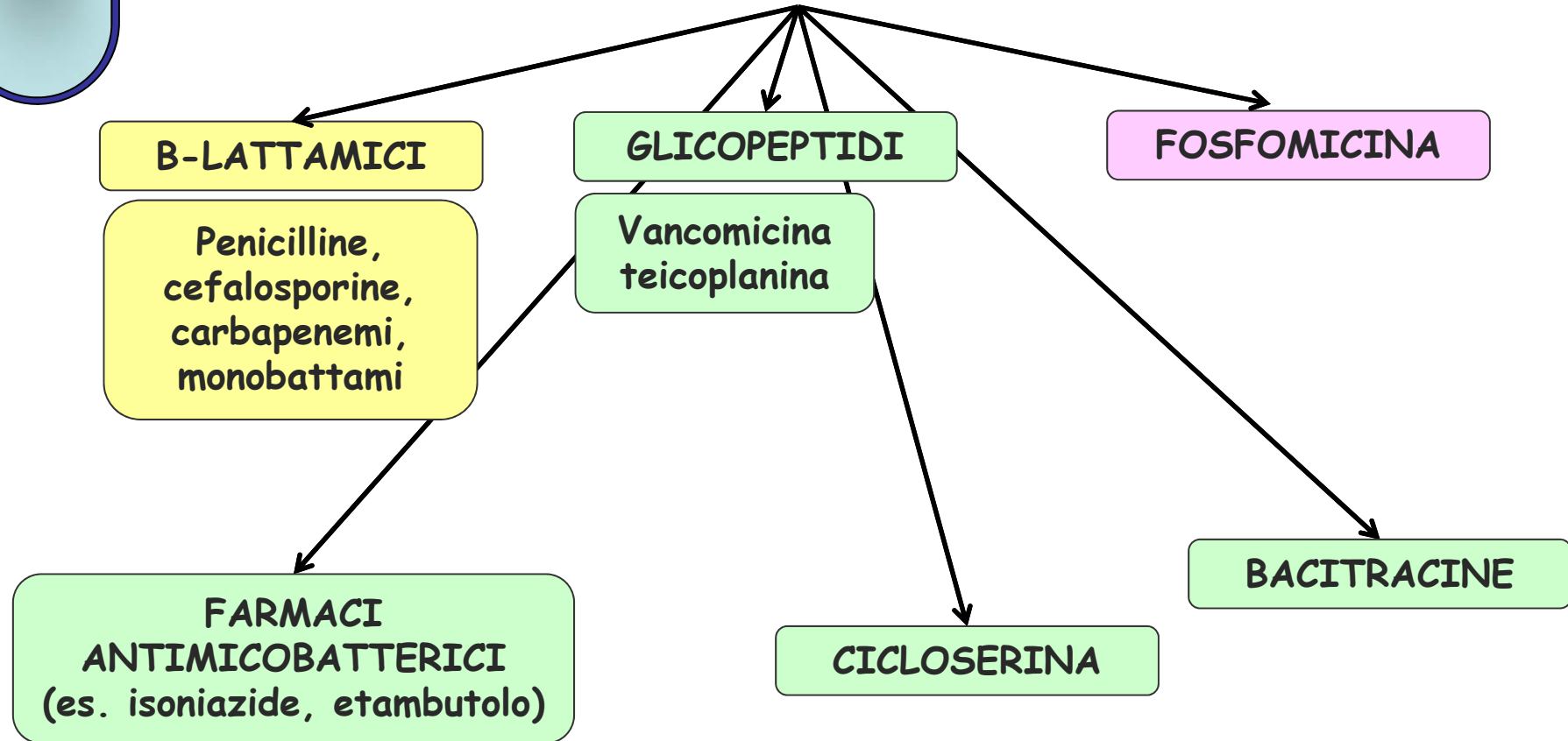
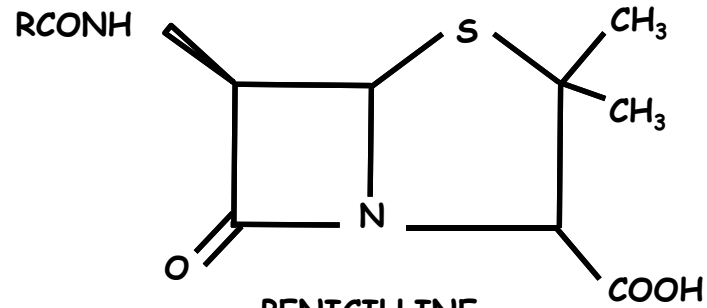


LA PARETE E' IL BERSAGLIO DI
MOLTI ANTIBIOTICI:

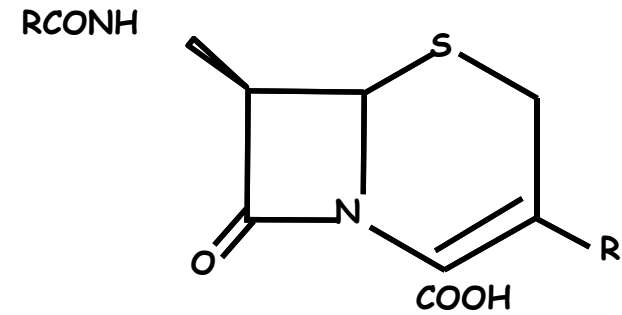




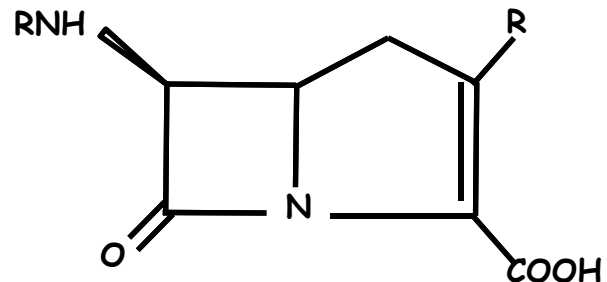
B-LATTAMICI



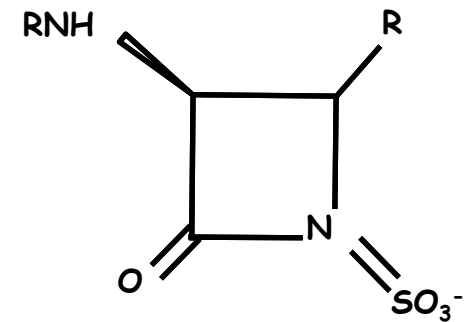
PENICILLINE
PENICILLIUM



CEFALOSPORINE
CEPHALOSPORIUM



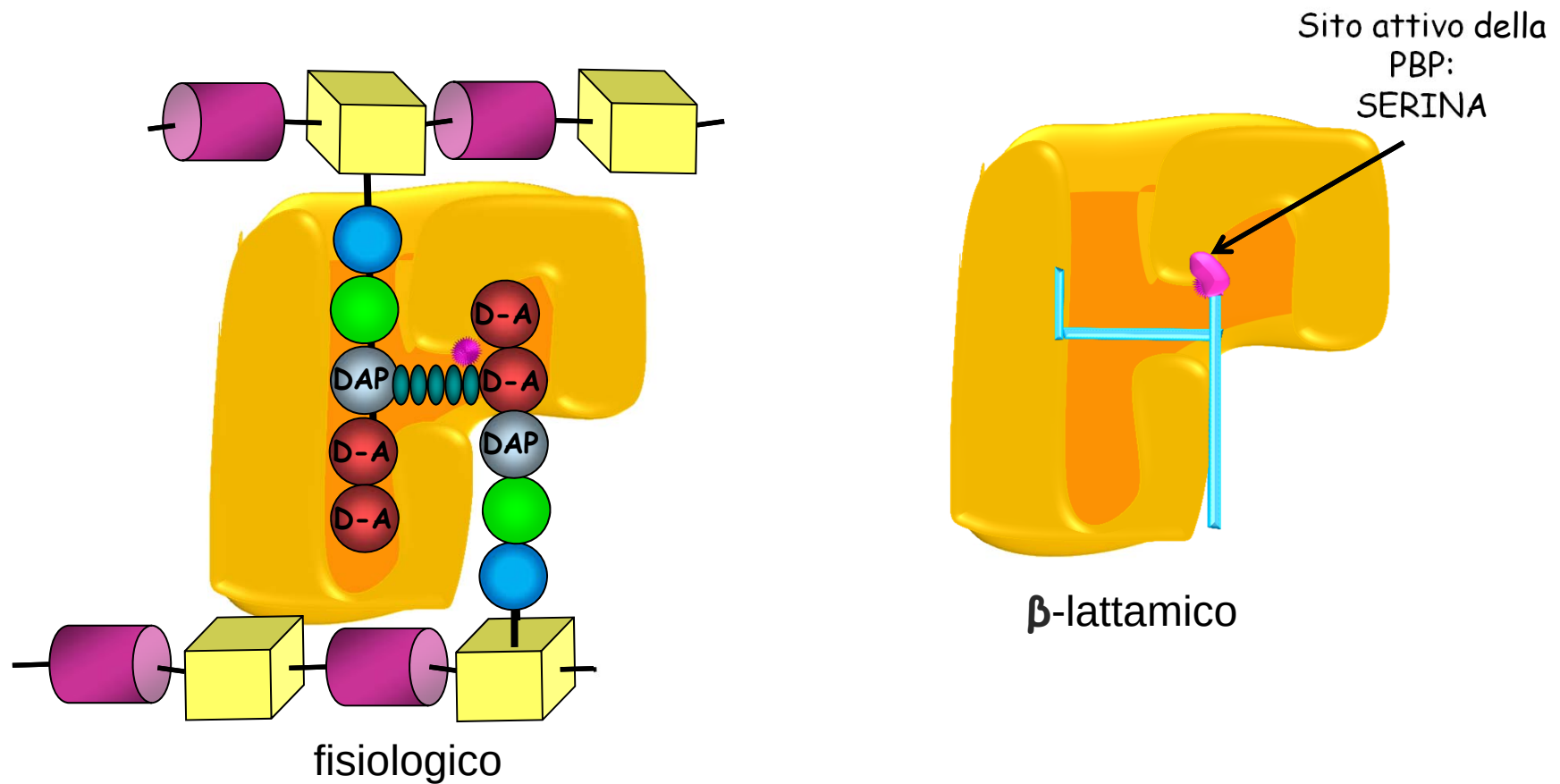
CARBAPENEMI
STREPTOMYCES



MONOBATTAMI
GLUCONOBACTER

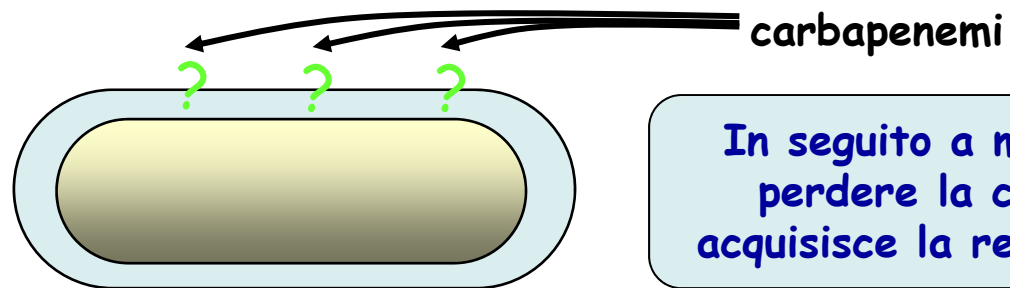
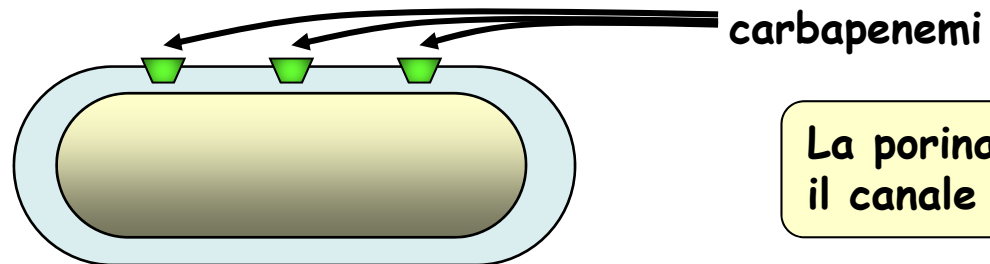
Gli antibiotici β -lattamici bloccano la
transpeptidazione nella sintesi della parete

PONENDOSI COME PSEUDOSUBSTRATO E ACILANDO
STABILMENTE IL SITO ATTIVO DELLE PBP



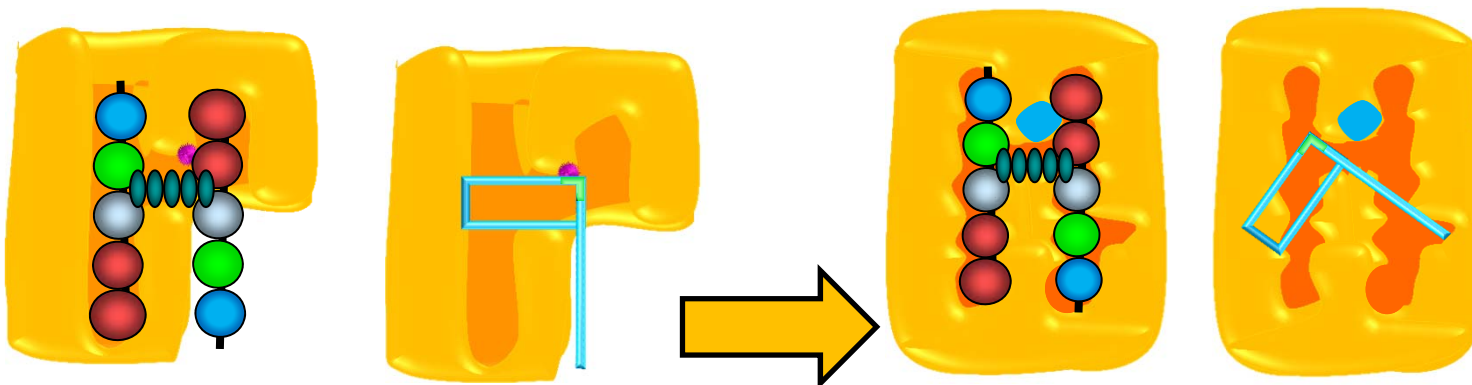
MEDIATA DA UNA DIMINUITA PERMEABILITA'

Pseudomonas aeruginosa



O DALLA SOSTITUZIONE DEL BERSAGLIO

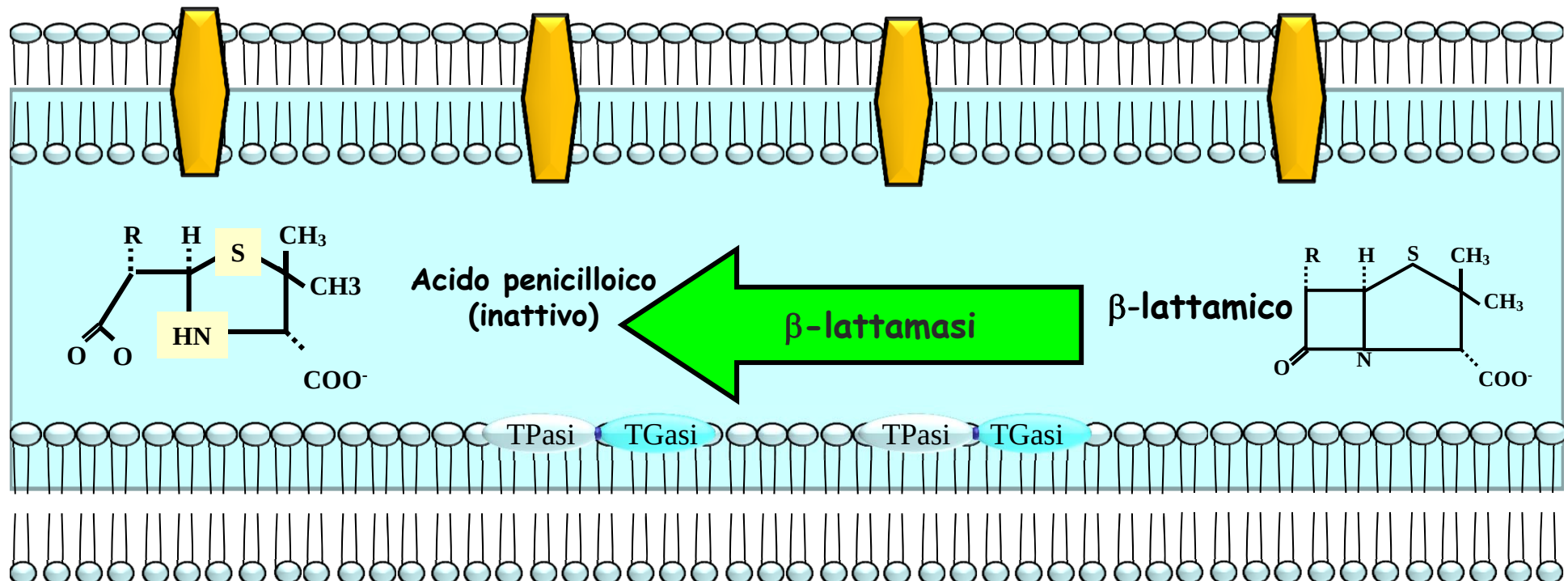
I ceppi METICILLINO-RESISTENTI di *S. aureus* hanno acquisito una PBP alternativa, funzionale ma insensibile ai β -lattamici



LA RESISTENZA ACQUISITA AI β -LATTAMICI PUO' ESSERE ENZIMATICA

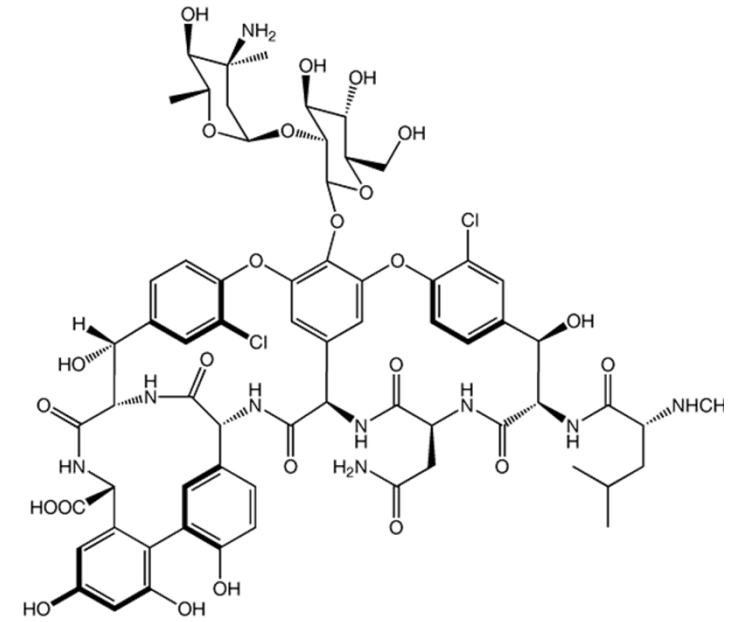
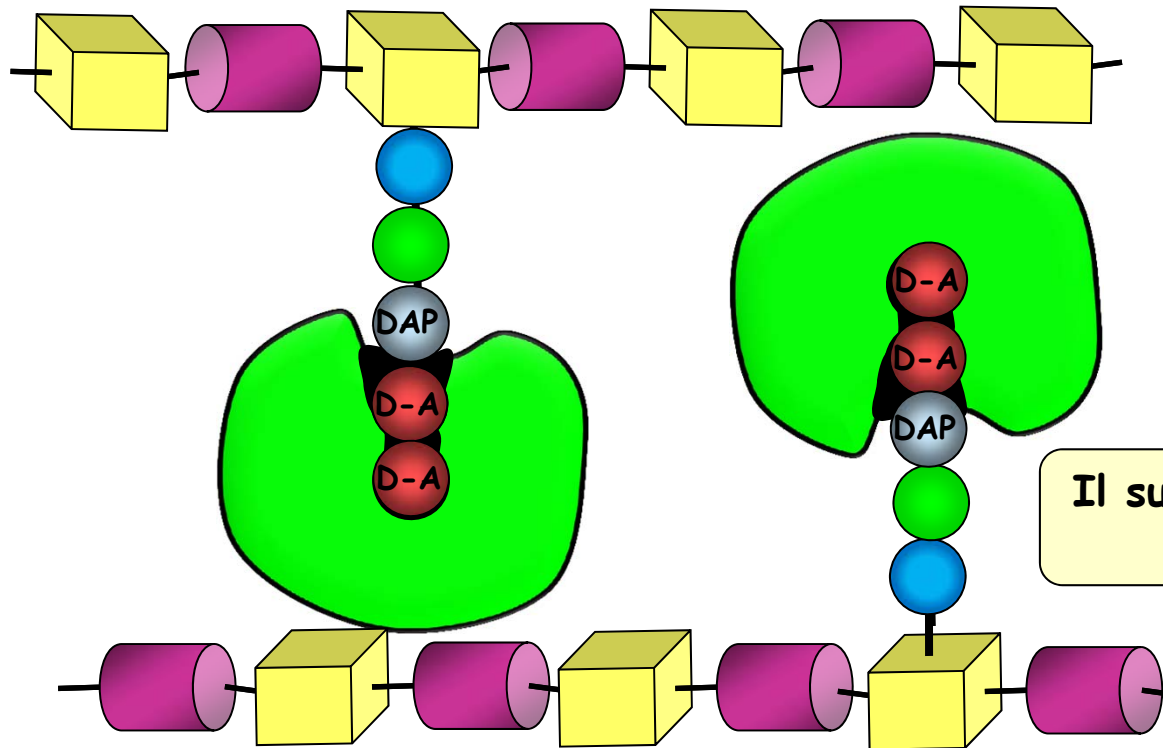


Le β -lattamasi secrete nello spazio periplasmico, inattivano la penicillina prima che si legghi alle PBP



GLICOPEPTIDI: Vancomicina, estratta da *Streptomyces orientalis*, attiva sui Gram+

**SI LEGANO AL DIPEPTIDE
D-Ala/D-Ala bersaglio delle PBP**

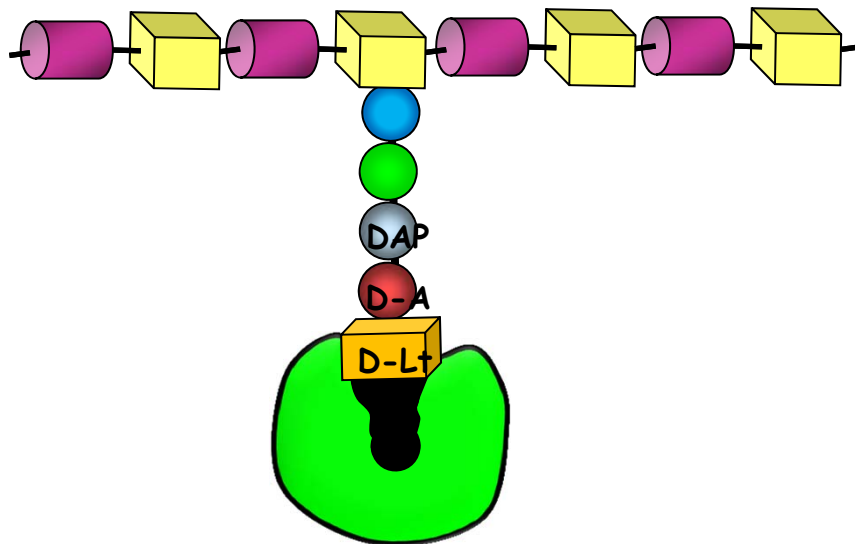


**Il substrato non è più disponibile per
l'azione delle PBP**

ALLA BASE DELLA RESISTENZA E' UN MECCANISMO DI SOSTITUZIONE DEL BERSAGLIO

La resistenza è apparsa negli enterococchi
(ceppi VRE: Vancomycin Resistant Enterococci)

I ceppi VRE
Sintetizzano un dipeptide
D-alanil-D-lattato invece che D-ala/D-ala

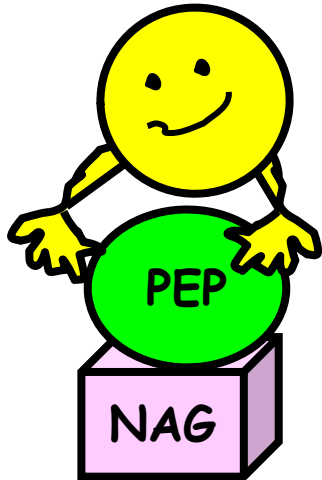
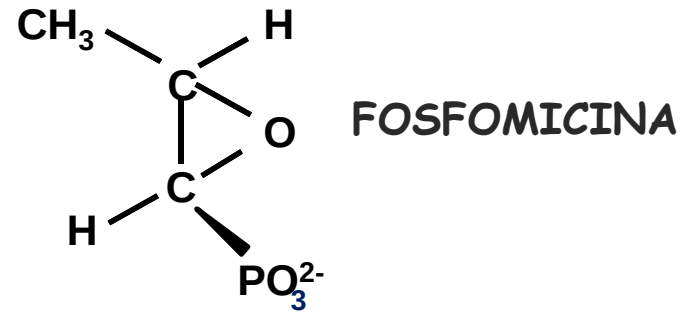


I nuovi dipeptidi non sono
riconosciuti dalla vancomicina

È possibile che la comparsa di
resistenze sia stata favorita dall'uso
in agricoltura di un antibiotico
simile: l'avoparcina

Alcuni ceppi di stafilococco hanno acquisito questa
resistenza dai VRE, per TGO → VRSA

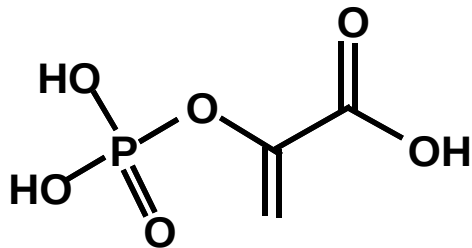
FOSFOMICINA
Streptomyces fradiae



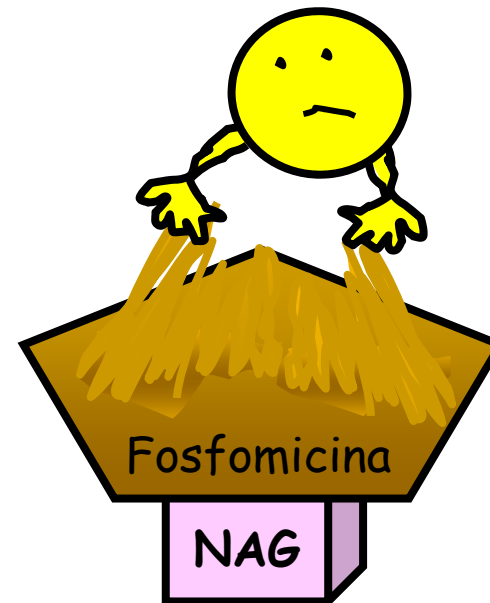
Inattiva la fosfoenolpiruvasi, necessaria
alla sintesi dell'acido N-acetilmuramico



Sostituendosi come substrato al
fosfoenolpiruvato



FOSFOENOLPIRUVATO

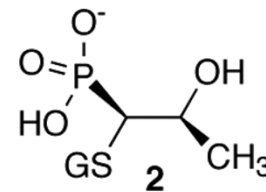
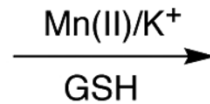


La resistenza alla fosfomicina insorge
facilmente e spontaneamente

Per mutazione di un trasportatore non
essenziale del glicerofosfato

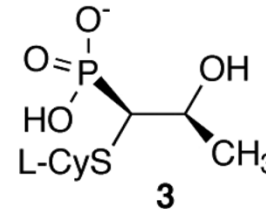
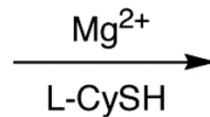
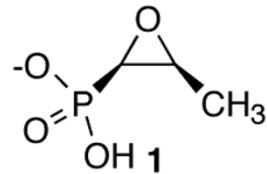
Inattivazione enzimatica

FosA



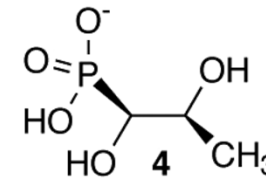
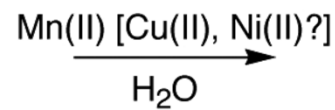
Glutamil-trasferasi

FosB



Tiol-trasferasi

FosX



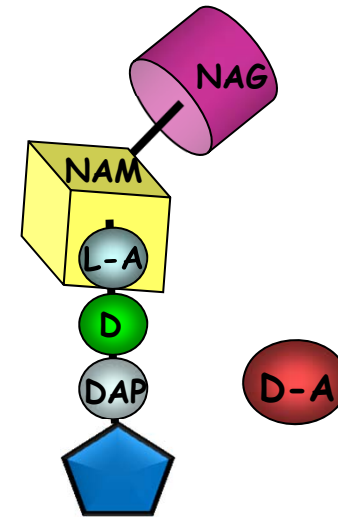
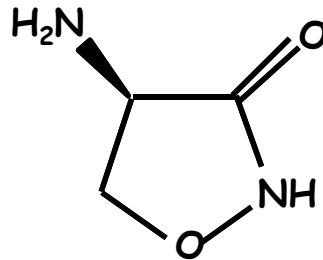
Epossido-idrolasi

La resistenza enzimatica può essere codificata dal cromosoma o da plasmidi

CICLOSERINA

Blocca la sintesi
della terminazione
D-Ala/D-Ala

Neurotossica usata solo per
M. tuberculosis resistente agli
altri farmaci (terza scelta)

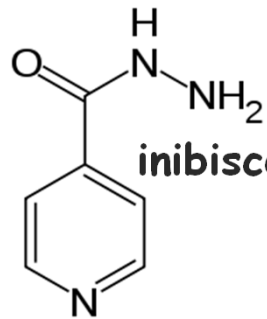


La stabilità dell'anello ne permette il legame
preferenziale rispetto al substrato naturale
degli enzimi (racemasi e sintetasi)

Scoperta (1955) da tre gruppi di ricercatori che lavoravano su
Streptomyces diversi: *S. lavendulae*, *S. orchidaceus*, *S. garyphalus*

RESISTENZA: MUTAZIONI SPONTANEE
NEL BERSAGLIO

Alcuni farmaci interagiscono in modo specifico con la sintesi della parete di *Mycobacterium tuberculosis*



ISONIAZIDE

inibisce la sintesi degli acidi micolici, bloccando la reduttasi NADH-dipendente

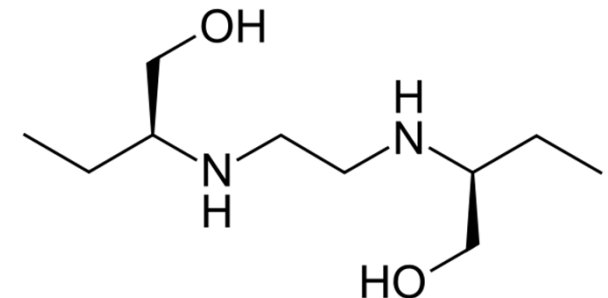
L'isoniazide è un profarmaco: per agire deve essere ossidata dalla catalasi-perossidasi (KatG) batterica, ottenendo un radicale attivo

La resistenza insorge facilmente, per mutazioni di KatG che non attiva più il profarmaco. Per questo motivo l'isoniazide non viene mai usata se non in associazione con altri farmaci

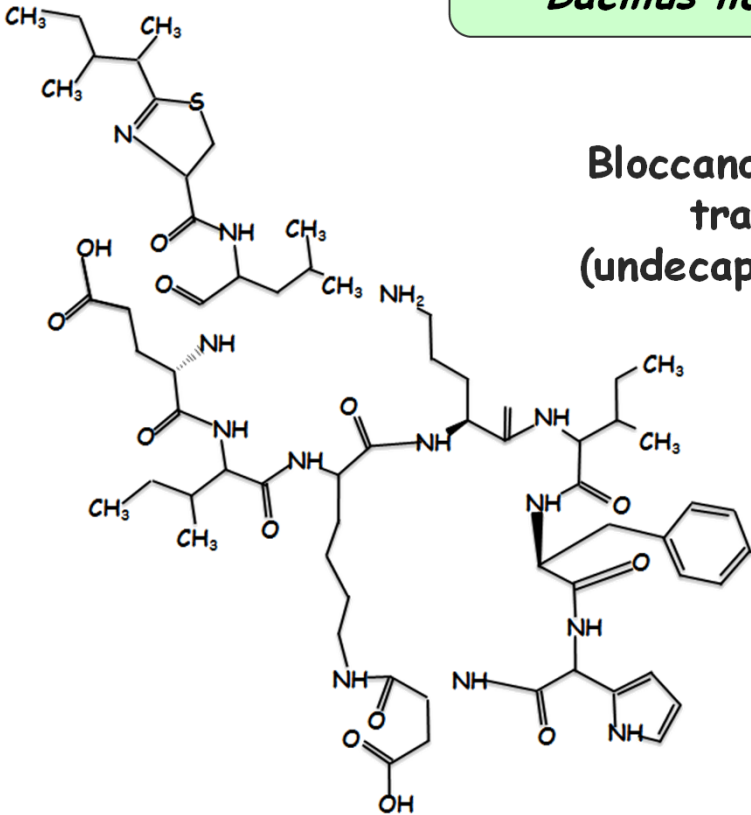
ETAMBUTOLO

Impedisce la sintesi dell'arabinogalattano inibendo l'enzima chiave (α -1,3-arabinosiltrasferasi)

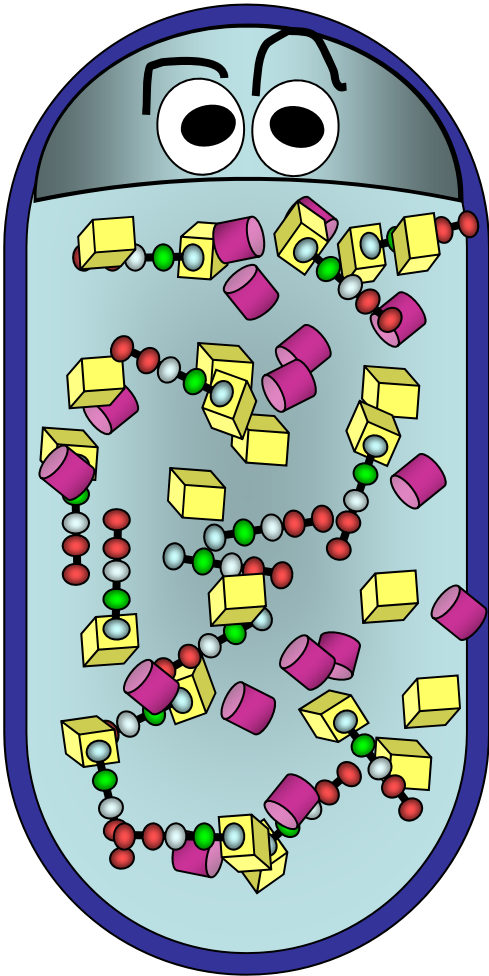
La resistenza si instaura per modificazione del bersaglio



BACITRACINE
Bacillus licheniformis



**Bloccano il trasportatore
transmembrana
(undecaprenil pirofosfato)**

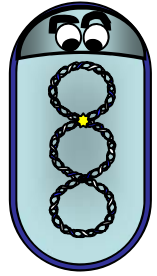


Resistenza:

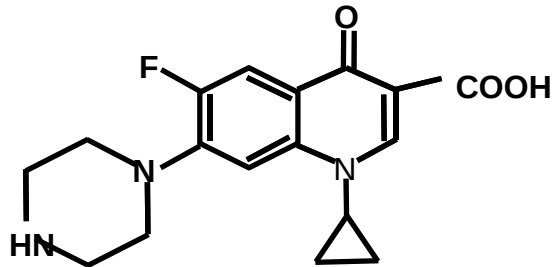
- 1) efflusso (trasportatore: BcrABC)
- 2) Sintesi de novo del bersaglio dovuta alla undecaprenol kinase BacA

**Impediscono l'esportazione
delle componenti della parete**

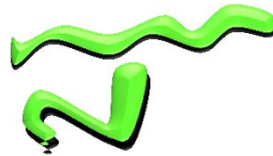
DUPLICAZIONE DEL CROMOSOMA BATTERICO



i chinoloni (sintetici) bloccano le girasi (> Gram-) e le topoisomerasi IV (> Gram+) e impediscono la duplicazione del cromosoma batterico:



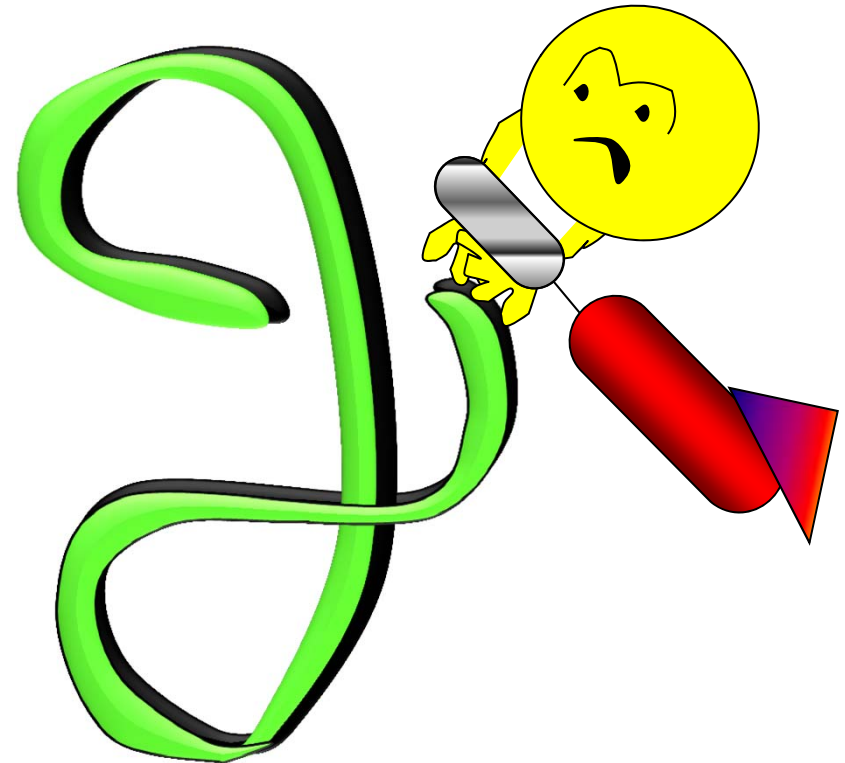
Nel citoplasma si accumulano frammenti di cromosoma

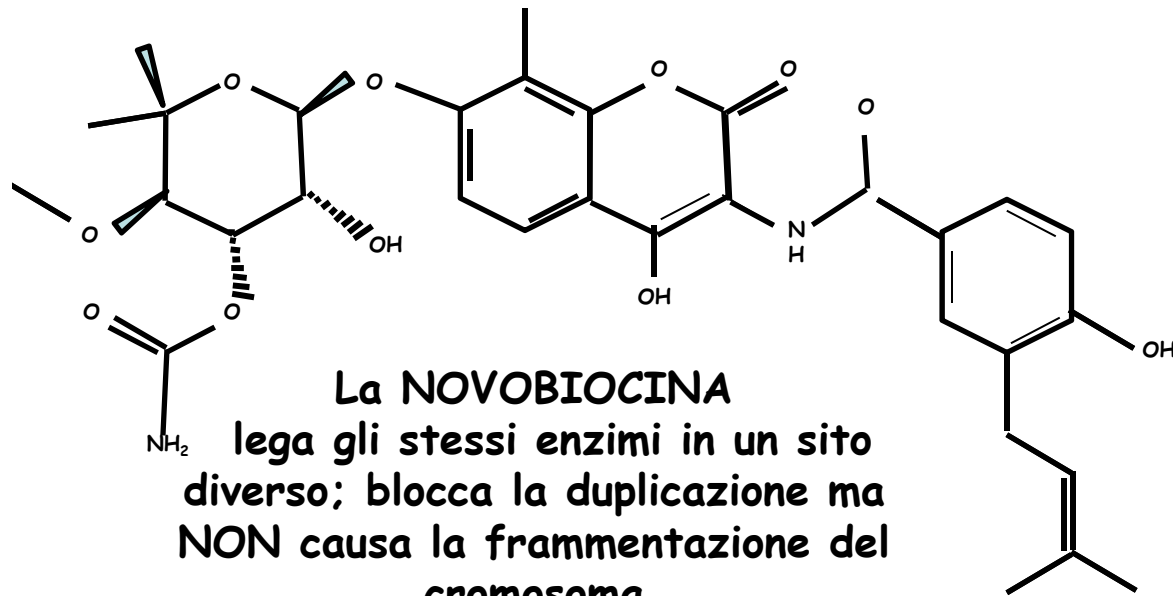


La seconda generazione (chinoloni fluorurati es. Ciprofloxacin) è molto più efficace della prima (es. Ac nalidixico, Ofloxacin)

Resistenza: spontanea (alto livello) mutazioni puntiformi negli enzimi

Acquisita (basso livello): efflusso (QEP)
protezione del bersaglio (QNR)





lega gli stessi enzimi in un sito diverso; blocca la duplicazione ma NON causa la frammentazione del cromosoma

La resistenza è dovuta a mutazioni nel bersaglio

L'immunità nei ceppi produttori e la resistenza intrinseca in alcune specie

Prodotta da *Streptomyces sphaeroides*/ *S. niveus*

Sono sostenute da geni che codificano forme resistenti dell'enzima bersaglio



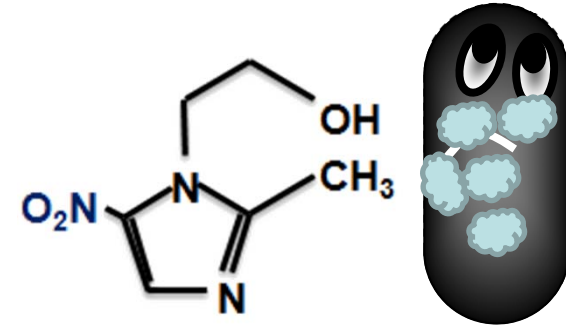
The image shows a complex chemical structure, likely a steroid or terpenoid derivative. It features a central fused ring system (possibly a steroid nucleus) with various substituents. Key features include:

- A central fused ring system with a ketone group (C=O) and a hydroxyl group (OH).
- Substituents including methyl groups (CH₃), hydroxyl groups (OH), a ketone group (C=O), and a side chain with a double bond and a methyl group.
- The structure is labeled with "R₂" and "CH₃".

La resistenza può nascere per diminuita affinità del bersaglio (mutazioni puntiformi)

METRONIDAZOLO E NITROFURANTOINA

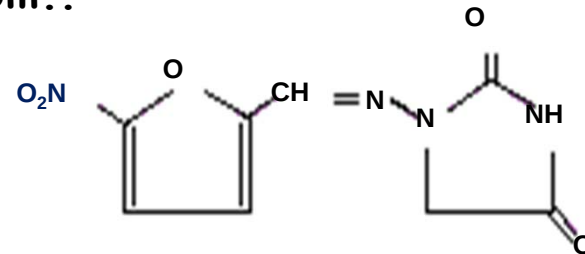
Inibiscono la sintesi degli acidi nucleici quando sono ridotti in vivo da enzimi batterici



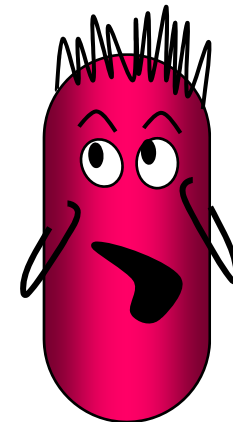
Il metronidazolo non è attivo in presenza di O₂: il suo nitrogruppo reagisce con le ferredossine dei batteri ANAEROBI dando origine a un nitroradicale anione

Anche LA NITROFURANTOINA è attivata dalle nitrofurano-reduttasi della cellula batterica: il prodotto è molto reattivo

danneggia molti siti con diversi meccanismi:
DNA, Ribosomi, Enzimi inducibili..

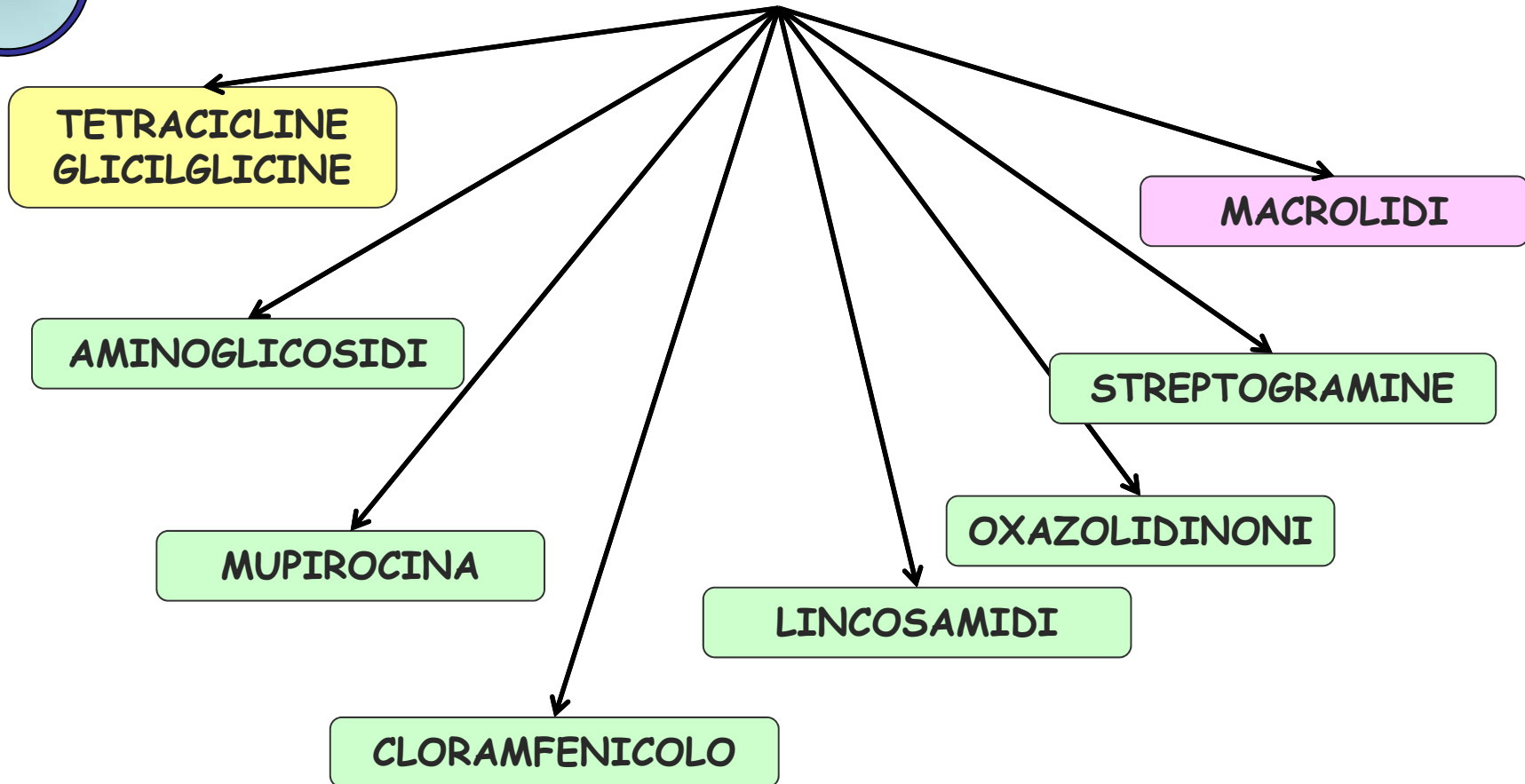


La resistenza è rara, forse anche a causa dei molti bersagli

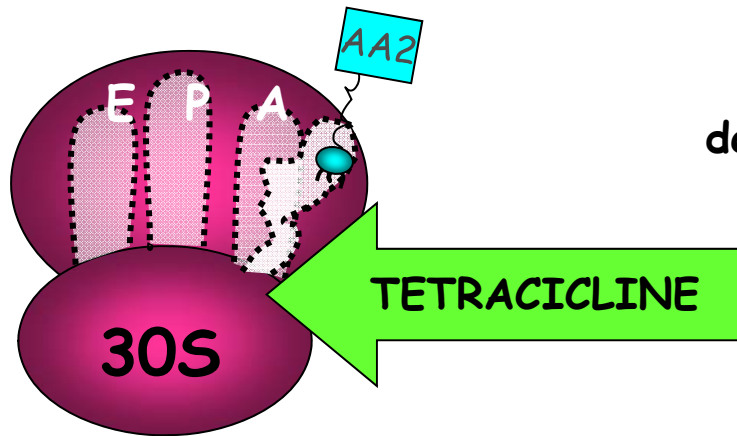
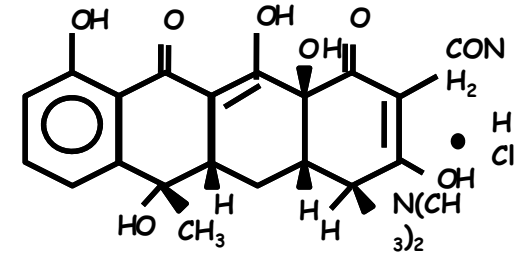




GLI ANTIBIOTICI CHE
AGISCONO SULLA SINTESI
PROTEICA SONO:



TETRACICLINE : isolate da *Streptomyces aureofaciens* e *S. rimosus*, le molecole successive sono semisintetiche



si legano alla subunita' 30S del ribosoma, deformando il sito "A" che accoglie gli AA-tRNA

RESISTENZA:

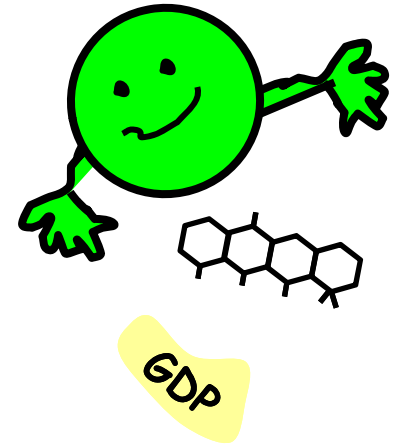
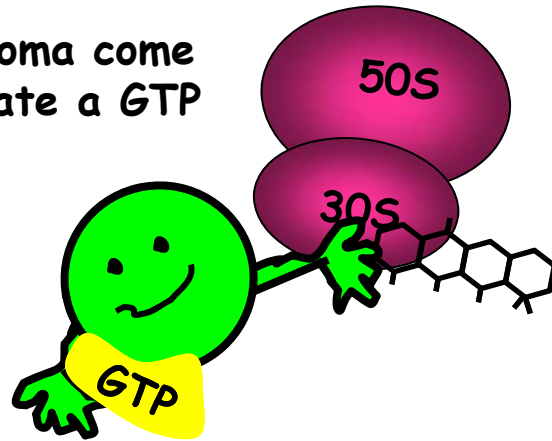
POMPE DI EFFLUSSO
(TetA, B, C..)

MODIFICAZIONE DEL BERSAGLIO
(TetO, TetM)

INATTIVAZIONE ENZIMATICA
(Tet-X)

Le proteine di protezione del ribosoma come TetO (Gram+) e TetM (Gram-) legate a GTP

dislocano la tetraciclina dal ribosoma



poi si staccano liberando GDP e ripristinando la funzionalità del ribosoma

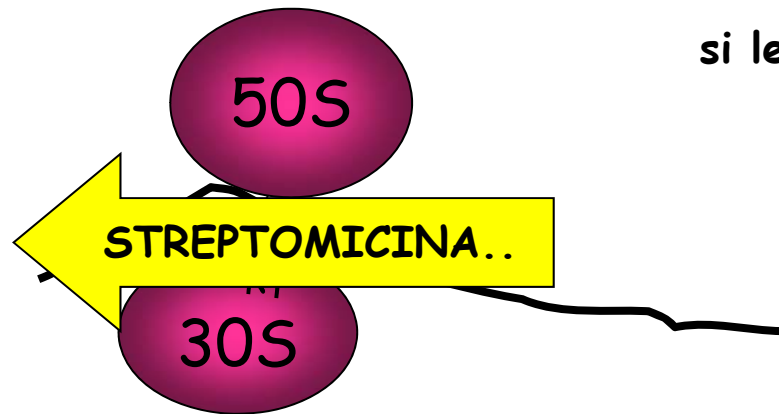
TetX è una monoossigenasi flavina-dipendente

Inattiva le tetracicline in presenza di ossigeno

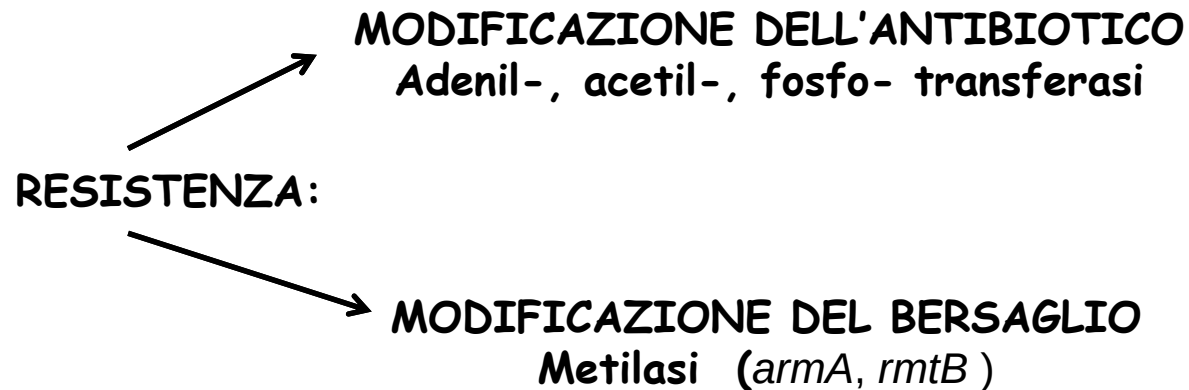
È stata scoperta in *Bacteroides* (anaerobi stretti) in cui non può essere funzionale

Si ritiene che origini da ceppi ambientali non ancora individuati

AMINOGLICOSIDI es. Streptomicina, kanamicina (*Streptomyces*)
gentamicina (*Micromonospora*) amikacina: semisintetica (da kanamicina)



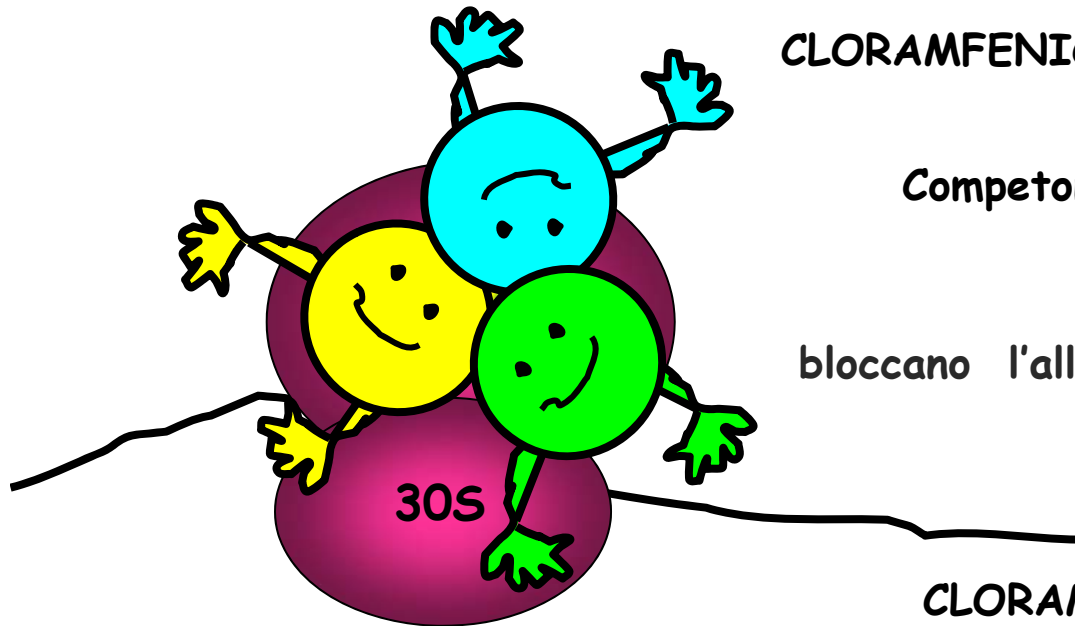
si legano alla subunita' 30S impediscono l'assemblaggio
del ribosoma e l'inizio della traduzione



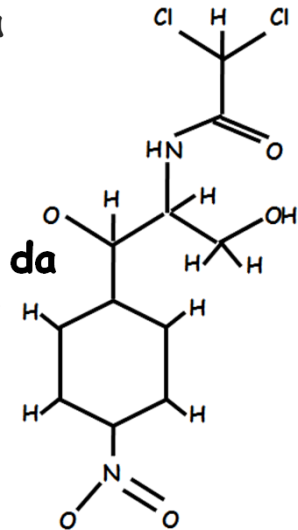
CLORAMFENICOLO, MACROLIDI E LINCOSAMIDI

Competono per il medesimo sito di legame sulla subunità 50S

bloccano l'allungamento della catena



CLORAMFENICOLO, prodotto da *Streptomyces venezuelae*



Ampio spettro, rischio di tossicità
Inibizione della sintesi proteica mitocondriale nei mammiferi)

RESISTENZA:

Enzimatica: Cloramfenicolo-Acetil-Transferasi) (trasferibile)

Diminuita permeabilità: alterazione delle porine (*E. coli*) o della permeabilità di membrana (Gram +)

Aumentato efflusso (resistenza cromosomica, plasmidica e da trasposoni)

Ridotta Affinità del Bersaglio: mutazione di alcune proteine nel bersaglio

MACROLIDI

Es. Eritromicina, prodotta da
Streptomyces erythraeus

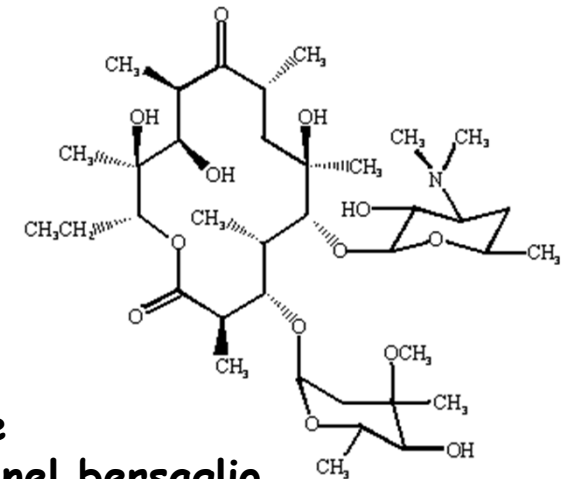
Attivi sui Gram+

RESISTENZA:

enzimatica (*Enterobacteriaceae*) idrolisi mediata da esterasi
aumentato efflusso (pompe multidrug-resistance) trasferibile

Ridotta Affinità del Bersaglio: mutazione di alcune proteine nel bersaglio

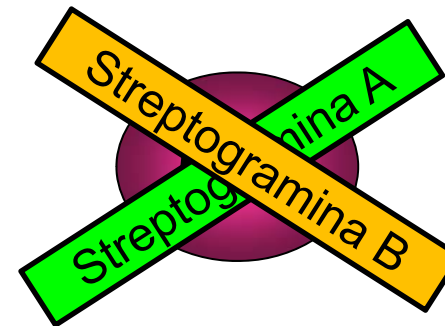
Modificazione del bersaglio (geni erm → metilasi indotta dall'antibiotico) trasferibile



Anche le STREPTOGRAMINE (*S. diastaticus*) si legano alla subunità 50S, in modo irreversibile

A = Dalfopristina

B = Quinopristina



RESISTENZA:

Alterazione del bersaglio (B: metilasi, resistenza crociata con i macrolidi)

Pompe di efflusso (A)

Modificazione dell'antibiotico (A: acetilazione)

Inattivazione enzimatica (B: lattonasi)

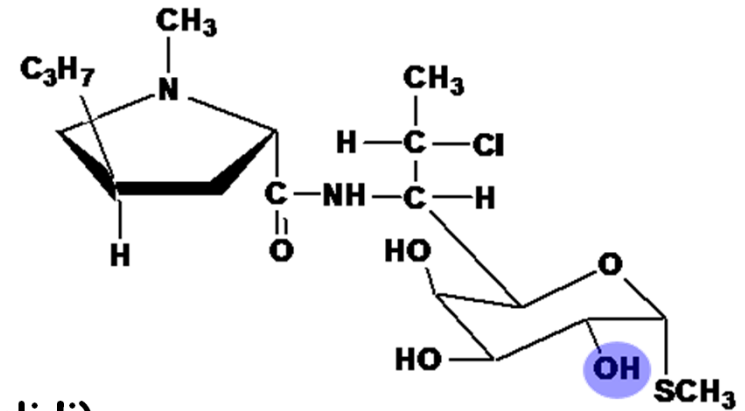
LINCOSAMIDI (Lincomicina, Clindamicina)
Streptomyces lincolnensis

Attive su Gram+ e anaerobi

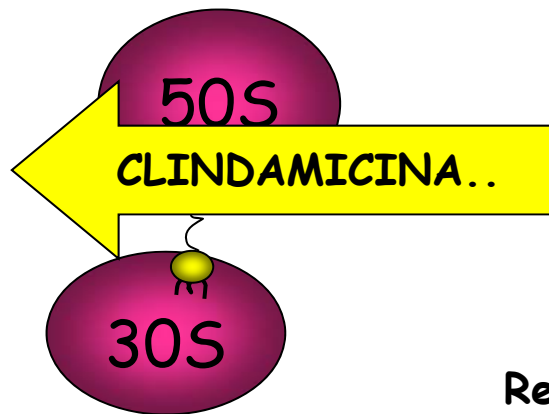
RESISTENZA

Alterazione del bersaglio: metilasi (crociata con i macrolidi)

NON pompe di efflusso



OXAZOLIDINONI es. LINEZOLID
sintetico



Attivo su Gram+ aerobi e anaerobi

impedisce l'assemblaggio del ribosoma
legandosi alla 50S

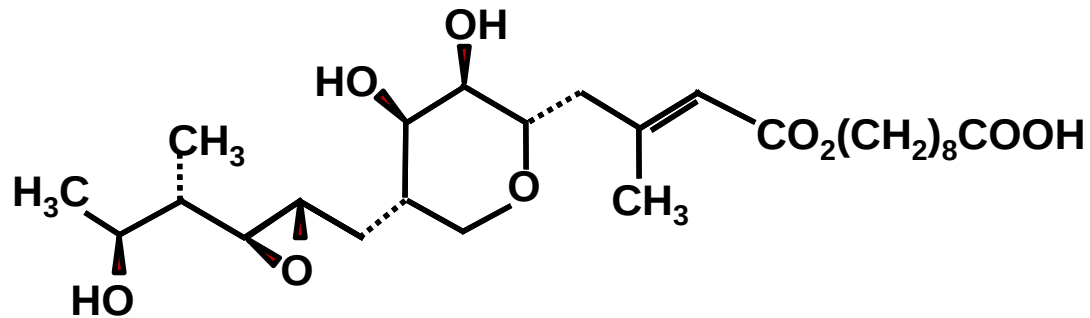
Resistenza: rara, per mutazione nel bersaglio
(G→U nel rRNA 23S di *E. faecium*)

La MUPIROCINA non agisce sul ribosoma

Si comporta da analogo dell'isoleucina e impedisce che questo aminoacido sia incorporato nei peptidi

È un derivato dell'acido pseudomonico, estratto da *Pseudomonas flavescens*

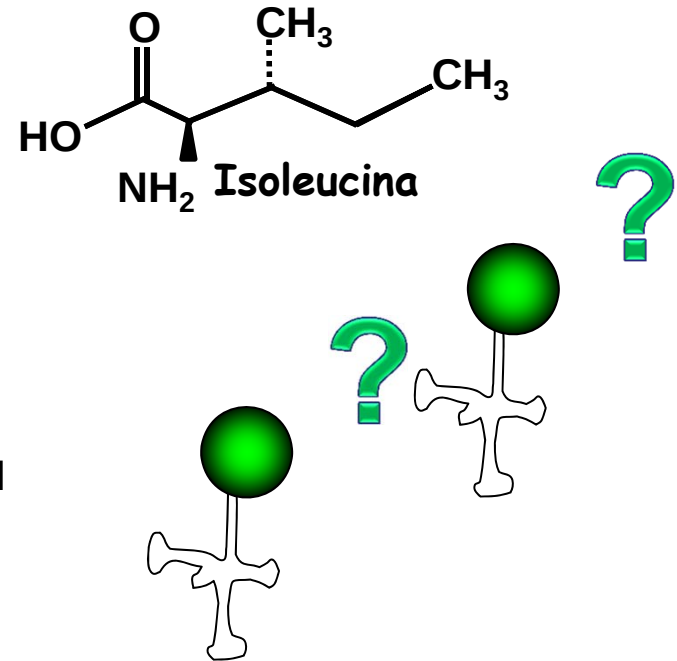
Attiva sui Gram+



Resistenza:

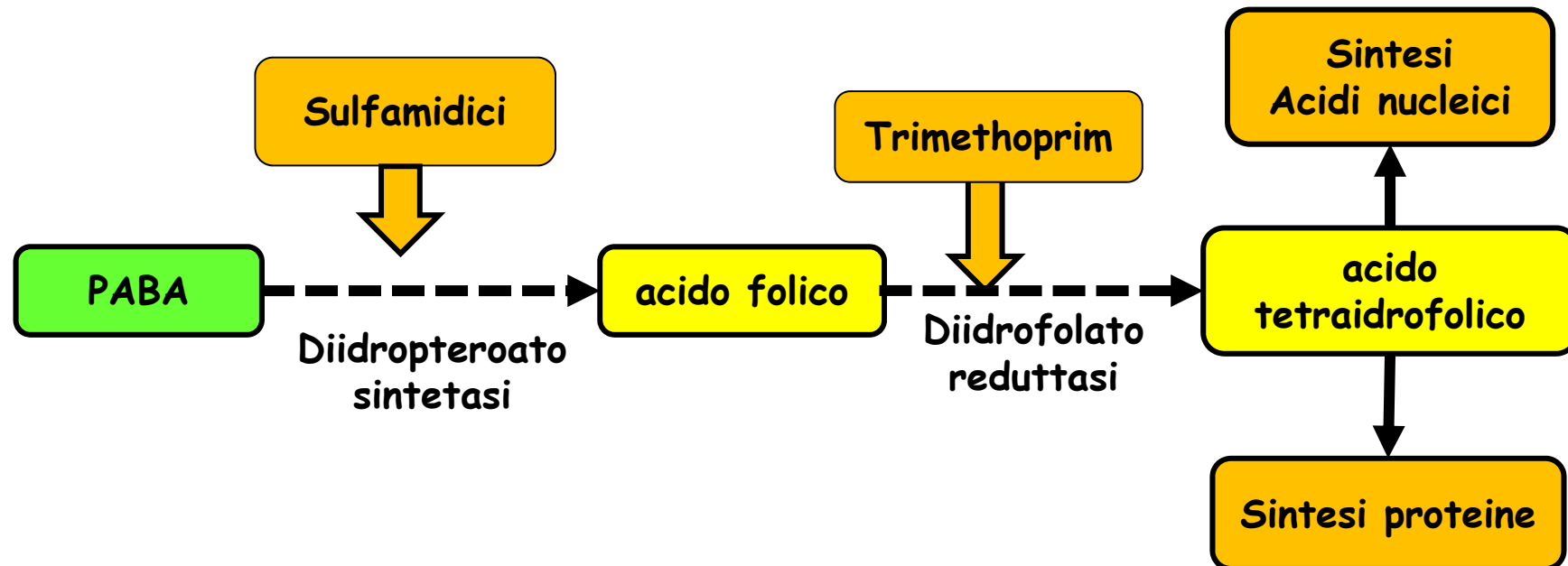
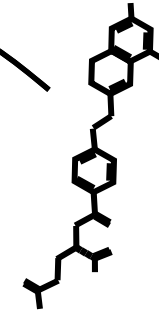
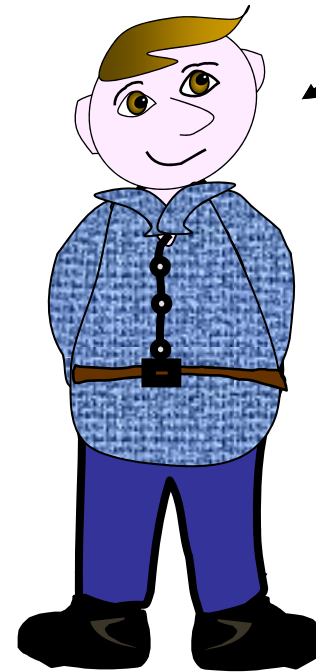
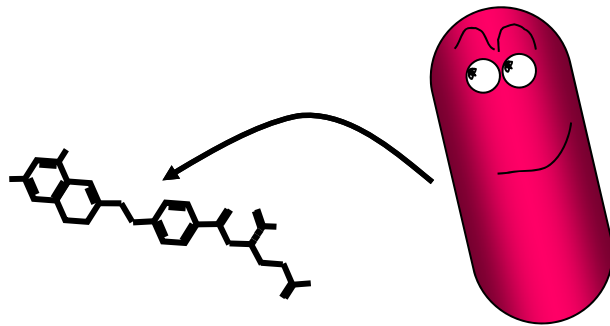
basso livello-mutazioni nel gene *ileS*
alto livello: acquisizione del gene *mupA* (plasmidico)

mupA codifica una nuova isoleucyl RNA synthetase



ANTIMETABOLITI

L'acido folico è indispensabile per noi come per i batteri che, a differenza di noi, lo sintetizzano



La resistenza spontanea ai sulfamidici insorge facilmente, per questo motivo si usano insieme molecole che interferiscono con due passi successivi della via biosintetica

Geni di resistenza (*su1*, *su2* e *su3*, codificati da elementi trasferibili) codificano diidropteroato sintetasi alternative di dimensioni leggermente minori delle forme sensibili

Sul1 è associato a integroni di classe I, con una frequenza tale da esserne considerato un marcatore

Sul2 si trova su piccoli plasmidi non coniugativi o su grandi plasmidi di multiresistenza

Sul3, plasmidico, è meno frequente.
E' stato scoperto nei suini

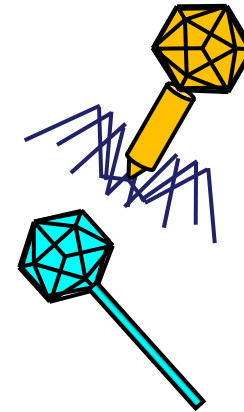
Le crescenti difficoltà causate dal diffondersi di ceppi resistenti
Hanno suscitato un rinnovato interesse per possibilità alternative

ampliamento e miglioramento di:

strategie vaccinali



Terapia fagica



I problemi posti dalla resistenza non trovano al momento risposta in nuove molecole

I pur numerosi studi di genomica tesi a cercare nuovi bersagli non hanno portato risultati concreti: non è sufficiente individuare un passo o un enzima indispensabili per la cellula batterica

Un antibiotico deve poter penetrare nella cellula batterica

Non essere degradato al suo interno

Potersi legare al bersaglio e inattivarlo

Non essere tossico per l'ospite

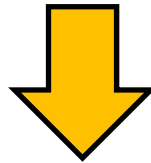
Avere una farmacocinetica tale da poter raggiungere in dosi adeguate il sito dell'infezione

Sono stati proposti moltissimi bersagli, ma nella quasi totalità dei casi, non sono state trovate le molecole adatte per inattivarle.

Terapia fagica: in uso a lungo in Unione sovietica per trattare infezioni ostinate

L'uso dei batteriofagi ha diverse limitazioni:

- **Possibile lisogenia**
- **Rapida insorgenza di mutanti resistenti**
- **Scarso controllo sui cocktail impiegati**

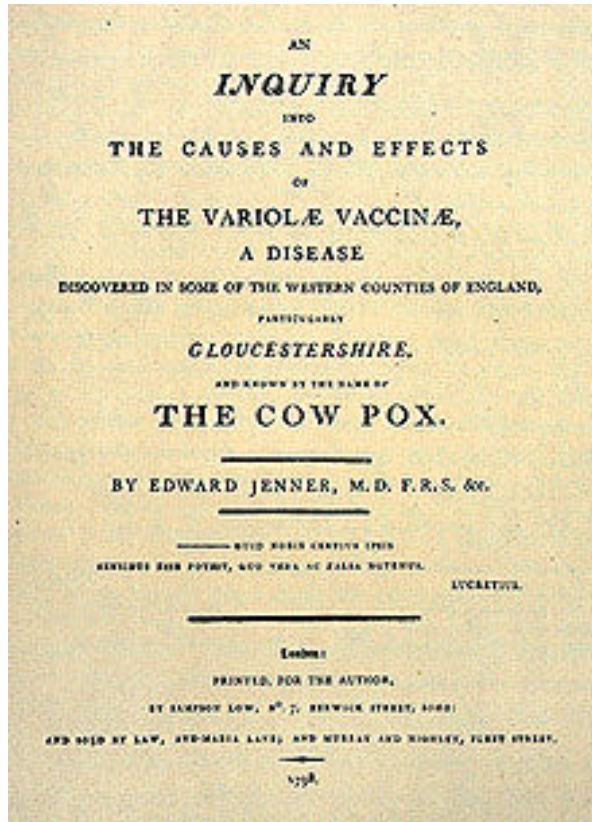


endolisine

Applicabili su superfici estese
Sulle mucose
Additivi in prodotti alimentari

Strategia anti-antrace:
Endolisina + composto per indurre
la germinazione delle spore

**La vaccinazione ha avuto inizio su base scientifica, in EUROPA;
nel 1798, con le osservazioni e le prove in vivo di Jenner**



**Pratiche riconducibili alla vaccinazione erano già presenti
nella medicina tradizionale cinese**

**Nuove tecniche molecolari hanno ampliato
le possibilità di utilizzare questo approccio**

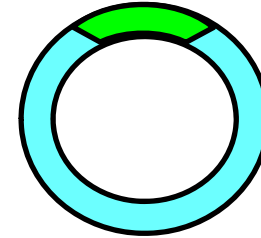
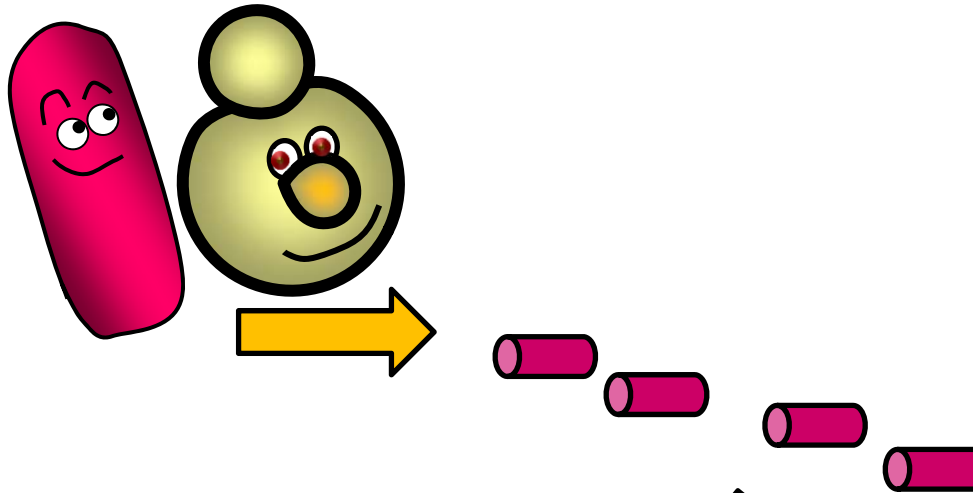
- 1) Vaccini interi uccisi: *influenza, Salk, epatite A, rabbia, pertosse intero*
- 2) Vaccini vivi attenuati: *BCG, MPR, Sabin, febbre gialla, varicella, Ty21a*
- 3) Vaccini con componenti purificati: *influenza a sub-unità o split, pertosse acellulare, anatossina difterica e tetanica, vaccini coniugati (Hib, pneumococco e meningococco)*
- 4) Vaccini coniugati (*Haemophilus influenzae* tipo b, meningococco, pneumococco): polisaccaridi coniugati con proteine *carrier* che li rendono maggiormente immunogeni e aumentano il coinvolgimento dei linfociti T
- 5) Reverse vaccinology: studio del genoma, individuazione dei possibili antigeni *meningococco gruppo B*
- 6) Vaccini DNA ricombinanti: es. *HBsAg*
- 7) Vaccini a DNA: contro tutti gli agenti infettivi; non ancora in commercio
- 8) Vaccini da piante, geneticamente modificate

VACCINI RICOMBINANTI A SUB-UNITA'

Clonazione in batteri o lieviti del gene che codifica l'immunogeno più rappresentato

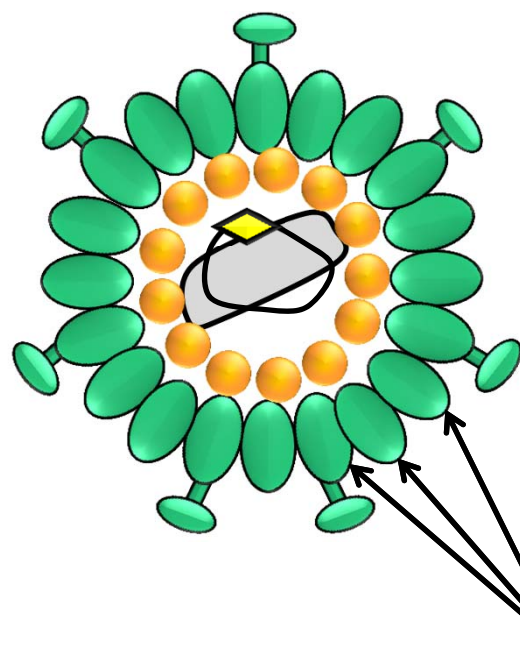
Antibatterici:
proteine di adesione o
tossine modificate

Antivirali: una proteina del
capside o dell'envelope

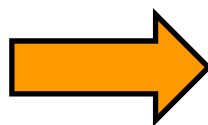


PURIFICAZIONE

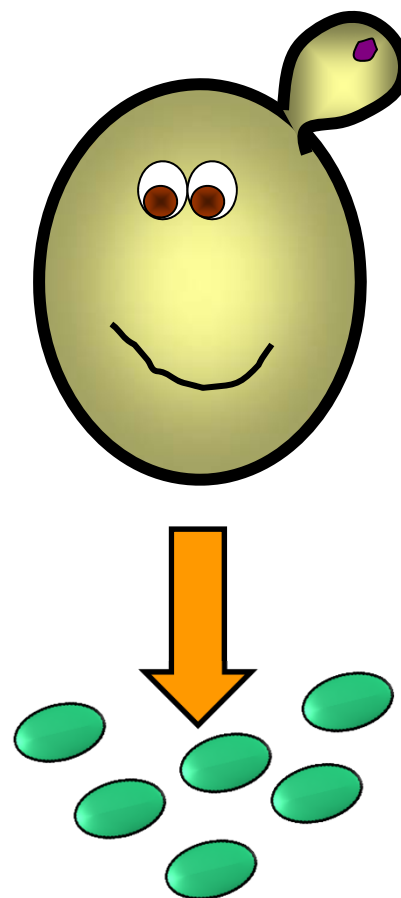
HBsAg ANTIGENE DELL'ENVELOPE DI HBV



E' la molecola di scelta per allestire il vaccino clonandola nell'ospite *SACCHAROMYCES*



Proteina di
superficie HBs



L'antigene prodotto dal lievito presenta tutte le caratteristiche della proteina HBsAg nativa

Vaccini attivi ricombinanti omologhi:
mutanti avirulenti di una specie patogena

Ottenuti per mutazione o delezione dei geni di virulenza

Il microrganismo si moltiplica nel soggetto vaccinato, senza causare la malattia, ma stimolando attivamente la risposta immunitaria specifica

Produzione di PTX inattiva da parte di *B.pertussis*

Allo studio:

Vibrio Cholerae

- privato della capacità di produrre CTX attiva,
- ma in grado di indurre immunità

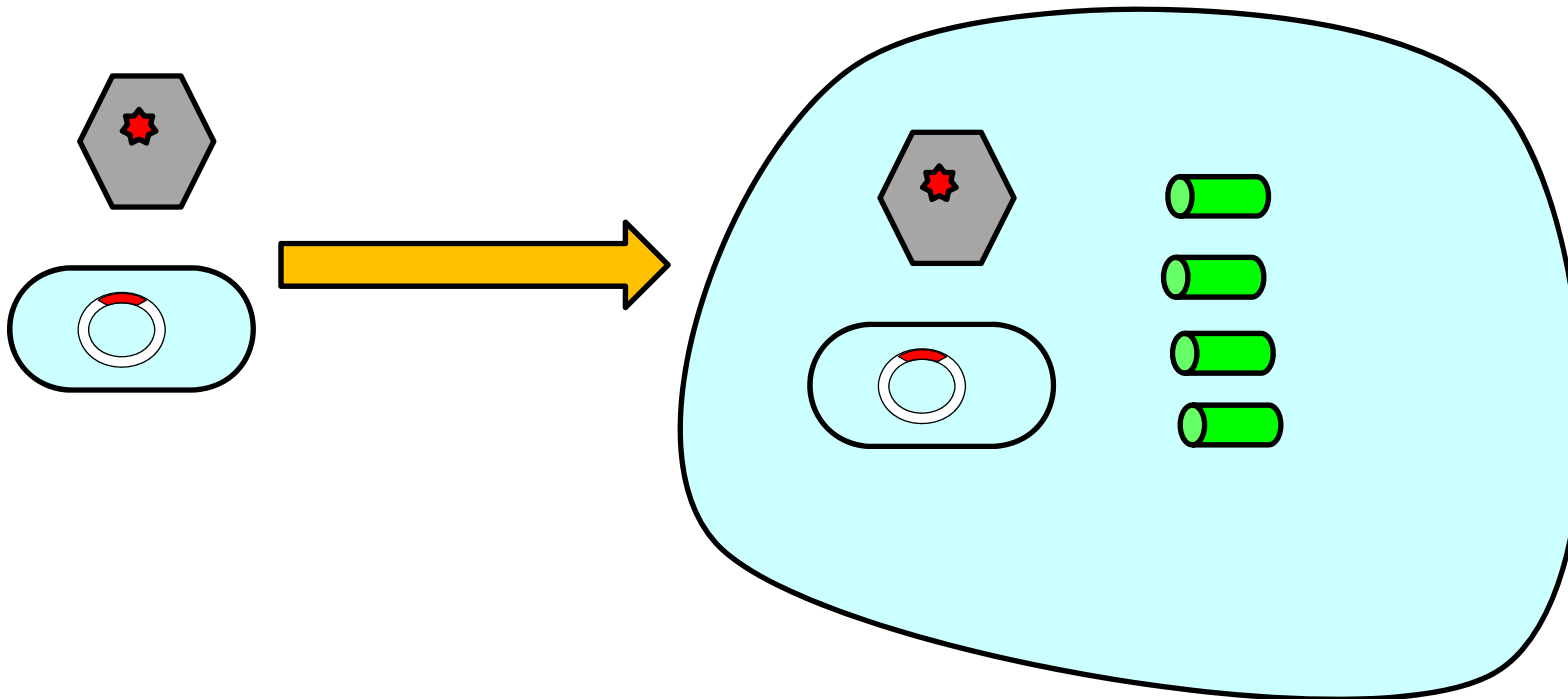
Virus Erpetico dopo delezione del gene TK che causa la virulenza

Vaccini attivi ricombinanti eterologhi:
clonazione in vettori virali o batterici,
geneticamente modificati

VIRUS Es virus del vaiolo bovino: vettore
per vaccini ricombinanti, tra cui
alcuni sperimentali anti-HIV

MUTANTI DI BATTERI INVASIVI

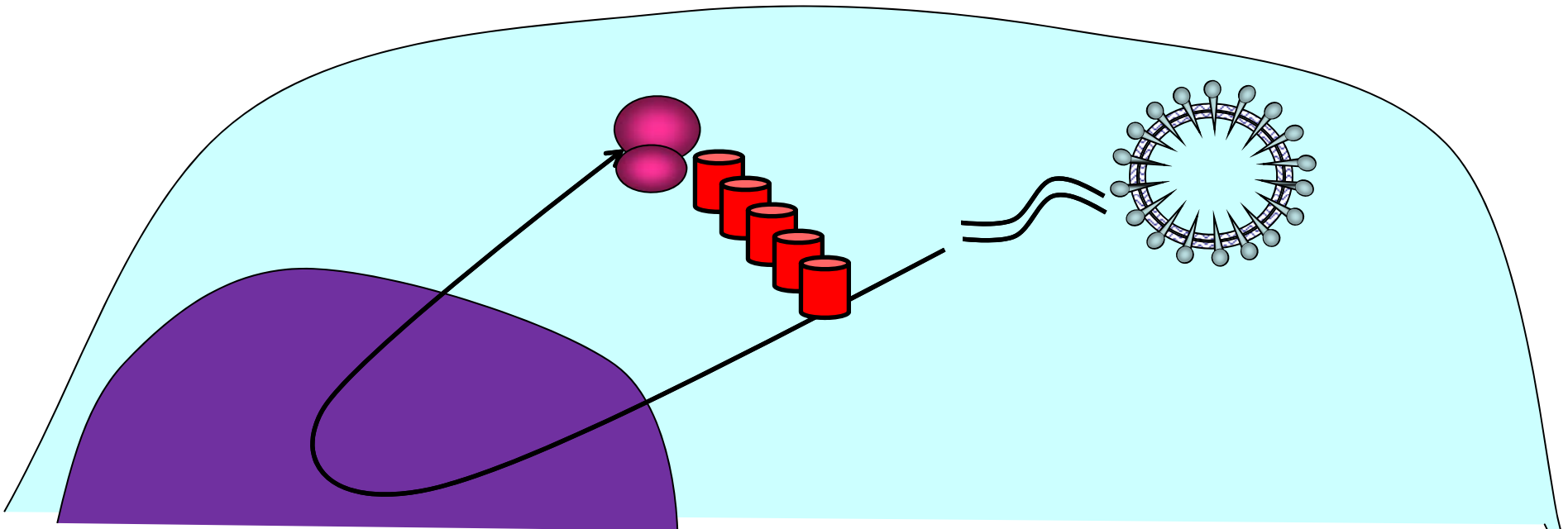
Mutanti di *Salmonella enterica* sono
usati per lo sviluppo di un nuovo
vaccino anti-HBV



VACCINI A DNA

Lo scopo di un vaccino a DNA è promuovere la sintesi dell'antigene direttamente all'interno di una cellula

Mimando quello che succede nelle infezioni virali



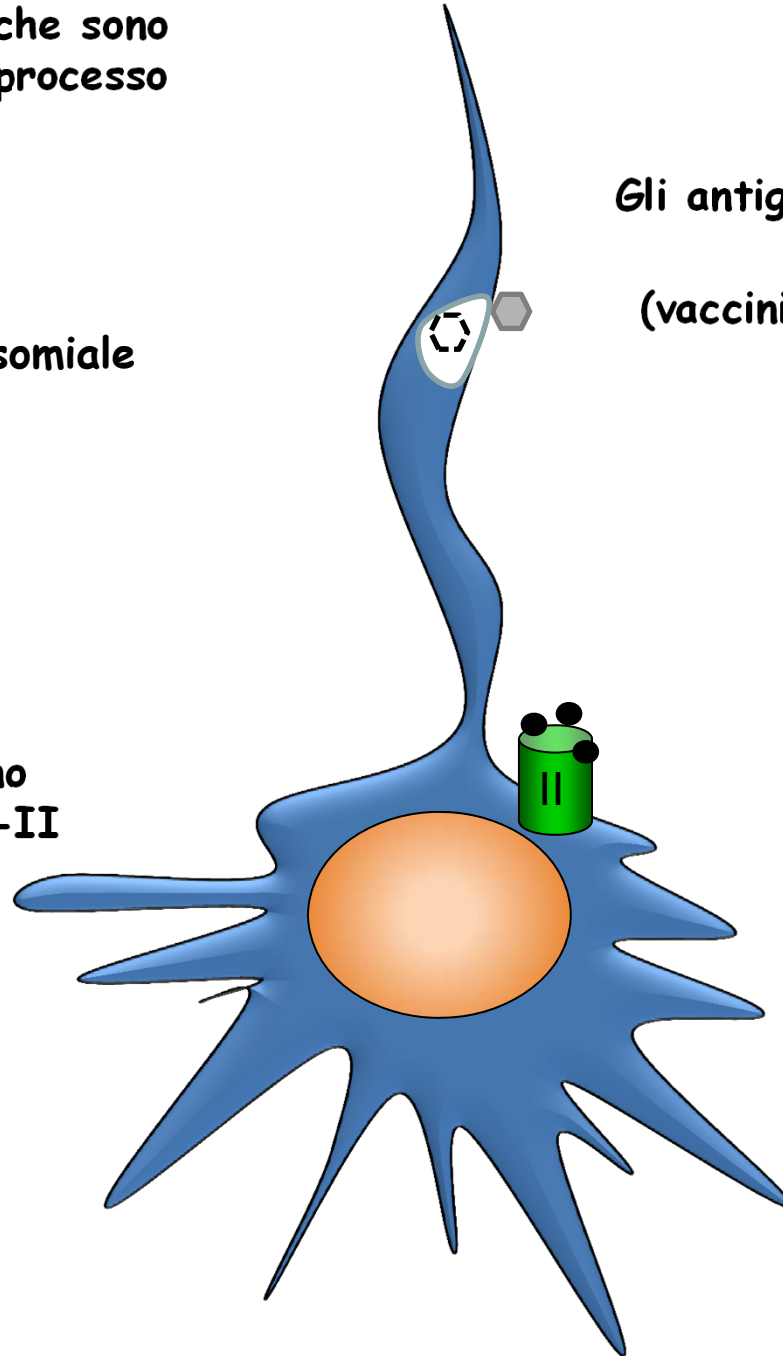
Le cellule Dendritiche sono
critiche in questo processo

Seguono la via endolisosomiale

Sono degradati

E i frammenti sono
presentati su MHC-II

Gli antigeni che vi penetrano
dall'esterno
(vaccini uccisi o attenuati)



Se invece l'informazione per l'antigene è
inserita direttamente nella cellula

Raggiunge il nucleo

È trascritta

L'antigene è prodotto nel
citoplasma e segue due vie:

Esce dalla cellula

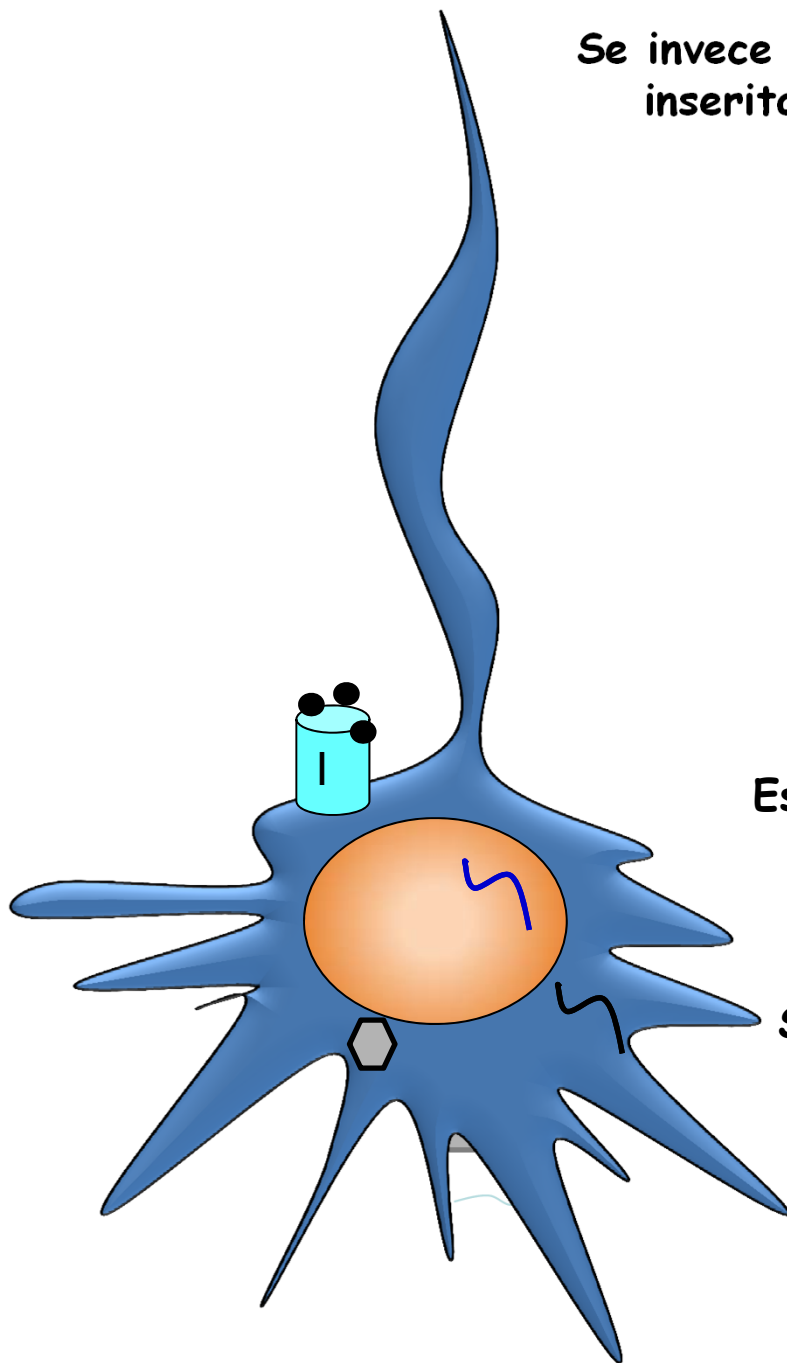


S.I. come i vaccini
tradizionali

È tagliato e
presentato su MHC-I



Attivazione dei CD8



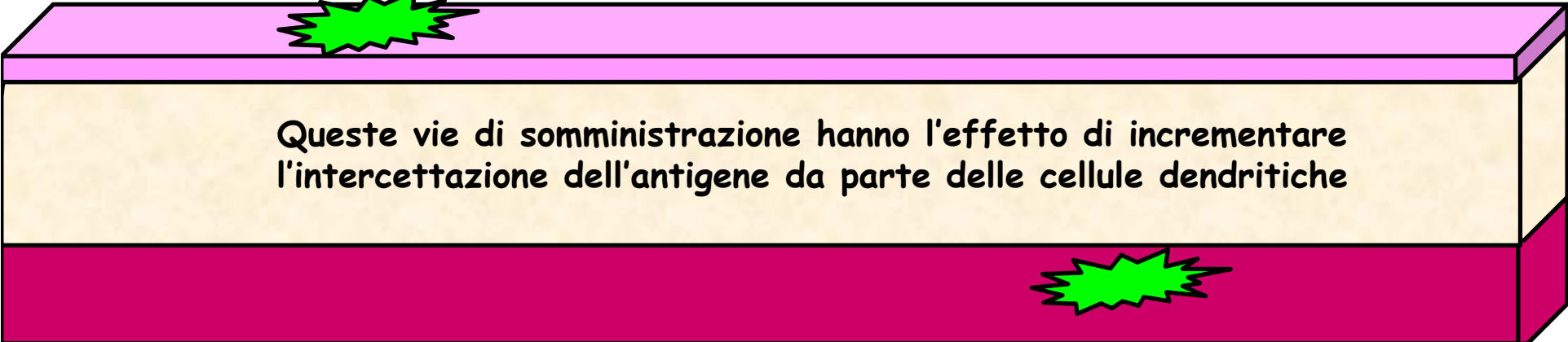
La forma di rilascio nella cellula
è su di un plasmide

Il gene deve essere sotto un
promotore eucariotico

La somministrazione può avvenire per via

INTRADERMICA

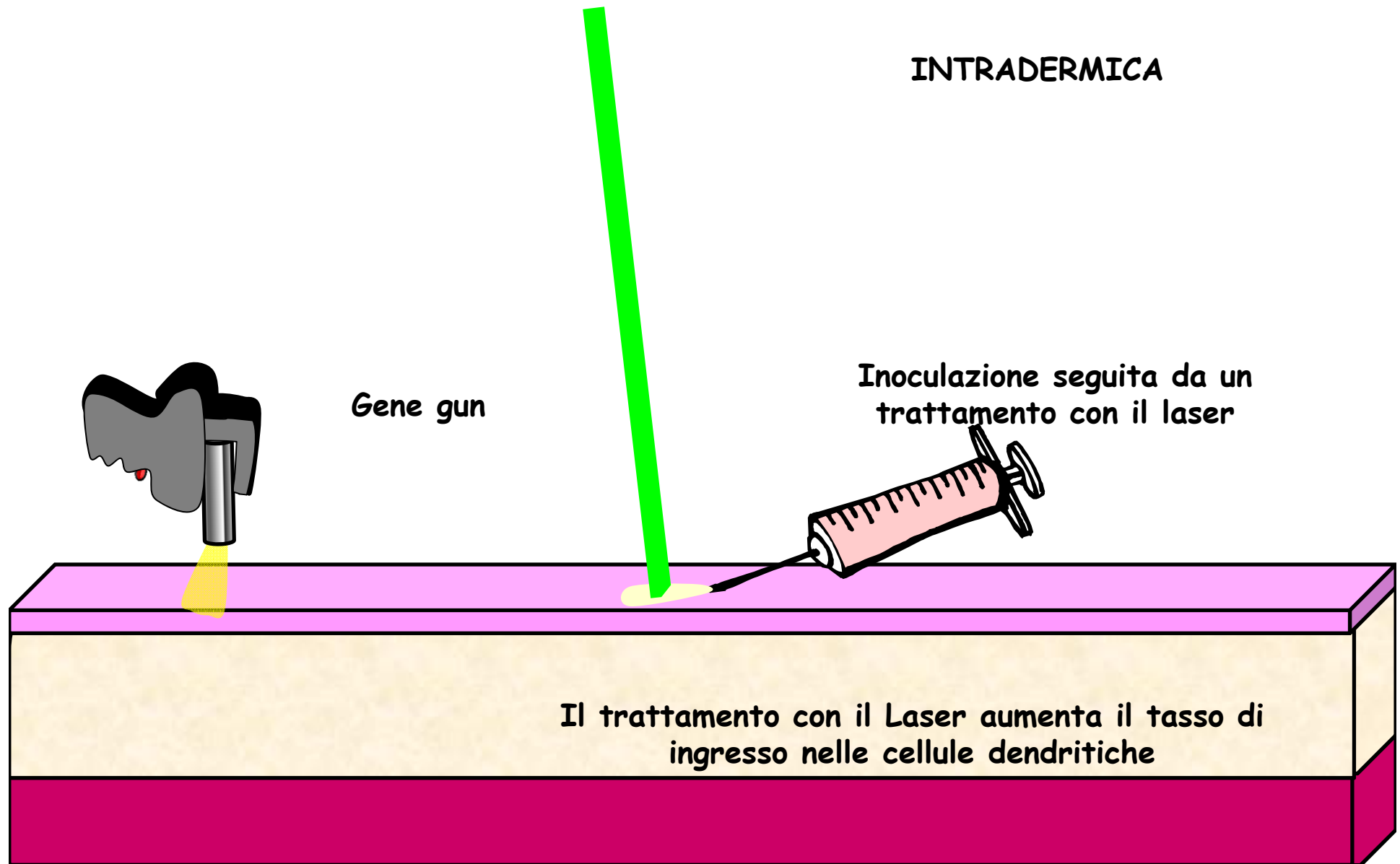
INTRAMUSCOLARE

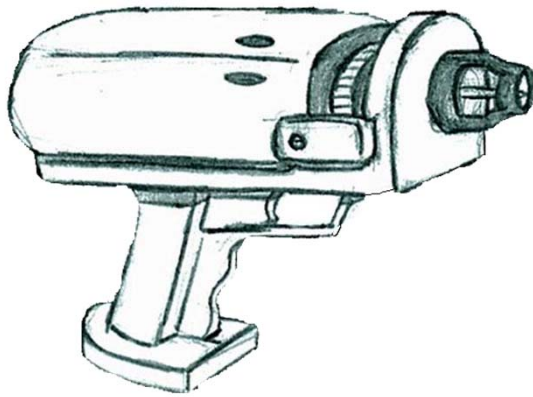


Queste vie di somministrazione hanno l'effetto di incrementare
l'intercettazione dell'antigene da parte delle cellule dendritiche

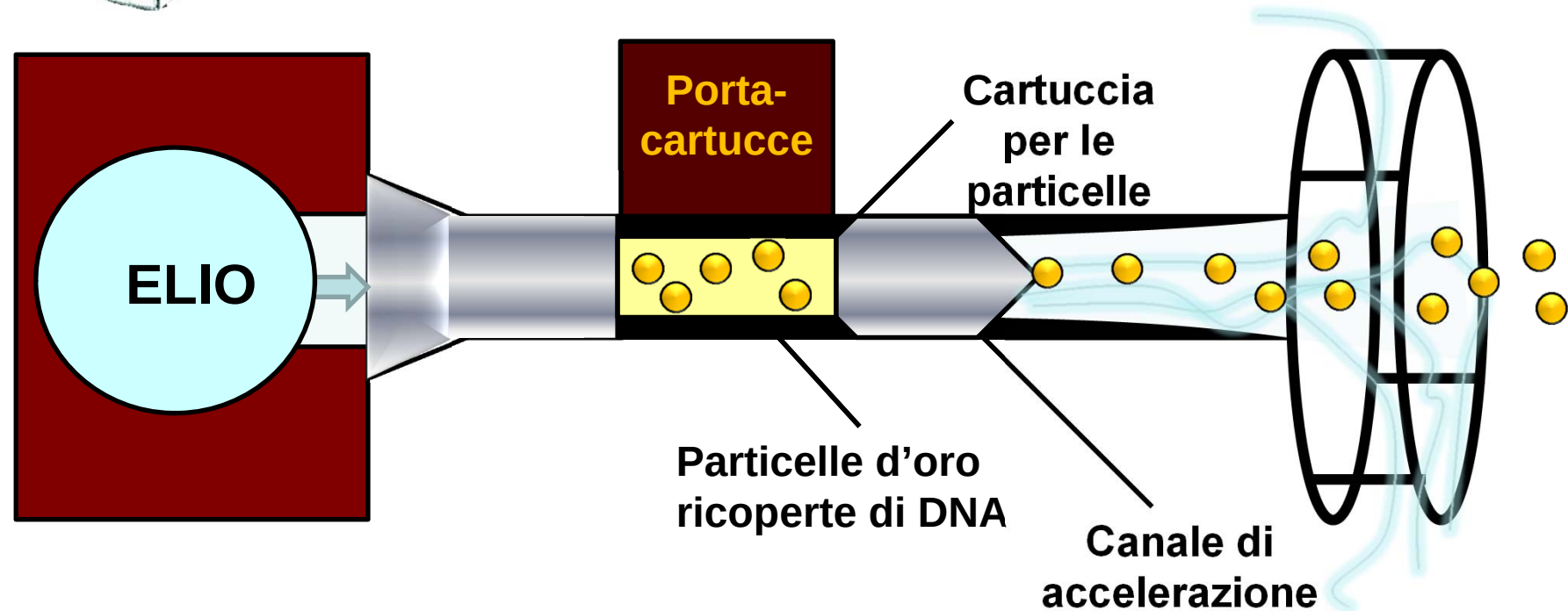
The diagram illustrates the skin layers and injection sites. It consists of a 3D rectangular block divided into three horizontal layers. The top layer is light pink, the middle layer is light yellow, and the bottom layer is dark pink. A green starburst icon is located on the surface of the top layer, representing an intradermal injection. Another green starburst icon is located within the bottom layer, representing an intramuscular injection. Arrows from the text 'INTRADERMICA' and 'INTRAMUSCOLARE' point to these respective locations.

INTRADERMICA





Il "Gene gun" è un dispositivo che spara particelle d'oro ricoperte con l'antigene



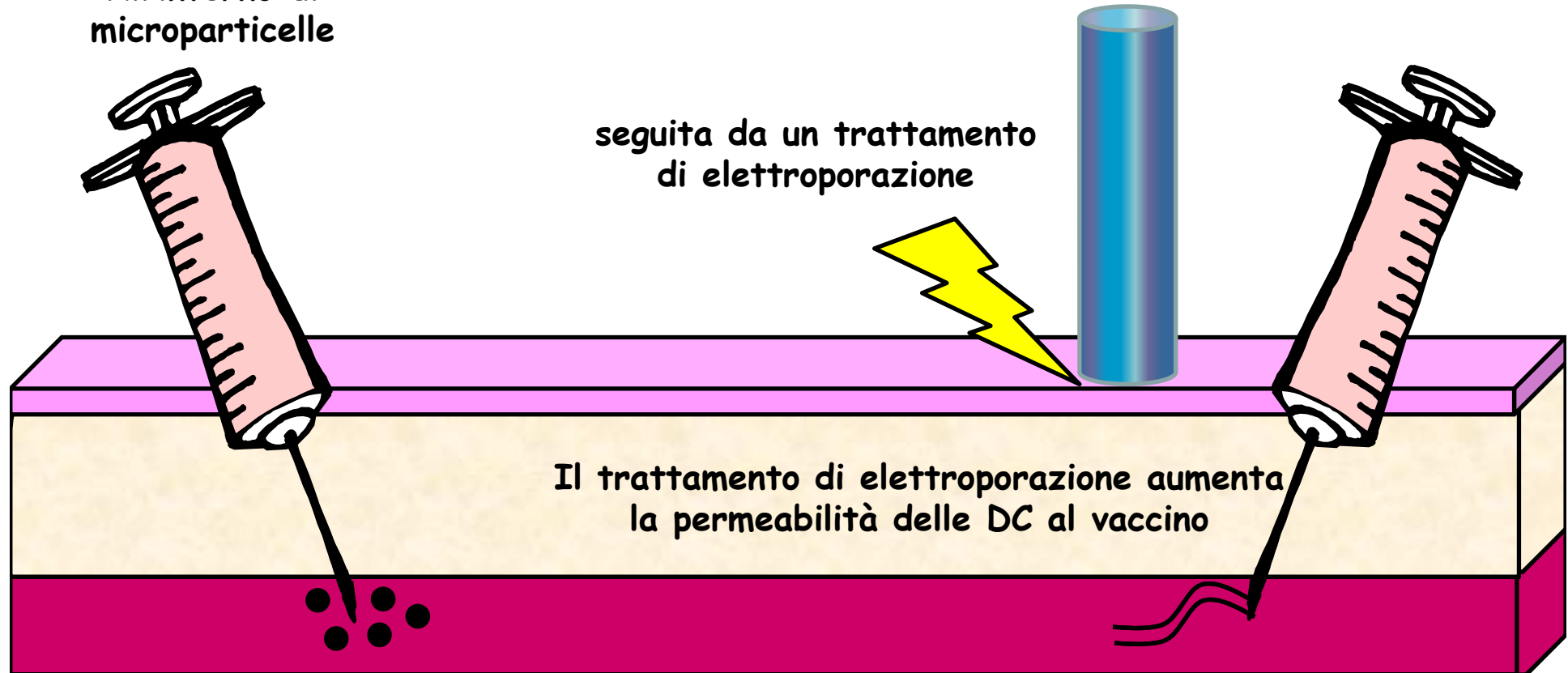
Le particelle entrano così in contatto direttamente con le cellule di Langerhans: DC immature situate subito sotto la pelle

INOCULAZIONE INTRAMUSCOLARE

All'interno di
microparticelle

come DNA nudo

seguita da un trattamento
di elettroporazione

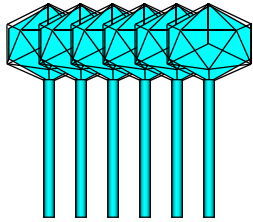


Il trattamento di elettroporazione aumenta
la permeabilità delle DC al vaccino

Le particelle favoriscono l'uptake

E' STATO ANCHE PROPOSTO UN TIPO DI RILASCIO
ALTERNATIVO AI PLASMIDI

CLONARE IL GENE NEL GENOMA DI
UN BATTERIOFAGO



AMPLIFICARE IL FAGO

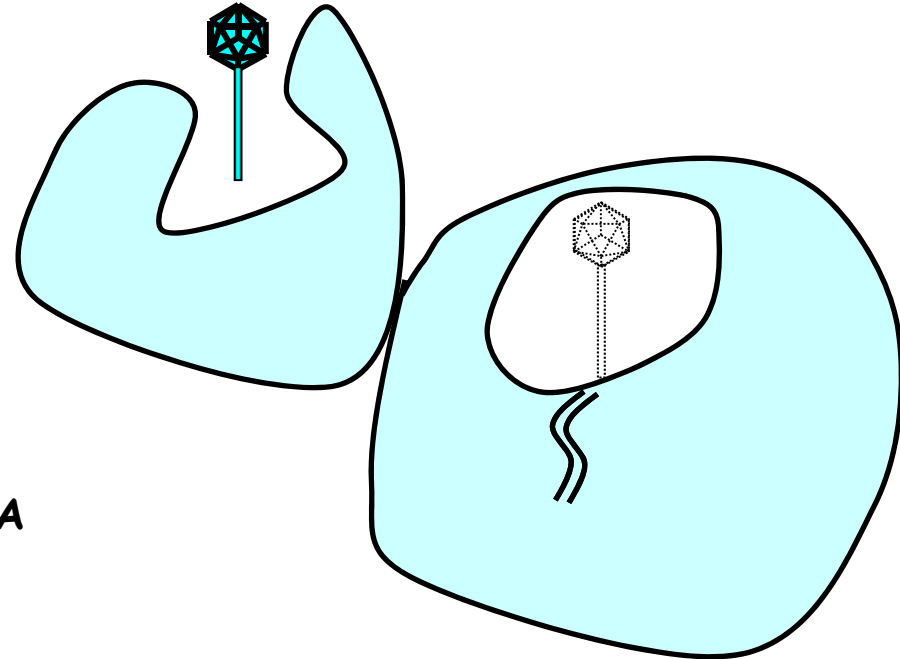
LE CELLULE APC CATTURANO IL
BATTERIOFAGO

IL CAPSIDE E' DEGRADATO

L'INFORMAZIONE E' RILASCIATA
NEL CITOPLASMA..



INOCULARE IL
FAGO PURIFICATO



I VANTAGGI DEI VACCINI A DNA SONO MOLTI

STABILITA'

**PRODUZIONE SEMPLICE ED
ECONOMICA**

**FACILITA' DI
MANIPOLAZIONE
DELL'ANTIGENE (SEGUIRE LE
MUTAZIONI DEL PATOGENO)**

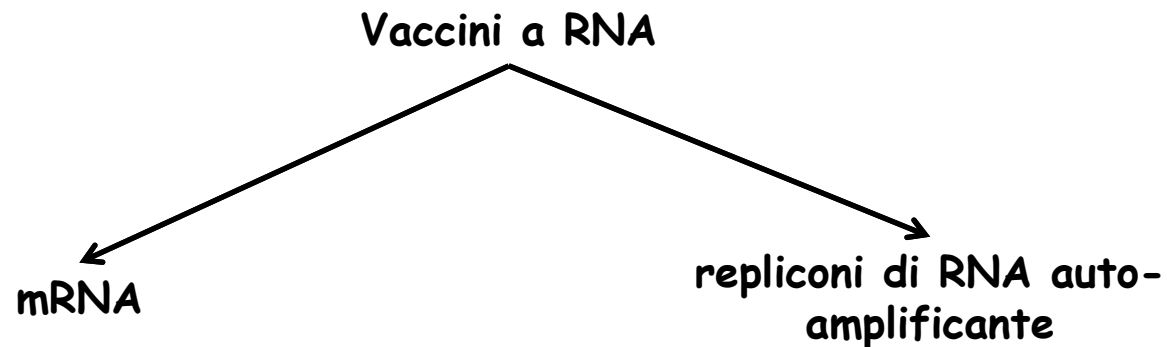
**SINTESI PROTEICA DIRETTA
DA PARTE DELL'OSPITE**

**STIMOLAZIONE
PROLUNGATA DEL S.I.**

Il loro punto critico per i vaccini a DNA, è il trasporto attraverso la membrana nucleare

Particolarmente inefficiente nelle cellule che non si dividono (es. miociti maturi)

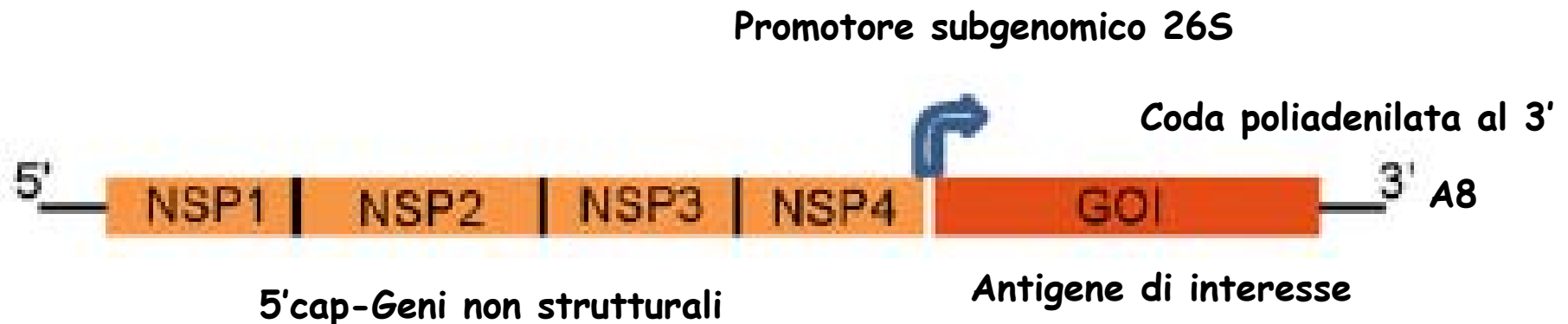
Per ovviare a questo inconveniente sono stati sperimentati i



Nonviral delivery of self-amplifying RNA vaccines

Andrew J. Geall^{a,1}, Ayush Verma^a, Gillis R. Otten^a, Christine A. Shaw^a, Armin Hekele^a, Kaustuv Banerjee^a, Yen Cu^a, Clayton W. Beard^a, Luis A. Brito^a, Thomas Krucker^b, Derek T. O'Hagan^a, Manmohan Singh^a, Peter W. Mason^a, Nicholas M. Valiante^a, Philip R. Dormitzer^a, Susan W. Barnett^a, Rino Rappuoli^a, Jeffrey B. Ulmer^a, and Christian W. Mandl^a

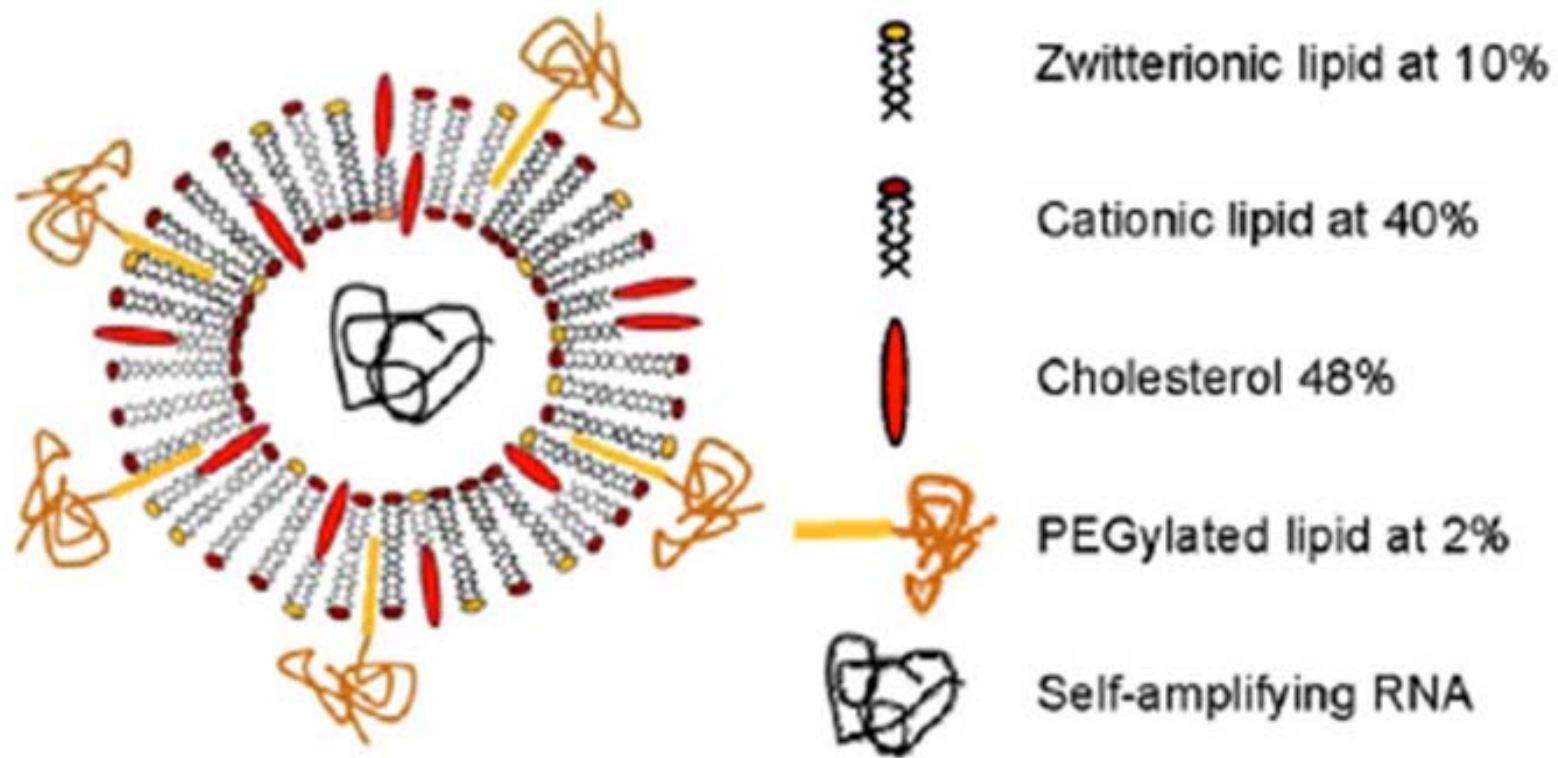
www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1209367109



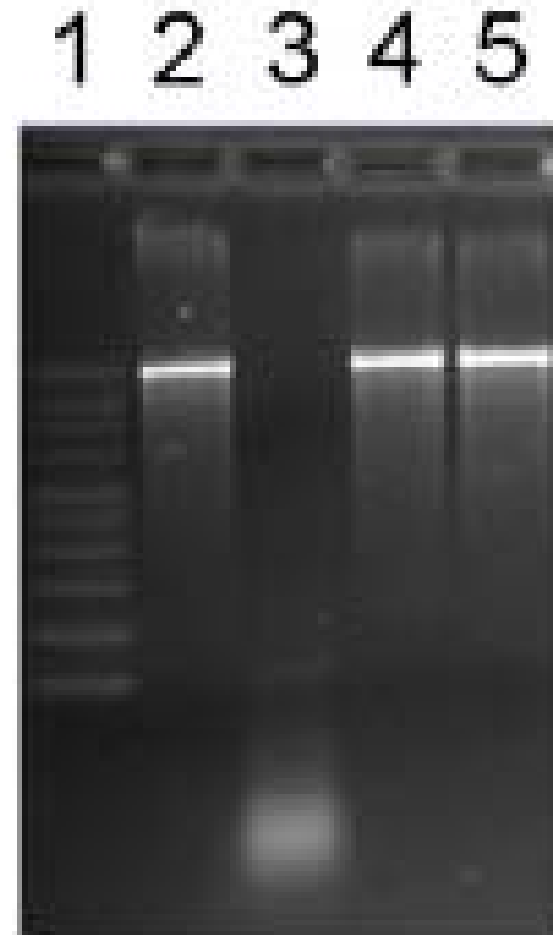
I geni non strutturali guidano la propria amplificazione nel citoplasma della cellula ospite; nei vettori derivati dagli alphavirus, gli antigeni sostituiscono I geni che codificano il capsido e le glicoproteine

Il vettore amplifica il proprio intero genoma nel citoplasma e dà inizio poi alla produzione dell'mRNA sub genomico che codifica l'antigene

Nanoparticella lipidica (LNP) che incapsula l'RNA auto-amplificante



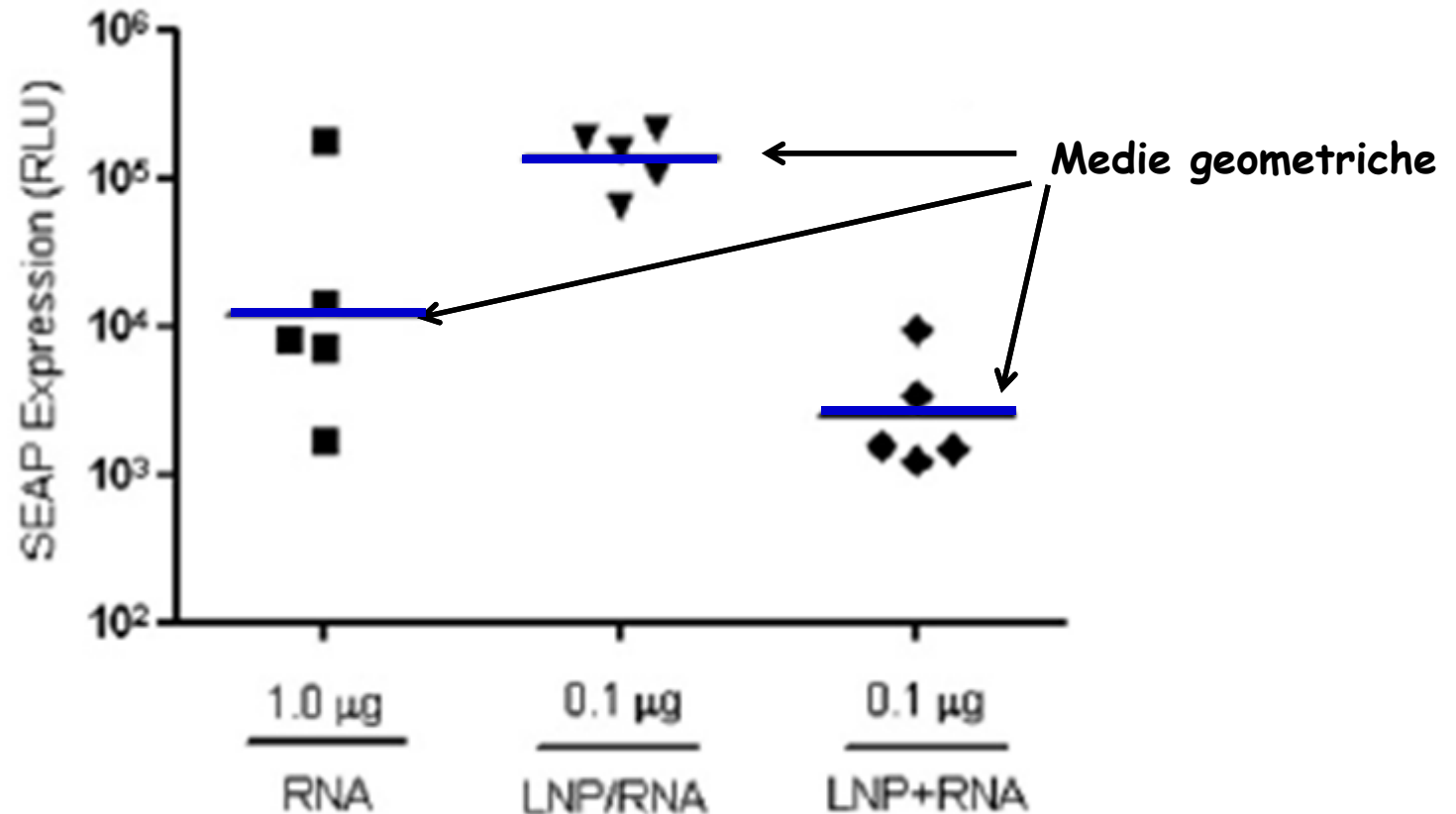
Le LNP proteggono in modo efficace l'RNA



RNA agarose gel electrophoresis:

- 1) RNA ladder**
- 2) RNA "self-amplifying"**
- 3) RNA "self-amplifying" dopo esposizione a RNAsi**
- 4) estrazione con PCI di RNA "self-amplifying" da una LNP**
- 5) estrazione con PCI di RNA "self-amplifying" da una LNP, dopo esposizione a RNAsi**

In vivo expression of di fosfatasi alcalina secreta (SEAP)
6 giorni dopo iniezione intramuscolare di:



self-amplifying RNA in PBS

self-amplifying RNA incapsulato in LNP

self-amplifying RNA mescolato con LNP (non all'interno)

Confronto di diversi tipi di vaccini contro il virus sinciziale respiratorio

