

Università degli Studi di Firenze

**DOTTORATO DI RICERCA IN
MEDICINA CLINICA E SPERIMENTALE**

XXV ciclo

COORDINATORE Prof. Giacomo Laffi

**LIGANDI SINTETICI DEL TLR7 E LORO
APPLICAZIONE *IN VIVO* COME ADIUVANTI NEL
TRATTAMENTO DELLE MALATTIE ALLERGICHE E
DEI TUMORI**

Settore Scientifico Disciplinare MED/09

Dottorando

Dott. Sara Pratesi

Tutore

Prof. Enrico Maggi

Anni 2010/2012

INDICE

1. INTRODUZIONE

pag. 5

- Immunità innata
- Toll-like receptors come sensori dell'immunità innata
- Vie di segnalazione dei Toll-like receptors
- I ligandi dei Toll-like receptors 7 e 8
- Imidazochinoline
- Analoghi guanosinici
- RNA a singola elica
- L'asma e la flogosi allergica
- Il microambiente tumorale e risposta immune
- Effetti dei ligandi dei TLR7 e TLR8 sulle componenti della risposta immune antiflogosi e antitumorale
- Cellule dendritiche e linfociti B
- Linfociti T e cellule NK
- Cellule tumorali
- Adenine modificate: nuovi ligandi del TLR7

2. SCOPO DELLO STUDIO

pag. 33

3. MATERIALI E METODI

pag. 35

- Reagenti
- Protocollo di coniugazione adenine-proteine e purificazione dei coniugati
- Animali
- Modelli murini di infiammazione allergica acuta e cronica del polmone e di trattamento con SA-2
- Modello murino di produzione sistemica di IL-17 e trattamento con SA-2
- Modelli murini di infiammazione allergica del polmone e di trattamento con OVA-SA26E
- Valutazione dell'iperreattività bronchiale (AHR)
- Lavaggio Broncoalevolare (BAL)
- Analisi istologica del tessuto polmonare
- Generazione di Cellule Dendritiche da Midollo Osseo (BMDCs)
- Proliferazione di cellule T antigene (OVA)-specifiche
- Valutazione quantitativa delle citochine nei surnatanti e nel siero
- Analisi quantitativa dell'mRNA
- Anticorpi antigene (OVA)-specifici

- Determinazione di anticorpi anti-nucleo (ANA)
- Analisi statistica

4. RISULTATI

pag. 44

- L'adenina modificata SA-2 è un ligando del TLR7 murino
- L'adenina modificata SA-2 induce la produzione di citochine regolatorie e proinfiammatorie da parte di cellule dendritiche
- SA-2 previene e downregola lo sviluppo di risposte immuni di tipo Th2 in un modello murino di asma bronchiale
- Ligandi del TLR3 quali promotori di una risposta immune di tipo Th17 in un modello murino α GalCer-dipendente
- SA-2 inibisce la produzione di IL-17 indotta da α -GalCer e TLR3 ligandi in vitro e in vivo
- OVA-SA26E lega il TLR7 e attiva cellule dendritiche murine
- L'immunizzazione con OVA-SA26E previene lo sviluppo di flogosi allergica con effetto long term in modelli murini di asma bronchiale
- Uso terapeutico del coniugato proteico OVA-SA26E in un modello murino di asma bronchiale acuta
- Sicurezza d'impiego delle adenine modificate e loro coniugati proteici

5. DISCUSSIONE

pag. 65

6. BIBLIOGRAFIA

pag. 70

1. INTRODUZIONE

Immunità innata

L'immunità innata o immunità naturale rappresenta la prima linea di difesa contro le infezioni. Essa consta di una serie di meccanismi cellulari e biochimici preesistenti all'attacco del microrganismo che rappresenta un efficace e precoce sistema di difesa, in grado di controllare le infezioni e perfino di eradicarle, ancor prima dell'intervento dell'immunità adattiva.

L'immunità innata è composta da varie componenti complementari fra loro, in grado di bloccare l'ingresso dei microrganismi nei tessuti dell'ospite e favorirne la loro eliminazione.

La prima barriera chimica e fisica contro l'attacco microbico è rappresentata, in primis, dalla cute e dagli epitelii del tratto gastrointestinale e dell'apparato respiratorio. Questi sono formati da cellule produttrici di peptidi dotati di attività antibiotica, capaci quindi di eliminare i batteri. La neutralizzazione dei microbi e delle cellule infettate avviene, a livello epiteliale, anche da parte dei linfociti intraepiteliali, che appartengono alla linea dei linfociti T, ma che esprimono recettori per l'antigene scarsamente diversificati.

Il sistema immunitario naturale è inoltre formato da alcune cellule circolanti e tissutali e da diverse proteine plasmatiche. La componente cellulare circolante è costituita da cellule del sangue come i neutrofili e i monociti che vengono reclutate nei siti di infezione, dove riconoscono e fagocitano i microrganismi per poi eliminarli in sede intracellulare. Mentre i neutrofili muoiono nel giro di poche

ore, i monociti sopravvivono nelle sedi di infezione per periodi maggiori differenziandosi in macrofagi tissutali. La migrazione di queste cellule nelle sedi extravascolari d'infezione avviene grazie al legame con molecole di adesione, chiamate selectine, che sono espresse sull'endotelio in risposta a citochine ad azione chemotattica, denominate chemochine, prodotte in seguito all'incontro con il microrganismo. Altra fondamentale componente cellulare dell'immunità naturale è rappresentata dalle cellule natural killer (NK), classe di linfociti che risponde ai microrganismi intracellulari uccidendo le cellule infettate e producendo la più importante citochina attivante i macrofagi, l'interferone γ (IFN- γ). Queste cellule infatti esprimono recettori inibitori ed attivatori che permettono alle cellule NK di riconoscere le cellule normali dell'ospite (le quali presentano una maggiore espressione delle molecole MHC di classe I) da quelle infettate dai virus: il virus inibisce l'espressione delle molecole MHC di classe I, attivando le cellule NK che, liberando sostanze citotossiche, portano alla eliminazione delle cellule infettate. Le cellule NK inoltre, agiscono in modo sinergico con i macrofagi per l'eliminazione dei microrganismi intracellulari: i macrofagi ingeriscono i microrganismi e producono interleuchina 12 (IL-12) che stimola le cellule NK a secernere IFN- γ , che a sua volta induce i macrofagi ad uccidere i microrganismi ingeriti.

Per quanto riguarda la componente proteica dell'immunità innata, questa è composta dalle proteine che costituiscono il sistema del complemento e dalle citochine.

Il sistema del complemento è un insieme di proteine, circolanti e di membrana, importanti nella difesa contro i microrganismi. Molte di queste proteine sono enzimi proteolitici e l'attivazione del complemento comporta la loro attivazione sequenziale, dando origine a una cascata enzimatica.

Il sistema del complemento assolve tre funzioni in difesa dell'ospite: opsonizza i germi e ne promuove la fagocitosi; produce sostanze chemotattiche per neutrofilii e monociti; causa direttamente lisi osmotica o morte apoptotica del microrganismo, alterandone la permeabilità di membrana.

Le citochine invece sono proteine solubili coinvolte nelle reazioni immunitarie e infiammatorie, prodotte in seguito ad uno stimolo ed in grado di modificare il comportamento di altre cellule inducendo nuove attività come crescita, differenziazione e morte. La loro azione di solito è locale, ma talvolta hanno un effetto sistemico: possono infatti avere un effetto autocrino, modificando il comportamento della stessa cellula che l'ha secreta, o paracrino, andando a modificare il comportamento di cellule adiacenti. Alcune citochine possono invece agire in modo endocrino, cioè su cellule molto distanti da loro.

Tra le citochine vi è l'importante famiglia degli interferoni, che inducono le cellule a resistere a infezioni virali. L'IFN- γ viene liberato dalle cellule NK e dai linfociti T e ha come bersaglio gli stessi linfociti T, i linfociti B e i macrofagi; l'IFN- α viene liberato dai leucociti e agisce sulle cellule normali con azione antivirale. L'Interleuchina-1 viene prodotta dai macrofagi e ha come bersaglio i linfociti T, linfociti B e altri tipi di cellule come gli epatociti in cui stimola la produzione di proteine della fase acuta come la proteina C e permette l'extravasazione di molte

cellule infiammatorie. L'Interleuchina-2 viene prodotta dai linfociti T e agisce sulle medesime cellule T, sulle cellule NK e stimola la proliferazione e il differenziamento cellulare. L'Interleuchina-3 viene liberata dai linfociti Th1 e agisce sulle cellule emopoietiche indifferenziate come fattore di crescita. L'IL-4 è liberata dai linfociti Th2 e ha come bersaglio i linfociti B su cui stimola la crescita e la cosmutazione di classe verso le IgE. L'IL-5 viene liberata dai linfociti T e agisce sui linfociti B in cui stimola la produzione di IgA. L'IL-10 viene prodotta dai linfociti Th2 e agisce sulle cellule Th1 inibendole. L'Interleuchina-11 viene liberata dai macrofagi, cellule dendritiche e agisce sui linfociti B, sui precursori megacariocitici e induce crescita e attivazione. Tra le varie interleuchine, l'IL-12 ha un ruolo duplice, in quanto, oltre ad attivare le cellule NK nella risposta naturale, agisce insieme al riconoscimento dell'antigene come attivatore per i linfociti T: l'IL-12 stimola infatti il differenziamento dei linfociti Th1, cellule effettrici della risposta adattiva di tipo cellulo-mediato. Oltre a questo, l'immunità innata possiede altri meccanismi che le permettono di stimolare le risposte immunitarie acquisite, determinando l'attivazione di linfociti T e B solo da parte di microbi e non da sostanze che non sono infettive.

I limiti della risposta immunitaria naturale o innata sono quindi: efficacia non sempre ottimale, incapacità di adattarsi alle contromisure sviluppate dai microrganismi patogeni ed una scarsa capacità di discriminazione tra self e non-self, che determina lo sviluppo di danni tissutali spesso sproporzionati rispetto all'entità dello stimolo immunogeno.

Toll-like receptors come sensori dell'immunità innata

La scoperta dei recettori Toll-like (TLRs) e del loro ruolo chiave, oltre che nell'immunità innata, nell'induzione e regolazione dell'immunità adattativa, nel mantenimento dell'omeostasi e come trasduttori di messaggi di morte o sopravvivenza cellulare, ha dato avvio ad un intenso e crescente interesse scientifico che li vede bersaglio per l'immunoterapia di molte patologie, non solo infettive ma anche autoimmuni, allergiche, degenerative e neoplastiche.

I TLRs, sono così definiti per la loro stretta omologia strutturale e funzionale con un recettore transmembranario di tipo I descritto nella *Drosophila*, e denominato Toll, essenziale nella difesa contro i miceti. Questi recettori sono altamente conservati dal punto di vista evolutivo e loro omologhi sono stati riscontrati negli insetti, nelle piante e nei mammiferi.

Finora sono stati descritti 13 differenti TLRs, 10 dei quali nell'uomo. I TLRs sono espressi in maniera modulata sia sulle cellule dell'immunità innata (fagociti mononucleati, cellule dendritiche) che specifiche (linfociti B e, forse, T) rendendo tali cellule capaci di rispondere a componenti microbiche. La loro espressione non è comunque limitata esclusivamente a queste cellule ma si estende anche a granulociti, mastociti e cellule non appartenenti al sistema immune. L'attivazione cellulare conseguente al legame dei TLRs con lo specifico ligando è finalizzata a limitare la proliferazione e la diffusione dei patogeni nel periodo che precede lo sviluppo dell'immunità antigene-specifica (1,2). Anche se la maggior parte dei TLRs è espressa sulla superficie cellulare, alcuni di essi (TLR3, TLR7, TLR8 e

TLR9), sono esclusivamente intracellulari e, in particolare, sono localizzati all'interno degli endosomi.

Dal punto di vista strutturale, i TLRs sono costituiti da un dominio extracellulare N-terminale contenente una sequenza ricca di leucina (Leucin-Rich Repeats o LRRs), da un dominio trans-membrana e da un dominio citoplasmatico TIR (Toll/IL-1 Receptor), così denominato in quanto simile al recettore dell'IL-1 (3) (Fig.1).

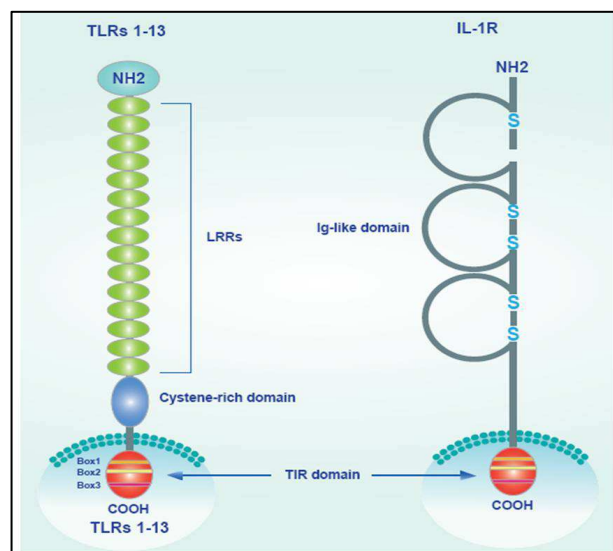


Fig. 1: Struttura dei TLRs

I TLRs riconoscono strutture esogene, i PAMPs, ossia strutture peculiari dei microrganismi, essenziali per la loro sopravvivenza e capaci di stimolare le risposte dell'immunità innata. Tra di essi vanno ricordati i motivi molecolari associati a batteri, virus, funghi e protozoi; molecole strutturali di superficie come il lipopolisaccaride dei batteri Gram negativi, i peptidoglicani e l'acido lipoteicoico dei Gram positivi, la flagellina batterica, il lipoarabinomannano della parete

micobatterica, le proteine dell'envelope virale, lo zymosan del lievito e le lipoproteine esterne dei parassiti. Fanno inoltre parte dei PAMPs anche gli acidi nucleici dei patogeni, cioè molecole a singola o doppia elica di RNA virale oppure DNA con sequenze CpG non metilate.

I TLRs sono anche sensori di danno cellulare, essendo bersaglio dei cosiddetti Danger-Associated Molecular Patterns o DAMPs, ovvero molecole di origine endogena rilasciate dalle cellule dell'ospite in seguito ad una lesione tissutale o alla necrosi (hidden-self), e che si legano ad essi proprio come i PAMPs (4).

I recettori Toll-like svolgono quindi la funzione di sensori della presenza di patogeni nell'ambiente extra- ed intracellulare, di effettori di risposte rapide antimicrobiche e di regolatori/attivatori della risposta adattativa.

Nel compito di riconoscimento, ai TLRs spetta la discriminazione tra self e non-self, oltre che tra microrganismi commensali e patogeni.

La risposta effettrice consiste nell'induzione NF- κ B-dipendente di geni per defensine, citochine pro-infiammatorie, interferoni e Tumor Necrosis Factor (TNF): ne risulta un'attivazione delle cellule limitrofe con produzione di chemochine e molecole di adesione che attraggono nel sito di infezione i leucociti. Questi ultimi fagocitano i patogeni e li eliminano attraverso la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), enzimi proteolitici e monossido di azoto (NO).

Recentemente si è accresciuta la conoscenza sull'interconnessione esistente tra l'immunità innata e l'immunità adattativa alla quale contribuisce sicuramente la regolazione mediata dai TLRs. Più precisamente, l'attivazione dei recettori Toll-

like determina la maturazione delle cellule dendritiche con aumento dell'espressione di molecole MHC, di molecole co-stimolatorie (CD40, CD80 e CD86) essenziali per il priming dei linfociti T e per la produzione di citochine (IFN- α , IFN- β , IL-1 α , IL-1 β , IL-12 ed altre) che inducono la differenziazione delle cellule T CD4+ e CD8+ specifiche contro il patogeno. Le cellule dendritiche mature migrano nei linfonodi drenanti dove ha luogo la presentazione degli antigeni alle cellule T naïve: gli antigeni sono esposti sulla membrana plasmatica insieme alle molecole MHC e sono riconosciuti dai linfociti solo dopo legame delle molecole di costimolo CD80/CD86 ai ligandi CD28 espressi dalle cellule T. Questo contatto diretto con l'APC è il pre-requisito per l'attivazione e differenziazione dei linfociti T naïve.

Da studi sui diversi tipi di TLR si evince che differenti vie di trasduzione intracellulare correlano con differenti profili di espressione di citochine, che possono spiegare i vari destini differenziativi delle cellule T CD4+ in Th1, Th2, Th17 o Treg.

In generale, attraverso vie dipendenti o indipendenti dalla proteina adattatrice MyD88, il signalling dei TLRs favorisce l'orientamento in senso Th1, improntato alla difesa antivirale e antibatterica e associato alla produzione di IFN- α ed all'induzione della produzione di anticorpi IgG2a. Le risposte Th2 sembrano invece preferenzialmente indotte da ligandi di TLR 2, associate a produzione di IL-4, IL-5 ed IL-13 ed all'induzione della produzione di anticorpi IgE e IgG1 e fisiologicamente deputate alla protezione nei confronti degli elminti, ma coinvolte anche nella patogenesi di reazioni allergiche. Insieme all'immunità adattativa

cellulo-mediata, pure l'immunità umorale risente delle azioni TLR-dipendenti e ciò avviene o direttamente o attraverso la mediazione dei linfociti helper: le cellule B si attivano, maturano e proliferano, generando classi isotipiche diverse di immunoglobuline e IgM a bassa affinità ed esprimendo MHC di tipo II (5,6).

Vie di segnalazione dei Toll-like receptors

I meccanismi molecolari coinvolti a seguito dell'attivazione dei TLRs sono ormai ben noti (7,8). La cascata segnalatoria origina dal dominio TIR posto all'interno della cellula ma, a valle di TIR, i segnali intracellulari generati dai vari TLRs sono diversificati (Fig.2). La molecola adattatrice più importante, in quanto attivata dal maggior numero di TLRs, è rappresentata da MyD88 (Myeloid Differentiation Marker 88) così denominata in quanto inizialmente identificata nelle cellule mieloidi. In seguito alla stimolazione del recettore, MyD88 recluta IRAK-4 (IL-1 Receptor-Associated Kinase-4), che, di seguito, fosforila IRAK-1 che si attiva legandosi a TRAF6 (TNF-Receptor Associated Factor 6), determinando infine l'attivazione dei fattori di trascrizione JNK e NF- κ B attraverso due vie di segnalazione:

- attivazione del fattore di trascrizione AP-1 ed attivazione di una MAP-chinasi;
- attivazione del complesso TAK1/TAB che aumenta l'attività del complesso IKK costituito da IKK α , IKK β e NEMO/Ikky. Il complesso fosforila I κ B e la conseguente degradazione di I κ B permette la translocazione nucleare di NF- κ B che induce l'espressione di alcune citochine pro-infiammatorie (IL-12p40 e TNF- α).

Esiste tuttavia anche una via di segnalazione MyD88-indipendente descritta a seguito del triggering di TLR3 e TLR4 che porta all'attivazione di IRF-3 e all'espressione di IFN- β . L'attivazione di TLR4 è molto particolare in quanto il lipopolisaccaride (LPS) dei batteri Gram-negativi attiva sia una via MyD88-dipendente che MyD-88-indipendente, che portano all' attivazione di NF- κ B e MAP-chinasi, rispettivamente.

Più recentemente sono state descritte altre molecole adattatrici che contengono il dominio TIR la cui utilizzazione provvede alla specificità delle vie di signalling dei vari TLRs:

- TIRAP (TIR domain-containing adaptor protein)/Mal (MyD88 adaptor-like), che è coinvolto in una via MyD88-dipendente conseguente all'attivazione di TLR2 e TLR4;
- TRIF (TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β) adattatore TLR3-associato coinvolto in una via MyD88-indipendente attraverso IKKs, IKK α /IKK ϵ e TBK1, che mediano l'attivazione di IRF-3 responsabile della produzione di IFN- β ;
- TRAM (TRIF-related-adaptor-molecule) adattatore che attiva una via MyD88-indipendente e TRIF-dipendente di TLR4.

Dal momento che la stimolazione dei TLRs determina la produzione di numerose citochine che, se prodotte in eccesso, potrebbero determinare seri disordini sistemici e provocare la morte dell'ospite, gli organismi hanno anche sviluppato meccanismi atti a modulare la risposta mediata da questi recettori e come è stato osservato in molti modelli sperimentali:

- dopo numerose esposizioni a LPS si sviluppa una sorta di tolleranza per riduzione dell'espressione del complesso recettoriale TLR4 e MD-2;
- i ligandi di TLR2, TLR7 e TLR4 inducono una ridotta espressione di IRAK1;
- IRAK-M, membro della famiglia delle IRAK Serina/Treonina chinasi e Tollip inibiscono la formazione del complesso IRAK1/TRAF-6;
- la variante di MyD88 priva del dominio centrale per splicing alternativo inibisce la fosforilazione di IRAK-1 mediata da IRAK-4 riducendo l'attivazione di NF- κ B;
- SOCS1, membro della famiglia delle proteine SOCS, modula negativamente la via di segnalazione dei TLRs;
- SIGIRR (Single immunoglobulin IL-1 receptor-related molecule) e T1/ST2 si sono dimostrate molecole inibitorie;
- degradazione dei TLRs mediata dall'ubiquitina (9).

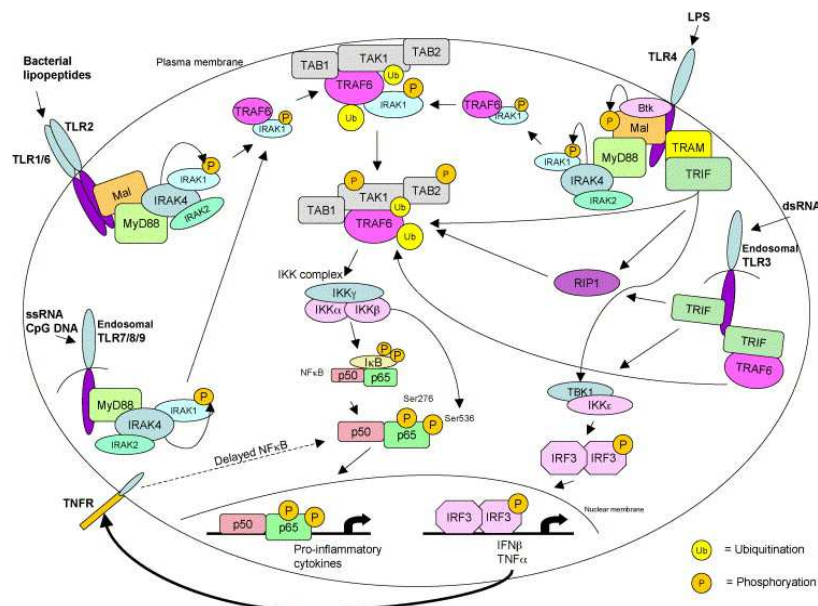


Fig. 2: Le vie segnalatorie dei Toll-Like Receptors

I ligandi dei Toll-like receptors 7 e 8

Fino ad oggi numerosi ligandi sono stati individuati per il TLR7 ed 8, classificati come sintetici e naturali e caratterizzati tutti da una struttura di tipo nucleosidico. Alcuni dei ligandi sintetici sono stati prima prodotti ed utilizzati come immunomodulanti prima ancora di conoscere la loro capacità di trigger nei confronti del TLR.

Il riconoscimento delle strutture nucleosidiche da parte del TLR7 ed 8 attiva un pathway intracellulare che conduce alla produzione di citochine proinfiammatorie (tra cui gli IFN di tipo I), chemochine ed up-regolazione di molecole costimolatorie. Sia il TLR7 che 8 sono generalmente raggruppati insieme al TLR3 ed al TLR9 in quanto a prevalente espressione intracellulare a livello dei compartimenti endosomiali. Il signaling intracellulare di questi recettori prevede il rapido reclutamento della molecola adattatore MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88). Questo risulta nell'attivazione di protein-chinasi mitogeno-attivati (MAPK) e I-B chinasi (IKK). Le MAPK chinasi fosforilano ed attivano un fattore di trascrizione chiamato AP-1 mentre le IKK sono coinvolte nella traslocazione nucleare del fattore NF-kB. Sia AP-1 che NF-kB controllano l'espressione di geni codificanti per le citochine proinfiammatorie . Inoltre i ligandi del TLR7 e 8 attivano anche membri della famiglia IRF (interferon regulatory factor) in modo MyD88-dipendente, conducendo alla induzione di IFN di tipo I (10).

Le imidazochinoline

Negli anni '80 una nuova famiglia di analoghi nucleosidici sono stati sintetizzati quali potenziali agenti antivirali. Si tratta di analoghi adenosinici con un terzo anello, ma diversamente dalle purine mancano di un gruppo nitrogeno. I primi esperimenti con queste molecole sono stati focalizzati su modelli animali di infezione sostenuta da HSV (herpes simplex virus) (11). Le imidazochinoline dimostrarono ben presto una spiccata capacità di indurre citochine proinfiammatorie e regolatorie *in vivo*, tali da condurre ad una potente attività antivirale ed antitumorale. Imiquimod (R837, S26308) è stato la prima imidazochinolina approvata nel 1997 dalla FDA per il trattamento delle lesioni genitali sostenute da infezione da papilloma virus. È inoltre utilizzato per il trattamento di tumori maligni della cute. Imiquimod è un ligando preferenziale del TLR7 (12). Resiquimod (R848, S28463) si è dimostrato più solubile e più potente nell'induzione dell'espressione citochinica rispetto all'imiquimod (13,14). Esso svolge la sua attività immunomodulante attraverso l'attivazione del TLR7 nel topo e TLR7 e 8 nell'uomo (15,16).

Analoghi guanosinici

Gli analoghi delle guanosine sono ribonucleosidi con una (C8) o due (C8 ed N7) sostituzioni dotati di importante attività immunomodulante, compresa una attività antitumorale. Gli analoghi con duplice sostituzione dimostrano maggiori effetti immunostimolatori rispetto ai composti monosostituiti (17).

Nell'ambito di questa famiglia di ligandi la loxoribina è sicuramente il più noto. Esso è ritenuto un ligando esclusivo del TLR7, in quanto dotato di una affinità basale nei confronti del TLR8 molto debole e tale da non poter essere detettata con i comuni assays biologici (18,19).

RNA a singola elica

I ligandi naturali del TLR7 e TLR8 sono le molecole a singola elica di RNA virale (ssRNA) ricche in guanosina (G) ed uridina (U) (20). Sebbene il contenuto in G ed U sembri essere importante per l'attivazione sia del TLR7 che del TLR8, il motivo RNA specifico riconosciuto dai due TLR non è ancora ben noto. Altri ligandi immunostimolatori del TLR7 e 8 sono rappresentati dalle molecole di RNA self (21). Tuttavia la metilazione in posizione 2- è in grado di inibire la attivazione recettoriale e la conseguente risposta immune, conducendo allo sviluppo di TLR7 e 8 antagonisti. Questi antagonisti potrebbero essere potenziali terapie nei confronti di malattie autoimmuni quali il LES (22,23).

L'asma e la flogosi allergica

L'asma è una malattia cronica molto complessa, caratterizzata da infiammazione e iperreattività delle vie aeree (AHR). La patogenesi dell'asma presenta caratteristiche di elevata eterogeneità, essendo associata a molti fattori di tipo ambientale, a diversi tipi cellulari e a differenti vie molecolari. In passato, è stata rivolta molta attenzione al broncospasmo, come elemento fisiopatologico fondamentale dell'asma, orientando quasi esclusivamente il trattamento

farmacologico a controllare lo spasmo della muscolatura liscia. Ad oggi, è ormai stato accertato che, nonostante i fattori scatenanti l'asma bronchiale possano essere di vario tipo, tutti i pazienti asmatici presentano un'alterazione istologica e immunopatologia, conseguenza di un processo flogistico delle vie aeree. Questo, infatti, si ritrova sia in pazienti in cui l'asma bronchiale è scatenato da fattori allergici, come ad esempio il polline (asma allergico), sia in quelli in cui un ruolo di tali fattori non è documentabile (asma intrinseco).

La disponibilità di modelli murini, ha permesso di studiare i meccanismi che innescano la flogosi allergica tissutale. Il ruolo fondamentale alla base di questi meccanismi flogistici, si considera, ormai tradizionalmente, essere svolto dai linfociti T di tipo Th2. Queste cellule sono capaci di riconoscere specificamente gli allergeni, garantire la produzione continuativa di IgE e influenzare le cellule dell'infiltrato flogistico mediante la produzione di citochine ad azione chemotattica (24,25).

Attraverso la liberazione di differenti combinazioni di citochine (IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, GM-CSF) i linfociti Th2 possono, quindi, rappresentare meglio di qualsiasi altra cellula, un fattore comune capace di collegare l'iperproduzione di IgE ed il coinvolgimento nella flogosi allergica di cellule quali gli eosinofili, i mastociti, i basofili ed i macrofagi. I linfociti Th2 sono, quindi, considerati delle vere e proprie cellule "orchestranti" gli eventi cellulari e molecolari della flogosi bronchiale. La produzione di IL-4 e IL-13 stimola, ad esempio, la produzione di IgE da parte dei linfociti B. La produzione di IL-5 e chemochine favorisce, invece, l'infiammazione bronchiale eosinofila.

Il reclutamento delle diverse componenti infiammatorie ed in particolare degli eosinofili è, infatti, promosso dal rilascio di chemochine a vari livelli, da parte dei linfociti T, dei mastociti e anche delle cellule residenti (cellule della parete bronchiale, quali cellule epiteliali, fibroblasti e "goblet cells"). Uno dei primi eventi che caratterizza la flogosi allergica bronchiale è legato all'attivazione delle cellule endoteliali che, a seguito della stimolazione da parte di citochine come IL-1, IL-4, IL-13 e TNF- α , presentano un'aumentata espressione di proteine di adesione. Queste riconoscono e interagiscono con proteine sulla membrana degli eosinofili, le integrine, permettendone l'adesione all'endotelio. La migrazione degli eosinofili verso la mucosa è favorita dalla produzione di IL-5 e PAF. Oltre a questi, hanno una notevole importanza fattori come le chemochine del gruppo β : MCP-1 (CCL2), MCP-3 (CCL7), RANTES (CCL5) ed eotassina (CCL11). Queste controllano la migrazione degli eosinofili verso l'epitelio grazie all'interazione con un unico recettore comune (CCR3), espresso anche dai basofili e dai linfociti Th2.

Recenti studi, hanno messo in dubbio la teoria che la flogosi allergica bronchiale fosse sostenuta soltanto da una risposta di tipo Th2. La presenza di neutrofili e citochine non rilasciate da questo tipo cellulare, come l'INF- γ e, soprattutto, l'IL-17, in polmoni di pazienti affetti da asma allergico grave, ha evidenziato il coinvolgimento di altre popolazioni linfocitarie (25). Dopo la scoperta delle cellule Th17 e dopo aver visto che questo tipo cellulare è coinvolto nella patogenesi di alcune malattie di tipo immune, è stato ipotizzato che anche i linfociti Th17 potessero avere un ruolo nelle risposte allergiche. Questa ipotesi deve, però,

essere tutt'ora verificata. Sembra, infatti, che questo tipo di linfociti non sia coinvolto nelle malattie allergiche IgE mediate: primo, perché queste cellule sono in grado di stimolare la produzione di IgG, IgM e IgA, ma non di anticorpi IgE.; secondo, perché l'IL-4, citochina che stimola la risposta allergica, rappresenta un fattore inibente la differenziazione Th17 (26,27).

E' invece ormai stato dimostrato il ruolo chiave delle cellule Th17 nella patogenesi dell'asma ed in modo particolare nel reclutamento dei neutrofili. Bullens et al. hanno infatti dimostrato nell'espettorato di pazienti con forme severe di malattia, elevate quantità di IL-17A e IL-8 (CXCL8), la cui produzione è appunto, indotta da IL-17. L'IL-8 è poi responsabile del reclutamento dei neutrofili. Infatti, la concentrazione di IL-8 nel BAL correla con il numero di neutrofili presenti nel liquido stesso (28,29). L'infiltrazione di neutrofili contribuisce, infine, all'ipersecrezione delle ghiandole bronchiali, all'iperreattività e al rimodellamento delle vie aeree. Numerosi lavori sull'uomo confermano inoltre che esiste una relazione tra concentrazione di IL-17 nei tessuti e gravità dell'asma. Anche studi condotti su modelli murini hanno confermato il ruolo chiave dei linfociti Th17 nella patologia asmatica: topi deficienti del recettore per la IL-17 (IL-17R^{-/-}) sono infatti incapaci di reclutare neutrofili ed eosinofili nelle vie respiratorie (30), bloccando l'instaurarsi della risposta Th2, e topi IL-17A^{-/-} esibiscono una riduzione della risposta Th2 nella fase di sensibilizzazione all'antigene (31). Diversamente, la deplezione di IL-17A durante la fase effettrice della flogosi bronchiale, porta ad un aumento dell'infiammazione eosinofila, attribuendo a questa citochina una funzione regolatoria negativa della patologia

asma (30). L'IL-17A svolge, quindi, un duplice ruolo nella regolazione della flogosi eosinofila bronchiale: durante la fase di sensibilizzazione all'antigene, l'IL-17A promuove l'infiammazione eosinofila attraverso l'induzione di una risposta Th2 antigene-specifica, mentre, la produzione di IL-17A durante la fase effettrice, inibisce la flogosi bronchiale attraverso la soppressione di risposte allergiche di tipo locale. Anche l'IL-17F, altra citochina prodotta dalle cellule Th17, sembra essere coinvolta nella patogenesi dell'asma (32). Il gene corrispondente appare, infatti, iperespresso nelle vie aeree dei pazienti asmatici, da cellule CD4+ attivate, mastociti e basofili, dove induce la produzione del GM-CSF, di molte citochine (IL-6, IL-8), di chemochine di tipo CXC (eotaxina e RANTES), potenti chemioattrattori degli eosinofili e neutrofili, e l'espressione di molecole di adesione da parte delle cellule epiteliali bronchiali (33,34). È importante ricordare che esiste una variante di IL-17F, dovuta ad una sostituzione aminoacidica (H161R), che non presenta attività proinfiammatoria, bloccando l'espressione di IL-8 (35) (Fig.3).

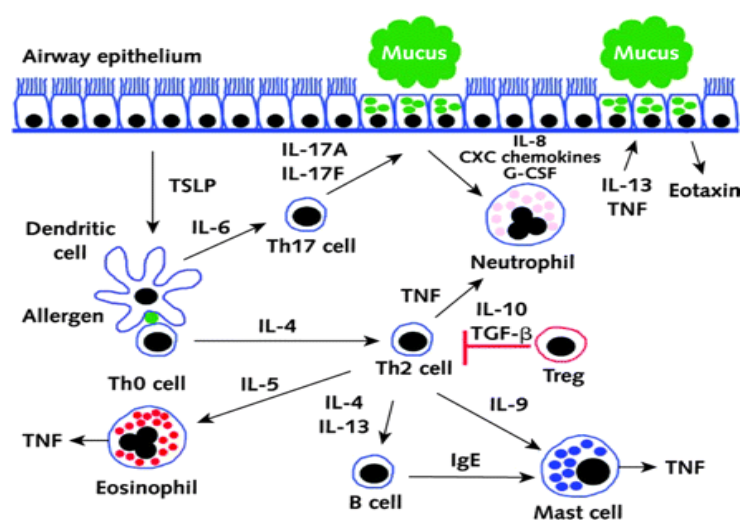


Fig. 3: Ruolo dei TH2 e TH17 nella patogenesi dell'asma allergico grave

Ciò suggerisce quindi un possibile ruolo terapeutico di questa variante (antagonista di IL-17F) nella patologia asmatica.

La IL-23 invece è una citochina importante nell'amplificazione della risposta Th17 e sembra avere un ruolo determinante anche nella patogenesi dell'asma. Infatti, IL-23 è espressa nel polmone in corso di flogosi allergica. Inoltre la sua neutralizzazione riduce il reclutamento polmonare di eosinofili e di cellule Th2 (36). L'IL-23, quindi, non solo induce una flogosi bronchiale neutrofila mediata da cellule Th17 (37), ma è anche in grado di upregolare la risposta cellulare Th2-mediata. Il meccanismo mediante il quale si realizza questo fenomeno, è ovviamente indiretto (attraverso una modulazione delle cellule dendritiche), in quanto le cellule T non esprimono il recettore per IL-23 (IL-23R). I dati ottenuti in modelli murini di adoptive transfer, hanno poi dimostrato la capacità anche delle cellule Th17 di incrementare la flogosi allergica Th2-mediata con conseguente incremento dell'infiltrato polmonare eosinofilo (36). Ciò suggerisce un significativo link funzionale tra risposta Th17 e Th2 in corso di flogosi allergica.

Del resto, uno studio condotto su cellule umane ha dimostrato che i precursori (cellule T CCR6+CD161+CD4+) da cui originano le cellule Th17, possono differenziarsi *in vitro* in cloni cellulari capaci di produrre, in seguito a stimolazione con PMA e ionomicina, un diverso profilo di citochine: solo IL-17A (cellule Th17), IL-17A e IFN- γ (cellule Th17/Th1) o IL-17A e IL-4 (cellule Th17/Th2). Quest'ultima popolazione può essere ottenuta non solo *in vitro*, ma anche *ex vivo*, ovvero dal sangue periferico di soggetti atopici. In particolare, le cellule Th17/Th2 rappresentano una minima percentuale di linfociti T CD4+ circolanti in

pazienti affetti da asma e, soprattutto, da asma grave (38). Lo stesso studio ha inoltre dimostrato come, le cellule Th17/Th2, specifiche per l'antigene sensibilizzante, originino *in vivo* da cellule della memoria di tipo Th17, in seguito ad uno shift indotto dalla presenza di IL-4. Le cellule Th17 sono infatti caratterizzate da una notevole plasticità che spiegherebbe la possibilità di produrre citochine di tipo Th2, in determinate condizioni. Diversamente, la probabilità che siano invece i Th2 a produrre IL-17A è molto bassa, proprio per la scarsa plasticità di questo tipo cellulare rispetto ai linfociti Th17. La dimostrazione quindi dell'esistenza *in vitro* e *ex vivo* di cellule T CD4+ capaci di produrre citochine sia Th17- che Th2-correlate, oltre all'aumento di questo tipo cellulare in pazienti asmatici, suggerisce un ruolo delle cellule Th17/Th2 nella flogosi bronchiale (38).

Il microambiente tumorale e risposta immune

Il sistema immunitario è chiaramente capace di riconoscere ed eliminare cellule tumorali, sebbene esse siano considerate scarsamente immunogeniche (39). Infatti: 1) regressioni spontanee di tumori sono state descritte, mentre i soggetti immunodeficienti sono a maggior rischio rispetto alla popolazione generale per lo sviluppo di malattia neoplastica (40); 2) modelli animali sperimentali dimostrano una immunità antitumore (41); 3) il sistema immunitario spesso riconosce la presenza del tumore, come dimostrato da un reclutamento di cellule del sistema immunitario nella sede del tumore (42). Nonostante ciò comunque, la presenza del tumore anche in soggetti immunocompetenti indica come le cellule tumorali

siano in grado di “sfuggire” al sistema immunitario (43). I meccanismi utilizzati per eludere il riconoscimento consistono nella inibizione dei fenomeni di presentazione antigenica, nell’attivazione di segnali negativi di costimolo e nella produzione di fattori immunosoppressivi da parte delle cellule tumorali (44). Inoltre, le cellule tumorali possono promuovere l’espansione e/o il reclutamento di cellule regolatorie che contribuiscono al network immunosoppressivo (45). Come precedentemente detto il Toll-like receptors (TLRs) sono una famiglia di recettori trans membrana di tipo I che riconoscono pattern molecolari conservati di origine microbica e definiti PAMPS. Sono formati da tre domini, uno extracellulare implicato nel riconoscimento del ligando, uno transmembranario ed uno intracellulare omologo al recettore per la IL-1 (IL-1R) e noto come dominio TIR (Toll/IL-1R), necessario alla trasduzione del segnale intracellulare. E’ ormai noto che oltre ai ligandi di origine microbica (ligandi esogeni) esistono anche ligandi appartenenti all’ospite stesso (ligandi endogeni) e ligandi di origine sintetica. Tra i ligandi microbici maggiormente conosciuti ricordiamo l’LPS dei batteri Gram-negativi che stimola il TLR4, le lipoproteine batteriche, l’acido lipoteicoico e gli zimosani dei funghi che stimolano TLR1, TLR2 e TLR6, la flagellina batterica che stimola TLR5, una molecola profilina-like di origine protozoaria (*T.gondii*) che attiva il TLR11, le sequenze di DNA ricche in motivi CpG non metilati che funzionano da trigger del TLR9, l’RNA a doppia elica (dsRNA) che è un ligando del TLR3 e l’RNA a singola elica (ssRNA) che stimola TLR7 e TLR8.

Questa famiglia di proteine è comunque in continua espansione, al momento sono stati identificati almeno 13 TLRs nel topo ed 11 nell'uomo. La maggior parte di questi recettori sono localizzati a livello della membrana cellulare mentre alcuni sono a localizzazione intracellulare (endosomi, lisosomi e reticolo endoplasmatico). Al momento inoltre per i TLR10, 12 e 13 non sono noti i corrispondenti ligandi (46).

In considerazione del ruolo dei TLRs nella stimolazione dell'immunità innata ed acquisita, i TLR ligandi sono divenuti interessanti targets per la messa a punto di adiuvanti nell'immunoterapia dei tumori. Gli agonisti dei TLR possono infatti contribuire alle risposte antitumorali influenzando le cellule del sistema immunitario, le cellule tumorali ed il microambiente del tumore (47). In particolare gli agonisti dei TLR7 sono in grado di stimolare contemporaneamente diverse cellule immuni conducendo ad un mix di cellule immuni attivate, citochine e chemochine nelle sedi tumorali (48).

Già nel XVIII° secolo Deidier osservò una correlazione positiva tra infezione e remissione della malattia neoplastica, formulando la prima ipotesi che i microbi potessero avere una proprietà anticancro (49). Alla fine del XIX° secolo, William Coley osservò che ripetute iniezioni di tossine batteriche provenienti da *S. Pneumoniae* e *Serratia Marcescens* erano in grado di funzionare come efficienti agenti terapeutici anti-tumorali, dimostrando che i prodotti microbici *di per se'*, piuttosto che l'infezione stessa, potessero mediare l'effetto antitumorale (49). Successivamente Shear e Turner dimostrarono che l'effetto antitumorale descritto da Coley con il mix batterico risiedeva nell'LPS, ligando del TLR4,

dimostrando che l'effetto suddetto era il risultato di una attivazione dei TLR (50). Altre molecole di origine microbica con attività antitumorale sono in grado di legare ed attivare TLRs. Sia nell'uomo che in modelli animali la somministrazione (locale o sistemica) di ligandi purificati dei TLRs sono stati e sono tutt'ora utilizzati con potenti effetti anti-tumorali (51). Per esempio OK-432, una preparazione liofilizzata ottenuta da streptococco di gruppo A che è utilizzato per il trattamento del carcinoma cervicale, gastrico e squamocellulare, è stato recentemente dimostrato essere in grado di stimolare il TLR4 (52). Infine il bacillo di Calmette-Guerin (BCG), ottenuto dal M.Bovis, un potente attivatore del TLR2 e TLR4 è ormai utilizzato da circa 30 anni quale trattamento del cancro vescicale mediante instillazioni locali. La somministrazione dell'LPS è stato utilizzato in trials clinici di fase II per il trattamento del tumore polmonare e colon-rettale e si è dimostrato capace di portare alla regressione del tumore quanto direttamente iniettato a livello della lesione in modelli murini (53). Medesimi risultati sono stati ottenuti utilizzando la flagellina (TLR5 ligando) (54). L'applicazione locale di ligandi del TLR7 e TLR8 quale l'imiquimod, è sotto analisi per il trattamento di tumori cutanei e per il trattamento della leucemia linfatica cronica, come i CpG (ligandi del TLR9) lo sono per il trattamento del tumore cerebrale, cutaneo, renale per il trattamento del linfoma (55-57).

I meccanismi attraverso i quali gli agonisti dei TLRs possono mediare i loro effetti anti-tumorali sono molteplici. Alte dosi di Poly I:C che stimola il TLR3, possono condurre all'apoptosi per "killing" diretto delle cellule neoplastiche e delle cellule endoteliali presenti nel microambiente tumorale (58-60). L'attivazione dei TLRs

può inoltre causare regressione tumorale incrementando la permeabilità vascolare ed incrementando direttamente ed indirettamente il reclutamento leucocitario necessario per la lisi tumorale da parte delle cellule NK e cellule T citotossiche (49). Una delle principali funzioni dei TLRs nella terapia dei tumori è sicuramente la capacità di stimolare la risposta immune adattiva, funzionando da adiuvanti del sistema immunitario. Questa proprietà è stata utilizzata per la messa a punto di vaccini anti-tumorali in grado di sostenere la risposta T anti-tumore (antigene-specifica) da sfruttare per la terapia mediante transfer adottivo (51). L'attivazione dei TLRs ha un ruolo fisiologico (e non solo iatrogeno) nell'inibizione della tumorigenesi? Nella maggior parte degli studi, è stata utilizzata una somministrazione di TLRs agonisti esogeni per indurre una risposta cellulare T anti-cancro. Tuttavia due recenti studi hanno suggerito un ruolo "più fisiologico" dei TLRs nell'induzione di una risposta immune anti-tumorale. Infatti topi knock-out per TLR4 o per MyD88, dopo transfer adottivo di cellule tumorali, hanno dimostrato una minore suscettibilità a numerosi agenti chemioterapici, in quanto la morte cellulare indotta dal chemioterapico induce la liberazione della molecola HMGB1 in grado di attivare il TLR4 ed in questo modo di indurre immunità T tumore-specifica (61). Un secondo studio, ha inoltre dimostrato che topi C3H/HeJ portatori di una ipofunzione del TLR4 sviluppano più facilmente tumori cutanei DMBA-indotti rispetto ai topi WT (62). È importante ricordare poi che un possibile ruolo fisiologico nell'ambito dell'immunologia dei tumori dei TLRs è quello mediante il quale possono prevenire molte infezioni potenzialmente in grado di

evolvere verso malattia neoplastica, quale l'infezione virale da HCV, da EBV, papilloma virus ed H.Pylori (63-65).

Effetti dei ligandi dei TLR7 e TLR8 sulla risposta immune in corso di malattia allergica e tumorale

Cellule dendritiche e linfociti B

Le cellule dendritiche esprimono sia il TLR7 che il TLR8 (almeno nell'uomo). L'espressione del TLR8 è stato individuato in DCs di derivazione monocitaria (mDC), in macrofagi ed in cellule di Langherans. Viceversa il TLR7 è poco espresso su queste cellule, ma è fortemente presente nelle cellule dendritiche plasmacitoidi (pDC) e nei linfociti B (66). E' da ricordare che le pDC sebbene rappresentino solo lo 0.1% delle cellule circolanti, sono le maggiori produttrici di IFN I in risposta alle infezioni virali (67). Gli studi di Ito e di Gibson e collaboratori hanno dimostrato che gli agonisti del TLR7 e 8 prevalentemente inducono la produzione di IFN α nelle pDCs in modo TLR7-mediato e IL-12 da parte delle mDCs in modo TLR8-dipendente (67,68). E' inoltre da ricordare che TLR agonisti diversi possono avere diversa efficienza e diversificarsi per la citochina prevalentemente indotta.

Sia le mDC che le pDCs attivate dai TLR agonisti sono in grado non solo di produrre citochine proinfiammatorie o regolatorie, ma anche di upregolare l'espressione di molecole di costimolo, facilitando la polarizzazione in senso Th1 delle cellule T naïve (68). Ne deriva che l'attivazione dei TLR7 e 8 sulle cellule

mDC e pDC risulta in un aumento delle potenzialità citotossiche delle cellule effettrici anti-virali.

Per quanto concerne le cellule B, il triggering dei TLR7 e 8 rappresenta un meccanismo di attivazione, proliferazione e produzione anticorpale che mima il segnale CD40-mediato (69). Le cellule B così attivate sono inoltre in grado di funzionare da cellule professionali presentanti l'antigene.

Linfociti T e cellule NK

Anche le cellule T esprimono il TLR7 ed il TLR8 sebbene con minore intensità rispetto alle cellule monocitarie (70). La cellula T è in grado per esempio di rispondere alla presenza di resiquimod incrementando la produzione di IFN- γ , IL-2 ed il IL-10, (sia in modo TCR dipendente che indipendente) ma non di citochine Th2 correlate. In generale, la somministrazione di TLR7 ed 8 agonisti determina una attivazione di cellule T CD4+ e CD8+ produttori IFN γ . Inoltre migliora sicuramente il priming da parte delle cellule DCs di cellule T citotossiche CTL, mediante una maggiore attivazione e maturazione delle DC, ma anche una maggiore espressione di perforine e granuli citotossici da parte delle cellule T medesime (71). Quindi come descritto da Rosenberg (72), gli agonisti dei TLR7 e 8 possono giocare tre ruoli fondamentali nella risposta T antigene (tumore)-specifici:

1. facilitare la generazione di un numero sufficiente di cellule T in grado di riconoscere le cellule tumorali;
2. reclutare cellule T a livello dello stroma tumorale;
3. attivare cellule T con meccanismi effettrici. E' importante ricordare

che la qualità della risposta cellulare T è sicuramente dipendente dal tipo di agonista utilizzato, come dimostrato dagli studi sui primati non umani (73).

Per quanto concerne le cellule NK, sebbene sia ancora motivo di dibattito la presenza del TLR7 e 8 su queste cellule, la loro attività è sicuramente modulabile da parte di questi agonisti, verosimilmente per gli effetti indiretti sulla produzione citochinica da parte delle cellule dendritiche (74,75).

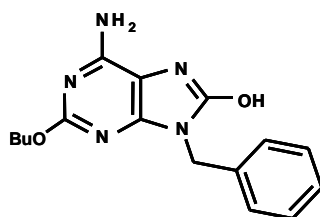
Cellule tumorali

In studi sia *in vitro* (su linee cellulari di tumore cutaneo e vescicale) che (su pazienti affetti da basalioma e melanoma), imiquimod ha dimostrato effetti pro-apoptotici diretti. Oltre alla diretta induzione di apoptosi, le imidazochinoline hanno dimostrato capacità di reclutare cellule T citotossiche nella sede tumorale, cellule NK e cellule DCs (76-78).

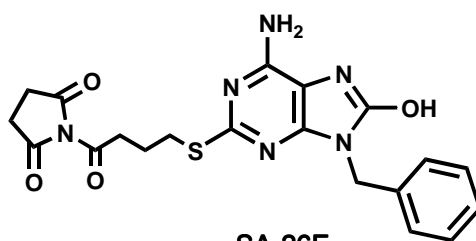
Un altro effetto diretto del trattamento con TLR7 e 8 agonisti, è quello di rendere cellule leucemiche (di LLC) maggiormente suscettibili all'attività di chemioterapici, quali doxorubicina e vincristina, e all'attività citotossica delle cellule del sistema immunitario (56). E' importante ricordare però che tra le citochine pro-infiammatorie indotte vi è la IL-6, la quale rappresenta un fattore di crescita per certe forme mieloproliferative (mieloma multiplo), conducendo ad una espansione di cellule tumorali. Pertanto per certi tipi di tumori, il microambiente citochinico prodotto, può essere favorente la crescita neoplastica.

Adenine modificate: nuovi ligandi del TLR7

SA-2 è un eterociclo sintetico chimicamente derivato dalla struttura dell'adenina ma con gruppo ossidrilico in posizione 8- e con gruppi sostituenti in posizione 2- e 9- , mentre OVA-SA26E è un composto formato dalla coniugazione dell' estere attivo SA-26E (Acido 4-(6-amino-9-benzil-8-idrossi-9H-purin-2-ilsulfanil) butirrico 2,5-diossopirrolidin-1-il ester) e l'antigene ovalbumina (Fig.4). Precedenti studi presso il nostro laboratorio hanno identificato queste molecole quali ligandi del TLR7 su cellule umane e murine, in grado quindi di attivare fattori trascrizionali quali NF-kB (79).



SA-2
[9-benzyl-2-butoxy-
8-hydroxyadenine]



SA-26E
[4-(6-amino-9-benzil-8-idrossi-9H-purin-
2-ilsulfanil)butirrico 2,5-diossopirrolidin-1-il estere]

Fig. 4 : Adenine modificate

2. SCOPO DELLO STUDIO

Le malattie allergiche sono associate all'espansione di cellule Th2 specifiche per epitopi antigenici che sviluppano e mantengono una flogosi nelle sedi del danno, sostenuta prevalentemente da eosinofili e mastociti. Nell'evoluzione verso la cronicizzazione però sembra giocare un ruolo importante anche la risposta Th17 che complica l'infiammazione reclutando soprattutto granulociti neutrofili.

Anche nei tumori il microambiente di tipo Th2 sembra essere responsabile della capacità immunosoppressiva delle cellule cancerose. Del resto in una infiammazione sostenuta da cellule di tipo Th2 e una locale immunosoppressione possono far evolvere una patologia infiammatoria cronica in tumore (80). Parallelamente in molte tipologie di tumori umani, come il cancro ovarico, pancreatico, renale e gastrico, è stato descritto un incremento delle cellule Th17 nell'infiltrato peritumorale nonché una correlazione fra la presenza di queste cellule nelle lesioni tissutali o nel sangue periferico e grado di avanzamento della patologia neoplastica (81).

Le sempre maggiori acquisizioni sul ruolo del sistema immunitario nel controllo delle allergie e del cancro suggeriscono come esso possa essere modulato con varie strategie per potenziarne le sue capacità di difesa.

Recentemente la famiglia dei recettori Toll-like (TLRs) è stata identificata come principali sensori delle componenti microbiche in grado di condurre conseguentemente ad una risposta immune innata ed adattiva. In questa visione, i ligandi dei TLRs, rappresentano una promettente classe di sostanze

potenzialmente in grado di indurre una risposta immune anti-flogistica e anti-tumorale, e pertanto di poter essere utilizzati nell'immunoterapia o come adiuvanti nei vaccini. In particolare gli agonisti del TLR7 sono in grado di stimolare contemporaneamente diverse cellule del sistema immunitario, conducendo ad un mix di cellule attivate, citochine e chemochine nelle sedi infiammatorie e tumorali.

Lo scopo del progetto dunque è stato quello di valutare gli effetti *in vivo* di adenine modificate sulle risposte immuni di tipo Th2 e Th17 utilizzando modelli murini. In particolare è stata valutata tale capacità sia da parte dei singoli ligandi (SA-2) sia di loro coniugati proteici con ovalbumina (OVA-SA26E). La SA-2 solubile è stata dunque testata per la capacità di stimolare i TLRs, di indurre la produzione di citochine e chemochine modulatorie da parte delle cellule dendritiche e di inibire *in vivo* la risposta Th2 e Th17. Un adiuvante valido dal punto di vista clinico però, non può essere usato solo in forma solubile ma anche coniugato a proteine allergeniche allo scopo di limitare la stimolazione eccessiva dei linfociti B (la molecola coniugata viene fagocitata solo dai macrofagi) e quindi di impedire l'attivazione policlonale spesso destinata a suscitare una risposta autoimmune o linfoproliferativa. Per tale motivo è stata scelta una adenina modificata più idonea ad essere coniugata a molecole proteiche senza subire cambiamenti nelle sue attività biologiche (SA-26E). SA-26E è stata legata in modo covalente alla ovalbumina e tale coniugato è stato testato nuovamente per la capacità di stimolare i TLRs e di modulare le risposte Th2 e Th17 *in vivo*.

3. MATERIALI E METODI

Reagenti

L'eterociclico sintetico dell'adenina (2-butossi-8-idrossi-9-benziladenina, SA-2) e il suo analogo inattivo (2-butossiadenina, SA-1) sono stati ottenuti col metodo descritto da Hirota K. et al. In particolare la SA-2 è stata ottenuta per O-alchilazione in posizione 2 della corrispondente diidrossiadenina, utilizzando un trattamento con butil bromuro in dimetilformammide. La diidrossiadenina è ottenuta, a sua volta, per ciclizzazione con urea dell'opportuno imidazolo (5-ammino-1-benzil-ciano-2-idrossiimidazolo). L'estere attivo SA-26E (Acido 4-(6-amino-9-benzil-8-idrossi-9H-purin-2-ilsulfanil) butirrico 2,5-diossopirrolidin-1-il ester) è stato ottenuto presso il Dipartimento di Chimica Organica "Ugo Schiff" dell'Università degli Studi di Firenze a partire da un derivato dell'adenina già noto in letteratura secondo un metodo già descritto da altri Autori (Hirota K. et al. 2002). Il Poly I:C (ligando del TLR3) e il Resiquimod (R848) sono stati ottenuti da Invivogen, il PolydTA (controllo negativo del Poly I:C) è stato ottenuto da Sigma Aldrich, mentre alpha-galactosylceramide (α -GalCer) è stato ottenuto da Alexis Biochemicals. I livelli di endotossina dei reagenti erano inferiori a 0.003 EU/ml dopo misurazione mediante LAL test.

Protocollo di coniugazione adenine-proteine e purificazione dei coniugati

La SA-26E (2.5 mg) è stata diluita in 130 μ l di DMSO ed è stata coniugata chimicamente con 3 mg di ovalbumina (Sigma) in 1 ml di Buffer Fosfato,

mediante incubazione overnight a 4°C su oscillatore continuo. La SA-26E non coniugata è stata poi rimossa con ripetute dialisi (2000 mw cut-off, Slyde-A-Lyzer cassettes, Pierce, Rockford) contro PBS.

Animali

Sono stati utilizzati topi femmine C57BL/6J (7 settimane), mantenuti in condizioni di stabulazione standard. Tutti gli studi condotti sugli animali sono stati eseguiti secondo le linee guida istituzionali nazionali e locali relative all'etica animale.

Modelli murini di infiammazione allergica acuta e cronica del polmone e di trattamento con SA-2

È stato inizialmente studiato l'effetto dell'adenina modificata SA-2 in un modello murino di asma bronchiale acuto. I topi sono stati sensibilizzati mediante duplice (giorno 0 e 4) somministrazione intraperitoneale (i.p.) di 10 µg o 300 µg di ovalbumina (OVA) assorbiti in 2.25 µg di idrossido di alluminio (Alum). I controlli negativi sono stati sensibilizzati con idrossido di alluminio secondo lo stesso protocollo. Tutti gli animali sono stati sottoposti a challenge intratracheale (i.t.) di OVA (10 µg in 50µl di PBS, topi sensibilizzati) o di solo PBS (gruppo di controllo), al giorno 28 e 32. Alcuni hanno, inoltre, ricevuto per via i.p. l'eterociclico sintetico SA-2 (50 µg in 100 µl di salina al 20% di DMSO), o il suo veicolo (100 µl di salina al 20% di DMSO), due giorni prima (giorno -2) e 4 giorni dopo (giorno 4) la prima sensibilizzazione con OVA (Protocollo A, Preventivo , Fig.5). Un secondo gruppo di topi OVA-sensibilizzati hanno, invece, ricevuto una singola somministrazione

per via i.p. di SA-2 (50 µg in 100 µl di salina al 20% di DMSO), 24h prima (giorno 27) del challenge con l'antigene (Protocollo B, Terapeutico, Figura 2B). 72h dopo l'ultimo challenge i topi sono stati sacrificati. Infine a topi wild-tipe è stata somministrata per via i.p. SA-2 (SA-1 come controllo negativo) e, dopo 2 e 12h, sono stati quantificati i livelli sierici di citochine (IL-6, IL-10, IL-12, IL-27, IFN di tipo I) e chemochine (CXCL10) utilizzando test ELISA.

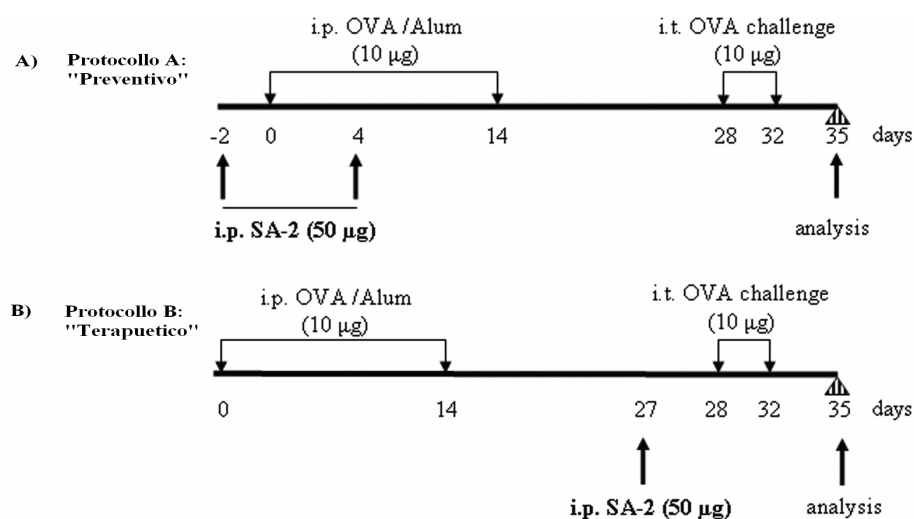


Fig. 5: Trattamento con SA-2: protocollo preventivo (A) e protocollo terapeutico(B)

In un secondo protocollo abbiamo valutato l'effetto della SA-2 in un modello murino di asma bronchiale cronico. I topi sono stati sensibilizzati con OVA e sono stati sottoposti a ripetuti challenge intratracheali sempre con OVA (10 µg in 50µl di PBS) nei giorni 14, 18, 42 e 45. Gli animali sensibilizzati hanno ricevuto SA-2 o DMSO come descritto nel modello acuto. Anche per questo protocollo l'analisi è stata effettuata tre giorni dopo l'ultimo challenge con OVA.

Modello murino di produzione sistemica di IL-17 e trattamento con SA-2

I topi sono stati pretrattati con una somministrazione i.p. di 50 µg di SA-2, 4 ore prima della somministrazione di α-GalCer/Poly I:C (2 µg/10 µg) o del controllo negativo α-GalCer/PolydTA (2 µg/10 µg) per via endovenosa (e.v.) e dopo 6 ore sono stati sacrificati per l'analisi.

Modelli murini di infiammazione allergica del polmone e di trattamento con OVA-SA26E

È stato inizialmente studiato l'effetto dell'adenina coniugata OVA-SA26E in un modello preventivo di asma bronchiale acuto. I topi sono stati sensibilizzati mediante duplice (giorno 0 e 7) somministrazione intraperitoneale (i.p.) di 10 µg di OVA assorbiti in idrossido di alluminio (Alum) oppure di 10 µg di OVA-SA26E oppure di un mix composto da 10 µg di OVA e 0.085 µg/ml di SA-26E. I controlli negativi sono stati sensibilizzati con idrossido di alluminio secondo lo stesso protocollo. Tutti gli animali sono stati sottoposti a challenge intratracheale (i.t.) di OVA (10 µg in 50µl di PBS, topi sensibilizzati) o di solo PBS (gruppo di controllo), al giorno 14 e 18. 72h dopo l'ultimo challenge i topi sono stati sacrificati.

E' stato valutato anche un modello preventivo Long-term dove gli animali sono stati sensibilizzati e challengiati come riportato precedentemente. Per valutare l'effetto long-term dell'immunizzazione con OVA-SA26E, i topi sono stati mantenuti in condizioni di sterilità per circa 7 mesi dopo il secondo challenge i.t..

Ai giorni 230 e 234 è stato nuovamente effettuato un challenge e il giorno 237 gli animali sono stati sacrificati.

Infine è stato effettuato un modello terapeutico dove gli animali sono stati sensibilizzati per via i.p. con 10 µg di OVA assorbiti in alum i giorni 0 e 7. La fase di sensibilizzazione è stata seguita da un challenge con 10 µg di OVA il giorno 10. Il trattamento è consistito nella somministrazione i.p. di coniugato i giorni 14 e 21. Il giorno 28 gli animali sono stati nuovamente esposti all'antigene mediante somministrazione i.t. e il giorno 31 sono stati sacrificati (Fig.6).

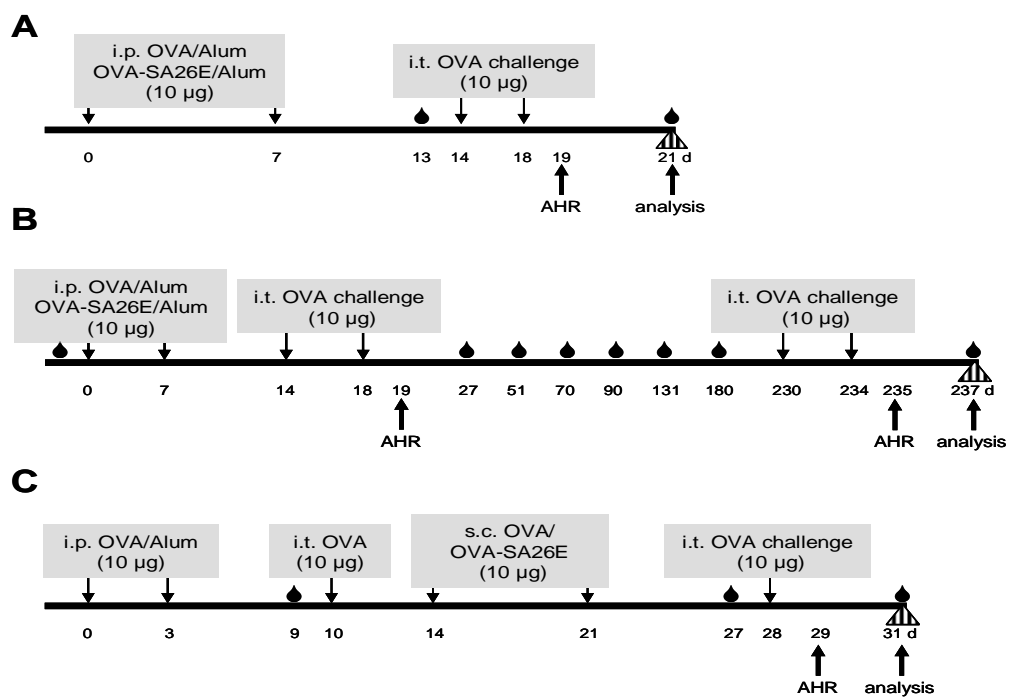


Fig. 6: Modelli murini di asma allergico

Valutazione dell'iperreattività bronchiale (AHR)

La valutazione della broncoreattività è stata effettuata su topi coscienti utilizzando un pletismografo e registrando curve di pressione respiratoria in risposta a dosi crescenti di metacolina. Per quantificare l'AHR è stato quindi usato l'Enhanced pause (Penh value).

Lavaggio Broncoalevolare (BAL)

I topi sono stati uccisi con un'iniezione i.p. di Avertin 72 ore dopo l'ultimo challenge con OVA ed il BAL è stato ottenuto come descritto: la trachea è stata liberata dai tessuti circostanti e, successivamente, incanalata con un ago 27 gauge racchiuso in un tubo di silicone di 0,96 mm. I polmoni sono stati lavati con 500 µl di PBS e poi con 800 µl di PBS con BSA allo 0.1%. I campioni ottenuti sono stati centrifugati a 300 giri per 5 minuti a 4°C, ottenendo pellet cellulari. A questo punto, i surnatanti ottenuti, sono stati conservati a -20°C, mentre i pellet cellulari delle due aliquote sono stati pullati. Le cellule ottenute dal BALF sono state sottoposte ad analisi morfologica (colorazione con Diff Quick) ed analisi citofluorimetrica. A questo scopo le cellule del BALF sono state marcate con anticorpi monoclonali fluorocromo-coniugati: anti-CD3, anti-CD4 e anti-CCR3.

Analisi istologica del tessuto polmonare

I polmoni sono stati perfusi con PBS e fissati in formalina neutra 4% prima dell'inclusione in paraffina. Il tessuto (3 µm) è stato, successivamente, colorato mediante Ematossilina e Eosina (H&E) o colorazione Congo Red. Nel primo caso

la severità dell'infiammazione peribronchiale e perivascolare è stata valutata assegnando un punteggio crescente da 1 a 4 in base al numero di cellule presenti (1 = nessuna infiltrazione rilevabile; 2 = <20 cellule; 3= <100 cellule e 4 = >100 cellule).

Generazione di Cellule Dendritiche da Midollo Osseo (BMDCs)

Le BMDCs sono state preparate secondo questo protocollo: femore e tibia di topi C57BL/6J sono stati rimossi e da questi è stato prelevato il midollo con una siringa, mentre gli eritrociti sono stati lisati con una soluzione allo 0,15 M di NH₄Cl. Dopo il lavaggio, una soluzione contenente 0.4x10⁶ cellule/ml è stata trasferita in piastre da 24 pozzetti in terreno completo a cui è stato aggiunto GM-CSF murino alla concentrazione di 10 ng/ml. Al giorno ottavo, oltre il 75% delle cellule era in grado di esprimere la molecola di superficie CD11c. Il recupero è stato pari al 50% delle cellule in coltura. Le BMDCs sono state coltivate in vitro per 3, 12 e 72 ore in presenza di 2,5 µg/ml SA-2 o SA-1 (come controllo negativo). Al termine delle colture le cellule (3 ore) sono state raccolte per l'estrazione dell'RNA totale e i surnatanti (3, 12, 72 ore) sono stati analizzati per determinare la produzione di IL-6, IL-10, IL-12, IL-27 e di CXCL10 utilizzando test ELISA.

Proliferazione di cellule T antigene (OVA)-specifiche

Sono state ottenute cellule mononucleate (MNCs) dalla milza e dai linfonodi mesenterici e mediastinici e la proliferazione di cellule T antigene (OVA)-

specifiche è stata effettuata come descritto (81) con dosi crescenti di OVA. In breve, 2×10^5 cellule sono state poste in coltura per 72 ore in terreno completo e siero bovino fetale (5%) in piastre da 96 pozzetti con fondo tondo in presenza o meno di OVA a diverse concentrazioni (100, 50, 25 $\mu\text{g/ml}$). Al quarto giorno di coltura sono stati raccolti i surnatanti ed è stata quindi aggiunta timidina triziata (0.5 $\mu\text{Ci/pozzetto}$).

Nel surnatante di coltura è stato effettuato il dosaggio di citochine (IL-5, IL-13 e IFN- γ) mediante kit commerciali ELISA (R&D Systems) con i seguenti limiti di detezione: 31 pg/ml per IL-5, 15 pg/ml per IL-13 e 15 pg/ml per IFN- γ .

Valutazione quantitativa delle citochine nei surnatanti e nel siero

I livelli di citochine nel siero e nei surnatanti delle colture cellulari sono stati misurati con test ELISA commerciali (R&D Systems).

Analisi quantitativa dell'mRNA

L'RNA totale è stato estratto dai polmoni congelati dei topi e dalle BMDCs utilizzando il reagente Trizol. Quindi è stata effettuata una Real-Time PCR (RT-PCR) quantitativa utilizzando sonde e reagenti predefiniti.

Anticorpi antigene (OVA)-specifici

Il dosaggio degli anticorpi IgG1, IgG2a e IgE antigene-specifici nel siero, è stato ottenuto utilizzando test ELISA. È stato effettuato un coating sulle piastre con l'antigene alla concentrazione di 10 $\mu\text{g/ml}$ in Buffer Carbonato. Per bloccare gli

anticorpi aspecifici la piastra è stata saturata con Blocking Buffer (PBS/BSA al 3%) per le IgG1 e le IgG2a antigene-specifiche, mentre per le IgE antigene-specifiche con Buffer Carbonato/BSA al 5%. Per valutare le IgE antigene-specifiche i sieri sono stati, precedentemente, assorbiti su biglie di sefarosio coniugate alle proteine G, al fine di eliminare le IgG presenti. Per l'analisi è stata fatta una diluizione dei sieri da 1:160 a 1:20480 per le IgG1; da 1:5 a 1:640 per le IgG2a; da 1:10 a 1:640 per le IgE antigene-specifiche. Gli anticorpi legati, sono stati individuati utilizzando anticorpi anti-IgG1, anti-IgG2a e anti-IgE biotinilati. Gli anticorpi legati sono stati quindi rilevati aggiungendo il cromogeno ABTS e successiva lettura spettrofotometrica (405 nm).

Determinazione di anticorpi anti-nucleo (ANA)

La determinazione degli anticorpi anti-nucleari ed il relative pattern di fluorescenza (omogeneo o speckeld) è avvenuta mediante utilizzo di immunofluorescenza indiretta su cellule Hep-2 (Antibodies, Inc) secondo le istruzioni riportate ed utilizzando sieri murini a partire da una diluizione 1:20.

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il test t di Student. I dati riportati sono espressi come valori medi \pm ESM (errore standard medio). Sono stati considerati significativi i $p < 0.05$.

4. RISULTATI

L'adenina modificata SA-2 è un ligando del TLR7 murino

E' stata innanzitutto valutata la possibilità che la adenina modificata SA-2 potesse comportarsi da ligando del TLR7 murino. A questo scopo è stata utilizzata una linea cellulare di HEK293 co-transfettata con il gene codificante per il TLR7 ed un gene reporter (luciferasi) come descritto (79). La molecola SA-2 è stata in grado di up-regolare l'espressione della luciferasi NF- κ B-dipendente in maniera dose dipendente, dimostrando che SA-2 è in grado di agire quale ligando del TLR7 murino. Sono stati utilizzati R848 (resiquimod) e SA-1 (analogo inattivo della SA-2) rispettivamente quali controllo positivo e negativo (Fig. 3A).

L'adenina modificata SA-2 induce la produzione di citochine regolatorie e proinfiammatorie da parte di cellule dendritiche

Prima di sperimentare gli effetti *in vivo* dell'adenina modificata ne abbiamo valutato l'effetto sulle cellule dell'immunità innata. BMDCs purificate sono state coltivate in assenza o in presenza di SA-2 (o SA-1). Cellule stimulate con SA-2, ma non con SA-1, hanno mostrato una riduzione del rapporto Jagged1/Delta4, valutato in termini di espressione di mRNA. Analogamente SA-2, ma non SA-1, up-regolava l'espressione di citochine pro-infiammatorie (IL-6 e IL-27), di citochine regolatorie (IL-10) e di molecole Th1-associate (IL-12, CXCL10) senza invece modificare l'espressione di chemochine Th2 correlate quali CCL17 e CCL22. Un'analisi dei livelli proteici ha evidenziato che SA-2 stimolava le BMDCs

a produrre una quantità di citochine e chemochine crescente nel tempo, con una cinetica variabile tra le varie citochine. La somministrazione intraperitoneale di SA-2, ma non di SA-1, a topi wild type ha mostrato un incremento dei livelli sierici di IL-6, IL-10 e IL-27 già a partire da 2 ore dopo il trattamento. Inoltre, nelle medesime condizioni sperimentali, nel siero di topi trattati con SA-2 sono emerse elevate concentrazioni di IFN di tipo I e di CXCL10. È infine interessante notare come la chemochina CXCL10 fosse ancora rilevabile 12 ore dopo la somministrazione i. p. di SA-2.

SA-2 previene e downregola lo sviluppo di risposte immuni di tipo Th2 in un modello murino di asma bronchiale

Per determinare se il trattamento con SA-2 fosse capace di prevenire e ridurre una risposta infiammatoria di tipo Th2 *in vivo* è stato utilizzato un modello murino di asma bronchiale OVA-indotto. In particolare è stato effettuato un protocollo di tipo preventivo in cui SA-2 è stato somministrato per 2 volte durante la fase di sensibilizzazione (giorno -2 e +4) con OVA in Alum (topi sa-2/OVA). Tali animali hanno poi subito un duplice challenge allergenico per via intratracheale con OVA (Protocollo A). Al gruppo di controllo positivo è stato somministrato DMSO, veicolo della SA-2 (topi DMSO/OVA), mentre, per il gruppo di controllo negativo, è stato utilizzato solo PBS sia per la somministrazione i.p. (topi PBS/PBS) che per il challenge. L'esame istologico del tessuto polmonare (colorazione Ematossilina-Eosina) ha evidenziato una riduzione del grado di infiltrato

infiammatorio, sia perivascolare che peribronchiale (rispettivamente: $p < 0.02$ e $p < 0.005$), nei topi SA-2/OVA rispetto ai topi DMSO/OVA (Fig.7).

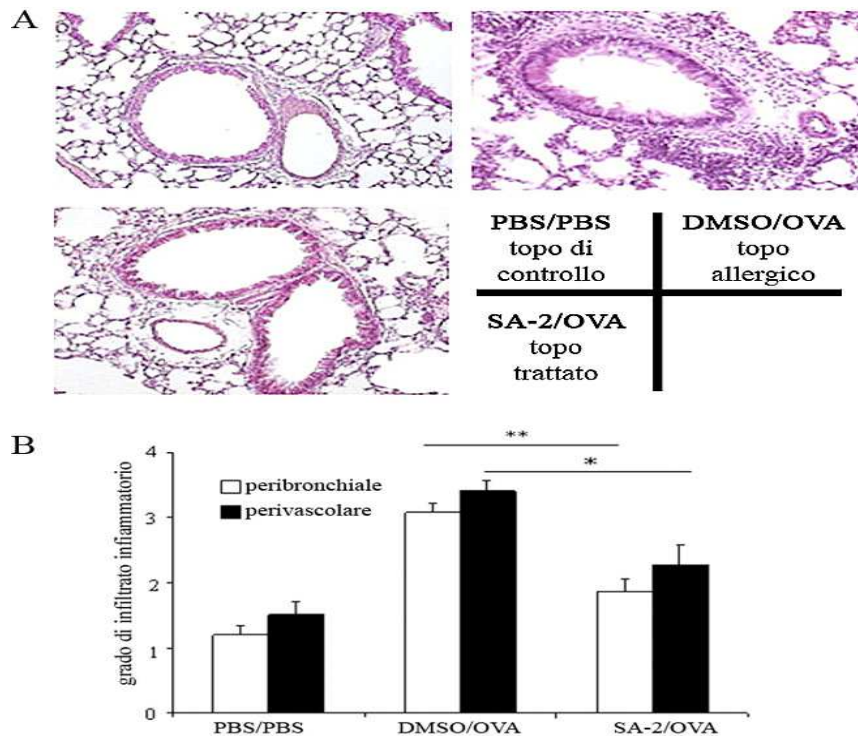


Fig. 7: A, Riduzione del grado di infiltrato infiammatorio peribronchiale e perivascolare. B, grado di infiltrato infiammatorio. I dati riportati sono espressi come valori medi (\pm ESM) dei gradi d'infiltrato infiammatorio di 10 topi/gruppo. *, $p < 0.005$; **, $p < 0.02$.

Inoltre, nel BAL di topi SA-2/OVA è stata evidenziata una significativa riduzione sia del numero totale di cellule ($p < 0.0025$), sia delle percentuali e del numero assoluto di linfociti ($p < 0.005$) e di eosinofili ($p < 0.001$), rispetto al BAL ottenuto da topi DMSO/OVA. L'analisi quantitativa dell'mRNA, mediante RT-PCR, ha mostrato che questo effetto è accompagnato anche da una riduzione dell'espressione polmonare di GOB-5 e Muc5b, proteine tipicamente associate a

iperplasia delle cellule mucipare e alla produzione di muco in corso di asma bronchiale (Fig.8).

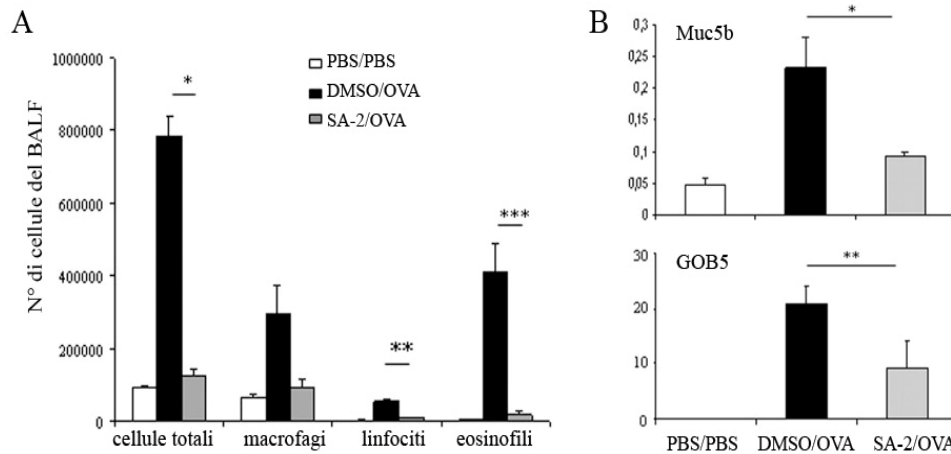


Fig. 8: Riduzione del numero di cellule dell'infiammazione nel BALF e dell'espressione polmonare di Muc5b e GOB-5. A, L'analisi cellulare del BALF è stata eseguita su base morfologica (colorazione Diff Quick). I dati riportati sono espressi come valori medi (\pm ESM). *, $p < 0.0025$; **, $p < 0.005$; ***, $p < 0.001$. B, L'espressione polmonare di mRNA di GOB-5 e Muc5b è stata analizzata mediante RT-PCR. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.005$.

Dopo il secondo challenge, nei polmoni dei topi SA-2/OVA rispetto ai topi DMSO/OVA, è stata evidenziata una significativa riduzione dell'espressione di mRNA codificante sia molecole Th2-associate (IL-4, IL-5, IL-13, CCL11, CCL17, CCL22) sia IL-10 e TGF- β (dati non mostrati in Fig.9), con equivalente espressione di IFN- γ e CXCL10.

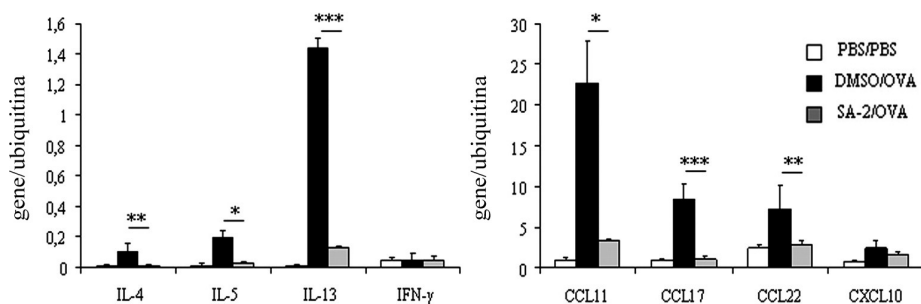


Fig. 9: Espressione polmonare di citochine e chemochine TH2- e TH1-correlate. L'espressione polmonare di mRNA di citochine (pannello di sinistra) e chemochine (pannello di destra) è stata analizzata mediante RT-PCR". I dati riportati da 3 esperimenti differenti sono espressi come valori medi (\pm ESM). *, $p < 0.01$; **, $p < 0.02$; ***, $p < 0.005$.

Parallelamente, cellule MNs ottenute da linfonodi mediastinici di topi SA-2/OVA si caratterizzano per una ridotta produzione di IL-5 e IL-13, dopo stimolazione in vitro con OVA, rispetto a cellule ottenute da topi di controllo. Non è, invece, emersa alcuna variazione a carico della produzione di IFN- γ . Il dosaggio degli anticorpi sierici ha evidenziato una significativa diminuzione dei livelli di IgE totali (1116 ± 284 vs 411 ± 77 ng/ml, $p < 0.05$), di IgE- e di IgG1-OVA-specifiche, con livelli immodificati di IgG2a-OVA-specifiche (Fig.10).

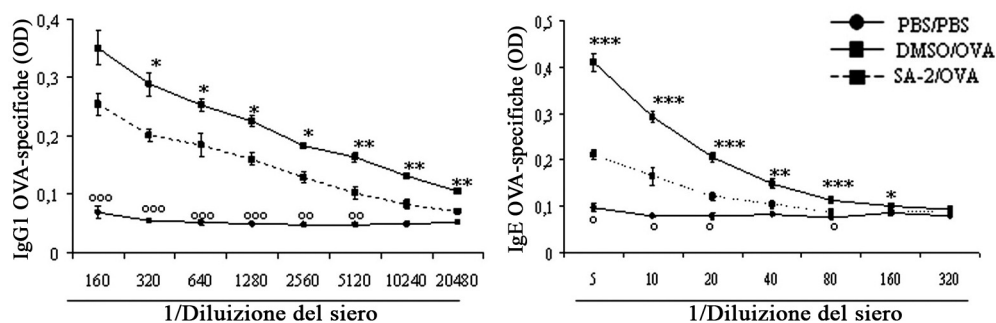


Fig. 10: SA-2 inibisce la produzione di anticorpi OVA-specifici. La significatività statistica tra i gruppi DMSO/OVA e SA-2/OVA è indicata secondo la legenda seguente: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. La significatività tra i gruppi PBS/PBS e SA-2/OVA è, invece, indicata come segue: °, $p < 0.05$; °°, $p < 0.01$; °°°, $p < 0.001$

Parallelamente per determinare se il trattamento con SA-2 fosse capace di modulare una sensibilizzazione Th2 stabilizzata, abbiamo applicato un protocollo sperimentale di tipo terapeutico (Protocollo B) in cui SA-2 è stata somministrata per via intraperitoneale 13 giorni dopo l'ultima sensibilizzazione avvenuta il giorno 14. Nei polmoni di topi trattati con SA-2 (topi OVA/SA-2) è stata rilevata una significativa riduzione dell'infiltrato infiammatorio a livello peribronchiolare (ma non a livello perivascolare), rispetto ai topi appartenenti al gruppo di controllo (topi OVA/DMSO), con riduzione (anche se non significativa) del numero di cellule dell'infiammazione presenti nel BAL (Fig.11).

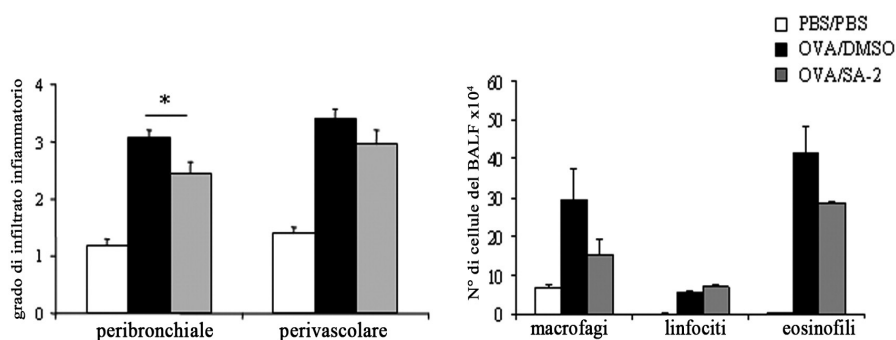


Fig. 11: Riduzione del grado d'infiltrato infiammatorio peribronchiolare e perivascolare e del numero di cellule dell'infiammazione nel BALF. I dati riportati sono espressi come valori medi (\pm ESM). *, $p < 0.05$.

Nel tessuto polmonare di topi OVA/SA-2 è stato osservato un aumento significativo ($p < 0.05$) dell'espressione di IFN- γ e di CXCL10 ed una parallela riduzione, non significativa, di citochine (IL-4, IL-5 e IL-13) e chemochine (CCL11, CCL17, CCL22) Th2-associate, rispetto al gruppo di controllo. Le cellule MNs prelevate dai linfonodi mediastinici di topi OVA/SA-2, si sono dimostrate in grado di produrre IFN- γ ($p < 0.005$) dopo ristimolazione *in vitro* con OVA, in quantità significativamente maggiore, rispetto a cellule mononucleate ottenute da

topi di controllo OVA/DMSO (Fig.12).

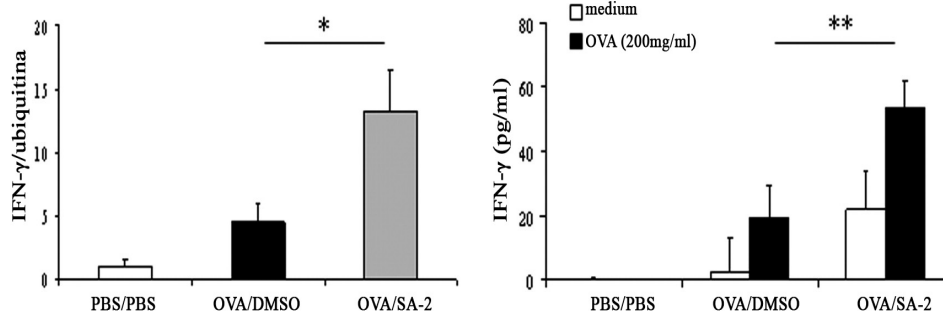


Fig. 12: SA-2 induce un aumento dell'espressione polmonare di IFN- γ e della produzione di IFN- γ da parte di linfonodi mediastinici. I dati riportati relativi all'espressione polmonare di mRNA di IFN- γ (pannello di sinistra) ed alla produzione di IFN- γ (pannello di destra) da parte di linfonodi mediastinici dopo stimolazione con OVA, sono espressi come valori medi (\pm ESM). *, $p < 0.05$; **, $p < 0.005$.

L'analisi dei livelli anticorpali ha evidenziato una significativa ($p < 0.05$) diminuzione dei livelli di IgE totali e di IgG1, ma non di IgE OVA-specifiche nel siero di topi OVA/SA-2. I livelli di IgG2a OVA-specifiche, anche se in modo non significativo, sono risultati più alti nel siero dei topi OVA/SA-2 rispetto ai topi OVA/DMSO.

A causa degli effetti più lievi esercitati da SA-2 nel protocollo terapeutico, rispetto a quello preventivo, ci siamo chiesti se l'attività dell'adenina modificata potesse essere potenziata modificando la via di somministrazione (i.t. anziché i.p.), la dose utilizzata, nonché le condizioni di sensibilizzazione dell'animale, variando le dosi di antigene o di adiuvante stesso. Sia la somministrazione i.p. sia quella i.t. determinavano una riduzione dell'espressione polmonare di molecole Th2-correlate (IL-13 e IL-15) ed un parallelo incremento di quelle Th1-correlate (IL-12,

CXCL10, IFN- γ e T-bet). Per quanto concerne il dosaggio di SA-2 è emerso un suo effetto dose dipendente con una maggiore espressione di molecole Th1-associate, indotta da elevate dosi (250 μ g) di SA-2 rispetto a dosi minori (50 μ g) (Fig.13).

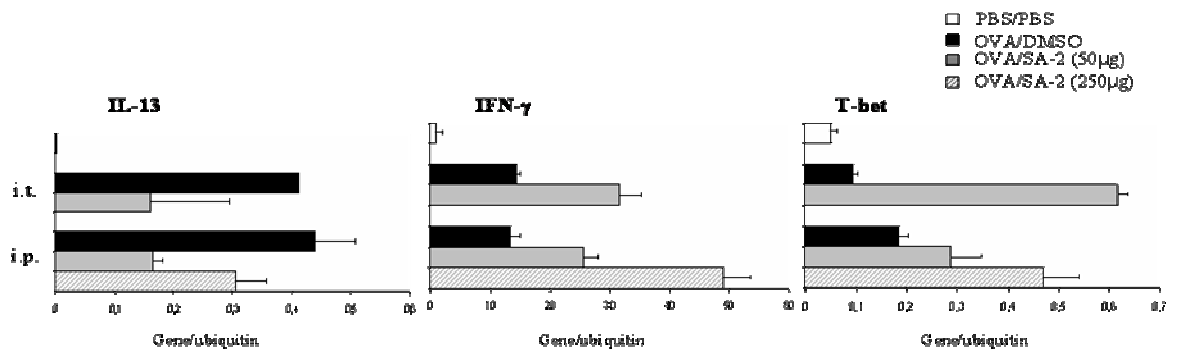


Fig. 13: Effetti di differenti vie di somministrazione (i.p. e i.t.) e dosi (50 e 250 μ g) di SA-2 nel protocollo terapeutico sull' espressione molecolare di citochine Th1 e Th2 nel tessuto polmonare.

Infine abbiamo evidenziato che gli effetti terapeutici di SA-2 si amplificavano in caso di immunizzazione con elevate dosi di antigene (OVA 300 μ g anziché 10 μ g, hdOVA). Infatti il modello hdOVA/SA-2 ha portato ad una significativa riduzione sia della flogosi polmonare (infiltrati cellulari a livello perivascolare, peribronchiale, bronchiolare e alveolare) sia dell'eosinofilia tissutale. Inoltre topi hdOVA/SA-2 hanno mostrato diminuiti livelli sierici ($p < 0.05$) di IgE, di IgE OVA-specifiche e di IgG1, rispetto a topi hdOVA/DMSO (Fig.14).

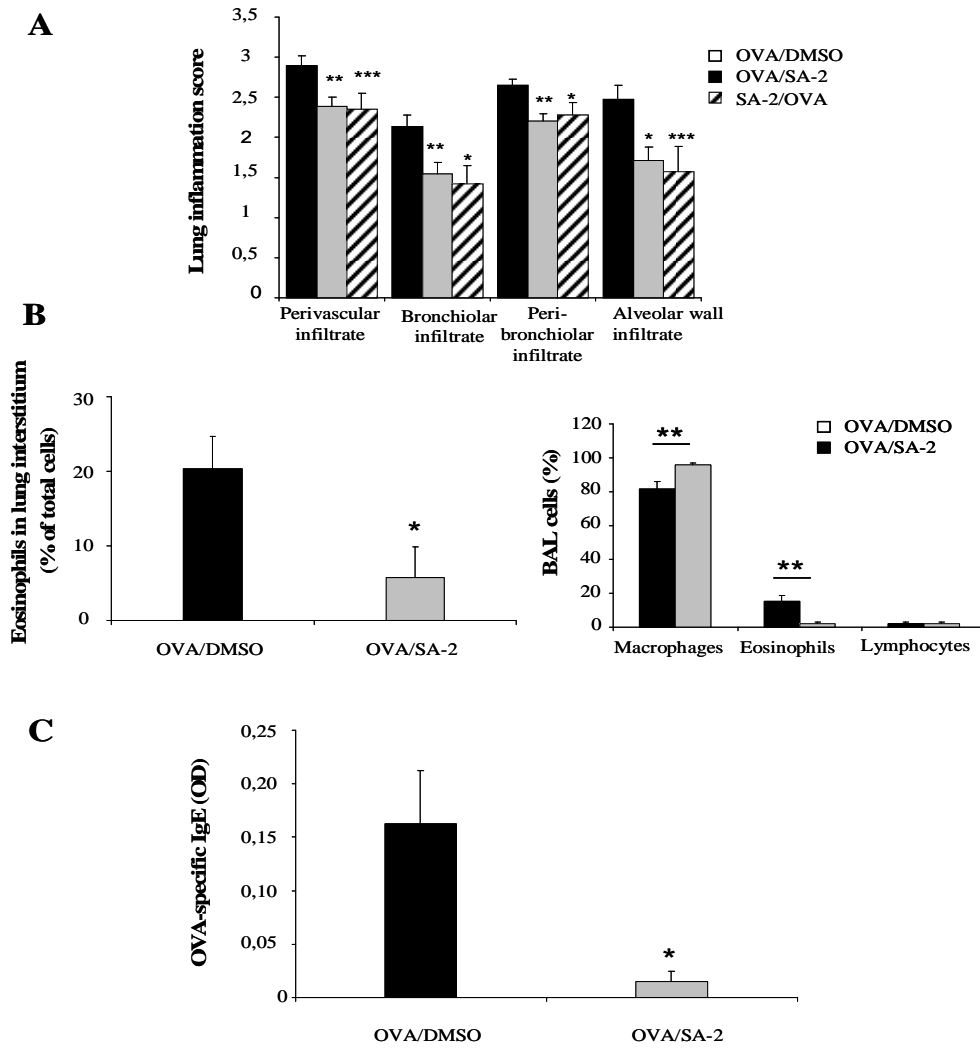


Fig. 14: A, grado di infiltrazione del polmone in topi immunizzati con alte dosi di OVA e trattati secondo i vari protocolli *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,005$. B, Percentuale di infiltrato eosinofilo nel polmone (pannello a sinistra) e analisi delle cellule del BAL (pannello a destra) in topi OVA / DMSO e OVA/SA-2 *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$. C, Livelli sierici di IgE OVA- specifiche in topi OVA / DMSO e OVA/SA-2 *, $p < 0,05$.

Ligandi del TLR3 quali promotori di una risposta immune di tipo Th17 in un modello murino α GalCer-dipendente

E' risaputo che le cellule NKT invariati (iNKT) giocano un ruolo importante nello sviluppo e nel mantenimento di risposte immuni di tipo Th2/Th17 in quanto, dopo essere state attivate, producono rapidamente IFN- γ , IL-4, IL-13 e IL-17(82,83).

Abbiamo quindi messo a punto un modello sperimentale che prevede l'utilizzo di α -GalCer, in grado di attivare le iNKT, e Poly I:C, ligando del TLR3 per aumentare la produzione di IL-17 *in vitro* e *in vivo*.

L'effetto del Poly I:C sull'attività delle iNKT è stata valutata in esperimenti condotti *in vitro* su cellule murine di milza e polmone. Tale TLR3 si è dimostrato in grado di indurre un incremento nell'espressione di mRNA e nella produzione di IL-17 da parte di queste cellule MNs stimulate con α -GalCer in assenza di un parallelo aumento di IFN- γ , IL-4, IL-13. L'attività di α -GalCer e Poly I:C sulla risposta Th17 è stata ulteriormente confermata dall' up-regolazione di due fattori essenziali ROR γ t e IL-23R nelle cellule mononucleate di milza e polmone. Questi dati sono stati poi confermati in un modello murino *in vivo*, dove topi trattati per via i.p. o via e.v con α -GalCer e dosi crescenti di Poly I:C (10,50,250 μ g), mostravano maggiori livelli sierici crescenti di IL-17 (ma non di IFN- γ , IL-4, IL-13) rispetto ai topi di controllo trattati con α -GalCer più dosi crescenti di PolydTA.

SA-2 inibisce la produzione di IL-17 indotta da α -GalCer e TLR 3 ligandi *in vitro e in vivo*

E' stato valutato se gli agonisti del TLR7 inducevano la produzione di IL-17 da parte di cellule stimulate con α -GalCer e Poly I:C. E' stato dunque messo a punto un esperimento in time course dove si evidenziava che SA-2 e R848, ma non SA-1(controllo negativo di SA-2), inibivano significativamente la produzione di IL-17 e up-regolavano la produzione di IL-27 e IL-10 in cellule MNCs di milza (Fig.15). Ulteriormente i ligandi del TLR7 inibivano l'espressione di mRNA di IL-1 β e IL-23 e incrementavano l'espressione di IL-10 e IL-27 in cellule CD11C+ e BMDC stimulate con Poly I:C (dati non mostrati in figura).

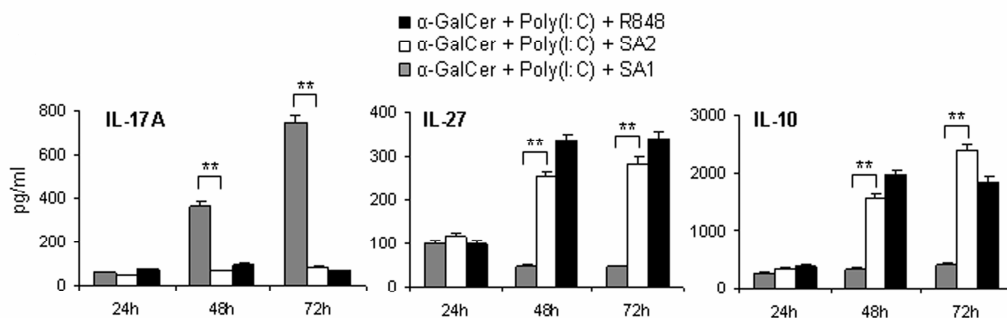


Fig. 15: Produzione di citochine da parte di MNCs di milza stimulate per 24, 48, 72 ore in presenza di SA-2 (10 μ g / ml) ,SA-1 (10 μ g / ml) ,R848 (6 μ M) *, p < 0.05; **, p < 0.01.

E' quindi stata valutata la somministrazione i.p. di SA-2 nel modello murino α -GalCer/Poly I:C-dipendente. I dati indicano che SA-2 riduceva la produzione a livello sistemico di IL-17 senza che ci fosse un effettivo coinvolgimento di citochine come IL-13 e IFN- γ (Fig16). Anche i dati sull'espressione di mRNA di cellule mononucleate provenienti da milza e polmone di animali pretrattati con

SA-2, mostravano una diminuzione di IL-17 e un incremento di livelli di citochine ad azione regolatoria e angiogenetica come IL-10 e IL-27 (dati non mostrati in figura).

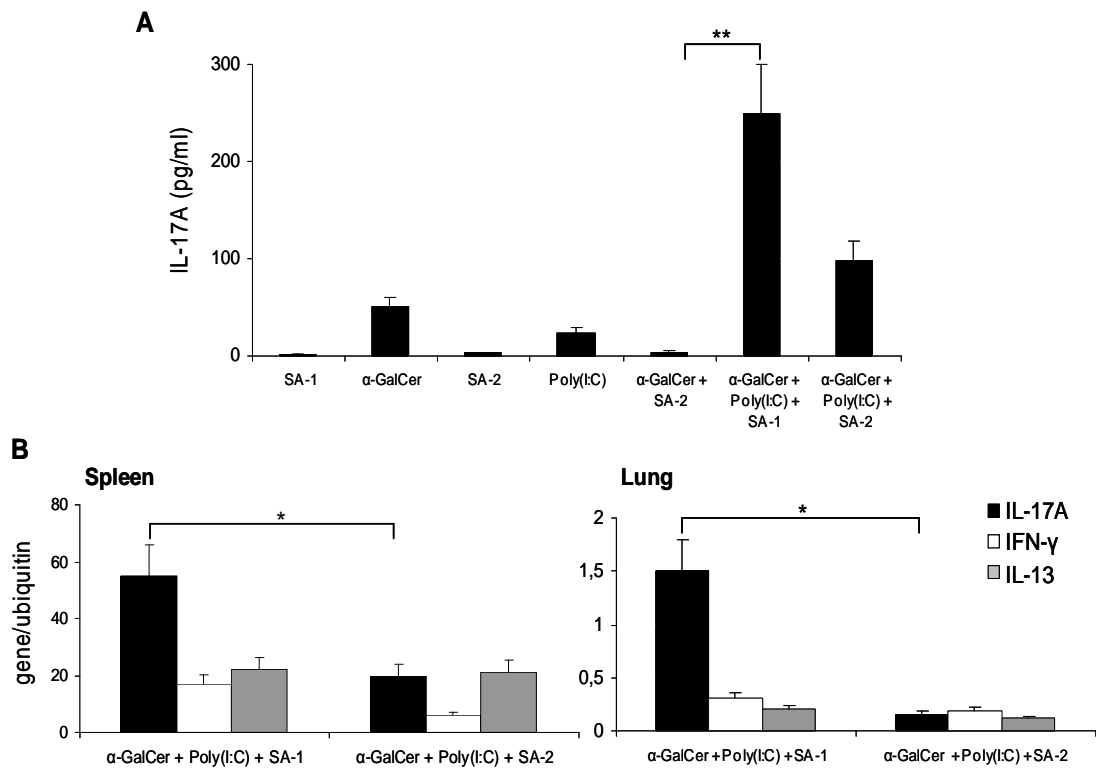


Fig. 16: SA-2 inibisce selettivamente la produzione di IL-17 *in vivo*. A, SA-2 o il controllo negativo SA-1 sono somministrate per via i.p. 4h prima del trattamento i.v. con α-GalCer e Poly I:C. Dopo 6h è stato preso il sangue per la misurazione di IL-17 nel siero. B, I topi sono trattati come in A e l'espressione di citochine nella milza e nel polmone è stata valutata in mRNA tramite RT-PCR. I dati riportati relativi all'espressione di mRNA sono espressi come valori medi (± ESM). *, p<0.05; **, p<0.01

SA26E coniugata con OVA (OVA-SA26E) lega il TLR7 e attiva le cellule dendritiche murine

Per prima cosa abbiamo determinato se il coniugato OVA-SA26E fosse stato in grado di legare il TLR7 murino usando delle cellule HEK293 trasfettate con il TLR7 (Fig.17).

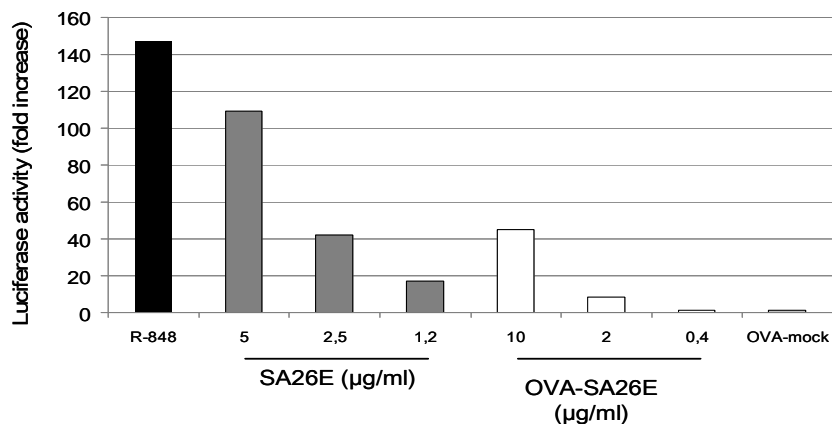


Fig. 17: Cellule HEK293 transfettate stabilmente con TLR7 murino sono state co-transfettate mediante nucleofezione (Nucleofection®) con un plasmide codificante per la luciferasi NF- κ B dipendente e poi stimulate con R-848, SA-26E e il coniugato OVA-SA26E. I valori dell'attività luciferasica sono espressi come indice di incremento rispetto al controllo negativo (cellule stimulate solo con OVA).

Sia la molecola non coniugata che OVA-SA26E sono in grado di attivare le cellule trasfettate come indicato dalla up-regolazione dell'espressione di NF- κ B.

Questo significa che la molecola SA26E mantiene la sua capacità di binding sul TLR7 murino anche dopo legame covalente alla proteina allergenica. Uno degli aspetti peculiari dell'attivazione del TLR7 è quello della massiva produzione di citochine. Quindi per verificare l'effettiva attivazione del TLR7 abbiamo valutato

l'efficacia del coniugato nell'indurre la secrezione di citochine proinfiammatorie e di chemochine da parte di BMDCs. Tali cellule dopo stimolazione *in vitro* con OVA-SA26E, up-regolavano significativamente l'espressione di mRNA e la sintesi di numerose citochine quali IL-12, IL-10, IL-27, IL-1 β e CXCL10. (Fig.18 e dati non mostrati).

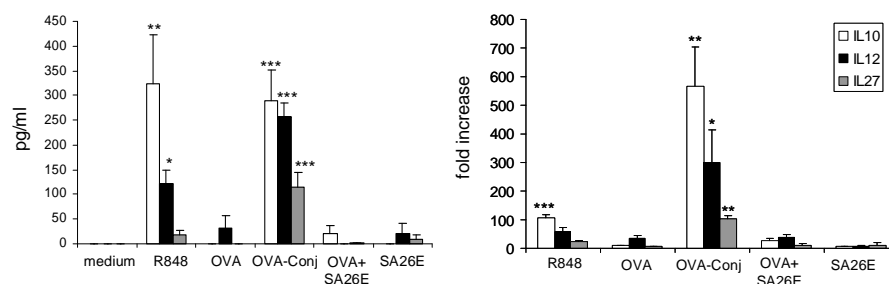


Fig. 18: Valutazione della produzione di citochine proinfiammatorie nei surnatanti (pannello di sinistra) e in mRNA da parte di BMDC ristimate *in vitro* con l'antigene *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

L'immunizzazione con OVA-SA26E previene lo sviluppo di flogosi allergica con effetto long term in modelli murini di asma bronchiale

Il ruolo *in vivo* del coniugato OVA-SA26E è stato inizialmente valutato in un modello murino di asma bronchiale OVA-correlato, in cui il coniugato è stato utilizzato per effettuare il priming allergenico. Tali animali mostravano rispetto ai topi di controllo sensibilizzati con OVA, una riduzione del grado di iperreattività bronchiale accompagnato da una riduzione significativa del numero di eosinofili nel BAL. Si segnala inoltre un incremento del numero di linfociti reclutati a livello polmonare (Fig.19).

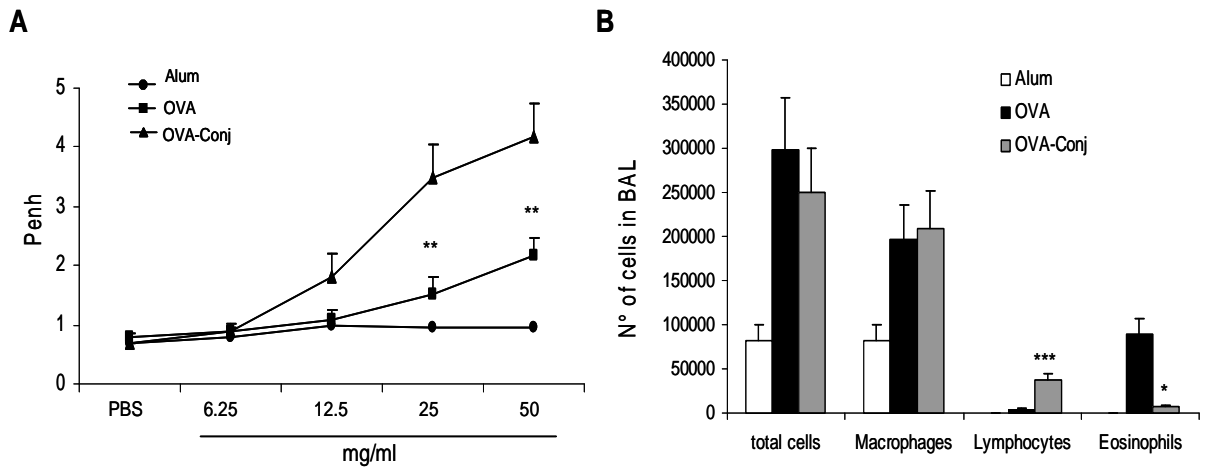


Fig. 19: A, Penh; B, numero totale delle cellule nel liquido broncoalveolare e sua caratterizzazione morfologica *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

A livello di espressione molecolare notiamo anche un significativo decremento di *GOB5* e *Muc5b*, geni responsabili della secrezione di mucine in corso di infiammazione, così come dei livelli di *CCR3* nel tessuto polmonare. L'analisi istologica di sezioni polmonari (Fig.20) ha mostrato una significativa riduzione della flogosi negli animali sensibilizzati con il coniugato, accompagnata da una riduzione dell'espressione molecolare polmonare di geni correlati alla iperplasia mucipara (*GOB5* e *MUC5b*) ed alla infiltrazione eosinofila (*CCR3*) (dati non mostrati).

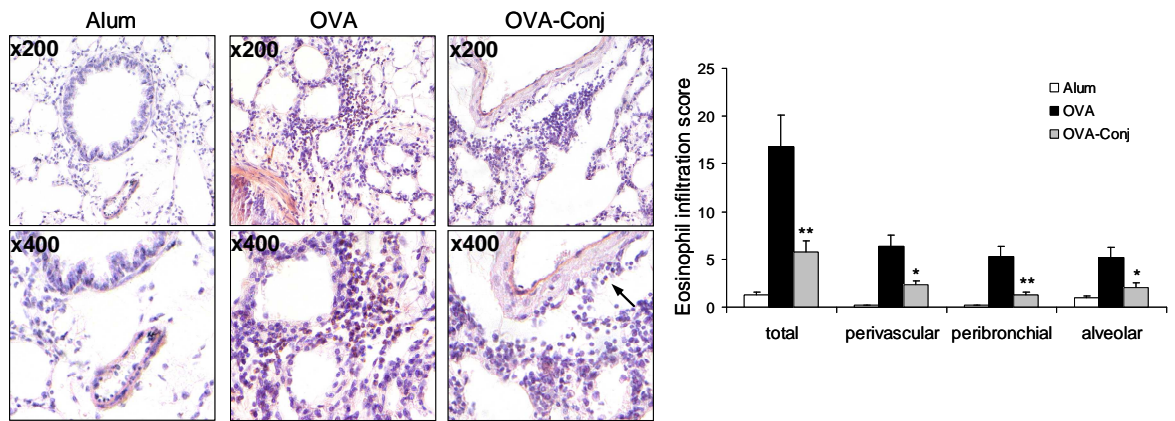


Fig. 20: Analisi istologica del tessuto polmonare e valutazione dell'infiltrato eosinofilo *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$

E' stato quindi indagato se la prevenzione di una infiammazione allergica si associasse ad una inibizione della risposta Th2-OVA specifica. Cellule MNCs ottenute da linfonodi mediastinici di topi sensibilizzati con il coniugato, hanno mostrato ridotta produzione di IL-13 e IL-5 in risposta *in vitro* ad una ristimolazione con OVA. In associazione invece un incremento nella sintesi di IFN- γ e IL-10 (Fig.21).

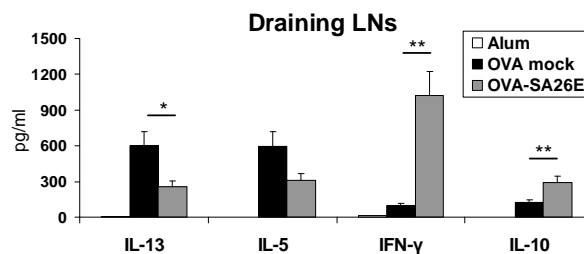


Fig. 21: Citochine valutate nei surnatanti di MNCs ottenuti da linfonodi mediastinici ristimolati *in vitro* con l'antigene *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$

In accordo con gli effetti del coniugato sulla produzione citochimica, è stata osservata una significativa riduzione dei livelli di IgE-OVA specifiche e un significativo incremento delle IgG2a a livello sierico in topi sensibilizzati con OVA-SA26E (Fig.22).

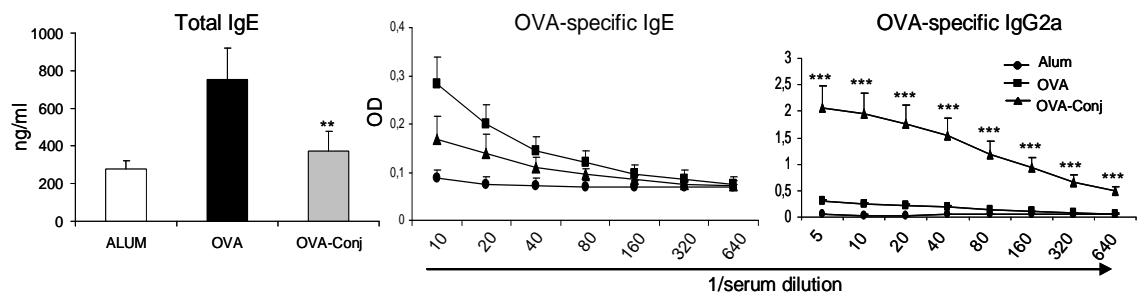


Fig. 22: Livelli sierici di Immunoglobuline OVA-specifiche ^{***}, p<0.001

Al fine di verificare la durata nel tempo degli effetti del coniugato, abbiamo analizzato l'efficacia di un priming con il coniugato a distanza di 7 mesi seguendo un protocollo di analisi come riportato in Fig. 23.

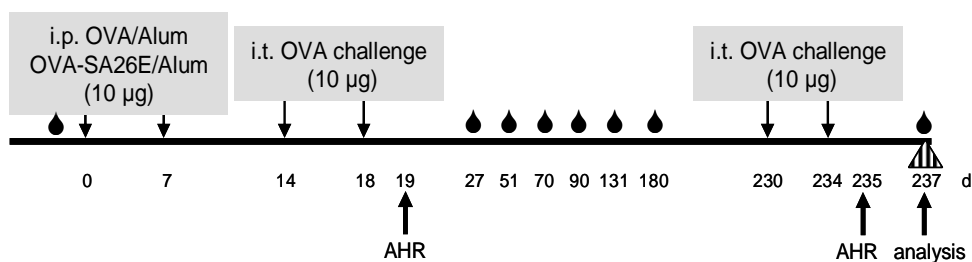


Fig. 23: Protocollo sperimentale preventivo long term di asma bronchiale

Gli animali sensibilizzati con il coniugato, 24 ore dopo il secondo challenge con

OVA (giorno +234), mostravano una ridotta broncoreattività rispetto ai topi di controllo ed una ridotta espressione di Muc5b e GOB5 a livello del tessuto polmonare, ed un ridotto reclutamento di eosinofili nel BAL (dati non mostrati in Fig.24).

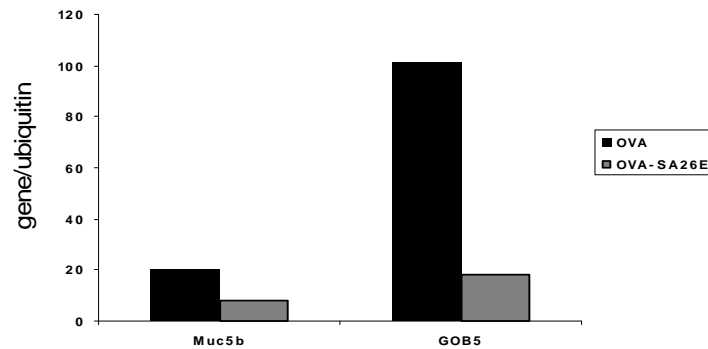


Fig. 24: Riduzione dell'espressione polmonare di Muc5b e GOB-5 analizzata mediante RT-PCR .

Non vi erano invece visibili differenze all'analisi del tessuto polmonare mediante colorazione istologica. Queste modificazioni a livello locale si associavano inoltre ad una ridotta produzione di citochine Th2 correlate (IL-13) ed un aumento di quelle Th1 correlate (IFN- γ) nonché, a livello sistemico, di un incremento di anticorpi IgG2a OVA-specifici (Fig.25).

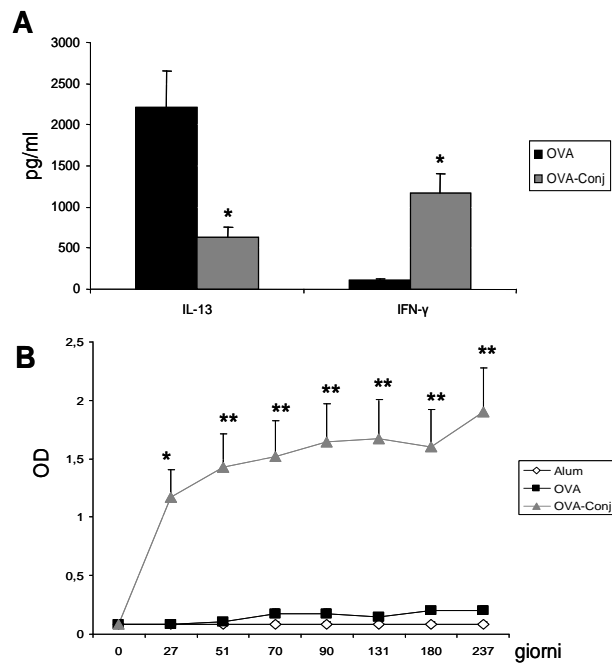


Fig. 25: A, citochine valutate nei surnatanti di MNCs ottenuti da polmone *in vitro* con l'antigene; B, livelli sierici di iGg2a OVA-specifiche *, $p < 0.05$; **, $p < 0.02$

Uso terapeutico del coniugato proteico OVA-SA26E in un modello murino di asma bronchiale

Cellule MNCs ottenute da linfonodi mediastinici ottenute da animali trattati con OVA-SA26E, producevano *in vitro* livelli significativamente più alti di IFN- γ e IL-10 in risposta all'antigene rispetto ad agli animali di controllo non trattati con il coniugato ma solamente con OVA, in assenza di significative modificazioni della produzione di IL-13. Il trattamento con OVA-SA26E ma non con OVA incrementava significativamente, senza modificare le IgE totali ed IgE OVA-specifiche, la produzione sistemica di IgG2a (dati non mostrati).

Sicurezza d'impiego delle adenine modificate e loro coniugati proteici

Allo scopo di valutare la capacità della adenina modificata SA-2 e dell'adenina coniugata OVA-SA26E di indurre fenomeni di autoimmunità, è stata effettuata la ricerca di anticorpi anti-nucleo (ANA) sierici nei vari protocolli sperimentali utilizzati. Dopo 35 giorni dalla somministrazione di SA-2, i topi trattati (SA-2/OVA) dimostravano livelli sierici di ANA significativamente più bassi rispetto ai topi di controllo (DMSO/OVA) come riportato nella tabella 1. La somministrazione di SA-2 sia in fase di sensibilizzazione (protocollo preventivo) che di challenge (protocollo terapeutico) si associava addirittura ad una riduzione dei livelli autoanticorpali. Inoltre anche con l'utilizzo di dosi alte di SA-2 (250 µg/topo), i livelli di ANA erano più bassi dopo 30, 60 e 90 gg dalla terapia rispetto ai controlli (Tab.1). Da sottolineare inoltre che l'analisi della fluorescenza su cellule Hep-2 non ha dimostrato un incremento di ANA a pattern speckled (autoanticorpi anti-RNA) nei topi trattati con SA-2 rispetto ai topi di controllo.

In accordo con questi dati non è stato osservato nessun aumento nella produzione di autoanticorpi nei topi che avevano subito un priming o un trattamento con OVA-SA26E rispetto ai topi di controllo, sia nell'analisi a breve che in quella a lungo termine.

Tabella 1. Anticorpi antinucleo (ANA) in topi trattati con SA-2

Protocollo di trattamento (dose di SA-2)	giorni dopo trattamento	Gruppi di topi		
		PBS/PBS	DMSO-trattati ^a	SA-2-trattati ^a
Protocollo A (50 µg)	35	23 ± 20	235 ± 60	87 ± 17 *
Protocollo B (50 µg)	35	25 ± 24	387 ± 78	30 ± 10 *
	90	20 ± 18	480 ± 160	373 ± 141
Protocollo B (250 µg)	35	21 ± 13	346 ± 162	20 ± 7 **
	60	22 ± 14	280 ± 114	21 ± 3
	90	20 ± 8	315 ± 178	30 ± 7

^a Topi immunizzati con OVA hanno ricevuto DMSO o SA-2 in accordo ai differenti protocolli come descritto in Materiali e Metodi. Topi PBS/PBS sono stati inclusi come controllo. La titolazione sierica degli ANA è stata effettuata come descritto in Materiali e Metodi a tempi diversi di trattamento. I risultati sono riportati come valori medi (± ES) dell'inverso del titolo. Le differenze significative tra i topi trattati con SA-2 e DMSO sono indicate : *, $p < 0.02$; **, $p < 0.005$

5. DISCUSSIONE

Lo scopo dello studio è stato quello di valutare *in vivo* in modelli murini le capacità immunomodulanti e la sicurezza di impiego di una adenina modificata (chiamata SA-2) e successivamente di un suo analogo (chiamato SA-26E) coniugato ad un allergene (OVA), al fine di individuarne la potenziale applicabilità nell'immunoterapia delle malattie allergiche e dei tumori. Del resto le sempre maggiori acquisizioni sul ruolo del sistema immunitario nel controllo di queste patologie suggeriscono come esso possa essere modulato con varie strategie per potenziarne le sue capacità di difesa antiallergica e antitumorale.

Negli ultimi anni sono state sviluppate differenti strategie terapeutiche riguardanti le DCs, le quali svolgono un ruolo fondamentale nel coordinare la risposta immune. Le cellule dendritiche, infatti, possono differenziare e maturare up-regolando molecole di costimolo e producendo citochine proinfiammatorie (84,85) importanti nella induzione e nel mantenimento della risposta T tumore o allergene-specifica.

Molti studi clinici e preclinici hanno esaminato l'uso di differenti agenti in grado di attivare/maturare le DCs (86). Recentemente la famiglia dei recettori Toll-like (TLRs) è stata identificata come principale sensore delle componenti microbiche in grado di condurre conseguentemente ad una risposta immune innata ed adattiva. Membri diversi di questa famiglia sono largamente espressi da diverse cellule appartenenti al sistema immunitario tra cui proprio le cellule dendritiche, e ciascuna cellula esprime una diversa combinazione di recettori TLRs. In questa

visione, i ligandi dei TLRs rappresentano una promettente classe di sostanze potenzialmente in grado di indurre una risposta immune antiallergica e antitumorale, e pertanto di poter essere utilizzate indipendentemente nell'immunoterapia o come adiuvanti vaccinici. Il nostro studio ha dimostrato che nuovi prodotti di sintesi, rappresentati strutturalmente da adenine modificate, sono in grado di comportarsi da ligandi del TLR7 nel topo (e nell'uomo) portando alla attivazione TLR7-mediata delle cellule dendritiche inducendo la produzione di citochine pro-infiammatorie e regolatorie.

L'utilizzo di SA-2 in un modello murino di asma bronchiale ha permesso di dimostrare le sue capacità di modulazione della risposta immune T, inducendo sia a livello sistemico che tissutale una risposta di tipo Th1, caratterizzata dalla produzione di IFN- γ .

A questo proposito i nostri dati dimostravano come una risposta immune di tipo Th1 fosse inducibile anche con l'utilizzo del coniugato OVA-SA26E in modelli murini di asma bronchiale, dove è emerso un incremento dei livelli di IFN- γ nei surnatanti di cellule MNs ristimolate con l'antigene, a discapito di un decremento di IL-13. Un altro dato che conferma il ripristino di un profilo immunologico di tipo Th1 è espresso dall'elevata produzione di IgG2a nei topi sensibilizzati e trattati con tale coniugato. E' molto importante sottolineare come gli esperimenti di analisi condotti a distanza di circa 6 mesi dal momento del priming con il coniugato, dimostrino una persistenza degli elevati valori di anticorpi Th1-correlati, nonché una netta riduzione di aspetti istologici e funzionali tipici dell'asma bronchiale. Dato che la possibilità di ottenere risposte immuni durature nel tempo

rappresenta un importante elemento della terapia vaccinica, questo dato appare estremamente significativo.

La capacità di questo nuovo ligando sintetico del TLR7 di indurre una attivazione della sistema immunitario anche *in vivo*, è stata inoltre confermata dalla presenza nel siero di topi wild type a 2 ore dalla somministrazione intraperitoneale di SA-2 di significativi livelli di IFN- α , CXCL10, IL-27, IL-6, IL-10. Le citochine e chemochine così indotte, svolgono un ruolo importante nel controllo da parte del sistema immune della flogosi e della crescita tumorale. In particolare si ricorda e sottolinea l'attività antitumorale e pleiotropica dell'IFN- α e l'attività antiangiogenetica della IL-27 e del CXCL10.

Alcuni studi riportano l'utilizzo di ligandi dei TLR7 e 8 nella immunoterapia dei tumori anche come adiuvanti per la messa a punto di vaccini (48). Numerosi agonisti sono già stati testati nei modelli murini utilizzando diverse vie di somministrazione. L'unico trial clinico (87) effettuato ha previsto l'utilizzo di imiquimod quale adiuvante in combinazione con Flt-3 ligand (fattore emopoietico in grado di incrementare il numero di cellule dendritiche circolanti e tissutali) in pazienti con melanoma. L'applicazione locale di imiquimod ha portato ad un incremento della reazione cutanea nei confronti dei peptidi tumorali ed un più alto numero di cellule T circolanti tumore-specifiche (87). Due metodi sono stati descritti in grado di incrementare l'attività adiuvante degli agonisti dei TLR7 e 8 :

- a) la coniugazione con un antigene, b) la combinazione con altri fattori di stimolazione.

In particolare la contemporanea iniezione dell'anticorpo anti-CD40 ha dimostrato un incremento della attività citotossica delle cellule T ed una

riduzione delle metastasi polmonari ed una maggiore protezione ed induzione di cellule memory (88,89). Così come nelle allergie, anche nelle patologie oncologiche il microambiente gioca un ruolo fondamentale nello sviluppo e nel mantenimento delle stesse. Sicuramente studiare la immunomodulazione da parte dei ligandi dei TLR7 e 8 di una risposta Th2/Th17 tipica della lesione cancerosa può essere necessaria per la messa a punto di nuove strategie terapeutiche.

E' stato dimostrato recentemente che cellule iNKT, componenti centrali dell'immunità innata, sono state identificate come le principali produttrici di IL-17 in risposta a stimoli specifici di attivazione tra i quali l'alfa-galactosilceramide (α -GalCer). I dati che abbiamo ottenuto sia *in vitro* che *in vivo* dimostrano la capacità di SA-2 di inibire significativamente la produzione di IL-17 da parte delle cellule iNKT. Nei topi trattati con α -GalCer e Poly I:C, la somministrazione di SA-2 riduce fortemente la sintesi di IL-17, grazie alla capacità di indurre *in vivo* elevati livelli sierici di IFN- α , IL-27 ed IL-10. Tali dati rinforzano ulteriormente il ruolo regolatorio delle adenine modificate sulla risposta immune Th2 e Th17 proprie sia della flogosi allergica che di quella tumorale.

Recentemente è stata suggerita un'attività regolatoria delle cellule B naïve e della memoria che producono IL-10 (90,91), così come è stata dimostrata la capacità delle cellule T e B di produrre IL-10 dopo stimolazione con SA-2 *in vivo*. Ciò nonostante l'effetto finale delle cellule B produttrici IL-10 è quello di svincolare la patologia (indipendentemente dal fatto che sia Th1, Th2, o Th17-mediata) da un'attività diretta delle cellule T CD4 + effettrici, da una riduzione del

priming con l'antigene, o dall' incremento di cellule T produttori IL-10 (91,92). Questo dato è perfettamente in accordo anche con la dimostrazione della non capacità di SA-2 di favorire la comparsa di autoanticorpi *in vivo*. Infatti la somministrazione dei ligandi di TLR7 descritti in questo lavoro, non si è associata ad effetti collaterali particolari e non ha impattato sulla curva di sopravvivenza degli animali trattati. Uno dei rischi riportati in letteratura per l'uso dei TLR7 e 8 ligandi, è quello dell'induzione di fenomeni di autoimmunità. In particolare, è stato recentemente dimostrato che segnali TLR7-mediati possono essere coinvolti nella patogenesi del LES e nella generazione di autoanticorpi in topi esposti LES-proni (93,94). Come riportato da Krieg e Vollmer (95) non vi sono casi descritti di autoimmunità sistemica dopo applicazione locale di imiquimod, ma solo fenomeni locali (vitiligine e pemfigo).

I dati ottenuti nei nostri animali (strain non autoimmune) non mostrano alcuna induzione di autoreattività da parte del trattamento con SA-2 anche dopo molti giorni (fino a 90 gg) ed in entrambi i protocolli (preventivo e terapeutico) utilizzati. Addirittura si evidenzia una riduzione del titolo degli anticorpi antinucleari nel siero di topi trattati con SA-2.

In conclusione, la capacità delle adenine modificate di inibire sia la risposta Th2 che Th17 senza indurre fenomeni autoreattivi e la possibilità di costituire coniugati stabili adenina-allergene rende questi composti sintetici come ottimi candidati per la creazione di nuovi vaccini per le malattie allergiche e oncologiche.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Akira S. et Hemmi H. 2003. Akira S. and Hemmi H.. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol. Lett.* 2003; 85, 85-95.
2. Medzhitov R. et al. 1997. Medzhitov R., Preston-Hurlburt P. and Janeway CA Jr.. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388, 394-397.
3. Barton GM. et al. 2002. Barton GM., Medzhitov R.. Control of adaptive immune responses by Toll-like receptors. *Curr. Opinion Immunol.* 2002; 14, 380-383.
4. Abbas AK. et al. 2001. Abbas AK., Lichtman AH., Pillai S.. *Immunologia cellulare e molecolare*. Elsevier, ristampa 2011; 19-26.
5. Kawai T. et al. 2009. Kawai T., Akira S.. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Internat. Immunol.* 2009; 21, 317-337.
6. Beutler BA. 2009. Beutler BA.. TLRs and innate immunity. *Blood* 2009; 113, 1399-1407.
7. Miggin SM. e O'Neill LA. 2006. Miggin SM., O'Neill LA.. New insights into the regulation of TLR signalling. *J. Leukoc. Biol.* 2006; 80, 220-226.
8. Pasare C. e Medzhitov R. 2005. Pasare C. and Medzhitov R.. Control of B-cell responses by Toll-like receptors. *Nature* 2005; 438, 364-368.
9. Liew FY. et al. 2005. Liew FY., Xu D., Brint EK., O'Neill LA.. Negative regulation of Toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat. Rev.*

Immunol. 2005; 5, 446-458.

10. Smits EL, Ponsaerts P, Berneman ZN, Van Tendeloo VF. The use of TLR7 and TLR8 ligands for the enhancement of cancer immunotherapy. *Oncologist* 2008;13(8):859-75
11. Miller RL et al Immunomodulation as a treatment strategy for genital herpes: review of the evidence. *Int Immunopharmacol.* 2002;2(4):443-51
12. Spaner DE, Masellis A. Toll-like receptor agonists in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2007;21:53-60
13. Tomai MA, Gibson SJ, Imbertson LM, Miller RL, Myhre PE, Reiter MJ, Wagner TL, Tamulinas CB, Beaurline JM, Gerster JF, et al. Immunomodulating and antiviral activities of the imidazoquinoline S-28463. *Antiviral Res.* 1995;28(3):253-64.
14. Burns RP Jr et al The imidazoquinolines, imiquimod and R848 induce functional but no phenotypic maturation of human epidermal Langerhans' cells. *Clin Immunol* 2000;94:13-23
15. Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, Horiuchi T, Tomizawa H, Takeda K, Akira S. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol.* 2002;3(2):196-200.
16. Jurk M, Heil F, Vollmer J et al. Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat Immunol* 2002;3:499
17. Pope BL, Chourmouzis E, Lee S, Goodman MG. Enhancement of immunostimulatory activity by dual substitution of C8-substituted guanine

- ribonucleosides: correlation with increased cytokine secretion. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol.* 1995;17(2):98-108.
18. Heil F, Ahmad-Nejad P, Hemmi H et al. The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur J Immunol* 2003;33:2987–2997
 19. Lee J, Chuang TH, Redecke V et al. Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: Activation of Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:6646–6651
 20. Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H et al. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 2004;303:1529–1531.
 21. Diebold SS, Massacrier C, Akira S et al. Nucleic acid agonists for Toll-like receptor 7 are defined by the presence of uridine ribonucleotides. *Eur J Immunol* 2006;36:3256–3267.
 22. Kariko K, Buckstein M, Ni H et al. Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: The impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity* 2005;23:165–175.
 23. Robbins M, Judge A, Liang L et al. 2'-O-methyl-modified RNAs act as TLR7 antagonists. *Mol Ther* 2007;15:1663–1669.
 24. Romagnani S, Matucci A, Rossi O L'asma bronchiale. Dagli aspetti patogenetici alle applicazioni diagnostiche, terapeutiche e di prevenzione SEE-Editrice Firenze 2004
 25. Kim HY DeKruyff RH, Umetsu DT The many paths to asthma: phenotype

shaped by innate and adaptive immunity *Nature immunology* 2010, 11: 577-584

26. Romagnani S Human Th17 cells *Arthritis Research & Therapy* 2008, 10:206
27. Goriely S, Cavoy R, Goldman M Interleukin-12 family members and type I interferons in Th17-mediated inflammatory disorders *Allergy* 2009; 64: 702–709
28. Bullens DM, Truyen E, Coteur L, et al. IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx? *Respir Res* 2006, 7:135.
29. Canessa C, Vierucci A e Azzari C Cellule Th17 nella patologia umana: buone o cattive? *Rivista di Immunologia e Allergologia Pediatrica* 01/2010: 19-26
30. Schnyder-Candrian S, Togbe D, Couillin I, et al. Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma. *J Exp Med* 2006, 203:2715-25.
31. Nakae S, Komiyama Y, Nambu A, Sudo K, Iwase M, Homma I, Sekikawa K, Asano M, Iwakura Y Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppressing of allergic cellular and human responses *Immunity* 2002; 17:375-387.
32. Kawaguchi M, Onuchic LF, Li XD, Essayan, DM, Schroeder J, Xiao HQ, Liu MC, Krishnaswamy G, Germino G, Huang SK Identification of a novel cytokine, ML-1, and its expression in subjects with asthma *J. Immunol.*, 2001, 167, 4430-5.
33. Hizawa N, Kawaguchi M, Huang SK, et al. Role of interleukin-17F in chronic

inflammatory and allergic lung disease. *Clin Exp Allergy* 2006; 36:1109-14.

34. Kawaguchi M, Kokubu F, Fujita J, Huang SK, Hizawa N Role of Interleukin-17F in Asthma *Inflammation & Allergy - Drug Targets*, 2009, 8, 383-389.
35. Kawaguchi M, Takahashi D, Hizawa N, et al. IL-17F sequence variant (His161Arg) is associated with protection against asthma and antagonizes wild-type IL-17F activity *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:795-801.
36. Wakashin H, Hirose K, Maezawa Y, Kagami S, Suto A, Watanabe N, Saito Y, Hatano M, Tokuhisa T, Iwakura Y, Puccetti P, Iwamoto I and Nakajima H IL-23 and Th17 cell enhance Th2-cell-mediated eosinophilic airway inflammation in mice *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178: 1023-1032.
37. Hiroshi N and Koichi H Role of IL-23 and Th17 Cells in Airway Inflammation in Asthma *Immune network* 2010 10:1-4
38. Cosmi L, Maggi L, Santarlaschi V, Capone M, Cardilicchia E, Frosali F, Querci V, Angeli R, Matucci A, Fambrini M, Liotta F, Parronchi P, Maggi E, Romagnani S e Annunziato F Identification of a novel subset of human circulating memory CD4+ cells that produce both IL-17A and IL-4 *Mechanisms of allergy and clinical immunology* 2010; 125:222-230.
39. Rosenberg SA. Progress in human tumor immunology and immunotherapy. *Nature* 2001;411:380-384
40. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 2001;410:1107-1111

41. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunodediting. *Ann Rev Immunol* 2004;22:329-360
42. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, et al. Intratumoral T cells, recurrence and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 2003; 348:203-213
43. Croci DO, Zacarias Fluck MF, Rico MJ, Matar P, Rabinovich GA, Scharovsky OG. Dynamic cross-talk between tumor and immune cells in orchestrating the immunosuppressive network at the tumor microenvironment. *Cancer Immunol Immunother* 2007; 56:1687-1700
44. Rivoltini L, Carrabba M, Huber V, Castelli C, Novellino L, Dalerba P, Mortarini R, Arancia G, Anichini A, Fais S, Parmiani G. Immunità to cancer: attack and escape in T lymphocyte-tumor cell interaction. *Immunol Rev* 2002;188:97-113
45. Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:295-307
46. O'Neill LA. The interleukin-1/receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. *Immunol Rev* 2008;226:10-8
47. Rakoff-Nohoum S. and Medzhitov R. Toll-like receptors and cancer. *Nat Rev Cancer* 2009;9:57-63
48. Smits EL, Ponsaerts P, Berneman ZN, Van Tendeloo VF. The use of TLR7 and TLR8 ligands for the enhancement of cancer immunotherapy. *Oncologist* 2008;13(8):859-75
49. Garay R et al. Cancer relapse under chemotherapy why TLR2/4 receptor

agonist can help. *Eur J Pharmacol* 2007;563:1-17

50. Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1983 *Clin Orthop. Relat. Res* 1991;3-11
51. Krieg AM. Development of TLR9 agonists for cancer therapy. *J Clin Invest* 2007;117:1184-1194
52. Okamoto M et al. Mechanism of anticancer host response induced by OK-432, a streptococcal preparation, mediated by phagocytosis and Toll-like receptor 4 signalling. *J Immunother* 1997;29:78-86
53. Chicoine MR et al. The in vivo antitumoral effects of lipopolysaccharide against glioblastoma multiforme are mediated in part by Toll-like receptor 4. *Neurosurgery* 2007;60:372-380
54. Sfrondini L et al, Antitumor activity of the TLR5 ligand flagellin in mouse models of cancer. *J Immunol* 2006;176:6624-6630
55. Stockfleth E et al. The use of Toll-like receptors-7 agonist in the treatment of basal cell carcinoma: an overview. *Br J Dermatol* 2003;149(suppl 66)53-56
56. Spaner DE, Masellis A. Toll-like receptor agonists in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2007;21:53-60
57. Carpentier et al Phase I trial of a CpG oligodeoxynucleotide for patients with recurrent glioblastoma. *Neuro Oncol* 2006;8:60-66
58. El Andaloussi A et al. Stimulation of TLR9 with CpG ODN enhances apoptosis of glioma and prolongs the survival of mice with experimental brain tumors. *Glia* 2006;54:526-535

59. Haimovitz-Friedman A et al. Lipopolysaccharide induces disseminated endothelial apoptosis requiring ceramide generation. *J Exp Med* 1997; 186:1831-1841
60. Noguerras S et al. Coupling of endothelial injury and repair. An analysis using an in vivo experimental model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;294:703-713
61. Apethoh L et al. Toll-like 4 dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nature Med* 2007;13:1050-1059
62. Yusuf N Protective role of Toll-like receptor 4 during the initiation stage of cutaneous chemical carcinogenesis. *Cancer Res* 2008;68:615-622
63. Broering R et al. Toll-like receptor stimulated non parenchymal liver cells can regulate hepatitis C virus replication *J Hepatol* 2008;48:914-922
64. Wu J et al. Toll-like receptor-mediated control of HBV replication by non parenchymal liver cells in mice. *Hepatology* 2007;46:1769-1778
65. Dolganiuc A et al. Hepatitis C core and non structural proteins trigger toll-like receptor 2-mediated pathway and inflammatory activation. *Gastroenterology* 2004;127:1513-1524
66. Zarembka KA, Godowski PJ. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNA in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol* 2002; 168:554-561
67. Ito T, Amakawa R, Kaisho T et al. Interferon-alpha and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic

cell subsets. *J Exp Med* 2002; 195:1507-1512

68. Gibson SJ, Lindh JM, Riter TR et al. Plasmacytoid dendritic cells produce cytokines and mature in response to the TLR7 agonists, imiquimod and resiquimod. *Cell Immunol* 2002; 218:74-86
69. Bishop GA, Ramirez LM, Baccam M et al. The immune response modifier resiquimod mimics CD40-induced B cell activation. *Cell Immunol* 2001;208:9-17
70. Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S et al. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 2002; 168:4531-4537
71. Ambach A, Bonnekoh B, Nguyen M et al. Imiquimod, a Toll-like receptor-7 agonist, induces perforin in cytotoxic T lymphocytes in vitro. *Mol Immunol* 2004; 40:1307-1314
72. Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: Moving beyond current vaccines. *Nat Med* 2004; 10:909-915
73. Wille-Reece U, Flynn BJ, Lore K et al. Toll-like receptor agonists influence the magnitude and quality of memory T cell responses after prime-boost immunization in nonhuman primates. *J Exp Med* 2006; 203:1249-1258
74. Lauzon NM, Mian F, MacKenzie R et al. The direct effects of Toll-like receptor ligands on human NK cell cytokine production and cytotoxicity. *Cell Immunol* 2006; 241:102-112
75. Sawaki J, Tsutsui H, Hayashi N et al. Type 1 cytokine/chemokine production

by mouse NK cells following activation of their TLR/MyD88-mediated pathways. *Int Immunol* 2007; 19:311-320

76. Schon M, Bong AB, Drewniok C et al. Tumor-selective induction of apoptosis and the small-molecule immune response modifier imiquimod. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95:1138-1149
77. Meyer T, Nindl I, Schmook T et al. Induction of apoptosis by Toll-like receptor-7 agonist in tissue cultures. *Br J Dermatol* 2003; 149(suppl 66):9-14
78. Smith EB, Schwartz M, Kawamoto H et al. Antitumor effects of imidazoquinolines in urothelial cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 2007; 177:2347-2351
79. L. Fili, S. Ferri, F. Guarna, S. Sampognaro, C. Manuelli, F. Liotta, L. Cosmi, A. Matucci, A. Vultaggio, F. Annunziato, E. Maggi, A. Guarna, S. Romagnani, P. Parronchi. 2006. Redirection of allergen-specific TH2 responses by a modified adenine through Toll-like receptor 7 interaction and IL-12/IFN release. *J. Allergy Clin. Immunol* 118: 511-517
80. Feng Q, Wei H, Morihara J, Stern J, Yu M, Kiviat N, Hellstrom I, Hellstrom KE. Th2 type inflammation promotes the gradual progression of HPV-infected cervical cells to cervical carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2012 Nov;127(2):412-9. doi: 10.1016/j.ygyno.2012.07.098. Epub 2012 Jul 22.
81. Gnerlich JL, Mitchem JB, Weir JS, Sankpal NV, Kashiwagi H, Belt BA, Porembka MR, Herndon JM, Eberlein TJ, Goedegebuure P, Linehan DC. Induction of Th17 cells in the tumor microenvironment improves survival in a murine model of pancreatic cancer. *J Immunol.* 2010 Oct 1;185(7):4063-71.

doi: 10.4049/jimmunol.0902609. Epub 2010 Aug 30.

82. Akbari O, Stock P, Meyer E. Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med* 2003;9:582–588.
83. Lee KA, Kang M, Lee YS, Kim YJ, Kim DH, Ko HJ et al. A distinct subset of natural killer T cells produces IL-17, contributing to airway infiltration of neutrophils but not to airway hyperreactivity. *Cell Immunol* 2008;251:50–55.
84. Steinman RM and Hemmi H. dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006; 311:17-58
85. Steinman RM. Linking innate to adaptive immunity through dendritic cells. *Novartis Found Symp* 2006; 279:101-109
86. Palucka AK, Ueno H, Fay WJ and Banchereau J. Taming cancer by inducing immunity via dendritic cells. *Immunol Rev* 2007; 220:129-150
87. Shackleton M, Davis ID, Hopkins W et al. The impact of imiquimod, a Toll-like receto-7 ligand (TLR7L), on the immunogenicity of melanoma peptide vaccination with adjuvant FLT-3 ligand. *Cancer Immun* 2004;4:9
88. Warger T, Rechtsteiner G, Schmid B et al. Transcutaneous immunization with imiquimod is amplified by CD40 ligation and results in sustained cytotoxic T lymphocyte activation and tumor protection. *Clin Rev Allergy Immunol* 2007;32:57-66
89. Ahonen CL, Doxsee CL, McGurran SM et al. Combined TLR and CD40 triggering induces potent CD8+ T cell expansion with variable dependence on type I IFN. *J Exp Med* 2004;199:775-784

90. Lampropoulou, V., K. Hoehlig, T. Roch, P. Neves, E. Caldero'n Go'mez, C. H. Sweenie, Y. Hao, A. A. Freitas, U. Steinhoff, S. M. Anderton, and S. Fillatreau. TLR-activated B cells suppress T cell-mediated autoimmunity. 2008. *J. Immunol.* 180: 4763–4773.
91. Fillatreau, S., D. Gray, and S. M. Anderton. Not always the bad guys: B cells as regulators of autoimmune pathology. 2008. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 391–397.
92. Gabrysova', L., K. S. Nicolson, H. B. Streeter, J. Verhagen, C. A. Sabatos-Peyton, D. J. Morgan, and D. C. Wraith. Negative feedback control of the autoimmune response through antigen-induced differentiation of IL-10-secreting Th1 cells. 2009. *J. Exp. Med.* 206: 1755–1767.
93. P. Pisitkun, J.A. Deane, M.J. Difilippantonio, T. Tarasenko, A.B. Satterthwaite, S. Bolland. 2006. Autoreactive B cell responses to RNA-related antigens due to TLR7 gene duplication. *Science.* 312: 1669-1672.
94. M. Ehlers, J.V. Ravetch. 2007. Opposing effects of Toll-like receptor stimulation induce autoimmunity or tolerance. *Trends Immunol.* 28: 74-79.
95. Krieg AM, Vollmer J. Toll-like receptors 7,8 and 9:linking innate immunity to autoimmunity. *Immunol Rev* 2007;220:251-269