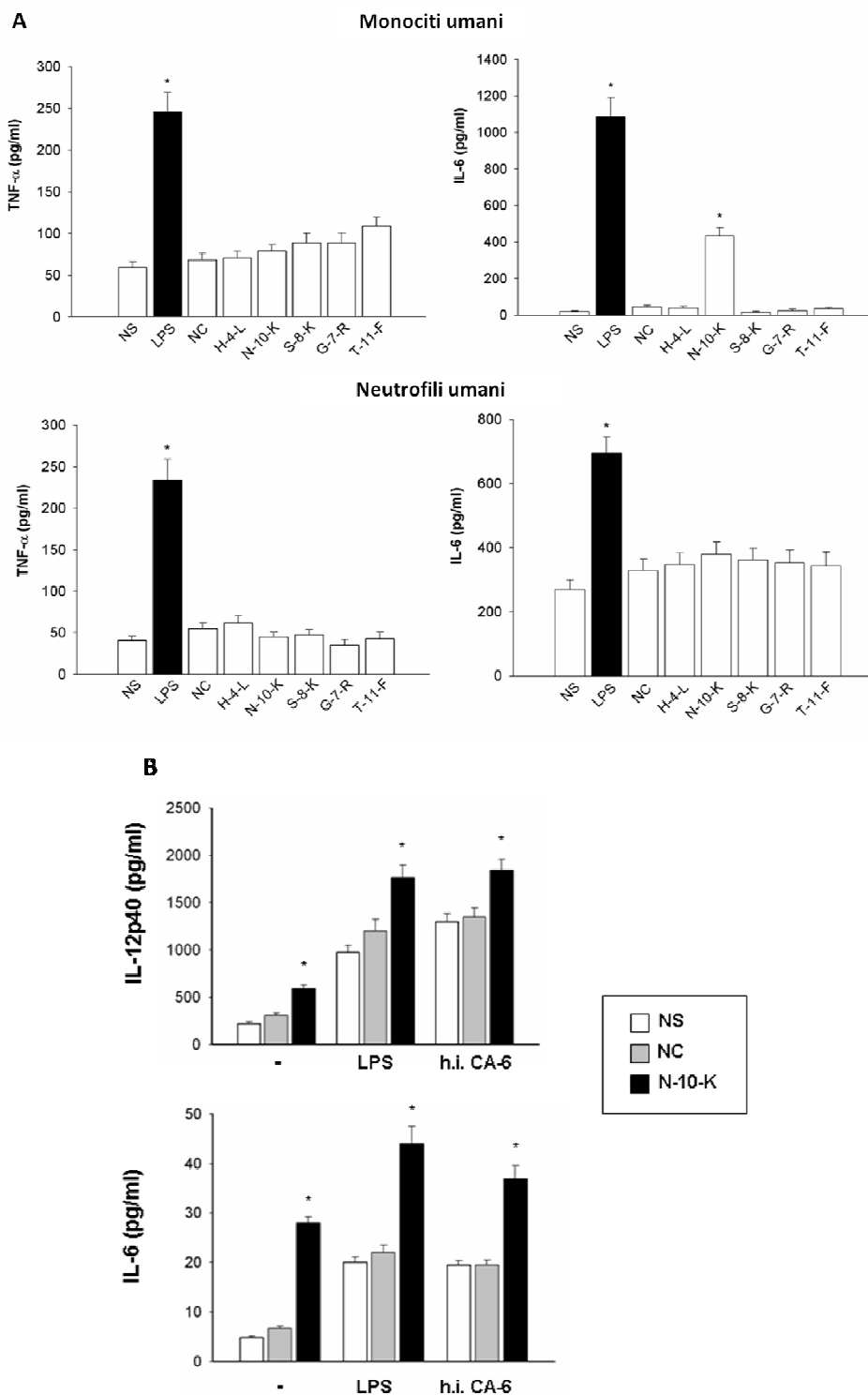


Figura 36. Produzione citochinica. **(A)** Monociti e neutrofili umani sono stati incubati per 18 ore in presenza o meno (NS) di LPS, NC, H4L, N10K, S8K, G7R, T11F (tutti 10 $\mu\text{g/ml}$). Dopo la stimolazione i livelli di TNF- α e IL-6 sono stati valutati nei sopranatanti mediante specifici saggi ELISA. **(B)** PBMC sono stati incubati per 30 minuti in presenza o meno (NS) di NC o N10K (entrambi 10 $\mu\text{g/ml}$). Dopo incubazione le cellule sono state stimolate per 18 ore con LPS (10 $\mu\text{g/ml}$) o CA-6 inattivate al calore (E/T 1:10). I livelli di IL-12p40 e IL-6 sono stati valutati nei sopranatanti mediante specifici saggi ELISA (* $P < 0,05$ trattato vs non trattato).

Risultati

Dal momento che N10K ha mostrato la migliore capacità di modulare le citochine proinfiammatorie da parte dei monociti, rispetto ad altri peptidi della porzione costante, questo peptide è stato utilizzato negli esperimenti successivi.

È stato studiato il network di regolazione mediato dalla proteina Dectina-1, il principale recettore β -glucanico espresso sulla superficie di monociti/macrofagi, in grado di promuovere la proliferazione cellulare (391). È stata valutata l'espressione superficiale di Dectina-1 in monociti umani, dopo incubazione per 30 minuti in presenza o assenza (NS) del ceppo di h.i. CA-6 (E/T 1:10), di NC o di N10K (entrambi alla concentrazione di 10 μ g/ml). I risultati hanno mostrato una significativa espressione superficiale di Dectina-1 in seguito a stimolazione con h.i. CA-6 e con il peptide N10K (**Figura 37**).

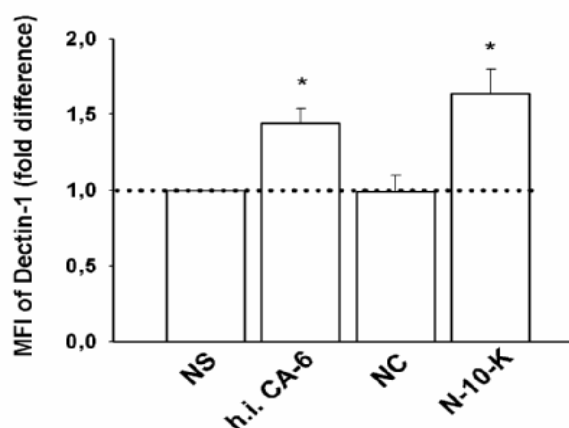


Figura 37. Espressione di Dectina-1 in monociti umani. I monociti sono stati incubati per 30 minuti in presenza o meno (NS) di h.i.-CA-6 (E/T 1:10), NC o N10K (entrambi 10 μ g/ml). Dopo incubazione è stata valutata l'espressione superficiale di Dectina-1 (* $P < 0,05$ trattato vs non trattato).

È stata, inoltre, valutata la modulazione delle proteine coinvolte nel pathway di attivazione mediato da Dectina-1, illustrato in modo schematico in **Figura 38**. PBMC sono stati pre-incubati per 30 minuti in presenza o assenza (NS) di NC, N10K (entrambi alla concentrazione di 10 μ g/ml) o piceatannolo (100 μ M), un potente inibitore della proteina Syk. Dopo incubazione, i PBMC sono stati stimolati con o senza Zymosan, glucano con unità di glucosio ripetute unite con legame β -1,3-glicosidico, per 5, 15 o 30 minuti e i lisati cellulari sono stati analizzati mediante Western Blot per valutare l'attivazione delle proteine pSyk, CARD-9 e pI κ B- α (**Figura 39**). I risultati hanno mostrato un'attivazione statisticamente significativa nelle cellule trattate con N10K rispetto ai controlli.

Tutti i risultati relativi alla attività immunomodulante dei peptidi derivati da Fc saranno oggetto di una prossima pubblicazione.

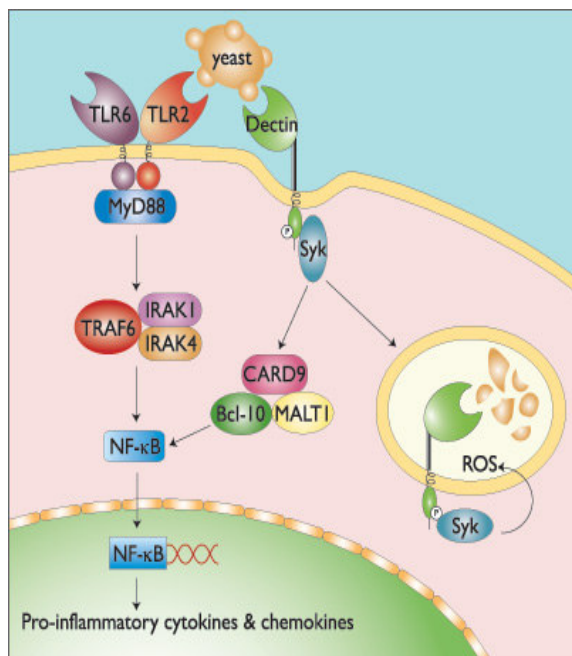


Figura 38. Pathway di trasduzione del segnale attivato da Dectina-1.

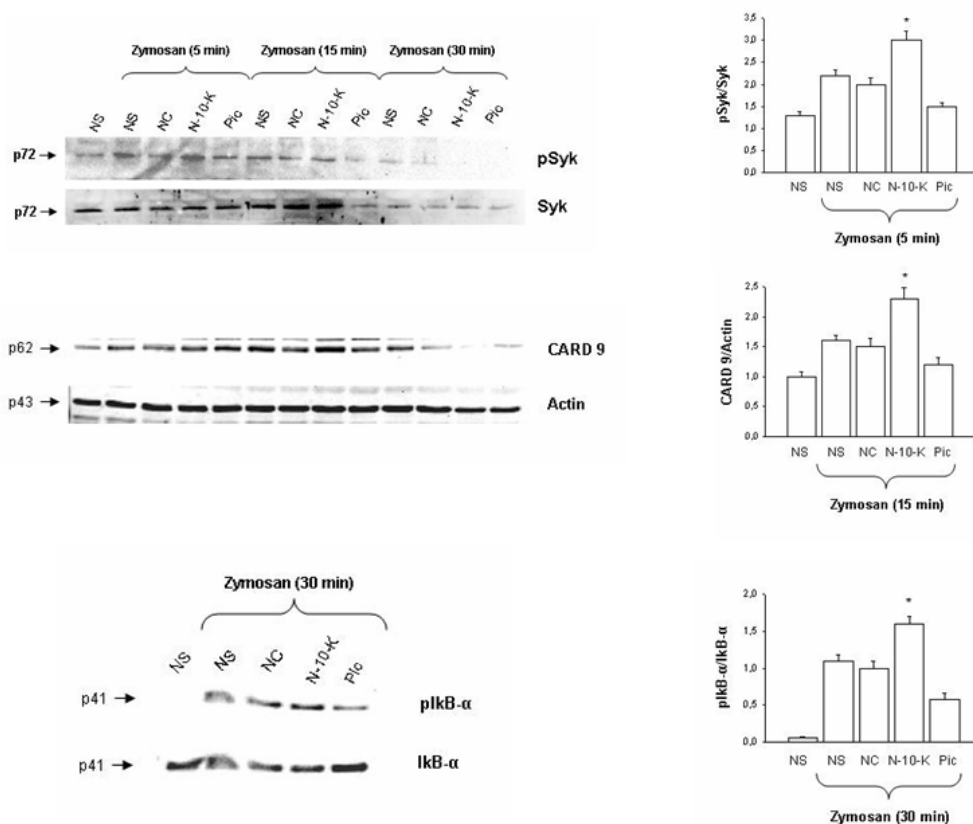


Figura 39. Modulazione delle proteine coinvolte nel pathway di attivazione di Dectina-1. I PBMC sono stati pre-incubati per 30 minuti in presenza o meno (NS) di NC, N10K (entrambi 10 μg/ml) o piceatannolo (100 μM). Dopo incubazione, le cellule sono state stimolate con o senza Zymosan per 5, 15 o 30 min. Quindi, i lisati cellulari ottenuti sono stati analizzati tramite Western Blot per valutare l'attivazione di pSyk, CARD-9 e p-IκB-α (*P< 0,05 trattato vs non trattato).

Risultati

Attività citotossica *in vitro* di peptidi anticorpali selezionati nei confronti di cellule di melanoma

Sono state valutate le potenziali proprietà antitumorali dei peptidi selezionati nei confronti di cellule di melanoma, in collaborazione con il gruppo di ricerca del Prof. Luiz R. Travassos del Dipartimento di Microbiologia, Immunologia e Parassitologia, Sezione di Oncologia Sperimentale, dell'Università Federale di San Paolo, Brasile,.

In particolare è stata valutata l'attività *in vitro* dei peptidi N10K e T11F nei confronti della linea cellulare di melanoma B16F10-Nex2. I peptidi N10K e T11F e un peptide *scramble* (SP), usato come controllo negativo, sono stati diluiti in modo scalare e incubati con cellule B16F10-Nex2 (alla concentrazione di 5×10^3 /pozzetto) in 100 μ l per pozzetto per 12 ore. Ciascun peptide è stato saggiato in triplo a scopo statistico. Dopo 12 ore, l'attività citotossica dei peptidi è stata determinata con la misura della vitalità cellulare mediante Trypan Blue. Come mostrato in **Figura 40**, i peptidi N10K e T11F hanno mostrato una differenziale attività nei confronti di cellule di melanoma. In particolare, N10K si è dimostrato annullare la vitalità delle cellule di melanoma alla concentrazione di 0,3 mM, mentre T11F alla concentrazione di 1 mM non è risultato in grado di azzerare la vitalità cellulare.

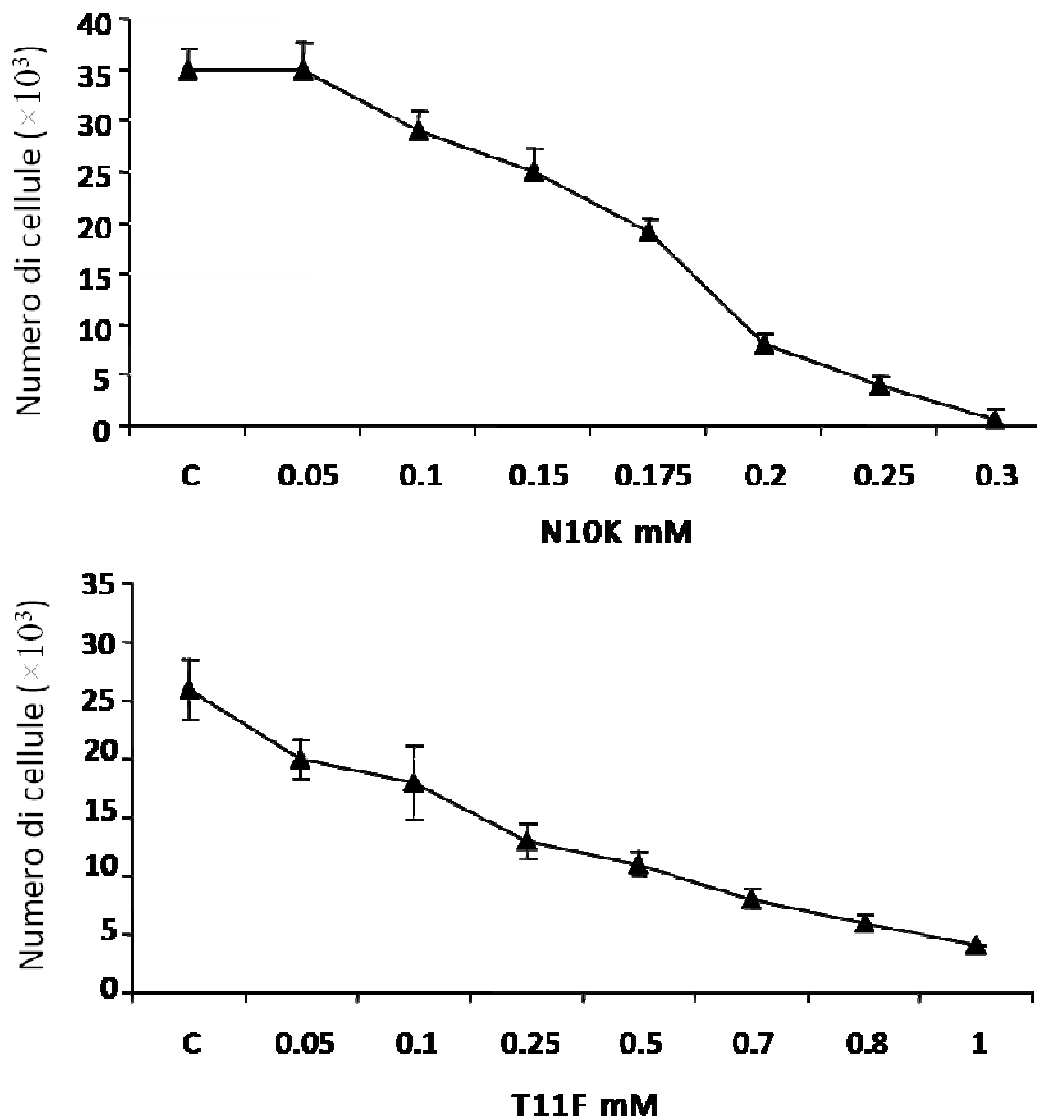


Figura 40. Valutazione dell'attività citotossica *in vitro* dei peptidi N10K e T11F nei confronti di cellule di melanoma B16F10-Nex2. I peptidi N10K e T11F e i relativi peptidi *scramble* (SP) usati come controlli negativi sono stati diluiti da 1 mM a 0,05 mM in terreno RPMI addizionato con 10% FCS e incubati con cellule B16F10-Nex2 alla concentrazione di 5×10^3 cellule/pozzetto in 100 μ l per 12 ore a 37°C. L'attività citotossica dei peptidi è stata determinata con la misura della vitalità cellulare mediante Trypan Blue.

Risultati

Effetti citotossici *in vitro* dei peptidi selezionati

La citotossicità dei peptidi anticorpali selezionati, H4L, N10K, T11F, nei confronti di cellule umane, è stata valutata mediante due differenti saggi, uno colorimetrico con MTT ed uno emolitico.

Nel saggio colorimetrico con MTT, cellule LLC-MK2 sono state seminate in triplo in piastre da 96 pozzetti alla concentrazione di $1,5 \times 10^5 / \text{cm}^2$ in 100 μl e incubate con le diluizioni seriali dei peptidi per 24 ore. Le cellule sono state successivamente trattate con MTT e, dopo la solubilizzazione dei sali di formazano precipitati, l'assorbanza è stata misurata a 540 e 620 nm. La vitalità cellulare è stata espressa come rapporto percentuale T/C, dove T rappresenta la media dell'assorbanza delle cellule trattate con i peptidi e C la media dell'assorbanza dei controlli. I risultati non hanno mostrato per tutti i peptidi saggiati alcun rilevante effetto citotossico; infatti alla concentrazione massima utilizzata di 500 $\mu\text{g/ml}$, corrispondente ad una concentrazione 25 e 100 volte più elevata di quella candidacida per i peptidi N10K e T11F, rispettivamente, le cellule mantengono una vitalità superiore all'80% (**Figura 41/A**).

Per valutare la capacità da parte dei peptidi di lisare cellule ematiche, globuli rossi di tacchino sono stati incubati in agitazione a diversi tempi con diverse concentrazioni dei peptidi. Come controlli negativi e positivi sono stati utilizzati rispettivamente PBS e una soluzione 1% Triton X-100. L'effetto emolitico è stato verificato nei sovrinatanti, effettuando una lettura spettrofotometrica a 540 e 620 nm. I risultati, rapportati al controllo in PBS ed espressi in una scala percentuale dal 100% (assenza di lisi) allo 0% (lisi con Triton X-100), non hanno evidenziato alcun rilevante effetto emolitico da parte dei peptidi. Anche in questo caso, alla concentrazione massima utilizzata di 500 $\mu\text{g/ml}$ è stata osservata una integrità cellulare superiore all'80% (**Figura 41/B**).

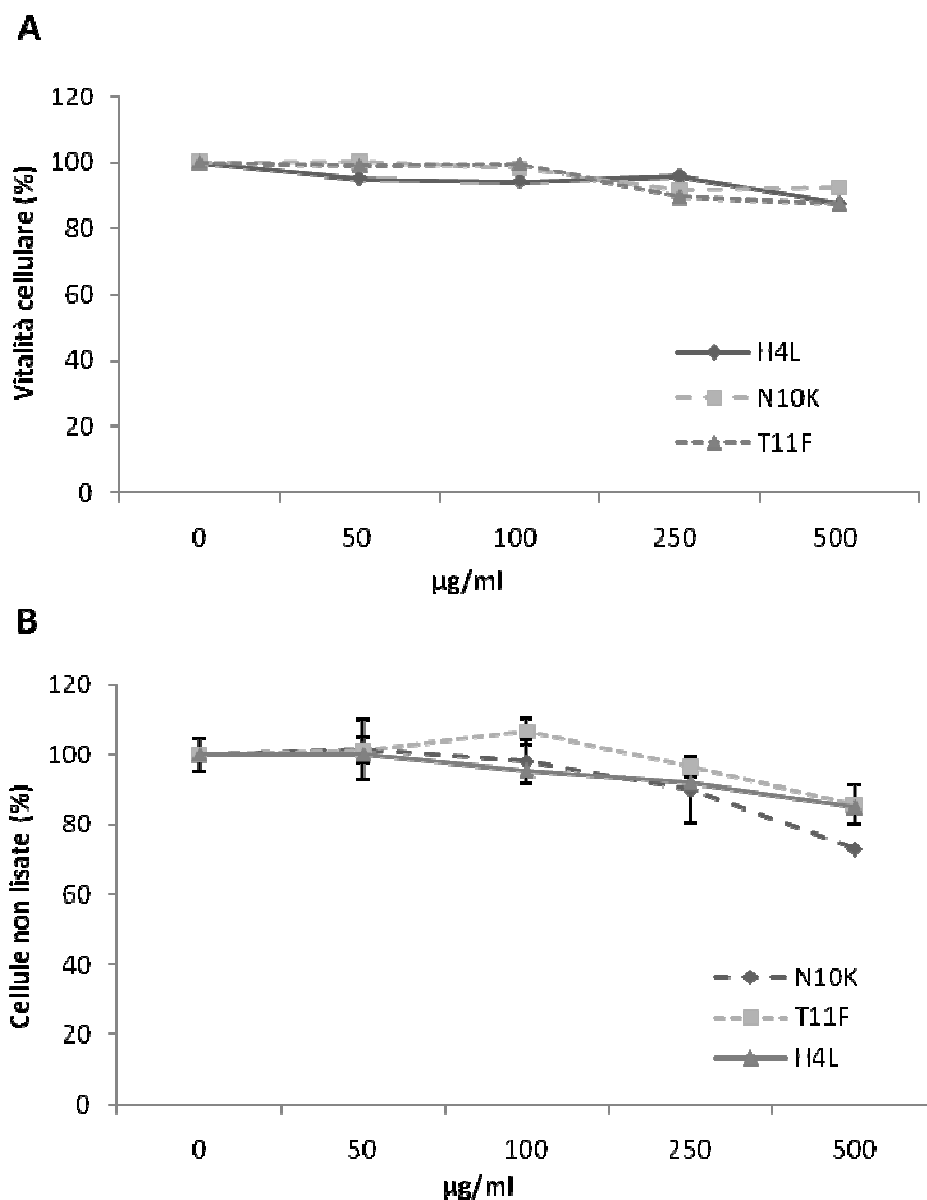


Figura 41. Valutazione della citotossicità *in vitro* dei peptidi selezionati. La citotossicità dei peptidi è stata valutata sia mediante saggio colorimetrico MTT (A), in cui la vitalità cellulare è stata espressa come rapporto percentuale T/C dove T rappresenta la media dell'assorbanza delle cellule trattate con i peptidi e C la media dell'assorbanza dei controlli; sia mediante saggio emolitico (B), in cui tutti i valori sono stati rapportati in scala percentuale che va dal 100% di lisi da parte del Triton X-100 all'assenza di lisi del solo PBS.

Risultati

Proprietà autoaggreganti dei peptidi selezionati

Studi di dicroismo circolare (CD) sono stati condotti al fine di acquisire informazioni riguardanti la conformazione dei peptidi anticorpali di interesse, alla quale potrebbe essere ricondotto il meccanismo d'azione, da cui derivano le attività antimicrobiche. In particolar modo, sono stati registrati spettri nella regione del lontano UV (190-250 nm), da cui è possibile dedurre la struttura secondaria di campioni proteici in esame.

Sulla base di quanto precedentemente osservato per KP, in grado di auto-aggregare, in modo spontaneo e reversibile, in strutture organizzate fibrillari simili a idrogel, con un processo catalizzato da β -1,3-glucano (375), le proprietà auto-aggreganti dei peptidi N10K e T11F sono state indagate, in collaborazione con la dott.ssa Thelma A. Pertinhez della Sezione di Chimica e Biochimica Strutturale del Dipartimento di Medicina Sperimentale, presso il Centro Interdipartimentale Misure "Giuseppe Casnati" (CIM).

Nell'indagine mediante CD le strutture secondarie conosciute di proteine appaiono secondo lo schema mostrato in **Figura 42**.

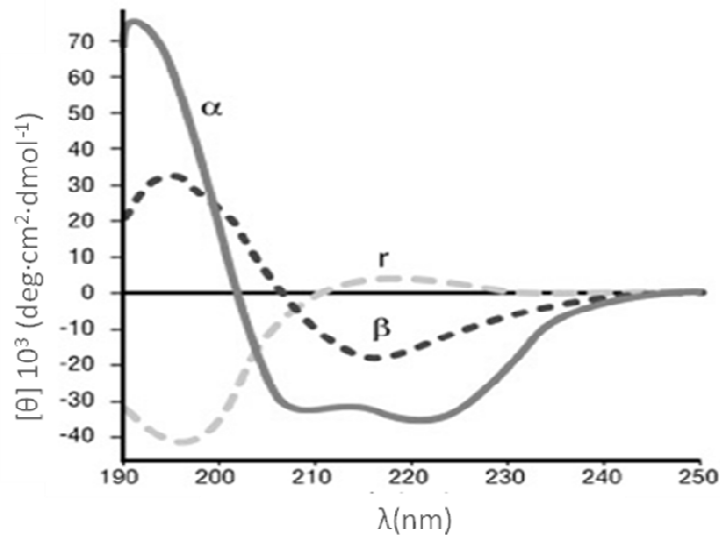


Figura 42. Spettri CD di strutture secondarie di proteine. L'immagine mostra i tipici profili in CD di strutture secondarie "pure" ad α elica (α), con due bande negative di intensità paragonabile a 208 e 220 nm e una banda intensa positiva vicino a 190 nm; a foglietto β (β), con una banda negativa vicino a 217 nm ed una positiva vicino a 195 nm; denaturate o *random coil* (r), con una banda intensa negativa a circa 200 nm ed una banda debole a lunghezze d'onda maggiori che può essere sia negativa sia positiva.

Sono stati acquisiti gli spettri CD (grafici dell'ellitticità in funzione della lunghezza d'onda) di soluzioni acquose 100 μM dei peptidi, mediante lettura allo spettropolarimetro alle lunghezze d'onda da 190 a 250 nm; la misura di ellitticità θ (mdegree) è stata convertita in ellitticità molare $[\theta]$ ($\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$) secondo la formula riportata nella sezione Materiali e metodi.

Da una prima analisi è stata evidenziata l'auto-aggregazione del peptide N10K in foglietto β , favorita anche dall'alternanza dei residui amminoacidici idrofobici e idrofilici, fondamentale per la complementarietà chimica e strutturale tipica di questa conformazione. Lo spettro CD è risultato caratterizzato da una banda negativa a circa 219 nm e da una banda positiva a 201 nm. Diverso il caso del peptide T11F, il quale non è risultato caratterizzato da uno spettro CD tipico di strutture secondarie conosciute, nemmeno dopo variazione di alcuni parametri fisici della soluzione, quali pH e solvente organico (**Figura 43/A**). L'analisi degli spettri CD del peptide N10K in presenza di laminarina 500 μM ha consentito di rilevare una immediata conversione del peptide dalla conformazione *random coil* a quella a foglietto β , con una accentuazione della banda negativa a 219 nm e la formazione di una piccola banda positiva a 201 nm (**Figura 43/B**). È stato osservato, inoltre, che aggiungendo la laminarina ad una soluzione di peptidi già organizzati in aggregati, si otteneva una maturazione di questi ultimi, ovvero un aumentato ordine o numero dei foglietti β , risultando in una più elevata attività dicroica. La laminarina sembra avere un ruolo catalitico nell'aggregazione del peptide, probabilmente grazie alla sua capacità di agire come supporto su cui i peptidi si possono legare e assemblare più facilmente.

Sulla base di tale presupposto, l'aggiunta di cellule di *C. albicans* ($\sim 5 \times 10^7$ cell/ml) alla soluzione peptidica (1 mM) ha prodotto un profilo CD simile a quello osservato in presenza di peptidi aggregati catalizzati da laminaria (dati non mostrati).

Risultati

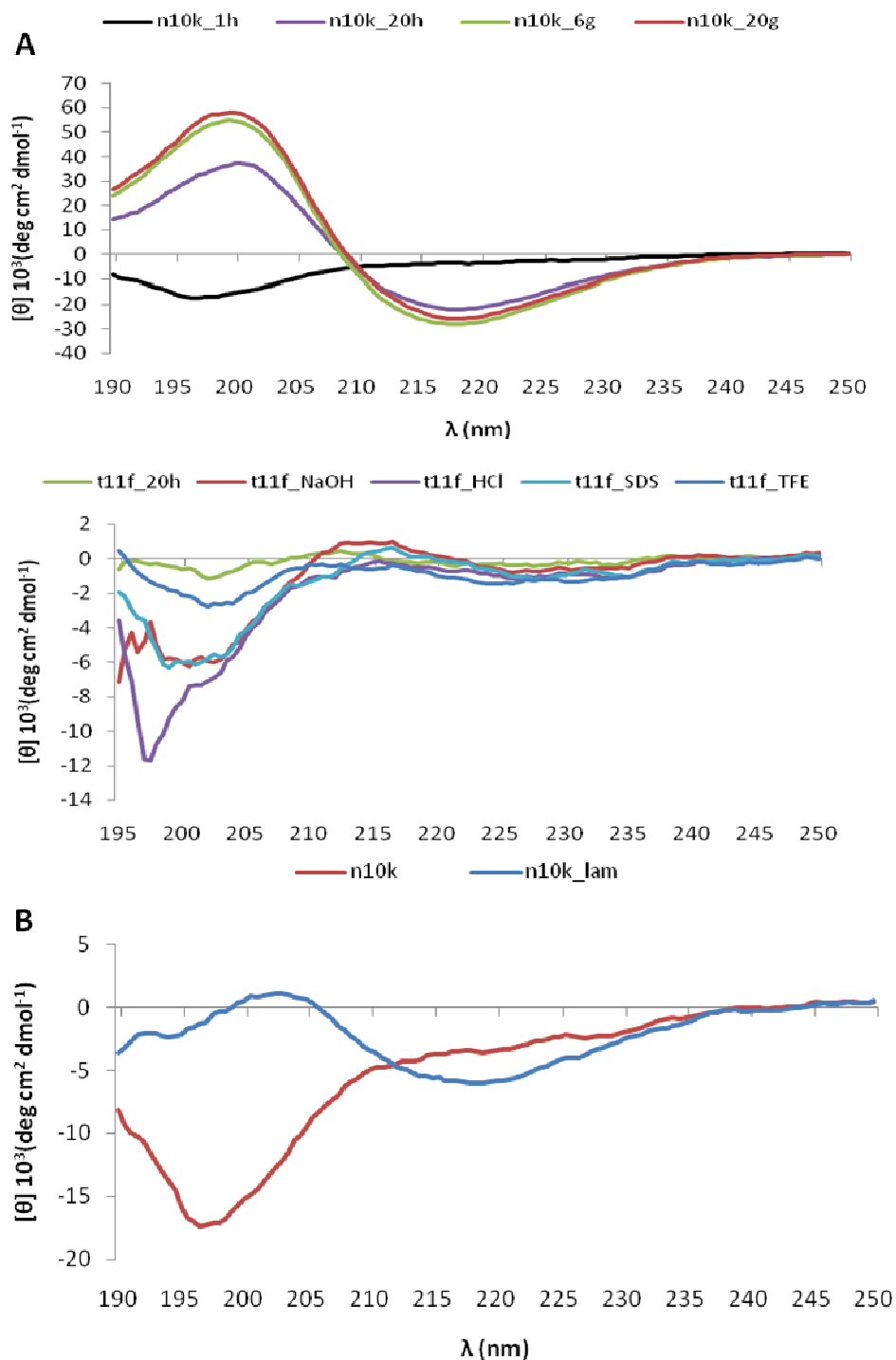


Figura 43. Auto-aggregazione dei peptidi N10K e T11F. (A) *In alto*, spettri CD di una soluzione acquosa 100 μM del peptide N10K acquisiti a 20°C utilizzando campioni preparati da una soluzione madre tenuta a 4°C per 1 ora (*random coil*), 20 ore, 6 giorni, 20 giorni (foglietto β). *In basso*, spettri CD del peptide T11F alla concentrazione di 100 μM acquisiti a 20°C in soluzione acquosa (20h), in soluzione basica (NaOH), acida (HCl), al 70% di sodio dodecilsolfato (SDS), al 80% di tetrafluoroetene (TFE). (B) Spettri CD al tempo 0 del peptide N10K alla concentrazione di 100 μM in una soluzione acquosa (*random coil*) e in una soluzione 500 μM di laminarina (aggregazione in foglietto β), indicati rispettivamente come n10k e n10k_lam.

Successivamente è stata eseguita una denaturazione termica del peptide N10K alla concentrazione di 100 μM , da 20 a 90°C, con riscaldamento del tubo polarimetrico di 1°C/min, monitorata in CD a 201 nm, lunghezza d'onda alla quale corrisponde una banda positiva in strutture a foglietto β e una banda negativa in strutture denaturate (**Figura 44/A**). Sono stati registrati i profili spettrali da 190 a 250 nm sia a 20°C (foglietto β) che a 90°C (*random coil*); inoltre è stata osservata la reversibilità dell'aggregazione, monitorando l'attività dicroica al diminuire della temperatura di 10°C per volta, partendo da 90°C fino a 20°C. È stata così stabilita la temperatura di *melting* (T_m) pari a $45,7 \pm 0,14^\circ\text{C}$, ovvero la temperatura alla quale metà dei peptidi si trovano nello stato di aggregazione a foglietto β , e metà in quello denaturato; inoltre l'auto-aggregazione del peptide N10K in soluzione 100 μM , in seguito a denaturazione termica, non risulta essere reversibile, a dimostrazione del fatto che l'auto-aggregazione è un processo concentrazione- e temperatura-dipendente.

È stata effettuata anche la denaturazione termica del peptide N10K in presenza di laminarina 500 μM , nelle condizioni descritte in precedenza, ottenendo uno spettro diverso da quello acquisito denaturando il peptide in soluzione acquosa (**Figura 44/B**); infatti il profilo spettrale si mantiene costante fino a circa 45°C, poi aumenta d'intensità fino a 58°C, temperatura alla quale il segnale cade fino al raggiungimento dei 65°C per poi stabilizzarsi a un valore di ellitticità positivo. Tale andamento della curva indica che aumentando la temperatura, gli aggregati peptidici si condensano maggiormente grazie alla loro componente idrofobica portando a un aumento del valore di ellitticità che si verifica tra 45 e 58°C; con un ulteriore incremento della temperatura (sopra i 58°C) l'energia cinetica degli aggregati è talmente elevata da indurre una loro parziale degradazione. La soluzione di laminarina mantiene sempre un certo grado di organizzazione degli aggregati peptidici in strutture a foglietto β dissociando solo parzialmente anche a temperature elevate, come mostrato in **Figura 44/C**.

Risultati

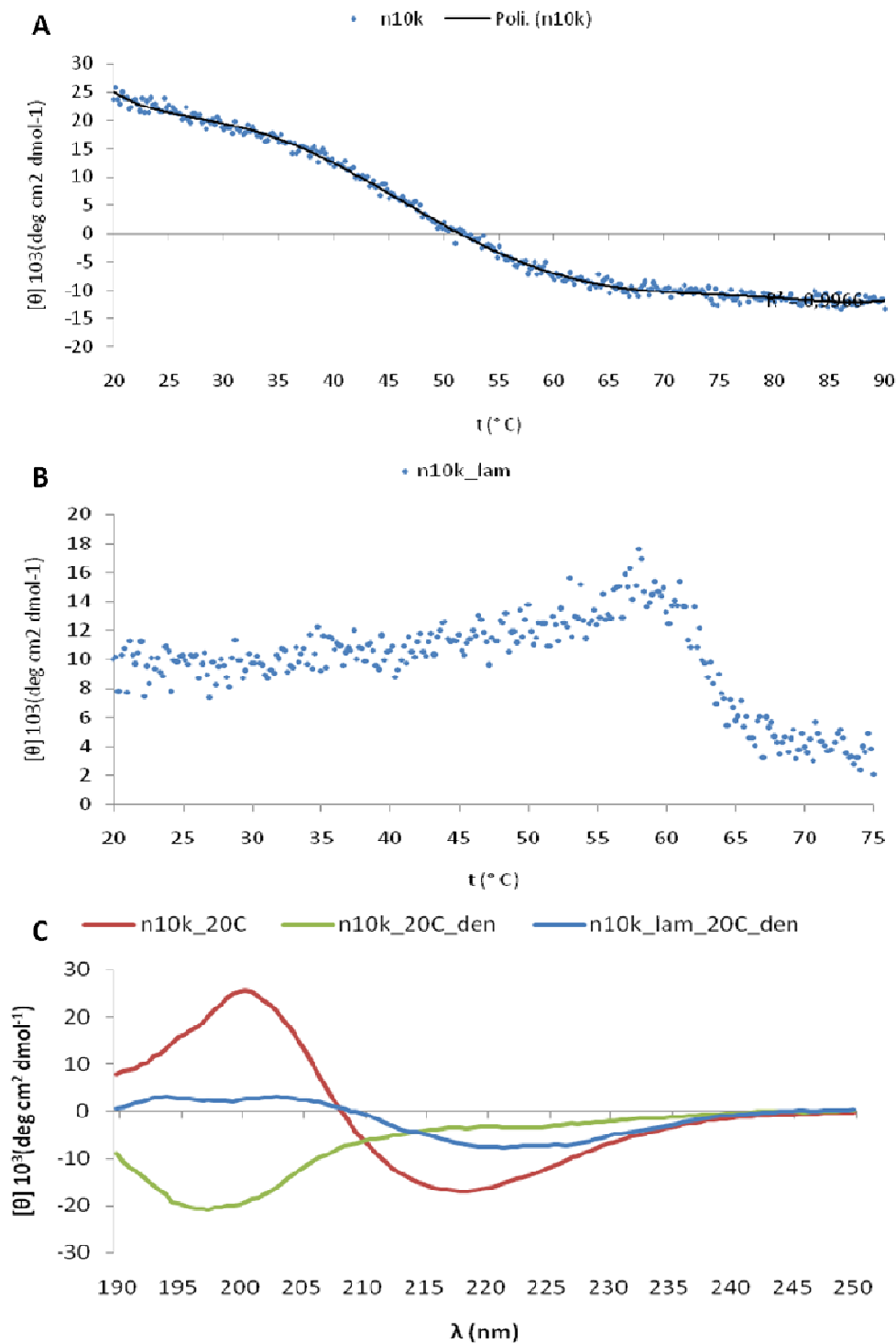


Figura 44. Denaturazione termica del peptide N10K. **(A)** Spettro CD di una soluzione acquosa 100 μM del peptide N10K a 201 nm, da 20 a 90°C (1°C/min), con temperatura di *melting* (T_m) pari a $45,7 \pm 0,14^{\circ}\text{C}$. **(B)** Spettro CD di una soluzione del peptide N10K (100 μM) in presenza di laminarina (500 μM) a 201 nm, da 20 a 75°C (1°C/min). **(C)** Confronto degli spettri del peptide N10K a 20°C prima (20C) e dopo denaturazione termica in soluzione acquosa (20C_den) e in soluzione 500 μM di laminarina (lam_20C_den); in quest'ultimo caso si ha un mantenimento della struttura degli aggregati in foglietto β catalizzato dalla laminarina.

Registrando i profili CD di una soluzione acquosa 100 μ M di N10K, a diversi intervalli di tempo da 1 a 570 minuti, è stato possibile osservare, come mostrato in **Figura 45**, che il peptide passa da una conformazione completamente denaturata (1 minuto) ad una perfettamente organizzata in strutture a foglietto β già dopo 9 ore.

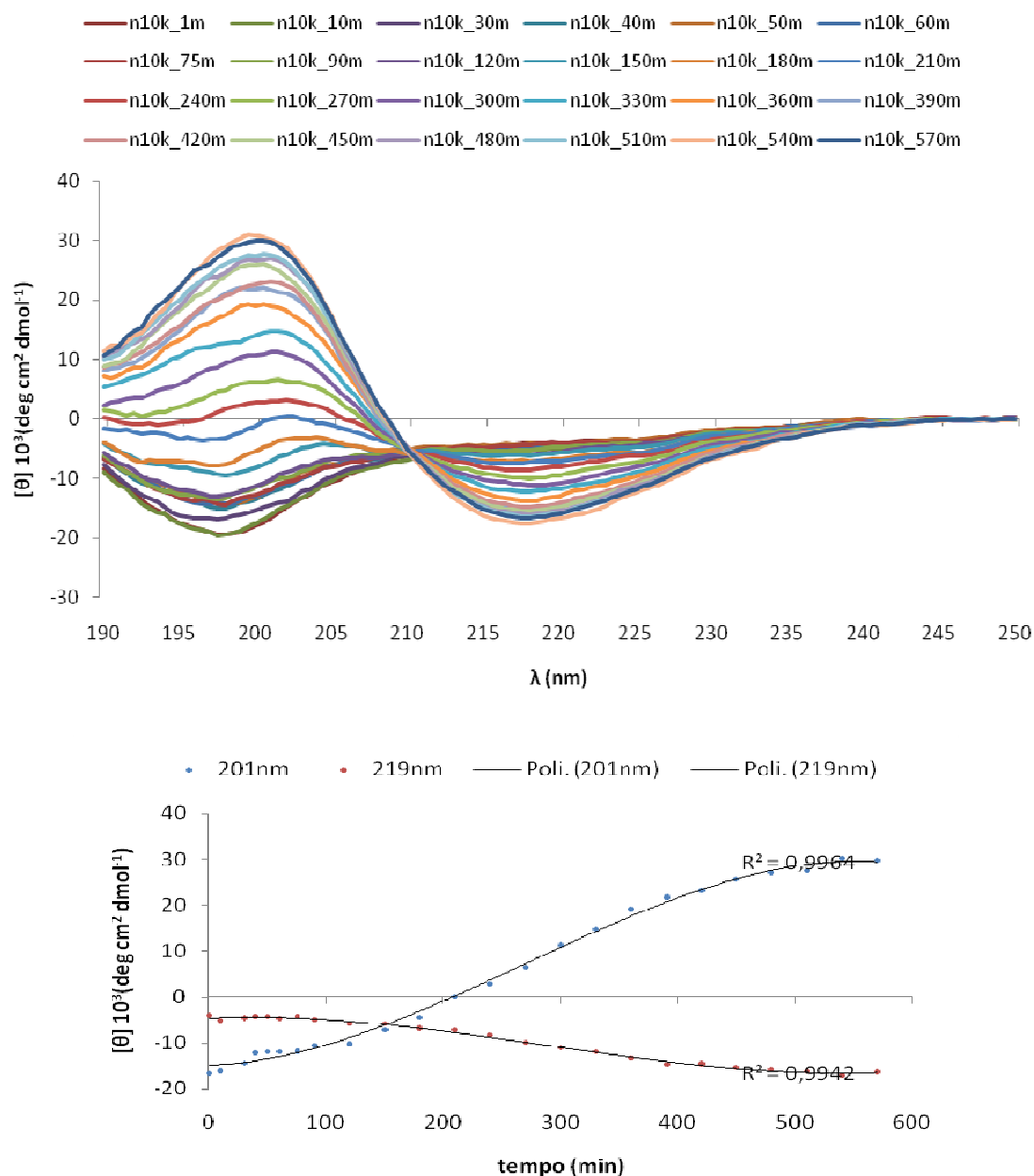


Figura 45. Cinetica di aggregazione del peptide N10K. Spettri CD di una soluzione acquosa 100 μ M del peptide N10K acquisito a 20°C a diversi intervalli di tempo, da 1 minuto (*random coil*) a 570 minuti (perfettamente aggregato in foglietto β), raggiungendo un picco di aggregazione con plateau dopo 6 giorni (vedi anche Figura 43/A), come mostrato anche dai valori di ellitticità molare $[\theta]$ a 201 e 219 nm, lunghezze d'onda alle quali alle strutture secondarie *random coil* e foglietto β corrispondono bande di intensità opposte, figura in basso.

Risultati

Allo stesso modo, è stata seguita la cinetica di denaturazione degli aggregati a 20 e 37°C del peptide N10K in soluzione acquosa 100 μ M, partendo da soluzioni madre 1,8 mM solubilizzate in tempi diversi (24 ore, 3 e 4 giorni), monitorata a diversi intervalli di tempo (ogni 15 minuti) alle lunghezze d'onda da 190 a 250 nm. Per quanto riguarda la soluzione peptidica a 24 ore, è stata osservata una notevole perdita di attività dicroica già dopo 15 minuti, con ulteriore riduzione fino a 1 ora, e successiva stabilizzazione in uno stato *random coil* (**Figura 46/A**). Nel caso della soluzione peptidica solubilizzata da 3 giorni si osserva una costante riduzione dell'attività dicroica, che si stabilizza dopo circa 150 minuti in uno stato ancora parzialmente aggregato; infatti, sono ancora evidenti nello spettro i picchi tipici positivi e negativi di una struttura organizzata in foglietto β (**Figura 46/B**). Questa differenza è sicuramente da attribuire al diverso livello di organizzazione degli aggregati in soluzione nonché al maggior numero di aggregati formati in tre giorni di solubilizzazione piuttosto che in 24 ore. Per quanto riguarda invece la cinetica di denaturazione a 37°C, sono stati monitorati gli spettri a 100 μ M partendo da una soluzione peptidica solubilizzata da 4 giorni alla concentrazione di 1,8 mM. Come controllo è stato acquisito lo spettro a 20°C della stessa soluzione, in modo da individuare il punto di partenza dell'aggregazione, e successivamente seguire la denaturazione termica a 37°C a diversi intervalli di tempo. I risultati hanno mostrato che lo stato molto organizzato degli aggregati di partenza si riduce già al tempo \emptyset dell'incubazione a 37°C, in cui si ha una drastica riduzione dell'attività dicroica. In questo caso si raggiunge quasi immediatamente un plateau nella curva, dopo 30 minuti a 37°C, che si mantiene costante fino a 90 minuti (**Figura 47**). Questa differenza nell'andamento della curva di cinetica di denaturazione alle diverse temperature può essere ascritta alla natura altamente idrofobica del peptide N10K, che facilita la compattazione degli aggregati in soluzione acquosa alle temperature più elevate, 37°C piuttosto che 20°C. Considerazione interessante è la presenza del punto isodicroico, unico punto di intersezione tra le varie curve, in tutte le condizioni sperimentali esaminate, ad una lunghezza d'onda di circa 210 nm. Tale punto indica il passaggio diretto da una forma all'altra nelle condizioni di equilibrio, escludendo la presenza di intermedi instabili tra le due forme strutturali, ed indicando la formazione di aggregati molto organizzati.

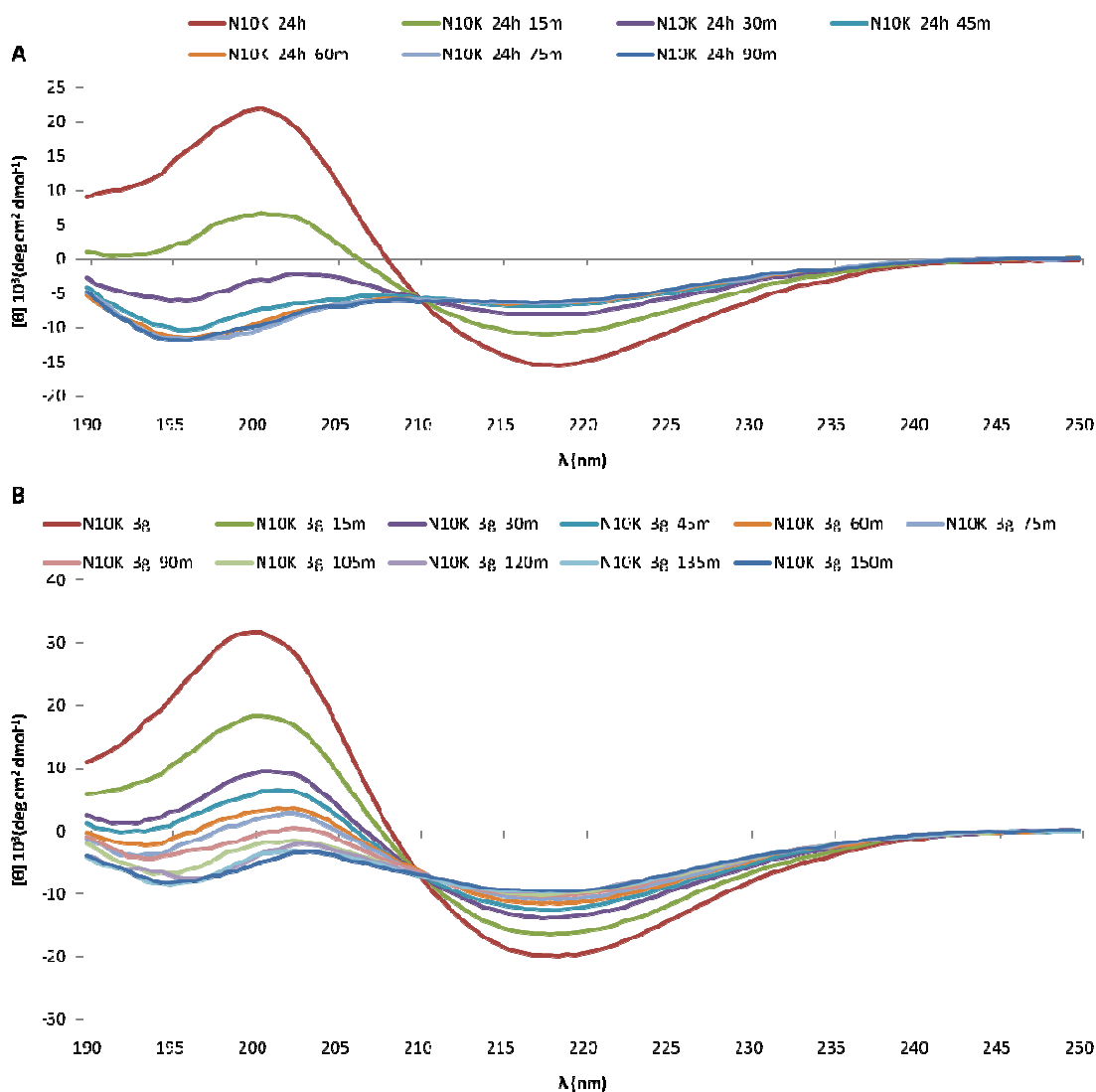


Figura 46. Cinetica di denaturazione del peptide N10K. Spettri CD di una soluzione acquosa 100 μ M del peptide N10K acquisiti a 20°C a diversi intervalli di tempo, ogni 15 minuti. **(A)** Denaturazione degli aggregati di una soluzione di 24 ore dal tempo \emptyset (N10K_24h), perfettamente aggregato in foglietto β a 90 minuti (N10K_24h_90m), completamente denaturato già dopo un'ora. **(B)** Denaturazione degli aggregati di una soluzione di 3 giorni dal tempo \emptyset (N10K_3g), perfettamente aggregato in foglietto β a 150 minuti (N10K_3g_150m), ancora parzialmente aggregato in strutture a foglietto β . Da notare la presenza del punto isodicroico a $\lambda \sim 210$ nm per entrambe le soluzioni.

Risultati

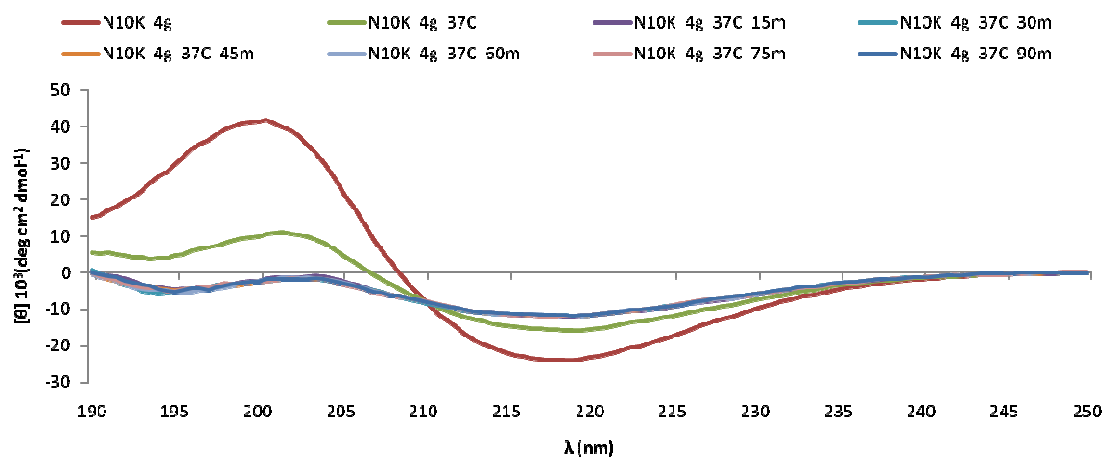


Figura 47. Cinetica di denaturazione del peptide N10K. Spettri CD di una soluzione acquosa 100 μM del peptide N10K acquisito a 20 e 37°C a diversi intervalli di tempo, ogni 15 minuti. È stato acquisito uno spettro degli aggregati di una soluzione di 4 giorni dal tempo 0 a 20°C (N10K_4g), perfettamente aggregato in foglietto β , e seguita la denaturazione degli aggregati della stessa soluzione a 37°C dal tempo 0 (N10K_4g_37C) a 90 minuti (N10K_4g_37C_90m), raggiungendo un plateau già dopo 30 minuti. Da notare la presenza del punto isodicroico a $\lambda \sim 210$ nm.

Peptidi CDR

Parallelamente agli studi condotti sui peptidi derivanti da Fc e al fine di stabilire se i CDR possano condurre verso una risposta immunitaria protettiva, dovuta esclusivamente alla loro attività immunomodulante, sono stati studiati i CDR non candidacidi di un mAb di topo cross-reattivo (MoA), specifico per l'antigene difucosile del gruppo sanguigno A umano, che non condivide nessuna omologia di sequenza con HuA, Ab umano diretto nei confronti dello stesso Ag. MoA e HuA sono quasi identici dal punto di vista immunochimico, nonostante presentino sequenze primarie non correlate, e sono rappresentativi di diversi modi con cui lo stesso epitopo possa essere riconosciuto dal sistema immunitario (381). Sono stati studiati gli effetti immunomodulanti dei CDR di mAb HuA, già valutati per la loro attività candidacida (378), così come gli effetti immunomodulanti e candidacidi dei CDR di MoA.

Attività immunomodulante *in vitro* di CDR selezionati su cellule immunitarie murine

Innanzitutto, è stato dimostrato che nessuno dei 6 CDR di MoA era candidacida *in vitro*, nelle condizioni sperimentali normalmente utilizzate (dati non mostrati). È stata allora analizzata la capacità di tutti i CDR sintetici umani (HuA) e murini (MoA) di stimolare la produzione di citochine da parte di una popolazione cellulare non omogenea come gli splenociti murini. Un peptide sintetico irrilevante precedentemente dimostratosi incapace di stimolare le cellule immunitarie è stato utilizzato come controllo negativo (NC) in tutti gli esperimenti (373).

I risultati ottenuti sono stati oggetto di recente pubblicazione (392) e vengono di seguito riportati.

È stato osservato che il peptide sintetico corrispondente a HuA V_LCDR3 è in grado di indurre una significativa *up*-regolazione della produzione di IL-6 ma non di TNF- α , mentre MoA V_HCDR3 è in grado di stimolare un'aumentata produzione di entrambe le citochine proinfiammatorie da parte dei macrofagi. Altri CDR o NC non hanno influenzato la produzione di citochine da parte degli splenociti. Dato che la secrezione di citochine proinfiammatorie è generalmente considerata un requisito fondamentale delle cellule dell'immunità innata (393), macrofagi peritoneali murini (PM) purificati sono stati stimolati con tutti i peptidi CDR sintetici murini ed umani. I risultati hanno dimostrato che, come osservato negli splenociti, la stimolazione con HuA V_LCDR3 o con MoA V_HCDR3 ha indotto nei PM, rispettivamente, un significativo aumento ($P < 0,05$) della produzione di IL-6 (fino a 800 pg/ml) (**Figura 48/A**), e di TNF- α (fino a 125 pg/ml) e IL-6 (fino a 50 pg/ml) (**Figura**

Risultati

48/B, alto). Un analogo saggio condotto utilizzando PMN murini non ha evidenziato alcuna produzione di TNF- α e/o IL-6 dopo 18 ore (**Figura 48/B, basso**). Tutti gli altri CDR o NC non hanno stimolato la produzione di citochine, mentre LPS, utilizzato come controllo positivo, ha confermato la sua già nota capacità di indurre la produzione di citochine nei due modelli cellulari.

Dal momento che MoA V_HCDR3 ha mostrato una migliore capacità di modulare le citochine proinfiammatorie da parte di PM rispetto a HuA V_LCDR3, tale peptide è stato utilizzato negli esperimenti successivi.

Al fine di analizzare la possibile interazione di V_HCDR3 con cellule del sistema immunitario, DC, PM, PMN e linfociti T sono stati incubati con V_HCDR3 marcato con biotina (b-V_HCDR3) per un'ora, e successivamente permeabilizzati, trattati con un mAb anti-biotina marcato con isotiocianato di fluoresceina (FITC) ed analizzati mediante citofluorimetria, per determinare l'*uptake* del peptide. I risultati, espressi come percentuale di cellule positive, hanno mostrato che le cellule ricettive per il peptide sono solamente i PM (P < 0,05, cellule trattate con b-V_HCDR3 rispetto ai controlli), mentre DC, PMN e linfociti T non hanno mostrato alcuna significativa interazione con b-V_HCDR3 (**Figura 48/C**). Il legame di NC è risultato marginale in ogni popolazione cellulare valutata.

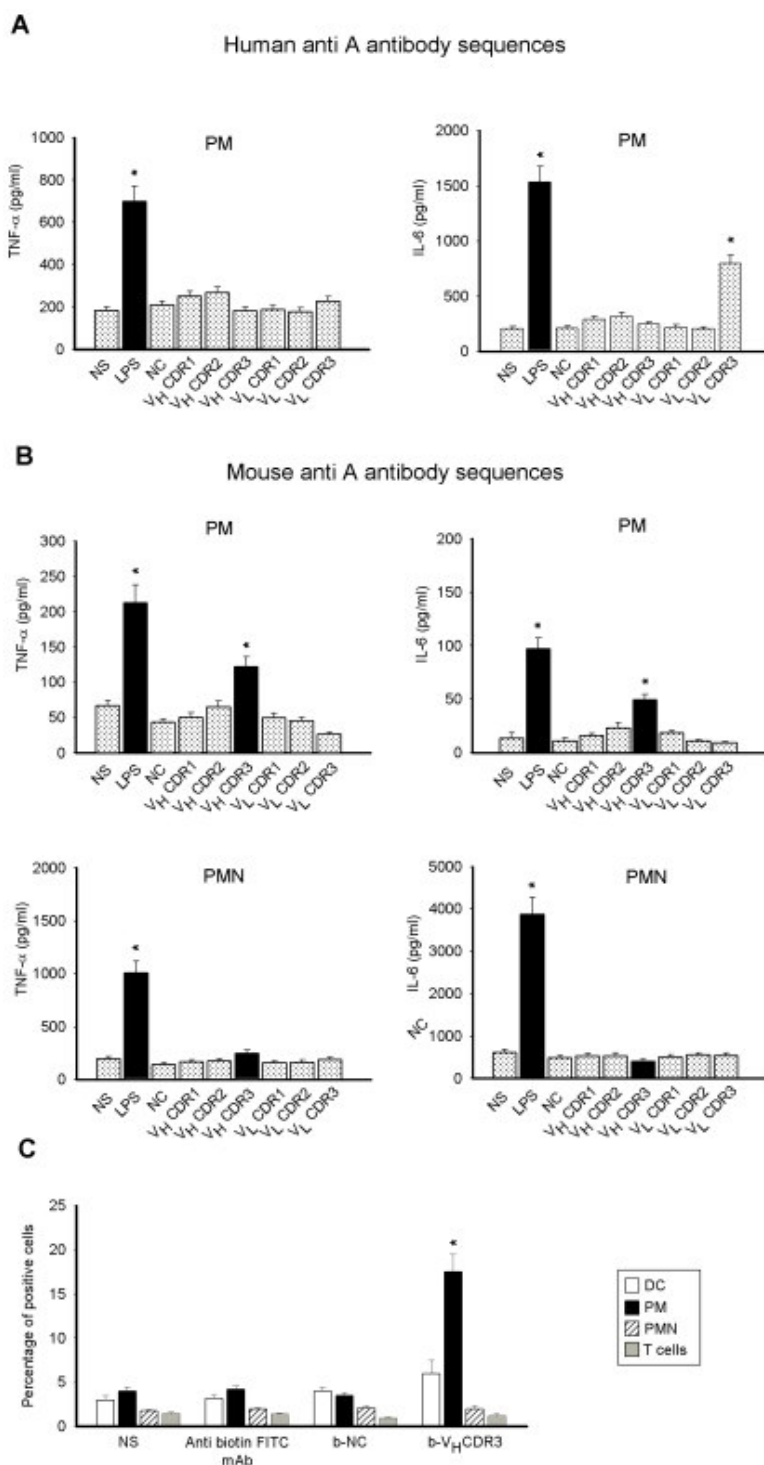


Figura 48. Produzione di TNF- α e IL-6 da parte di PM e PMN stimolati con CDR umani e/o murini e uptake di V_HCDR3 murino da parte di diverse popolazioni cellulari. PM (A) o PM e PMN (B) (entrambi 5×10^6 /ml) sono stati coltivati in presenza o assenza (NS) di CDR umani e/o murini, LPS, o NC (tutti $10 \mu\text{g/ml}$) per 18 ore. Dopo incubazione, i livelli di TNF- α e IL-6 sono stati valutati nei sovranatanti colturali mediante specifici saggi ELISA. (C) DC, PM, PMN e linfociti T (tutti 1×10^6 /ml) sono stati incubati per un'ora in presenza o assenza (NS) di b-V_HCDR3 o b-NC (entrambi $10 \mu\text{g/ml}$). Dopo incubazione, le cellule permeabilizzate sono state fatte reagire con mAb marcato con FITC specifico per la biotina e analizzate mediante citometria a flusso FACScan. I dati sono riportati come percentuale di cellule positive (* $P < 0,05$ cellule trattate vs cellule non trattate) (392).

Risultati

Dato che V_HCDR3 si è dimostrato in grado di stimolare la produzione di TNF- α e IL-6 e di legarsi significativamente a PM, si poteva ipotizzare una interazione fisica tra macrofagi e peptide. Di conseguenza, è stata analizzata la cinetica (20 minuti, 1, 6, 18 e 72 ore) di *uptake* di V_HCDR3 da parte di PM. I risultati hanno mostrato che tale *uptake* era elevato dopo un'ora di incubazione, persisteva dopo 6 e 18 ore, e scendeva a livelli trascurabili dopo 72 ore (**Figura 49/A**). L'incubazione prolungata probabilmente determinava la degradazione o espulsione di V_HCDR3 da parte delle cellule, come documentato dalla rapida diminuzione della intensità di fluorescenza media (MFI) e dalla percentuale di cellule positive a 72 ore (**Figura 49/A**). Inoltre, l'*uptake* di V_HCDR3 è stato confermato dall'osservazione al microscopio a fluorescenza. A parte una certa fluorescenza aspecifica di fondo osservabile nei PM trattati con mAb anti-biotina marcato con FITC (Anti biotin FITC mAb) o con b-NC, l'intensa fluorescenza verdastra specifica, rilevabile nelle cellule trattate con V_HCDR3 e confermata dalla sovrapposizione (merge) delle immagini ottenute con le due diverse colorazioni, testimonia l'avvenuto, specifico *uptake* del peptide (**Figura 49/B**). A tutti i tempi considerati il legame di NC è stato trascurabile.

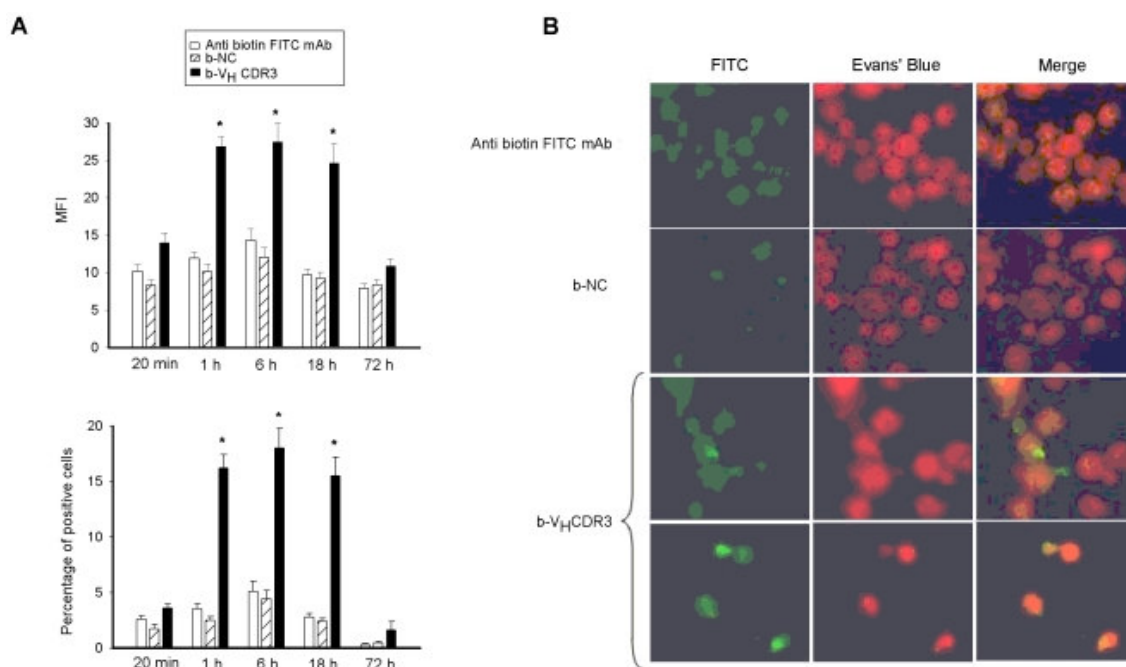


Figura 49. Cinetica di *uptake* di V_HCDR3 da parte dei PM. (A) PM (1×10^6 /ml) sono stati incubati per tempi diversi con b-V_HCDR3 o b-NC (tutti 10 μ g/ml). Dopo incubazione, le cellule permeabilizzate sono state fatte reagire con mAb marcato con FITC specifico per la biotina e analizzate mediante citometria di flusso FACSscan. I dati sono riportati come intensità di fluorescenza media (MFI) (alto) e percentuale di cellule positive (basso). (B) In esperimenti selezionati, le cellule sono state incubate per un'ora, fatte reagire con mAb marcato con FITC specifico per la biotina in presenza di Blue di Evans e, successivamente, esaminate al microscopio a fluorescenza. Da notare la fluorescenza verde delle cellule trattate con b-V_HCDR3 (* $P < 0,05$ cellule trattate vs cellule non trattate) (392). Ingrandimento originale 20 \times .

Poiché è stato accertato che il network PI3K-Akt è coinvolto nella regolazione di risposte cellulari, tra cui attivazione cellulare, sintesi proteica, regolazione del ciclo cellulare e sopravvivenza (394) e che PI3K rappresenta un segnale di trasduzione associato con l'attivazione cellulare (395), è stata considerata la possibilità che l'attivazione dei macrofagi mediata da MoA V_HCDR3 implicasse il reclutamento di PI3K. Inoltre, dato che la fosforilazione di Akt dipendente da PI3K è correlata ad una aumentata attività di PI3K (395), la fosforilazione di Akt in cellule stimulate per un'ora con MoA V_HCDR3 è stata valutata, utilizzando un peptide *scramble* (SP) come ulteriore controllo della specifica attività immunomodulante. I risultati ottenuti, mediante Western Blotting dei lisati cellulari e trattamento delle membrane di nitrocellulosa con Ab anti-pAkt o anti-Akt, dimostrano che mentre Akt viene prodotta in modo simile in tutte le condizioni valutate, la sua forma fosforilata (pAkt) risulta notevolmente aumentata nelle cellule stimulate con V_HCDR3 o LPS, rispetto a quelle di controllo (NC e SP) (**Figura 50/A, alto**); tale osservazione è ulteriormente confermata dalla significatività ($P < 0,05$) del rapporto pAkt/Akt per tali cellule (**Figura 50/A, basso**). Nei PM stimolati con V_HCDR3 o LPS l'aumentata produzione di pAkt sembra correlata ad un'aumentata produzione di TNF- α (**Figura 50/B**).

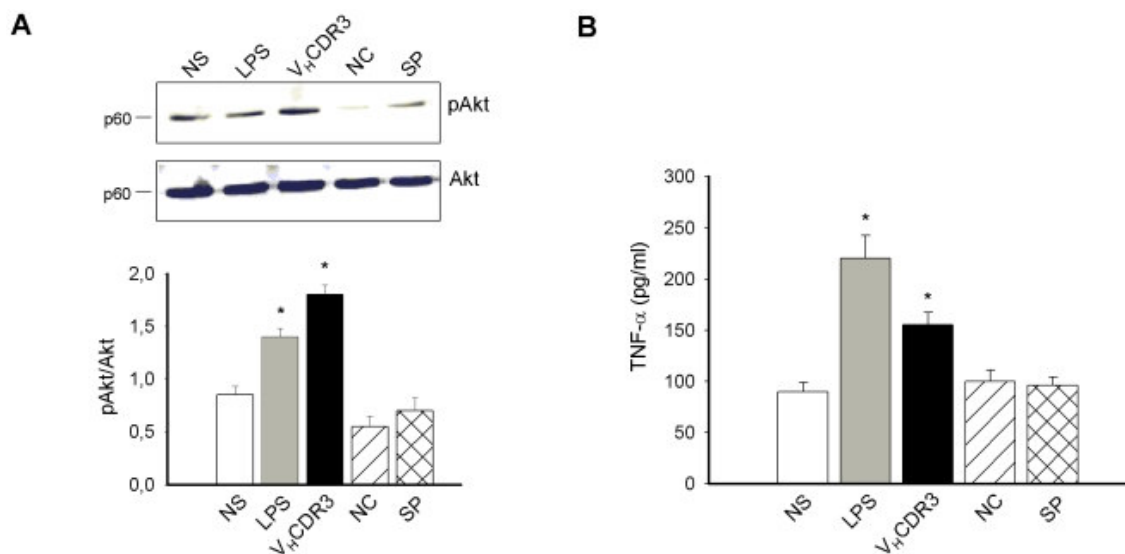


Figura 50. Attivazione di fosfo-Akt e produzione di TNF- α in PM stimolati con V_HCDR3. **(A)** PM (3×10^6 /ml) sono stati stimolati per un'ora in presenza o assenza (NS) di V_HCDR3, LPS, NC o SP (tutti 10 μ g/ml). Dopo incubazione, i lisati cellulari sono stati sottoposti a Western Blotting. Le membrane sono state incubate con Ab specifici per pAkt e Akt; pAkt è stato normalizzato nei confronti di Akt. **(B)** PM (5×10^6 /ml) sono stati stimolati per 18 ore. Dopo incubazione, il livello di TNF- α è stato valutato nei sovrantanti colturali mediante specifici saggi ELISA (* $P < 0,05$ cellule trattate vs cellule non trattate) (392).

Risultati

In base all'osservazione che Akt è coinvolta nella regolazione dell'attivazione del gene codificante TNF- α mediante l'intervento di fattori nucleari (394), si è voluto verificare se in questo caso tale attivazione avvenga mediante fosforilazione della proteina I κ B α , consentendo la traslocazione nel nucleo del fattore di trascrizione NF κ B. I κ B α , infatti, nella forma non fosforilata lega NF κ B nel citoplasma inibendone traslocazione nel nucleo e funzioni (fattore di trascrizione e legame al DNA); la sua fosforilazione ne determina la ubiquitinazione, la dissociazione da NF κ B e l'eventuale degradazione da parte del proteasoma. NF κ B è così libero di traslocare nel nucleo, dove si lega al DNA fungendo da fattore di trascrizione (396). Analogamente a quanto osservato per pAkt/Akt, i risultati ottenuti (**Figura 51/A**) dimostrano un'aumentata produzione della forma fosforilata (pI κ B α) di I κ B α nei PM stimolati con V_HCDR3 o LPS, come confermato anche dal rapporto pI κ B α /I κ B α ($P < 0,05$). Il trattamento delle cellule con wortmannina, un inibitore del pathway PI3K-Akt, ha determinato una significativa riduzione di tale fosforilazione ($P < 0,05$), confermando il ruolo decisivo di tale pathway nel processo (**Figura 51/A**). L'attività stimolatoria di V_HCDR3 è stata confermata anche dalla sua capacità di indurre nei PM trattati un significativo aumento della espressione del gene codificante per TNF- α , valutata mediante determinazione del numero di copie di mRNA specifico per tale citochina, confermata dalla incapacità di NC di attivare le cellule. Tale numero, normalizzato con quello ottenuto per il gene GAPDH utilizzato come controllo negativo interno, è stato calcolato mediante Real-Time-PCR (qPCR) condotta su cDNA ottenuto per retrotrascrizione da 100 ng/ml di RNA purificato da PM trattati per tempi diversi. La stimolazione con V_HCDR3 ha determinato un significativo aumento dei trascritti specifici per TNF- α dopo un'ora di incubazione (analogamente a quanto osservato con LPS), con un successivo declino dell'espressione genica nel tempo (6 ore) ed il suo azzeramento dopo più prolungata incubazione (18 ore) (**Figura 51/B**).

Dato che p38 MAPK sembra essere correlato alla produzione di TNF- α e al "signaling" attraverso l'attivazione di PI3K, il coinvolgimento di p38 MAPK e/o di PI3K nella produzione di TNF- α è stato valutato utilizzando un inibitore di p38 MAPK (SB203580) e wortmannina (inibitore del pathway PI3K-Akt). I risultati ottenuti hanno evidenziato come il trattamento di PM con i due inibitori abbia ridotto la produzione di TNF- α indotta da LPS e V_HCDR3, rispettivamente del 39 e 28% (wortmannina) e del 28 e 21% (SB203580).

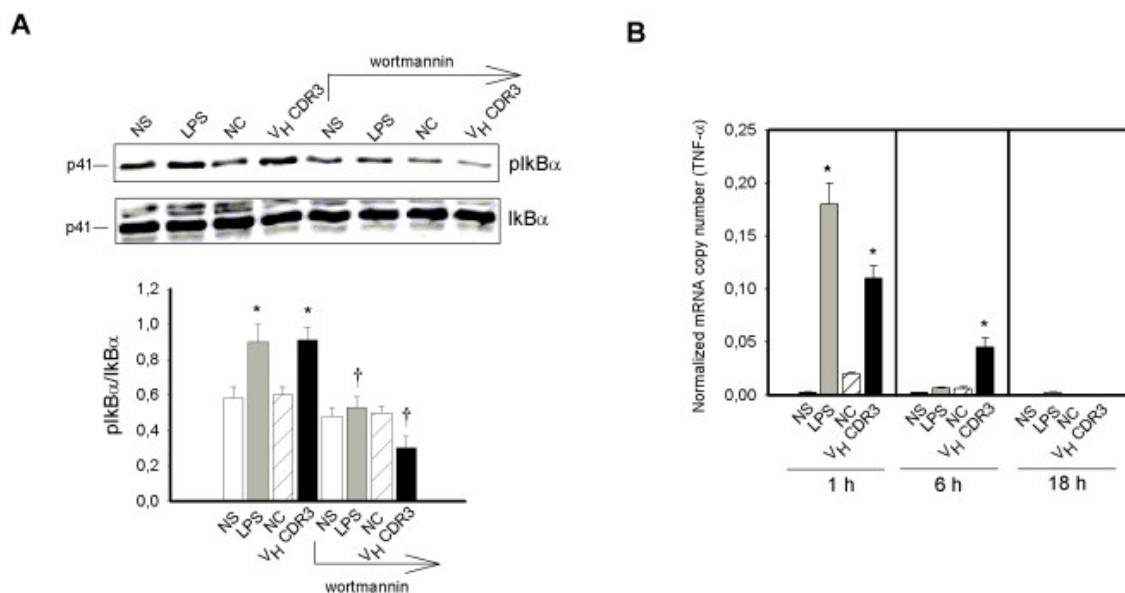


Figura 51. Attivazione di fosfo-IkB α ed espressione genica di TNF- α in PM stimolati con V_HCDR3. **(A)** PM (3×10^6 /ml) sono stati stimolati per un'ora in presenza o assenza (NS) di wortmannina (4 nM), V_HCDR3, LPS o NC (tutti 10 μ g/ml). Dopo incubazione, i lisati cellulari sono stati sottoposti a Western Blotting. Le membrane sono state incubate con Ab specifici per pIkB α e IkB α ; pIkB α è stato normalizzato nei confronti di IkB α . **(B)** Per saggiare il livello di espressione genica di TNF- α , PM (1×10^6 /ml) sono stati coltivati per 1, 6 e 18 ore. Dopo incubazione, l'RNA totale è stato isolato e analizzato per l'espressione di mRNA con RT-PCR. Il numero di copie trascritte è stato determinato utilizzando qPCR usando cDNA come template. Il numero delle copie è stato normalizzato contro il numero di copie del gene GAPDH (*P < 0,05 cellule trattate vs cellule non trattate; †P < 0,05 cellule trattate con wortmannina vs cellule non trattate) (392).

Poichè TNF- α è considerato un regolatore positivo dell'espressione di TLR-4 e la capacità delle cellule di rispondere a molte molecole microbiche dipende dai livelli di espressione di tale recettore, e dato che, come appena dimostrato, TNF- α viene secreto abbondantemente da PM in seguito a stimolazione con V_HCDR3, si è voluto verificare se, nei sistemi sperimentali, utilizzati, l'espressione di TLR-4 fosse regolata da questa citochina.

Utilizzando approcci sperimentali del tutto simili a quelli descritti precedentemente per TNF- α , è stato possibile dimostrare un rapido (1 ora) e significativo (P < 0,05) aumento dell'espressione genica per TLR-4 solamente in PM stimolati con V_HCDR3, con successivo declino dopo 6 ore (**Figura 52/A**). Tale attivazione è correlata con un conseguente significativo aumento della sintesi della proteina TLR-4, come evidenziato dall'analisi Western Blot e calcolo del rapporto TLR-4/actina, 1 e 3 ore dopo stimolazione con V_HCDR3 (**Figura 52/B**). Coerentemente con questi risultati, è stato osservato, mediante citofluorimetria a flusso, un aumento significativo della percentuale di cellule TLR-4 positive (38,1%) dopo

Risultati

un'ora di incubazione con V_HCDR3 e trattamento con mAb anti-TLR-4 marcato con ficoeritrina ricombinante (RPE) (**Figura 52/C**). Nessuna attivazione è stata osservata dopo stimolazione con LPS o NC. Questo potrebbe essere dovuto alla capacità di LPS di indurre la produzione di altre citochine, come IL-10, che possono inibire l'espressione di TLR-4.

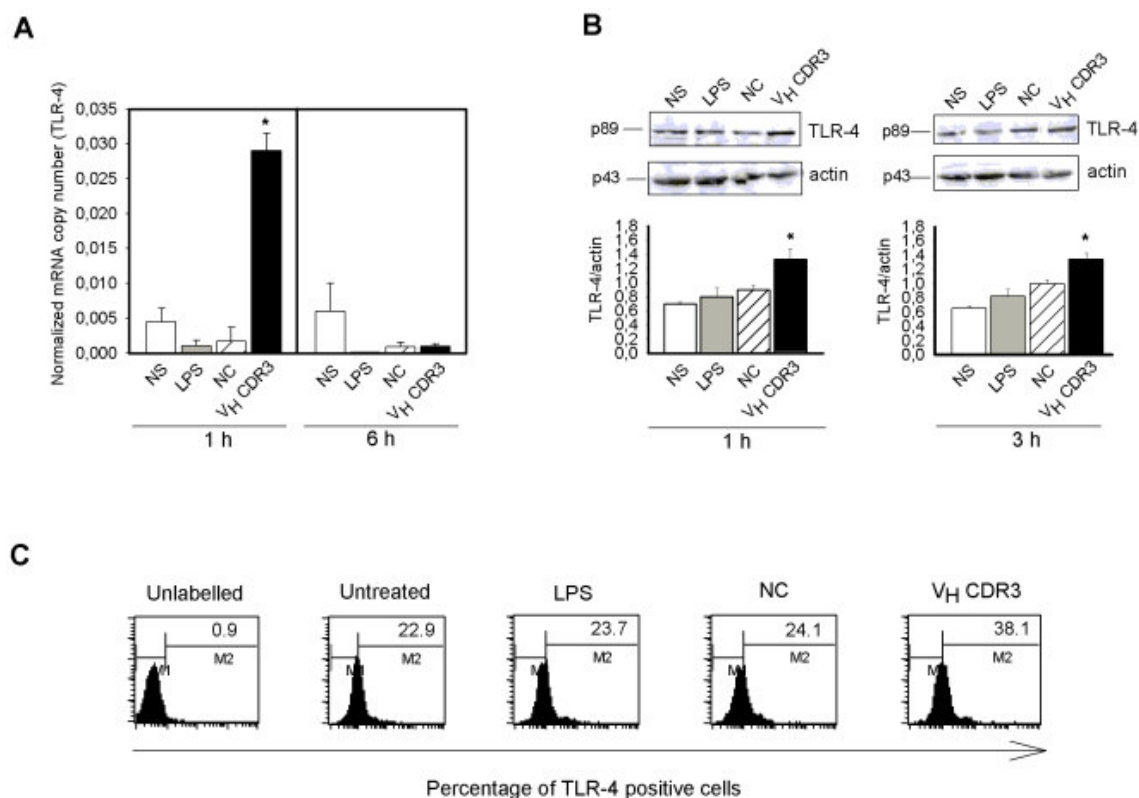


Figura 52. Espressione di TLR-4 in PM stimolati con V_HCDR3. **(A)** PM (1×10^6 /ml) sono stati coltivati per 1 e 6 ore in presenza o assenza (NS) di V_HCDR3, LPS o NC (tutti 10 μ g/ml). Dopo incubazione, l'RNA totale è stato isolato e analizzato per l'espressione di mRNA con RT-PCR. Il numero di copie trascritte è stato determinato utilizzando qPCR usando cDNA come template. Il numero di copie è stato normalizzato rispetto al numero di copie del gene GADPH. **(B)** PM (3×10^6 /ml) sono stati coltivati per 1 e 3 ore. Dopo incubazione, i lisati cellulari sono stati sottoposti a Western Blotting. Le membrane sono state incubate con Ab specifici per TLR-4 e actina. La produzione di TLR-4 è stata normalizzata rispetto ad actina. **(C)** PM (1×10^6 /ml) sono stati coltivati per un'ora. Dopo incubazione, le cellule permeabilizzate sono state fatte reagire con mAb marcato con RPE specifico per TLR-4 e analizzate mediante citometria a flusso FACScan. I valori rappresentano la percentuale di cellule positive (* $P < 0,05$ cellule trattate vs cellule non trattate) (392).

Per confermare il coinvolgimento diretto di TNF- α nell'aumentata espressione di TRL-4 nei PM, è stata valutata la produzione di questa citochina da parte di queste cellule in presenza o assenza di V_HCDR3 e di Ab anti-TNF- α . Un aumento significativo della produzione di TNF- α è stata osservata dopo un'ora di stimolazione con V_HCDR3 (**Figura 53/A**). Come riportato in **Figura 53/B**, l'espressione di TRL-4 in PM stimolati per un'ora con V_HCDR3 in presenza di Ab specifici anti-TNF- α è risultata significativamente inibita, come attestato dalla riduzione della percentuale di cellule TLR-4 positive in citofluorimetria. Per chiarire se questa inibizione dell'espressione di TRL-4 fosse dovuta alla sua internalizzazione, i livelli della proteina sono stati analizzati mediante immunoblotting. Come mostrato in **Figura 53/C**, mediante analisi in Western Blotting (pannello superiore) e calcolo del rapporto TRL-4/actina (pannello inferiore), un'ora dopo la stimolazione con V_HCDR3, i livelli di proteina TRL-4 nelle cellule trattate col peptide in presenza di mAb anti-TNF- α sono risultati significativamente diminuiti ($P < 0,05$), rispetto a controlli non trattati. Questi risultati sembrano essere una diretta conseguenza dell'inibizione della trascrizione genica, come evidenziato in **Figura 53/D**.

Risultati

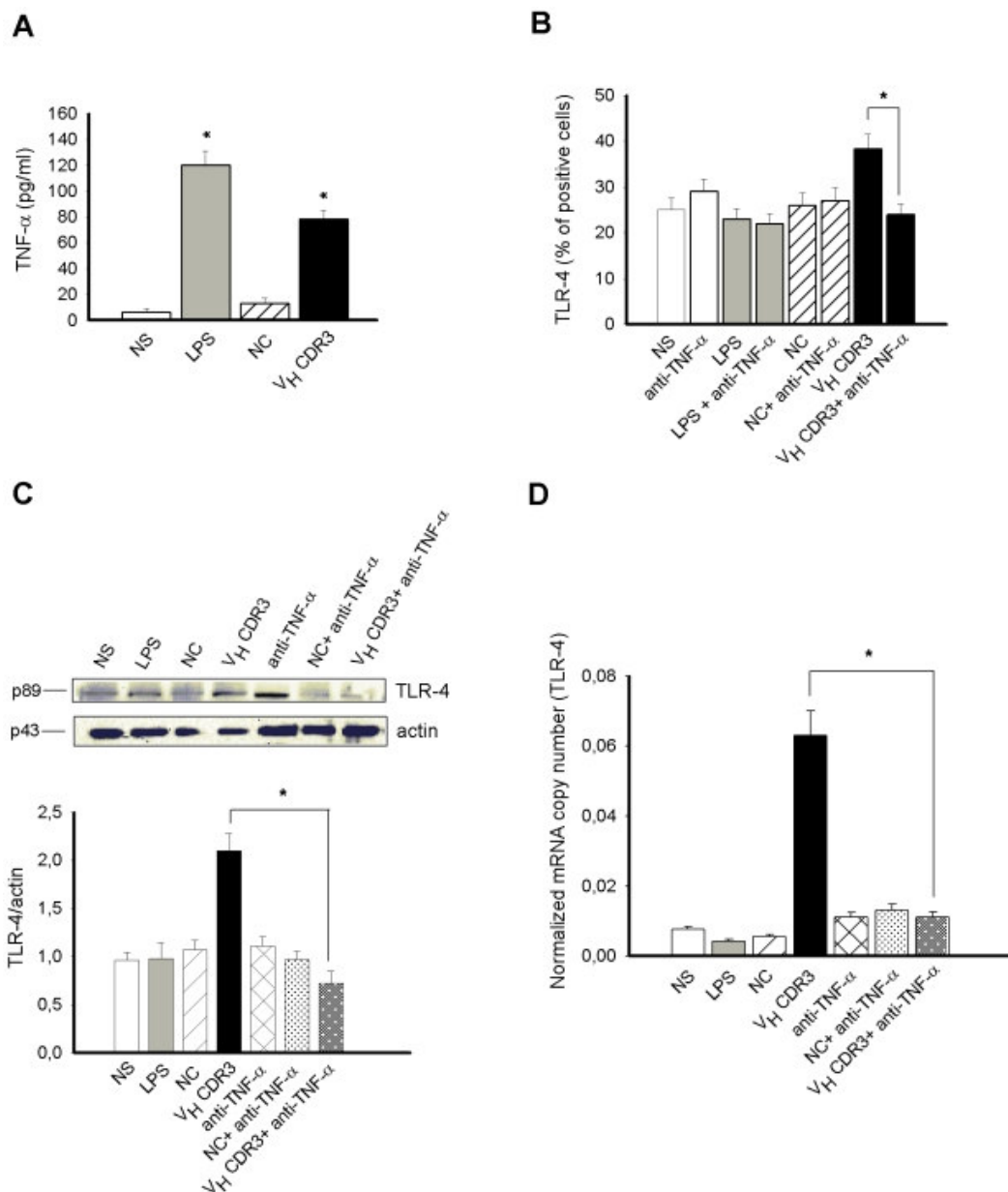


Figura 53. Espressione di TLR-4 indotta da TNF- α in PM stimolati con V_HCDR3. **(A)** PM (5×10^6 /ml) sono stati coltivati per un'ora in presenza o assenza (NS) di V_HCDR3, LPS o NC (tutti 10 μ g/ml). Dopo incubazione, il livello di TNF- α è stato valutato nei sovrinatanti culturali mediante specifici saggi ELISA. **(B)** PM (1×10^6 /ml) sono stati coltivati per un'ora con V_HCDR3, LPS o NC (tutti 10 μ g/ml), in presenza o assenza (NS) di mAb specifico per TNF- α (0,5 μ g/ml). Dopo incubazione, le cellule permeabilizzate sono state fatte reagire con mAb marcato con RPE specifico per TLR-4 e analizzate mediante citometria a flusso FACScan. I valori rappresentano la percentuale di cellule positive. **(C)** PM (3×10^6 /ml) sono stati coltivati per un'ora. Dopo incubazione, i lisati cellulari sono stati sottoposti a Western Blotting. Le membrane sono state incubate con Ab specifici per TLR-4 e actina. La produzione di TLR-4 è stata normalizzata rispetto ad actina. **(D)** Per saggiare il livello di espressione genica di TLR-4, PM (1×10^6 /ml) sono stati coltivati per un'ora. Dopo incubazione, l'RNA totale è stato isolato e analizzato per l'espressione di mRNA con RT-PCR. Il numero di copie trascritte è stato determinato utilizzando qPCR usando cDNA come template. Il numero di copie è stato normalizzato rispetto al numero di copie del gene GAPDH (* $P < 0,05$ cellule trattate vs cellule non trattate) (392).

Attività terapeutica *in vivo* in un modello di infezione sperimentale sistemica

Dato che MoA V_H CDR3 si è dimostrato in grado di indurre uno stato di attivazione in PM, è stata considerata la possibilità che questo potesse influenzare il decorso di infezioni sperimentali in un modello murino di candidosi sistemica, già precedentemente utilizzato, nonostante la mancanza di attività candidacida diretta da parte del peptide. Topi sono stati inoculati endovena con un ceppo altamente virulento di *C. albicans* e trattati con V_H CDR3 o V_L CDR3 (quest'ultimo, non immunomodulante e non candidacida, utilizzato come controllo negativo), mediante iniezione intraperitoneale 1, 24 e 48 ore dopo l'infezione.

L'osservazione della mortalità nei 30 giorni successivi all'infezione sperimentale ha evidenziato che il trattamento con V_H CDR3 ha determinato un significativo aumento della sopravvivenza degli animali infettati, rispetto ai controlli (**Figura 54/A**), ed una impressionante riduzione della colonizzazione renale da parte del lievito infettante (**Figura 54/B**).

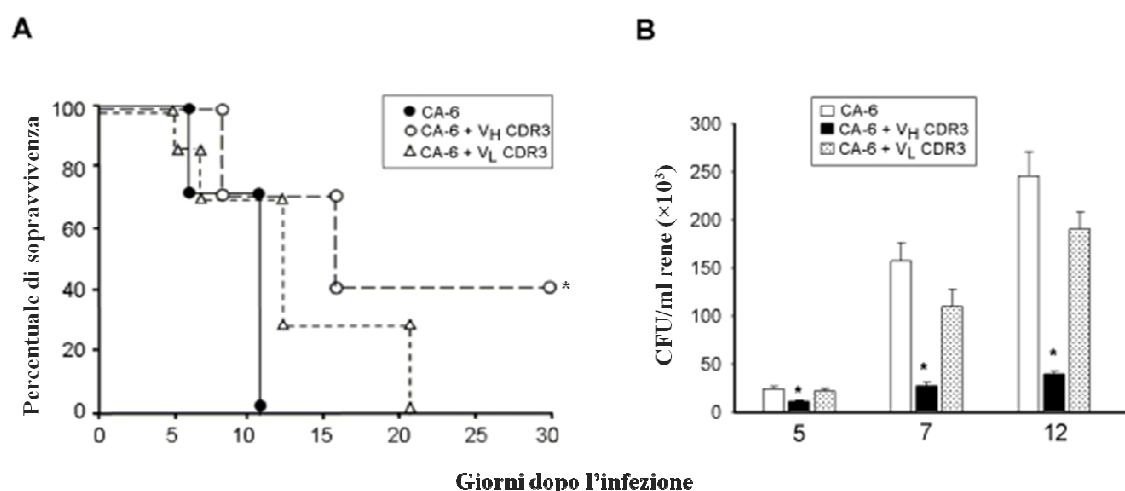


Figura 54. Percentuale di sopravvivenza e determinazione della carica fungina in reni di topi Balb/c infettati con *C. albicans* CA-6 e trattati con V_H CDR3 o V_L CDR3. **(A)** La percentuale di sopravvivenza dei topi infettati è stata valutata mediante Mantel-Cox Logrank test e le differenze tra i gruppi sperimentali è risultata significativa. **(B)** Le CFU nei reni dei topi sono state determinate 5, 7 e 12 giorni dopo l'infezione fungina (* $P < 0,05$).

Discussione

In studi precedenti è stato dimostrato che i CDR, o frammenti peptidici connessi, di un scFv, che rappresenta l'immagine interna di una tossina killer (KT) di *Pichia anomala* ad ampio spettro antimicrobico, possono esercitare una attività microbica *in vitro* nei confronti di microrganismi sensibili a KT, caratterizzati dalla presenza di specifici recettori sulla parete cellulare principalmente costituiti da β -1,3-glucani (362). In particolare, il decapeptide KP, caratterizzato da una elevata attività candidacida, ha dimostrato di essere attivo, *in vitro*, nei confronti di diversi microrganismi procarioti ed eucarioti e di inibire *in vitro*, *ex vivo* e/o *in vivo* la replicazione dei virus HIV-1 ed influenzale attraverso differenti meccanismi d'azione (362, 366-369, 371, 372, 379). KP ha mostrato di esercitare un'attività terapeutica molto efficace in modelli sperimentali di candidosi vaginale e sistemica, criptococchi disseminata e paracoccidioidomicosi così come di infezione da virus dell'influenza A. KP ha dimostrato, inoltre, di modulare l'espressione di molecole costimolatorie e MHC in cellule dendritiche murine (DC), dopo legame selettivo, e di migliorare la loro capacità di indurre la proliferazione dei linfociti (373).

Recenti studi sul rapporto struttura-funzione hanno mostrato la capacità di KP di autoaggregare reversibilmente ad uno stato simile a idrogel, con un processo significativamente catalizzato da β -1,3-glucani. Gli aggregati di KP possono offrire protezione nei confronti di proteasi e regolare il rilascio della forma attiva nel tempo, mentre l'affinità per i β -glucani è responsabile della sua attività mirata (375).

È stato successivamente documentato che le sequenze peptidiche isolate corrispondenti a CDR, soprattutto CDR H₃, chiamate microAb, possono mostrare le stesse proprietà di legame e funzioni biologiche mostrate dall'Ab nativo (354, 397). Recentemente, è stato dimostrato che, indipendentemente dalla specificità dell'Ab nativo per un determinato Ag, i CDR spesso possono esplicare attività antimicrobica (*C. albicans*), antivirale (HIV-1) e antitumorale (melanoma) differenziali, *in vitro*, *ex vivo* e/o *in vivo*, con modalità che ricordano quelle delle molecole dell'immunità innata (378).

Sulla base di tali esperienze ed utilizzando approcci sperimentali simili, durante l'intero corso di dottorato è stata analizzata principalmente l'attività antimicrobica, antivirale ed immunomodulante di peptidi anticorpali, in particolare derivanti dalla porzione Fc o da CDR. Principalmente, è stato dimostrato che peptidi sintetici, rappresentanti sequenze incluse nella regione C degli Ab e potenzialmente derivanti dalle principali classi di Ig in seguito a taglio

Discussione

proteolitico fisiologico durante la loro emivita, possono anch'essi essere caratterizzati da attività microbica ed immunomodulante differenziale.

La ricerca iniziale di possibili peptidi di interesse per ciascuna classe di Ig (IgG1, IgM, IgA) è stata finalizzata all'ottenimento di sequenze generate da tagli di enzimi fisiologicamente presenti nell'organismo, quali catepsine, tripsina e chimotripsina, in zone di Fc altamente conservate, anche in funzione di ulteriori parametri, quali la lunghezza del peptide generato, il punto isoelettrico e l'alternanza di amminoacidi idrofobici/idrofilici. Tali parametri sono stati presi in considerazione in quanto è noto che l'interazione, sia ionica sia idrofobica/idrofilica, di corti peptidi, quali gli AMP, con pareti cellulari o membrane plasmatiche di microrganismi o con virus è di fondamentale importanza per eventuali effetti antimicrobici e/o antivirali.

I peptidi ottenuti da tale selezione sono stati sottoposti ai saggi di attività biologica, in particolare antimicrobica, antivirale ed immunomodulante. È stata valutata inizialmente l'attività microbica *in vitro* dei peptidi N10K e T11F, mostratisi maggiormente attivi nei saggi *in vitro* nei confronti di due ceppi di lievito di riferimento di *C. albicans* e *C. neoformans*, così come del peptide H4L, comune a tutte le Ig, determinando nel primo caso in modo del tutto preliminare i valori di EC₅₀ nei confronti di diversi ceppi batterici e funghi, mediante saggi di CFU. In particolare, i saggi sono stati condotti nei confronti di ceppi microbici di *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, per quanto riguarda i batteri, e *C. albicans*, *C. neoformans*, *A. fumigatus* e *M. furfur*, per quanto riguarda i funghi. È stata anche determinata, con saggi preliminari, la sensibilità di ceppi caspofungina-resistenti di *C. albicans* e *S. cerevisiae* nei confronti di entrambi i peptidi, suggerendo un meccanismo d'azione differente da quello esplicito dall'antimicotico convenzionale.

È stato possibile dimostrare, inoltre, che l'attività candidacida del peptide N10K è completamente abolita in presenza di laminarina (β -1,3-glucano solubile), stabilendo così che i β -glucani sono essenziali nella fase di riconoscimento di tale peptide nei confronti di *C. albicans* per esplicitare la propria attività antimicrobica. Studi di *time killing* hanno consentito di stabilire, in via del tutto preliminare, la diversa modalità d'azione candidacida; infatti, mentre T11F esplicita la sua attività antifungina già dopo 30 minuti di esposizione, per il peptide N10K occorrono circa 6 ore. Gli aspetti relativi alla comprensione dei meccanismi d'azione a livello molecolare sono attualmente in fase di studio.

Lo studio delle proprietà antivirali *in vitro* dei peptidi selezionati, in particolare nei confronti del ceppo linfocitotropico IIIB (X4) e del ceppo monocitotropico BaL (R5) di HIV, ha consentito di evidenziare una inibizione differenziale da parte dei peptidi H4L, N10K e T11F.

Significativamente, N10K ha dimostrato di poter esplicare una attività terapeutica e proteggente in un consolidato modello murino di candidosi sperimentale sistemica, mentre N10K e T11F hanno dimostrato analoga attività terapeutica in un modello murino sperimentale di candidosi vaginale.

Il peptide N10K, inoltre, si è dimostrato possedere proprietà immunomodulanti *in vitro* nei confronti di cellule umane del sistema immunitario, essendo in grado di stimolare la produzione di mediatori citochinici, quali IL-6 in monociti e IL-6 e IL-12p40 in PBMC, l'espressione di Dectina-1 in PBMC, e di modulare proteine coinvolte nel pathway di attivazione di Dectina-1, come pSyk, CARD-9 e p-Ik β - α .

Altrettanto interessanti sembrano essere l'attività antitumorale dimostrata *in vitro* dai peptidi N10K e T11F nei confronti di cellule di melanoma B16F10-Nex2, attività particolarmente rilevante per il peptide N10K, e l'assenza di rilevanti effetti citotossici ed emolitici *in vitro* dei peptidi H4L, N10K e T11F nei confronti della linea cellulare LLC-MK2 o di emazie, anche a concentrazioni, rispettivamente, 25 e 100 volte superiori a quelle candidacide. Anche gli studi in Dicroismo Circolare hanno consentito di ottenere informazioni rilevanti per chiarire soprattutto la modalità d'azione dei peptidi in sistemi *in vivo*. Mentre uno dei peptidi, T11F, non risulta avere alcuna tipica struttura secondaria conosciuta, il peptide N10K è in grado di formare strutture secondarie altamente organizzate in foglietti β già dopo 9 ore dalla solubilizzazione in acqua, come indicato da studi di cinetica di aggregazione. La laminarina, come le cellule di *C. albicans*, può svolgere un ruolo catalitico nel processo di formazione degli aggregati, importante anche nel mantenere gli aggregati stessi ad un livello ben organizzato ad elevate temperature. Nel complesso, lo studio ha rivelato che le molecole di N10K, dopo dimerizzazione attraverso la formazione di ponti disolfuro, si autoassemblano in strutture a foglietto β simili a idrogel fisici (398) e, dal momento che l'estensione e la stabilità degli aggregati sono concentrazione- e temperatura-dipendenti, i peptidi possono ritornare col tempo alla loro forma attiva all'aumentare della diluizione e/o della temperatura. Sulla base di questo modello, è plausibile ipotizzare che gli aggregati ordinati, formati sulla superficie di cellule di lievito in cui sono esposti i β -glucani, rappresentino un pool di peptidi che, grazie al loro stato autoaggregato, ci si aspetta siano protetti *in vivo* dalla degradazione da proteasi, mentre possono regolare il rilascio della forma attiva, estendendo così nel tempo l'attività antimicrobica del farmaco. L'autoaggregazione reversibile, quindi, può rappresentare un nuovo paradigma di peptidi terapeutici *autodelivering*, mentre l'affinità per i β -glucani assicurerebbe una selettività d'azione.

Discussione

Parallelamente, i risultati ottenuti in questo studio su CDR di un mAb di topo (MoA) e di uno umano (HuA), entrambi diretti nei confronti dell'antigene difucosilico del gruppo sanguigno A umano, che non condividono alcuna omologia di sequenza (381), hanno consentito di dimostrare che alcuni di essi possono esplicare una attività immunomodulante, senza essere candidacidi. Il peptide sintetico corrispondente a HuA V_LCDR3 è stato in grado di indurre una significativa stimolazione della produzione di IL-6, ma non di TNF- α , mentre MoA V_HCDR3 è stato in grado di stimolare un'umentata produzione di entrambe le citochine proinfiammatorie da parte dei macrofagi (392). In particolare, l'attivazione dei macrofagi mediata da MoA V_HCDR3 sembra implicare il reclutamento di PI3K (394) e indurre l'attivazione di Akt, mediante sua fosforilazione (pAkt). L'attivazione di Akt determina a sua volta la fosforilazione di I κ B α , come dimostrato anche dalla inibizione di tale processo da parte di wortmannina, un inibitore del pathway PI3K-Akt; tale fosforilazione determina traslocazione del fattore NF κ B nel nucleo e significativo aumento dell'espressione del gene per TNF- α . Il coinvolgimento di p38 MAPK e PI3K-Akt nella produzione di TNF- α è stato dimostrato dalla riduzione di tale produzione in presenza di inibitori specifici (SB203580 per p38 MAPK e wortmannina per PI3K). Tutto questo suggerirebbe che il pathway di trasduzione del segnale mediato da Akt determinerebbe l'espressione dei geni per citochine e TLR, quale TLR-4, come schematizzato in **Figura 55**.

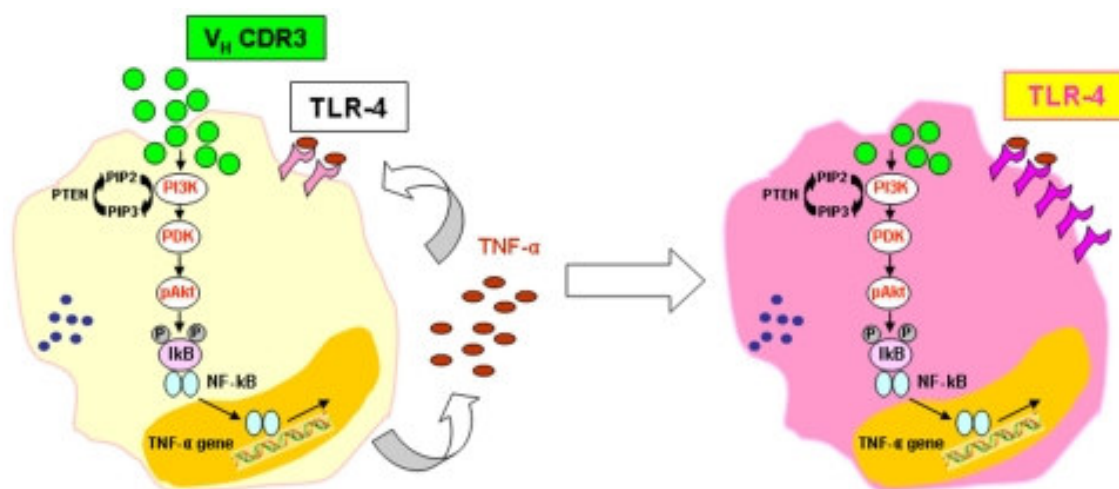


Figura 55. Meccanismo di *up*-regolazione di TLR-4 indotto in PM da parte di MoA V_HCDR3. L'interazione di V_HCDR3 con PM induce l'attivazione di Akt che a sua volta determina la fosforilazione di I κ B α , ottenendo la traslocazione di NF κ B nel nucleo. Questi eventi molecolari sono responsabili dell'attivazione cellulare e successiva trascrizione e traduzione di geni come quello per TNF- α . Questa citochina pro-infiammatoria aumenta l'espressione di TLR-4 da parte delle cellule della risposta immunitaria.

TNF- α viene considerato un regolatore positivo dell'espressione di TRL-4, che a sua volta determina la capacità delle cellule di rispondere a componenti microbici. Nei sistemi sperimentali utilizzati in questo studio è stata effettivamente osservata un'aumentata espressione di TRL-4 indotta da MoA V_HCDR3. Poiché la stimolazione di TRL-4 determina attivazione cellulare, questo effetto potrebbe rafforzare la capacità di MoA V_HCDR3 di indurre una risposta infiammatoria. Inoltre, dato che la aumentata espressione di TRL-4 è risultata completamente bloccata da anticorpi anti-TNF- α , essa si dimostra secondaria e dipendente dalla produzione di tale citochina.

La rilevazione in questo studio di un significativo aumento della sopravvivenza e di una drastica riduzione della crescita fungina nel rene, organo bersaglio di *C. albicans*, in topi sperimentalmente infettati e trattati con MoA V_HCDR3, è risultata relativamente inattesa data la mancanza di attività candidacida diretta del peptide *in vitro*. La rapida eliminazione (*clearance*) di *C. albicans* osservata *in vivo* è risultata particolarmente rilevante. Una possibile spiegazione potrebbe derivare dalla capacità di MoA V_HCDR3 di attivare cellule dell'immunità innata, rendendole più inclini al riconoscimento e all'uccisione delle cellule di *C. albicans*. L'aumentata espressione di TRL-4 sui macrofagi, in particolare, potrebbe facilitare il riconoscimento delle cellule del lievito con conseguente risposta immunitaria più rapida ed efficace, dimostrando come un semplice peptide di un mAb specifico per il difucosile dell'antigene di gruppo sanguigno A umano possa essere caratterizzato da un potente effetto immunoregulatorio intrinsecamente in grado di controllare il corso di un'infezione fungina (392).

Ulteriori studi saranno necessari per riuscire a capire tutti i meccanismi molecolari esistenti alla base della differenziale attività biologica e per comprendere il razionale evolutivo e fisiologico dell'attività di tali peptidi anticorpali nell'omeostasi immunitaria antimicrobica, antivirale e antitumorale.

Attualmente, si sta procedendo con l'analisi dei derivati amminoacidici del peptide N10K, ottenuti mediante singole o multiple sostituzioni amminoacidiche mirate. Sono in corso le valutazioni dell'attività microbica *in vivo* dei peptidi, nei confronti dei diversi microrganismi procariotici ed eucariotici saggiati *in vitro* in questo lavoro di dottorato, in un sistema di infezioni sperimentali in larve di *Galleria mellonella* (Falena) (399, 400), in collaborazione con la Dott.ssa Joanne Slater dell'Università di Manchester. Il sistema immunitario innato degli insetti e dei mammiferi, ma non quello adattativo assente nei primi (401), mostra un elevato grado di omologia strutturale e funzionale (402, 403), per cui l'analisi della risposta degli insetti ai patogeni può fornire indicazioni sulla risposta innata dei

Discussione

vertebrati alle infezioni e/o l'eventuale necessità dell'intervento di altri fattori dell'immunità adattativa, presenti solo nei mammiferi, per consentire una efficace attività dei peptidi (404, 405). Numerosi studi, infatti, mostrano la correlazione positiva esistente tra i due tipi di risposta (403, 406). L'utilizzo di un sistema alternativo per saggi *in vivo* per valutare la patogenicità microbica, e che possa offrire dati comparabili senza la necessità di utilizzare animali, comporta vantaggi in termini economici e puramente lavorativi, limitando i problemi burocratici, legali ed etici relativi all'utilizzo di animali da laboratorio. In particolar modo, le larve di *G. mellonella* sono state recentemente utilizzate per determinare la virulenza di ceppi di *C. albicans* e per differenziare tra specie di lieviti patogeni e non patogeni (399).

Successivamente, si prevede di condurre studi di Microscopia a Forza Atomica (AFM), Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) e Spettrometria di Massa (MS) su siero e plasma di individui sani o infetti, al fine di individuare la presenza in tali campioni biologici in prima analisi dei peptidi N10K o T11F e poi di peptidi appartenenti alla porzione costante degli Ab, eventualmente presenti in quantità rilevabile in circolo. Le tecniche MS, in particolare, verranno privilegiate in quanto sono diventate sempre più metodi di scelta per l'analisi di campioni di proteine o peptidi, grazie all'elevata sensibilità ed attendibilità dei risultati. I metodi MS/MS consentono non solo l'identificazione peptidica, ma anche il sequenziamento e la rilevazione e localizzazione di possibili modificazioni post-traduzionali.

Queste ulteriori acquisizioni potrebbero aprire nuovi scenari sulla possibilità che peptidi anticorpali possano essere prodotti anche fisiologicamente, potendo così influenzare la naturale risposta immunitaria antimicrobica. I peptidi anticorpali caratterizzati da attività microbica potrebbero rappresentare un collegamento tra l'immunità innata e adattativa e svolgere un ruolo significativo nei confronti delle infezioni microbiche.

Conclusioni

A dispetto del notevole progresso tecnologico e della continua evoluzione delle conoscenze in ambito medico, alcune malattie da infezione presentano ancora elevati tassi di morbilità e mortalità. Un significativo incremento delle infezioni opportunistiche, in particolare di origine fungina, ha accompagnato negli ultimi decenni l'aumento del numero di individui immunocompromessi per patologie congenite o acquisite o in seguito a terapie. Il massiccio e talvolta inappropriato uso di farmaci ha contribuito all'aggravamento della situazione, favorendo la diffusione di ceppi resistenti ai farmaci antimicrobici. Ancora oggi, pertanto, le malattie da infezione costituiscono un problema sanitario di portata mondiale e per il loro controllo sono necessarie strategie alternative basate su presupposti razionali concettualmente innovativi.

Negli ultimi anni gli Ab, in diversi formati, sono emersi sempre più come strumenti terapeutici in diverse malattie umane, quali quelle autoimmuni ed il cancro. Tra l'altro, la loro coniugazione con farmaci convenzionali, radioisotopi o altri composti citotossici, ha potenziato l'attività terapeutica, riducendo gli effetti collaterali sistemici. Al contrario, un più limitato armamentario di Ab e derivati anticorpali terapeutici è attualmente disponibile nel campo delle malattie infettive. Tuttavia, i progressi compiuti nell'identificazione di opportuni bersagli nei patogeni, una migliore comprensione delle interazioni ospite-parassita e la recente introduzione di mAb in terapia, hanno rivitalizzato l'approccio storico per il trattamento o la prevenzione di infezioni con Ab (407).

La descrizione di Ab microbicidi, in grado di uccidere un ampio spettro di microrganismi patogeni mediante specifica interazione con recettori della parete cellulare (quali β -1,3-D-glucani o molecole glucano-simili) assenti in cellule di mammifero, ha consentito di ipotizzare la disponibilità di nuovi strumenti terapeutici concettualmente innovativi nei confronti di varie infezioni microbiche, anche in pazienti immunocompromessi (241). La rilevanza dei β -1,3-D-glucani come rilevante bersaglio dell'attività antimicrobica, almeno nei funghi, è attestata dal successo delle echinocandine, una classe relativamente recente di agenti fungicidi che agiscono con una inibizione non competitiva della sintesi di β -1,3-D-glucano (408), e dalle aspettative suscitate da un vaccino coniugato antifungino "universale" costituito da β -glucani (243).

In questo contesto peptidi derivati da Ab, quali KP ed i peptidi CDR e Fc descritti in questo studio, con le loro attività multifunzionali possono rappresentare una intrigante nuova

Conclusioni

potenzialità, proponendo gli Ab come possibile fonte di un numero illimitato di peptidi antitumorali e antinfettivi.

Piccoli peptidi, in quanto molecole altamente flessibili, possono essere adeguatamente progettati e ottimizzati chimicamente per essere proposti quali potenziali nuovi agenti antimicrobici. Oltre alla loro difficile purificazione da fonti naturali, infatti, essi possono essere ottenuti per sintesi chimica o con tecnologie ricombinanti, come in batteri e lieviti trasformati o animali e piante transgenici, in quantità sufficiente e con adeguate e sicure modalità di produzione (“good manufacturing practice”), essenziali per l'approvazione del loro utilizzo in studi clinici da parte delle competenti autorità sanitarie. La sintesi chimica, inoltre, può consentire la produzione di varianti (dimeri, D-enantiomeri o peptidi contenenti amminoacidi non naturali) resistenti all'azione delle proteasi, in grado di superare il problema della loro breve emivita, contenenti nuovi gruppi funzionali (carichi, polari o idrofobici), coniugate con farmaci tradizionali, radioisotopi, composti citotossici o marcatori, o incorporate in liposomi per il miglioramento della stabilità e la diminuzione della tossicità. L'ottimizzazione chimica può influenzare positivamente bioattività, stabilità alla proteolisi, farmacocinetica e/o farmacodinamica, potenziando così l'attività terapeutica di queste molecole (409).

Oltre ai numerosi peptidi AMP attualmente noti, che svolgono un ruolo importante nei confronti delle infezioni attraverso la loro attività diretta nei confronti dei patogeni e la loro capacità di modulare la risposta immunitaria, numerosi altri frammenti peptidici anionici e cationici di proteine più grandi sono stati dimostrati agire in modo simile. Tra questi, la lattoferrina, AMP cationico antimicrobico, antivirale, antitumorale ed immunomodulante, prodotta dall'idrolisi della lattoferrina nei mammiferi (410), derivati peptidici della proteina battericida/aumentante la permeabilità (BPI) dei neutrofili bovini con proprietà antimicrobiche e neutralizzanti LPS (411), e le emocidine, frammenti antimicrobici naturali derivati dall'emoglobina presenti anche nell'uomo (412). I frammenti anticorpali sarebbero quindi analogamente prodotti da proteine più grandi e caratterizzati da attività biologiche in gran parte simili a quelli di altri AMP naturali o derivati.

I peptidi possono presentare diversi vantaggi rispetto ad altre molecole per l'utilizzazione in terapia. Nei confronti di molecole di maggiori dimensioni, quali gli Ab, i vantaggi risiedono nella mancanza di immunogenicità, nella più facile penetrazione all'interno dei tessuti e nella possibile produzione per sintesi chimica a costi accessibili, mentre rispetto a molecole di piccole dimensioni i peptidi mostrano una maggiore specificità e affinità per i bersagli cellulari. Un importante problema legato all'uso terapeutico dei peptidi è la loro potenziale

sensibilità all'attacco di enzimi proteolitici con sfavorevoli effetti sull'attività e sulla farmacocinetica, che potrebbe essere risolta dalla introduzione di modificazioni chimiche e l'uso di mimetici sintetici, quali peptoidi ed oligomeri di piccole dimensioni.

Diversi peptidi antibiotici, quali gramicidine e polimixine, sono già stati sviluppati e sono attualmente disponibili o in fase di sperimentazione clinica, anche se finora limitatamente ad applicazioni topiche, a causa della loro tossicità quando introdotti in circolo (413, 414). Anche molecole a bassa tossicità e ad ampio spettro, come i lantibiotici, cioè peptidi antibiotici contenenti lantionine, sono difficili da ottenere in quantità sufficiente e a basso costo e si degradano rapidamente nel sangue (415). Così, i principali inconvenienti per l'uso terapeutico della maggior parte degli AMP sono rappresentati dalla loro instabilità in condizioni fisiologiche e dalle scarse caratteristiche farmacocinetiche, oltre che dalla tossicità. In questa prospettiva, peptidi derivati da Ab, quali KP, CDR e peptidi Fc, possono rappresentare un'eccezione. Essi, infatti, non sembrano mostrare alcuna tossicità o attività emolitica rilevabile in colture di linee cellulari, in modelli animali o su emazie, sebbene l'eventuale tossicità associata a somministrazione sistemica debba essere ulteriormente valutata. Inoltre, come dimostrato dai dati ottenuti in questo ed in precedenti studi, peptidi di derivazione anticorpale sembrano apparentemente privi di immunogenicità, dimostrando inoltre *in vivo* una sufficiente stabilità e buone caratteristiche farmacocinetiche per il raggiungimento di concentrazioni terapeutiche in differenti modelli animali di infezioni sperimentali sistemiche e/o delle mucose e di tumori (361).

Ovviamente ci sono ancora ulteriori rilevanti aspetti che attendono di essere chiariti, tra i quali il meccanismo molecolare d'azione ed aspetti legati al loro uso potenziale come agenti terapeutici, quali impatto sul microbiota endogeno, eventuale selezione di mutanti resistenti, farmacocinetica e profili di sicurezza. E' possibile che la proteolisi fisiologica delle Ig, al di là della loro emivita, determini il rilascio di frammenti anticorpali con attività antimicrobica e/o immunomodulante? Tale ipotesi sembra essere molto stimolante e potrebbe in parte spiegare l'apparente ridondanza nella produzione degli Ab. Un rilascio proteolitico di frammenti attivi dalle Ig al di là della loro emivita è un'ipotesi possibile, che ricorderebbe l'attività estrinseca di altri peptidi derivati da proteine, precedentemente ricordati. Nel corso dell'evoluzione, ancora una volta la natura avrebbe selezionato proteine con funzioni specializzate, come gli Ab, integrando peptidi che potrebbero conservare altre ancestrali attività biologiche, quali attività antimicrobica, antivirale, antitumorale ed immunomodulante, che si esplicherebbero solo dopo il loro rilascio dalla proteina integra. Si spera che gli studi attualmente in corso possano rispondere a tali quesiti.

Conclusioni

Quasi dieci anni dopo l'introduzione degli Ab in terapia umana, stanno sorgendo gravi preoccupazioni sui loro effetti collaterali, quali reazioni avverse, patologie sistemiche ed infezioni che si verificano dopo somministrazione parenterale, che non erano stati rilevati nel corso degli studi preclinici e clinici precedenti la commercializzazione (**Tabella 9**) (416, 417).

I rischi connessi all'uso terapeutico degli Ab sembrano essere significativamente più elevati rispetto a quelli di altri prodotti biologici, come gli ormoni (rapporto di rischio: 12,1 *versus* 1,0), con un rapporto di incidenza su 1000 mesi di 7,9. E' stato pertanto raccomandato un efficace monitoraggio di questi prodotti biologici anche dopo la commercializzazione (416). Peptidi, quali quelli di derivazione anticorpale, potrebbero non presentare tali problematiche.

All'inizio del 21esimo secolo, l'emergenza e la ri-emergenza di nuovi e vecchi agenti eziologici, la crescente incidenza di microrganismi e virus multiresistenti, così come la presenza di gruppi crescenti di individui immunocompromessi o comunque debilitati rappresentano una drammatica sfida per l'assistenza sanitaria nel trattamento di malattie infettive, con un impatto socio-economico rilevante (418, 419). La scarsità di nuovi agenti antifettivi attualmente in fase di sviluppo ha suscitato serie preoccupazioni nella comunità scientifica, rendendo assolutamente necessario raddoppiare gli sforzi e le risorse per la sperimentazione e l'introduzione in clinica di nuove molecole terapeutiche efficaci. Un problema ulteriore è rappresentato dalla crescente incidenza in tutto il mondo del cancro, per il quale tossicità dei farmaci, insufficiente accesso al tumore, scarsità di farmaci e trattamenti disponibili sono ancora più drammatici. In questo scenario, i peptidi di derivazione anticorpale possono rappresentare una nuova classe di composti terapeutici antitumorali, antimicrobici, antivirali da utilizzare da soli o in associazione con composti esistenti. Tali peptidi sono in grado di fornire strutture di base per la progettazione razionale di nuovi agenti terapeutici, a basso costo, specifici ed applicabili a diverse malattie.

La recente approvazione (marzo 2003) da parte di FDA del primo farmaco peptidico anti-HIV (T-20, Fuzeon o enfuvirtide), ha aperto nuove prospettive per i peptidi terapeutici e rinnovato l'interesse per questo campo di ricerca. Enfuvirtide è un peptide sintetico antiretrovirale di 36 amminoacidi, razionalmente progettato per mimare componenti del sistema di fusione di HIV-1, ed in grado di bloccare l'ingresso del virus nelle cellule ospiti, interferendo con la fusione virus-cellula, legandosi alla proteina virale gp41. La somministrazione di Enfuvirtide, primo di una nuova classe di molecole conosciute come inibitori della fusione, in terapia di combinazione ha dimostrato una favorevole risposta al trattamento, anche se effetti collaterali avversi vengono sempre più spesso riportati (**Tabella 9**) (420-423).

Tabella 9. Anticorpi monoclonali e peptidi anticancro e antinfettivi approvati per usi terapeutici da FDA.

Sostanza attiva	Nome farmaco	Descrizione	C. t.*	D. a. §	Note ^a
mAb					
Alemtuzumab	Campath	Umanizzato, CDR- <i>grafted</i> IgG1 anti-CD52	Ac	05/07/01	Decessi correlati alle infezioni
Bevacizumab	Avastin	Umanizzato, CDR- <i>grafted</i> IgG1κ anti-VEGF	Ac	02/26/04	Eventi tromboembolici; fistola tracheoesofagea
Cetuximab	Erbix	Chimerico, IgG1κ anti-EGFR	Ac	02/12/04	Reazioni da infusione; arresto cardiorespiratorio
Gemtuzumab ozogamicin	Mylotarg	Umanizzato, CDR- <i>grafted</i> IgG4κ anti-CD33; immunotossina calicheamicina-coniugata	Ac	05/17/00	Ipersensibilità e reazioni da infusione, tossicità polmonare ed epatica
Ibritumomab tiuxetan	Zevalin	Murino, IgG1κ anti-CD20, ⁹⁰ Y-marcato	Ac	02/19/02	Gravi reazioni cutanee e mucocutanee
Panitumumab	Vectibix	Umano, IgG2κ transgenico anti-EGFRr	Ac	9/27/06	Alta incidenza di decessi e tossicità quando addizionato alla chemioterapia standard, reazioni di ipersensibilità ^b
Rituximab	Rituxan	Chimerico, IgG1κ anti-CD20	Ac	11/26/97	Reazioni da infusione con esito fatale, Gravi reazioni mucocutanee, leucoencefalopatia multifocale
Tositumomab- ¹³¹ I	Bexxar	Murino, IgG2ακ anti-CD20, ¹³¹ I-marcato	Ac	06/27/03	Mielosoppressione, ipotiroidismo
Trastuzumab	Herceptin	Umanizzato, CDR- <i>grafted</i> anti-HER2	Ac	09/25/98	Ipersensibilità e reazioni da infusione, tossicità polmonare ed epatica
Palivizumab	Synagis	Umanizzato, IgG1κ anti-RSV	Ai	06/19/98	Anafilassi
Peptidi					
Enfivirtide	Fuzeon	peptide 36-mer anti-HIV-1	Ai	03/13/03	Reazioni al sito d'iniezione, effetti negativi gastrointestinali, muscolo-scheletrici e respiratori, neuropatia periferica, infezioni ^c

*C. t., categoria terapeutica; §D. a., Data di approvazione; Ac, Anti-cancro; Ai, Antinfettivo; CD, *cluster* di differenziazione; CDR, regioni determinanti la complementarità; EGFR, recettore fattore di crescita epidermico; HER, recettore fattore di crescita epidermico umano; RSV, virus respiratorio sinciziale; VEGF, fattore di crescita endoteliale vascolare.

^a riferimento (416), ^b riferimento (417); ^c riferimento (422, 423).

Conclusioni

Le limitazioni intrinseche dei peptidi, come lunghi tempi di produzione, purezza, mancanza di biodisponibilità orale ed effetti collaterali, enfatizzano la necessità di procedere con cautela quando si valutino tali molecole per lo sviluppo di farmaci. Tuttavia, nonostante le sfide formidabili attuali e future, è ragionevole attendersi che nuovi approcci terapeutici basati su peptidi, compresi quelli di derivazione anticorpale, eventualmente caratterizzati da proprietà autoaggreganti, possano essere disponibili nel prossimo futuro, anche in una possibile era post-antibiotica, per applicazioni cliniche o in associazione con terapie più convenzionali, sfruttando la loro selettività di bersaglio ed anche la loro capacità di agire da effettori della risposta immunitaria innata e da modulatori della risposta immunitaria cellulo-mediata (424-426).

Alle strategie in corso volte allo sviluppo di nuovi potenziali agenti antinfettivi ed antitumorali, quali approcci genomici e postgenomici (427), *repurposing*, ossia nuove applicazioni di farmaci già esistenti (428), *mining*, ossia ricerca di nuove molecole o *scaffolds* in nicchie ecologiche o genomi microbici inesplorati (20, 24) o in banche dati (429, 430), vanno aggiunte quelle basate su *mining* di proteine, e di Ab in particolare (361, 431).

Bibliografia

1. Culotta, E. 1994. Funding crunch hobbles antibiotic resistance research. *Science* 264:362.
2. Bax, R. P. 1997. Antibiotic resistance: a view from the pharmaceutical industry. *Clin Infect Dis* 24 Suppl 1:S151.
3. Cohen, M. L. 2000. Changing patterns of infectious disease. *Nature* 406:762.
4. Wolfe, N. D., C. P. Dunavan, and J. Diamond. 2007. Origins of major human infectious diseases. *Nature* 447:279.
5. Jones, K. E., N. G. Patel, M. A. Levy, A. Storeygard, D. Balk, J. L. Gittleman, and P. Daszak. 2008. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451:990.
6. Zanetti, A. R., and A. Zappa. Emerging and re-emerging infections at the turn of the millennium. *Haemophilia* 16 Suppl 1:7.
7. Pohanka, M., and K. Kuca. Biological warfare agents. *Exs* 100:559.
8. Woolhouse, M., and E. Gaunt. 2007. Ecological origins of novel human pathogens. *Crit Rev Microbiol* 33:231.
9. Fauci, A. S. 2001. Infectious diseases: considerations for the 21st century. *Clin Infect Dis* 32:675.
10. Spellberg, B., R. Guidos, D. Gilbert, J. Bradley, H. W. Boucher, W. M. Scheld, J. G. Bartlett, and J. Edwards, Jr. 2008. The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 46:155.
11. Boucher, H. W., G. H. Talbot, J. S. Bradley, J. E. Edwards, D. Gilbert, L. B. Rice, M. Scheld, B. Spellberg, and J. Bartlett. 2009. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 48:1.
12. Rice, L. B. 2009. The clinical consequences of antimicrobial resistance. *Curr Opin Microbiol* 12:476.
13. Kumar, D. Emerging viruses in transplantation. *Curr Opin Infect Dis* 23:374.
14. Pfaller, M. A., and D. J. Diekema. Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit Rev Microbiol* 36:1.
15. Broder, S. The development of antiretroviral therapy and its impact on the HIV-1/AIDS pandemic. *Antiviral Res* 85:1.
16. Nathan, C. 2004. Antibiotics at the crossroads. *Nature* 431:899.
17. Czerepak EA, and Ryser S. 2008. Drug approvals and failures: implications for alliances. *Nature Rev. Drug Discov.* 7:197.
18. Projan, S. J. 2003. Why is big Pharma getting out of antibacterial drug discovery? *Curr Opin Microbiol* 6:427.
19. Service, R. F. 2004. Surviving the blockbuster syndrome. *Science* 303:1796.
20. Loferer, H. 2000. Mining bacterial genomes for antimicrobial targets. *Mol Med Today* 6:470.
21. Fischbach, M. A., and C. T. Walsh. 2009. Antibiotics for emerging pathogens. *Science* 325:1089.
22. Rahman, H., B. Austin, W. J. Mitchell, P. C. Morris, D. J. Jamieson, D. R. Adams, A. M. Spragg, and M. Schweizer. Novel anti-infective compounds from marine bacteria. *Mar Drugs* 8:498.
23. Payne, D. J., M. N. Gwynn, D. J. Holmes, and D. L. Pompliano. 2007. Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nat Rev Drug Discov* 6:29.
24. Gross, H. 2009. Genomic mining--a concept for the discovery of new bioactive natural products. *Curr Opin Drug Discov Devel* 12:207.

Bibliografia

25. Hammami, R., and I. Fliss. Current trends in antimicrobial agent research: chemo- and bioinformatics approaches. *Drug Discov Today* 15:540.
26. Fleming A. 1922. On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proc. R. Soc. Lond. (Biol.)* 93:306.
27. Skarnes, R. C., and D. W. Watson. 1957. Antimicrobial factors of normal tissues and fluids. *Bacteriol Rev* 21:273.
28. Zeya, H. I., and J. K. Spitznagel. 1963. Antibacterial and Enzymic Basic Proteins from Leukocyte Lysosomes: Separation and Identification. *Science* 142:1085.
29. Hultmark, D., H. Steiner, T. Rasmuson, and H. G. Boman. 1980. Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur J Biochem* 106:7.
30. Selsted, M. E., D. M. Brown, R. J. DeLange, and R. I. Lehrer. 1983. Primary structures of MCP-1 and MCP-2, natural peptide antibiotics of rabbit lung macrophages. *J Biol Chem* 258:14485.
31. Boman, H. G. 2000. Innate immunity and the normal microflora. *Immunol Rev* 173:5.
32. Hancock, R. E., and R. Lehrer. 1998. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol* 16:82.
33. Zasloff, M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415:389.
34. Bulet, P., R. Stocklin, and L. Menin. 2004. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev* 198:169.
35. Lai, Y., and R. L. Gallo. 2009. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol* 30:131.
36. Steiner, H., D. Hultmark, A. Engstrom, H. Bennich, and H. G. Boman. 1981. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* 292:246.
37. Steiner, H. 1982. Secondary structure of the cecropins: antibacterial peptides from the moth *Hyalophora cecropia*. *FEBS Lett* 137:283.
38. Holak, T. A., A. Engstrom, P. J. Kraulis, G. Lindeberg, H. Bennich, T. A. Jones, A. M. Gronenborn, and G. M. Clore. 1988. The solution conformation of the antibacterial peptide cecropin A: a nuclear magnetic resonance and dynamical simulated annealing study. *Biochemistry* 27:7620.
39. Samakovlis, C., P. Kylsten, D. A. Kimbrell, A. Engstrom, and D. Hultmark. 1991. The andropin gene and its product, a male-specific antibacterial peptide in *Drosophila melanogaster*. *Embo J* 10:163.
40. Marchini, D., P. C. Giordano, R. Amons, L. F. Bernini, and R. Dallai. 1993. Purification and primary structure of ceratotoxin A and B, two antibacterial peptides from the female reproductive accessory glands of the medfly *Ceratitis capitata* (Insecta:Diptera). *Insect Biochem Mol Biol* 23:591.
41. Mignogna, G., M. Simmaco, G. Kreil, and D. Barra. 1993. Antibacterial and haemolytic peptides containing D-alloisoleucine from the skin of *Bombina variegata*. *Embo J* 12:4829.
42. Zasloff, M. 1987. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:5449.
43. Gennaro, R., and M. Zanetti. 2000. Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides. *Biopolymers* 55:31.
44. Huttner, K. M., and C. L. Bevins. 1999. Antimicrobial peptides as mediators of epithelial host defense. *Pediatr Res* 45:785.
45. Casteels, P., C. Ampe, F. Jacobs, M. Vaeck, and P. Tempst. 1989. Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *Embo J* 8:2387.

46. Bulet, P., J. L. Dimarcq, C. Hetru, M. Lagueux, M. Charlet, G. Hegy, A. Van Dorsselaer, and J. A. Hoffmann. 1993. A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila* carries an O-glycosylated substitution. *J Biol Chem* 268:14893.
47. Agerberth, B., J. Y. Lee, T. Bergman, M. Carlquist, H. G. Boman, V. Mutt, and H. Jornvall. 1991. Amino acid sequence of PR-39. Isolation from pig intestine of a new member of the family of proline-arginine-rich antibacterial peptides. *Eur J Biochem* 202:849.
48. Frank, R. W., R. Gennaro, K. Schneider, M. Przybylski, and D. Romeo. 1990. Amino acid sequences of two proline-rich bactericins. Antimicrobial peptides of bovine neutrophils. *J Biol Chem* 265:18871.
49. Skerlavaj, B., D. Romeo, and R. Gennaro. 1990. Rapid membrane permeabilization and inhibition of vital functions of gram-negative bacteria by bactericins. *Infect Immun* 58:3724.
50. Lorenzini, D. M., P. I. da Silva, Jr., A. C. Fogaca, P. Bulet, and S. Daffre. 2003. Acanthoscurrin: a novel glycine-rich antimicrobial peptide constitutively expressed in the hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. *Dev Comp Immunol* 27:781.
51. Kavanagh, K., and S. Dowd. 2004. Histatins: antimicrobial peptides with therapeutic potential. *J Pharm Pharmacol* 56:285.
52. Zanetti, M., L. Litteri, R. Gennaro, H. Horstmann, and D. Romeo. 1990. Bactericins, defense polypeptides of bovine neutrophils, are generated from precursor molecules stored in the large granules. *J Cell Biol* 111:1363.
53. Zerial, A., B. Skerlavaj, R. Gennaro, and D. Romeo. 1987. Inactivation of herpes simplex virus by protein components of bovine neutrophil granules. *Antiviral Res* 7:341.
54. Selsted, M. E., M. J. Novotny, W. L. Morris, Y. Q. Tang, W. Smith, and J. S. Cullor. 1992. Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils. *J Biol Chem* 267:4292.
55. Lambert, J., E. Keppi, J. L. Dimarcq, C. Wicker, J. M. Reichhart, B. Dunbar, P. Lepage, A. Van Dorsselaer, J. Hoffmann, J. Fothergill, and et al. 1989. Insect immunity: isolation from immune blood of the dipteran *Phormia terranovae* of two insect antibacterial peptides with sequence homology to rabbit lung macrophage bactericidal peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:262.
56. Lehrer, R. I., A. K. Lichtenstein, and T. Ganz. 1993. Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu Rev Immunol* 11:105.
57. Nakamura, T., H. Furunaka, T. Miyata, F. Tokunaga, T. Muta, S. Iwanaga, M. Niwa, T. Takao, and Y. Shimonishi. 1988. Tachyplesin, a class of antimicrobial peptide from the hemocytes of the horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*). Isolation and chemical structure. *J Biol Chem* 263:16709.
58. Kokryakov, V. N., S. S. Harwig, E. A. Panyutich, A. A. Shevchenko, G. M. Aleshina, O. V. Shamova, H. A. Korneva, and R. I. Lehrer. 1993. Protegrins: leukocyte antimicrobial peptides that combine features of corticostatic defensins and tachyplesins. *FEBS Lett* 327:231.
59. Romeo, D., B. Skerlavaj, M. Bolognesi, and R. Gennaro. 1988. Structure and bactericidal activity of an antibiotic dodecapeptide purified from bovine neutrophils. *J Biol Chem* 263:9573.
60. Park, C. H., E. V. Valore, A. J. Waring, and T. Ganz. 2001. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 276:7806.
61. Fehlbauer, P., P. Bulet, S. Chernysh, J. P. Briand, J. P. Roussel, L. Letellier, C. Hetru, and J. A. Hoffmann. 1996. Structure-activity analysis of thanatin, a 21-residue inducible insect defense peptide with sequence homology to frog skin antimicrobial peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:1221.

Bibliografia

62. Silva, P. I., Jr., S. Daffre, and P. Bulet. 2000. Isolation and characterization of gomesin, an 18-residue cysteine-rich defense peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* hemocytes with sequence similarities to horseshoe crab antimicrobial peptides of the tachyplesin family. *J Biol Chem* 275:33464.
63. Clark, D. P., S. Durell, W. L. Maloy, and M. Zasloff. 1994. Ranalexin. A novel antimicrobial peptide from bullfrog (*Rana catesbeiana*) skin, structurally related to the bacterial antibiotic, polymyxin. *J Biol Chem* 269:10849.
64. Agerberth, B., A. Boman, M. Andersson, H. Jornvall, V. Mutt, and H. G. Boman. 1993. Isolation of three antibacterial peptides from pig intestine: gastric inhibitory polypeptide (7-42), diazepam-binding inhibitor (32-86) and a novel factor, peptide 3910. *Eur J Biochem* 216:623.
65. Barcellini, W., G. Colombo, L. La Maestra, G. Clerici, L. Garofalo, A. T. Brini, J. M. Lipton, and A. Catania. 2000. Alpha-melanocyte-stimulating hormone peptides inhibit HIV-1 expression in chronically infected promonocytic U1 cells and in acutely infected monocytes. *J Leukoc Biol* 68:693.
66. Cutuli, M., S. Cristiani, J. M. Lipton, and A. Catania. 2000. Antimicrobial effects of alpha-MSH peptides. *J Leukoc Biol* 67:233.
67. Kim, H. S., H. Yoon, I. Minn, C. B. Park, W. T. Lee, M. Zasloff, and S. C. Kim. 2000. Pepsin-mediated processing of the cytoplasmic histone H2A to strong antimicrobial peptide buforin I. *J Immunol* 165:3268.
68. Ulvatne, H., and L. H. Vorland. 2001. Bactericidal kinetics of 3 lactoferricins against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Scand J Infect Dis* 33:507.
69. Pellegrini, A., U. Thomas, N. Bramaz, P. Hunziker, and R. von Fellenberg. 1999. Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine alpha-lactalbumin molecule. *Biochim Biophys Acta* 1426:439.
70. Liepke, C., S. Baxmann, C. Heine, N. Breithaupt, L. Standker, and W. G. Forssmann. 2003. Human hemoglobin-derived peptides exhibit antimicrobial activity: a class of host defense peptides. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 791:345.
71. Sforca, M. L., A. Machado, R. C. Figueredo, S. Oyama, Jr., F. D. Silva, A. Miranda, S. Daffre, M. T. Miranda, A. Spisni, and T. A. Pertinhez. 2005. The micelle-bound structure of an antimicrobial peptide derived from the alpha-chain of bovine hemoglobin isolated from the tick *Boophilus microplus*. *Biochemistry* 44:6440.
72. Brogden, K. A., M. Ackermann, and K. M. Huttner. 1998. Detection of anionic antimicrobial peptides in ovine bronchoalveolar lavage fluid and respiratory epithelium. *Infect Immun* 66:5948.
73. Brogden, K. A., M. R. Ackermann, P. B. McCray, Jr., and K. M. Huttner. 1999. Differences in the concentrations of small, anionic, antimicrobial peptides in bronchoalveolar lavage fluid and in respiratory epithelia of patients with and without cystic fibrosis. *Infect Immun* 67:4256.
74. Schitteck, B., R. Hipfel, B. Sauer, J. Bauer, H. Kalbacher, S. Stevanovic, M. Schirle, K. Schroeder, N. Blin, F. Meier, G. Rassner, and C. Garbe. 2001. Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nat Immunol* 2:1133.
75. Ganz, T. 1999. Defensins and host defense. *Science* 286:420.
76. Yang, D., A. Biragyn, L. W. Kwak, and J. J. Oppenheim. 2002. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol* 23:291.
77. Zaiou, M. 2007. Multifunctional antimicrobial peptides: therapeutic targets in several human diseases. *J Mol Med* 85:317.
78. Zanetti, M., R. Gennaro, and D. Romeo. 1995. Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett* 374:1.

79. Cowland, J. B., A. H. Johnsen, and N. Borregaard. 1995. hCAP-18, a cathelin/pro-bactenecin-like protein of human neutrophil specific granules. *FEBS Lett* 368:173.
80. Storici, P., A. Tossi, B. Lenarcic, and D. Romeo. 1996. Purification and structural characterization of bovine cathelicidins, precursors of antimicrobial peptides. *Eur J Biochem* 238:769.
81. Zaiou, M., V. Nizet, and R. L. Gallo. 2003. Antimicrobial and protease inhibitory functions of the human cathelicidin (hCAP18/LL-37) prosequence. *J Invest Dermatol* 120:810.
82. Agerberth, B., H. Gunne, J. Odeberg, P. Kogner, H. G. Boman, and G. H. Gudmundsson. 1995. FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:195.
83. Frohm, M., B. Agerberth, G. Ahangari, M. Stahle-Backdahl, S. Liden, H. Wigzell, and G. H. Gudmundsson. 1997. The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *J Biol Chem* 272:15258.
84. Sorensen, O. E., P. Follin, A. H. Johnsen, J. Calafat, G. S. Tjabringa, P. S. Hiemstra, and N. Borregaard. 2001. Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood* 97:3951.
85. Murakami, M., B. Lopez-Garcia, M. Braff, R. A. Dorschner, and R. L. Gallo. 2004. Postsecretory processing generates multiple cathelicidins for enhanced topical antimicrobial defense. *J Immunol* 172:3070.
86. Di Nardo, A., A. Vitiello, and R. L. Gallo. 2003. Cutting edge: mast cell antimicrobial activity is mediated by expression of cathelicidin antimicrobial peptide. *J Immunol* 170:2274.
87. Zasloff, M. 2006. Defending the epithelium. *Nat Med* 12:607.
88. Bals, R., X. Wang, M. Zasloff, and J. M. Wilson. 1998. The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:9541.
89. Raj, P. A., and A. R. Dentino. 2002. Current status of defensins and their role in innate and adaptive immunity. *FEMS Microbiol Lett* 206:9.
90. Linzmeier, R., C. H. Ho, B. V. Hoang, and T. Ganz. 1999. A 450-kb contig of defensin genes on human chromosome 8p23. *Gene* 233:205.
91. White, S. H., W. C. Wimley, and M. E. Selsted. 1995. Structure, function, and membrane integration of defensins. *Curr Opin Struct Biol* 5:521.
92. Ouellette, A. J. 2004. Defensin-mediated innate immunity in the small intestine. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 18:405.
93. Quayle, A. J., E. M. Porter, A. A. Nussbaum, Y. M. Wang, C. Brabec, K. P. Yip, and S. C. Mok. 1998. Gene expression, immunolocalization, and secretion of human defensin-5 in human female reproductive tract. *Am J Pathol* 152:1247.
94. Ganz, T. 2003. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 3:710.
95. Schutte, B. C., J. P. Mitros, J. A. Bartlett, J. D. Walters, H. P. Jia, M. J. Welsh, T. L. Casavant, and P. B. McCray, Jr. 2002. Discovery of five conserved beta -defensin gene clusters using a computational search strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:2129.
96. McCray, P. B., Jr., and L. Bentley. 1997. Human airway epithelia express a beta-defensin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 16:343.
97. Valore, E. V., C. H. Park, A. J. Quayle, K. R. Wiles, P. B. McCray, Jr., and T. Ganz. 1998. Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J Clin Invest* 101:1633.

Bibliografia

98. Harder, J., J. Bartels, E. Christophers, and J. M. Schroder. 2001. Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* 276:5707.
99. Ghosh, S. K., T. A. Gerken, K. M. Schneider, Z. Feng, T. S. McCormick, and A. Weinberg. 2007. Quantification of human beta-defensin-2 and -3 in body fluids: application for studies of innate immunity. *Clin Chem* 53:757.
100. Garcia, J. R., A. Krause, S. Schulz, F. J. Rodriguez-Jimenez, E. Kluver, K. Adermann, U. Forssmann, A. Frimpong-Boateng, R. Bals, and W. G. Forssmann. 2001. Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *Faseb J* 15:1819.
101. Yamaguchi, Y., T. Nagase, R. Makita, S. Fukuhara, T. Tomita, T. Tominaga, H. Kurihara, and Y. Ouchi. 2002. Identification of multiple novel epididymis-specific beta-defensin isoforms in humans and mice. *J Immunol* 169:2516.
102. Tran, D., P. A. Tran, Y. Q. Tang, J. Yuan, T. Cole, and M. E. Selsted. 2002. Homodimeric theta-defensins from rhesus macaque leukocytes: isolation, synthesis, antimicrobial activities, and bacterial binding properties of the cyclic peptides. *J Biol Chem* 277:3079.
103. Menard, S., V. Forster, M. Lotz, D. Gutle, C. U. Duerr, R. L. Gallo, B. Henriques-Normark, K. Putsep, M. Andersson, E. O. Glocker, and M. W. Hornef. 2008. Developmental switch of intestinal antimicrobial peptide expression. *J Exp Med* 205:183.
104. Li, P., H. C. Chan, B. He, S. C. So, Y. W. Chung, Q. Shang, Y. D. Zhang, and Y. L. Zhang. 2001. An antimicrobial peptide gene found in the male reproductive system of rats. *Science* 291:1783.
105. Zhou, C. X., Y. L. Zhang, L. Xiao, M. Zheng, K. M. Leung, M. Y. Chan, P. S. Lo, L. L. Tsang, H. Y. Wong, L. S. Ho, Y. W. Chung, and H. C. Chan. 2004. An epididymis-specific beta-defensin is important for the initiation of sperm maturation. *Nat Cell Biol* 6:458.
106. Selsted, M. E., and A. J. Ouellette. 2005. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat Immunol* 6:551.
107. Harder, J., U. Meyer-Hoffert, L. M. Teran, L. Schwichtenberg, J. Bartels, S. Maune, and J. M. Schroder. 2000. Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa*, TNF-alpha, and IL-1beta, but not IL-6, induce human beta-defensin-2 in respiratory epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22:714.
108. Mendez-Samperio, P., L. Alba, and A. Trejo. 2007. Mycobacterium bovis-mediated induction of human beta-defensin-2 in epithelial cells is controlled by intracellular calcium and p38MAPK. *J Infect* 54:469.
109. Vora, P., A. Youdim, L. S. Thomas, M. Fukata, S. Y. Tesfay, K. Lukasek, K. S. Michelsen, A. Wada, T. Hirayama, M. Arditi, and M. T. Abreu. 2004. Beta-defensin-2 expression is regulated by TLR signaling in intestinal epithelial cells. *J Immunol* 173:5398.
110. Amlie-Lefond, C., D. A. Paz, M. P. Connelly, G. B. Huffnagle, N. T. Whelan, and H. T. Whelan. 2005. Innate immunity for biodefense: a strategy whose time has come. *J Allergy Clin Immunol* 116:1334.
111. Gombart, A. F., N. Borregaard, and H. P. Koeffler. 2005. Human cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene is a direct target of the vitamin D receptor and is strongly up-regulated in myeloid cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Faseb J* 19:1067.
112. Schaubert, J., R. A. Dorschner, K. Yamasaki, B. Brouha, and R. L. Gallo. 2006. Control of the innate epithelial antimicrobial response is cell-type specific and dependent on relevant microenvironmental stimuli. *Immunology* 118:509.

113. Schaubert, J., C. Svanholm, S. Termen, K. Iffland, T. Menzel, W. Scheppach, R. Melcher, B. Agerberth, H. Luhrs, and G. H. Gudmundsson. 2003. Expression of the cathelicidin LL-37 is modulated by short chain fatty acids in colonocytes: relevance of signalling pathways. *Gut* 52:735.
114. Schaubert, J., K. Iffland, S. Frisch, T. Kudlich, B. Schmausser, M. Eck, T. Menzel, A. Gostner, H. Luhrs, and W. Scheppach. 2004. Histone-deacetylase inhibitors induce the cathelicidin LL-37 in gastrointestinal cells. *Mol Immunol* 41:847.
115. Murakami, M., T. Ohtake, R. A. Dorschner, B. Schitteck, C. Garbe, and R. L. Gallo. 2002. Cathelicidin anti-microbial peptide expression in sweat, an innate defense system for the skin. *J Invest Dermatol* 119:1090.
116. Wolk, K., S. Kunz, E. Witte, M. Friedrich, K. Asadullah, and R. Sabat. 2004. IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity* 21:241.
117. Wilson, N. J., K. Boniface, J. R. Chan, B. S. McKenzie, W. M. Blumenschein, J. D. Mattson, B. Basham, K. Smith, T. Chen, F. Morel, J. C. Lecron, R. A. Kastelein, D. J. Cua, T. K. McClanahan, E. P. Bowman, and R. de Waal Malefyt. 2007. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 8:950.
118. Dubin, P. J., and J. K. Kolls. 2008. Th17 cytokines and mucosal immunity. *Immunol Rev* 226:160.
119. Milner, J. D., J. M. Brencley, A. Laurence, A. F. Freeman, B. J. Hill, K. M. Elias, Y. Kanno, C. Spalding, H. Z. Elloumi, M. L. Paulson, J. Davis, A. Hsu, A. I. Asher, J. O'Shea, S. M. Holland, W. E. Paul, and D. C. Douek. 2008. Impaired T(H)17 cell differentiation in subjects with autosomal dominant hyper-IgE syndrome. *Nature* 452:773.
120. Ferwerda, B., G. Ferwerda, T. S. Plantinga, J. A. Willment, A. B. van Sriel, H. Venselaar, C. C. Elbers, M. D. Johnson, A. Cambi, C. Huysamen, L. Jacobs, T. Jansen, K. Verheijen, L. Masthoff, S. A. Morre, G. Vriend, D. L. Williams, J. R. Perfect, L. A. Joosten, C. Wijmenga, J. W. van der Meer, G. J. Adema, B. J. Kullberg, G. D. Brown, and M. G. Netea. 2009. Human dectin-1 deficiency and mucocutaneous fungal infections. *N Engl J Med* 361:1760.
121. Glocker, E. O., A. Hennigs, M. Nabavi, A. A. Schaffer, C. Woellner, U. Salzer, D. Pfeifer, H. Veelken, K. Warnatz, F. Tahami, S. Jamal, A. Manguiat, N. Rezaei, A. A. Amirzargar, A. Plebani, N. Hanneschlager, O. Gross, J. Ruland, and B. Grimbacher. 2009. A homozygous CARD9 mutation in a family with susceptibility to fungal infections. *N Engl J Med* 361:1727.
122. Mookherjee, N., and R. E. Hancock. 2007. Cationic host defence peptides: innate immune regulatory peptides as a novel approach for treating infections. *Cell Mol Life Sci* 64:922.
123. Jenssen, H., P. Hamill, and R. E. Hancock. 2006. Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 19:491.
124. Matsuzaki, K. 1999. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim Biophys Acta* 1462:1.
125. Shai, Y. 1999. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim Biophys Acta* 1462:55.
126. Huang, H. W. 2000. Action of antimicrobial peptides: two-state model. *Biochemistry* 39:8347.
127. Yang, L., T. M. Weiss, R. I. Lehrer, and H. W. Huang. 2000. Crystallization of antimicrobial pores in membranes: magainin and protegrin. *Biophys J* 79:2002.
128. Brogden, K. A. 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 3:238.

Bibliografia

129. Yang, L., T. A. Harroun, T. M. Weiss, L. Ding, and H. W. Huang. 2001. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophys J* 81:1475.
130. Cantor, R. S. 2002. Size distribution of barrel-stave aggregates of membrane peptides: influence of the bilayer lateral pressure profile. *Biophys J* 82:2520.
131. Pouny, Y., D. Rapaport, A. Mor, P. Nicolas, and Y. Shai. 1992. Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. *Biochemistry* 31:12416.
132. Yamaguchi, S., D. Huster, A. Waring, R. I. Lehrer, W. Kearney, B. F. Tack, and M. Hong. 2001. Orientation and dynamics of an antimicrobial peptide in the lipid bilayer by solid-state NMR spectroscopy. *Biophys J* 81:2203.
133. Bechinger, B. 1999. The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 1462:157.
134. Ladokhin, A. S., and S. H. White. 2001. 'Detergent-like' permeabilization of anionic lipid vesicles by melittin. *Biochim Biophys Acta* 1514:253.
135. Guani-Guerra, E., T. Santos-Mendoza, S. O. Lugo-Reyes, and L. M. Teran. Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clin Immunol* 135:1.
136. Matsuzaki, K., O. Murase, N. Fujii, and K. Miyajima. 1996. An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation. *Biochemistry* 35:11361.
137. Hallock, K. J., D. K. Lee, and A. Ramamoorthy. 2003. MSI-78, an analogue of the magainin antimicrobial peptides, disrupts lipid bilayer structure via positive curvature strain. *Biophys J* 84:3052.
138. Yamaguchi, S., T. Hong, A. Waring, R. I. Lehrer, and M. Hong. 2002. Solid-state NMR investigations of peptide-lipid interaction and orientation of a beta-sheet antimicrobial peptide, protegrin. *Biochemistry* 41:9852.
139. Cudic, M., and L. Otvos, Jr. 2002. Intracellular targets of antibacterial peptides. *Curr Drug Targets* 3:101.
140. De Lucca, A. J., and T. J. Walsh. 1999. Antifungal peptides: novel therapeutic compounds against emerging pathogens. *Antimicrob Agents Chemother* 43:1.
141. Lee, D. G., H. K. Kim, S. A. Kim, Y. Park, S. C. Park, S. H. Jang, and K. S. Hahm. 2003. Fungicidal effect of indolicidin and its interaction with phospholipid membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 305:305.
142. Dathe, M., and T. Wieprecht. 1999. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochim Biophys Acta* 1462:71.
143. Bierbaum, G., and H. G. Sahl. 1985. Induction of autolysis of staphylococci by the basic peptide antibiotics Pep 5 and nisin and their influence on the activity of autolytic enzymes. *Arch Microbiol* 141:249.
144. Kragol, G., S. Lovas, G. Varadi, B. A. Condie, R. Hoffmann, and L. Otvos, Jr. 2001. The antibacterial peptide pyrrolicin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding. *Biochemistry* 40:3016.
145. Park, C. B., H. S. Kim, and S. C. Kim. 1998. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochem Biophys Res Commun* 244:253.
146. Brotz, H., M. Josten, I. Wiedemann, U. Schneider, F. Gotz, G. Bierbaum, and H. G. Sahl. 1998. Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics. *Mol Microbiol* 30:317.

147. Zhang, L., P. Dhillon, H. Yan, S. Farmer, and R. E. Hancock. 2000. Interactions of bacterial cationic peptide antibiotics with outer and cytoplasmic membranes of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 44:3317.
148. De, Y., Q. Chen, A. P. Schmidt, G. M. Anderson, J. M. Wang, J. Wooters, J. J. Oppenheim, and O. Chertov. 2000. LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *J Exp Med* 192:1069.
149. Koczulla, R., G. von Degenfeld, C. Kupatt, F. Krotz, S. Zahler, T. Gloe, K. Issbrucker, P. Unterberger, M. Zaiou, C. Lebherz, A. Karl, P. Raake, A. Pfosser, P. Boekstegers, U. Welsch, P. S. Hiemstra, C. Vogelmeier, R. L. Gallo, M. Clauss, and R. Bals. 2003. An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. *J Clin Invest* 111:1665.
150. Bowdish, D. M., D. J. Davidson, Y. E. Lau, K. Lee, M. G. Scott, and R. E. Hancock. 2005. Impact of LL-37 on anti-infective immunity. *J Leukoc Biol* 77:451.
151. Niyonsaba, F., A. Someya, M. Hirata, H. Ogawa, and I. Nagaoka. 2001. Evaluation of the effects of peptide antibiotics human beta-defensins-1/-2 and LL-37 on histamine release and prostaglandin D(2) production from mast cells. *Eur J Immunol* 31:1066.
152. Kirikae, T., M. Hirata, H. Yamasu, F. Kirikae, H. Tamura, F. Kayama, K. Nakatsuka, T. Yokochi, and M. Nakano. 1998. Protective effects of a human 18-kilodalton cationic antimicrobial protein (CAP18)-derived peptide against murine endotoxemia. *Infect Immun* 66:1861.
153. Scott, M. G., A. C. Vreugdenhil, W. A. Burman, R. E. Hancock, and M. R. Gold. 2000. Cutting edge: cationic antimicrobial peptides block the binding of lipopolysaccharide (LPS) to LPS binding protein. *J Immunol* 164:549.
154. Scott, M. G., M. R. Gold, and R. E. Hancock. 1999. Interaction of cationic peptides with lipoteichoic acid and gram-positive bacteria. *Infect Immun* 67:6445.
155. Yang, D., O. Chertov, S. N. Bykovskaia, Q. Chen, M. J. Buffo, J. Shogan, M. Anderson, J. M. Schroder, J. M. Wang, O. M. Howard, and J. J. Oppenheim. 1999. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* 286:525.
156. Niyonsaba, F., K. Iwabuchi, H. Matsuda, H. Ogawa, and I. Nagaoka. 2002. Epithelial cell-derived human beta-defensin-2 acts as a chemotaxin for mast cells through a pertussis toxin-sensitive and phospholipase C-dependent pathway. *Int Immunol* 14:421.
157. Niyonsaba, F., H. Ushio, I. Nagaoka, K. Okumura, and H. Ogawa. 2005. The human beta-defensins (-1, -2, -3, -4) and cathelicidin LL-37 induce IL-18 secretion through p38 and ERK MAPK activation in primary human keratinocytes. *J Immunol* 175:1776.
158. Niyonsaba, F., H. Ushio, N. Nakano, W. Ng, K. Sayama, K. Hashimoto, I. Nagaoka, K. Okumura, and H. Ogawa. 2007. Antimicrobial peptides human beta-defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines. *J Invest Dermatol* 127:594.
159. Murphy, C. J., B. A. Foster, M. J. Mannis, M. E. Selsted, and T. W. Reid. 1993. Defensins are mitogenic for epithelial cells and fibroblasts. *J Cell Physiol* 155:408.
160. Aarbiou, J., R. M. Verhoosel, S. Van Wetering, W. I. De Boer, J. H. Van Krieken, S. V. Litvinov, K. F. Rabe, and P. S. Hiemstra. 2004. Neutrophil defensins enhance lung epithelial wound closure and mucin gene expression in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30:193.
161. Davidson, D. J., A. J. Currie, G. S. Reid, D. M. Bowdish, K. L. MacDonald, R. C. Ma, R. E. Hancock, and D. P. Speert. 2004. The cationic antimicrobial peptide LL-37

Bibliografia

- modulates dendritic cell differentiation and dendritic cell-induced T cell polarization. *J Immunol* 172:1146.
162. Biragyn, A., P. A. Ruffini, C. A. Leifer, E. Klyushnenkova, A. Shakhov, O. Chertov, A. K. Shirakawa, J. M. Farber, D. M. Segal, J. J. Oppenheim, and L. W. Kwak. 2002. Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2. *Science* 298:1025.
163. Tokumaru, S., K. Sayama, Y. Shirakata, H. Komatsuzawa, K. Ouhara, Y. Hanakawa, Y. Yahata, X. Dai, M. Tohyama, H. Nagai, L. Yang, S. Higashiyama, A. Yoshimura, M. Sugai, and K. Hashimoto. 2005. Induction of keratinocyte migration via transactivation of the epidermal growth factor receptor by the antimicrobial peptide LL-37. *J Immunol* 175:4662.
164. Baroni, A., G. Donnarumma, I. Paoletti, I. Longanesi-Cattani, K. Bifulco, M. A. Tufano, and M. V. Carriero. 2009. Antimicrobial human beta-defensin-2 stimulates migration, proliferation and tube formation of human umbilical vein endothelial cells. *Peptides* 30:267.
165. Dorschner, R. A., V. K. Pestonjamas, S. Tamakuwala, T. Ohtake, J. Rudisill, V. Nizet, B. Agerberth, G. H. Gudmundsson, and R. L. Gallo. 2001. Cutaneous injury induces the release of cathelicidin anti-microbial peptides active against group A Streptococcus. *J Invest Dermatol* 117:91.
166. Raqib, R., P. Sarker, P. Bergman, G. Ara, M. Lindh, D. A. Sack, K. M. Nasirul Islam, G. H. Gudmundsson, J. Andersson, and B. Agerberth. 2006. Improved outcome in shigellosis associated with butyrate induction of an endogenous peptide antibiotic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:9178.
167. Islam, D., L. Bandholtz, J. Nilsson, H. Wigzell, B. Christensson, B. Agerberth, and G. Gudmundsson. 2001. Downregulation of bactericidal peptides in enteric infections: a novel immune escape mechanism with bacterial DNA as a potential regulator. *Nat Med* 7:180.
168. Gudmundsson, G. H., P. Bergman, J. Andersson, R. Raqib, and B. Agerberth. Battle and balance at mucosal surfaces--the story of Shigella and antimicrobial peptides. *Biochem Biophys Res Commun* 396:116.
169. Klotman, M. E., and T. L. Chang. 2006. Defensins in innate antiviral immunity. *Nat Rev Immunol* 6:447.
170. Feng, Z., G. R. Dubyak, M. M. Lederman, and A. Weinberg. 2006. Cutting edge: human beta defensin 3--a novel antagonist of the HIV-1 coreceptor CXCR4. *J Immunol* 177:782.
171. Chen, X., F. Niyonsaba, H. Ushio, D. Okuda, I. Nagaoka, S. Ikeda, K. Okumura, and H. Ogawa. 2005. Synergistic effect of antibacterial agents human beta-defensins, cathelicidin LL-37 and lysozyme against Staphylococcus aureus and Escherichia coli. *J Dermatol Sci* 40:123.
172. Aerts, A. M., I. E. Francois, B. P. Cammue, and K. Thevissen. 2008. The mode of antifungal action of plant, insect and human defensins. *Cell Mol Life Sci* 65:2069.
173. Rivas-Santiago, B., S. K. Schwander, C. Sarabia, G. Diamond, M. E. Klein-Patel, R. Hernandez-Pando, J. J. Ellner, and E. Sada. 2005. Human {beta}-defensin 2 is expressed and associated with Mycobacterium tuberculosis during infection of human alveolar epithelial cells. *Infect Immun* 73:4505.
174. Ong, P. Y., T. Ohtake, C. Brandt, I. Strickland, M. Boguniewicz, T. Ganz, R. L. Gallo, and D. Y. Leung. 2002. Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N Engl J Med* 347:1151.
175. Gilliet, M., and R. Lande. 2008. Antimicrobial peptides and self-DNA in autoimmune skin inflammation. *Curr Opin Immunol* 20:401.

176. Yamasaki, K., A. Di Nardo, A. Bardan, M. Murakami, T. Ohtake, A. Coda, R. A. Dorschner, C. Bonnart, P. Descargues, A. Hovnanian, V. B. Morhenn, and R. L. Gallo. 2007. Increased serine protease activity and cathelicidin promotes skin inflammation in rosacea. *Nat Med* 13:975.
177. Segaert, S. 2008. Vitamin D regulation of cathelicidin in the skin: toward a renaissance of vitamin D in dermatology? *J Invest Dermatol* 128:773.
178. Hiemstra, P. S. 2006. Defensins and cathelicidins in inflammatory lung disease: beyond antimicrobial activity. *Biochem Soc Trans* 34:276.
179. Bals, R., X. Wang, Z. Wu, T. Freeman, V. Bafna, M. Zasloff, and J. M. Wilson. 1998. Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *J Clin Invest* 102:874.
180. Beisswenger, C., and R. Bals. 2005. Antimicrobial peptides in lung inflammation. *Chem Immunol Allergy* 86:55.
181. Mukae, H., H. Ishimoto, S. Yanagi, H. Ishii, S. Nakayama, J. Ashitani, M. Nakazato, and S. Kohno. 2007. Elevated BALF concentrations of alpha- and beta-defensins in patients with pulmonary alveolar proteinosis. *Respir Med* 101:715.
182. Lee, S. H., H. H. Lim, H. M. Lee, and J. O. Choi. 2000. Expression of human beta-defensin 1 mRNA in human nasal mucosa. *Acta Otolaryngol* 120:58.
183. Meyer, J. E., J. Harder, T. Gorogh, J. M. Schroder, and S. Maune. 2000. [hBD-2 gene expression in nasal mucosa]. *Laryngorhinootologie* 79:400.
184. Vanhinsbergh, L. J., D. G. Powe, and N. S. Jones. 2007. Reduction of TLR2 gene expression in allergic and nonallergic rhinitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 99:509.
185. Richer, S. L., A. Q. Truong-Tran, D. B. Conley, R. Carter, D. Vermylen, L. C. Grammer, A. T. Peters, R. K. Chandra, K. E. Harris, R. C. Kern, and R. P. Schleimer. 2008. Epithelial genes in chronic rhinosinusitis with and without nasal polyps. *Am J Rhinol* 22:228.
186. Bryborn, M., M. Adner, and L. O. Cardell. 2005. Psoriasin, one of several new proteins identified in nasal lavage fluid from allergic and non-allergic individuals using 2-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Respir Res* 6:118.
187. Herr, C., C. Beisswenger, C. Hess, K. Kandler, N. Suttorp, T. Welte, J. M. Schroeder, and C. Vogelmeier. 2009. Suppression of pulmonary innate host defence in smokers. *Thorax* 64:144.
188. Fellermann, K., D. E. Stange, E. Schaeffeler, H. Schmalzl, J. Wehkamp, C. L. Bevins, W. Reinisch, A. Teml, M. Schwab, P. Lichter, B. Radlwimmer, and E. F. Stange. 2006. A chromosome 8 gene-cluster polymorphism with low human beta-defensin 2 gene copy number predisposes to Crohn disease of the colon. *Am J Hum Genet* 79:439.
189. Wehkamp, J., G. Wang, I. Kubler, S. Nuding, A. Gregorieff, A. Schnabel, R. J. Kays, K. Fellermann, O. Burk, M. Schwab, H. Clevers, C. L. Bevins, and E. F. Stange. 2007. The Paneth cell alpha-defensin deficiency of ileal Crohn's disease is linked to Wnt/Tcf-4. *J Immunol* 179:3109.
190. Wehkamp, J., M. Schmid, and E. F. Stange. 2007. Defensins and other antimicrobial peptides in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 23:370.
191. Higazi, A. A., E. Lavi, K. Bdeir, A. M. Ulrich, D. G. Jamieson, D. J. Rader, D. C. Usher, W. Kane, T. Ganz, and D. B. Cines. 1997. Defensin stimulates the binding of lipoprotein (a) to human vascular endothelial and smooth muscle cells. *Blood* 89:4290.
192. Barnathan, E. S., P. N. Raghunath, J. E. Tomaszewski, T. Ganz, D. B. Cines, and A. a.-R. Higazi. 1997. Immunohistochemical localization of defensin in human coronary vessels. *Am J Pathol* 150:1009.

Bibliografia

193. Higazi, A. A., T. Nassar, T. Ganz, D. J. Rader, R. Udassin, K. Bdeir, E. Hiss, B. S. Sachais, K. J. Williams, E. Leitersdorf, and D. B. Cines. 2000. The alpha-defensins stimulate proteoglycan-dependent catabolism of low-density lipoprotein by vascular cells: a new class of inflammatory apolipoprotein and a possible contributor to atherogenesis. *Blood* 96:1393.
194. Higazi, A. A., T. Ganz, K. Kariko, and D. B. Cines. 1996. Defensin modulates tissue-type plasminogen activator and plasminogen binding to fibrin and endothelial cells. *J Biol Chem* 271:17650.
195. Kougiyas, P., H. Chai, P. H. Lin, Q. Yao, A. B. Lumsden, and C. Chen. 2006. Neutrophil antimicrobial peptide alpha-defensins causes endothelial dysfunction in porcine coronary arteries. *J Vasc Surg* 43:357.
196. Liu, Y., H. Yu, Y. Zhang, and Y. Zhao. 2008. TLRs are important inflammatory factors in atherosclerosis and may be a therapeutic target. *Med Hypotheses* 70:314.
197. Joseph, G., L. Tarnow, A. S. Astrup, T. K. Hansen, H. H. Parving, A. Flyvbjerg, and J. Frystyk. 2008. Plasma alpha-defensin is associated with cardiovascular morbidity and mortality in type 1 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 93:1470.
198. Hoskin, D. W., and A. Ramamoorthy. 2008. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta* 1778:357.
199. Bals, R., D. J. Weiner, R. L. Meegalla, and J. M. Wilson. 1999. Transfer of a cathelicidin peptide antibiotic gene restores bacterial killing in a cystic fibrosis xenograft model. *J Clin Invest* 103:1113.
200. Jacobsen, F., D. Mittler, T. Hirsch, A. Gerhards, M. Lehnhardt, B. Voss, H. U. Steinau, and L. Steinstraesser. 2005. Transient cutaneous adenoviral gene therapy with human host defense peptide hCAP-18/LL-37 is effective for the treatment of burn wound infections. *Gene Ther* 12:1494.
201. Trias, J. 2001. The role of combichem in antibiotic discovery. *Curr Opin Microbiol* 4:520.
202. Blondelle, S. E., and R. A. Houghten. 1996. Novel antimicrobial compounds identified using synthetic combinatorial library technology. *Trends Biotechnol* 14:60.
203. Oppenheim, J. J., A. Biragyn, L. W. Kwak, and D. Yang. 2003. Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. *Ann Rheum Dis* 62 Suppl 2:ii17.
204. Bowdish, D. M., D. J. Davidson, and R. E. Hancock. 2005. A re-evaluation of the role of host defence peptides in mammalian immunity. *Curr Protein Pept Sci* 6:35.
205. Deslouches, B., K. Islam, J. K. Craigo, S. M. Paranjape, R. C. Montelaro, and T. A. Mietzner. 2005. Activity of the de novo engineered antimicrobial peptide WLBU2 against *Pseudomonas aeruginosa* in human serum and whole blood: implications for systemic applications. *Antimicrob Agents Chemother* 49:3208.
206. Dartois, V., J. Sanchez-Quesada, E. Cabezas, E. Chi, C. Dubbelde, C. Dunn, J. Granja, C. Gritzen, D. Weinberger, M. R. Ghadiri, and T. R. Parr, Jr. 2005. Systemic antibacterial activity of novel synthetic cyclic peptides. *Antimicrob Agents Chemother* 49:3302.
207. Freidinger, R. M. 2003. Design and synthesis of novel bioactive peptides and peptidomimetics. *J Med Chem* 46:5553.
208. Masip, I., E. Perez-Paya, and A. Messeguer. 2005. Peptoids as source of compounds eliciting antibacterial activity. *Comb Chem High Throughput Screen* 8:235.
209. Marr, A. K., W. J. Gooderham, and R. E. Hancock. 2006. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Curr Opin Pharmacol* 6:468.
210. Mygind, P. H., R. L. Fischer, K. M. Schnorr, M. T. Hansen, C. P. Sonksen, S. Ludvigsen, D. Raventos, S. Buskov, B. Christensen, L. De Maria, O. Taboureau, D. Yaver, S. G. Elvig-Jorgensen, M. V. Sorensen, B. E. Christensen, S. Kjaerulff, N.

- Frimodt-Moller, R. I. Lehrer, M. Zasloff, and H. H. Kristensen. 2005. Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. *Nature* 437:975.
211. Schito, G. C. 2002. Is antimicrobial resistance also subject to globalization? *Clin Microbiol Infect* 8 Suppl 3:1.
212. Sieprawska-Lupa, M., P. Mydel, K. Krawczyk, K. Wojcik, M. Puklo, B. Lupa, P. Suder, J. Silberring, M. Reed, J. Pohl, W. Shafer, F. McAleese, T. Foster, J. Travis, and J. Potempa. 2004. Degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus*-derived proteinases. *Antimicrob Agents Chemother* 48:4673.
213. Ghosh, D., E. Porter, B. Shen, S. K. Lee, D. Wilk, J. Drazba, S. P. Yadav, J. W. Crabb, T. Ganz, and C. L. Bevins. 2002. Paneth cell trypsin is the processing enzyme for human defensin-5. *Nat Immunol* 3:583.
214. Diamond, G., V. Kaiser, J. Rhodes, J. P. Russell, and C. L. Bevins. 2000. Transcriptional regulation of beta-defensin gene expression in tracheal epithelial cells. *Infect Immun* 68:113.
215. Carter, P. J. 2006. Potent antibody therapeutics by design. *Nat Rev Immunol* 6:343.
216. Litman, G. W., J. P. Cannon, and L. J. Dishaw. 2005. Reconstructing immune phylogeny: new perspectives. *Nat Rev Immunol* 5:866.
217. Delves, P. J., and I. M. Roitt. 2000. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* 343:37.
218. Delves, P. J., and I. M. Roitt. 2000. The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med* 343:108.
219. Torres, M., and A. Casadevall. 2008. The immunoglobulin constant region contributes to affinity and specificity. *Trends Immunol* 29:91.
220. Tonegawa, S. 1983. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302:575.
221. Maizels, N. 2005. Immunoglobulin gene diversification. *Annu Rev Genet* 39:23.
222. Di Noia, J. M., and M. S. Neuberger. 2007. Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu Rev Biochem* 76:1.
223. Peled, J. U., F. L. Kuang, M. D. Iglesias-Ussel, S. Roa, S. L. Kalis, M. F. Goodman, and M. D. Scharff. 2008. The biochemistry of somatic hypermutation. *Annu Rev Immunol* 26:481.
224. Dudley, D. D., J. Chaudhuri, C. H. Bassing, and F. W. Alt. 2005. Mechanism and control of V(D)J recombination versus class switch recombination: similarities and differences. *Adv Immunol* 86:43.
225. Longerich, S., U. Basu, F. Alt, and U. Storb. 2006. AID in somatic hypermutation and class switch recombination. *Curr Opin Immunol* 18:164.
226. Paul, S., Y. Nishiyama, S. Planque, S. Karle, H. Taguchi, C. Hanson, and M. E. Weksler. 2005. Antibodies as defensive enzymes. *Springer Semin Immunopathol* 26:485.
227. Sanderson, C. J., I. A. Clark, and G. A. Taylor. 1975. Different effector cell types in antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Nature* 253:376.
228. Gale, R. P., and J. Zigelboim. 1975. Polymorphonuclear leukocytes in antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Immunol* 114:1047.
229. Casadevall, A., and L. A. Pirofski. 2006. A reappraisal of humoral immunity based on mechanisms of antibody-mediated protection against intracellular pathogens. *Adv Immunol* 91:1.
230. Igietseme, J. U., F. O. Eko, Q. He, and C. M. Black. 2004. Antibody regulation of Tcell immunity: implications for vaccine strategies against intracellular pathogens. *Expert Rev Vaccines* 3:23.
231. Magliani, W., S. Conti, R. Frazzi, L. Ravanetti, D. L. Maffei, and L. Polonelli. 2005. Protective antifungal yeast killer toxin-like antibodies. *Curr Mol Med* 5:443.

Bibliografia

232. Magliani, W., S. Conti, M. Gerloni, D. Bertolotti, and L. Polonelli. 1997. Yeast killer systems. *Clin Microbiol Rev* 10:369.
233. Polonelli, L., F. De Bernardis, S. Conti, M. Boccanera, W. Magliani, M. Gerloni, C. Cantelli, and A. Cassone. 1996. Human natural yeast killer toxin-like candidacidal antibodies. *J Immunol* 156:1880.
234. Magliani, W., S. Conti, F. de Bernardis, M. Gerloni, D. Bertolotti, P. Mozzoni, A. Cassone, and L. Polonelli. 1997. Therapeutic potential of antiidiotypic single chain antibodies with yeast killer toxin activity. *Nat Biotechnol* 15:155.
235. Polonelli, L., N. Seguy, S. Conti, M. Gerloni, D. Bertolotti, C. Cantelli, W. Magliani, and J. C. Cailliez. 1997. Monoclonal yeast killer toxin-like candidacidal anti-idiotypic antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol* 4:142.
236. Seguy, N., J. C. Cailliez, P. Delcourt, S. Conti, D. Camus, E. Dei-Cas, and L. Polonelli. 1997. Inhibitory effect of human natural yeast killer toxin-like candidacidal antibodies on *Pneumocystis carinii*. *Mol Med* 3:544.
237. Conti, S., F. Fanti, W. Magliani, M. Gerloni, D. Bertolotti, A. Salati, A. Cassone, and L. Polonelli. 1998. Mycobactericidal activity of human natural, monoclonal, and recombinant yeast killer toxin-like antibodies. *J Infect Dis* 177:807.
238. Conti, S., W. Magliani, S. Arseni, E. Dieci, R. Frazzi, A. Salati, P. E. Varaldo, and L. Polonelli. 2000. In vitro activity of monoclonal and recombinant yeast killer toxin-like antibodies against antibiotic-resistant gram-positive cocci. *Mol Med* 6:613.
239. Conti, S., W. Magliani, S. Arseni, R. Frazzi, A. Salati, L. Ravanetti, and L. Polonelli. 2002. Inhibition by yeast killer toxin-like antibodies of oral Streptococci adhesion to tooth surfaces in an ex vivo model. *Mol Med* 8:313.
240. Cenci, E., A. Mencacci, A. Spreca, C. Montagnoli, A. Bacci, K. Perruccio, A. Velardi, W. Magliani, S. Conti, L. Polonelli, and L. Romani. 2002. Protection of killer antiidiotypic antibodies against early invasive aspergillosis in a murine model of allogeneic T-cell-depleted bone marrow transplantation. *Infect Immun* 70:2375.
241. Magliani, W., S. Conti, L. Giovati, D. L. Maffei, and L. Polonelli. 2008. Anti-beta-glucan-like immunoprotective candidacidal antiidiotypic antibodies. *Front Biosci* 13:6920.
242. Bromuro, C., A. Torosantucci, P. Chiani, S. Conti, L. Polonelli, and A. Cassone. 2002. Interplay between protective and inhibitory antibodies dictates the outcome of experimentally disseminated Candidiasis in recipients of a *Candida albicans* vaccine. *Infect Immun* 70:5462.
243. Torosantucci, A., C. Bromuro, P. Chiani, F. De Bernardis, F. Berti, C. Galli, F. Norelli, C. Bellucci, L. Polonelli, P. Costantino, R. Rappuoli, and A. Cassone. 2005. A novel glyco-conjugate vaccine against fungal pathogens. *J Exp Med* 202:597.
244. Rachini, A., D. Pietrella, P. Lupo, A. Torosantucci, P. Chiani, C. Bromuro, C. Proietti, F. Bistoni, A. Cassone, and A. Vecchiarelli. 2007. An anti-beta-glucan monoclonal antibody inhibits growth and capsule formation of *Cryptococcus neoformans* in vitro and exerts therapeutic, anticryptococcal activity in vivo. *Infect Immun* 75:5085.
245. Chiarella, P., and V. M. Fazio. 2008. Mouse monoclonal antibodies in biological research: strategies for high-throughput production. *Biotechnol Lett* 30:1303.
246. Almagro, J. C., and J. Fransson. 2008. Humanization of antibodies. *Front Biosci* 13:1619.
247. Lonberg, N. 2008. Human monoclonal antibodies from transgenic mice. *Handb Exp Pharmacol*:69.
248. Hoogenboom, H. R. 2005. Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat Biotechnol* 23:1105.
249. Mondon, P., O. Dubreuil, K. Bouayadi, and H. Kharrat. 2008. Human antibody libraries: a race to engineer and explore a larger diversity. *Front Biosci* 13:1117.

250. Schirrmann, T., L. Al-Halabi, S. Dubel, and M. Hust. 2008. Production systems for recombinant antibodies. *Front Biosci* 13:4576.
251. Buckler, D. R., A. Park, M. Viswanathan, R. M. Hoet, and R. C. Ladner. 2008. Screening isolates from antibody phage-display libraries. *Drug Discov Today* 13:318.
252. Hudson, P. J., and C. Souriau. 2003. Engineered antibodies. *Nat Med* 9:129.
253. Holliger, P., and P. J. Hudson. 2005. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol* 23:1126.
254. Donzeau, M., and A. Knappik. 2007. Recombinant monoclonal antibodies. *Methods Mol Biol* 378:14.
255. Demarest, S. J., and S. M. Glaser. 2008. Antibody therapeutics, antibody engineering, and the merits of protein stability. *Curr Opin Drug Discov Devel* 11:675.
256. Liu, X. Y., L. M. Pop, and E. S. Vitetta. 2008. Engineering therapeutic monoclonal antibodies. *Immunol Rev* 222:9.
257. Holt, L. J., C. Herring, L. S. Jespers, B. P. Woolven, and I. M. Tomlinson. 2003. Domain antibodies: proteins for therapy. *Trends Biotechnol* 21:484.
258. Tanha, J., T. D. Nguyen, A. Ng, S. Ryan, F. Ni, and R. Mackenzie. 2006. Improving solubility and refolding efficiency of human V(H)s by a novel mutational approach. *Protein Eng Des Sel* 19:503.
259. Kovtun, Y. V., and V. S. Goldmacher. 2007. Cell killing by antibody-drug conjugates. *Cancer Lett* 255:232.
260. Carter, P. J., and P. D. Senter. 2008. Antibody-drug conjugates for cancer therapy. *Cancer J* 14:154.
261. Chari, R. V. 2008. Targeted cancer therapy: conferring specificity to cytotoxic drugs. *Acc Chem Res* 41:98.
262. Lo, A. S., Q. Zhu, and W. A. Marasco. 2008. Intracellular antibodies (intrabodies) and their therapeutic potential. *Handb Exp Pharmacol*:343.
263. Cardinale, A., and S. Biocca. 2008. Combating protein misfolding and aggregation by intracellular antibodies. *Curr Mol Med* 8:2.
264. Muller, S., Y. Zhao, T. L. Brown, A. C. Morgan, and H. Kohler. 2005. TransMabs: cell-penetrating antibodies, the next generation. *Expert Opin Biol Ther* 5:237.
265. Humphreys, D. P., S. P. Heywood, A. Henry, L. Ait-Lhadj, P. Antoniwi, R. Palframan, K. J. Greenslade, B. Carrington, D. G. Reeks, L. C. Bowering, S. West, and H. A. Brand. 2007. Alternative antibody Fab' fragment PEGylation strategies: combination of strong reducing agents, disruption of the interchain disulphide bond and disulphide engineering. *Protein Eng Des Sel* 20:227.
266. Presta, L. G. 2008. Molecular engineering and design of therapeutic antibodies. *Curr Opin Immunol* 20:460.
267. Mazor, Y., T. Van Blarcom, R. Mabry, B. L. Iverson, and G. Georgiou. 2007. Isolation of engineered, full-length antibodies from libraries expressed in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* 25:563.
268. von Behring, E., and S. Kitasato. 1991. [The mechanism of diphtheria immunity and tetanus immunity in animals. 1890]. *Mol Immunol* 28:1317.
269. Casadevall, A., and M. D. Scharff. 1995. Return to the past: the case for antibody-based therapies in infectious diseases. *Clin Infect Dis* 21:150.
270. Newcombe, C., and A. R. Newcombe. 2007. Antibody production: polyclonal-derived biotherapeutics. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 848:2.
271. Stockwin, L. H., and S. Holmes. 2003. Antibodies as therapeutic agents: vive la renaissance! *Expert Opin Biol Ther* 3:1133.
272. Goldstein, G. 1987. Overview of the development of Orthoclone OKT3: monoclonal antibody for therapeutic use in transplantation. *Transplant Proc* 19:1.

Bibliografia

273. Beck, A., T. Wurch, and N. Corvaia. 2008. Therapeutic antibodies and derivatives: from the bench to the clinic. *Curr Pharm Biotechnol* 9:421.
274. Reichert, J. M. 2008. Monoclonal antibodies as innovative therapeutics. *Curr Pharm Biotechnol* 9:423.
275. Thie, H., T. Meyer, T. Schirrmann, M. Hust, and S. Dubel. 2008. Phage display derived therapeutic antibodies. *Curr Pharm Biotechnol* 9:439.
276. Steinmeyer, D. E., and E. L. McCormick. 2008. The art of antibody process development. *Drug Discov Today* 13:613.
277. Tcheng, J. E. 1994. Dosing and administration of ReoPro (c7E3 Fab). *J Invasive Cardiol* 6 Suppl A:29A.
278. Gralla, J., A. T. Rennie, R. A. Corkill, S. T. Laloo, A. Molyneux, J. V. Byrne, and W. Kuker. 2008. Abciximab for thrombolysis during intracranial aneurysm coiling. *Neuroradiology* 50:1041.
279. Coiffier, B., C. Haioun, N. Ketterer, A. Engert, H. Tilly, D. Ma, P. Johnson, A. Lister, M. Feuring-Buske, J. A. Radford, R. Capdeville, V. Diehl, and F. Reyes. 1998. Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) for the treatment of patients with relapsing or refractory aggressive lymphoma: a multicenter phase II study. *Blood* 92:1927.
280. Newsome, B. W., and M. S. Ernstoff. 2008. The clinical pharmacology of therapeutic monoclonal antibodies in the treatment of malignancy; have the magic bullets arrived? *Br J Clin Pharmacol* 66:6.
281. Castillo, J., E. Winer, and P. Quesenberry. 2008. Newer monoclonal antibodies for hematological malignancies. *Exp Hematol* 36:755.
282. Sawyers, C. 2004. Targeted cancer therapy. *Nature* 432:294.
283. Imai, K., and A. Takaoka. 2006. Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Nat Rev Cancer* 6:714.
284. James, D. F., and T. J. Kipps. 2007. Alemtuzumab in chronic lymphocytic leukemia. *Future Oncol* 3:29.
285. Fanale, M. A., and A. Younes. 2007. Monoclonal antibodies in the treatment of non-Hodgkin's lymphoma. *Drugs* 67:333.
286. Robak, T. 2008. Novel monoclonal antibodies for the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Curr Cancer Drug Targets* 8:156.
287. Horton, H. M., M. J. Bennett, E. Pong, M. Peipp, S. Karki, S. Y. Chu, J. O. Richards, I. Vostiar, P. F. Joyce, R. Repp, J. R. Desjarlais, and E. A. Zhukovsky. 2008. Potent in vitro and in vivo activity of an Fc-engineered anti-CD19 monoclonal antibody against lymphoma and leukemia. *Cancer Res* 68:8049.
288. Clynes, R. 2006. Antitumor antibodies in the treatment of cancer: Fc receptors link opsonic antibody with cellular immunity. *Hematol Oncol Clin North Am* 20:585.
289. Roque-Navarro, L., K. Chakrabandhu, J. de Leon, S. Rodriguez, C. Toledo, A. Carr, C. M. de Acosta, A. O. Hueber, and R. Perez. 2008. Anti-ganglioside antibody-induced tumor cell death by loss of membrane integrity. *Mol Cancer Ther* 7:2033.
290. Metro, G., M. Mottolese, and A. Fabi. 2008. HER-2-positive metastatic breast cancer: trastuzumab and beyond. *Expert Opin Pharmacother* 9:2583.
291. Banerjee, D., P. Matthews, E. Matayeva, J. L. Kaufman, R. M. Steinman, and K. M. Dhodapkar. 2008. Enhanced T-cell responses to glioma cells coated with the anti-EGF receptor antibody and targeted to activating FcγRs on human dendritic cells. *J Immunother* 31:113.
292. Yan, L., K. Hsu, and R. A. Beckman. 2008. Antibody-based therapy for solid tumors. *Cancer J* 14:178.
293. Norden, A. D., J. Drappatz, and P. Y. Wen. 2008. Antiangiogenic therapy in malignant gliomas. *Curr Opin Oncol* 20:652.

294. Rose, J. W., J. Foley, and N. Carlson. 2008. Monoclonal antibody treatments for multiple sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep* 8:419.
295. Lynch, S. M., C. Zhou, and A. Messer. 2008. An scFv intrabody against the nonamyloid component of alpha-synuclein reduces intracellular aggregation and toxicity. *J Mol Biol* 377:136.
296. Prenner, B. M. 2008. Asthma 2008: targeting immunoglobulin E to achieve disease control. *J Asthma* 45:429.
297. Cambridge, G., M. J. Leandro, J. C. Edwards, M. R. Ehrenstein, M. Salden, M. Bodman-Smith, and A. D. Webster. 2003. Serologic changes following B lymphocyte depletion therapy for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 48:2146.
298. Vega, O., G. Cardenas, R. Correa-Rotter, J. Alberu, and L. E. Morales-Buenrostro. 2008. Basiliximab vs. limited-dose daclizumab (2 mg/kg) administered in single or two separated doses in kidney transplantation. *Rev Invest Clin* 60:82.
299. Sharkey, R. M., and D. M. Goldenberg. 2005. Perspectives on cancer therapy with radiolabeled monoclonal antibodies. *J Nucl Med* 46 Suppl 1:115S.
300. Mulford, D. A., D. A. Scheinberg, and J. G. Jurcic. 2005. The promise of targeted {alpha}-particle therapy. *J Nucl Med* 46 Suppl 1:199S.
301. Sofou, S. 2008. Radionuclide carriers for targeting of cancer. *Int J Nanomedicine* 3:181.
302. Dadachova, E., E. Revskaya, M. A. Sesay, H. Damania, R. Boucher, R. S. Sellers, R. C. Howell, L. Burns, G. B. Thornton, A. Natarajan, G. R. Mirick, S. J. DeNardo, G. L. DeNardo, and A. Casadevall. 2008. Pre-clinical evaluation and efficacy studies of a melanin-binding IgM antibody labeled with 188Re against experimental human metastatic melanoma in nude mice. *Cancer Biol Ther* 7:1116.
303. Stasi, R. 2008. Gemtuzumab ozogamicin: an anti-CD33 immunoconjugate for the treatment of acute myeloid leukaemia. *Expert Opin Biol Ther* 8:527.
304. Potala, S., S. K. Sahoo, and R. S. Verma. 2008. Targeted therapy of cancer using diphtheria toxin-derived immunotoxins. *Drug Discov Today* 13:807.
305. Bhatti, M., G. Yahioğlu, L. R. Milgrom, M. Garcia-Maya, K. A. Chester, and M. P. Deonarain. 2008. Targeted photodynamic therapy with multiply-loaded recombinant antibody fragments. *Int J Cancer* 122:1155.
306. Baxevanis, C. N., S. A. Perez, and M. Papamichail. 2009. Combinatorial treatments including vaccines, chemotherapy and monoclonal antibodies for cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* 58:317.
307. Romero, J. R. 2003. Palivizumab prophylaxis of respiratory syncytial virus disease from 1998 to 2002: results from four years of palivizumab usage. *Pediatr Infect Dis J* 22:S46.
308. Reichert, J. M., and M. C. Dewitz. 2006. Anti-infective monoclonal antibodies: perils and promise of development. *Nat Rev Drug Discov* 5:191.
309. Wu, H., D. S. Pfarr, G. A. Losonsky, and P. A. Kiener. 2008. Immunoprophylaxis of RSV infection: advancing from RSV-IGIV to palivizumab and motavizumab. *Curr Top Microbiol Immunol* 317:103.
310. Xiao, X., and D. S. Dimitrov. 2007. Monoclonal antibodies against viruses and bacteria: a survey of patents. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 2:171.
311. Weisman, L. E. 2007. Antibody for the prevention of neonatal nosocomial staphylococcal infection: a review of the literature. *Arch Pediatr* 14 Suppl 1:S31.
312. Casadevall, A. 2006. The third age of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis* 42:1414.
313. Singla, M. 2007. Antibody based target tailored antimicrobial chemotherapy - a new approach. *Med Hypotheses* 68:957.
314. Hamad, M. 2008. Antifungal immunotherapy and immunomodulation: a double-hitter approach to deal with invasive fungal infections. *Scand J Immunol* 67:533.

Bibliografia

315. Dadachova, E., and A. Casadevall. 2006. Treatment of infection with radiolabeled antibodies. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 50:193.
316. Bryan, R. A., X. Huang, A. Morgenstern, F. Bruchertseifer, A. Casadevall, and E. Dadachova. 2008. Radiofungicidal effects of external gamma radiation and antibody-targeted beta and alpha radiation on *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* 52:2232.
317. Casadevall, A., H. Goldstein, and E. Dadachova. 2007. Targeting host cells harbouring viruses with radiolabeled antibodies. *Expert Opin Biol Ther* 7:595.
318. Wang, X. G., E. Revskaya, R. A. Bryan, H. D. Strickler, R. D. Burk, A. Casadevall, and E. Dadachova. 2007. Treating cancer as an infectious disease--viral antigens as novel targets for treatment and potential prevention of tumors of viral etiology. *PLoS One* 2:e1114.
319. Dadachova, E., and A. Casadevall. 2008. Host and microbial cells as targets for armed antibodies in the treatment of infectious diseases. *Curr Opin Investig Drugs* 9:184.
320. Nooney, L., R. C. Matthews, and J. P. Burnie. 2005. Evaluation of Mycograb, amphotericin B, caspofungin, and fluconazole in combination against *Cryptococcus neoformans* by checkerboard and time-kill methodologies. *Diagn Microbiol Infect Dis* 51:19.
321. Pacht, J., P. Svoboda, F. Jacobs, K. Vandewoude, B. van der Hoven, P. Spronk, G. Masterson, M. Malbrain, M. Aoun, J. Garbino, J. Takala, L. Drgona, J. Burnie, and R. Matthews. 2006. A randomized, blinded, multicenter trial of lipid-associated amphotericin B alone versus in combination with an antibody-based inhibitor of heat shock protein 90 in patients with invasive candidiasis. *Clin Infect Dis* 42:1404.
322. Hodgetts, S., L. Nooney, R. Al-Akeel, A. Curry, S. Awad, R. Matthews, and J. Burnie. 2008. Efungumab and caspofungin: pre-clinical data supporting synergy. *J Antimicrob Chemother* 61:1132.
323. Messaoudi, S., J. F. Peyrat, J. D. Brion, and M. Alami. 2008. Recent advances in Hsp90 inhibitors as antitumor agents. *Anticancer Agents Med Chem* 8:761.
324. www.neutecpharma.com/mycograb.html, and www.neutecpharma.com/aurograb.html. 2008. Accessed December 22.
325. Zhang, M. X., M. C. Bohlman, C. Itatani, D. R. Burton, P. W. Parren, S. C. St Jeor, and T. R. Kozel. 2006. Human recombinant antimannan immunoglobulin G1 antibody confers resistance to hematogenously disseminated candidiasis in mice. *Infect Immun* 74:362.
326. De Bernardis, F., H. Liu, R. O'Mahony, R. La Valle, S. Bartollino, S. Sandini, S. Grant, N. Brewis, I. Tomlinson, R. C. Basset, J. Holton, I. M. Roitt, and A. Cassone. 2007. Human domain antibodies against virulence traits of *Candida albicans* inhibit fungus adherence to vaginal epithelium and protect against experimental vaginal candidiasis. *J Infect Dis* 195:149.
327. Beninati, C., M. R. Oggioni, M. Boccanera, M. R. Spinosa, T. Maggi, S. Conti, W. Magliani, F. De Bernardis, G. Teti, A. Cassone, G. Pozzi, and L. Polonelli. 2000. Therapy of mucosal candidiasis by expression of an anti-idiotypic in human commensal bacteria. *Nat Biotechnol* 18:1060.
328. Chartrain, M., and L. Chu. 2008. Development and production of commercial therapeutic monoclonal antibodies in Mammalian cell expression systems: an overview of the current upstream technologies. *Curr Pharm Biotechnol* 9:447.
329. Widakowich, C., G. de Castro, Jr., E. de Azambuja, P. Dinh, and A. Awada. 2007. Review: side effects of approved molecular targeted therapies in solid cancers. *Oncologist* 12:1443.
330. Force, T., and R. Kerkela. 2008. Cardiotoxicity of the new cancer therapeutics--mechanisms of, and approaches to, the problem. *Drug Discov Today* 13:778.

331. Kreisl, T. N. 2008. Neurologic complications of antitumor antibody therapies. *Curr Neurol Neurosci Rep* 8:259.
332. Cao, L., Y. Yu, I. Darko, D. Currier, L. H. Mayeenuddin, X. Wan, C. Khanna, and L. J. Helman. 2008. Addiction to elevated insulin-like growth factor I receptor and initial modulation of the AKT pathway define the responsiveness of rhabdomyosarcoma to the targeting antibody. *Cancer Res* 68:8039.
333. Feng, Y., and D. S. Dimitrov. 2008. Monoclonal antibodies against components of the IGF system for cancer treatment. *Curr Opin Drug Discov Devel* 11:178.
334. Liu, Z., Z. Yu, W. He, S. Ma, L. Sun, and F. Wang. 2009. In-vitro internalization and in-vivo tumor uptake of anti-EGFR monoclonal antibody LA22 in A549 lung cancer cells and animal model. *Cancer Biother Radiopharm* 24:15.
335. Beck, A., E. Wagner-Rousset, M. C. Bussat, M. Lokteff, C. Klinguer-Hamour, J. F. Haeuw, L. Goetsch, T. Wurch, A. Van Dorsselaer, and N. Corvaia. 2008. Trends in glycosylation, glycoanalysis and glycoengineering of therapeutic antibodies and Fc-fusion proteins. *Curr Pharm Biotechnol* 9:482.
336. Wurch, T., P. Lowe, V. Caussanel, C. Bes, A. Beck, and N. Corvaia. 2008. Development of novel protein scaffolds as alternatives to whole antibodies for imaging and therapy: status on discovery research and clinical validation. *Curr Pharm Biotechnol* 9:502.
337. Bevan, E. A., and M. Makower. 1963. The physiological basis of the killer character in yeast. In *Proc XIth Int Congr Genet. Pergamon Press, The Netherlands* 1:202.
338. Hardy, K. G. 1975. Colicinogeny and related phenomena. *Bacteriol Rev* 39:464.
339. Klis, F. M. 1994. Review: cell wall assembly in yeast. *Yeast* 10:851.
340. Polonelli, L., and G. Morace. 1986. Reevaluation of the yeast killer phenomenon. *J Clin Microbiol* 24:866.
341. Pettoello-Mantovani, M., A. Nocerino, L. Polonelli, G. Morace, S. Conti, L. Di Martino, G. De Ritis, M. Iafusco, and S. Guandalini. 1995. *Hansenula anomala* killer toxin induces secretion and severe acute injury in the rat intestine. *Gastroenterology* 109:1900.
342. Jerne, N. K. 1974. Towards a network theory of the immune system. *Ann Immunol (Paris)* 125C:373.
343. Bhattacharya-Chatterjee, M., K. A. Foon, and H. Kohler. 1991. Anti-idiotypic monoclonal antibodies as vaccines for human cancer. *Int Rev Immunol* 7:289.
344. Herlyn, D., M. Wettendorff, and H. Koprowski. 1989. Modulation of cancer patients' immune responses by anti-idiotypic antibodies. *Int Rev Immunol* 4:347.
345. Polonelli, L., S. Conti, M. Gerloni, W. Magliani, M. Castagnola, G. Morace, and C. Chezzi. 1991. 'Antibodies': antibiotic-like anti-idiotypic antibodies. *J Med Vet Mycol* 29:235.
346. Polonelli, L., R. Lorenzini, F. De Bernardis, M. Gerloni, S. Conti, G. Morace, W. Magliani, and C. Chezzi. 1993. Idiotypic vaccination: immunoprotection mediated by anti-idiotypic antibodies with antibiotic activity. *Scand J Immunol* 37:105.
347. Polonelli, L., F. De Bernardis, S. Conti, M. Boccanera, M. Gerloni, G. Morace, W. Magliani, C. Chezzi, and A. Cassone. 1994. Idiotypic intravaginal vaccination to protect against candidal vaginitis by secretory, yeast killer toxin-like anti-idiotypic antibodies. *J Immunol* 152:3175.
348. Magliani, W., S. Conti, L. R. Travassos, and L. Polonelli. 2008. From yeast killer toxins to antibodies and beyond. *FEMS Microbiol Lett* 288:1.
349. Seguy, N., L. Polonelli, E. Dei-Cas, and J. C. Cailliez. 1997. Monoclonal killer toxin-like anti-idiotypic antibodies to control rat-pneumocystosis. *J Eukaryot Microbiol* 44:37S.

Bibliografia

350. Barthelemy, P. A., H. Raab, B. A. Appleton, C. J. Bond, P. Wu, C. Wiesmann, and S. S. Sidhu. 2008. Comprehensive analysis of the factors contributing to the stability and solubility of autonomous human VH domains. *J Biol Chem* 283:3639.
351. Padlan, E. A., C. Abergel, and J. P. Tipper. 1995. Identification of specificity-determining residues in antibodies. *Faseb J* 9:133.
352. Heap, C. J., Y. Wang, T. J. Pinheiro, S. A. Reading, K. R. Jennings, and N. J. Dimmock. 2005. Analysis of a 17-amino acid residue, virus-neutralizing microantibody. *J Gen Virol* 86:1791.
353. Saphire, E. O., P. W. Parren, R. Pantophlet, M. B. Zwick, G. M. Morris, P. M. Rudd, R. A. Dwek, R. L. Stanfield, D. R. Burton, and I. A. Wilson. 2001. Crystal structure of a neutralizing human IGG against HIV-1: a template for vaccine design. *Science* 293:1155.
354. Bourgeois, C., J. B. Bour, L. S. Aho, and P. Pothier. 1998. Prophylactic administration of a complementarity-determining region derived from a neutralizing monoclonal antibody is effective against respiratory syncytial virus infection in BALB/c mice. *J Virol* 72:807.
355. Dorfman, T., M. J. Moore, A. C. Guth, H. Choe, and M. Farzan. 2006. A tyrosine-sulfated peptide derived from the heavy-chain CDR3 region of an HIV-1-neutralizing antibody binds gp120 and inhibits HIV-1 infection. *J Biol Chem* 281:28529.
356. Park, B. W., H. T. Zhang, C. Wu, A. Berezov, X. Zhang, R. Dua, Q. Wang, G. Kao, D. M. O'Rourke, M. I. Greene, and R. Murali. 2000. Rationally designed anti-HER2/neu peptide mimetic disables P185HER2/neu tyrosine kinases in vitro and in vivo. *Nat Biotechnol* 18:194.
357. Qiu, X. Q., H. Wang, B. Cai, L. L. Wang, and S. T. Yue. 2007. Small antibody mimetics comprising two complementarity-determining regions and a framework region for tumor targeting. *Nat Biotechnol* 25:921.
358. Deroo, S., A. Fischer, N. Beaupain, M. Counson, N. Boutonnet, J. Pletinckx, S. Loverix, E. Beirnaert, H. De Haard, J. C. Schmit, and I. Lasters. 2008. Non-immunized natural human heavy chain CDR3 repertoires allow the isolation of high affinity peptides mimicking a human influenza hemagglutinin epitope. *Mol Immunol* 45:1366.
359. Mozes, E., U. Sela, and A. Sharabi. 2008. A novel synthetic peptide for the specific treatment of lupus: clinical effects and mechanism of action. *Isr Med Assoc J* 10:40.
360. Sela, U., M. Dayan, R. Hershkoviz, O. Lider, and E. Mozes. 2008. A peptide that ameliorates lupus up-regulates the diminished expression of early growth response factors 2 and 3. *J Immunol* 180:1584.
361. Magliani, W., S. Conti, R. L. Cunha, L. R. Travassos, and L. Polonelli. 2009. Antibodies as crypts of antiinfective and antitumor peptides. *Curr Med Chem* 16:2305.
362. Polonelli, L., W. Magliani, S. Conti, L. Bracci, L. Lozzi, P. Neri, D. Adriani, F. De Bernardis, and A. Cassone. 2003. Therapeutic activity of an engineered synthetic killer antiidiotypic antibody fragment against experimental mucosal and systemic candidiasis. *Infect Immun* 71:6205.
363. Magliani, W., S. Conti, A. Salati, S. Arseni, L. Ravanetti, R. Frazzi, and L. Polonelli. 2004. Engineered killer mimotopes: new synthetic peptides for antimicrobial therapy. *Curr Med Chem* 11:1793.
364. Magliani, W., S. Conti, A. Salati, S. Vaccari, L. Ravanetti, D. L. Maffei, and L. Polonelli. 2004. Therapeutic potential of yeast killer toxin-like antibodies and mimotopes. *FEMS Yeast Res* 5:11.

365. Magliani, W., S. Conti, D. L. Maffei, L. Ravanetti, and L. Polonelli. 2007. Antiidiotype-derived killer peptides as new potential tools to combat HIV-1 and AIDS-related opportunistic pathogens. *Anti-Infect. Agents Med. Chem.* 6:263.
366. Savoia, D., S. Scutera, S. Raimondo, S. Conti, W. Magliani, and L. Polonelli. 2006. Activity of an engineered synthetic killer peptide on *Leishmania major* and *Leishmania infantum* promastigotes. *Exp Parasitol* 113:186.
367. Fiori, P. L., A. Mattana, D. Dessi, S. Conti, W. Magliani, and L. Polonelli. 2006. In vitro acanthamoebicidal activity of a killer monoclonal antibody and a synthetic peptide. *J Antimicrob Chemother* 57:891.
368. Cenci, E., F. Bistoni, A. Mencacci, S. Perito, W. Magliani, S. Conti, L. Polonelli, and A. Vecchiarelli. 2004. A synthetic peptide as a novel anticryptococcal agent. *Cell Microbiol* 6:953.
369. Travassos, L. R., L. S. Silva, E. G. Rodrigues, S. Conti, A. Salati, W. Magliani, and L. Polonelli. 2004. Therapeutic activity of a killer peptide against experimental paracoccidioidomycosis. *J Antimicrob Chemother* 54:956.
370. Donini, M., C. Lico, S. Baschieri, S. Conti, W. Magliani, L. Polonelli, and E. Benvenuto. 2005. Production of an engineered killer peptide in *Nicotiana benthamiana* by using a potato virus X expression system. *Appl Environ Microbiol* 71:6360.
371. Casoli, C., E. Pilotti, C. F. Perno, E. Balestra, E. Polverini, A. Cassone, S. Conti, W. Magliani, and L. Polonelli. 2006. A killer mimotope with therapeutic activity against AIDS-related opportunistic micro-organisms inhibits ex-vivo HIV-1 replication. *Aids* 20:975.
372. Conti, G., W. Magliani, S. Conti, L. Nencioni, R. Sgarbanti, A. T. Palamara, and L. Polonelli. 2008. Therapeutic activity of an anti-idiotypic antibody-derived killer peptide against influenza A virus experimental infection. *Antimicrob Agents Chemother* 52:4331.
373. Cenci, E., E. Pericolini, A. Mencacci, S. Conti, W. Magliani, F. Bistoni, L. Polonelli, and A. Vecchiarelli. 2006. Modulation of phenotype and function of dendritic cells by a therapeutic synthetic killer peptide. *J Leukoc Biol* 79:40.
374. Conti, S., W. Magliani, L. Giovati, I. Libri, D. L. Maffei, A. Salati, and L. Polonelli. 2008. Screening of a *Saccharomyces cerevisiae* nonessential gene deletion collection for altered susceptibility to a killer peptide. *New Microbiol* 31:143.
375. Pertinhez, T. A., S. Conti, E. Ferrari, W. Magliani, A. Spisni, and L. Polonelli. 2009. Reversible self-assembly: a key feature for a new class of autodelivering therapeutic peptides. *Mol Pharm* 6:1036.
376. Lesage, G., and H. Bussey. 2006. Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 70:317.
377. Brena, S., M. J. Omaetxebarria, N. Elguezabal, J. Cabezas, M. D. Moragues, and J. Ponton. 2007. Fungicidal monoclonal antibody C7 binds to *Candida albicans* Als3. *Infect Immun* 75:3680.
378. Polonelli, L., J. Ponton, N. Elguezabal, M. D. Moragues, C. Casoli, E. Pilotti, P. Ronzi, A. S. Dobroff, E. G. Rodrigues, M. A. Juliano, D. L. Maffei, W. Magliani, S. Conti, and L. R. Travassos. 2008. Antibody complementarity-determining regions (CDRs) can display differential antimicrobial, antiviral and antitumor activities. *PLoS One* 3:e2371.
379. Manfredi, M., M. J. McCullough, S. Conti, L. Polonelli, P. Vescovi, Z. M. Al-Karaawi, and S. R. Porter. 2005. In vitro activity of a monoclonal killer anti-idiotypic antibody and a synthetic killer peptide against oral isolates of *Candida* spp. differently susceptible to conventional antifungals. *Oral Microbiol Immunol* 20:226.
380. Manfredi, M., E. Merigo, A. Salati, S. Conti, A. Savi, L. Polonelli, M. Bonanini, and P. Vescovi. 2007. In vitro candidacidal activity of a synthetic killer decapeptide (KP)

Bibliografia

- against *Candida albicans* cells adhered to resin acrylic discs. *J Oral Pathol Med* 36:468.
381. Nickerson, K. G., M. H. Tao, H. T. Chen, J. Larrick, and E. A. Kabat. 1995. Human and mouse monoclonal antibodies to blood group A substance, which are nearly identical immunochemically, use radically different primary sequences. *J Biol Chem* 270:12457.
382. Chen, H. T., E. A. Kabat, A. Lundblad, and R. M. Ratcliffe. 1987. Nucleotide and translated amino acid sequences of cDNA coding for the variable regions of the light and heavy chains of mouse hybridoma antibodies to blood group A and B substances. *J Biol Chem* 262:13579.
383. Morgan, J. F., H. J. Morton, and R. C. Parker. 1950. Nutrition of animal cells in tissue culture; initial studies on a synthetic medium. *Proc Soc Exp Biol Med* 73:1.
384. Jones, T., N. A. Federspiel, H. Chibana, J. Dungan, S. Kalman, B. B. Magee, G. Newport, Y. R. Thorstenson, N. Agabian, P. T. Magee, R. W. Davis, and S. Scherer. 2004. The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:7329.
385. Braun, B. R., M. van Het Hoog, C. d'Enfert, M. Martchenko, J. Dungan, A. Kuo, D. O. Inglis, M. A. Uhl, H. Hogues, M. Berriman, M. Lorenz, A. Levitin, U. Oberholzer, C. Bachewich, D. Marcus, A. Marcil, D. Dignard, T. Iouk, R. Zito, L. Frangeul, F. Tekaiia, K. Rutherford, E. Wang, C. A. Munro, S. Bates, N. A. Gow, L. L. Hoyer, G. Kohler, J. Morschhauser, G. Newport, S. Znaidi, M. Raymond, B. Turcotte, G. Sherlock, M. Costanzo, J. Ihmels, J. Berman, D. Sanglard, N. Agabian, A. P. Mitchell, A. D. Johnson, M. Whiteway, and A. Nantel. 2005. A human-curated annotation of the *Candida albicans* genome. *PLoS Genet* 1:36.
386. Romani, L., A. Mencacci, E. Cenci, R. Spaccapelo, P. Mosci, P. Puccetti, and F. Bistoni. 1993. CD4+ subset expression in murine candidiasis. Th responses correlate directly with genetically determined susceptibility or vaccine-induced resistance. *J Immunol* 150:925.
387. Monari, C., T. R. Kozel, F. Bistoni, and A. Vecchiarelli. 2002. Modulation of C5aR expression on human neutrophils by encapsulated and acapsular *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 70:3363.
388. Oren, Z., and Y. Shai. 1997. Selective lysis of bacteria but not mammalian cells by diastereomers of melittin: structure-function study. *Biochemistry* 36:1826.
389. Fanti, F., S. Conti, A. Zucchi, and L. Polonelli. 2003. First Italian report of onychomycosis caused by *Onychocola canadensis*. *Med Mycol* 41:447.
390. de Bernardis, F., F. Mondello, G. Scaravelli, A. Pachi, A. Girolamo, L. Agatensi, and A. Cassone. 1999. High aspartyl proteinase production and vaginitis in human immunodeficiency virus-infected women. *J Clin Microbiol* 37:1376.
391. Taylor, P. R., G. D. Brown, D. M. Reid, J. A. Willment, L. Martinez-Pomares, S. Gordon, and S. Y. Wong. 2002. The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *J Immunol* 169:3876.
392. Gabrielli, E., E. Pericolini, E. Cenci, F. Ortelli, W. Magliani, T. Ciociola, F. Bistoni, S. Conti, A. Vecchiarelli, and L. Polonelli. 2009. Antibody complementarity-determining regions (CDRs): a bridge between adaptive and innate immunity. *PLoS One* 4:e8187.
393. Azuma, M. 2006. Fundamental mechanisms of host immune responses to infection. *J Periodontal Res* 41:361.
394. Dillon, R. L., D. E. White, and W. J. Muller. 2007. The phosphatidylinositol 3-kinase signaling network: implications for human breast cancer. *Oncogene* 26:1338.

395. Hawkins, P. T., K. E. Anderson, K. Davidson, and L. R. Stephens. 2006. Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells. *Biochem Soc Trans* 34:647.
396. Kawai, T., and S. Akira. 2006. TLR signaling. *Cell Death Differ* 13:816.
397. Levi, M., M. Sallberg, U. Ruden, D. Herlyn, H. Maruyama, H. Wigzell, J. Marks, and B. Wahren. 1993. A complementarity-determining region synthetic peptide acts as a miniantibody and neutralizes human immunodeficiency virus type 1 in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:4374.
398. Ramachandran, S., Y. Tseng, and Y. B. Yu. 2005. Repeated rapid shear-responsiveness of peptide hydrogels with tunable shear modulus. *Biomacromolecules* 6:1316.
399. Cotter, G., S. Doyle, and K. Kavanagh. 2000. Development of an insect model for the in vivo pathogenicity testing of yeasts. *FEMS Immunol Med Microbiol* 27:163.
400. Kavanagh, K., and E. P. Reeves. 2004. Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev* 28:101.
401. Klein, J. 1997. Homology between immune responses in vertebrates and invertebrates: does it exist? *Scand J Immunol* 46:558.
402. Ratcliffe, N. A. 1985. Invertebrate immunity--a primer for the non-specialist. *Immunol Lett* 10:253.
403. Salzet, M. 2001. Vertebrate innate immunity resembles a mosaic of invertebrate immune responses. *Trends Immunol* 22:285.
404. Kimbrell, D. A., and B. Beutler. 2001. The evolution and genetics of innate immunity. *Nat Rev Genet* 2:256.
405. Hoffmann, J. A. 1995. Innate immunity of insects. *Curr Opin Immunol* 7:4.
406. Brennan, M., D. Y. Thomas, M. Whiteway, and K. Kavanagh. 2002. Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. *FEMS Immunol Med Microbiol* 34:153.
407. Nagy, E., C. Giefing, and A. von Gabain. 2008. Anti-infective antibodies: a novel tool to prevent and treat nosocomial diseases. *Expert Rev Anti Infect Ther* 6:21.
408. Morrison, V. A. 2006. Echinocandin antifungals: review and update. *Expert Rev Anti Infect Ther* 4:325.
409. Cudic, P., and M. Stawikowski. 2008. Peptidomimetics: Fmoc solid-phase pseudopeptide synthesis. *Methods Mol Biol* 494:223.
410. Gifford, J. L., H. N. Hunter, and H. J. Vogel. 2005. Lactoferricin: a lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties. *Cell Mol Life Sci* 62:2588.
411. Chockalingam, A., D. S. Zarlenga, and D. D. Bannerman. 2007. Antimicrobial activity of bovine bactericidal permeability-increasing protein-derived peptides against gram-negative bacteria isolated from the milk of cows with clinical mastitis. *Am J Vet Res* 68:1151.
412. Mak, P. 2008. Hemocidins in a functional and structural context of human antimicrobial peptides. *Front Biosci* 13:6859.
413. Molina, J., E. Cordero, and J. Pachon. 2009. New information about the polymyxin/colistin class of antibiotics. *Expert Opin Pharmacother* 10:2811.
414. Mogi, T., and K. Kita. 2009. Gramicidin S and polymyxins: the revival of cationic cyclic peptide antibiotics. *Cell Mol Life Sci* 66:3821.
415. Smith, L., and J. Hillman. 2008. Therapeutic potential of type A (I) lantibiotics, a group of cationic peptide antibiotics. *Curr Opin Microbiol* 11:401.
416. Giezen, T. J., A. K. Mantel-Teeuwisse, S. M. Straus, H. Schellekens, H. G. Leufkens, and A. C. Egberts. 2008. Safety-related regulatory actions for biologicals approved in the United States and the European Union. *Jama* 300:1887.

Bibliografia

417. Giusti, R. M., M. H. Cohen, P. Keegan, and R. Pazdur. 2009. FDA review of a panitumumab (Vectibix) clinical trial for first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Oncologist* 14:284.
418. Lashley, F. R. 2006. Emerging infectious diseases at the beginning of the 21st century. *Online J Issues Nurs* 11:2.
419. Sipahi, O. R. 2008. Economics of antibiotic resistance. *Expert Rev Anti Infect Ther* 6:523.
420. Liu, S., S. Wu, and S. Jiang. 2007. HIV entry inhibitors targeting gp41: from polypeptides to small-molecule compounds. *Curr Pharm Des* 13:143.
421. Marr, P., and S. Walmsley. 2008. Reassessment of enfuvirtide's role in the management of HIV-1 infection. *Expert Opin Pharmacother* 9:2349.
422. Belperio, P. S., L. A. Mole, J. Halloran, D. B. Boothroyd, I. C. Thomas, and L. I. Backus. 2008. Postmarketing use of enfuvirtide in veterans: provider compliance with criteria for use, overall efficacy, and tolerability. *Ann Pharmacother* 42:1573.
423. Emerson, C. R., J. J. Post, and C. Workman. 2009. A delayed hypersensitivity reaction to enfuvirtide after rechallenge. *Int J STD AIDS* 20:288.
424. Matsuzaki, K. 2009. Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta* 1788:1687.
425. Haberkorn, U., M. Eisenhut, A. Altmann, and W. Mier. 2008. Endoradiotherapy with peptides - status and future development. *Curr Med Chem* 15:219.
426. Kaufmann, G. F., J. Park, and K. D. Janda. 2008. Bacterial quorum sensing: a new target for anti-infective immunotherapy. *Expert Opin Biol Ther* 8:719.
427. Brotz-Oesterhelt, H., and P. Sass. Postgenomic strategies in antibacterial drug discovery. *Future Microbiol* 5:1553.
428. Boguski, M. S., K. D. Mandl, and V. P. Sukhatme. 2009. Drug discovery. Repurposing with a difference. *Science* 324:1394.
429. Vooturi, S. K., and S. M. Firestine. Synthetic membrane-targeted antibiotics. *Curr Med Chem* 17:2292.
430. Wang, G., K. M. Watson, A. Peterkofsky, and R. W. Buckheit, Jr. Identification of novel human immunodeficiency virus type 1-inhibitory peptides based on the antimicrobial peptide database. *Antimicrob Agents Chemother* 54:1343.
431. Timmerman, P., R. Barderas, J. Desmet, D. Altschuh, S. Shochat, M. J. Hollestelle, J. W. Hoppener, A. Monasterio, J. I. Casal, and R. H. Melen. 2009. A combinatorial approach for the design of complementarity-determining region-derived peptidomimetics with in vitro anti-tumoral activity. *J Biol Chem* 284:34126.