

Progetto "TENET – Targeting bacterial cell ENvelope to reverse rEsisTance in emerging pathogens"

Codice Identificativo: 202288EJ8B - CUP: E53D23009760006

Il progetto TENET aveva l'obiettivo di studiare proteine di membrana di *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii* multiresistenti al fine di arginare importanti meccanismi di resistenza di questi patogeni.

In particolare, il progetto si è concentrato su due principali meccanismi di resistenza:

i) la resistenza alla colistina causata da modifiche del lipopolisaccaride (LPS);

ii) la resistenza/tolleranza ad antibiotici e biocidi determinata dall'attivazione delle pompe di efflusso.

Il progetto è stato svolto da tre unità di ricerca, l'unità operativa 1 (RU1), Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), responsabile dr. Rita Berisio, coordinatrice del progetto; l'unità operativa 2 (RU2), Università degli Studi di Milano (UNIMIB), responsabile Prof. Francesco Peri; l'unità operativa 3, Università di Napoli Federico II (UNINA), responsabile Prof. Raffaele Zarrilli.

L'Unità operativa 1 (RU1), CNR, ha partecipato ai WP1-WP3 e coordinato il WP1. Ha inoltre coordinato il progetto, come leader del WP4.

Nei task 1-4 del WP1, RU1 si è occupata della produzione in forma ricombinante e della caratterizzazione strutturale e biochimica di proteine responsabili dei principali meccanismi di resistenza in *A. baumannii* e di nuove proteine d'interesse contro *K. pneumoniae* e *Enterococcus faecium* multiresistenti.

Sulla base delle informazioni strutturali e funzionali generate nel WP1, RU1 ha identificato piccole molecole in grado di inibire la proteina PmrC di *A. baumannii* (Task 1 del WP2). Combinando metodologie interferometriche e calorimetriche ha caratterizzato il binding di queste molecole all'enzima (Task 4 del WP2). In collaborazione con RU2 e RU3, queste molecole sono ancora in via di miglioramento hit-to-lead. I test microbiologici effettuati dalla RU3 hanno dimostrato (Task 1 del WP3) hanno dimostrato l'efficacia dell'inibizione della proteina PmrC come strategia per contrastare la resistenza alla colistina (Romano et al 2024). La RU1 ha inoltre studiato proteine di notevole interesse per lo sviluppo di inibitori contro *K. pneumoniae* (Privitera et al 2025, Napolitano et al 2025) e *E. faecium* (Napolitano et al 2025).

L'Unità Operativa 2 (RU2), UNIMIB, ha svolto le attività previste originariamente nel WP2 (Sviluppo di piccoli inibitori molecolari) e ha contribuito al WP3 (Test biologici) e al WP4 (Disseminazione). L'Unità UNIMIB si è concentrata sulla progettazione, sintesi, ottimizzazione e caratterizzazione biologica di molecole immunomodulanti contro i patogeni oggetto di studio. In particolare, si è occupata di agonisti sintetici di TLR4 strutturalmente semplificati, basati su monosaccaridi e derivati da mimetici del lipid A. Questi composti rappresentano alternative chimicamente accessibili e scalabili al MPLA. Le attività hanno incluso: sintesi organica e ottimizzazione strutturale delle molecole della serie FP (FP18, FP20, FP20Rha e derivati glicosilati); conferma strutturale tramite NMR, MS e HPLC; caratterizzazione immunologica meccanicistica; ottimizzazione finalizzata a migliorare potenza biologica e compatibilità formulativa. Tali attività sono state completate secondo il piano previsto, attraverso cicli iterativi di chimica medicinale integrati con test biologici. Un risultato di particolare rilievo dell'unità è stato la caratterizzazione biologica e lo studio del meccanismo d'azione dei derivati glicosilati di FP20.

L'Unità Operativa 3 (RU3), UNINA ha studiato l'epidemiologia genomica, la suscettibilità agli antimicrobici e i geni di resistenza associati negli isolati di *A. baumannii*. Durante la fase iniziale del progetto di ricerca, RU3 ha sviluppato e validato diversi strumenti bioinformatici per analizzare i genomi delle specie cliniche più rilevanti del genere *Acinetobacter* e i loro geni di resistenza agli antimicrobici (Migliaccio et al.,

2023). Inoltre, RU3 ha revisionato i meccanismi d'azione e di resistenza, nonché la suscettibilità agli antimicrobici degli isolati di *A. baumannii* nei confronti dei nuovi beta-lattamici attivi contro *A. baumannii* resistente ai carbapenemi (Karruli et al., 2023).

RU3 ha partecipato ai Work Packages (WPs) 1–3 del progetto e ha coordinato le attività scientifiche descritte nel WP3. RU3 ha collaborato con RU1 al clonaggio e all'espressione della proteina di membrana ricombinante PmrC PteN transferasi in *A. baumannii* e ha dimostrato che il gene *pmrC* è sovraespresso in due ceppi di *A. baumannii* resistenti alla colistina. Per affrontare il Task 1 del WP3, RU3 ha dimostrato che il ligando s-Phen, inibitore competitivo di PmrC, a concentrazioni non citotossiche, riduce la suscettibilità alla colistina da 16 a 64 volte nei ceppi di *A. baumannii* resistenti alla colistina (Romano et al., 2024). Per affrontare i Task 1–4 del WP3, RU3 ha studiato la suscettibilità dei biofilm di *A. baumannii* ai biocidi clorexidina (CHX) e benzalconio (BZK) e la capacità dello stilbenoide monomero naturale resveratrolo (RV) di modulare questo fenomeno. Gli effetti dei biocidi e del resveratrolo e il contributo delle pompe di efflusso sono stati testati sui biofilm di isolati di *A. baumannii* appartenenti a diversi genotipi. In tali esperimenti, RU3 ha dimostrato che CHX e BZK, da soli o in presenza di RV, inibiscono la crescita del biofilm e il biofilm preformato in *A. baumannii*; che la tolleranza a CHX e BZK durante la crescita del biofilm dipende dall'attivazione delle pompe di efflusso AdeB e AdeJ; e che l'effetto inibitorio di RV sulla crescita del biofilm è mediato dall'inibizione dell'espressione dei geni delle pompe di efflusso in *A. baumannii* (Migliaccio et al., 2024).

Il progetto ha richiesto solo minime variazioni, per uno svolgimento più efficiente delle attività di ricerca.

Per identificare le molecole di membrana di *A. baumannii* multiresistente responsabili della resistenza ad antimicrobici e biocidi, la RU3 ha tipizzato i profili dei loci capsulari (KL) e dei loci dell'O-antigene (OL) dei ceppi di *A. baumannii*. Tale analisi, inizialmente condotta sui ceppi assegnati al lignaggio clonale epidemico ST25, ha dimostrato che gli isolati ST25, indipendentemente dal loro profilo di resistenza agli antimicrobici, presentano una significativa correlazione positiva tra la presenza dei genotipi KL14 e OL6 e la resistenza allo stress ossidativo, la resistenza alla disseccazione e la capacità di uccidere le larve di *Galleria mellonella* (Migliaccio et al., 2026). La caratterizzazione dei profili KL e OCL dei ceppi di *A. baumannii* risulta quindi necessaria per studiare i meccanismi di resistenza ad antimicrobici e biocidi e correlare tali caratteristiche con i loro tratti di virulenza.

Inoltre, la proposta originale era focalizzata principalmente su *K. pneumoniae* e *A. baumannii* come patogeni modello del gruppo ESKAPE. Durante l'implementazione del progetto, sulla base di nuove urgenze epidemiologiche e di opportunità traslazionali, il consorzio ha deciso di sostituire *K. pneumoniae* con *Pseudomonas aeruginosa* come patogeno target. Questa variazione, anche giustificata dalla criticità sotto riportata, è pienamente coerente con l'impianto scientifico originale poiché: *P. aeruginosa* appartiene al gruppo ESKAPE; è classificato come WHO Priority 1 – Critical; condivide l'architettura dell'involucro cellulare tipico dei Gram-negativi rilevante per l'attivazione immunitaria mediata da TLR4; ed è una delle principali cause di infezioni ospedaliere multiresistenti. Inoltre, poiché il progetto si concentrava sulle proteine di membrana dei patogeni nosocomiali, il consorzio ha ritenuto di studiare anche proteine da *E. faecium*, data l'emergenza di ceppi vancomicina-resistenti.

Tali modifiche non hanno avuto impatto sugli obiettivi del progetto, che non si sono discostati dal fine generale di contrastare la resistenza antimicrobica nei patogeni ESKAPE. Al contrario, hanno rafforzato l'impatto traslazionale, ampliando le strategie orientate allo sviluppo vaccinale, che complementano gli approcci basati su inibitori. L'inclusione di *P. aeruginosa* e *E. faecium* ha aumentato la produzione e il valore

scientifico dei risultati, e la piattaforma adiuvante ha dimostrato efficacia in un modello di infezione clinicamente rilevante.

Piccole misure correttive sono state necessarie per una implementazione più efficiente delle attività di ricerca. Infatti, mentre il consorzio ha avuto piena disponibilità di diversi strumenti genomici, molecolari e microbiologici per studiare i meccanismi di resistenza agli antimicrobici e ai biocidi in *A. baumannii* (Migliaccio et al., 2023, 2024; Romano et al., 2024), più critica è stato lo studio di *K. pneumoniae*. Per questo motivo, ha concentrato le attività di studio del progetto sui meccanismi di resistenza in *A. baumannii*. Per ciò che riguarda *K. pneumoniae*. Il consorzio ha effettuato studi computazionali e di biologia strutturale su molecole di origine fagica in grado di degradare le capsule di *K. pneumoniae*, rendendo il batterio suscettibile agli antibiotici (Privitera et al 2025, Napolitano et al 2025).

Pubblicazioni.

Il progetto ha prodotto 10 pubblicazioni scientifiche su riviste Internazionali ad alto impatto. Altre pubblicazioni sono state inviate e in corso di valutazione. Tra queste, si fornisce una lista non esaustiva con una descrizione sintetica:

1. Romano et al Front Microbiol; 15:1501051, 2024.

Lo studio descrive la produzione ricombinante e la caratterizzazione biofisica in soluzione della proteina di membrana PmrC, una PetN transferasi. Inoltre, approcci in silico, tra cui virtual screening e modellistica molecolare, sono stati utilizzati per identificare ligandi di PmrC. È stato dimostrato che una piccola molecola, denominata qui s-Phen, si lega a PmrC con un'affinità nell'ordine dei micromolari. Test microbiologici hanno confermato che s-Phen può ridurre drasticamente la concentrazione minima inibente (MIC) della colistina in due isolati resistenti di *A. baumannii* e che non presenta citotossicità. È importante sottolineare che il sito di legame di PmrC per s-Phen è altamente conservato in tutti gli omologhi di PmrC, indipendentemente dalla posizione dei geni che li codificano e dai rispettivi operoni. Lo studio fornisce una caratterizzazione molecolare di PmrC e dimostra l'importanza di questo enzima come target farmacologico e il forte potenziale delle molecole leganti PmrC come adiuvanti della colistina, capaci di agire in sinergia per contrastare patogeni multiresistenti.

2. Migliaccio et al, Front. Microbiol. 15:1494772, 2024.

Lo studio analizza la suscettibilità dei biofilm di *A. baumannii* ai biocidi clorexidina (CHX) e benzalconio (BZK), e la capacità dello stilbenoide monomero naturale resveratrolo (RV) di modulare tale fenomeno. I dati ottenuti dimostrano che: (i) CHX e BZK, da soli o in presenza di RV, inibiscono la formazione del biofilm e il biofilm preformato in *A. baumannii*; (ii) la tolleranza a CHX e BZK durante la crescita del biofilm dipende dall'attivazione delle pompe di efflusso AdeB e AdeJ; e (iii) l'effetto inibitorio di RV sulla crescita del biofilm è mediato dalla repressione dell'espressione dei geni delle pompe di efflusso in *A. baumannii*.

3. Migliaccio et al, mSphere. 11:e00717-25, 2026.

Lo studio ha condotto un'analisi integrata genomica e fenotipica per valutare le caratteristiche di virulenza degli isolati di *A. baumannii* appartenenti allo ST25. Gli isolati classificati nel lignaggio clonale epidemico ST25 mostravano un'elevata similarità genomica e si raggruppavano in quattro cladi (I, II, III e IV), con il clade IV ulteriormente suddiviso in CIVa, CIVb, CIVc e CIVd. Il locus capsulare (KL) KL14 risultava il tipo predominante (47%).

Gli isolati ST25 di *A. baumannii* appartenenti ai cladi CIVb e CIVd mostravano una maggiore capacità di infettare le larve di *Galleria mellonella* rispetto agli isolati CI, CII, CIII e CIVc. La resistenza al perossido di idrogeno era più elevata negli isolati CI, CII, CIVb e CIVd rispetto a quelli CIII e CIVc. Nei test di sopravvivenza alla disseccazione, gli isolati CIII, CIVb e CIVd presentavano una sopravvivenza prolungata. Inoltre, gli isolati CI, CII, CIII, CIVb e CIVd mostravano una maggiore resistenza al siero rispetto agli isolati CIVc. Anche gli isolati di tipo KL14 e di tipo OCL6 (locus dell'outer core del lipooligosaccaride) erano significativamente più resistenti allo stress ossidativo, alla disseccazione e mostravano una elevata capacità di uccidere le larve di *G. mellonella*. È stata inoltre riscontrata una correlazione positiva e significativa tra l'espressione delle pompe di efflusso AdeB e AdeJ e la resistenza al perossido di idrogeno.

4. Privitera et al. Front Biosci (Landmark Ed). 30(11):46489. 2025

In questo studio, l'intelligenza artificiale e analisi bioinformatiche sono state utilizzate per ricostruire la struttura finora sconosciuta del fago KP32, specifico per ceppi di *K. pneumoniae* con sierotipi capsulari K3 e K21/KL163. I fagi si sono infatti dimostrati altamente efficaci nel colpire ceppi di *K. pneumoniae* multiresistente, rappresentando una promettente alternativa alle terapie antibiotiche tradizionali. L'analisi ha permesso di modellare l'intero fago, composto da oltre 500 catene proteiche organizzate nel capsido e nel complesso core-portal-tail, responsabile dell'adesione al batterio, della degradazione dei polisaccaridi capsulari e dell'iniezione del genoma virale. Questi risultati dimostrano che la ricostruzione strutturale completa dei fagi è oggi una strategia efficace per comprenderne i meccanismi d'azione e ampliare le potenzialità applicative della terapia fagica come alternativa alle terapie antimicrobiche tradizionali.

5. Napolitano et al. Int J Antimicrob Agents. 66(6):107596, 2025

Lo studio analizza la depolimerasi KP32gp38 del fago *K. pneumoniae* Przondovirus KP32, parte di una complessa macchina di degradazione capsulare. Attraverso saggi di degradazione del polisaccaride capsulare (CPS) e spettrometria di massa, è stato identificato come prodotto della reazione un pentasaccaride piruvato (K21-pyr5), poi utilizzato per determinare la struttura cristallina dell'enzima in complesso con il suo ligando. La struttura mostra che K21-pyr5 si lega al sito catalitico inter-catena, rivelando i residui chiave per il riconoscimento del CPS. È stato inoltre osservato che il prodotto di degradazione K21-pyr5 stimola la maturazione e la differenziazione delle cellule dendritiche, inducendo proliferazione linfocitaria e polarizzazione Th. Analisi modellistiche suggeriscono che ogni virione KP32 porta 12 depolimerasi, organizzate in sei rami che collegano KP32gp38 a KP32gp37 e quindi al portale del fago. Nel complesso, i risultati indicano che le depolimerasi agiscono come agenti antivirulenza sia eliminando il CPS batterico sia producendo molecole immunostimolatorie, aprendo alla possibilità di impiegare i prodotti di degradazione del CPS come antigeni in strategie vaccinali contro *K. pneumoniae*.

6. Franco et al., RSC Medicinal Chemistry, 2025.

Questo studio presenta una caratterizzazione completa, biologica e meccanicistica, di agonisti sintetici di TLR4 basati su monosaccaridi glicosilati derivati dallo scaffold FP20. Il lavoro dimostra che una glicosilazione mirata potenzia l'attivazione di TLR4 e modula le vie di segnalazione a valle, incluse le cascate dipendenti da MyD88 e TRIF. I derivati ottimizzati inducono la traslocazione nucleare di NF- κ B, la fosforilazione di STAT1 e la polarizzazione dei macrofagi verso il fenotipo M1 in macrofagi derivati da THP-1. Inoltre, i composti promuovono la piroptosi dipendente da gasdermina e il rilascio di citochine pro-infiammatorie come IL-1 β e IFN- β . Rispetto alla molecola parentale, i derivati glicosilati mostrano una maggiore potenza immunostimolatoria mantenendo una bassa tossicità. Questi risultati definiscono una piattaforma sintetica scalabile per lo sviluppo di nuovi adiuvanti vaccinali e immunoterapeutici.

7. Shaik et al., Journal of Medicinal Chemistry, 2024.

Questo studio descrive lo sviluppo razionale di un sistema adiuvante completamente sintetico, ispirato alla formulazione clinicamente approvata AS01. Lo studio sostituisce l'MPLA con l'agonista sintetico di TLR4 FP20 e la QS-21 naturale con una variante sintetica semplificata (QS21v). Le proprietà chimico-fisiche della co-formulazione sono state caratterizzate mediante calorimetria a scansione differenziale, dynamic light scattering, misure di potenziale ζ e crio-microscopia elettronica. I nano-aggregati ottimizzati (~120 nm) hanno mostrato elevata omogeneità e stabilità. Studi di immunizzazione in vivo, utilizzando ovalbumina come antigene modello, hanno rivelato un potenziamento sinergico delle risposte IgG specifiche rispetto ai singoli adiuvanti. I risultati evidenziano la fattibilità di sostituire adiuvanti naturali complessi con alternative chimicamente definite e scalabili, migliorando sostenibilità e riproducibilità dei processi produttivi.

8. A. Franco, J. Med. Chem. 2024, 67, 5603–5616

I vaccini rappresentano una delle più grandi conquiste della medicina moderna. Grazie al loro profilo più sicuro, le ricerche più recenti si concentrano solitamente sui vaccini a subunità. Tuttavia, il componente attivo deve spesso essere associato a un adiuvante per essere efficace e innescare correttamente una risposta immunitaria. Stiamo sviluppando un nuovo agonista sintetico del TLR4 a base di monosaccaridi, come i composti derivati dalla glucosamina FP18 e FP20, come potenziale adiuvante per il vaccino. In questo studio, presentiamo un nuovo derivato di FP20, FP20Hmp, con un estere idrossilato legato al nucleo di glucosamina. Dimostriamo che la modifica introdotta migliora l'attività dell'adiuvante e la sua solubilità. Questo studio presenta la sintesi di FP20Hmp, la sua caratterizzazione in vitro e l'attività in vivo in associazione con l'antigene dell'ovalbumina o in formulazione con un antigene enterococcico. Dimostriamo che FP20Hmp consente una maggiore produzione di anticorpi specifici per l'antigene che si legano all'intero batterio.

9. Sainz-Mejías et al., ACS Infectious Diseases, 2025.

Questo studio valuta l'efficacia protettiva degli agonisti sintetici di TLR4 FP18 e FP20Rha in un modello murino di polmonite acuta da *Pseudomonas aeruginosa*, utilizzando l'antigene OprF. L'immunizzazione con OprF adiuvato con FP18 ha ridotto significativamente la carica batterica polmonare e la disseminazione alla milza rispetto all'antigene da solo. FP18 ha potenziato le risposte IgG1 e IgG2c specifiche per l'antigene e ha indotto robuste risposte dei linfociti T CD4+ di tipo Th1, caratterizzate dalla produzione di IFN γ e TNF. Sebbene FP20Rha induca risposte infiammatorie, FP18 ha mostrato una superiore efficacia protettiva e un profilo immunitario più equilibrato tra risposta cellulare e umorale. Questi risultati dimostrano che agonisti sintetici di TLR4 strutturalmente semplificati possono migliorare la protezione vaccinale contro patogeni critici del gruppo ESKAPE, supportandone lo sviluppo traslazionale.

10. Napolitano et al. FEBS J. 2025 Oct;292(20):5475-5490.

E. faecium mostra alti livelli di resistenza antibiotica, con i ceppi vancomicino-resistenti considerati dall'OMS una seria minaccia. PpiC è una lipoproteina di membrana con attività peptidil-prolil isomerasi e foldase, essenziale per il corretto ripiegamento di molte proteine secrete ed è facilmente accessibile a farmaci e al sistema immunitario, rendendola un target promettente. Abbiamo determinato la struttura cristallina di PpiC e analizzato le sue proprietà biofisiche, rivelando un dimer a forma di scodella con due domini parvulinici. Le regioni N- e C-terminali risultano cruciali per la dimerizzazione, un processo che sembra coordinare le sue attività enzimatiche. Questi dati forniscono nuove basi per lo sviluppo di antimicrobici e vaccini contro infezioni nosocomiali da *E. faecium*.