



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

Dipartimento scienze della vita e
dell'ambiente

Corso di Laurea

SCIENZE BIOLOGICHE

STRATEGIE TERAPEUTICHE ALTERNATIVE CONTRO I PATOGENI RESISTENTI AGLI ANTIBIOTICI

ALTERNATIVE THERAPEUTIC STRATEGIES TO TREAT ANTIBIOTIC-RESISTANT PATHOGENS

Tesi di Laurea di:
Paola Longoni

Docente Referente:
Chiar.ma Prof.ssa
Carla Vignaroli

Sessione Estiva
Anno Accademico 2025/2026

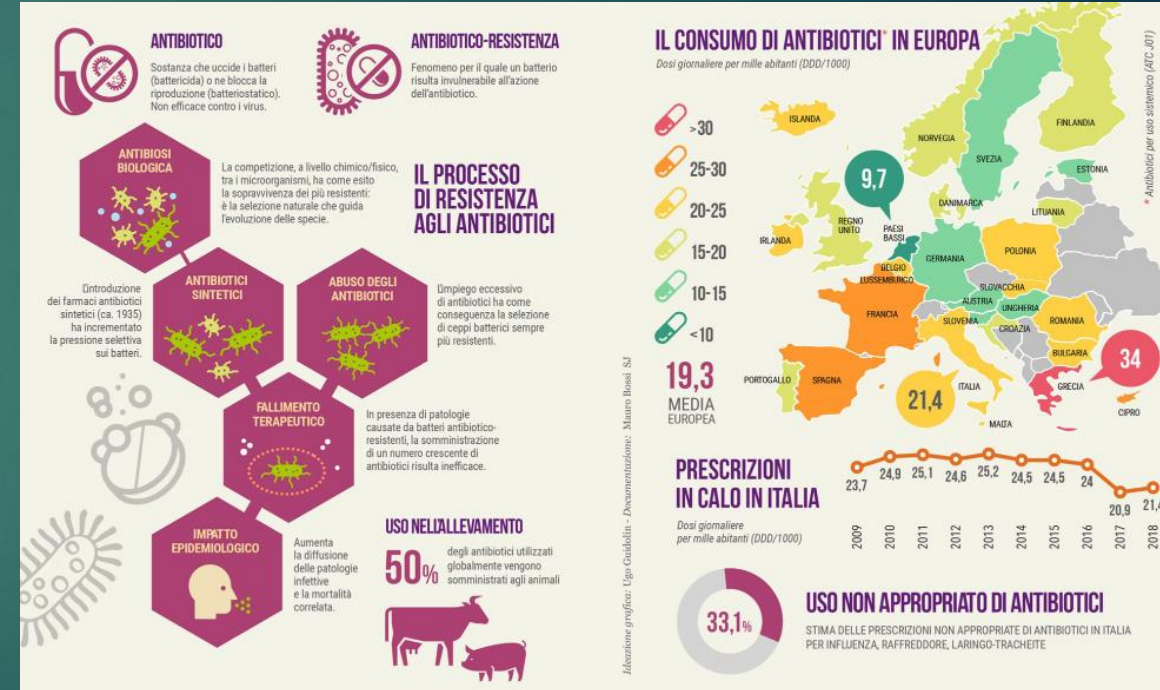
Strategie terapeutiche alternative contro i patogeni resistenti agli antibiotici

Craig R. MacNair , Steven T. Rutherford & Man-Wah Tan. **Alternative therapeutic strategies to treat antibiotic-resistant pathogens**. Nature Reviews Microbiology. Volume 22; May 2024; 262-275. <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00993-0>

Riassunto esteso

La scoperta degli antibiotici è stata una svolta nella storia della medicina: essi hanno permesso di salvare numerose vite e di svolgere procedure chirurgiche di base e terapie più complesse in sicurezza. Purtroppo, però, negli ultimi decenni stiamo assistendo a una forte diffusione della **resistenza agli antibiotici**, che minaccia di farci retrocedere all'era pre-antibiotica. Finora, lo sviluppo di nuove classi di antibiotici si è basato principalmente sulla modifica di strutture farmacologiche già esistenti, ma esse sono limitate nella loro diversità strutturale e di bersaglio e questo aumenta la loro suscettibilità alla resistenza crociata dovuta a meccanismi intrinseci e preesistenti. Questo ha portato i ricercatori a compiere ulteriori studi per sviluppare nuove strategie terapeutiche che possano contrastare il problema della resistenza.

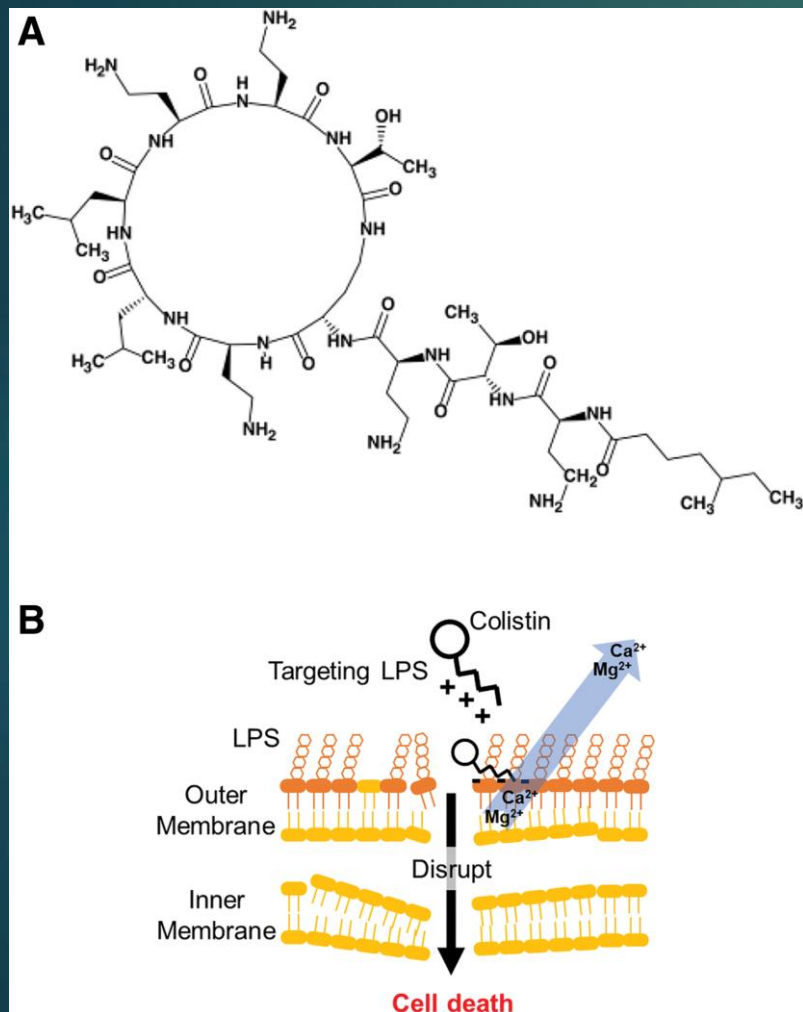
Questa Review mette in evidenza il potenziale terapeutico di peptidi antimicrobici (AMP), anticorpi antibatterici, batteriofagi e terapie basate su oligonucleotidi antisenso (ASO) e dei vantaggi e dei limiti di questi approcci. Sono invece affrontati più brevemente i consorzi batterici, le terapie antivirulenza, gli adiuvanti antibiotici e i vaccini.



<https://www.aggiornamentisociali.it/articoli/la-resistenza-agli-antibiotici/>

Peptidi antimicrobici (AMP) naturali

I peptidi antimicrobici, naturali e sintetici, sono delle piccole catene di amminoacidi, anfipatiche e cationiche, ubiquitarie e fondamentali nella risposta immunitaria innata alle infezioni.



Gli AMP naturali hanno una potente attività antibatterica, anche se molti di essi presentano un'attività litica di membrana non specifica che può colpire anche le cellule ospiti dei mammiferi, risultando così tossici. Grazie a nuovi approcci bioinformatici è possibile sviluppare analoghi con migliori profili di selettività e resistenza.

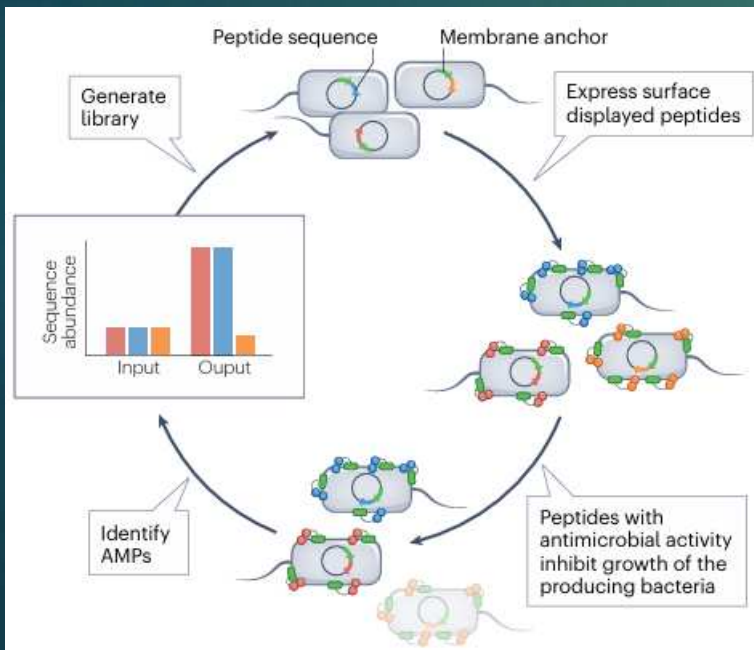
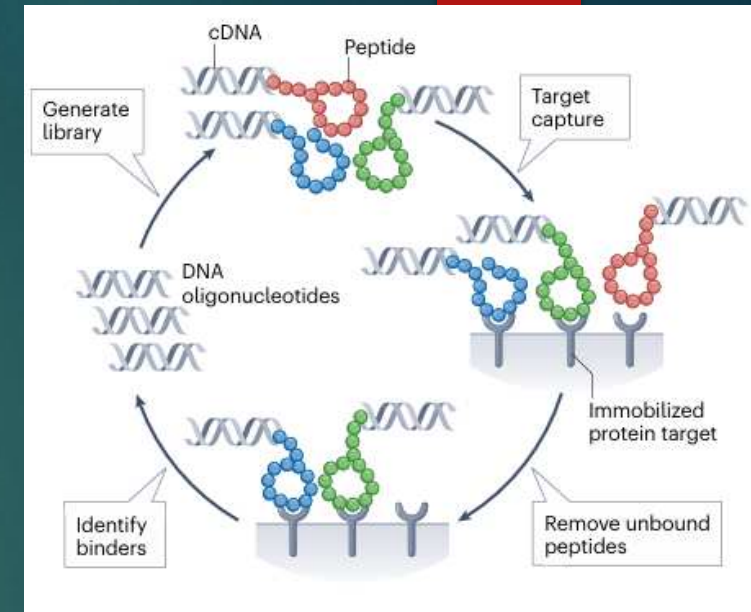
Un esempio di AMP naturale è la **colistina**, un lipodecapeptide ciclico utilizzato contro i batteri Gram-negativi multiresistenti (MDR), il cui uso è limitato da una notevole nefrotossicità e dall'emergere della resistenza alla colistina mediata da plasmidi mobili (conferita dal gene *mcr1*). Sono stati identificati due analoghi di questo AMP, ancora oggetto di studio: la **polimixina QPX9003**, con minore tossicità e la **macolacina**, in grado di colpire anche i batteri resistenti alla colistina.

Limiti: potenza, legame con il siero, sensibilità alle proteasi, tossicità, biodisponibilità e resistenza.

AMP sintetici

Essendo le combinazioni strutturali di AMP sintetici quasi infinite, vengono utilizzate delle tecnologie di screening per selezionare i migliori all'interno di librerie enormi.

La **mRNA display** è una tecnica basata sulla selezione di peptidi in grado di legarsi a un determinato bersaglio proteico: una libreria di peptidi fusi con i rispettivi cDNA viene incubata con una proteina bersaglio immobilizzata. Le sequenze dei peptidi capaci di legarsi verranno identificate e utilizzate per creare una nuova libreria, ancora più specifica, ripetendo il ciclo finché non si trova il peptide perfetto ad altissima affinità per proteine bersaglio complesse.



Il **Surface-localized antimicrobial display (SLAY)** è un approccio su cellula intera, basato sull'ancoraggio dei peptidi a una proteina di membrana che permette la sua esposizione sulla superficie: a questo scopo le cellule batteriche vengono trasformate con plasmidi contenenti una sequenza peptidica casuale, che verrà espressa fusa a una proteina transmembrana; successivamente la crescita in coltura induce l'espressione dei peptidi. Quelli ad attività antimicrobica inibiscono la crescita degli stessi batteri produttori del peptide e sequenziando prima e dopo l'induzione, è possibile identificare gli AMP.

Un AMP sintetico identificato con SLAY è **Symbah 1**, un peptide macrociclico a forcina- β che distrugge le membrane di *Acinetobacter baumannii*, senza la tipica attività emolitica degli altri AMP agenti su membrane.

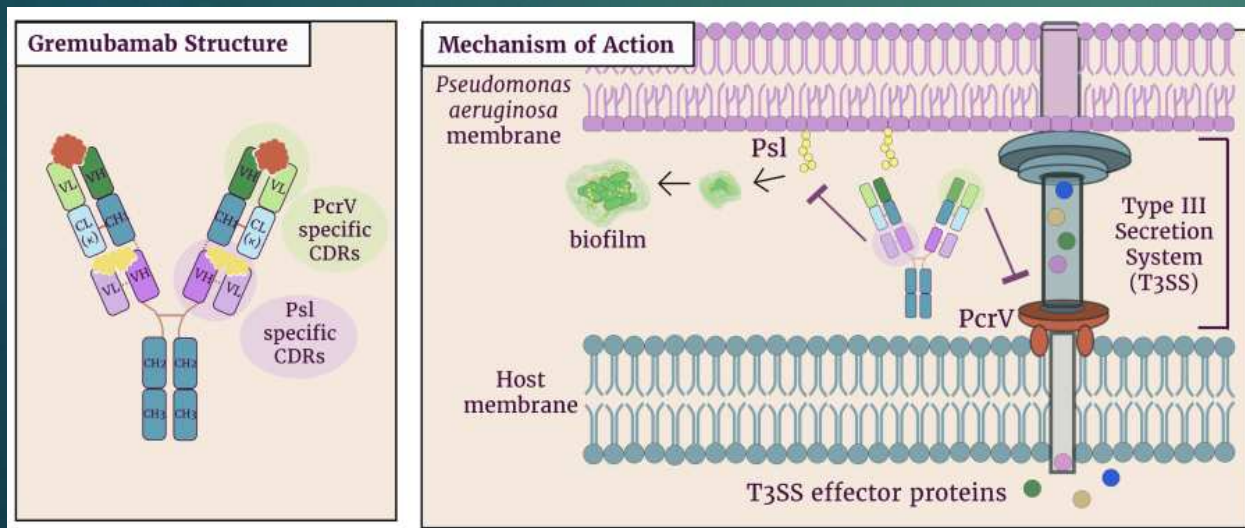
Anticorpi monoclonali antibatterici

Vantaggi: si legano agli epitopi bersaglio in modo potente e con un'ottima selettività, reclutano componenti immunitarie dell'ospite, sono sicuri e non devono attraversare l'involucro cellulare.

Svantaggi: gli mAb ad azione diretta e inibitori della crescita sono poco efficaci, perché non riescono a superare le barriere biologiche; inoltre, andranno incontro a resistenza, tramite meccanismi di occlusione o modificazione diretta del bersaglio e degradazione proteolitica dell'mAb.

Tre anticorpi, agenti sui fattori di virulenza, sono stati approvati contro i Gram-positivi:

- **raxibacumab** e **obiltoxaximab** legano e neutralizzano l'antigene protettivo di *Bacillus anthracis*;
- **bezlotoxumab** neutralizza la tossina B del *Clostridium difficile*.



Esistono anche mAb contro i Gram-negativi, come *Pseudomonas aeruginosa*, che durante l'infezione secerne il Psl, polisaccaride extracellulare coinvolto nell'adesione cellulare e nella formazione di biofilm e, grazie al sistema di secrezione di tipo III, riesce ad eludere il sistema immunitario dell'ospite:

- **gremubamab**, anticorpo bispecifico che lega simultaneamente il Psl e T3SS;
- **panobacumab**, che lega il polisaccaride O della membrana esterna.

Essi favoriscono l'eliminazione di *P. aeruginosa*, riducendo l'infezione polmonare.

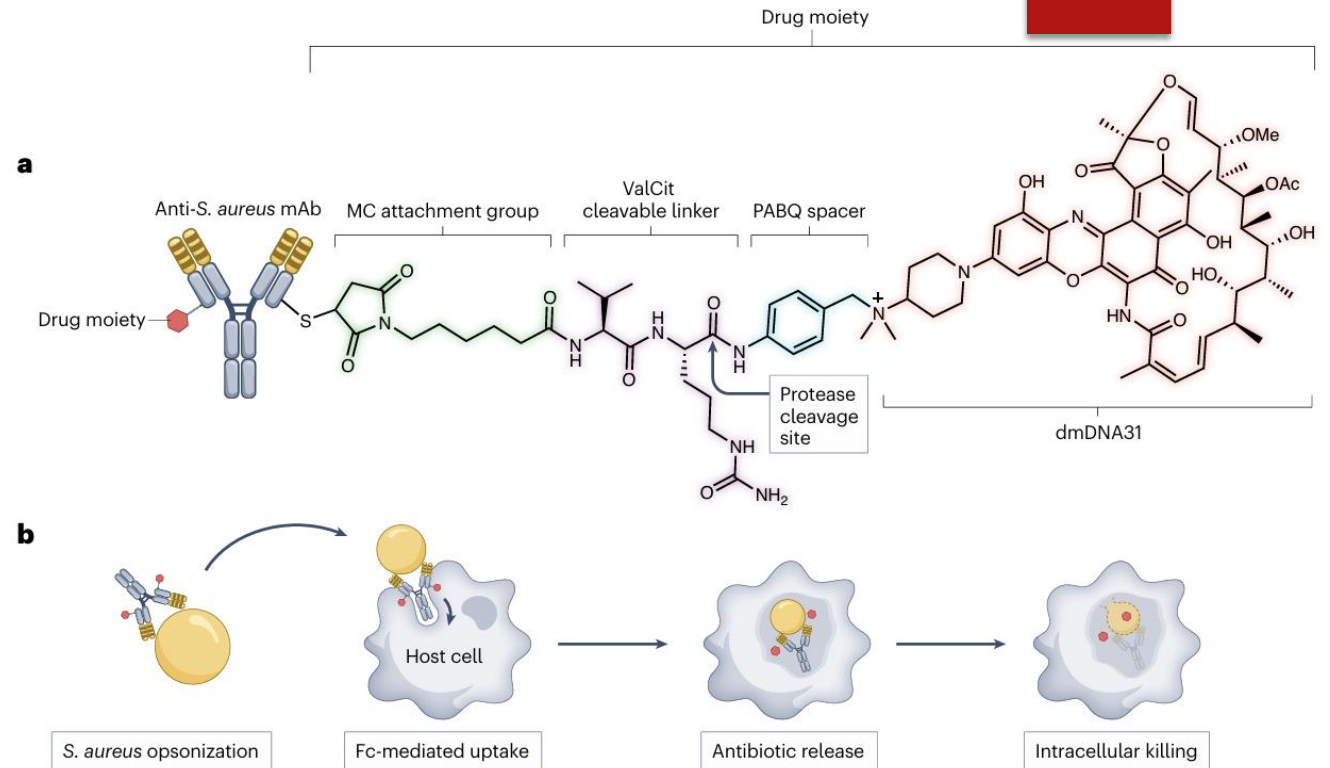
Coniugati anticorpo-antibiotico (AAC)

Un AAC molto efficace è **DSTA4637S**, formato da un anticorpo monoclonale IgG1 anti-acido teicoico coniugato a un analogo della rifampicina, dmDNA31. Il linker è formato da tre componenti:

- maleimmide e acido caproico (esanoico) (MC) legati all'anticorpo;
- un dipeptide linker valina-citrullina (Val-Cit) scindibile da proteasi;
- uno spacer autoeliminante di sale di ammonio quaternario p-amminobenzilico (PABQ), che lega l'antibiotico.

Vantaggi: migliora la farmacocinetica di un antibiotico, limita la tossicità, permette di eseguire terapie a lungo termine, può rendere specifico un antibiotico ad ampio spettro.

Ostacoli: scoperta di un anticorpo che si leghi a un epitopo accessibile e conservato in tutte le specie batteriche, sviluppo di resistenza.



Esso si lega allo *S. aureus* extracellulare circolante, viene internalizzato dai fagociti o da altre cellule dell'ospite e una volta entrato nei fagolisosomi, l'ambiente acido e le proteasi lisosomiali scindono il linker, a livello del legame amidico all'estremità C-terminale della citrullina, che rilascia il dmDNA31 attivo dopo l'eliminazione del PABQ.

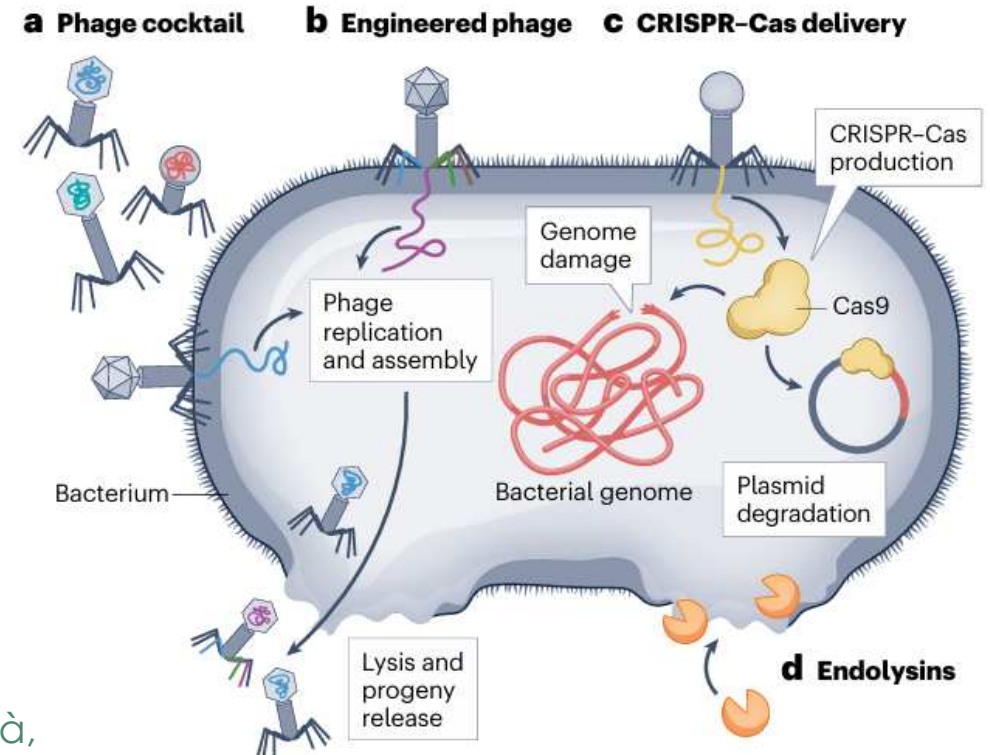
Terapie basate sui batteriofagi

La terapia fagica si basa sulla capacità dei fagi di uccidere i batteri: essi iniettano il loro materiale genetico e prendono il controllo del DNA batterico e del macchinario di sintesi proteica; e, nel caso dei fagi litici, si avrà l'assemblaggio di nuove particelle fagiche e la lisi del batterio.

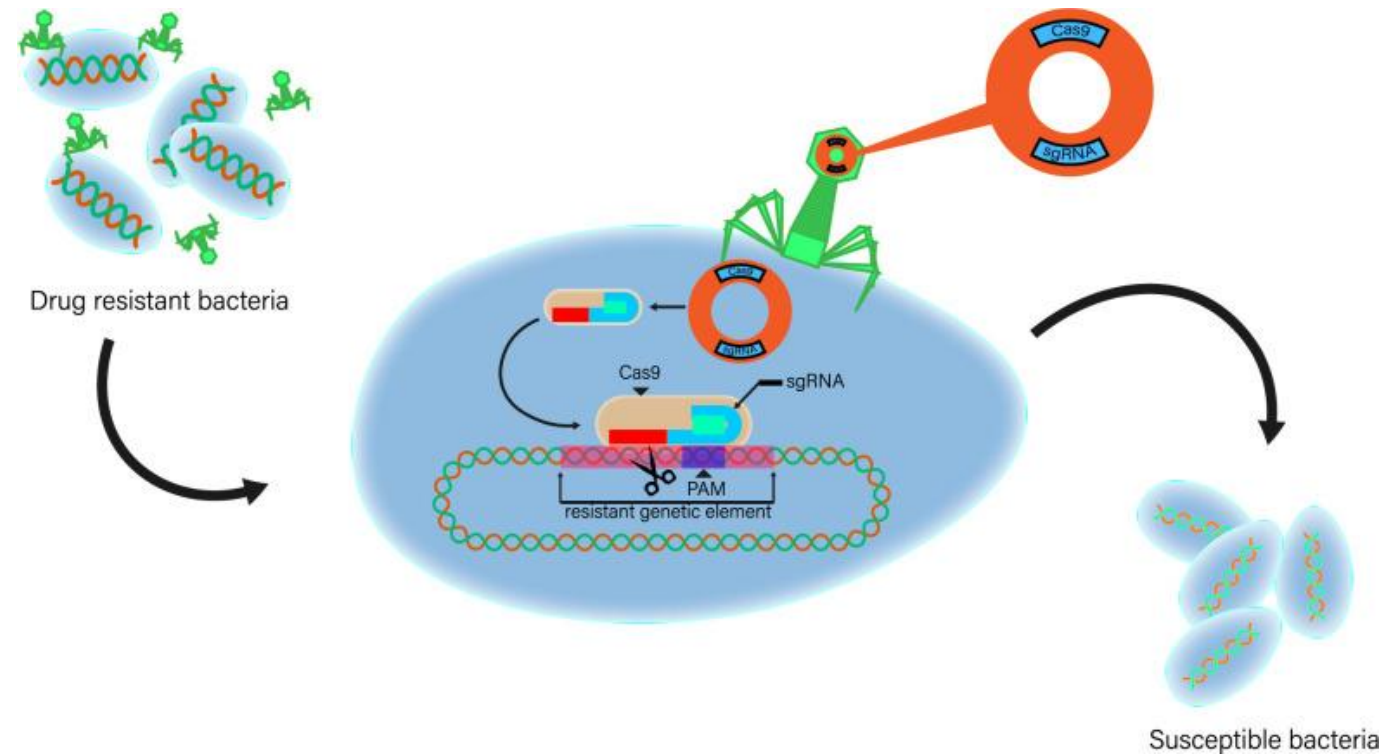
Esistono diverse terapie basate sui batteriofagi:

- **Cocktail di fagi:** si usano miscele di fagi per ampliare la gamma di ospiti e ridurre lo sviluppo di resistenza; è stata efficace nel trattamento di pazienti affetti da fibrosi cistica con infezioni da *Mycobacterium abscessus*, portando all'eliminazione del ceppo antibiotico-resistente, insensibile alle terapie tradizionali.
- **Fagi ingegnerizzati:** un approccio ha identificato e mutato regioni codificanti una fibra della coda del fago T3 responsabili del legame con la superficie batterica; l'infezione da fago T3 di batteri contenenti plasmidi che esprimono queste fibre mutate, ha portato alla produzione di progenie fagica con una più ampia gamma di ospiti.

Limiti: gamma ristretta di ospiti, sviluppo di resistenza, immunogenicità, aumento di trasferimento genico orizzontale, concentrazione dei fagi nel sito di infezione, determinazione del dosaggio e difficoltà di produzione.



- **Fagi vettori di CRISPR-Cas:** utilizzando fagi che esprimono anti-CRISPR, piccole proteine che neutralizzano questo sistema, o ingegnerizzando fagi non replicanti come vettori di sistemi CRISPR-Cas programmati (es. gene *cas9*) è possibile eludere questo meccanismo di difesa dei batteri, colpendo regioni essenziali del genoma batterico determinando la morte cellulare, oppure colpendo geni noti di resistenza agli antibiotici, in modo da inattivarli e rendere il batterio nuovamente sensibile a quel determinato antibiotico.
- **Endolisine:** permettono la rottura della parete cellulare e la lisi batterica; nei Gram-negativi si usano insieme a composti alteranti la membrana esterna. Si sfrutta il potenziale antibatterico di enzimi fagici, aggirando contemporaneamente alcune delle limitazioni associate alle terapie fagiche.



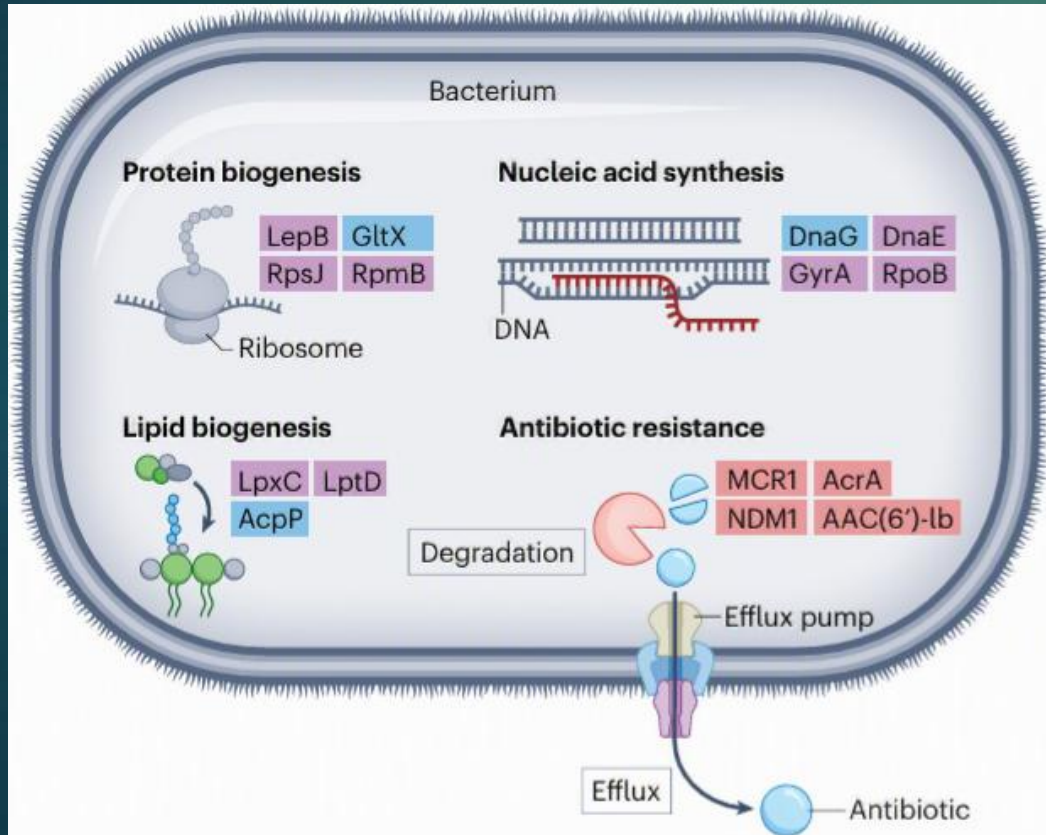
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37662004/>

Terapie basate su oligomeri antisense

Queste terapie utilizzano oligomeri di acidi nucleici a singolo filamento che legano sequenze di mRNA complementari, inibendo la traduzione e promuovendo la degradazione.

Per superare il problema dello scarso assorbimento cellulare, vengono usati i **coniugati CPP-ASO**, che ne facilitano il trasporto.

Limiti: bassa selettività, sviluppo di resistenza e tossicità.



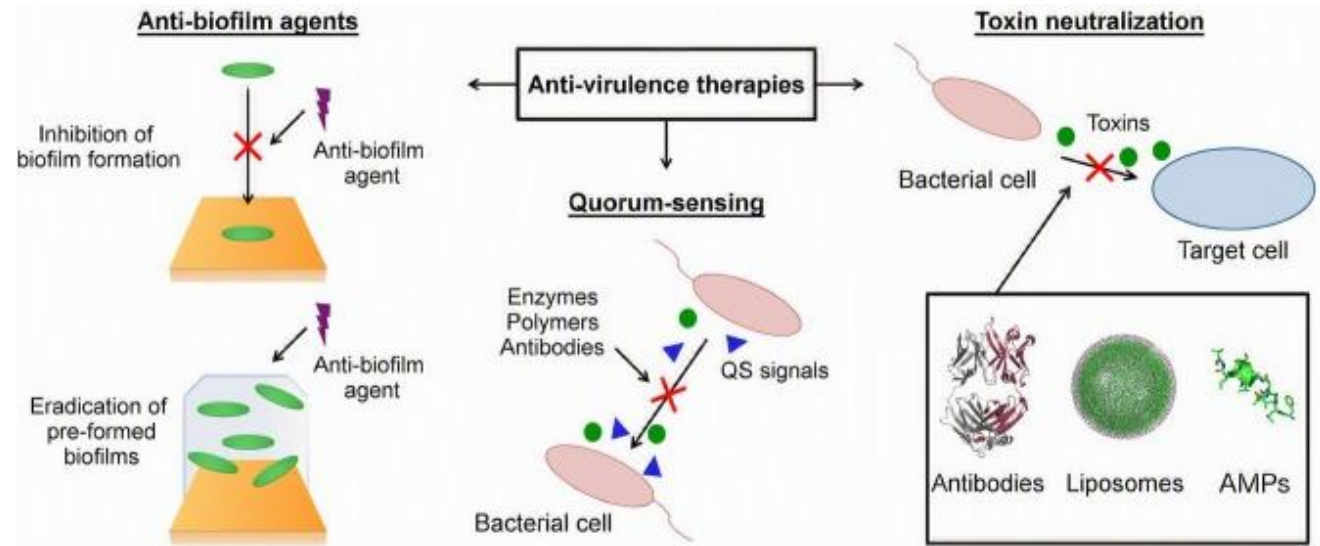
Gli ASO agiscono su processi suscettibili all'inibizione degli antibiotici tradizionali (biogenesi proteica e lipidica, sintesi di acidi nucleici, RNA polimerasi). Inoltre, essendo complementari alla regione di inizio della traduzione del gene di interesse, si possono progettare oligomeri sia ad ampio spettro che a spettro ristretto.

Gli ASO possono anche colpire geni di resistenza, ripristinando la sensibilità del batterio oppure gli elementi associati alla resistenza intrinseca, come quelli codificanti le pompe di efflusso.

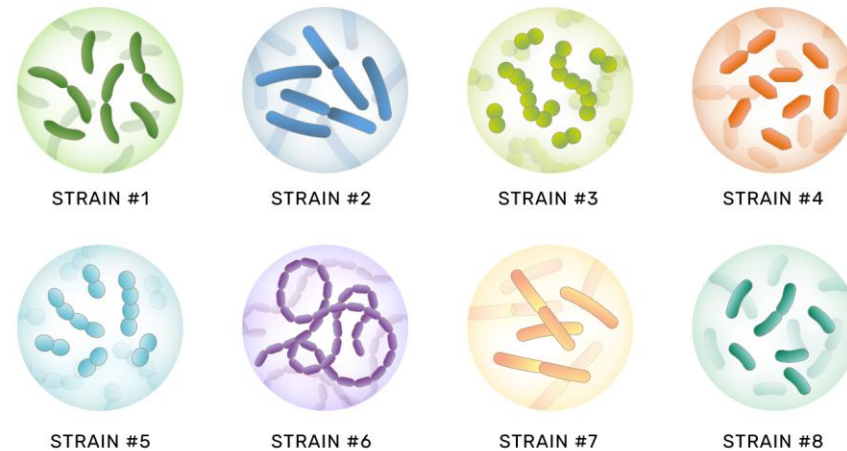
Ambiti di miglioramento: ampliamento dello spettro d'azione, design ottimali dei CPP per evitare lo sviluppo di resistenza.

Ulteriori approcci contro i patogeni resistenti agli antibiotici

- **Terapie antivirulenza:** inibiscono i fattori di virulenza batterici, senza uccidere i batteri. Esempio: bezlotoxumab neutralizza le tossine di *Clostridioides difficile*.
- **Aiuvanti antibiotici:** molecole prive di attività antimicrobica, che sensibilizzano i batteri a un antibiotico altrimenti inefficace. Esempi: vaborbactam inibisce le β -lattamasi; SPR741 altera integrità di membrana.
- **Consorti batterici:** usano batteri commensali per ripristinare la diversità microbica e prevenire la disbiosi, in cui i patogeni prendono il sopravvento. Esempio: VE303 comprende 8 ceppi di *Clostridium* per il trattamento di *C. difficile*.
- **Vaccini:** sfruttano batteri inattivati, batteri vivi attenuati o antigeni batterici per stimolare il sistema immunitario dell'ospite. Esempio: PCV20, formato da polisaccaridi che generano immunità allo *Streptococcus pneumoniae*.



<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6454102/>



<https://www.vedantabio.com/pipeline-programs/ve303/>

Conclusioni

Per sfruttare appieno il potenziale di questi antimicrobici alternativi è necessario aumentare le nostre conoscenze sulle proprietà della membrana esterna e sull'efflusso dei farmaci, in quanto due degli ostacoli principali sono proprio la penetrazione e l'accumulo intracellulare dei composti. A differenza degli antibiotici tradizionali, che presentano attività ad ampio spettro, molte delle strategie trattate in questa Review hanno uno spettro d'azione ristretto: questo potrebbe sia rappresentare un limite che essere vantaggioso perché ridurrebbe il danno al microbiota dell'ospite durante il trattamento. Nonostante i notevoli progressi recenti, pochi antimicrobici alternativi sono giunti alla fase di sperimentazione clinica e molte tecniche e composti promettenti in fase iniziale non sono mai stati approfonditi oltre la scoperta iniziale. Per far progredire queste sperimentazioni, sono necessari ulteriori studi sull'efficacia di queste molecole contro isolati batterici clinici e sulla sensibilità batterica di ceppi dotati di meccanismi di resistenza preesistenti, così come studi sui tassi di resistenza spontanea, e di tossicità.

L'implementazione clinica degli approcci affrontati in questa Review inizierà probabilmente con l'introduzione di terapie simili agli antibiotici attuali, in modo da minimizzare i rischi. La terapia fagica potrebbe richiedere più tempo e impegno, in quanto deve prima superare alcuni ostacoli, come la progettazione degli studi clinici, il dosaggio, la produzione e la conservazione. Anche gli altri approcci, come gli adiuvanti antibiotici, le terapie antivirulenza, i consorzi microbici e i vaccini, sono promettenti e saranno importanti per il contenimento della resistenza. In particolare, la vaccinazione si è già affermata in ambito clinico: riducendo il numero di casi di malattie infettive diminuisce l'uso di antibiotici e l'emergere della resistenza.

Grazie a tecnologie avanzate come la *biologia di sintesi*, il sequenziamento di nuova generazione e il calcolo computazionale, gli scienziati possono esplorare nuove aree chimico-fisiche e questo permetterà di generare nuove molecole e modificare le strutture già esistenti per potenziarle e scoprire nuovi antimicrobici, utili a contrastare i meccanismi di resistenza agli antibiotici dei batteri.



<https://marcocurrenti.com/it/tag/resistenza-agli-antibiotici/>

Grazie per l'attenzione!