

# INDICE

|  |    |
|--|----|
| 1. Introduzione.....   | 4  |
| 1.1. Proprietà e biosintesi degli AMP.....                                   | 5  |
| 1.2. Classificazione degli AMP .....   | 9  |
| 1.2.1. Classificazione degli AMP basata su fonti.....                        | 9  |
| 1.2.1.1. Peptidi antimicrobici derivanti dai mammiferi.....                  | 10 |
| 1.2.1.2. Peptidi antimicrobici derivati dagli anfibi.....                    | 12 |
| 1.2.1.3. Peptidi antimicrobici derivanti dalle piante.....                   | 13 |
| 1.2.1.4. Peptidi antimicrobici derivati dagli insetti.....                   | 14 |
| 1.2.1.5. Peptidi antimicrobici derivati da microrganismi.....                | 15 |
| 1.2.2. Classificazione basata sull'attività.....                             | 17 |
| 1.2.2.1. Peptidi antibatterici.....  | 18 |
| 1.2.2.2. Peptidi antifungini.....  | 18 |
| 1.2.2.3. Peptidi antivirali.....   | 18 |
| 1.2.2.4. Peptidi antiparassitari.....  | 20 |
| 1.2.2.5. Peptidi antitumorali.....   | 21 |
| 1.2.3. Classificazione degli AMP basata su specie ricche di amminoacidi..... | 22 |
| 1.2.3.1. Peptidi ricchi di prolina (PrAMPs).....                             | 22 |
| 1.2.3.2. Peptidi antimicrobici ricchi di triptofano e arginina.....          | 22 |
| 1.2.3.3. Peptidi ricchi di istidina.....                                     | 23 |
| 1.2.3.4. Peptidi antimicrobici ricchi di glicina.....                        | 23 |
| 1.2.4. Classificazione basata sulle strutture peptidiche .....               | 23 |
| 1.3. Approfondimenti sui meccanismi d'azione di AMP.....                     | 24 |
| 1.3.1. Meccanismo di targeting della membrana.....                           | 24 |
| 1.3.1.1. Il modello dei pori toroidali.....                                  | 25 |
| 1.3.1.2. Il modello Barrel-Stave.....  | 25 |
| 1.3.1.3. Il modello carpet-like.....   | 26 |
| 1.3.2. Meccanismo di targeting non di membrana.....                          | 28 |
| 1.3.2.1. Inibizione della biosintesi proteica.....                           | 28 |
| 1.3.2.2. Inibizione della biosintesi degli acidi nucleici.....               | 29 |
| 1.3.2.3. Inibizione dell'attività della proteasi.....                        | 29 |
| 1.3.2.3.1. Inibizione della divisione cellulare.....                         | 29 |

|            |  |    |
|------------|--|----|
| 1.4.       | Metodi di progettazione dei peptidi antimicrobici .....  | 30 |
| 1.4.1.     | Mutazione diretta al sito.....   | 31 |
| 1.4.2.     | Peptidi di progettazione de novo.....  | 31 |
| 1.4.3.     | Metodo di progettazione basato su template.....  | 32 |
| 1.4.4.     | metodo di progettazione basato sull'autoassemblaggio di AMP.....   | 32 |
| 1.4.5.     | Modificazione chimica.....   | 32 |
| 1.4.6.     | Uso di motivi.....   | 33 |
| 1.4.6.1.   | Motivi a fine catena.....  | 33 |
| 1.4.6.1.1. | Motivo ATCUN.....  | 33 |
| 1.4.6.1.2. | Rana Box.....  | 33 |
| 1.4.6.2.   | Sintesi di peptidi polivalenti basati su motivi (dimeri, tetrameri, ecc.)...34                                 |    |
| 1.4.7.     | Progettazione informatica.....   | 34 |
| 1.4.8.     | Progettazione razionale della biblioteca.....  | 35 |
| 1.5.       | I peptidi antimicrobici: armi innate contro malattie.....  | 35 |
| 1.5.1.     | Coinvolgimento degli AMP nelle malattie dell'apparato respiratorio.....  | 36 |
| 1.5.2.     | AMP nella guarigione di ferite e infezioni cutanee.....  | 37 |
| 1.5.3.     | Peptidi inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensina I (ACE).....                                    | 38 |
| 1.5.4.     | Peptidi inibitori della lipasi pancreatica.....  | 39 |
| 1.5.5.     | Peptidi con attività antiossidante .....   | 40 |
| 1.5.6.     | AMP nell'infezione e infiammazione intestinale .....   | 41 |
| 1.6.       | Farmacocinetica e farmacodinamica (PK/PD): approccio nella valutazione delle applicazioni cliniche di AMP..... | 42 |
| 1.6.1.     | Approccio PK/PD per determinare l'efficacia antibatterica di AMP.....  | 42 |
| 1.6.2.     | Approccio PK/PD per determinare l'efficacia di AMP in malattie non batteriche                                  | 43 |
| 1.7.       | Fattori ambientali che influiscono sull'attività degli AMP .....   | 44 |
| 1.7.1.     | Ioni metallici .....   | 44 |
| 1.7.2.     | pH.....  | 45 |
| 1.7.3.     | proteasi .....   | 46 |
| 1.8.       | sviluppo di farmaci e approcci di formulazione per applicazioni di AMP .....                                   | 46 |
| 1.8.1.     | Produzione e costi – studio pilota vs. piccola scala industriale .....   | 46 |
| 1.8.2.     | Forme di dosaggio di AMP .....   | 47 |
| 1.8.3.     | Sistemi di consegna .....  | 48 |

|          |  |    |
|----------|--|----|
| 1.8.3.1. | Idrogel – panoramica e sviluppo della piattaforma per la somministrazione cutanea e sub-dermica di AMP ..... | 48 |
| 1.8.3.2. | Sistema di consegna del Cubosoma .....   | 51 |
| 1.8.3.3. | Altri sistemi di somministrazione di farmaci .....   | 52 |
| 1.8.4.   | Vie di somministrazione .....  | 54 |
| 1.9.     | Progressi attuali e applicazioni dei peptidi antimicrobici .....   | 55 |
| 1.9.1.   | Medicina .....   | 55 |
| 1.9.2.   | Alimenti .....   | 57 |
| 1.9.3.   | Zootecnia e acquacoltura.....  | 58 |
| 1.9.4.   | Agricoltura .....  | 59 |
| 2.       | Materiali e metodi.....  | 60 |
| 2.1.     | Peptidi antimicrobici .....  | 60 |
| 2.2.     | Caratterizzazione dei ceppi batterici.....   | 60 |
| 2.3.     | Concentrazione minima inibitrice (MIC).....  | 62 |
| 2.4.     | Attività antimicrobica AMP mediante studi time-kill tempo-dipendente .....                                   | 63 |
| 2.5.     | Analisi statistica.....  | 63 |
| 3.       | RISULTATI .....  | 64 |
| 3.1.     | MIC Determinazione degli AMP .....   | 64 |
| 3.2.     | Attività antimicrobica degli AMP mediante studi time-kill tempo-dipendente...65                              |    |
| 3.3.     | Attività degli AMP selezionati contro gli isolati di MRSA.....   | 68 |
| 4.       | DISCUSSIONE.....   | 69 |
| 5.       | CONCLUSIONE .....  | 72 |
| 6.       | RIFERIMENTI .....  | 73 |

# 1. INTRODUZIONE

Oggi è disponibile un'ampia varietà di agenti antimicrobici, ampiamente applicati per trattare diversi tipi di infezioni umane. Nello specifico, gli antibiotici sono potenti farmaci utilizzati per il trattamento dei batteri patogeni (1). Tuttavia, il loro utilizzo indiscriminato e prolungato, soprattutto nei Paesi in via di sviluppo, sia in medicina umana che veterinaria, nonché in agricoltura, ha contribuito allo sviluppo e alla diffusione di microrganismi farmacoresistenti (Huan et al., 2020). Come ampiamente annunciato dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), l'allarmante aumento a livello globale della resistenza agli antimicrobici convenzionali rappresenta un potenziale e grave rischio per la salute pubblica. Pertanto, il problema della resistenza agli antibiotici ha reso urgente la ricerca di alternative agli antibiotici convenzionali, con nuove modalità di azione e meno predisposte alla resistenza batterica. Nella ricerca di nuovi antibiotici, i peptidi antimicrobici (AMP), noti anche come peptidi di difesa dell'ospite, hanno recentemente suscitato grande interesse (Haney et al., 2019; Bhattacharjya e Straus, 2020; Mahlapuu et al., 2020). La ricerca attuale si concentra su questi composti naturali come farmaci antinfettivi innovativi e nuovi candidati immunomodulatori (Luong et al., 2020; Mahlapuu et al., 2020).

Gli AMP sono piccole proteine bioattive, prodotte naturalmente da tutti gli organismi viventi come componenti importanti e indispensabili del loro sistema immunitario innato, diventando la difesa di prima linea contro gli attacchi microbici negli eucarioti, o prodotte come strategia di competizione nei procarioti, per limitare la crescita di altri microrganismi (Lei et al., 2019; Magana et al., 2020). Gli AMP naturali hanno un'attività potente e ad ampio spettro contro molteplici classi di batteri, lieviti, funghi, virus e parassiti (Huan et al., 2020; Luong et al., 2020), mostrando proprietà batteriostatiche, microbicide e citolitiche (Pasupuleti et al., 2012). Inoltre, l'interesse per gli AMP è recentemente aumentato durante la pandemia da coronavirus 2 (SARS-CoV 2) alla ricerca di nuove molecole antivirali per contrastare la malattia COVID-19 (Kurpe et al., 2020).

Gli AMP furono scoperti nel 1939, quando il microbiologo René Dubos ha isolato da un ceppo di *Bacillus* del suolo, un agente antimicrobico, denominato gramicidina, che ha dimostrato di proteggere i topi dall'infezione da pneumococco (Van Epps, 2006). Successivamente sono stati scoperti diversi AMP sia del regno procariotico che

eucariotico (Boparai e Sharma, 2020), tra cui la tirocidina, prodotta dal batterio *Bacillus brevis*, con attività contro i batteri, e la purotionina, identificata nella pianta *Triticum aestivum*, attiva contro funghi e batteri (Ohtani et al., 1977). Il primo AMP di origine animale descritto è la defensina, che è stata isolata da leucociti di coniglio (Hirsch, 1956); successivamente la lattoferrina è stata identificata nel latte vaccino (Groves et al., 1965) ed è stato dimostrato che i lisosomi dei leucociti umani (Zeya e Spitznagel, 1966) e il tratto riproduttivo femminile umano contengono AMP a basso peso molecolare (Sharma et al., 2011). Ad oggi, sono stati scoperti, caratterizzati e annotati più di 3.000 AMP nel database AMP (APD3) (Huan et al., 2020), considerando che la sola pelle di rana è un serbatoio di oltre 300 AMP diversi (Boparai e Sharma, 2020).

### 1.1. PROPRIETÀ E BIOSINTESI DELL'AMP GLI AMP NATURALI

Gli AMP naturali sono molecole codificate da geni conservati nell'evoluzione con diversità strutturale e funzionale, che è responsabile della loro vasta gamma di attività contro diversi agenti patogeni in vari organismi (Zhang e Gallo, 2016).

Tuttavia, pur presentando una notevole diversità nelle loro proprietà fisico-chimiche e strutturali, nelle origini e nei meccanismi d'azione, gli AMP condividono alcune caratteristiche comuni (Moravej et al., 2018). Si tratta infatti per lo più di molecole corte (<100 aminoacidi) (Pasupuleti et al., 2012), tipicamente con una carica netta positiva (generalmente compresa tra +2 e +11) e una notevole proporzione di residui idrofobici (tipicamente 50%) (Haney et al., 2017). Presentano una struttura anfipatica, poiché contengono sia regioni idrofobiche che idrofile, che consentono loro di essere solubili in ambienti acquosi (Boparai e Sharma, 2020). Una classe di AMP meno comune è rappresentata dagli AMP anionici, che hanno una carica netta negativa compresa tra -1 e -7 e sono stati identificati in vertebrati, invertebrati e piante (Harris et al., 2009). Includono molti residui di acido aspartico e glutammico caricati negativamente e negli animali si trovano in vari organi vitali, tra cui il cervello, l'epidermide, i tratti respiratorio e gastrointestinale (Lakshmaiah Narayana e Chen, 2015). Presentano un meccanismo d'azione diverso rispetto a quelli cationici. Per facilitare la loro interazione con l'organismo bersaglio, alcuni AMP anionici utilizzano ioni metallici per formare ponti salini cationici con costituenti caricati negativamente delle membrane microbiche, consentendo la loro penetrazione nella cellula. Quando raggiungono il citoplasma,

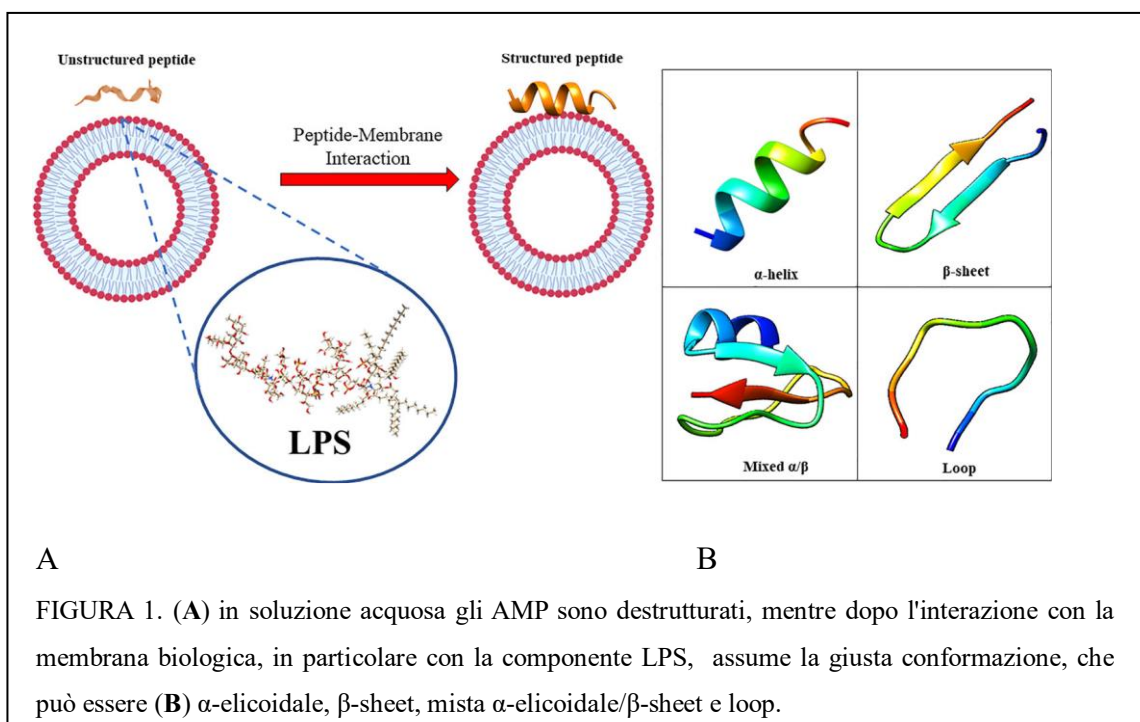
possono attaccarsi ai ribosomi o inibire l'attività della ribonucleasi (Jeżowska-Bojczuk e Stokowa-Sołtys, 2018). Alcuni anionici AMP, come la therosmina da *Theromyzon tessulatum* (Tasiemski et al., 2004), richiedono lo zinco come cofattore funzionale e si è riscontrato che il complesso con lo zinco ha più forte attività antimicrobica (Jiang et al., 2014).

Nonostante la loro relativa somiglianza nelle caratteristiche biofisiche, le sequenze di AMP sono raramente simili tra persone strettamente correlate o specie/organismi distinti (Pasupuleti et al., 2012). Tuttavia, per alcuni AMP, un certo grado di identità si trova nel file pro-regione (la sequenza inattiva che viene eliminata dal processo di modifiche post-traduzionali) o nei pattern di aminoacidi.

La natura anfifilica della maggior parte degli AMP lo è responsabili della loro flessibilità strutturale. Gli AMP sono comunemente classificati in quattro categorie in base alla loro struttura secondaria, inclusi peptidi lineari ad  $\alpha$ -elica, peptidi a foglio  $\beta$  con presenza di 2 o più legami disolfuro,  $\beta$ -forcina o loop peptidici con la presenza di un singolo legame disolfuro e/o ciclizzazione di catena peptidica e, infine, strutture estese (Boparai e Sharma, 2020). La maggior parte degli AMP appartengono alle prime due categorie elicoidale. I peptidi ad  $\alpha$ -elica mostrano una conformazione non strutturata in soluzione acquosa ma adotta una struttura elicoidale anfipatica contatto con le membrane biologiche. Tuttavia, una caratteristica rilevante è legata alle possibili interazioni con strutture batteriche, come i lipopolisaccaridi (LPS), che provocano cambiamenti conformazionali, influenzando la permeabilizzazione della membrana e il corretto passaggio nel citosol. In effetti, questa interazione potrebbe cambiare la struttura terziaria dell'AMP e le molecole di AMP potrebbero assumere diverse conformazioni, come quella elicoidale monomeriche o quella elicoidale ad elica (**Fig. 1**) (Bhunia et al., 2011).

Ad esempio, il contatto con LPS induce l'oligomerizzazione del AMP specifici, come le temporine, attraverso l'interazione tra residui terminali idrofobici N e C, impedendone il corretto movimento attraverso la membrana e l'azione antimicrobica corretta (Bhunia et al., 2011). Una particolare composizione di aminoacidi potrebbe prevenire questa oligomerizzazione, migliorando l'attività della temporina. È il caso della temporina-1T1, ricca di residui aromatici con due amminoacidi caricati positivamente (Bhunia et al., 2011). La sinergia della temporina-1T1 con le altre temporine (Temporina A e

Temporina B), ne impedisce l'oligomerizzazione e ne facilita il corretto attraversamento della membrana batterica (Bhunia et al., 2011). Un altro esempio di modificazione delle informazioni dopo l'interazione con LPS sono le strutture a  $\beta$ -forcina della Tachiplesina I, che diventa piú ordinata e compatta quando interagiscono con LPS (Saravanan et al., 2012; Kushibiki et al., 2014). Un altro esempio interessante è legato all'LL-37AMP umano, uno dei peptidi meglio studiati di questo gruppo, presente nei neutrofili e nelle cellule epiteliali (Mahlapuu et al., 2016). È stato dimostrato che le interazioni tra composti aromatici stabilizza la struttura delle proteine in correlazione con i lipidi (Li et al., 2006) e che LL-37 potrebbe subire un riorientamento a seconda della concentrazione, suggerendo anche in questo caso un processo di oligomerizzazione (Dinget al., 2013). Al contrario, i peptidi  $\beta$ -sheet sono piú ordinati in soluzione acquosa a causa della loro rigidità struttura e non subiscono cambiamenti conformazionali radicali come i peptidi elicoidali nell'interazione con la membrana (Mahlapuu et al., 2016). Non è semplice chiarire le conformazioni strutturali di AMP  $\beta$ -sheet nelle membrane, a causa della potenziale aggregazione micellare; infatti, un recente rapporto sul peptide tanatina, isolato dall'insetto *Podisus maculiventris*, ha mostrato dimerizzazione delle strutture  $\beta$ -sheet (Sinha et al., 2017). Queste strutture dimeriche potrebbero facilitare il legame con le molecole di LPS, anche alle estremità distali, favorendo associazioni di cellule batteriche e agglutinazione (Sinha et al., 2017).



Oltre al principio che la sequenza aminoacidica determina la funzione di un peptide, si è scoperto che la composizione aminoacidica (in termini di abbondanza di residui con specifiche proprietà fisico-chimiche) influisce anche sull'attività AMP come chiaramente documentato per la nuova classe di AMP cationici noti come “peptidi antimicrobici cationici intrinsecamente disordinati” o “CIDAMP” poiché sono caratterizzati da una struttura intrinsecamente disordinata. I CIDAMP sono stati rilevati nella pelle umana e in altri organi barriera (Gerstel et al., 2018; Latendorf et al., 2019) e, portando una carica positiva netta, hanno una bassa percentuale di aminoacidi che promuovono l'ordine (per lo più residui idrofobici comunemente situati all'interno del core idrofobico di proteine pieghevoli) e un'alta percentuale di amminoacidi che promuovono il disordine (per lo più carichi e residui polari, tipicamente presenti sulla superficie delle proteine pieghevoli). Questi mostrare attività microbica contro diversi microbi, inclusi la *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (Gerstel et al., 2018). La proteina hornerina, espressa nell'epitelio cornificato, sembra essere la principale fonte di CIDAMP, che agiscono come disinfettanti, aiutando a mantenere la superficie della pelle sana priva di infezioni (Gerstel et al., 2018).

La biosintesi dell'AMP può avvenire in tre modi diversi: sintesi ribosomiale classica, sintesi non ribosomiale e digestione proteolitica delle proteine (Buda De Cesare et al., 2020).

Gli AMP di sintesi ribosomiale, come le istatine e le  $\beta$ -defensine umane sono prodotte dalla traduzione ribosomiale di specifici mRNA nelle sequenze di aminoacidi biologicamente attive nei vertebrati, insetti, piante e batteri. I peptidi di sintesi non ribosomiale sono prodotti da grandi enzimi noti come sintetasi peptidiche non ribosomiali, che incorporano gli amminoacidi non-proteinogenici nella sequenza e si trovano in funghi e batteri filamentosi (attinomiceti e bacilli).

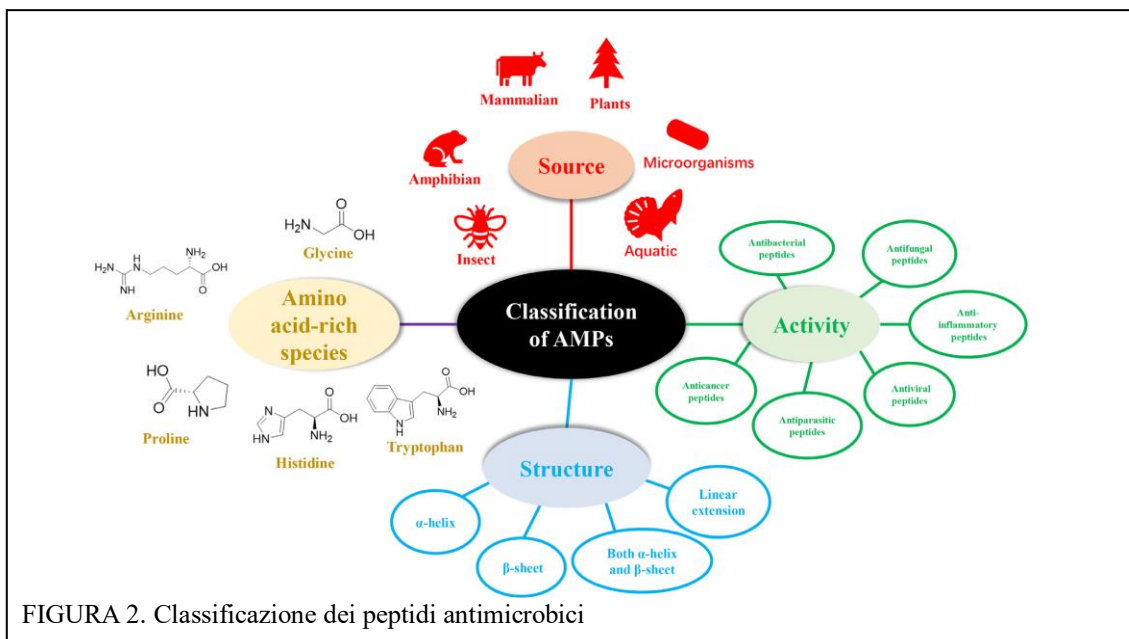
Infine, vengono generati alcuni AMP, chiamati peptidi criptici, dalla scissione proteolitica di proteine più grandi con altre funzioni. Per esempio, l'istone H2A del rospo asiatico (*Duttaphrynus melanostictus*) viene elaborato dall'attività enzimatica della pepsina C, producendo buforina I, che a sua volta viene processata dalle endopeptidasi per generare buforina II (Buda De Cesare et al., 2020). È interessante notare che molti AMP vengono prodotti come precursori inattivi e sono attivi dopo la



scissione proteolitica. Perciò, la loro attività non dipende solo dalla loro stessa espressione ma anche dalla presenza di proteasi appropriate (Mahlapuu et al.,2016). L'espressione degli AMP può essere costitutiva o inducibile da specifici fattori esterni (Mahlapuu et al., 2016; Lei et al.,2019). Alcuni AMP sono espressi durante tutto il ciclo cellulare ma sono immagazzinati ad alta concentrazione come precursori granuli e vengono rilasciati in caso di infezione nel sito di infezione o infiammazione (Mahlapuu et al., 2016). P9A e P9B lo sono esempi di peptidi inducibili, la cui espressione può essere indotta nell'emolinfa del Silkmoth (*Bombyx mori*) da vaccinazione con *Enterobacter cloacae* (Hultmark et al., 1980).

## 1.2 CLASSIFICAZIONE DEGLI AMP

La diversità degli AMP naturali causa difficoltà nella loro classificazione. Gli AMP sono classificati in base a (1) fonte, (2) attività, (3) caratteristiche strutturali e (4) specie ricche di aminoacidi (**Fig. 2**).



### 1.2.1 CLASSIFICAZIONE DEGLI AMP BASATA SU FONTI

Le fonti di AMP possono essere suddivise in mammiferi (ospite umano i peptidi di difesa rappresentano una grande percentuale), anfibi, microrganismi e insetti secondo i

dati statistici in APD3. Anche gli AMP presenti negli oceani hanno attirato l'attenzione diffusa.

#### 1.2.1.1 PEPTIDI ANTIMICROBICI DERIVANTI DAI MAMMIFERI

Gli AMP animali vengono prodotti nei siti costantemente esposti a microbi, come le barriere cutanee e mucose (López-Meza et al., 2011). Sono stati isolati vari AMP da invertebrati e molte specie di vertebrati (compresi pesci, anfibi e mammiferi).

Gli AMP dei mammiferi sono stati identificati negli esseri umani, nei bovini, pecore e altri vertebrati (Huan et al., 2020). Alcuni AMP dai mammiferi hanno una seconda importante funzione inducente chemioattrazione e attivazione delle cellule ospiti per la difesa innata (Yang et al., 2001). Gli AMP possono essere immagazzinati in fagociti e cellule epiteliali e possono essere rilasciati extracellularmente per degranolazione in risposta a diversi stimoli, divenendo disponibili nel sito di infezione (Yang et al., 2001). Per esempio, le catelicidine vengono immagazzinate all'interno dei granuli delle cellule immunitarie circolanti come propeptidi inattivi (Jenssen et al., 2006). Le catelicidine e le defensine sono i principali AMP presenti nei mammiferi, come gli esseri umani, cavalli, conigli, pecore e topi. La famiglia delle catelicidine comprende peptidi eterogenei che condividono la pro-regione N-terminale ma mostrano un peptide antibatterico variabile nella regione C-terminale, che può essere  $\beta$ -forcina,  $\alpha$ -elicoideale, arginina e peptidi ricchi di prolina (Kościuczuk et al., 2012). Questa diversità strutturale riflette le diverse funzioni della catelicidina e il loro ampio spettro di proprietà antimicrobiche e attività immunomodulanti (Jenssen et al., 2006). Il BMAP-28  $\alpha$ -elicoideale è un AMP bovino della famiglia delle catelicidine che è in grado di permeabilizzare le membrane di diversi batteri e funghi in vitro ad una moderata concentrazione (Risso et al., 2002; Benincasa et al., 2006). Solo una catelicidina, la hCAP18 (meglio conosciuta come LL-37), è prodotta negli esseri umani ed è stata isolata da granuli specifici dei neutrofilo. Un secondo gruppo di AMP dei mammiferi sono le defensine, le quali richiedono attività proteolitiche per acquisire la loro forma attiva (Selsted e Ouellette, 2005). Sono state identificate più di 50 specie di defensine nei mammiferi; alcuni di essi sono immagazzinati in granuli di macrofagi, neutrofilo e cellule di Paneth, mentre altri lo sono prodotti dalle cellule epiteliali della mucosa e dai cheratinociti (Yang et al., 2001). La produzione di difensine può essere costitutiva,

come ad esempio per la  $\beta$ -defensina-1 umana (hBD1), o inducibile, come per hBD2, la cui espressione è indotta dall'esposizione a componenti di batteri o microbi, come LPS (Jenssen et al., 2006).

Il peptide anionico Dermcidina, scoperto nell'epitelio e nei granuli dei neutrofilo degli esseri umani, è uno degli AMP anionici umani più studiati. Questo peptide viene processato proteoliticamente nel sudore producendo diversi peptidi troncati che mostrano un buon spettro di attività antimicrobica (Schitteck et al., 2001).

Esistono diversi esempi di AMP di mammiferi proposti per applicazioni cliniche. La digestione acido-pepsinica della lattoferrina bovina provoca il rilascio del peptide lattoferricina, che mostra la più forte attività antimicrobica tra le lattoferricine dei mammiferi (Vorland et al., 1998) con potenti proprietà immunologiche e antitumorali (Gifford et al., 2005; Yin et al., 2013; Arias et al., 2017). Esercita la sua attività battericida su batteri Gram-positivi e Gram-negativi che inducono la depolarizzazione della membrana cellulare, con fusione di liposomi carichi negativamente e formazione di vesciche sulla superficie cellulare (Ulvatne et al., 2001; Bruni et al., 2016). La lattoferricina bovina mostra proprietà utili per potenziali applicazioni nella medicina umana. È stata utilizzata con successo per il trattamento di infezioni enteroemorragiche da *E. coli* (Kühnle et al., 2019). Per le sue proprietà antimicrobiche e antinfiammatorie, la lattoferricina bovina può essere utilizzata per il trattamento delle infezioni oculari, poiché potenzia l'effetto di convenzionali antibiotici contro isolati clinici oculari di *P. aeruginosa* e *S. aureus* (Oo et al., 2010). Inoltre, migliora la guarigione delle ferite diabetiche (Mouritzen et al., 2021) e trova applicazioni nel trattamento delle patologie osteo-articolari (Yan et al., 2013). La saliva degli esseri umani e di altri primati contiene varie forme di AMP, tra questi le istatine, che sono piccoli peptidi cationici ricchi di istidina con proprietà antifungine. L'istatina 5, prodotto della scissione proteolitica dell'istatina 3, è l'istatina più attiva contro diversi lieviti, come il *Cryptococcus neoformans*, la *Candida dubliniensis* e la *Candida albicans* (da Costa et al., 2015). Le istatine esercitano la loro attività prendendo di mira i mitocondri, influenzando la respirazione cellulare (Kavanagh e Dowd, 2004) e, grazie alla loro sicurezza e tolleranza, hanno avuto successo testato in gel topici per il trattamento delle infezioni fungine orali (Paquette et al., 2002). Sono stati fatti diversi sforzi per identificare frammenti di istatina 5 con applicazione farmaceutica e hanno dato risultati promettenti.

Un esempio a questo proposito è il 12-amminoacido peptide P113, valutato in studi clinici di fase I e fase II come agenti farmaceutici per combattere la candidosi orale (Woong et al., 2008; Cheng et al., 2018; Browne et al., 2020).

#### 1.2.1.2. PEPTIDI ANTIMICROBICI DERIVATI DAGLI ANFIBI

Negli invertebrati il sistema immunitario innato è estremamente efficiente poiché mancano di un sistema immunitario adattativo, e a questo proposito, gli AMP svolgono un ruolo chiave nella protezione contro attacchi microbici esterni (Jenssen et al., 2006). Gli invertebrati possono produrre una vasta gamma di proteine e peptidi che sono si trovano nei fagociti, nelle cellule epiteliali e nell'emolinfa (plasma ed emociti) (Jenssen et al., 2006). La tachiplesina (Nakamura et al., 1988), polifemusina (Miyata et al., 1989) (dal granchio a ferro di cavallo) e melittina (dal veleno d'api) (Raghuraman e Chattopadhyay, 2007) sono esempi di AMP provenienti da invertebrati.

Gli anfibi, in particolare le rane, sono una ricca fonte di AMP. La maggior parte degli AMP di anfibi sono stati isolati dalla pelle della rana. Queste molecole biologicamente attive vengono rilasciate dalle ghiandole cutanee ed escrete verso la superficie della pelle a seguito della stimolazione da parte dell'agente patogeno (Patockaa et al., 2018). Il prototipo e il più famoso AMP delle rane è la magainina  $\alpha$ -elicoideale (Zasloff, 1987), attiva contro lieviti, funghi, batteri e virus (Borah et al., 2020). Esculentine, nigrocine, brevinine, e temporine sono alcuni dei peptidi meglio caratterizzati prodotti dalle rane del genere *Rana* (Patockaa et al., 2018). L'esculentina-1, composta da 46 residui aminoacidici e da ponte disolfuro, mostra una forte attività contro diversi patogeni umani, come *C. albicans*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. aureus* (Patockaa et al., 2018). L'esculentina è stata testata in vitro sull'epitelio polmonare umano per determinarne la tossicità, riscontrando una buona tollerabilità in termini di effetti infiammatori. Successivamente è stata studiata in un modello murino, in cui è stata indotta un'infezione polmonare da *P. aeruginosa*: risultati promettenti hanno mostrato una forte riduzione della carica batterica non solo nei polmoni ma anche nella milza, indicando una ridotta diffusione sistemica dei batteri (Chen C. et al., 2017).

La brevinina-2Ta è stata testata su topi affetti da polmonite da *Klebsiella pneumoniae*. In questo studio, è stato dimostrato che il peptide diminuisce la carica batterica, alterando la struttura del microorganismo nei siti di infezione e ha anche mostrato la

capacità di accelerare l'angiogenesi e il processo di maturazione del tessuto di granulazione, ottenendo risultati comparabili agli antibiotici classici. Per questo motivo, questo peptide è un buon candidato per studi preclinici, anche se sono presenti alcune modifiche necessario per diminuirne il potere emolitico (Liu et al., 2017). Liu et al. (2017), hanno ipotizzato che le sostituzioni di aminoacidi nella struttura primaria potrebbe essere la giusta strategia per ridurre l'attività emolitica, migliorando, al tempo stesso, quella antimicrobica.

Per quanto riguarda gli AMP anionici, la temporina-1Ja, avente carica netta di -1, è stata isolata dalle secrezioni cutanee della Rana giapponese *Rana japonica* (Isaacson et al., 2002). Questo peptide anionico ha rivelato un'attività moderata contro *E. coli* e *S. aureus* tensioni. Tuttavia, si è scoperto che questo peptide agisce in sinergia con altre temporine, contribuendo alla neutralizzazione delle endotossine (Rosenfeld et al., 2006). Gli AMP possono anche proteggere gli anfibi da agenti patogeni ingeriti poiché sono prodotti nella mucosa dello stomaco. La buforina del rospo asiatico e buforina II sono gli esempi meglio caratterizzati a questo riguardo (Jenssen et al., 2006).

### 1.2.1.3. PEPTIDI ANTIMICROBICI DERIVANTI DALLE PIANTE

I peptidi bioattivi sono componenti essenziali nei meccanismi di difesa delle piante, di straordinaria importanza fisiologica, fornendo una protezione rapida contro le infezioni batteriche e fungine (Jenssen et al., 2006; López-Meza et al., 2011; Salas et al., 2015). Gli AMP delle piante non solo mostrano attività microbicide, ma sono anche coinvolti nella segnalazione cellulare (Salas et al., 2015). Diversi peptidi attivi sono stati estratti e isolati da radici, fiori, semi, steli e foglie e sono classificati in base alla loro sequenza aminoacidica, posizione e numero di residui di cisteina coinvolti nella formazione del ponte disolfuro (López-Meza et al., 2011). Sono state descritte dieci famiglie di AMP vegetali (López-Meza et al., 2011) e i gruppi meglio studiati sono le defensine, tionine e snachine (Jenssen et al., 2006; López-Meza et al., 2011; Huan et al., 2020). Il primo AMP di origine vegetale è la purotionina, che mostra attività contro il *Corynebacterium fasciani*, *Pseudomonas solanacearum*, *Corynebacterium stella* di Natale (de Caley et al., 1972). Le defensine vegetali sono AMP ricchi di cisteina, con quattro ponti disolfuro e una struttura globulare (Salas et al., 2015); sono peptidi basici, composti da 45 a 54 residui aminoacidici, ubiquitari nel regno vegetale, mostrando attività contro

batteri e funghi. Il peptide PvD1 è una defensina originaria da *Phaseolus vulgaris*, che inibisce la crescita di lieviti, come *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Saccharomyces cerevisiae* (Mello et al., 2011). Le tionine, composte da 45 a 47 aminoacidi, sono peptidi basici presenti in diversi tessuti vegetali, tossici per i batteri e funghi fitopatogeni (López-Meza et al., 2011). Le snachine sono piccoli peptidi con 12 residui di cisteina che formano sei ponti disolfuro, essenziali per la loro attività biologica (Menegueti et al., 2017). Infine, nell'avocado e nei frutti del *Capsicum* sono stati identificati diversi AMP, che per la loro proprietà antimicrobica potrebbero essere utilizzate nel trattamento delle infezioni causate da Ceppi di *S. aureus* ed *E. coli* (Liu et al., 2006; Guzmán-Rodríguez et al., 2013; Taveira et al., 2014).

Considerando la loro efficienza e l'attività ad ampio spettro, gli AMP vegetali possono rappresentare un'alternativa promettente agli antibiotici convenzionali per contrastare le infezioni (da Silva e Machado, 2012).

#### 1.2.1.4. PEPTIDI ANTIMICROBICI DERIVATI DAGLI INSETTI

Negli insetti sono stati isolati più di 200 AMP (Li et al., 2012). Il numero di queste molecole bioattive varia tra specie. *Hermetia illucens* e *Harmonia axyridis* producono fino a 50 AMP, mentre non si trovano in altre specie, come *Acyrtosiphon pisum* (Huan et al., 2020; Moretta et al., 2020). Gli AMP sono prodotti principalmente nel grasso corporeo e nelle cellule del sangue (emociti) degli insetti e poi vengono secreti nell'emolinfa (Jenssen et al., 2006; Huan et al., 2020). In base alla loro sequenza amminoacidica e attività antimicrobica, gli AMP degli insetti sono divisi in diversi gruppi: cecropine, defensine, peptidi ricchi di prolina e peptidi ricchi di glicina (Manniello et al., 2021). La cecropina è stata il primo AMP di insetto scoperto nell'emolinfa delle pupe di *Hyalophora cecropia* (Steiner et al., 1981). Le cecropine, che sono descritte solo nell'ordine dei Ditteri e dei Lepidotteri, sono peptidi lineari con α-elica e senza cisteine, composti da circa 35 residui di aminoacidi e mostra attività contro Batteri Gram-positivi e Gram-negativi (Wu Q. et al., 2018). Le defensine degli insetti sono peptidi inducibili che mostrano una forte azione attività contro i batteri Gram-positivi e meno contro i batteri Gram-negativi. Sono composti da 29-34 residui amminoacidici e sono stati isolati da diversi ordini di insetti, come ad esempio i Coleotteri, Emitteri, Ditteri, Tricotteri, Imenotteri e Odonata (Bulet et al., 1999). Gli

Attacini sono un esempio di AMP ricchi di glicina, che mostrano attività contro i batteri Gram-negativi, incluso *E. coli* (Carlsson et al., 1991). Questo gruppo di peptidi ha dimensioni eterologhe, ma la loro caratteristica comune è l'alto contenuto di residui di glicina (10-22%) (Wu Q. et al., 2018), che influenzano la struttura terziaria e di conseguenza la loro modalità di azione (Li et al., 2012). Sebbene gli AMP per insetti potrebbero essere una buona alternativa ai convenzionali antibiotici, il loro uso clinico è ancora limitato e la maggior parte di questi sono solo testati in vitro (Manniello et al., 2021).

Tra questi, il peptide della melittina è attualmente in uso clinico per la sua potenza antimicrobica. Composta da 26 aminoacidi, la melittina è la componente principale del veleno del l'ape mellifera *Apis mellifera*. La melittina ha un'attività ad ampio spettro, e la sua capacità di proteggere in vivo dalle infezioni da MRSA è stata dimostrata (Choi et al., 2015). Agisce per induzione di formazione di pori in seguito all'interazione con le superfici di membrana (van den Bogaart et al., 2008). Poiché ha anche proprietà antinfiammatorie (Lee e Bae, 2016), la Food and Drug Administration (FDA) ne ha approvato l'utilizzo nella pratica clinica (Dijksteel et al., 2021), per alleviare il dolore associato a tendiniti, artrite e sclerosi multipla (Park et al., 2004; Son et al., 2007; Yang et al., 2011).

#### 1.2.1.5. PEPTIDI ANTIMICROBICI DERIVATI DA MICRORGANISMI

Batteri e funghi sono serbatoi di AMP (Huan et al., 2020). Tra i numerosi AMP, i primi isolati e caratterizzati erano quelli prodotti dai batteri (Jenssen et al., 2006). Gli AMP dai batteri non vengono prodotti allo scopo di proteggere contro infezioni, ma piuttosto come una strategia competitiva (Jenssen et al., 2006). Con la loro attività uccidono altri microbi che competono per i nutrienti nelle stesse nicchie, garantendo la sopravvivenza delle cellule batteriche individuali (Jenssen et al., 2006). Gli AMP batterici, chiamati anche batteriocine, sono rappresentati da una famiglia eterogenea di piccole molecole sintetizzate ribosomialmente con forte azione antimicrobica a concentrazioni specifiche (Soltani et al., 2021). Queste molecole, prodotte da batteri Gram-positivi e Gram-negativi, sono efficaci contro molti batteri patogeni e sono straordinariamente attivi rispetto alle loro controparti eucariotiche (Jenssen et al., 2006; Soltani et al., 2021). Ad esempio, gli AMP isolati da *Pseudomonas* spp mostrano attività contro diverse specie

batteriche, come *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, mostrando sia attività antibatterica generale che attività antibiofilm specifica (Fontoura et al., 2008; Mohammadi-Barzelighi et al., 2019). La mersacidina, isolata da *Bacillus* spp, manifesta in vivo attività battericida contro *S. aureus* meticillino-resistente (MRSA) equivalente a quello della vancomicina (Jenssen et al., 2006).

Gli AMP sono prodotti anche dal microbiota umano. Il crosstalk del microbiota ospite si basa sulla secrezione di AMP da parte dei fagociti e cellule epiteliali e microbiota dell'intestino umano, della pelle e della cavità orale; questi peptidi contribuiscono all'equilibrio microbico ed ecologico (Magana et al., 2020). Un esempio di AMP proveniente da microbiota umano è la tiopeptide-lattocillina prodotta dal commensale vaginale *Lactobacillus gasseri* e che agisce contro Batteri Gram-positivi, inclusi *S. aureus* e *Gardnerella vaginalis* (He et al., 2020).

Diversi funghi filamentosi producono AMP simili alle defensine vegetali e animali. Esempi di AMP defensina-like ricchi di cisteina negli ascomiceti sono AFP di *Aspergillus giganteus*, PAF da *Penicillium chrysogenum*, ANAFP da *Aspergillus niger*, AcAFP e AcAMP da *Aspergillus clavatus* (Montesinos, 2007; Hegedüs e Marx, 2013). Tutti questi peptidi fungini hanno attività antifungina contro gli ascomiceti filamentosi, compresi gli agenti opportunistici animali e vegetali e agenti patogeni, come *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium* sp., e *Botrytis* sp. (Hegedüs e Marx, 2013).

Sulla base delle loro proprietà antimicrobiche e della loro sicurezza e tollerabilità, alcuni di questi AMP naturali hanno potenziali applicazioni terapeutiche. La nisina batteriocina, prodotta da *Lactococcus lactis*, è stata ampiamente studiata essendo utilizzata come conservante alimentare. La nisina è l'unica batteriocina legalmente approvata come bioconservante e viene utilizzata nell'industria lattiero-casearia per controllare la contaminazione da ceppi di *Listeria* (Soltani et al., 2021). A causa della sua attività ad ampio spettro contro agenti patogeni Gram-positivi e Gram-negativi, la nisina è stata approvata per uso clinico come alternativa agli antibiotici (Dijksteel et al., 2021). Diversi studi hanno riportato l'idoneità della nisina nel trattamento di numerose infezioni, come la mastite (Cao et al., 2007; Fernández et al., 2008), infezioni orali (Shin et al., 2015; Mitra et al., 2019), infezioni respiratorie (De Kwaadsteniet et al., 2009) e infezioni cutanee (Heunis et al., 2013). Inoltre, alcuni studi supportano le capacità antimicrobiche di nisina contro i batteri patogeni orali rilevanti per le malattie



parodontali e carie. Infatti, Tong et al. (2010) hanno dimostrato che la nisina A è in grado di inibire la crescita dei batteri cariogeni. Cao et al. (2007) hanno dimostrato che una formulazione a base di nisina era efficace nel trattamento della mastite clinica nelle vacche lattanti causata da diversi agenti patogeni della mastite. La mastite è comune malattia infiammatoria nelle donne in allattamento, che causa cessazione dell'allattamento al seno (Foxman et al., 2002). *S. aureus* e *Staphylococcus epidermidis* sono i due agenti più comuni che causano infezioni associate alla mastite (Foxman et al., 2002). La nisina provoca l'inibizione della crescita batterica attraverso la formazione di pori di membrana e interruzione della biosintesi della parete cellulare con l'interazione specifica del lipide II (Prince et al., 2016).

Un altro esempio di AMP di derivazione batterica utilizzati nelle cliniche in alternativa agli antibiotici c'è la gramicidina, che è una miscela di gramicidina A, B e C. Sono AMP prodotti naturalmente da *Bacillus brevis*, con attività contro diversi batteri gram-positivi, inducendo la depolarizzazione di membrana e di conseguenza lisi cellulare (David e Rajasekaran, 2015; Yang and Yourself, 2018). La gramicidina è un costituente della Neosporin®, un triplo antibiotico utilizzato in preparazioni oftalmiche e topiche (Hallett et al., 1956). La gramicidina S è utilizzata nel trattamento delle infezioni di ferite e del canale radicolare dei denti dovuta alla formazione di biofilm da *Enterococcus faecalis* resistenti alla tetraciclina (Berditsch et al., 2016). Il batterio *Streptomyces roseosporus* è un batterio ricco dell'AMP anionico daptomicina, la quale mostra attività battericida contro i patogeni Gram-positivi (Ball et al., 2004). La daptomicina esercita la sua azione battericida mediante formazione dei pori della membrana, depolarizzazione della membrana e inibizione della sintesi della parete cellulare (Taylor e Palmer, 2016). Questo peptide è stato approvato e commercializzato come AMP anionico per il trattamento delle infezioni cutanee causate da batteri Gram-positivi (Wang et al., 2014). Considerando la grande varietà di AMP esistenti in natura, ci si può aspettare che altri nuovi peptidi ispirati alla natura, attivi farmacologicamente, possano trovare applicazioni cliniche in futuro.

### 1.2.2 CLASSIFICAZIONE BASATA SULL'ATTIVITÀ

L'attività degli AMP può essere suddivisa in 18 categorie a seconda alle statistiche del database ADP3. Queste categorie possono essere riassunte come antibatteriche,

antivirali, antimicotiche, antiparassitari, antivirus dell'immunodeficienza umana (HIV) e antitumorale peptidi.

#### 1.2.2.1 PEPTIDI ANTIBATTERICI

I peptidi antibatterici rappresentano gran parte degli AMP e hanno un ampio effetto inibitorio sui comuni agenti patogeni batteri, come VRE, *Acinetobacter baumannii* e MRSA in medicina clinica e *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* negli alimenti e *Salmonella*, *Vibrio parahaemolyticus* in prodotti acquatici. Molti AMP naturali e sintetici come la nisina, cecropine e defensine hanno mostrato una buona attività di inibizione Batteri Gram-positivi e batteri Gram-negativi.

#### 1.2.2.2 PEPTIDI ANTIFUNGINI (AFP)

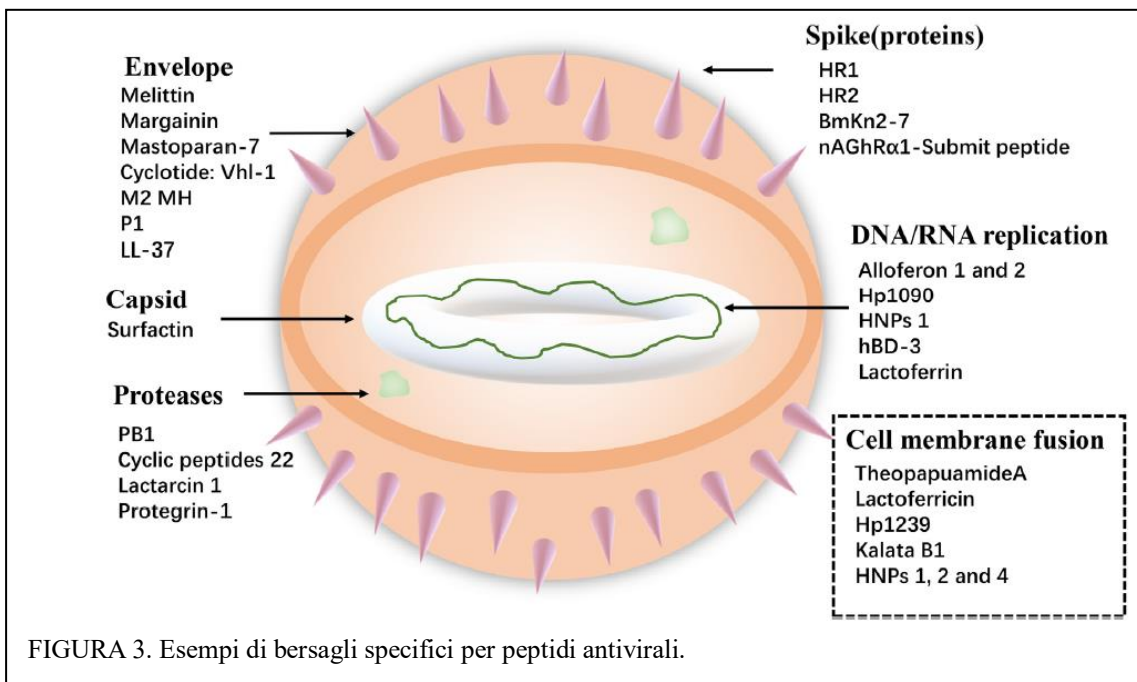
I peptidi antifungini sono una sottoclasse di AMP diretti verso infezioni fungine con aumentata resistenza ai farmaci. Molti AFP hanno mostrato eccellenti attività antifungine contro i comuni funghi patogeni, come *Aspergillus* e *Candida albicans* in medicina clinica, lieviti, funghi filamentosi (ad es. *Aspergillus flavus*), muffe negli alimenti e in agricoltura. Fatta eccezione per la brevinina, la ranatuerina e le cecropine, molti peptidi sintetici mostrano buona attività antifungina. Ad esempio, AurH1, derivato dall'aureina 1.2, può trattare efficacemente l'infezione da *C. albicans*, che ha un tasso di effetto letale fino al 40% (Madanchi et al., 2020). L'aflatossina, che è a cancerogeno prodotto da *A. flavus*, è dannosa per il corpo umano. Molti AFP possono inibire la crescita di *A. flavus*. Per esempio, un AFP con sequenza FPSHTGMSVPPP può inibire la crescita di *A. flavus* MD3. Un totale di 37 peptidi antifungini isolati da *Lactobacillus plantarum* TE10 e loro la miscela può ridurre la formazione di spore di *A. flavus* nei semi di mais freschi (Muhialdin et al., 2020).

#### 1.2.2.3. PEPTIDI ANTIVIRALI (AVP)

I virus causano gravi danni alla vita umana ed enormi perdite economiche per la zootecnia. Il COVID-19 ha causato grandi perdite di vite umane e proprietà. Inoltre, il virus dell'afta epizootica, il virus dell'influenza aviaria (AIV) e l'HIV rappresentano minacce a lungo termine per la vita umana. È quindi estremamente urgente risolvere

questi problemi e i peptidi antivirali forniscono nuove modalità. I peptidi antivirali mostrano un forte effetto letale sui virus principalmente (1) inibendo l'attaccamento del virus e la fusione del virus con la membrana cellulare, (2) distruzione dell'involucro del virus, o (3) inibizione della replicazione del virus (Jung et al., 2019) (mostrato in **Figura 3**). Un recente rapporto ha dimostrato che l'AMP Epi-1 media l'inattivazione delle particelle virali e ha una buona attività inibitoria contro il virus dell'afte epizootica (Huang et al., 2018).

Inoltre, il virus della bronchite infettiva (IBV) è l'agente patogeno di bronchite infettiva e l'inoculazione di una soluzione mista di AMP di origine intestinale suino (SIAMP)–IBV ha ridotto notevolmente la mortalità di embrioni di pollo rispetto al gruppo con infezione da IBV, mostrando la buona attività inibitoria del SIAMP sull'IBV (Sun et al., 2010). I peptidi anti-HIV sono una sottoclasse di peptidi antivirali. Gli esempi più importanti di questi peptidi includono le defensine (comprese le  $\alpha$ - e  $\beta$ -defensine, che hanno meccanismi diversi), LL-37, gramicidina D, caerina 1, maximina 3, magainina 2, dermaseptina-S1, dermaseptina-S4, siamicina-I, siamicina-II e RP 71955 (Madanchi et al., 2020) e il peptide antivirale Fuzeon<sup>TM</sup> (enfuvirtide) è stato commercializzato come farmaco anti-HIV (Ashkenazi et al., 2011).



A causa della diffusione globale del COVID-19, i peptidi antivirali contro il coronavirus verranno discussi in modo più dettagliato. I coronavirus (CoV) appartengono alla famiglia dei Coronaviridae; sono virus incapsulati con un genoma a RNA a filamento singolo con senso positivo e hanno una simmetria elicoidale (Franks e Galvin, 2014). La particella virale si forma dalla glicoproteina spike (S), l'involucro (E), la membrana (M) e il nucleocapside (N) (Vilas Boas et al., 2019). Esso va notato che la loro infettività richiede un picco virale (S) proteina. I peptidi inibitori della fusione si combinano con S proteina per interferire con il suo ripiegamento e prevenire l'infezione. Inoltre, il dominio S2 della proteina SARS-CoV S contiene sequenze HR1 e HR2 ripetute. Il peptide HR2 (HR2: LTQINTTLLDLTYEMLSLQVVKALNESYIDLKEL) e il suo peptide legante-lipidi è molto simile o addirittura identico alla porzione vicino alla membrana della proteina S ferredossina, la quale interferisce con il ripiegamento in domini catalizzatori di fusione post-fusione (FD) (Du et al., 2009; Park e Gallagher, 2017). Secondo studi recenti, il lipopeptide EK1C4, derivato da EK1 (SLDQINVTFLDLEYEMKKLEEAIKKLEESYIDLK-EL), è l'inibitore di fusione più efficace della proteina COVID-19 S con la membrana (Xia et al., 2020). Due AMP provenienti dalla proteina non strutturale nsp10 di SARS-CoV, K12 e K29, può inibire la replicazione di SARSCoV (Ke et al., 2012). In generale, gli AMP contro il coronavirus possono essere approssimativamente classificati come i) peptidi derivati da HR1, HR2 e Subunità RBD della proteina spike, ii) peptidi derivati da altri AMP, iii) Peptidi derivati da proteine non strutturali (Mustafa et al., 2018). Inoltre, analisi di docking molecolare hanno indicato che i peptidi sono stati impiegati per interrompere l'interazione tra COVID-19 e ACE2 (enzima di conversione dell'angiotensina 2) per inibire l'ingresso di COVID-19 nelle cellule (Souza et al., 2020). Infine, va notato che questa terapia manca di studi clinici e il metodo principale di esperimenti sugli animali è una somministrazione intranasale. Questo ci ricorda che la somministrazione nasale di farmaci (NDD) è una potenziale terapia per gli AMP come farmaci anti-coronavirus.

#### 1.2.2.4 PEPTIDI ANTIPARASSITARI

I protozoi parassiti possono causare malattie nell'uomo e negli animali attraverso una varietà di percorsi, incluso il passaggio da animale a persona o contatto da persona a persona, acqua, suolo e cibo (Chalmers et al., 2020). Con l'aumento della resistenza ai

farmaci parassitari, la necessità di nuovi trattamenti è aumentata. I peptidi antiparassitari mostrano il loro effetto letale sui parassiti che causano malattie come la malaria e la leishmaniosi (Mangoni et al., 2005; Rhaiem e Houimel, 2016) e gli AMP come la catelicidina, le temporine-SHd mostrano un'elevata attività di inibizione nei confronti dei parassiti (Abbassi et al., 2013). In studi recenti, l'Epi-1, un AMP sintetico marino, può inibire notevolmente il *Trichomonas vaginalis* distruggendo la sua membrana (Neshani et al., 2019). Il peptide Jelleina derivato dalla pappa reale delle api ha mostrato un effetto significativo sul parassita *Leishmania* (Cao et al., 2019; Zahedifard et al., 2020). Tuttavia, va notato che i loro meccanismi non sono gli stessi. I peptidi cianobatterici differiscono dagli AMP degli eucarioti superiori perché la loro azione antiparassitaria dipende da specifici bersagli proteici. Pertanto, questi parassiti target possono essere distinti con precisione anche se appartengono alla stessa famiglia o genere (Rivas e Rojas, 2019).

#### 1.2.2.5 PEPTIDI ANTITUMORALI (ACP)

I peptidi anticancerogeni (ACP) mostrano meccanismi antitumorali mediante (1) reclutamento di cellule immunitarie (come le cellule dendritiche) per uccidere le cellule tumorali, (2) inducendo la necrosi o l'apoptosi delle cellule tumorali, (3) inibendo l'angiogenesi per eliminare la nutrizione tumorale e prevenire metastasi e (4) l'attivazione di alcune proteine funzionali regolatorie che interferiscono con la trascrizione e la traduzione dei geni delle cellule tumorali (Wu D. et al., 2014; Ma et al., 2020). La tritripticina e i suoi analoghi inducono una notevole tossicità nei confronti delle cellule Jurkat in vitro, mentre anche l'indolicidina e la puroindolina A possono agire come ACP (Arias et al., 2020). Va notato che sia la carica netta e l'idrofobicità svolgono un ruolo importante nell'ottimizzazione dell'attività antitumorale degli ACP e possono limitare e influenzare l'un l'altro. Pertanto, ottenendo un equilibrio tra carica netta e idrofobicità è importante per una migliore attività antitumorale.

Oltre al peptide sopra menzionato, peptidi antinfiammatori, antidiabetici, peptidi spermicidi ecc. sono stati identificati, ma non sono la stessa cosa dei peptidi antimicrobici. In poche parole, i peptidi antinfiammatori riducono il rilascio di mediatori dell'infiammazione e di citochine infiammatorie (ossido nitrico, interleuchina-6 e interleuchina-1 $\beta$ ) e alcuni di essi inibiscono anche i mediatori

infiammatori come NF- $\kappa$ B, MAPK e JAK-STAT percorsi (Meram e Wu, 2017; Gao et al., 2020).

### 1.2.3. CLASSIFICAZIONE DEGLI AMP BASATA SU SPECIE RICCHE DI AMMINOACIDI

#### 1.2.3.1. PEPTIDI RICCHI DI PROLINA (PrAMPs)

La prolina è un tipico amminoacido non polare. I PrAMP si comportano diversamente degli altri AMP, infatti entrano nel citoplasma batterico mediante il trasportatore della membrana interna SbmA invece di uccidere i batteri attraverso la distruzione della membrana (Mattiuzzo et al., 2007). Una volta nel citoplasma, i PrAMP prendono di mira i ribosomi e bloccano il legame dell'amminoacil-tRNA alla peptidiltransferasi centrale o intrappolano i fattori di rilascio decodificanti sul ribosoma durante la cessazione della traduzione per interferire con la sintesi proteica (Seefeldt et al., 2015). Ad esempio, Tur1A, che è un AMP ortologo del PrAMP Bac7 bovino, scoperto nel *Tursiops truncatus*, interferisce con il passaggio dalla fase iniziale alla fase di estensione della sintesi proteica legandosi a ribosomi. Inoltre, diversi PrAMP mancano di sequenze ad elevata similitudine ma hanno motivi brevi contenenti prolina ripetuta e residui di arginina (Arg) (ad esempio, -PPXR- in Bac5 e -PRPX in Bac7) (Mardirossian et al., 2018, 2019). Sebbene i PrAMP uccidano principalmente i batteri Gram-positivi, il pPR-AMP1, un AMP ricco di prolina identificato nel granchio (*Scylla paramamosain*), mostra reperti di attività antimicrobica contro batteri Gram-positivi e Gram-negativi (Imjongjirak et al., 2017).

#### 1.2.3.2. PEPTIDI ANTIMICROBICI RICCHI DI TRIPTOFANO E ARGININA

Il triptofano (Trp), in quanto amminoacido non polare, ha un notevole effetto sulla regione dell'interfaccia del doppio strato lipidico, mentre l'arginina (Arg), in quanto amminoacido basico, conferisce una carica peptidica e interazioni a legame idrogeno, che sono proprietà essenziali da combinare con l'abbondante componente anionico della membrana batterica. Sembra inoltre che i residui di Trp svolgano il ruolo di attivatori aromatici naturali di AMP ricchi in Arg mediante interazioni della coppia ionica- $\pi$

(Walrant et al., 2020), promuovendo così interazioni potenziate peptide-membrana (Chan et al., 2006). Questo in aggiunta all'indolicidina e la triptirpticina che sono entrambi famosi AMP ricchi di residui Arg e Trp. Octa 2 (RRWWRWWR) è anch'esso un tipico AMP ricco di Trp e Arg che inibisce i Gram-negativi *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* e il Gram positivo *S. aureus*.

#### 1.2.3.3 PEPTIDI RICCHI DI ISTIDINA

L'istidina è un amminoacido basico comune e gli AMP ricchi di istidina mostrano una buona attività di permeazione della membrana. HV2 è un AMP ricco di istidina. Questo peptide aumenta la permeabilità delle membrane cellulari batteriche causando la rottura della cellula e la sua morte. Inoltre, HV2 inibisce i movimenti batterici in modo dipendente dalla concentrazione e mostra un forte effetto antinfiammatorio inibendone la produzione del fattore di necrosi tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Dong et al., 2019). Un AMP progettato sulla base di Octa 2 ha mostrato buone proprietà terapeutiche potenziali sostituendo i suoi residui di Arg con istidina (Bacalum et al., 2017).

#### 1.2.3.4. PEPTIDI ANTIMICROBICI RICCHI DI GLICINA

Il gruppo R della glicina è generalmente classificato come amminoacido non polare in biologia. Gli AMP ricchi di glicina, come le attacine e le diptericine, sono ampiamente presenti in natura (Lee et al., 2001; Kwon et al., 2008). Questi peptidi contengono dal 14% al 22% di residui di glicina, i quali hanno un effetto importante sulla struttura terziaria della catena peptidica. Un AMP ricco di glicina derivato dalle catelicidine salmonidi attiva i meccanismi microbicidi mediati dai fagociti, i quali differiscono dal meccanismo degli AMP convenzionali (D'Este et al., 2016). Inoltre, il GG3, AMP ricco di glicina, è un farmaco commerciale candidato ideale contro i batteri clinici Gram-negativi (Wang et al., 2015).

#### 1.2.4. CLASSIFICAZIONE BASATA SULLE STRUTTURE PEPTIDICHE

I peptidi antimicrobici possono essere suddivisi in quattro categorie sulla base della loro struttura, includono: peptidi lineari ad  $\alpha$ -elica, peptidi a  $\beta$ -forcina, struttura ad

estensione lineare, peptidi sia ad  $\alpha$ -elica che  $\beta$ -forcina (Lei et al., 2019). Inoltre, peptidi progressivamente ciclici e gli AMP con topologie più complesse (compresi i peptidi lazo e le strutture a ponte tioetere) sono riportati (Koehbach e Craik, 2019).

### 1.3 APPROFONDIMENTI SUI MECCANISMI D'AZIONE DI AMP

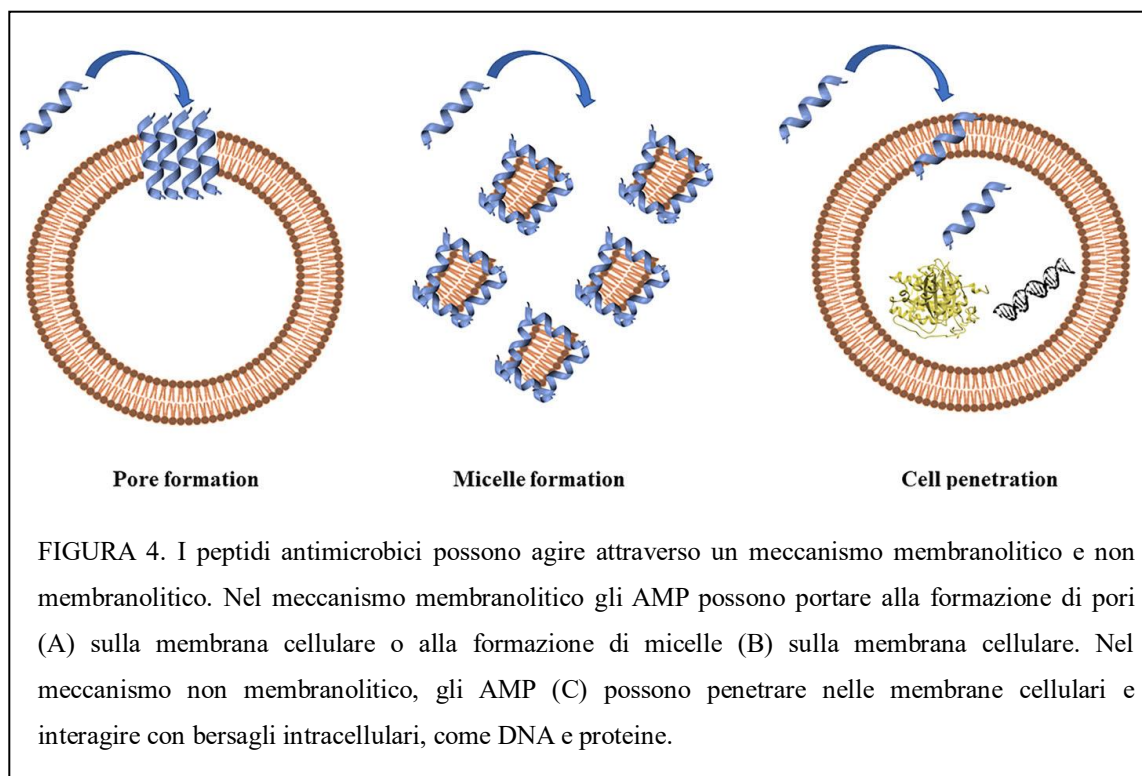
Il prerequisito per sviluppare AMP efficienti come nuovo farmaco candidato è la comprensione del loro modo di agire. Gli AMP esercitano la loro attività mediante interazione con le membrane cellulari microbiche e questa interazione è fortemente influenzata dalla composizione lipidica del membrane biologiche (Wu Q. et al., 2018). Del microbico, le membrane biologiche sono gli obiettivi primari degli AMP, è difficile per i batteri sviluppare resistenza agli AMP con la stessa facilità contro gli antibiotici convenzionali (Boparai e Sharma, 2020). Le interazioni della membrana sono mediate da forze elettrostatiche tra AMP caricati positivamente e superfici microbiche cariche negativamente. Gli acidi teicoici nella parete cellulare dei batteri gram-positivi e LPS nella membrana esterna dei batteri gram-negativi forniscono una carica elettronegativa alla superficie microbica, rafforzando l'interazione con gli AMP (Boparai e Sharma, 2020). Al contrario, lo strato esterno della membrana degli eucarioti è composta da fosfatidilcolina zwitterionica e sfingomieline, i quali non favoriscono l'interazione con gli AMP a causa della loro carica neutra a pH fisiologico. Sulla base della loro modalità di azione, gli AMP si dividono in “peptidi che agiscono sulla membrana”, i quali destabilizzano le membrane batteriche provocandone l'interruzione e “peptidi che non agiscono sulla membrana”, i quali sono in grado di traslocare attraverso le membrane senza danneggiarle ma destabilizzano le normali funzioni cellulari (Boparai e Sharma, 2020) (**Fig. 4**).

Sono stati proposti tre modelli per spiegare la permeabilizzazione delle membrane batteriche da parte degli AMP: il modello di Barrel-stave, il modello a pori toroidali e il modello a tappeto (Raheem e Straus, 2019).

#### 1.3.1 MECCANISMO DI TARGETING DELLA MEMBRANA

È possibile descrivere i meccanismi di targeting della membrana degli AMP attraverso diversi modelli, compresi i modelli a palo e a tappeto e il modello polare può essere ulteriormente suddiviso in poro toroidale e modelli a doge (**Fig. 5**).





### 1.3.1.1 IL MODELLO DEI PORI TOROIDALI

Il modello dei pori toroidali è noto anche come modello di Wormhole. In questo modello, gli AMP sono incorporati verticalmente nella membrana cellulare, si accumulano e poi si piegano per formare un foro ad anello del diametro di 1–2 nm (Matsuzaki et al., 1995, 1996). Il tipico esempi di questo modello sono la magainina 2, la latticina Q e l'arenicina. Inoltre, i peptidi cationici, inclusi TC19, TC84 e BP2, compromettono la barriera della membrana creando domini fluidi (Omaridien et al., 2018).

### 1.3.1.2 MODELLO BARREL-STAVE

I peptidi antimicrobici si aggregano tra loro, penetrano nel doppio strato della membrana cellulare sotto forma di multimeri, e formano canali che danno luogo al deflusso citoplasmatico. Nei casi gravi, gli AMP possono indurre il collasso della membrana cellulare e portare alla cellula morte (Lohner e Prossnigg, 2009). Ad esempio, l'Alameticina svolge la sua attività di formazione dei pori utilizzando questo modello. Inoltre, l'AMP a forcina protegrina-1 può formare barili- $\beta$  ottamericani stabili

e archi tetramerici (mezzi barili) nelle membrane implicite ed esplicite mediante simulazioni (Lipkin e Lazaridis, 2015).

### 1.3.1.3 MODELLO CARPET-LIKE

I peptidi antimicrobici sono disposti parallelamente alla membrana cellulare. La loro estremità idrofila è rivolta verso la soluzione e la loro estremità idrofobica è rivolta verso il doppio strato fosfolipidico. Gli AMP copriranno la superficie della membrana che assomiglia ad un tappeto e distruggeranno la membrana cellulare in modo ‘simile a un detergente’ (Oren e Shai, 1998). Tuttavia, questo meccanismo di formazione dei pori richiede un certo soglia di concentrazione e la concentrazione richiesta di AMP è alta. La catelicidina umana LL-37 mostra la sua attività attraverso questo meccanismo, e anche gli AMP con struttura a  $\beta$ -forcina svolgono un ruolo in questo modello (Shenkarev et al., 2011; Corrêa et al., 2019).

I meccanismi di targeting della membrana (la membrana cellulare differisce di composizione tra batteri e funghi come mostrato nella **Fig. 6**) può essere ulteriormente perfezionato per affrontare le grandi differenze nella composizione lipidica delle membrane cellulari di batteri, funghi e mammiferi. I principali lipidi nelle membrane cellulari includono glicerofosfolipidi (GPL), lisolipidi, sfingolipidi e steroli. La fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerolo (PG) e la cardiolipina (CL) sono i lipidi anionici più comuni nei batteri, mentre la fosfatidilcolina (PC), fosfatidilinositolo (PI), PE e acido fosfatidico (PA) sono i principali GPL nelle membrane cellulari dei funghi (Ejsing et al., 2009; Singh e Prasad, 2011; Li et al., 2017). Inoltre, le membrane cellulari fungine sono più anioniche rispetto alle membrane cellulari dei mammiferi. Nel frattempo, l'ergosterolo è lo sterolo presente nella membrana plasmatica degli eucarioti inferiori, come i funghi, mentre quella degli animali contiene colesterolo (Faruck et al., 2016). Molti AMP sfruttano le differenze nelle componenti della membrana per esercitare i loro effetti.

I peptidi antimicrobici promettono di essere agenti anti-biofilm ma va notato che sono diversi dai peptidi penetranti la cellula (CPP) che tipicamente comprendono 5-30 aminoacidi e possono traslocare attraverso la membrana cellulare. I CPP possono essere classificati in base alle proprietà fisico-chimiche in tre classi: cationici, anfipatici e idrofobici, ma i peptidi anti-biofilm hanno requisiti più severi per queste proprietà

fisico-chimiche. I peptidi anti-biofilm prendono di mira il biofilm mediante diversi meccanismi tra cui (1) la degradazione di segnali all'interno dei biofilm; (2) la permeabilizzazione della membrana citoplasmatica/EPS ecc. e poi può affrontare infezioni batteriche croniche multiresistenti (Pletzer et al., 2016; Ribeiro et al., 2016; Guidotti et al., 2017; Derakhshankhah e Jafari, 2018; Rajput e Kumar, 2018). Per esempio, SAAP-148, sintetizzato sulla base di LL-37, ha mostrato attività per prevenire la formazione di biofilm da parte di *S. aureus* e *A. baumannii* (Crunkhorn, 2018).

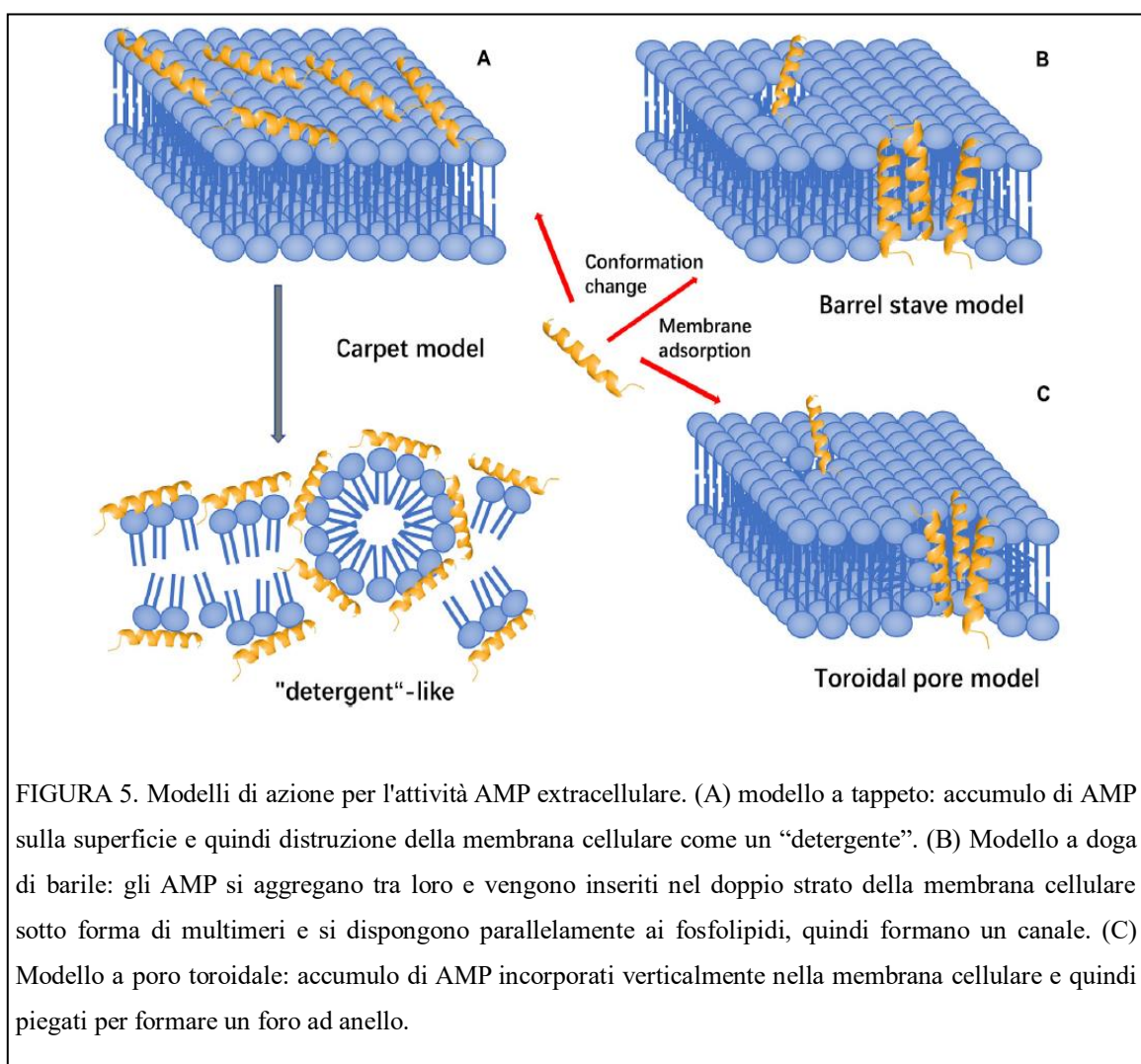
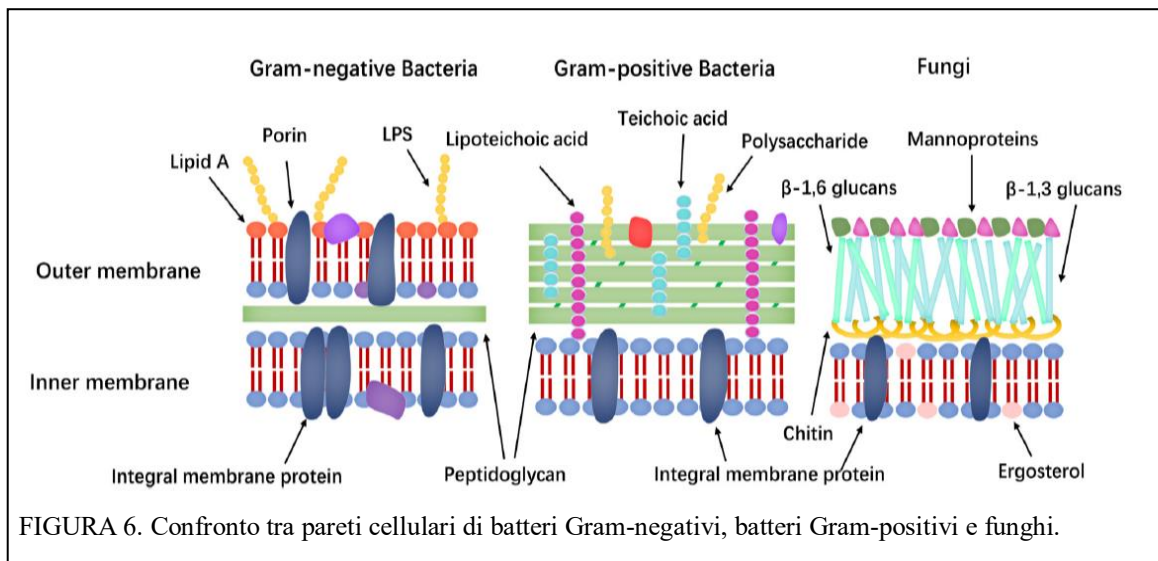


FIGURA 5. Modelli di azione per l'attività AMP extracellulare. (A) modello a tappeto: accumulo di AMP sulla superficie e quindi distruzione della membrana cellulare come un "detergente". (B) Modello a doghe di barile: gli AMP si aggregano tra loro e vengono inseriti nel doppio strato della membrana cellulare sotto forma di multimeri e si dispongono parallelamente ai fosfolipidi, quindi formano un canale. (C) Modello a poro toroidale: accumulo di AMP incorporati verticalmente nella membrana cellulare e quindi piegati per formare un foro ad anello.



### 1.3.2 MECCANISMO DI TARGETING NON A MEMBRANA

Il modo in cui gli AMP entrano nelle cellule è mediante penetrazione diretta o endocitosi. Dopo essere entrati nel citoplasma, gli AMP identificheranno e agiranno sul bersaglio. A seconda del target, gli AMP possono essere suddivisi nelle seguenti categorie.

#### 1.3.2.1 INIBIZIONE DELLA BIOSINTESI PROTEICA

I peptidi antimicrobici influenzano la trascrizione, la traduzione e l'assemblaggio in peptidi funzionali attraverso chaperonine molecolari che permettono il ripiegamento interferendo con gli enzimi correlati e gli effettori molecolari. Ad esempio, Bac7 1–35 agisce sui ribosomi per inibire la traduzione proteica (Mardirossian et al., 2014), mentre Tur1A inibisce la sintesi proteica in *E. coli* e in *Thermus thermophilus* inibendo il passaggio dalla fase iniziale a quella di estensione. Tuttavia, anche le differenze tra Tur1A e Bac7 portano a vari modi di legarsi ai ribosomi e di interagire con il tunnel di uscita del peptide ribosomiale (Mardirossian et al., 2018). Ma alcuni AMP hanno obiettivi diversi. Ad esempio, la trascrizione dell'intero genoma mostra che l'AMP DM3 può influenzare molte vie intracellulari importanti della biosintesi delle proteine (Le et al., 2016).

Le chaperonine sono proteine chiave per il corretto ripiegamento e assemblare di proteine appena sintetizzate e farle avere lo stereoisomerismo, il che fa sì che gli AMP abbiano selettività cellulare e posano prevenire la citotossicità.

#### 1.3.2.2 INIBIZIONE DELLA BIOSINTESI DEGLI ACIDI NUCLEICI

I peptidi antimicrobici possono influenzare gli enzimi chiave o indurre la degradazione delle molecole di acido nucleico per inibire la biosintesi degli acidi nucleici. L'indolicidina, un APM ricco di Trp, cationico, amidato C-terminale con 13 aminoacidi agisce specificamente sul sito abasico del DNA per reticolare il DNA a singolo o doppio filamento, inoltre può inibire anche la DNA topoisomerasi I (Subbalakshmi e Sitaram, 1998). Il TFP (inibitore della pathway del fattore tissutale) 1-1TC24, che è un AMP derivante dalla lingue, entra nel citoplasma delle cellule bersaglio dopo la rottura della membrana cellulare e quindi degrada il DNA e l'RNA (Lui et al., 2017).

#### 1.3.2.3. INIBIZIONE DELL'ATTIVITÀ DELLA PROTEASI

Molti AMP possono inibire varie attività metaboliche inibendo l'attività della proteasi. Ad esempio, l'istatina 5 ha un forte effetto inibitorio effetto sulle proteasi secrete dall'ospite e dai batteri. Gli AMP eNAP-2 e l'indolicidina inibiscono le proteasi microbiche serina, elastasi e chimotripsina (Le et al., 2017). La catelicidina-BF è un peptide isolato dal veleno di *Bungarus fasciatus*, può inibire efficacemente l'aggregazione piastrinica indotta dalla trombina e bloccare ulteriormente il recettore 4 attivato dalla proteasi (Shu et al., 2019).

#### 1.3.2.4. INIBIZIONE DELLA DIVISIONE CELLULARE

I peptidi antimicrobici inibiscono la divisione cellulare inibendo la replicazione del DNA e la risposta al danno del DNA, bloccando il ciclo cellulare o provocandone il fallimento della separazione cromosomica (Lutkenhaus, 1990). Ad esempio, APP, un AMP con 20 residui di aminoacidi, può uccidere efficacemente *C. albicans* a causa della sua efficiente penetrazione cellulare, la forte affinità di legame con il DNA e capacità di indurre l'arresto della fase S in ambiente intracellulare (Li L. et al., 2016). MciZ, che ha

40 residui aminoacidici, è un inibitore efficace della divisione cellulare batterica e della formazione dell'anello Z (Cruz et al., 2020).

Inoltre, è stato segnalato che diversi AMP hanno effetti dannosi sugli organelli dei funghi. Per esempio, l'istintina 5 può interagire con i mitocondri, causando la produzione di ROS e inducendo la morte cellulare (Helmerhorst et al., 2001).

Oltre ai bersagli intracellulari, le differenze nella composizione della parete cellulare, come lipopolisaccaride (LPS), lipide A e mannoproteine, sono potenziali bersagli per gli AMP. Nello specifico, i batteri Gram-positivi e Gram-negativi sono classificati in base alla struttura della parete cellulare. I batteri Gram-positivi hanno uno strato di peptidoglicano reticolato, mentre i Gram-negativi hanno una membrana esterna aggiuntiva con un foglio interno contenente solo acido fosfatidico e un foglio esterno realizzato in LPS. L'LPS ha numerosi gruppi fosfato caricati negativamente, i quali si combinano con un ponte salino con un catione bivalente (ad es.  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ) per formare una rete elettrostatica (Nikaido, 2003). Questa zona elettrostatica è la barriera principale contro gli antibiotici idrofobici e causa la bassa permeabilità dei batteri Gram-negativi. Le componenti principali della parete cellulare fungina sono le mannoproteine, i  $\beta$ -glucani e la chitina e mutazioni in geni rilevanti nella pathway delle LPS e nel traffico di fosfolipidi forniscono resistenza agli AMP (Cabib, 2009; Spohn et al., 2019). Le mannoproteine nelle pareti cellulari dei funghi comprendono una varietà di proteine, comprese le proteine strutturali, proteine di adesione cellulare (floccrina e lectina) ed enzimi coinvolti nella sintesi della parete cellulare e nel rimodellamento. Queste proteine differiscono dalle proteine della membrana cellulare umana e sono potenziali bersagli degli AMP (Rautenbach et al., 2016). Inoltre, anche l'acido teicoico e l'acido lipoteicoico della parete cellulare sono potenziali bersagli degli AMP e queste teorie potrebbero supportare la progettazione di AMP a bassa citotossicità.

#### 1.4. METODI DI PROGETTAZIONE DEI PEPTIDI ANTIMICROBICI

I peptidi antimicrobici hanno buone prospettive di applicazione. Tuttavia, gli AMP presentano i seguenti problemi. (1) Danneggiano la membrana cellulare degli eucarioti e causa effetti collaterali emolitici; (2) Aumento dei costi di produzione e problemi tecnici che limitano la loro produzione; (3) la loro stabilità è limitata a un determinato pH; (4) hanno un'attività ridotta in presenza di ferro e certi sieri; (5) vengono facilmente

idrolizzati dalle proteasi. Perciò, l'AMP ideale dovrebbe soddisfare le seguenti caratteristiche: (i) elevata attività antimicrobica; (ii) bassa tossicità per le membrane dei mammiferi; (iii) elevata proteasi e stabilità ambientale; (iv) bassa capacità legante del siero e (v) facilità di accesso e basso costo di produzione (Li et al., 2017). Pertanto, progettare un AMP per ottenere l'effetto desiderato attira sempre più attenzione. La progettazione razionale dei peptidi antibatterici dovrebbe concentrarsi sui seguenti cinque aspetti: lunghezza della catena, struttura secondaria, carica netta, idrofobicità e anfifilicità.

#### 1.4.1 MUTAZIONE DIRETTA AL SITO

La mutazione diretta al sito si riferisce alla riprogettazione dei naturale peptidi antimicrobici aggiungendo, eliminando o sostituendone uno, o diversi residui amminoacidici (Torres et al., 2019).

#### 1.4.2 PEPTIDI DI PROGETTAZIONE DE NOVO

La progettazione de novo dei peptidi attribuisce importanza alla progettazione di AMP anfifilici (Guha et al., 2019). Per esempio, GALA è un noto AMP progettato de novo. Il peptide anfipatico  $\alpha$ -elicoidale GALA viene creato posizionando residui di acido glutammico nella maggior parte delle posizioni con la spaziatura da  $i$  a  $i+4$  (Goormaghtig et al., 1991). La sequenza ripetuta  $(XXYY)_n$ , dove  $X_1$  e  $X_2$  sono amminoacidi idrofobici e  $Y_1$  e  $Y_2$  sono amminoacidi cationici e  $n$  è il numero di unità ripetitive, è progettato in base al ciclo di idrofobicità che imita gli AMP naturali  $\alpha$ -elicoidali e progetta con successo un ampio spettro di AMP ad  $\alpha$ -elica. Inoltre, i peptidi modello  $L_1K_mW_2$  sono anch'essi peptidi progettati de novo. Le proprietà elicoidali anfipatiche sono state conferite utilizzando leucine e lisina e due residui di triptofano sono stati posizionati a livello dell'interfaccia anfipatica tra il lato terminale idrofilo e il lato iniziale idrofobico. Tra i peptidi modello,  $L_4K_5W_2$  ha una buona attività anti-MRSA (Lee et al., 2011).

### 1.4.3 METODO DI PROGETTAZIONE BASATO SU TEMPLATE

I modelli di sequenza possono essere ottenuti confrontando un grande numero di frammenti strutturalmente omologhi degli AMP naturali (come gli HDP) con estrazione di pattern conservativi in base al tipo di residuo (ad esempio carico, polare, idrofobico, ecc.) (Zelezetsky e Tossi, 2006). In base alle modifiche, i parametri, come la tendenza alla formazione dell'elica, l'anfifilicità e l'idrofobicità complessiva, possono essere sistematicamente modificati. Ad esempio, la cecropina, la magainina, la protegrina e la lattoferrina sono state tutte utilizzate come template AMP (Fjell et al., 2012).

### 1.4.4 METODO DI PROGETTAZIONE BASATO SULL'AUTOASSEMBLAGGIO DI PEPTIDI ANTIMICROBICI

I peptidi possono formare nanostrutture, come micelle, vescicole, nanotubi, nanoparticelle di nanocinture e nanofibre di nanotubi e può aumentare o conferire attività antibatterica agli AMP durante l'autoassemblaggio dei peptidi. Ad esempio, KLD-12 (KLD) è un peptide autoassemblante con 12 residui aminoacidici che può adottano nanostrutture e sono noti per la loro proprietà ingegneristica tissutale. L'aggiunta di residui di Arg in KLD non mostra notevole cambiamento nella sua struttura secondaria del foglio- $\beta$  (Tripathi et al., 2015). È possibile, inoltre, utilizzare strutture dimeriche per migliorare l'attività antimicrobica degli AMP e ridurre la tossicità, ma gli effetti destabilizzanti della membrana sono ridotti dopo la formazione del dimero (Malekhaat Häffner e Malmsten, 2018).

### 1.4.5. MODIFICAZIONE CHIMICA

Varie modifiche chimiche degli AMP, inclusi i residui di fosforilazione, l'aggiunta di D-amminoacidi o amminoacidi innaturali (omoarginina), la ciclizzazione, l'alogenazione, il capping (modificazioni post-trascrizionali), la coniugazione, l'acetilazione e i peptidomimetici sintetici sono stati usati per migliorare la stabilità dei peptidi contro le proteasi. Dato che l'enzima è stereospecifico, l'incorporazione di aminoacidi D innaturali nella sequenza dell'AMP può invertire la stereochimica e prevenire la degradazione della proteasi (Zhong et al., 2020). I cosiddetto peptidomimetici, i cui elementi principali imitano la struttura dei peptidi, sono solitamente prodotti mediante



modifiche, come l'estensione di catena o l'incorporazione eteroatomica di peptidi esistenti (Patch e Barron, 2002). Ornine, che è un residuo innaturale con una carica positiva e con elevata resistenza all'attività proteasica, viene utilizzato anche nelle modificazioni non chimiche.

#### 1.4.6 USO DEI MOTIVI

Sono stati segnalati sempre più motivi con funzioni specifiche. Questi motivi possono essere ad unità ripetute per la combinazione di nuove peptidi antimicrobici o la combinazione specifica di unità aminoacidiche che compaiono alla fine o anche all'interno la catena peptidica.

##### 1.4.6.1 MOTIVI ALLA FINE DELLA CATENA

###### 1.4.6.1.1 Motivo ATCUN

Questo motivo include due strutture tripeptidiche, tra cui Gly–Gly–His o Val–Ile–His, che vengono aggiunti all'estremità terminale della catena peptidica. Gli AMP contenenti ATCUN in presenza di perossido di idrogeno e acido ascorbico si combinano con  $\text{Cu}^{2+}$  per indurre la valenza degli ioni di rame tra gli stati di ossidazione +2 e +3 e formando un complesso ATCUN-Cu (II), generando reazioni ROS di tipo Fenton-like. Le sostanze polimeriche extracellulari (EPS) sono importanti per i biofilm e possono aumentare la resistenza delle cellule agli agenti antibatterici (Flemming, 2016). Gli ATCUN-AMP sono stati utilizzati per degradare il DNA ambientale, che è uno dei componenti principali dell'EPS. Sono state riportate diverse applicazioni pratiche correlate. Ad esempio, l'attività biologica contro gli Enterobacteriaceae resistenti ai carbapenemi è aumentata con l'aggiunta di questo motivo all'estremità N-terminale di un AMP  $\alpha$ -elicoidale (come CM15). Inoltre, il derivato Cu-ATCUN di OV-3 che contiene una sequenza GGC C-terminale ha mostrato alti livelli di permeazione della membrana e di perossidazione lipidica.

###### 1.4.6.1.2 Rana Box

Rana box: è un motivo eptapeptidico (CGLXGLC) dalla famiglia della nigrocina. È composta da due residui di cisteina che sono separati da quattro o cinque altri residui da

un lato e può formare un legame disolfuro ciclico. Il peptide Rana box ha dimostrato analogie strutturali con la polimixina (colistina) e la sua struttura primaria è importante per determinar la sua attività batteriostatica (Kozić et al., 2015). La delezione del motivo Rana box sarà responsabile della scomparsa dell'effetto antibatterico dell'AMP, ma sostituendo la sequenza naturale della "Rana Box" di AMP con fenilalanina amidata può portare all'espansione della sua efficacia contro i microrganismi resistenti agli antibiotici, compreso l'MRSA e *P. aeruginosa*, con anche ridotta citotossicità. Questo fenomeno mostra anche che l'effetto del motivo sugli AMP deve essere determinato in base alla situazione specifica e non è completamente benefico (Bao et al., 2018).

#### 1.4.6.2 SINTESI DI PEPTIDI POLIVALENTI BASATI SU MOTIVI (DIMERI, TETRAMERI, ECC.)

La lattoferrina B bovina è un AMP composto da 25 residui aminoacidici e ha proprietà antibatteriche, antimicotiche e antiparassitarie. Le molecole multivalenti LfcinB (20–25)<sub>2</sub> e LfcinB (20–25)<sub>4</sub> contengono il motivo LfcinB (20–25) (RRWQWR) e mostrano attività di inibizione contro *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Il peptide chimero 3 contenente due motivi tra cui l'LfcinB(20-25) mostra un'elevata attività antibatterica contro *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 25923 (Vargas-Casanova et al., 2019; Pineda-Castañeda et al., 2020).

#### 1.4.7 PROGETTAZIONE INFORMATICA

La progettazione informatica comprende semplici modelli statistici e Studio delle relazioni struttura-attività (Abdel Monaim et al., 2018), reti neurali (Müller et al., 2018), deep learning (Veltri et al., 2018), word embedding (Hamid e Friedberg, 2018) e macchine learning. Ad esempio, un metodo di machine learning di Matlab viene proposto sulla base del concetto di punteggio del contributo di ciascun amminoacido all'attività antibatterica (Wu X. et al., 2014). L'algoritmo genetico è stato utilizzato per progettare il peptide anfifilico  $\alpha$ -elicoidale guavalina 2, che ha una composizione di aminoacidi non comune (tre residui di tirosina e tre di glutammina) e, cosa interessante, provoca l'iperpolarizzazione della membrana, meccanismo diverso da quelli degli altri AMP (Porto et al., 2018). Sono stati sviluppati due metodi di ricerca basati sul contesto

della ricerca sulla relazione quantitativa struttura-attività: metodo di previsione basato sull'indice terapeutico degli AMP e l'identificazione di nuovi potenziali AMP dal database di sequenza tag espresse, che si basano sui principi di sottoclassi di peptidi segnale altamente conservati correlate agli AMP (Juretic et al., 2011).

#### 1.4.8 PROGETTAZIONE RAZIONALE DELLA BIBLIOTECA

In questo modo è possibile ottenere diverse varianti di AMP. Se combinato con lo screening ad alto rendimento, può essere ottenuto efficacemente l'AMP desiderato. Ad esempio, alcuni nuovi AMP sono stati progettati dalla libreria peptidica combinatoria di melittina mostrando un'attività più elevata e una citotossicità inferiore (Krauson et al., 2015).

#### 1.5 I PEPTIDI ANTIMICROBICI: ARMI INNATE CONTRO MALATTIE

Dato l'ampio spettro d'azione degli AMP, la diversità nella loro sequenze e considerando le caratteristiche fisico-chimiche relative alle loro numerose fonti, possono trovare applicazione in campi diversi. Nello specifico, di seguito abbiamo affrontato l'idoneità degli AMP in ambito biomedico e farmacologico, tenendo conto dell'approccio farmacocinetico e farmacodinamico per sviluppare nuove molecole con attività antimicrobica.

Gli AMP sono tra le alternative più promettenti ai moderni antibiotici e hanno già trovato applicazioni cliniche in ambito medico, da soli o in sinergia con antibiotici esistenti. Gli AMP sono suscettibili alla proteolisi a causa delle loro caratteristiche chimiche e la loro attività è influenzata dalla concentrazione di sali e pH. Per questo motivo, l'applicazione più promettente per gli AMP nelle valutazioni cliniche sono quelle che coinvolgono applicazioni topiche (Hancock e Sahl, 2006). Anche la produzione endogena di AMP è rilevante e interessante per ulteriori studi. Ad esempio, è stato dimostrato che la somministrazione di butirrato di sodio induce la produzione di AMP intestinali, utili per il trattamento di malattie infettive o infiammatorie (Guaní-Guerra et al., 2010).

Tuttavia, l'ampio spettro di attività biologiche degli AMP suggerisce altri potenziali benefici clinici come per il trattamento del cancro e delle infezioni virali, nonché nella modulazione del sistema immunitario (Schweizer, 2009).

### 1.5.1 COINVOLGIMENTO DEGLI AMP NELLE MALATTIE DELL'APPARATO RESPIRATORIO

Le infezioni del tratto respiratorio inferiore sono coinvolte nei disturbi infiammatori respiratori cronici come la fibrosi cistica e la broncopatia cronico-ostruttiva. Nei pazienti con fibrosi cistica con infezione da *P. aeruginosa*, questo organismo produce AMP, come le piocine, che inibiscono la crescita di altri batteri vicini. Pertanto, gli stessi AMP potrebbero essere utilizzati come agente terapeutico per ridurre al minimo gli effetti dell'infezione, oltre a sradicare altri agenti patogeni sensibili. Le piocine derivate dai ceppi di *P. aeruginosa* hanno effetti tossici anche su *Haemophilus*, *Neisseria* e ceppi di *Campylobacter* e sono stati utilizzati con successo per il trattamento della peritonite nei topi (Scholl e Martin, 2008; Waite e Curtis, 2009).

È interessante notare che i neutrofili e le cellule epiteliali delle vie aeree producono degli AMP per prevenire l'infezione del sistema respiratorio da agenti patogeni. Nei pazienti con fibrosi cistica, *P. aeruginosa* induce la secrezione di sPLA2-IIA da parte delle cellule epiteliali delle vie aeree tramite un fattore di trascrizione Krüppel-like dipendente dalla (KLF)-2 pathway, questa conduce alla morte selettiva di *S. aureus* (Rahnamaeian, 2011).

Inoltre, il livello sierico del peptide umano LL-37 è maggiore nei pazienti con infezioni del tratto respiratorio inferiore rispetto alle persone sane (Majewski et al., 2018). Di recente è stato riportato che il peptide Esculentina (1–21), attivo sia su forme planctoniche che biofilm di *P. aeruginosa*, ha la capacità di prolungare la sopravvivenza dei modelli murini con polmoniti. I principali AMP rilevati nei tessuti polmonari e nelle secrezioni dei pazienti con fibrosi cistica sono sPLA2-IIA, l' $\alpha$ -defensine/HNP neutrofila, hBD e LL-37 (Hiemstra et al., 2016). Fenomeni simili sono stati descritti in malattie parodontali causate da *Porphyromonas gingivalis* in cui il peptide sPLA2-IIA è prodotto dalle cellule epiteliali orali mediante l'attivazione del recettore Notch-1 con uccisione dei batteri orali (Balestrieri et al., 2009).

### 1.5.2 AMP NELLA GUARIGIONE DI FERITE E INFEZIONI CUTANEE

Le infezioni della pelle e dei tessuti molli sono tra le più comuni infezioni microbiche negli esseri umani e gli AMP possono rappresentare una nuova opzione terapeutica grazie al loro ampio spettro d'azione biologica, poiché gli agenti patogeni della pelle includono batteri ma anche protozoi, funghi e virus (Sunderkötter e Becker, 2015). Inoltre, i preparati di AMP hanno il vantaggio di avere elevate concentrazioni nel sito target mediante la somministrazione topica a causa della loro scarsa capacità di penetrare nel flusso sanguigno. Inoltre, gli AMP possono favorire la guarigione delle ferite modulando la migrazione cellulare, l'angiogenesi, la chemiotassi e il rilascio di citochine (Ramos et al., 2011).

Ad esempio, l'hBD2 è indotto dall'attivazione del recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR) e può aumentare la migrazione dei cheratinociti e la produzione di citochine (Sørensen, 2016). Un altro è un peptide altamente espresso dai cheratinociti nei siti della ferita è rappresentato dalla defensina hBD3. Promuove la secrezione di citochine, la migrazione e proliferazione cellulare mediante la fosforilazione dell'EGFR e delle proteine STAT (Sørensen et al., 2005). Inoltre accelera la chiusura di ferite quando applicata localmente in un modello suino di ferita della pelle infetta (Hirsch et al., 2009). Del resto è stato dimostrato che hBD3 esibisce un'attività antinfiammatoria attraverso l'inibizione delle vie di segnalazione dei TLR (recettori Toll-like) nelle cellule immunitarie con conseguente repressione trascrizionale del gene proinfiammatorio (Semple et al., 2011).

Anche l'espressione del peptide LL-37 nella pelle aumenta dopo una ferita (Heilborn et al., 2003), e sembra essere coinvolto nella modulazione dell'angiogenesi. Infatti, il peptide LL-37 stimola la proliferazione delle cellule endoteliali e neovascolarizzazione attivando il formil peptide recettore-like 1 (FPR2/ALX) (Koczulla et al., 2003).

La psoriasi volgare è una malattia infiammatoria della pelle caratterizzata da proliferazione epidermica anormale e infiltrazione cellulare comprendente neutrofilo e cellule T (Davidovici et al., 2010). A causa dell'aumento del tasso di proliferazione dei cheratinociti psoriasici associati ad una riduzione della durata del ciclo cellulare, si ritiene che la psoriasi sia una malattia epidermica. Tuttavia, gli esperimenti eseguiti su topi con grave immunodeficienza combinata (SCID) hanno indicato che le eruzioni

psoriasiche sono indotte dalle cellule CD4+ e le cellule T svolgono un ruolo chiave nella patogenesi della psoriasi (Ellis et al., 1986; Wrone-Smith e Nickoloff, 1996).

I cheratinociti all'interno dell'epidermide delle placche psoriasiche sono anormali e tra le anomalie c'è l'eccessiva produzione di AMP che, nei vertebrati, si ritiene modifichino le risposte infiammatorie dell'ospite attraverso diversi meccanismi compresa la regolazione della proliferazione cellulare, attività chemiotattiche e angiogeniche (Lai e Gallo, 2009).

HNP1, HNP2, HNP3, hBD2 e hBD3 sono defensine identificate da estratti di scaglie di lesioni psoriasiche e la loro presenza potrebbe aiutare a spiegare perché una malattia iperproliferativa e non infettiva della pelle, come la psoriasi, subisca meno infezioni cutanee di quanto ci si aspetterebbe (Harder et al., 2001; Harder e Schröder, 2005). Studi eseguiti sul peptide LL-37 ha dimostrato di avere sia proprietà pro-infiammatorie che antinfiammatorie, può favorire la chemiotassi, l'angiogenesi e migliorare la riparazione delle ferite (Yang et al., 2000; Koczulla et al., 2003; Braff et al., 2005; Tokumaru et al., 2005; Mookherjee et al., 2006). Fromhm et al. sono stati i primi a segnalare che l'espressione di catelicidina/LL-37 è sovraregolata nella psoriasi epidermica e ha suggerito che questa induzione aumenta la capacità di difesa antimicrobica a livello della barriera interrotta nelle lesioni (Frohm et al., 1997). Successivamente è stato ipotizzato che LL-37 potrebbe favorire l'infiammazione nella psoriasi consentendo alle cellule dendritiche plasmacitoidi (pDC) di riconoscere il DNA autonomo attraverso TLR9 (Lande et al., 2007).

### 1.5.3 PEPTIDI INIBITORI DELL'ENZIMA DI CONVERSIONE DELL'ANGIOTENSINA I (ACE)

L'enzima di conversione dell'angiotensina I (ACE) è prodotto dai polmoni o dal tessuto renale e dalla membrana luminale delle cellule vascolari endoteliali. L'ACE converte il decapeptide inattivo angiotensina I (ANG I) nell'ottapeptide vasocostrittore angiotensina II (ANG II). ANGII è coinvolto in diverse condizioni cardiovascolari fisiologiche e fisiopatologiche come l'aterosclerosi e l'ipertensione (Wu C. H. et al., 2018). Gli ACE-inibitori sono utilizzati nel trattamento dell'ipertensione, ma possono causare gravi effetti collaterali, come tosse, rash ed edema (Wu C. H. et al., 2018).

Quindi, da questo deriva la necessità di identificare ACE inibitori nuovi e non tossici, la cui attività dipende dalla quantità e dal tipo di composizione aminoacidica.

È stato osservato che il legame con ACE è influenzato da amminoacidi idrofobici a livello del peptide C-terminale (Salampessy et al., 2017). Inoltre, aminoacidi come l'alanina, la valina, l'isoleucina e la glicina – che sono residui idrofobici con catene laterali alifatiche – nella porzione C-terminale sono associati ad un aumento dell'attività ACE inibitoria (Toopcham et al., 2017). SAGGYIW e APATPSFW sono due AMP in grado di agire come ACE inibitori potenzialmente adatti come peptidi antipertensivi. Sono prodotti nel glutine di frumento idrolizzato dalla proteasi *P. aeruginosa* e contengono triptofano all'estremità C-terminale (Zhang et al., 2020). Questa osservazione ha portato all'idea che la presenza di triptofano nell'estremità C-terminale di un peptide potrebbe influenzare l'attività dell'ACE inibitore bloccando il sito attivo dell'enzima tramite interazioni deboli, come legami elettrostatici, idrofobici, interazioni di Van Der Waals e legami idrogeno.

Un altro esempio è il peptide VEGY, che è stato isolato dalla *Chlorella ellipsoidea* marina e ha dimostrato di possedere attività ACE inibitoria e di essere stabile nei confronti degli enzimi gastrointestinali (Ko et al., 2012). Questo potenziale utilizzo degli AMP rappresenta certamente una via fruttuosa di ricerca e troverà probabilmente applicazioni cliniche in futuro.

#### 1.5.4 PEPTIDI INIBITORI DELLA LIPASI PANCREATICA

L'obesità e i disturbi del metabolismo degli acidi grassi sono molto diffusi. Una delle strategie farmacologiche per contrastare questi problemi sono l'inibizione dei lipidi alimentari. La lipasi pancreatica idrolizza il 50-70% del grasso derivato dal cibo nell'organismo umano e la sua inibizione viene sfruttata dal farmaco Orlistat utilizzato nel trattamento dell'obesità. Tuttavia, nel trattamento a lungo termine, questa strategia può causare effetti collaterali, come danni al pancreas e tossicità gastrointestinale (Cheung et al., 2013). Per questo motivo, la ricerca di nuovi composti in grado di inibire la lipasi pancreatica, senza esercitare effetti collaterali, rappresenta un'esigenza ancora viva per combattere questi disturbi. Finora sono stati identificati diversi AMP che sono in grado di manifestare questa attività, la quale dipende dalla struttura e dalla composizione aminoacidica del peptide (Hüttl et al., 2013). CQPHPGQTC,

EITPEKNPQLR e RKQEEDEDEEQRE sono tre peptidi derivanti dalla  $\beta$ -conglucina purificata della soia ed è stato dimostrato che inibiscono la lipasi pancreatica (Lunder et al., 2005; Martinez-Villaluenga et al., 2010), e sono sotto ricerca per potenziali applicazioni cliniche (Złotek et al., 2020).

### 1.5.5 PEPTIDI CON ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE

Lo stress ossidativo, causato da uno squilibrio tra le produzioni e rimozione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) nelle cellule e nei tessuti, possono favorire malattie come l'obesità, il diabete e malattie cardiache (Pizzino et al., 2017). Fattori di stress ambientale come le sostanze inquinanti, i metalli pesanti, gli xenobiotici, la dieta ricca di grassi e progressione dell'invecchiamento possono contribuire ad un aumento della produzione di ROS. Lo stress ossidativo è anche coinvolto in diversi disturbi neurologici come la Malattia di Alzheimer e Parkinson (Singh et al., 2019). È stato identificato un numero crescente di AMP antiossidanti da diverse fonti, inclusi animali, piante e insetti (Balti et al., 2010; Villadóniga e Cantera, 2019; Liang et al., 2020). L'attività antiossidante dei peptidi è correlata alla loro sequenza e alla composizione aminoacidica. In effetti, è stato suggerito che i residui di isoleucina, leucina e istidina potrebbero contribuire alla attività antiossidante degli estratti di acciughe di pesce fermentate (Najafian e Babji, 2019). Uno studio condotto da Wu et al. Sul peptide QMDDQ, proveniente da un idrolizzato proteico di gamberetti mostra che la potenza antiossidante potrebbe essere correlata al numero elevato di siti di idrogeno attivo (Wu et al., 2019). Le proprietà dei peptidi antiossidanti sono solitamente espresse con l'eliminazione dei radicali liberi, attività di chelazione di ioni metallici e inibizione della perossidazione lipidica (Jiang et al., 2020). Ad esempio, Zhang et al. ha dimostrato che il peptide VYLPR ha un effetto protettivo sul danno cellulare indotto da  $H_2O_2$  (Celle HEK-293) (Zhang et al., 2019). Inoltre, Liang et al. hanno studiato peptidi antiossidanti derivanti da una proteina idrolizzata da semi di Moringa oleifera e ne hanno dimostrato gli effetti protettivi sulle cellule epatiche di Chang esposte al danno ossidativo da  $H_2O_2$  (Liang et al., 2020). Jiang et al. identificato quattro peptidi AYI(L) e DREI(L) da idrolizzati proteici di Jiuzao in grado di diminuire la produzione di ROS nelle cellule HepG2 (Jiang et al., 2020).



### 1.5.6 AMP NELL'INFEZIONE INTESTINALE E INFIAMMAZIONE

La microflora batterica è essenziale per la salute umana e per lo sviluppo del sistema immunitario delle mucose. Nell'intestino tenue, le cellule di Paneth secernono  $\alpha$ -defensine in risposta da antigeni batterici, tra cui LPS e muramil-dipeptide (Ayabe et al., 2000). Petnicki-Ocwieja et al. hanno mostrato che l'attività battericida delle secrezioni della cripta dell'ileo terminale era compromesso dalla delezione del gene NOD2 (Petnicki-Ocwieja et al., 2009). La proteina umana NOD2 è un recettore citoplasmatico per molecole batteriche espresse principalmente nelle cellule di Paneth (Lala et al., 2003) ed è stato identificato come gene di suscettibilità per il Morbo di Crohn (Hugot et al., 2001). Un'espressione carente di  $\alpha$ -defensine nelle cellule di Paneth (HD5 e HD6) può contribuire alla fisiopatologia della malattia di Crohn (Bevins, 2006). È stato dimostrato che i topi privi di NOD2 non riescono ad esprimere criptidine, equivalenti delle  $\alpha$ -defensine umane (Kobayashi et al., 2005). Inoltre, l'espressione dell' $\alpha$ -defensina umana è ridotta nei pazienti affetti da morbo di Crohn, in particolare in quelli con mutazioni NOD2 (Wehkamp et al., 2005).

hBD1 è stata la prima defensina identificata nell'intestino crasso umano e nel colon non infiammato. È stata osservata una riduzione dell'espressione di hBD1 nella mucosa infiammata nei pazienti con malattie infiammatorie intestinali (Wehkamp et al., 2003). L'espressione di è stato dimostrato che l'espressione di hBD1, hBD2, hBD3 e hBD4 è sovra-regolato negli enterociti del colon di pazienti con colite ulcerosa (Fahlgren et al., 2004).

Inoltre, un importante interesse è stato dato al ruolo degli AMP nella lo stomaco, facilmente colonizzato dall'*Helicobacter pylori*. L'infezione da parte di questo batterio porta all'induzione di hBD2 (Wehkamp et al., 2003). È stato dimostrato che le cellule epiteliali gastriche sono indotte dall'*Helicobacter pylori* a sovra-regolare la produzione di hBD2 (Grubman et al., 2010).

Queste osservazioni rendono le defensine molto attraenti dal punto di vista farmacologico e può offrire un buon punto di partenza per future applicazioni cliniche dell'AMP.

## 1.6 FARMACOCINETICA E FARMACODINAMICO (PK/PD) APPROCCIO NELLA VALUTAZIONE DELLE APPLICAZIONI CLINICHE DI AMP

### 1.6.1 APPROCCIO PK/PD PER DETERMINARE L'EFFICACIA ANTIBATTERICA DELL'AMP

I principi di PK e PD che determinano la risposta agli AMP antimicrobici possono fornire ai clinici informazioni utili sul corretto regime posologico.

Dosler e colleghi hanno studiato le attività in vitro di AMP (indolicidina, cecropina [1–7]-melittina A [2–9] ammidici [CAMA] e nisina), da soli e in combinazione con antibiotici (daptomicina, linezolid, teicoplanina, ciprofloxacina e azitromicina) contro biofilm di MRSA standard e clinici, dimostrando che gli AMP migliorano l'efficacia PK in vitro di antibiotici tradizionali (Dosler e Mataraci, 2013).

Schmidt e colleghi hanno dimostrato che gli AMP (Onc72 e Onc112) raggiungono diversi organi entro 10 minuti dalla somministrazione endovenosa e dalla somministrazione intraperitoneale e gli esperimenti di PK spiegano l'elevata efficacia in vivo degli AMP indicando il loro potenziale utilizzo per il trattamento delle infezioni del tratto urinario (Schmidt et al., 2016). Questi dati però non sono sufficienti per prevedere l'esatta relazione tra dose, esposizione e risposta e vengono utilizzati modelli e simulazioni traslazionali di PK/PD per identificare il regime posologico più adatto nei pazienti. La modellizzazione PK/PD può fornire indizi utili riguardo alle molteplici correlazioni tra il tipo selezionato di AMP, le caratteristiche del batterio e la reazione dell'organismo ospite. Inoltre, nell'approccio in silico possono essere incorporati anche fattori complicanti, consentendo così di prevedere attentamente il giusto equilibrio tra uccisione batterica, effetti avversi e comparsa di resistenza. Questa pratica può, quindi, aiutare a identificare e ad ottimizzare la dose di agenti antibatterici nuovi e consolidati (Rathi et al., 2016). Come accennato, gli AMP influenzano la crescita di popolazioni batteriche diversamente dagli antibiotici (ampicillina, ciprofloxacina, gentamicina, kanamicina, neomicina, rifabutina, spectinomicina e tetraciclina), in particolare dal punto di vista della PD (Yu et al., 2016). Inoltre, Yu e colleghi, analizzando l'evoluzione della resistenza mediante modello predittivo, ha rilevato che le differenze in PD e nelle proprietà mutagene tra AMP e antibiotici produrre una probabilità molto più bassa che

la resistenza si evolverà contro gli AMP (Yu et al., 2018). Altri esperimenti con una varietà di AMP sono necessari per determinare se le caratteristiche PK/PD degli AMP possono essere generalizzate e se queste caratteristiche sono significativamente diverse dagli antibiotici. Tuttavia, tutti i dati disponibili suggeriscono che AMP sono significativamente diversi dagli antibiotici in termini di PD e proprietà mutagene e sono buoni candidati per rallentare l'evoluzione della resistenza.

### 1.6.2 APPROCCIO PK/PD PER DETERMINARE L'EFFICACIA DELL'AMP NELLE MALATTIE NON BATTERICHE

L'uso "giusto" degli AMP è fondamentale, non solo nel trattamento di infezioni batteriche ma anche in altre malattie per evitare la tossicità e limitare lo sviluppo di resistenza. Pochi studi hanno analizzato le proprietà PK/PD degli AMP in relazione alle malattie non batteriche. I peptidi antiossidanti AGPSIVH, FLLPH, e LLCVAV sono stati ottenuti da proteine idrolizzate di petto d'anatra. Da Li et al. e oltre agli effetti non tossici ha mostrato resistenza digestiva (Li et al., 2020). Xu e colleghi hanno utilizzato modelli in vitro e in vivo per studiare l'assorbimento e la potenziale attività antiossidante e metabolismo in vivo di WDHAPQLR derivato dalla proteina di colza (Xu et al., 2018). Koeninger e colleghi hanno dimostrato che hBD2 presenta una buona tollerabilità ed entra rapidamente nel torrente sanguigno in un modello sperimentale di colite dopo la sua somministrazione sottocutanea. Pertanto, oltre ad essere ben tollerato in vivo, potrebbe non solo agire solo a livello locale ma potrebbero anche avere effetti sistemici (Koeninger et al., 2020). Sono stati scoperti molti altri peptidi bioattivi nei recenti anni, ma le loro proprietà PK/PD sono ancora sconosciute. È quindi necessario aumentare gli studi per determinare l'efficace PK/PD degli AMP anche nelle malattie non batteriche.

## 1.7 FATTORI AMBIENTALI CHE INFLUISCONO SULL'ATTIVITÀ DEGLI AMP

### 1.7.1 IONI METALLICI

I cationi, come  $\text{Na}^+$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , possono influenzare l'attività degli AMP (Zhu et al., 2015). Tuttavia, le diverse valenze degli ioni metallici hanno effetti diversi sugli AMP. Ad esempio, cationi bivalenti mostrano un antagonismo più forte nei confronti dei batteri rispetto ai cationi monovalenti con tanatina e s-tanatina, che sono AMP degli insetti (Wu et al., 2008). In presenza di NaCl, la risposta del segnale durante la fase associativa è notevolmente diminuita negli esperimenti cinetici a ciclo unico e multi-ciclici, con conseguente diminuzione del tasso di associazione. Questo evento può essere causato dall'effetto schermante di NaCl tra il peptide cationico e la membrana zwitterionica. Un'altra possibile ragione è che il  $\text{Na}^+$  può legarsi al doppio strato fosfolipidico, dove gli ioni interagiscono con il fosfato e l'ossigeno carbonilico delle teste dei gruppi lipidici (Sabapathy et al., 2020). L'attività ridotta del peptide sintetico  $[\text{RLLR}]_5$  sotto un'elevata concentrazione di sale è probabilmente causata dalla distruzione della sua struttura ad elica.

Diversi AMP, inclusa l'istatina, mixinidina ed epcidina contengono motivi ATCUN (Amino Terminale Rame e Nichel con sequenza XXH). Il ferro è lo ione metallico più abbondante nella saliva umana, ma la combinazione con questo ione metallico causa la perdita dell' $\alpha$ -elica dell'istatina-5 e riduce notevolmente la sua attività antifungina (Puri et al., 2015). Tuttavia, la coordinazione degli ioni rame (II) e nichel (II) può indurre la formazione di ROS, essenziali per l'azione battericida (Je'zowska-Bojczuk e Stokowa-Sołtys, 2018).

Gli AMP anionici hanno un gran numero di residui aspartici e glutammici carichi negativamente (Lakshmaiah Narayana e Chen, 2015). Richiedono lo zinco come cofattore funzionale. Molti di questi AMP utilizzano ioni metallici per formare ponti salini cationici con i componenti carichi negativamente della membrana microbica per penetrarla. Gli AMP anionici possono attaccarsi ai ribosomi o inibiscono l'attività della ribonucleasi quando si trovano nel citoplasma (Je'zowska-Bojczuk e Stokowa-Sołtys, 2018).

Gli ioni metallici influenzano anche l'autoassemblaggio dei peptidi. Questi ioni possono riconoscere amminoacidi specifici, come la lisina e l'acido glutammico e può formare ponti salini tra le molecole peptidiche per indurre l'autoassemblaggio del peptide. Ad esempio,  $Zn^{2+}$  può stabilizzare l'aggregazione di peptidi sulla membrana cellulare, che si traduce in un effetto antibatterico potenziato del DCD-1L in presenza di  $Zn^{2+}$  (Tian et al., 2015).

### 1.7.2 pH

Molti AMP sono stabili e mantengono la loro attività antimicrobica in un ampio intervallo di pH. Gli AMP hanno un'attività potenziata a livelli bassi di pH grazie alle loro proprietà basiche. Questa condizione è correlata alla protonazione dell'istidina a pH acido, che favorisce interazioni elettrostatiche con superfici anioniche, incluso l'LPS e gli anioni dei fosfolipidi, e successivamente migliora le proprietà antibatteriche. L'effetto del pH sull'attività antibatterica degli AMP varia. Ad esempio, l'attività della Thanatina a pH neutro è leggermente superiore a quella in condizioni acide. Al contrario, l'attività dello xilano su *E. coli*, *Listeria* e *C. albicans* è notevolmente più alta a pH 5,5 che a pH 7,4 (Holdbrook et al., 2018). L'inattivazione dell'istidina contenente l'AMP C18G-His in condizioni di pH basso comporta cambiamenti pH-dipendenti nello stato degli aggregati nella soluzione, perché gli aggregati, che sono sensibili al pH e la composizione lipidica, possono essere influenzati dal legame e dalla conformazione. I peptidi possono anche aumentare la permeabilità della membrana batterica a pH basso (Hitchner et al., 2019). L'estremità C-terminale dei peptidi (TCP) derivato dalla trombina cambierà la modalità del CD14 (una proteina che è abbondante nel plasma umano) da antinfiammatorio a modalità di eliminazione batterica quando il pH varia da 7,4 a pH 5,5 (Holdbrook et al., 2018). È possibile creare un dimero (ad esempio P-113) per creare AMP con una resistenza ad un intervallo di pH più elevato. La sensibilità di questo AMP sensibile al pH può essere utilizzata per ottenere un certo effetto target nelle applicazioni pratiche. Inoltre, l'interazione di cariche è uno dei fattori più importanti nell'autoassemblaggio peptidico. Il pH influenza lo stato di carica degli amminoacidi e dei gruppi funzionali sostituenti. Pertanto, la regolazione del pH è il metodo più comune per controllare l'assemblaggio dei peptidi e il disassemblaggio (Tian et al., 2015).

### 1.7.3 PROTEASI

Le proteasi hanno un forte effetto distruttivo sugli AMP. Ad esempio, LL-37, che ha il più forte effetto inibitorio sull'infezione da clamidia, è inibito dal fattore attivante la proteasi clamidia-like (CPAF) secreto dalla clamidia (Tang et al., 2015). Gli studi si sono concentrati sulla progettazione di carrier di AMP per risolvere questo problema (Lewies et al., 2017; Nordström et al., 2019). La presenza di supporto solido chitosano-silice del peptide KR-12 può proteggerlo attraverso l'idrolizzazione dall' $\alpha$ -tripsina e il grado di protezione è aumentato del 38% rispetto al KR-12 libero (Diosa et al., 2020). Tuttavia, diversi enzimi, come la proteasi 65, l'esterasi 66 e fosfatasi 67, tagliano il gruppo bloccante del peptide e innescano l'autoassemblaggio del peptide, che influisce positivamente sul AMP (Tian et al., 2015).

## 1.8 SVILUPPO DI FARMACI E APPROCCI DI FORMULAZIONE PER AMP APPLICAZIONI

### 1.8.1 PRODUZIONE E COSTI - STUDIO PILOTA VS. PICCOLA SCALA INDUSTRIALE

Lo sviluppo di AMP come API (Active Pharmaceutical Ingredients) è stato notevolmente limitato dai loro costi di produzione. Sebbene la sintesi chimica di peptidi abbia un'elevata efficienza, sono anche complessi e costosi. Pertanto, dovrebbero essere presi in considerazione approcci naturali avanzati con l'obiettivo di aumentare la produzione di molecole alternative. L'ingegneria genetica può essere considerata una delle strategie più importanti per ottenere rese più elevate o una qualità più elevata di AMP.

Per ottenere gli AMP, sono coinvolti approcci biotecnologici che coinvolgono i batteri e i lieviti competenti, nonché piante transgeniche o animali, dovrebbero essere considerati (Sinha e Shukla, 2018). Gaglione e colleghi si sono concentrati su come ottimizzare la coltura batterica utilizzando una nuova composizione di brodo colturale. Fondamentalmente hanno considerato componenti poco costosi e prontamente disponibili contenenti quantità ben definite di ciascun nutriente. Hanno anche sostituito IPTG (isopropil  $\beta$ - d-1-tiogalattopiranoside) con zuccheri più economici e innocui, come il lattosio. In effetti, l'uso di IPTG potrebbe comportare un accumulo di alto costo

per scopi industriali. Complessivamente, la strategia ottimizzata di coltura batterica può contribuire ad un ulteriore sviluppo per migliorare la scalabilità della produzione degli AMP (Gaglione et al., 2019).

Tuttavia, sebbene i batteri possano produrre alcuni peptidi ciclici, non producono peptidi ricchi di disolfuro, quindi l'espressione ricombinante dei peptidi ciclici potrebbe essere eseguita meglio in lieviti o sistemi di espressione ricombinante di origine vegetale (Thorsthalm e Craik, 2012; Moridi et al., 2020).

Si stima che il costo di produzione degli AMP sia di circa \$ 50-400 per grammo di amminoacido prodotto da SPPS (Solid Phase Peptid Synthesis), quindi l'ingegneria biotecnologica o la fermentazione dovrebbero fornire un'alternative più economiche. Inoltre, l'identificazione, la caratterizzazione e produzione di nuovi AMP anche con il miglioramento della biotecnologia è costoso sotto molti punti di vista, quindi, potrebbe essere utile eseguire screening preliminari in vitro, per la valutazione delle caratteristiche fisico-chimiche, presunte modifiche nella struttura secondaria e presunta attività antimicrobica (Moretta et al., 2020).

Per quanto riguarda il mercato dei farmaci peptidici nel 2018, più di 50 farmaci peptidici sono stati commercializzati. Le vendite annuali di farmaci peptidici, compresi gli AMP, ammontano a circa 25 miliardi di dollari (Koo e Seo, 2019).

### 1.8.2 FORME DI DOSAGGIO AMP

Rispetto alle possibili modifiche di sequenza per potenziare la stabilità molecolare, lo sviluppo della piattaforma di somministrazione dei farmaci ha segnalato una minore attenzione finora. Come descritto in letteratura, le forme di dosaggio negli studi clinici in corso comprendono gel topico e idrogel, creme topiche, soluzioni a base di alcol polivinilico per somministrazione nella ferita, idrogel a base di acido ialuronico per la somministrazione nel sito chirurgico, soluzioni orali e collutori (Mahlapuu et al., 2016).

Per quanto riguarda la somministrazione cutanea, ustione e ferite cronica, queste possono presentare difficoltà di controllo, soprattutto nel caso di episodi causati dai patogeni ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e *Enterobacter* spp). La somministrazione topica di antimicrobici sulla pelle presenta numerosi vantaggi poiché offre un'elevata carica locale dell'antimicrobico. Inoltre, a causa del meccanismo d'azione pleiotropico, gli AMP possono contribuire a

combattere le infezioni da ESKAPE nonché per regolare vari meccanismi, tra cui i processi di infiammazione e guarigione delle ferite nell'ospiti (Kang et al., 2014; Vassallo et al., 2020). Tuttavia, gli AMP destinati al trattamento delle infezioni croniche della pelle e dei tessuti molli non devono (i) essere assorbite dalla ferita o dal sito di infezione alla circolazione sistemica, (ii) suscitare sensibilizzazione allergica. Amministrazioni topiche di AMP hanno dimostrato di non essere esenti da effetti collaterali sistemici dal momento che il trasporto del farmaco può avvenire anche attraverso gli strati cutanei e i follicoli capillari. Inoltre, il miglioramento della stabilità contro la degradazione enzimatica deve essere valutato quando vengono sviluppati i peptidi per scopi clinici. Inoltre, il bordo della membrana delle cellule epiteliali comprende diverse peptidasi da prendere in considerazione (ad es. elastasi leucocitaria, catepsine B e D, endopeptidasi zinco-dipendenti, collagenasi interstiziale), poiché sono caratterizzate da un'ampia specificità nel degradare i peptidi esogeni (Vlieghe et al., 2010; Lam et al., 2018; Pfalzgraff et al., 2018).

### 1.8.3 SISTEMA DI CONSEGNA

Nel contesto del Drug Delivery System (DDS), i peptidi giocando un ruolo importante come veicoli API, grazie alla loro intrinseca biodegradabilità e biocompatibilità (Giri et al., 2021). Nuovi DDS possono anche aiutare (i) a ridurre gli effetti collaterali avversi e (ii) a ottenere un rilascio controllato dell'AMP (Nordström e Malmsten, 2017; Martin-Serrano et al., 2019).

#### 1.8.3.1 IDROGEL – PANORAMICA E SVILUPPO DELLA PIATTAFORMA PER LA SOMMINISTRAZIONE CUTANEA E SUBDERMICA DI AMP

Gli idrogel (HG) comprendono materiali costituiti da veicoli idrofili e polimerici per intrappolare grandi quantità di acqua all'interno delle loro reti tridimensionali (3D) (Liu e Hsu, 2018). Come riporta l'Eur. Pharm 8, i gel sono costituiti da liquidi gelificati con agenti gelificanti idonei. Nello specifico, gli HG (cioè i gel idrofili) sono costituiti da preparazioni a base di acqua, glicerolo o glicole propilenico. Questi composti sono gelificati con amido, derivati della cellulosa, polossameri, carbomeri e silicati di



magnesio-alluminio (Farmacopea europea, 2016). Gli HG mostrano una biodisponibilità migliorata per le applicazioni su pelle danneggiata. Inoltre, le medicazioni per ustioni a base di HG (HBBD) sembrano appropriate in quanto forniscono un'adeguata copertura della ferita. Grazie ad una sensazione di raffreddamento che avviene per convezione ed evaporazione del solvente dalla ferita, l'HBBD può anche contribuire a dissipare il calore derivante dalla concomitante infiammazione (Fichman e Gazit, 2014; Goodwin et al., 2016). Anche gli HG sono stati ampiamente studiati poiché mostrano diversi potenziali di applicabilità che coprono la coltura cellulare (Caliari e Burdick, 2016), la medicina rigenerativa (Catoira et al., 2019) e gli sviluppi DDS.

Dopo le interazioni chimiche, come l'addizione di Michael, le reazioni delle basi di Diels-Alder o di Schiff, gli HG reticolati chimicamente formano la struttura matrice (Overstreet et al., 2012) (**Fig. 7**). Per ottenere un HG che supporti la chiusura della ferita, Bian e collaboratori hanno utilizzato chitosano modificato con anidride maleica e un derivato del glicole polietilenico, modificato con benzaldeide su entrambe le estremità. Attraverso una reazione a base di Schiff, l'HG ottenuto ha mostrato un comportamento di assottigliamento del taglio. Di conseguenza, era destinato ad essere iniettato/applicato nelle/sulle ferite, poiché era ideale ad adottare il contorno e a sigillare i difetti del tessuto danneggiato. Successivamente, la solidificazione dell'HG in situ è stata prontamente realizzata utilizzando la luce ultravioletta (Bian et al., 2019).

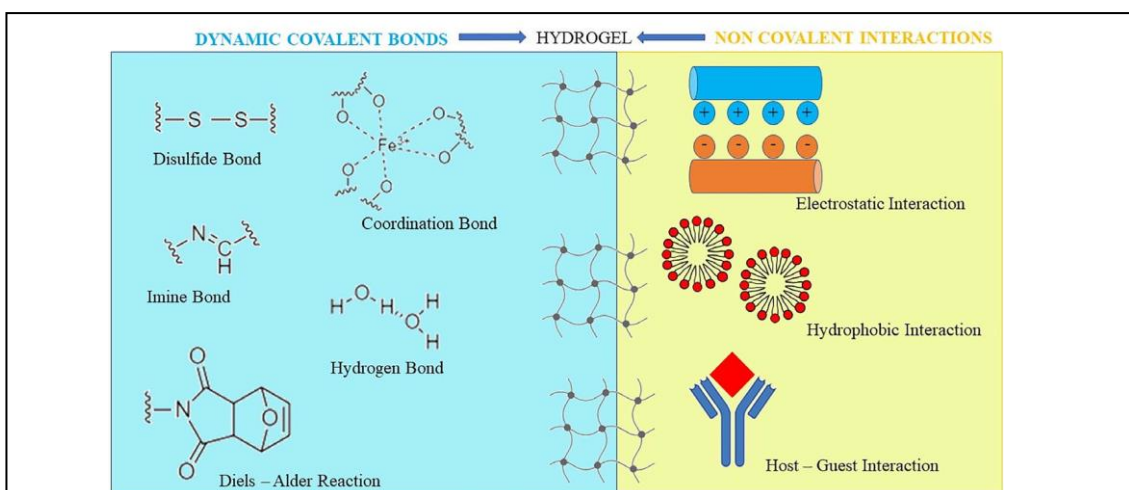


FIGURA 7. Legami chimici e fisici per ottenere idrogel. Gli idrogel possono anche essere preparati mediante un'interazione ibrida costituita da interazioni fisiche e/o formazione di legami covalenti, che mostrano allo stesso tempo proprietà meccaniche reversibili e stabilità a lungo termine.

L'HG può anche essere preparato mediante interazioni multiple non covalenti, mediante le quali gli elementi costitutivi monomerici possono autoassociarsi in strutture fibrose ordinate. Inoltre, sono adatti a interagire tra loro formando una rete 3D (Fichman e Gazit, 2014). Inoltre, grazie alla capacità di autoassemblaggio dei polimeri, ad esempio modificando il pH e la temperatura, il metodo di reticolazione fisica favorisce la formazione di HG più deboli e sensibili agli stimoli. Pertanto, gli HG possono modificare temporaneamente la struttura a causa della sollecitazione di forze meccaniche esterne e del comportamento di assottigliamento del taglio (Yan et al., 2010).

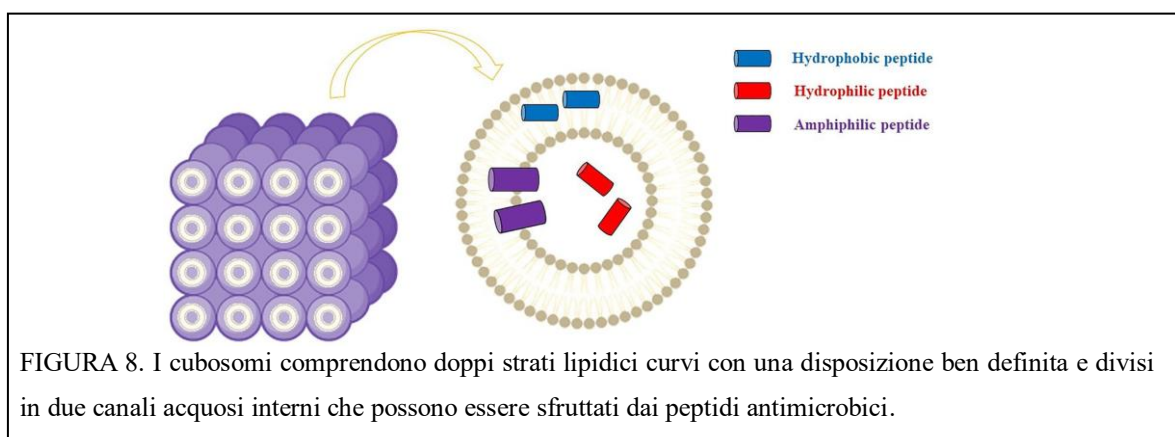
Poiché di solito non si osserva un cambiamento sostanziale nel volume, Gli HG sono adatti anche come veicoli iniettabili (Manna et al., 2019). Inoltre, l'HG possono anche polimerizzare in situ diventando un materiale che assottiglia il taglio dopo l'iniezione, consentendo, quindi, la consegna di AMP. L'HG che si forma in situ si è dimostrato utile per applicazioni oftalmiche, nonché per supportare la guarigione delle ferite dopo interventi chirurgici (Travkova et al., 2017). I materiali e le tecniche ampiamente utilizzati per scopi di chiusura chirurgica possono contribuire a fornire alcuni svantaggi. Pertanto, la contaminazione da impurità presenti nell'aria o da perdita di fluido può contribuire al danno da infezione microbica (Rajabi et al., 2020). Inoltre, gli HG medicati possono rilasciare AMP nel sito d'azione dopo la distruzione della matrice interna dovuta a erosione, gonfiore o tramite interazioni enzimatiche (Chen M. H. et al., 2017).

Li e colleghi hanno formulato un HG termosensibile per il trattamento di guarigione delle ferite cutanee, per indagare se gli AMP incapsulati in questa formulazione HG si sono dimostrati candidati efficienti nella gestione delle ferite. Hanno utilizzato un tipo di AMP multifunzionale di derivazione umana (cioè AP-57), con un'attività antimicrobica ad ampio spettro e una capacità di regolazione immunitaria. Il peptide AP-57 è stato racchiuso prima in nanoparticelle biocompatibili, denominate AP-57-NP. Successivamente, per facilitare la loro applicazione nella riparazione delle ferite cutanee, le AP-57-NP sono state ulteriormente incapsulate in una matrice HG (AP-57-NPs-H). Come riportato, il sistema di formazione del gel in situ ha mostrato in vitro una bassa citotossicità e un comportamento di rilascio prolungato del farmaco. (Li et al., 2015).

Un metodo diverso per ottenere HG nella fase acquosa è la chimica della polidopamina ispirata alle cozze. Uno studio di Khan e colleghi ha riportato l'uso del catecolo, invece della dopamina, come reticolante con polimeri ricchi di ammine per preparare film sottili. Il catecolo è meno costoso della dopamina; quindi, è stato utilizzato con  $\epsilon$ -poli-L-lisina (EPL), un AMP naturale prodotto da *Streptomyces albulus*, per fabbricare HG con proprietà antimicrobiche. EPL-catechol HG ha mostrato proprietà antimicrobiche e antibiofilm in vitro contro *A. baumannii* multiresistente, associate a una buona biocompatibilità con una linea cellulare di mioblasti di topo e in vivo ha ridotto la carica batterica e migliorato la guarigione delle ferite quando applicato localmente sulla pelle di un topo con un'ustione di secondo grado ferita infettata anche da *A. baumannii* multiresistente (Khan et al., 2019). Lee e colleghi hanno progettato impianti corneali di nanoparticelle-HG contenenti l'AMP umano LL-37: sebbene non siano già stati condotti studi in vivo, questo dispositivo potrebbe inibire l'attacco in vitro dell'HSV-1 alle cellule oculari (Lee et al., 2014). Un esempio di AMP di insetti formulato come HG è stato registrato da *Lucilia sericata*, sia in bende per ferite che in cosmetici per ostacolare i patogeni dermatologici (Mylonakis et al., 2016).

### 1.8.3.2 SISTEMA DI CONSEGNA DEL CUBOSOMA

I Cubosomi rappresentano sistemi di scaffold alternativi per la somministrazione di farmaci costituiti da un doppio strato lipidico continuo curvo che può essere realizzato con molecole anfifiliche. I sistemi lipidici anfifilici più comuni possono comprendere acqua e gliceril monooleato (OGM) (2,3-diidrossipropil (9Z)-9-ottadecenoato). Dispersioni simili mostrano diverse disposizioni di autoassemblaggio, tra cui le fasi cubiche bicontinue (**Fig. 8**).



In pratica, fasi cubiche bicontinue possono essere ottenute disperdendo il sistema lipidico anfifilico nella fase acquosa utilizzando, ad esempio, ultrasonificazione o omogeneizzazione. Successivamente si ottiene un gel disperso, noto come cubosoma (CB) (Karami e Hamidi, 2016). Come risultato dell'effetto idrofobico, vengono realizzate strutture termodinamicamente stabili con una disposizione ben definita di ciascun componente (cioè il gel cristallino liquido cubico). Queste nanostrutture si sono dimostrate adatte per carichi idrofili, idrofobi e anfifilici.

Anatomicamente, lo strato corneo rappresenta una forte barriera per la veicolazione transdermica dei farmaci applicati localmente, a causa della presenza dello strato cutaneo esterno ed altamente organizzato. La capacità del CB di aderire allo strato corneo rende il CB effettivamente utile nella somministrazione di farmaci topici per i tessuti mucosi (Gaballa et al., 2020). La struttura e le proprietà dei CB forniscono un veicolo promettente per la somministrazione transdermica di farmaci, in particolare per le infezioni cutanee (Zeng et al., 2012; Meikle et al., 2019).

Gli AMP possono essere assorbiti nelle strutture CB che solitamente mostrano una carica leggermente negativa. Ad esempio, Boge e colleghi hanno dimostrato che la struttura del CB a base di OGM contribuisce a proteggere gli AMP dalla degradazione proteolitica, migliorando la loro biodisponibilità dopo la somministrazione topica. Inoltre, hanno scoperto che gli AMP caricati sul CB vengono rilasciati in quantità elevate nell'ambiente indipendentemente dalla presenza di *P. aeruginosa* o di elastasi neutrofila umana.

### 1.8.3.3 ALTRI SISTEMI DI SOMMINISTRAZIONE DI FARMACI

Alcuni aspetti negativi sono legati ai nanocarrier a base lipidica: oltre alla scarsa stabilità, sono anche suscettibili all'aggregazione in vitro e all'attività esterasica. Quest'ultimo aspetto potrebbe anche influenzare la relazione tra il rilascio controllato in vitro e quello in vivo del carico. Successivamente, sono stati esplorati materiali alternativi ai lipidi, inclusi nanovettori polimerici autoassemblati per preparare sistemi sia vescicolari che bicontinui. Rispetto ai lipidi, le strutture polimeriche a blocchi (BPS) possono essere sintetizzate da un ampio pool di monomeri anfifilici. Pertanto, i BPS, detti anche polimerisomi, hanno dimostrato un'elevata flessibilità alla funzionalizzazione, insieme a strutture ben definite che possono essere distinte sia in

sezioni idrofobiche che idrofile. Pertanto, il BPS può mostrare vantaggi sostanziali che coinvolgono sia la stabilità meccanica che quella chimica (Allen et al., 2019).

La maggior parte delle formulazioni di AMP negli studi clinici in corso appartengono a preparati semisolidi per uso esterno (Koehbach e Craik, 2019; Koo e Seo, 2019; Sheard et al., 2019). Pertanto, tra le formulazioni topiche, le formulazioni in gel topico sono spesso menzionate in diversi lavori di ricerca per trattare, ad esempio, infezioni croniche della pelle e dei tessuti molli. Inoltre, le proteine ma anche i peptidi più lunghi compresi tra 20 e 30 aminoacidi possono anche autoassemblarsi naturalmente per ottenere motivi ad  $\alpha$ -eliche o fogli- $\beta$ . Allo stesso modo, due filamenti  $\beta$  antiparalleli possono piegarsi nel motivo  $\beta$ -forcina, che contribuisce a creare fibre di ordine superiore e veicoli di ingredienti farmaceutici attivi pH-sensibili. Recentemente, peptidi funzionali specifici sono stati sintetizzati e utilizzati come nanomateriali utili. In particolare, proprietà importanti hanno caratterizzato un gruppo speciale di peptidi sintetici chiamati anfifili peptidici (PA). Sono costituiti essenzialmente da quattro sequenze: (i) una coda idrofobica (ad esempio, residuo di acido palmitico); una porzione interna in grado di formare  $\beta$ -sheet, che comprende (ii) una sequenza amminoacidica che promuove tramite legame idrogeno la formazione di strutture simili a fibrille; (iii) uno spaziatore contenente amminoacidi carichi per consentire la solubilità e la reticolazione (Cui et al., 2010); all'estremità opposta della struttura (iv) si trova la testa idrofila che innesca la segnalazione per la risposta biologica. A causa dell'organizzazione molecolare e delle caratteristiche chimiche, i PA possono organizzarsi spontaneamente in una nanostrutture utilizzando un comportamento folding-like per formare nanostrutture specifiche, tra cui micelle e microtubi (**Fig. 9**).

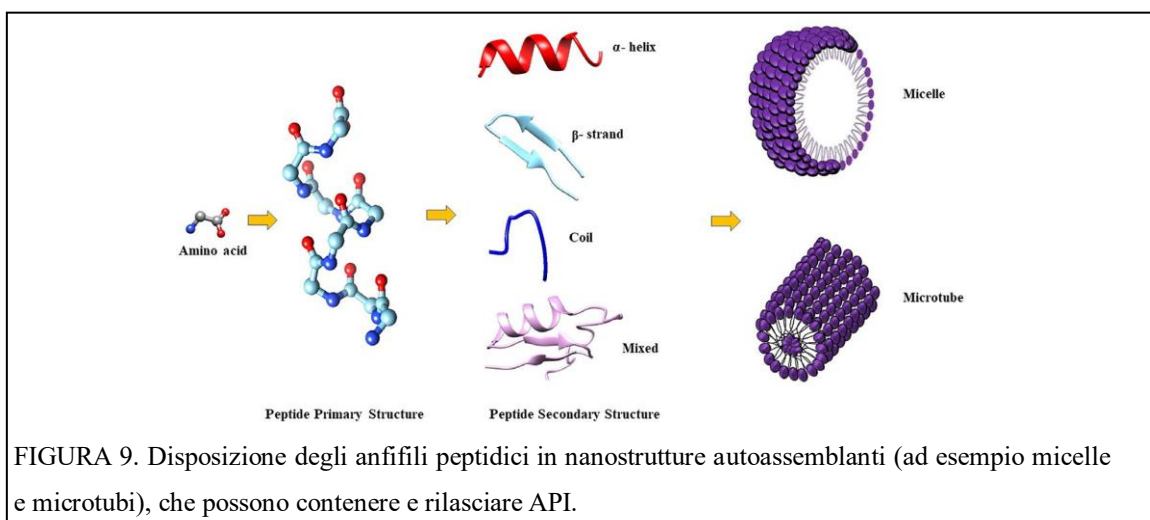


FIGURA 9. Disposizione degli anfifili peptidici in nanostrutture autoassemblanti (ad esempio micelle e microtubi), che possono contenere e rilasciare API.

Quindi, per stabilizzare il sistema in uno stato energetico inferiore, le molecole di PA possono organizzare le catene alchiliche lontano dall'ambiente acquoso, esponendo all'esterno la porzione idrofila. L'attitudine all'autoassemblaggio degli elementi costitutivi della difenilalanina (Di-Phe) può essere utilizzata per ottenere diverse nanostrutture supramolecolari, come nanofibrille o nanofili. Queste strutture hanno dimostrato un'ampia applicabilità grazie alla loro biocompatibilità, elevata capacità di carico e semplicità ad ottenere le nanostrutture autoassemblate. Inoltre, i nanoassemblaggi formati da Di-Phe hanno mostrato un'attività antibatterica intrinseca (Schnaider et al., 2017).

Tali nanostrutture possono migliorare considerevolmente la stabilità del principio attivo farmaceutico poiché diventano meno sensibili alla degradazione enzimatica. Allo stesso modo, la maggior parte degli AMP che formano  $\alpha$ -eliche o  $\beta$ -sheet potrebbero essere inseriti in nanostrutture supramolecolari. Questa strategia potrebbe contribuire, quindi, a un rilascio adeguato di AMP senza l'utilizzo di veicoli aggiuntivi. Al contatto con l'agente patogeno, la nanostruttura peptidica viene distrutta, soprattutto dalle peptidasi, e rilascia l'AMP.

#### 1.8.4 VIE DI SOMMINISTRAZIONE

Rispetto ad altre vie di somministrazione, la via intramuscolare o sottocutanea potrebbe non richiedere una stabilità eccessiva del peptide. Infatti, le caratteristiche fisico-chimiche e biologiche dell'AMP potrebbero essere prese meno in considerazione in queste vie di somministrazione, mentre le dimensioni, la permeazione attraverso la membrana gastrointestinale, la scarsa stabilità del pH gastrico e la suscettibilità agli enzimi proteolitici rendono la somministrazione orale molto difficile (Schiffner, 2011).

Pertanto, l'iniezione rappresenta la migliore via di somministrazione per la maggior parte degli AMP (Di, 2015). Tuttavia, la somministrazione endovenosa espone certamente i peptidi all'attività esterasica e peptidasica presente nel siero (Vlieghe et al., 2010; Fosgerau e Hoffmann, 2015).

La via orale rimane un'opzione a misura di paziente, grazie alla somministrazione non invasiva e indolore. Tuttavia, considerando poche eccezioni, le tecnologie farmaceutiche orali non hanno mostrato miglioramenti radicali per quanto riguarda la formulazione di AMP per aumentarne la biodisponibilità. Gli sforzi principali riguardano la stabilità dei

peptidi dovuta alla presenza di peptidasi pancreatiche, ad es.  $\alpha$ -chimotripsina, tripsina ed elastasi pancreatica secrete dal pancreas nel tratto gastrointestinale (Vlieghe et al., 2010; Aguirre et al., 2016; Malhaire et al., 2016).

Inoltre, l'alto dosaggio e la bassa esposizione sistemica consentono di minimizzare gli effetti collaterali sistemici quando un farmaco viene formulato per la somministrazione polmonare. I farmaci inalatori di peptidi si sono dimostrati superiori in termini di rapida insorgenza (Larijani et al., 2005). I macrocicli peptidici con effetto antimicrobico che funzionano come mimetici degli epitopi proteici possono anche essere formulati per l'inalazione, grazie all'adeguata stabilità chimica. POL6014, un inibitore dell'elastasi neutrofila (Murepavadin®), può essere somministrato tramite il sistema di nebulizzazione eFlow® per trattare le infezioni polmonari legate alla fibrosi cistica ed è attualmente in Fase I/II (NCT03748199, 2018).

In conclusione, le applicazioni topiche che coinvolgono il caricamento di AMP in nanoparticelle, idrogel, creme, gel e unguenti rappresentano le applicazioni AMP più utilizzate e meglio sviluppate e sono necessari ulteriori studi per sfruttare nuove vie di somministrazione adeguate.

## 1.9 PROGRESSI ATTUALI E APPLICAZIONE DI ANTIMICROBICI PEPTIDI

### 1.9.1 MEDICINA

I peptidi antimicrobici possono regolare le reazioni proinfiammatorie, reclutare cellule, stimolare la proliferazione delle cellule, promuovere la guarigione delle ferite, modificare l'espressione genetica de uccidere le cellule tumorali per partecipare alla regolazione immunitaria di malattie cutanee, infezioni respiratorie e malattie infiammatorie (de la Fuente- Núñez et al., 2017). Ad esempio, le  $\alpha$ -defensine HNP-1, HNP-2, e HNP-3 hanno mostrato un'attività antibatterica efficace contro gli adenovirus, il virus del papilloma umano, il virus dell'herpes, il virus dell'influenza e citomegalovirus. Le malattie polmonari, come la fibrosi idiopatica polmonare, la proteinosi alveolare e la sindrome da distress respiratorio acuto, mostrano livelli elevati di AMP (Guaní-Guerra et al., 2010). Allo stesso modo, gli AMP secreti dalle cellule di

Paneth nell'intestino dei mammiferi è importante per modellare il microbiota intestinale (Bevins e Salzman, 2011). L'applicazione degli AMP in medicina, come le infezioni dentali e chirurgiche, la guarigione delle ferite e l'oftalmologia si stanno sviluppando ora. Ma ci sono solo tre AMP approvati dalla FDA tra cui gramicidina, daptomicina e colistina.

Carie dentale, infezioni endodontiche, candidosi e le malattie parodontali sono malattie comuni nella cavità orale umana. La carie dentale è una malattia orale prevalente e alcuni batteri acidogeni come lo *Streptococcus* sp. sono i principali agenti patogeni associati (Izadi et al., 2020). Diversi AMP hanno buon potenziale applicativo. Ad esempio, il peptide ZXR-2 (FKIGGFIKKLWRSLLA) ha mostrato potenti attività contro batteri patogeni della carie dentale, lo *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* e *Porphyromonas gingivalis* e il peptide PAC-113 che è stato venduto come farmaco da banco a Taiwan per il trattamento della candidosi orale (Chen L. et al., 2017).

Nelle infezioni chirurgiche e nella guarigione di ferite: le infezioni chirurgiche che avvengono dopo un intervento chirurgico, ustioni, lesioni accidentali, malattie della pelle e le infezioni croniche delle ferite rappresentano un grave pericolo per la vita umana (Thapa et al., 2020). Diversi AMP hanno dimostrato un effetto terapeutico potenziale per queste malattie. Ad esempio, l'AMP PXL150 mostra efficacia pronunciata come agente antinfettivo nelle ferite da ustione nei topi e l'AMP D2A21 è stato nella terza fase di studi clinici per il trattamento delle infezioni delle ferite da ustione (Björn et al., 2015).

In oftalmologia: gli occhi umani tendono ad essere infettati da diversi organismi, tra cui batteri e funghi in cui *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Aspergillus* spp., e *C. albicans* sono i patogeni più rilevanti (Silva et al., 2013). Sebbene gli AMP come la lattoferricina B, la protegrina-1 mostrano attività antimicrobica contro questi batteri patogeni, la loro applicazione nel campo dell'oftalmologia è solo in fase teorica. Con la popolarità delle lenti a contatto e l'aumento dei casi di infezioni oculari correlate, i peptidi antimicrobici hanno mostrato buone prospettive di applicazione in oftalmologia (Khan e Lee, 2020).

È necessario eseguire metodi aggiuntivi per l'applicazione degli AMP come farmaci in medicina. Le principali strategie includono (1) costruire precursori per ridurre la citotossicità e migliorarla stabilità delle proteasi, (2) utilizzando AMP in combinazione



con agenti antibatterici esistenti, (3) inducendo la corretta espressione di AMP con farmaci appropriati e utilizzando probiotici ingegneristici come vettori per esprimere gli AMP. Ad esempio, nel campo della riparazione delle ferite, diverse strategie di formulazione, come ad esempio AMP carichi in nanoparticelle, idrogel, creme, gel, unguenti o capsule di carta di riso glutinoso sono stati sviluppati per fornire efficacemente gli AMP alla ferita (Borro et al., 2020; Thapa et al., 2020).

Mezzi più tecnici, inclusi AMP marcati con feromoni, AMP attivati dall'ambiente locale (farmaco con precursore enzimatico, sistemi di rilascio, AMP attivati da pH) sono stati sviluppati per migliorare il meccanismo di targeting degli AMP. Inoltre, nanotubi, punti quantici, grafene e nanoparticelle metalliche sono stati proposti come un metodo potenziale per migliorare la somministrazione farmaceutica di AMP (Magana et al., 2020). Peptidi ibridi sono stati utilizzati anche per costruire peptidi target. Per esempio, PA2, che è un peptide mirato a *P. aeruginosa*, è stato combinato con GNU7 (un AMP ad ampio spettro) per costruire un peptide ibrido (PA2-GNU7) che prende di mira la proteina OprF e ha buona attività battericida e specificità (Kim et al., 2020). Inoltre, alcuni antibiotici, ad esempio la daptomicina (un lipopeptide), la lugdunina (un peptide ciclico a 21 membri, costituito da 6 residui aminoacidici oltre ad una frazione tiazolidinica) e la telavancina (un glicopeptide) sono stati ampiamente utilizzati in clinica (Durand et al., 2019; Lampejo, 2020). Sebbene siano antibiotici, hanno fornito idee più ampie per la progettazione degli AMP.

## 1.9.2 ALIMENTI

I conservanti alimentari hanno un potenziale danno al corpo umano. Pertanto, i conservanti naturali vengono sostenuti da più persone. Gli AMP hanno un buon effetto inibitorio sui batteri comuni e funghi negli alimenti e molti AMP sono resistenti agli acidi, gli alcali e le alte temperature vengono facilmente idrolizzate dalle proteasi nel corpo umano. Pertanto, gli AMP rappresentano un'alternativa promettente ai conservanti. La nisina è una batteriocina prodotta da *L. lactis*. L'acido lattico dei batteri è stato ampiamente utilizzato come conservante alimentare. La nisina è classificata come generalmente riconosciuta come sicura (GRAS) dalla Food and Drug Administration (FDA) statunitense e è usata come conservante alimentare in altri paesi (Khan e Oh, 2016). Tuttavia, attualmente sono approvate dalla FDA solo la nisina e la polilisina

come additivi alimentari (Santos et al., 2018). Pedocin PA-1, una batteriocina composta da 44 aminoacidi prodotta da un diplococco, viene utilizzato anche come conservante alimentare e viene venduta sul mercato con il nome commerciale di ALTA 2431. Pedocin PA-1 è utilizzato come additivo alimentare per inibire la crescita di *L. monocytogenes*, che può provocare il deterioramento della carne (Settanni e Corsetti, 2008). L'enterocina AS-48 è un AMP utilizzato per conservare succhi di frutta e verdura e l'enterocina CCM4231 è utilizzata per conservare il latte di soia (Rai et al., 2016; Santos et al., 2018). L'incapsulamento delle batteriocine nei liposomi è un nuovo metodo utilizzato per superare i problemi degli AMP nelle applicazioni alimentari (es. la degradazione proteolitica o interazione con ingredienti alimentari) (da Silva Malheiros et al., 2010).

Inoltre, il packaging attivo mediante l'aggiunta di AMP è un nuovo metodo di confezionamento che ha un grande potenziale nel settore alimentare. Ad esempio,  $\epsilon$ -poli-L-lisina viene utilizzata insieme al biofilm di amido per mostrare buoni effetti inibitori sull'*Aspergillus parasiticus* (produttore di aflatossina) e *Penicillium expansum* e la nisina ha il potenziale per essere un conservante del latte perché è una molecola altamente tensioattiva (Luz et al., 2018).

### 1.9.3 ZOOTECCNIA E ACQUACOLTURA

L'Unione Europea ha vietato l'uso di promotori della crescita animale nei mangimi per animali nel 2006. Pertanto, una nuova strategia antibatterica è necessaria. Molti AMP possono essere utilizzati nel pollame, nell'allevamento di suini e ruminanti e acquacoltura perché possono migliorare le performance produttive, l'immunità e promuovere la salute intestinale e alcuni di essi hanno un effetto inibitorio più forte sull'infiammazione batterica se usato con antibiotici (Wang et al., 2019; Cote et al., 2020). Ad esempio, SIAMP ha un buon effetto sul trattamento dell'IBV nel pollo (Sun et al., 2010). La caerina 1.1 e i peptidi NK-lisina (NKLP) hanno buoni effetti inibitori su Nodavirus, sul virus della setticemia emorragica, virus della necrosi pancreatica infettiva e virus della viremia primaverile della carpa, che sono devastanti per la piscicoltura (León et al., 2020).

#### 1.9.4 AGRICOLTURA

Per l'agricoltura, l'infezione fitopatogena di batteri e i funghi causano grandi perdite economiche, ad esempio l'infezione da *Aspergillus flavus* del mais e arachidi, muffa verde degli agrumi causata da *Penicillium digitatum*, malattia della muffa grigia da *Botrytis cinerea* su fragole e infezioni di *Geotrichum citriaurantium* degli agrumi causano tutti gravi danni per la crescita e la post-raccolta dei prodotti agricoli (Liu et al., 2007; Liu et al., 2019). Diversi AFP hanno dimostrato una prospettiva per controllare questi problemi. Tuttavia, l'applicazione pratica dei peptidi antimicrobici nel trasporto e la conservazione dei prodotti agricoli è ancora carente, perché l'uso di peptidi antimicrobici aumenterà di molto i costi di trasporto di frutta e verdura (vengono mostrati esempi di applicazione degli AMP in questi quattro campi nella **tabella 1**).

|                    | AMP/Nome prodotto | Trattamento/effetto   | Riferimenti               |
|--------------------|-------------------|---|---------------------------|
| <b>Medicina</b>    | Dalbavancina      | Infezioni cutanee batteriche acute  | <b>Approvato</b>          |
|                    | Fuzeon            | Infezioni da HIV-1  | <b>Approvato</b>          |
|                    | Bacim             | Infezioni localizzate della pelle, occhi e ferite   | <b>Approvato</b>          |
|                    | Vancocina         | Infezioni batteriche  | <b>Approvato</b>          |
|                    | Daptomicina       | Infezioni gram-positive   | <b>Approvato</b>          |
|                    | Telavancina       | Infezioni cutanee, polmonite nosocomiale  | <b>Approvato</b>          |
|                    | Colistina         | Infezioni MDR causate da batteri gram-negativi  | <b>Approvato</b>          |
|                    | Gramicidina       | Malattie cutanee purulenti  | <b>Approvato</b>          |
|                    | D2A21             | Infezioni di ferite da ustione  | <b>Fase III</b>           |
|                    | Omiganan          | Rosacea papulopustolosa   | <b>Fase III</b>           |
| <b>Alimenti</b>    | Nisina            | Latticini ( <i>Listeria monocytogenes</i> and <i>Staphylococcus aureus</i> )                  | <b>Approvato</b>          |
|                    | Polilisina        | Sushi, riso bollito, noodles, carne, and bevande  | <b>Approvato</b>          |
| <b>Allevamento</b> | SGAMP             | Stress da caldo   | Hu et al., 2017           |
|                    | Caerina1.1        | <i>L. garvieae</i> , virus della diarrea epidemica suina                                      | León et al., 2020         |
|                    | Dicentracina      | <i>L. garvieae</i> , setticemia emorragica virale, virus pancreatico infettivo                | León et al., 2020         |
| <b>Agricoltura</b> | PAF26             | Muffa verde   | Wang et al., 2018         |
|                    | O3TR/C12O3TR      | <i>P. digitatum</i>   | Li X. et al., 2019        |
|                    | Ponicina W1       | <i>M. oryzae</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , and <i>Fusarium graminearum</i> , marciume acido | Orivel et al., 2001       |
|                    | Mastoparan-S      | G <sup>+</sup> , G <sup>-</sup> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus fumigates</i> ,   | Zare-Zardini et al., 2015 |

TABELLA 1. Esempi di applicazione degli AMP in vari ambiti.

## 2. MATERIALI E METODI

### 2.1 PEPTIDI ANTIMICROBICI (AMP)

In questo studio sono stati utilizzati diversi peptidi antimicrobici (AMP) di diversa origine: Citropina 1.1, Temporina A, Pexiganan (da anfibi), CA(1–7)M(2–9)NH<sub>2</sub>, Pal-KGK-NH<sub>2</sub>, Pal- KKKK- NH<sub>2</sub> (composti di sintesi) e LL-37 (catelicidina) (**Tabella 2**). Le soluzioni madre di Citropina 1.1, Temporina A, CA(1–7)M(2–9)NH<sub>2</sub> e LL-37 sono stati preparate in acqua distillata, mentre quelli di Pal-KGK-NH<sub>2</sub>, Pal-KKKK-NH<sub>2</sub> e Pexiganan in dimetilsolfossido (DMSO). Le soluzioni madre acquose sono state filtrate a 0,22 µm e tutte le soluzioni sono state mantenute a 4°C al buio.

| AMP                          | Sequenze di aminoacidi  | Rif. |
|------------------------------|---|------|
| Citropina 1.1                | GLFDVIKKVASVIGGL-NH <sub>2</sub>  | [32] |
| Temporina A                  | FLPLIGRVLSGIL- NH <sub>2</sub>  | [32] |
| CA(1–7)M(2–9)NH <sub>2</sub> | Peptide ibrido Cecropina A-melittina [CA(1-7)M(2-9)NH <sub>2</sub> ] KWKLFKKIGAVLKVL- NH <sub>2</sub> | [26] |
| LL-37                        | LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLV<br>PRTES   | [33] |
| Pexiganan                    | GIGKFLKKAKKFGKAFVKILKK- NH <sub>2</sub>   | [32] |
| Pal-KGK- NH <sub>2</sub>     | Palmitoil-Lis-Gli-Lis- NH <sub>2</sub>  | [34] |
| Pal-KK- NH <sub>2</sub>      | Palmitoil-Lis-Lis- NH <sub>2</sub>  | [26] |
| Pal-KKKK- NH <sub>2</sub>    | Palmitoil-lis-Lis-Lis-Lis- NH <sub>2</sub>  | [34] |

**Tabella 2.** Peptidi antimicrobici (AMP) utilizzati nello studio

### 2.2. CARATTERIZZAZIONE DEI CEPPI BATTERICI

I ceppi di *Staphylococcus aureus* sono stati isolati e gentilmente forniti dal Laboratorio di Microbiologia dell'Azienda Ospedaliera-Universitaria delle Marche (Ancona, Italia). In breve, i tamponi clinici di ferite (n=5), ferite chirurgiche (n=4), ferite profonde (n=2) e lesioni cutanee (n=4) (**Tabella 3**) sono stati strisciati sulla superficie delle piastre di agar sangue ( Oxoid , Milano, Italia) e incubate a 37°C per 24-48h. Presunte colonie positive sono state identificate come *S. aureus* **mediante spettrometria di massa MALDI-TOF (Vitek MS, bioMérieux, Durham, NC)**, mentre la suscettibilità antimicrobica dei ceppi isolati è stata determinata mediante microdiluizione in brodo con il sistema Vitek 2 (bioMérieux), utilizzando le schede di identificazione Vitek 2

Gram positive secondo le indicazioni del produttore. I breakpoint EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) sono stati utilizzati per determinare la resistenza agli antibiotici come segue:  $\geq 0,25$   $\mu\text{g/ml}$  per la penicillina G (PEN);  $\geq 1$   $\mu\text{g/ml}$  per clindamicina (CLI), rifampicina (RIF) e tigeciclina (TIG);  $\geq 2$   $\mu\text{g/ml}$  per daptomicina (DAP), gentamicina (GEN), levofloxacina (LEV) e acido fusidico (FUS);  $\geq 4$   $\mu\text{g/ml}$  per eritromicina (ERY), oxacillina (OXA), teico planina (TEC), tetraciclina (TET) e vancomicina (VAN);  $\geq 8$   $\mu\text{g/ml}$  per linezolid (LZD) e trimetoprim sulfametossazolo (SXT) (**Tabella 4**). Tutti gli MRSA isolati sono stati regolarmente mantenuti in Tryptic Soy Agar (TSA) (*Oxoid*) e conservato a  $-20^{\circ}\text{C}$  in Brodo nutriente (NB) (*Oxoid*) integrato con il 20% di glicerolo.

| <b>Campione</b> | <b>Fonte di isolamento</b> |
|-----------------|----------------------------|
| 357426          | lesione cutanea            |
| 351004          | ferita chirurgica          |
| 350355          | ferita chirurgica          |
| 360212          | ferita                     |
| 354432          | ferita chirurgica          |
| 348839          | ferita profonda            |
| 355663          | ferita chirurgica          |
| 353417/2        | ferita                     |
| 352867          | ferita                     |
| 355872          | lesione cutanea            |
| 358357          | ferita                     |
| 351138          | ferita                     |
| 351139          | ferita profonda            |
| 357723          | lesione cutanea            |
| 359890          | ferita chirurgica          |

**Tabella 3.** Provenienza dei campioni clinici sottoposti a identificazione microbiologica

| Antibiotico             | 357426   | 351004   | 350355   | 360212   | 354432   | 348839   | 355663   | 353417/2 | 352867   | 355872   | 358357   | 351138   | 351139   | 357723   | 359890   |
|-------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Penicillina G           | >0.5 R   | >0.5 R   | >0.5 R   | >0.5 R   | >0.5 R   | >0.5 R   | >0.5 R   | >0.5 R   | >0.5 R   | 0.25 R   | >0.5 R   | >0.5 R   | >0.5 R   | >0.5 R   | >0.5 R   |
| Screening ceftioxina    | +        | +        | +        | +        | +        | +        | +        | +        | +        | +        | +        | +        | +        | +        | +        |
| Oxacillina              | >= 4 R   | >= 4 R   | >= 4 R   | >= 4 R   | >= 4 R   | >= 4 R   | >= 4 R   | >= 4 R   | >= 4 R   | >= 4 R   | >= 4 R   | >= 4 R   | >= 4 R   | >= 4 R   | >= 4 R   |
| Gentamicina             | >=16 R   | <=0.5 S  | >=16 R   | >=16 R   | >=16 R   | >=16 R   | <=0.5 S  | <=0.5 S  | >=16 R   | <=0.5 S  | >=16 R   | >=16 R   | >=16 R   | >=16 R   | >=16 R   |
| Levofloxacina           | >=8 R    | >=8 R    | >=8 R    | >=8 R    | >=8 R    | >=8 R    | <=0.25 S | >=8 R    | >=8 R    | <=0.12 S | >=8 R    | >=8 R    | >=8 R    | >=8 R    | >=8 R    |
| Eritromicina            | 0.5 S    | >=8 R    | >=8 R    | >=8 R    | >=8 R    | >=8 R    | <=0.25 S | >=8 R    | >=8 R    | <=0.25 S | >=8 R    | >=8 R    | >=8 R    | >=8 R    | >=8 R    |
| Clindamicina            | 0.25 S   | >=4 R    | >=4 R    | 0.25 S   | >=4 R    | >=4 R    | <=0.12 S | >=4 R    | >=4 R    | <=0.12 S | >=4 R    | >=4 R    | >=4 R    | >=4 R    | >=4 R    |
| Linezolid               | 2 S      | 2 S      | 2 S      | 2 S      | 2 S      | 1 S      | 2 S      | 2 S      | 2 S      | 2 S      | 2 S      | 1 S      | 1 S      | 2 S      | 2 S      |
| Daptomicina             | 0.25 S   | 0.5 S    | 0.5 S    | 0.5 S    | 0.5 S    | 0.5 S    | 1 S      | 0.25 S   | 0.5 S    | 0.25 S   | 0.5 S    | 0.5 S    | 0.5 S    | 0.25 S   | 0.25 S   |
| Teicoplanina            | <=0.5 S  | <=0.5 S  | <=0.5 S  | <=0.5 S  | <=0.5 S  | <=0.5 S  | <=0.5 S  | <=0.5 S  | <=0.5 S  | <=0.5 S  | <=0.5 S  | <=0.5 S  | <=0.5 S  | <=0.5 S  | <=0.5 S  |
| Vancomicina             | 1 S      | 1 S      | 1 S      | <=0.5 S  | 1 S      | 1 S      | 2 S      | 1 S      | 1 S      | 1 S      | 1 S      | 1 S      | <=0.5 S  | 1 S      | <=0.5 S  |
| Tetraciclina            | <=1 S    | <=1 S    | <=1 S    | <=1 S    | <=1 S    | <=1 S    | <=1 S    | <=1 S    | <=1 S    | <=1 S    | <=1 S    | <=1 S    | <=1 S    | <=1 S    | <=1 S    |
| Tigeciclina             | <=0.12 S | <=0.12 S | <=0.12 S | <=0.12 S | <=0.12 S | <=0.12 S | <=0.12 S | <=0.12 S | <=0.12 S | <=0.12 S | <=0.12 S | <=0.12 S | <=0.12 S | <=0.12 S | <=0.12 S |
| Acido fusidico          | <=0.5 S  | <=0.5 S  | <=0.5 S  | <=0.5 S  | <=0.5 S  | <=0.5 S  | <=0.5 S  | <=0.5 S  | <=0.5 S  | <=0.5 S  | <=0.5 S  | <=0.5 S  | <=0.5 S  | <=0.5 S  | <=0.5 S  |
| Rifampicina             | <=0.03 S | <=0.03 S | >=4 R    | <=0.03 S | >=4 R    | >=4 R    | <=0.03 S | <=0.03 S | >=4 R    | <=0.03 S | <=0.03 S | <=0.03 S | <=0.03 S | >=4 R    | >=4 R    |
| Trim/sulfam.            | <=10 S   | <=10 S   | 20 S     | 40 S     | <=10 S   | <=10 S   | >=320R   | <=10 S   | <=10 S   | <=10 S   | <=10 S   | <=10 S   | <=10 S   | <=10 S   | <=10 S   |
| Induz. all-clindamicina | -        | -        | -        | +        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        |

**Tabella 4.** Sensibilità agli antibiotici dei ceppi clinici isolati di MRSA valutati dal sistema Vitek 2. I dati rappresentavano i valori MIC in mg/ml.

### 2.3 CONCENTRAZIONE MINIMA INIBITRICE (IMC)

Le MIC di ciascun AMP contro i ceppi isolati di MRSA sono state determinate utilizzando la tecnica della microdiluzione del brodo, seguendo le linee guida del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). I ceppi batterici sono stati incubati in Mueller Hinton Broth (MHB, Oxoid) durante la notte a 37 °C, successivamente le sospensioni batteriche sono state regolate mediante spettrofotometro a una densità ottica (OD<sub>610 nm</sub>) corrispondente a circa 10<sup>6</sup> cellule/ml. A questo punto, 50 µl di ciascuna sospensione batterica sono stati inoculati in piastre da 96 pozzetti con un uguale volume di ciascun AMP (concentrazioni finali da 128 a 0,125 µg/ml). Successivamente, le piastre sono state incubate a 37°C per 24 ore. Per ogni ceppo di MRSA sono stati inclusi un controllo positivo (100 µl di sospensione batterica) e un controllo negativo (100 µl di MHB). Per le soluzioni AMP preparate in DMSO (Pal-KGK-NH<sub>2</sub>, Pal-KKKK-NH<sub>2</sub> e Pexiganan), sono stati eseguiti saggi preliminari per

escludere una possibile attività batteriostatica e/o battericida del DMSO; in ogni caso, il volume di DMSO aggiunto in ciascun pozzetto non ha mai superato il 5% (v/v) del volume totale finale.

Al termine del periodo di incubazione, le piastre sono state osservate per determinare il valore di MIC, corrispondente al pozzetto con la più bassa concentrazione antimicrobica in cui la crescita batterica non è più visibile. La densità ottica (600 nm) di ciascun pozzetto è stata valutata utilizzando un lettore di micropiastre Multiscan Ex (Thermo Scientific, Italia). Tutti i dati sono stati espressi come media di tre esperimenti indipendenti eseguiti in duplicato.

#### 2.4. ATTIVITÀ ANTIMICROBICA AMP MEDIANTE STUDI TIME-KILL TEMPO-DIPENDENTE

Gli AMP che mostravano valori MIC più bassi sono stati usati per eseguire studi di attività tempo-dipendente contro ceppi di MRSA selezionati. A tale scopo, i ceppi sono stati fatti crescere in 10 ml di MHB (Oxoid) durante la notte a 37°C. Dopo l'incubazione, 500 µl di ciascuna sospensione batterica, contenente circa 10<sup>7</sup> ufc/ml (aggiustata mediante spettrofotometro a OD<sub>610nm</sub> di 0,15-0,18), sono stati incubati a 37°C con o senza 500 µl di ciascun AMP ai relativi valori MIC e 2MIC. Al tempo 0 e dopo 2, 4 e 6 ore di incubazione, è stata raccolta un'aliquota di 0,1 ml di ciascun campione, diluita in serie in soluzione fisiologica sterile e seminata in triplicato (10 µl ciascuno) su TSA. Le piastre sono state incubate per 24 ore a 37°C e successivamente osservate per il conteggio di cfu/ml. Tutti i dati sono stati espressi come media di tre esperimenti indipendenti eseguiti in duplicato.

#### 2.5 ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il programma Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA). I dati sono stati espressi come media ± deviazione standard. Le ipotesi per il test parametrico sono state verificate prima di eseguire l'analisi. Quando le ipotesi per il test parametrico non sono state rispettate, sono stati eseguiti test non parametrici (Mann Whitney, Kruskal-Wallis) con i test di confronto multipli di Dunn. Il livello di significatività è stato sempre considerato con  $\alpha = 0,05$ .

### 3. RISULTATI

#### 3.1 DETERMINAZIONE DELLA MIC DEGLI AMP

I dati relativi all'attività antimicrobica dei diversi AMP sono riassunti nella **Tabella 5**. Come mostrato, tra gli AMP testati, Pal-KGK-NH<sub>2</sub> ha mostrato la maggiore attività antimicrobica contro gli isolati di MRSA esaminati, con il valore di MIC più basso (1 µg/ml) osservato contro MRSA 355872. Le MIC per gli altri ceppi erano comprese tra 4 e 32 µg/ml, con la sola eccezione del ceppo MRSA 353417/2 (128 µg/ml).

Una tendenza simile è stata evidenziata per Temporin A e CA(1-7)M(2-9)NH<sub>2</sub>, con valori di MIC compresi tra 4 e 16 µg/ml per tutti i ceppi di MRSA testati. Per quanto riguarda la Citropina 1.1, è stato osservato un valore MIC di 16 µg/ml contro MRSA 357426, MRSA 355872, MRSA 348839 e MRSA 351138, mentre per i restanti ceppi sono stati determinati valori MIC più elevati (32 e 64 µg/ml). Una minore attività antimicrobica è stata evidenziata per Pexiganan, Pal-KKKK-NH<sub>2</sub> e LL-37, con valori di MIC compresi tra 32 e 128 µg/ml; inoltre, nel caso di Pexiganan e LL-37, le MIC sono risultate superiori a 128 µg/ml per almeno due ceppi di MRSA.

| MRSA isolati | Citropina 1.1 | Temporina A | CA(1-7)M(2-9)NH <sub>2</sub> | Pal-KGK-NH <sub>2</sub> | Pal-KKKK-NH <sub>2</sub> | Pexiganan | LL-37 |
|--------------|---------------|-------------|------------------------------|-------------------------|--------------------------|-----------|-------|
| 357426       | 16            | 8           | 8                            | 4                       | 32                       | 32        | >128  |
| 351004       | 64            | 4           | 8                            | 32                      | 32                       | 16        | 128   |
| 350355       | 64            | 4           | 16                           | 16                      | 32                       | 32        | 128   |
| 360212       | 64            | 8           | 16                           | 32                      | 32                       | 128       | >128  |
| 354432       | 64            | 8           | 8                            | 8                       | 32                       | 128       | >128  |
| 348839       | 16            | 4           | 8                            | 8                       | 32                       | 64        | >128  |
| 355663       | 32            | 8           | 8                            | 8                       | 16                       | 16        | 128   |
| 353417/2     | 16            | 16          | 16                           | 128                     | 32                       | 64        | 64    |
| 352867       | 32            | 16          | 16                           | 8                       | 32                       | 128       | >128  |
| 355872       | 16            | 4           | 8                            | 1                       | 32                       | 32        | >128  |
| 358357       | 32            | 4           | 8                            | 4                       | 32                       | 32        | 64    |
| 351138       | 16            | 8           | 8                            | 8                       | 64                       | 128       | 128   |
| 351139       | 64            | 16          | 16                           | 16                      | 64                       | >128      | 128   |
| 357723       | 64            | 4           | 8                            | 16                      | 32                       | 32        | 64    |
| 359890       | 32            | 8           | 16                           | 32                      | 32                       | 128       | >128  |

Tabella 5. Determinazione dei valori MIC (µg/ml) per i diversi AMP rispetto a 15 isolati clinici di MRSA.

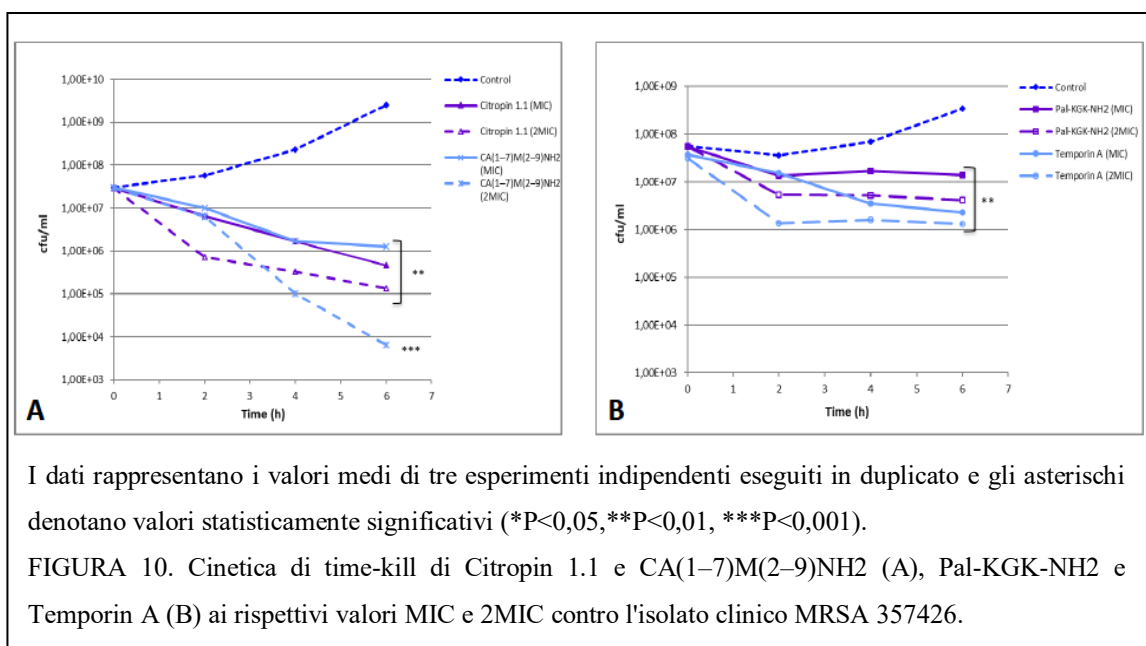


### 3.2 ATTIVITÀ ANTIMICROBICA DEGLI AMP MEDIANTE STUDI TIME-KILL TEMPO-DIPENDENTE

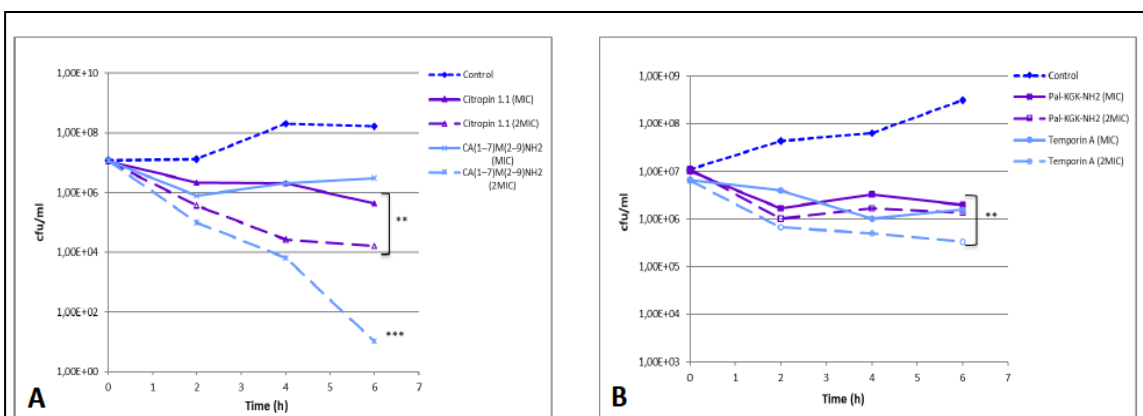
Sulla base della maggiore attività antimicrobica ( $MIC \leq 16 \mu\text{g/mL}$ ), citropina 1.1, temporina A, CA(1-7)M(2-9)NH<sub>2</sub> e Pal-KGK-NH<sub>2</sub> sono stati selezionati per eseguire studi time-kill contro tre ceppi rappresentativi di MRSA (357426, 355872 e 348839). Anche il ceppo di riferimento *S. aureus* ATCC 43300 è stato incluso come controllo interno.

I dati relativi all'attività antimicrobica degli AMP selezionati sono stati presentati in **Fig. (10-12)**. Come mostrato, dopo 2 ore di incubazione con Citropina 1.1 (concentrazione MIC), la vitalità di MRSA 357426 si è ridotta a  $6,67 \times 10^6$  ufc/ml, mentre lo stesso tempo di contatto con Citropina 1.1 (2MIC) ha causato una diminuzione della vitalità a  $7,33 \times 10^5$  ufc/ml, rispetto a  $5,67 \times 10^7$  ufc/ml del controllo. L'incubazione prolungata con Citropina 1.1 per 4 h ha indotto una diminuzione più notevole della vitalità di MRSA 357426, con  $1,67 \times 10^6$  e  $3,33 \times 10^5$  cfu/ml registrati in presenza di Citropin 1.1 a Valori MIC e 2MIC, rispettivamente. Dopo 6 ore di esposizione si sono osservate le riduzioni più significative dei valori ufc/ml, fino a  $1,33 \times 10^5$  ufc/ml in presenza di Citropina 1,1 (valore 2MIC). Per quanto riguarda CA(1-7)M (2-9)NH<sub>2</sub> (2MIC), durante l'esperimento è stata osservata una diminuzione costante di ufc/ml; in particolare, dopo 6 h di incubazione, la vitalità di MRSA 357426 si è ridotta a  $6,67 \times 10^3$  cfu/ml rispetto a  $2,50 \times 10^9$  cfu/ml del controllo non trattato ( $P < 0,001$ ). Al contrario, l'incubazione con CA(1-7)M (2-9)NH<sub>2</sub> alla concentrazione MIC, ha causato una minore diminuzione della vitalità, fino a  $1,27 \times 10^6$  cfu/ml dopo 6 ore di contatto (**Fig. 10A**).

L'incubazione di MRSA 357426 per 2 e 4 ore con Pal KGK-NH<sub>2</sub> alla concentrazione MIC ha indotto una moderata riduzione della vitalità batterica (rispettivamente  $1,33 \times 10^7$  e  $1,67 \times 10^7$  cfu/ml), rispetto ai controlli non trattati ( $3,53 \times 10^7$  e  $6,80 \times 10^7$  cfu/ml) ( $P < 0,01$ ); d'altra parte, alla concentrazione 2MIC, la conta batterica è diminuita fino a  $4,13 \times 10^6$  ufc/ml nel tempo prolungato di incubazione (6 h), rispetto a  $3,47 \times 10^8$  ufc/ml del relativo controllo ( $P < 0,01$ ). Nel caso di Temporin A (MIC e 2MIC), la riduzione più notevole della vitalità di MRSA 357426 è stata osservata dopo 6 ore di incubazione, rispettivamente con  $2,3 \times 10^6$  e  $1,33 \times 10^6$  cfu/ml, rispetto a  $3,47 \times 10^8$  cfu/ml ml del controllo ( $P < 0,01$ ) (**Fig. 10B**).



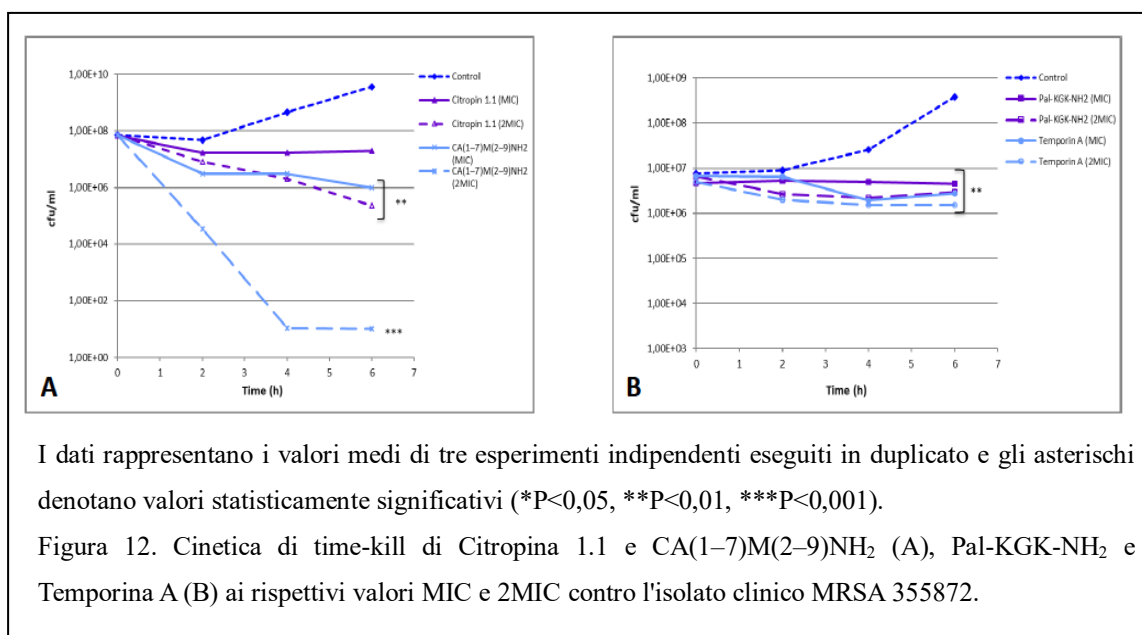
Nel caso di MRSA 355872, l'incubazione per 2h con Citropina 1.1 ai suoi valori MIC e 2MIC, ha indotto una diminuzione non marcata della vitalità ( $1,67 \times 10^7$  e  $8,0 \times 10^6$  cfu/ml rispettivamente) rispetto ai relativi controlli ( $4,67 \times 10^7$  cfu/ml). Dopo 6 ore, la vitalità di MRSA 355872 è stata ridotta a  $2,0 \times 10^7$  cfu/ml e  $2,33 \times 10^5$  cfu/ml (valori MIC e 2MIC rispettivamente), rispetto a  $3,63 \times 10^9$  cfu/ml del campione non trattato ( $P < 0,01$ ). Al contrario, l'incubazione per 2 h con CA(1-7)M(2-9)NH<sub>2</sub> alle concentrazioni MIC e 2MIC, ha causato una diminuzione della vitalità di MRSA 355872, rispettivamente con  $3,0 \times 10^6$  e  $3,33 \times 10^4$  cfu/ml, rispetto a  $4,67 \times 10^7$  cfu/ml del controllo. Riduzioni crescenti dei valori ufc/ml sono state poi osservate dopo 4 h di incubazione, fino a  $1,07 \times 10^4$  cfu/ml (2MIC). In ogni caso, la diminuzione più evidente è stata indotta dopo 6 ore di incubazione con solo  $1,03 \times 10^1$  cfu/ml rispetto a  $3,63 \times 10^9$  cfu/ml del relativo controllo ( $P < 0,001$ ) (**Fig. 11A**). L'esposizione per 2 e 4h di MRSA 355872 a Pal-KGK-NH<sub>2</sub> e Temporina A ai valori MIC e 2MIC ha determinato una trascurabile riduzione della vitalità, mentre è stata osservata una notevole riduzione dopo 6 h, con valori compresi tra  $2,90 \times 10^6$  cfu/ml nel caso di Pal-KGK-NH<sub>2</sub> (2MIC) rispettivamente a  $1,50 \times 10^6$  cfu/ml per Temporina A (2 MIC), in confronto a  $4,53 \times 10^6$  cfu/ml del relativo controllo ( $P < 0,01$ ) (**Fig. 11B**).



I dati rappresentano i valori medi di tre esperimenti indipendenti eseguiti in duplicato e gli asterischi denotano valori statisticamente significativi (\*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001).

FIGURA 11. Cinetica di time-kill di Citropina 1.1 e CA(1-7)M(2-9)NH<sub>2</sub> (A), Pal-KGK-NH<sub>2</sub> e Temporin A (B) ai rispettivi valori MIC e 2MIC contro l'isolato clinico MRSA 348839.

Dopo 2 ore di contatto, Citropina 1.1 ha ridotto la vitalità di MRSA 348839 a  $2,10 \times 10^6$  e  $3,67 \times 10^5$  cfu/ml rispettivamente ai valori MIC e 2MIC, contro  $1,33 \times 10^7$  cfu/ml registrati per il controllo. Una riduzione più evidente della vitalità è stata osservata dopo 4 h di incubazione, con  $2,0 \times 10^6$  e  $2,67 \times 10^4$  cfu/ml in presenza di Citropina 1,1 rispettivamente ai valori MIC e 2MIC, rispetto a  $2,0 \times 10^8$  cfu/ml del campione di controllo. Il tempo di incubazione prolungato (6 h) ha ridotto la vitalità fino a  $4,33 \times 10^5$  cfu/ml (a MIC) e  $1,67 \times 10^4$  cfu/ml (a 2MIC) rispetto a  $1,63 \times 10^8$  cfu/ml del controllo (P < 0,01). È interessante notare che l'incubazione per sole 2 ore con CA(1-7)M(2-9)NH<sub>2</sub>, ha causato una riduzione della vitalità di MRSA 348839, con  $8,0 \times 10^5$  e  $1,0 \times 10^5$  cfu/ml rispettivamente alle concentrazioni MIC e 2MIC, a partire da  $1,33 \times 10^7$  cfu/ml del controllo. La riduzione più notevole della vitalità batterica è stata osservata dopo 6 ore di incubazione con CA(1-7)M(2-9)NH<sub>2</sub> alla concentrazione 2MIC, fino a  $1,03 \times 10^1$  cfu/ml rispetto a  $1,63 \times 10^8$  cfu/ml del relativo controllo (P < 0,001) (Fig. 12A). Nel caso di MRSA 348839, la presenza di Pal-KGK-NH<sub>2</sub> e Temporina A, ai valori MIC e 2MIC, ha determinato un'evidente diminuzione di cfu/ml durante tutti gli esperimenti di time-kill tempo-dipendente del batterio, raggiungendo le riduzioni più notevoli dopo 6 h di incubazione, con  $1,33 \times 10^6$  cfu/ml (Pal-KGK-NH<sub>2</sub> 2MIC) e  $3,33 \times 10^5$  cfu/ml (Temporina A 2MIC) rispetto a  $3,10 \times 10^8$  cfu/ml del controllo non trattato (P<0,01) (Fig. 12B). L'attività antimicrobica degli AMP selezionati contro il ceppo di riferimento ha confermato i risultati precedentemente pubblicati [17, 18] (dati non mostrati).



### 3.3 ATTIVITÀ DEGLI AMP SELEZIONATI CONTRO GLI ISOLATI DI MRSA

I dati relativi all'attività dei diversi APM in termini di inibizione della crescita batterica sono stati riassunti nella **Tabella 6**. Si può notare che, tra i peptidi esaminati, i composti più attivi sono risultati essere la Citropina 1.1 e il CA(1-7)M(2-9)NH<sub>2</sub>, che mostra una frequenza relativamente elevata di percentuali di inibizione della crescita >30 % (in questo studio arbitrariamente scelto come indice di attività antimicrobica) per tutti gli isolati clinici di MRSA testati. Al contrario, Pal-KGK-NH<sub>2</sub> e Temporina A hanno mostrato minore attività, nella maggior parte dei casi con percentuali di inibizione della crescita <30%. Come previsto, l'attività antimicrobica osservata era dose-dipendente, con le più alte percentuali di crescita batterica (88,14 e 89,39%) osservate utilizzando gli AMP 2MIC concentrati.

|        | Inibizione della crescita indotta da |               |                              |               |             |               |                         |        |
|--------|--------------------------------------|---------------|------------------------------|---------------|-------------|---------------|-------------------------|--------|
|        | Citropina 1.1                        |               | CA(1-7)M(2-9)NH <sub>2</sub> |               | Temporina A |               | Pal-KGK-NH <sub>2</sub> |        |
| MRSA   | MIC                                  | 2MIC          | MIC                          | 2MIC          | MIC         | 2MIC          | MIC                     | 2MIC   |
| 357426 |                                      |               |                              |               |             |               |                         |        |
| 2h     | 11.99%                               | 24.35%        | 9.72%                        | 12.27%        | 4.80%       | 18.71%        | 5.61%                   | 10.88% |
| 4h     | 25.65%                               | <b>34.00%</b> | 25.65%                       | <b>40.25%</b> | 16.40%      | 20.79%        | 7.80%                   | 14.22% |
| 6h     | <b>39.68%</b>                        | <b>45.47%</b> | <b>35.06%</b>                | <b>59.31%</b> | 25.51%      | 28.28%        | 16.32%                  | 22.52% |
| 355872 |                                      |               |                              |               |             |               |                         |        |
| 2h     | 5.83%                                | 9.99%         | 15.54%                       | 41.02%        | 2.19%       | 9.39%         | 3.27%                   | 7.60%  |
| 4h     | 16.69%                               | 27.32%        | 25.28%                       | <b>88.14%</b> | 15.19%      | 16.45%        | 9.64%                   | 14.42% |
| 6h     | 23.63%                               | <b>43.85%</b> | <b>37.24%</b>                | <b>89.39%</b> | 24.91%      | 27.95%        | 22.35%                  | 24.61% |
| 348839 |                                      |               |                              |               |             |               |                         |        |
| 2h     | 11.27%                               | 21.90%        | 17.15%                       | 29.82%        | 13.55%      | 23.74%        | 18.53%                  | 21.43% |
| 4h     | 24.09%                               | <b>46.68%</b> | 24.09%                       | <b>53.93%</b> | 23.09%      | 26.95%        | 16.39%                  | 20.25% |
| 6h     | <b>31.37%</b>                        | <b>48.60%</b> | 21.14%                       | <b>87.65%</b> | 27.04%      | <b>34.96%</b> | 25.79%                  | 27.87% |

Tabella 6. Percentuali di inibizione della crescita indotta da ciascun AMP selezionato, alle relative concentrazioni MIC e 2MIC, contro tre isolati clinici rappresentativi di MRSA valutati mediante studi time-kill (in grassetto erano indicate le inibizioni della crescita batterica superiore al 30% raggiunto dopo 2, 4 e 6 h di incubazione con ciascun composto). I dati rappresentano la media di tre indipendenti esperimenti eseguiti in duplicato.

#### 4. DISCUSSIONE

Le infezioni da stafilococco rappresentano una seria sfida per i medici e sono considerate la seconda causa più frequente di infezioni nosocomiali in Europa [3]. Inoltre, tra gli isolati di *S. aureus*, la frequenza dei ceppi MRSA sta aumentando in tutto il mondo [19], rappresentando il 16,7% degli isolati in Europa [20]. Per quanto riguarda l'epidemiologia di *S. aureus* in Italia, lo studio di Campanile et al. [21] hanno riportato che MRSA rappresentava il 35,8% degli isolati nosocomiali di *S. aureus* e, la maggior parte degli MRSA, risultava anche multiresistente. In questa direzione, i ceppi utilizzati nella nostra ricerca sono una raccolta di isolati clinici di MRSA associati a lesioni cutanee e infezioni della ferita, tutti resistenti all'oxacillina (100%) e a più di tre diverse classi di antibiotici (86,7%) (**Tabella 4**). Questo aspetto assume particolare importanza perché la resistenza antimicrobica è in costante aumento ed è implicato in uno spettro sempre più ampio di malattie invasive [2, 19]. Per questi motivi, sono state condotte

ricerche considerevoli per sviluppare nuovi antibiotici per superare la resistenza batterica. Tra le diverse molecole, i peptidi antimicrobici (AMP) sono considerati un'alternativa promettente agli antimicrobici convenzionali, grazie alla loro efficacia contro un ampio spettro di microbi resistenti ai farmaci e al basso tasso di sviluppo di resistenza microbica [22].

Il primo passo nella valutazione di un nuovo candidato per una terapia antibiotica è la determinazione della suscettibilità dei patogeni all'agente antibatterico. Per questo, nel presente studio, l'attività antimicrobica di sette AMP da fonti diverse è stata valutata in primo luogo, in termini di valori di MIC, nei confronti di 15 isolati clinici di MRSA. Il composto attivo più basso è risultato essere LL-37, con valori di MIC nella maggior parte dei casi >128 µg/ml, seguito da Pexiganan e Pal-KKKK-NH<sub>2</sub>, mentre è stata osservata una maggiore attività per gli altri AMP testati, con valori di MIC di 16-64 µg/ml per Citropina 1.1, 8-16 µg/ml per CA(1-7)M(2-9)NH<sub>2</sub> e 4-16 µg/ml nel caso di Temporina A. I nostri dati sono in linea con quelli riportati da altri ricercatori che hanno testato diversi AMP contro MRSA clinico; infatti, Mohamed et al. [23] hanno evidenziato valori di MIC >128 µg/ml per LL-37 contro 16 MRSA clinici e, analogamente, Giacometti et al. [17] hanno riportato valori di MIC compresi tra 1 e 16 µg/ml per CA(1-7)M(2-9)NH<sub>2</sub> rispetto a 40 MRSA nosocomiali. In altri lavori, gli stessi AMP sono stati testati contro ceppi di *S. aureus* non resistenti alla meticillina, ottenendo valori di MIC differenti. Baranska-Rybak et al. [24] hanno riportato valori di MIC di 8-32 µg/ml per Citropina 1.1 e Temporina A e 4-16 µg/ml per CA(1-7)M(2-9)NH<sub>2</sub> contro 37 ceppi clinici di *S. aureus*. Allo stesso modo, Dawgul et al. [25] riferiscono valori di MIC di 8-16 µg/ml per Citropina 1.1, 2-16 µg/ml per Temporina A e 4 µg/ml per Pexiganan contro 12 ceppi clinici isolati di *S. aureus*. Inoltre, Jaskiewicz *et al.* [26] hanno riportato MIC di 16 µg/ml per Citropina 1.1, 4 µg/ml per CA(1-7)M(2-9)NH<sub>2</sub> e 16 µg/ml per Pal-KGK-NH<sub>2</sub> contro il ceppo di riferimento *S. aureus* ATCC 25923.

Nella seconda fase di questa indagine, sono stati eseguiti saggi di time-kill tempo-dipendente per consentire la valutazione dell'attività battericida o batteriostatica, nonché per la previsione del profilo farmacodinamico degli AMP in questione. Un confronto dei nostri dati con quelli presenti in letteratura non è facile, considerando i diversi punti temporali degli studi time-kill, le metodologie utilizzate per l'enumerazione dei batteri e, soprattutto, i diversi AMP esaminati [18, 23, 27]. Una recente ricerca ha rivelato che i

peptidi con una ridotta lunghezza della catena mantengono un'elevata attività antimicrobica [22]. Infatti, i nostri risultati hanno evidenziato che CA(1-7)M(2-9)NH<sub>2</sub> (peptide a 15 residui) e Citropina 1.1 (peptide a 16 residui) hanno mostrato la massima attività antibatterica contro MRSA e, sebbene l'inibizione della crescita non sia stata completamente raggiunto, nella maggior parte dei casi è stata raggiunta una significativa riduzione delle conte vitali, confermando l'azione dell'AMP nei confronti dei batteri Gram-positivi [28]. In opposizione ai nostri risultati, che mostrano la bassa attività del lipopeptide Pal-KKG-NH<sub>2</sub>, Baranska-Rybak et al. [27] hanno riferito che un lipopeptide corto era altamente efficace, inducendo la più alta soppressione della crescita batterica a basse concentrazioni, rispetto a Citropin 1.1 e Temporin A. Queste differenze potrebbero essere spiegate considerando che Baranska Rybak et al. [27] hanno testato gli AMP fino a 8 volte i valori della MIC, contrariamente ai dati presentati dal nostro gruppo (solo due volte la MIC). Allo stesso modo, Chua et al. [2] hanno valutato la capacità di uccisione di Citropina 1.1 contro *S. aureus* in 30 minuti e hanno riferito che la quantità di batteri vitali era significativamente ridotta a due volte la MIC, ottenendo la completa uccisione dell'inoculo iniziale a quattro volte la MIC dopo 10 minuti. Diversi autori hanno anche riferito che i peptidi antimicrobici hanno tassi di uccisione molto rapidi contro ceppi batterici in combinazione con antimicrobici convenzionali [18, 29]. La sinergia tra Citropin 1.1 con claritromicina e tra Temporin A con imipenem o ceftazidime contro batteri gram-positivi e gram-negativi è stata ben segnalata [18]. Tuttavia, nei nostri esperimenti, è stato raggiunto un buon tasso di uccisione contro i ceppi di MRSA utilizzando solo gli AMP. Come descritto, la presenza di CA(1-7)M(2-9)NH<sub>2</sub> nel terreno di coltura, ai suoi valori MIC o 2MIC, ha ridotto la vitalità di tutti i ceppi MRSA esaminati dopo 6h di incubazione, raggiungendo valori di 1,03 x 10<sup>1</sup> ufc/ml nel caso di MRSA 355872 e MRSA 348839. Una tendenza simile è stata osservata con Citro pin 1.1 e, in diversi casi, con Temporin A, confermando così l'efficacia di queste molecole contro MRSA. Per quanto riguarda l'origine degli AMP esaminati, essi possono essere divisi in due gruppi principali, AMP sintetici e naturali. Al primo gruppo appartengono CA(1-7)M(2-9)NH<sub>2</sub>, un peptide ibrido sintetico a 15 residui derivato dalle sequenze di cecropina A e melittina [30], Pexiganan, un peptide sintetico a 22 aminoacidi peptide cationico e i lipoptidi Pal-KGK-NH<sub>2</sub> e Pal- KKKK-NH<sub>2</sub>. Questi ultimi AMP sono palmitoilati all'estremità N, contengono tre o quattro

residui amminoacidici basici, sono amidati all'estremità C per massimizzare la carica positiva e il residuo di arginina è stato introdotto in posizioni diverse per fornire composti più attivi [31]. Al secondo gruppo appartengono i due AMP degli anfibii, Citropina 1.1 e Temporina A [18], e l'LL-37 umano, membro della famiglia delle catelicidine. Sulla base dei nostri dati si può osservare che i valori di MIC erano indipendenti dall'origine degli AMP e quelli di sintesi erano attivi così come gli altri, mentre negli studi di time-kill il composto più attivo risultava essere il CA (1–7)M(2–9)NH<sub>2</sub>, un AMP di sintesi.

Questo comportamento non è chiaro e facile da spiegare, ma conferma dati precedenti sulla maggiore attività antistafilococcica di questo AMP rispetto ai composti nativi [17, 18].

## 5. CONCLUSIONE

In questo studio abbiamo dimostrato il potenziale degli AMP contro l'MRSA clinico senza la combinazione con antibiotici convenzionali, aprendo così nuove prospettive per l'applicazione

clinica di peptidi antimicrobici ben selezionati. Tra gli AMP esaminati, Citropin 1.1 e CA(1-7)M(2-9)NH<sub>2</sub> ha mostrato la maggiore attività antimicrobica contro le cellule batteriche MRSA in fase stazionaria di crescita, come rilevato da esperimenti di time-kill. Collettivamente, sulla base delle qualità qui presentate, alcuni AMP hanno il potenziale per essere utilizzati come strumenti supplementari per diverse applicazioni, comprese le infezioni da MRSA resistenti. Sarà necessario approfondire ulteriormente gli studi per valutare il reale ruolo clinico di questi nuovi antibiotici, da soli o insieme agli antibiotici convenzionali per migliorarne l'efficacia.



## 6. RIFERIMENTI

- [1] Lei, J., Sun, L., Huang, S., Zhu, C., Li, P., He, J., et al. (2019). The Antimicrobial Peptides and Their Potential Clinical Applications. *Am. J. Transl. Res.* 11,3919–3931.
- [2] Reddy, P.N.; Srirama, K.; Dirisala, V. Un aggiornamento sull'onere clinico, sugli strumenti diagnostici e sulle opzioni terapeutiche dello *Staphylococcus aureus*. *Infect. Dis.*, 2017, 10, 1-5.
- [3] Chua, K.; Laurent, F.; Coombs, G.; Grayson, L.; Howden, BP. Resistenza antimicrobica: *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina non associato alla comunità (CA-MRSA)! Una guida medica sull'MRSA comunitario: evoluzione della resistenza antimicrobica e implicazioni per la terapia. *Clinica. Infect.. Dis.*, 2011, 52, 99–114.
- [4] Centro europeo per la prevenzione e il controllo delle malattie (ECDC) (2015). Sorveglianza della resistenza antimicrobica in Europa nel 2014. Relazione annuale della rete europea di sorveglianza della resistenza antimicrobica (EARS-Net) <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-europe-2014.pdf>. Accesso effettuato il 17 agosto 2016
- [5] Calfee, D.P. Tendenze nelle comunità rispetto alle infezioni da *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina acquisite in ambito sanitario . *Curr. Infect. Dis. Rep.*, 2017, 19, 48–55.
- [6] Tverdek, F.P.; Crank, C. W.; Segreti, J. Terapia antibiotica dello *Staphylococcus aureus* resistente alla methicillina in terapia intensiva. *Crit. Care Clin.*, 2008, 24, 249–260.
- [7] de Leo, F.R.; Chambers, H.F. Ricomparsa dello *Staphylococcus aureus* resistente agli antibiotici nell'era della genomica. *J. Clin. Invest.*, 2009, 119, 2464–2474.
- [8] Han, J.; Ma, Z.; Gao, P.; Lu, Z.; Liu, H.; Gao, L.; Lu, W.; Ju, X.; Lv, F.; Zhao, H.; Bie, X. L'attività antibatterica del peptide di tipo LI-F contro lo *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA) in vitro e inibizione delle infezioni nell'epiderma murino. *Appl. Microbiol. Biotecnologie*, 2018, 102(5), 2301–2311.
- [9] Kang, H.K.; Kim, C.; Seo, C.H.; Park, Y. Le applicazioni terapeutiche dei peptidi antimicrobici (AMP): una revisione dei brevetti. *J. Microbiol.*, 2017, 55, 1–12.

- [10] Phoenix, D.A., Dennison, S.R., Harris, F. Peptidi antimicrobici: la loro storia, evoluzione e promiscuità funzionale. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germania, 2013.
- [11] Scott, M.G.; Davidson, DJ; Oro, signor; Bowdish, D.; Hancock, RE Il peptide antimicrobico umano LL-37 è un modulatore multifunzionale delle risposte immunitarie innate. *J. Immunol.*, 2002, *169*, 3883–3891.
- [12] Beaumont, P.E., Li, H.N., Davidson, D.J. Peptidi antimicrobici e immunità innata, Springer, Basilea, 2013.
- [13] Teixeira, V.; Feio, M.J.; Bastos, M. Ruolo dei lipidi nell'interazione dei peptidi antimicrobici con le membrane. *Progr. Ricerca sui lipidi*, 2012, *51*, 149–177.
- [14] Poteri, J.P.; Hancock, R.E. La relazione tra struttura peptidica e attività antibatterica. *Peptidi*, 2003, *24*, 1681–1691.
- [15] Pikula, M.; Zieliński, M.; Specjalski, K.; Barańska-Rybak, W.; Dawgul, M.; Langa, P.; Jassem, E.; Kamysz, W.; Trzonkowski, P. Valutazione in vitro del potenziale allergico dei peptidi antibatterici: cammello e citropina. *Chimica. Biol. Drug Des.*, 2016, *87(4)*, 562–568.
- [16] Wiesner, J.; Vilcinskas, A. Peptidi antimicrobici – l'antico braccio del sistema immunitario umano. *Virulenza*, 2010, *1*, 440–464.
- [17] Toke, O. Peptidi antimicrobici: nuovi candidati nella lotta contro le infezioni batteriche. *Biopolimeri*, 2005, *80*, 717–735.
- [18] Giacometti, A.; Cirioni, O.; Kamysz, W.; D'Amato, G.; Silvestri, C.; Del Prete, M.S.; Lukasiak, J.; Scalise, G. Attività in vitro ed effetto letale del peptide ibrido sintetico cecropina A-melittina CA(1-7)M(2-9)NH(2) su isolati di *Staphylococcus aureus* nosocomiali resistenti alla meticillina e interazioni con antibiotici utilizzati clinicamente. *Diagnosi. Microbiolo. Infect. Dis.*, 2004, *49*, 197–200.
- [19] Giacometti, A.; Cirioni, O.; Kamysz, W.; Silverstri, C.; Licci, A.; Riva, A.; Ukasiak, J.; Scalise, G. Attività in vitro dei peptidi di anfibi da soli e in combinazione con agenti antimicrobici contro agenti patogeni multiresistenti isolati dall'infezione della ferita chirurgica. *Peptidi*, 2005, *26*, 2111–2116
- [20] Mediavilla, J.R.; Chen, L.; Mathema, B.; Kreiswirth, B.N. Epidemiologia globale dello *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina associato alla comunità (CA-MRSA). *Curr. Opin. Microbiol.*, 2012, *15*, 588–595.

- [21] Centro europeo per la prevenzione e il controllo delle malattie (ECDC). Sorveglianza della resistenza antimicrobica in Europa 2012. Rapporto annuale della rete europea di sorveglianza della resistenza antimicrobica (EARS-Net). ECDC: Stoccolma, Svezia; 2013 [visitato il 15 novembre 2013] <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/>
- [22] Campanile, F.; Bongiorno, D.; Perez, M.; Mongelli, G.; Sessa, L.; Benvenuto, S.; Gona, F.; AMCLI – Partecipanti all'indagine S. aureus; Varaldo, P.E.; Stefani, S. Epidemiologia dello Staphylococcus aureus in Italia: Prima indagine nazionale, 2012. *J. Glob. Antimicrob. Resist.*
- [23] Piotrowska, U.; Sobczak, M.; Oledzka, E. Stato attuale di un duplice comportamento di peptidi antimicrobici: agenti terapeutici e vettori di consegna promettenti. *Chem. Biol. Drug Des.*, 2017, 90(6), 1079–1093.
- [24] Mohamed, F.; Abdelkhalek, M.A.; Seleem, M.N. Valutazione di peptidi antimicrobici sintetici corti per il trattamento dello Staphylococcus aureus resistente ai farmaci e intracellulare. *Sci. Rep.*, 2016, 6, 29707.
- [25] Barańska-Rybak, W.; Pikula, M.; Dawgul, M.; Kamysz, W.; Trzonkowski, P.; Roszkiewicz, J. Profilo di sicurezza dei peptidi antimicrobici: camel, citropina, protegrina, temporina A e lipopeptide sui cheratinociti HaCaT. *Acta Pol. Pharm.*, 2013, 70(5), 795–801.
- [26] Dawgul, M.; Baranska-Rybak, W.; Piechowicz, L.; Bauer, M.; Neubauer, D.; Nowicki, R.; Kamysz, W. L'attività antistafilococcica di Citropin 1.1 e Temporin A contro cellule planctoniche e biofilm formati da isolati da pazienti con dermatite atopica: una valutazione del loro potenziale di indurre resistenza microbica rispetto agli antimicrobici convenzionali. *Pharmaceuticals*, 2016, 9, 30 doi:10.3390/ph9020030
- [27] Jaskiewicz, M.; Orłowska, M.; Olizarowicz, G.; Migon, D.; Grzywacz, D.; Kamysz, W. Screening rapido di peptidi sintetici antimicrobici. *Int. J. Pept. Res. Ther.*, 2016, 22, 155–161.
- [28] Baranska-Rybak, W.; Dawgul, M.; Bielinska, S.; Kraška, B.; Piechowicz, L.; Kamysz, W. Valutazione colorimetrica del tempo di uccisione per Citropin 1.1, lipopeptide Palm-KK-NH<sub>2</sub> e Temporin A. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, 21(5), 536–539.

- [29] Fernandez, D.I.; Gehman, J.D.; Separovic, F. Interazioni con la membrana dei peptidi antimicrobici delle rane australiane. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009, *1788*, 1630–1638.
- [30] Dosler, S.; Mataraci, E. Farmacocinetica in vitro di peptidi cationici antimicrobici da soli e in combinazione con antibiotici contro biofilm di *Staphylococcus aureus* resistenti alla meticillina. *Peptides*, 2013, *49*, 53–58.
- [31] Kamysz, W.; Kochan'ska, B.; Ke,dzia, A.; Ochocin'ska, J.; Mac'kiewicz, Z.; Kupryszewski, G. Staterine SV2 e il suo analogico. Sintesi e valutazione dell'attività antimicrobica. *Pol. J. Chem.*, 2002, *76*, 801–806.
- [32] Kamysz, W.; Silverstri, C.; Cirioni, O.; Giacometti, A.; Licci, A.; Della Vittoria, A.; Okroj, M.; Scalise, G. Attività in vitro dei lipopeptidi palmitoil (Pal)-Lis-Lis- NH<sub>2</sub> e Pal-Lis-Lis da soli e in combinazione con agenti antimicrobici contro cocchi Gram-positivi multiresistenti. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2007, *51*, 354–358.
- [33] Dawgul, M.; Maciejewska, M.; Jaskiewicz, M.; Karafova, A.; Kamysz, W. Peptidi antimicrobici come potenziale strumento per combattere il biofilm batterico. *Acta Pol. Farm.*, 2014, *71*, 39–47.
- [34] Noore, J.; Noore, A.; Li, B. Il peptide antimicrobico cationico LL-37 è efficace contro lo *Staphylococcus aureus* sia extra che intracellulare. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2013, *57*, 1283–1290.
- [35] Dawgul, M.; Baranska-Rybak, W.; Kamysz, E.; Karafova, A.; Nowicki, R.; Kamysz, W. Attività di lipopeptidi corti e antimicrobici convenzionali contro cellule planctoniche e biofilm formati da ceppi clinici di *Staphylococcus aureus*. *Future Med. Chem.*, 2012, *4*, 1541–1551.