



UNIVERSITÀ DI PAVIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

Direttore Chiar.ma Prof.ssa Simona Collina

LAUREA MAGISTRALE A CICLO UNICO IN FARMACIA

*Dinamiche di interazione molecolare dell'Elastasi Neutrofila Umana
nelle patologie polmonari infiammatorie acute e croniche
e valutazione della resilienza inibitoria degli inibitori non-peptidici
Alvelestat e Sivelestat in condizioni di stress ossidativo*

Relatore:
Chiar.ma Prof.ssa Simona Viglio
Dipartimento di Medicina Molecolare

Correlatore:
Dott.ssa Maura D'Amato
Chiar.mo Prof. Pasquale Linciano

Tesi di Laurea Magistrale a Ciclo Unico
Alessia Gatti
Matricola 485869

Anno Accademico 2025/2026

INDICE

1. INTRODUZIONE	p.1
1.1.1 Inquadramento patologico: l'infiammazione neutrofila.....	p.1
1.1.2 Le trappole extracellulari dei neutrofili (NETs).....	p.4
1.2 L'Elastasi Neutrofila Umana (HNE)	p.7
1.2.1 Struttura dell'HNE	p.7
1.2.2 Ruolo biologico dell'HNE	p.8
1.2.3 Meccanismo catalitico dell'HNE	p.9
1.3 L' α 1-Antitripsina (AAT) e il suo ruolo come inibitore endogeno dell'HNE.....	p.12
1.3.1 Struttura dell'AAT.....	p.12
1.3.2.1 Il ruolo fisiologico protettivo dell'AAT	p.13
1.3.2.2 Formazione del complesso stabile AAT-HNE in condizioni fisiologiche.....	p.14
1.3.3.1 Compromissione del complesso HNE-AAT in condizioni patologiche: squilibrio proteasi-antiproteasi.....	p.17
1.3.3.2 Lo stress ossidativo e l'ossidazione di AAT	p.21
1.3.3.3 Sequestro di AAT da parte dei NETs	p.23
1.3.4 α 1-Antitrypsin deficiency (AATD).....	p.24
1.4 Inibitori sintetici dell'HNE.....	p.27
1.4.1 Sivelestat	p.30
1.4.1.1 Struttura e meccanismo molecolare.....	p.30
1.4.1.2 Applicazioni cliniche	p.31
1.4.2 Alvelestat.....	p.32
1.4.2.1 Struttura e meccanismo molecolare.....	p.32
1.4.2.2 Applicazioni cliniche	p.33
2. SCOPO DELLA RICERCA.....	p.35
3. MATERIALI E METODI	p.37
3.1 Reagenti	p.37
3.2 Pazienti e campioni.....	p.37

3.3 Dosaggio Proteico con BCA	p.39
3.4 SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)	p.41
3.5 Western Blot	p.43
3.6 Ossidazione in vitro dell'Alfa-1 Antitripsina	p.45
3.7 Purificazione Alfa-1 Antitripsina.....	p.46
3.8 Reverse-Phase High Pressure Liquid Chromatography (RP-HPLC)	p.47
3.9 Digestione Enzimatica In Situ	p.48
3.10 Cromatografia liquida-spettrometria di massa in tandem (LC-MS/MS)	p.49
3.11 Saggi di attività enzimatica.....	p.50
3.12 Saggi di inibizione in presenza di H ₂ O ₂	p.52
3.13 Valutazione mediante spettrometria di massa della stabilità degli inibitori in condizioni ossidative	p.52
3.14 Modellistica molecolare	p.53
3.14.1 Docking molecolare	p.53
3.14.2 Simulazioni di dinamica molecolare.....	p.54
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	p.56
4.1 Analisi dei BALF mediante Western Blotting e LC-MS/MS	p.56
4.1.1 Analisi dei BALF di pazienti con sarcoidosi	p.57
4.1.2 Analisi dei BALF di pazienti con fibrosi polmonare.....	p.60
4.1.3 Analisi dei BALF di pazienti riceventi di trapianto polmonare in follow-up.....	p.62
4.1.4 Analisi dei BALF di pazienti affetti da polmonite grave da Covid-19	p.64
4.2 Studio delle modificazioni ossidative dell'AAT	p.68
4.2.1 Purificazione dell'AAT	p.69
4.2.2 Analisi della AAT purificata tramite RP-HPLC	p.70
4.2.3 Analisi delle modificazioni ossidative della AAT mediante spettrometria di massa.....	p.71

4.3 Studio comparativo degli inibitori sintetici Alvelestat e Sivelestat	p.73
4.3.1 Caratterizzazione strutturale e dinamica delle modalità di legame all'HNE di Sivelestat e Alvelestat attraverso la modellistica molecolare	p.74
4.3.2 Valutazione in vitro del potere inibitorio di Alvelestat e Sivelestat nei confronti di HNE	p.78
4.3.3 Valutazione dell'impatto dello stress ossidativo sull'inibizione di HNE e sulla stabilità enzimatica	p.80
5. CONCLUSIONI	p.87
6. PROSPETTIVE FUTURE	p.90
BIBLIOGRAFIA	p.92

1. INTRODUZIONE

1.1.1 Inquadramento patologico: l'infiammazione neutrofila

I neutrofili sono leucociti polimorfonucleati e rappresentano la prima linea di difesa dell'organismo contro l'invasione di batteri, virus, funghi e protozoi [1,2].

L'infiammazione mediata da neutrofili si articola in una sequenza ordinata di eventi; inizialmente, i neutrofili circolanti aderiscono all'endotelio vascolare attivato, fase a cui segue la loro extravasazione e migrazione verso i focolai infiammatori. Quest'ultima è prevalentemente stimolata da diversi tipi di chemochine, come IL-8 e IL-36 γ . Il processo culmina nella distruzione dei patogeni principalmente mediante fagocitosi, un meccanismo reso altamente efficace dall'azione sinergica di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e di una vasta gamma di composti ad elevata attività microbica. I neutrofili, infatti, vengono rapidamente reclutati dall'immunità innata presso i siti di infezione ed esplicano le proprie funzioni sfruttando meccanismi ossidativi e non. Tra i primi citati è compresa la degranulazione: vescicole intracellulari, definite granuli, vengono rilasciate in maniera controllata, permettendo a quest'ultime di liberare, all'interno del fagosoma o a livello della membrana plasmatica, il proprio contenuto proteico. Quest'ultima condizione può verificarsi nel momento in cui i patogeni non possano essere internalizzati oppure in presenza di un ambiente extracellulare infiammatorio particolarmente intenso [1-4]. La composizione interna dei granuli delinea la loro classificazione. Possiamo distinguere quattro tipologie di granuli:

- I granuli secretori, rilasciati per tutta la durata della vita del neutrofilo, hanno il compito di rifornire i recettori di superficie; contengono proteine plasmatiche e recettori Fc del complemento;
- I granuli terziari, che contengono metalloproteasi della matrice;

-I granuli secondari, che contengono proteine quali lisozima, precatelicidina e lattoferrina;

-I granuli primari, i primi a comparire nel corso della granulopoiesi, segnano la transizione da mieloblasti a promielociti. Detti anche azzurofili, contengono mieloperossidasi (MPO) e diverse proteine caratteristiche [1,5], tra cui le serin-proteasi catepsina G, proteinasi 3, elastasi neutrofila (HNE) e neutrophil serine protease 4 (NSP4); la proteasi enzimaticamente inattiva CAP37 (azurocidina); le defensine e la bactericidal permeability-increasing protein (BPI) [5].

La mieloperossidasi reagisce con H_2O_2 prodotta dalla NADPH ossidasi per generare, attraverso l'ossidazione di cloruro, tirosina e nitrito, acido ipocloroso (HOCl), radicali tirosinici e intermedi reattivi dell'azoto, elementi in grado di distruggere le membrane dei microorganismi. Le serin-proteasi degradano i componenti della matrice extracellulare come elastina, laminina, fibronectina e collagene IV. Alcune proteine granulari hanno funzioni immunomodulatorie: l'azurocidina è chemiotattica per monociti, fibroblasti e cellule T e aumenta la permeabilità vascolare durante l'extravasazione neutrofila, nonostante sia proteoliticamente inattiva a causa di sostituzioni amminoacidiche a livello della triade catalitica [1,2]. La mobilizzazione controllata dei granuli consente al neutrofilo di convertirsi da cellula circolante passiva a effettore dell'immunità innata. Attraverso un'esocitosi regolata i neutrofili rilasciano le proprie proteine citotossiche in modo mirato, indirizzandole principalmente al fagosoma per minimizzare i danni ai tessuti. Queste proteine contribuiscono al *burst* respiratorio, alla generazione di metaboliti ossidativi e alla capacità di eliminare i microorganismi fagocitati [1,2]. È importante sottolineare come determinate patologie polmonari, quali broncopneumopatia ostruttiva cronica (BPCO), sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS) e polmonite severa da COVID-19, siano associate a intensa ipossia locale. Diversi studi *in vitro* hanno

dimostrato che l'ipossia può aumentare la degranulazione come risposta modulata dei neutrofili alla variazione di tensione dell'ossigeno; l'eccessiva attivazione di questo meccanismo è correlata a danni rilevanti diffusi a livello polmonare, a causa della liberazione amplificata di proteine istotossiche e citochine pro-infiammatorie, come documentato per BPCO e bronchiectasie [4,6]. Parallelamente, studi su modelli animali con il marcatore chimico di ipossia tissutale *Hypoxyprobe* hanno dimostrato che l'ipossia prolunga la sopravvivenza dei neutrofili inibendo l'apoptosi. In queste condizioni risultano preservate chemiotassi e fagocitosi, mentre si riduce la capacità di generare il *burst* ossidativo e di uccidere i batteri, come *Staphylococcus aureus* [6,7].

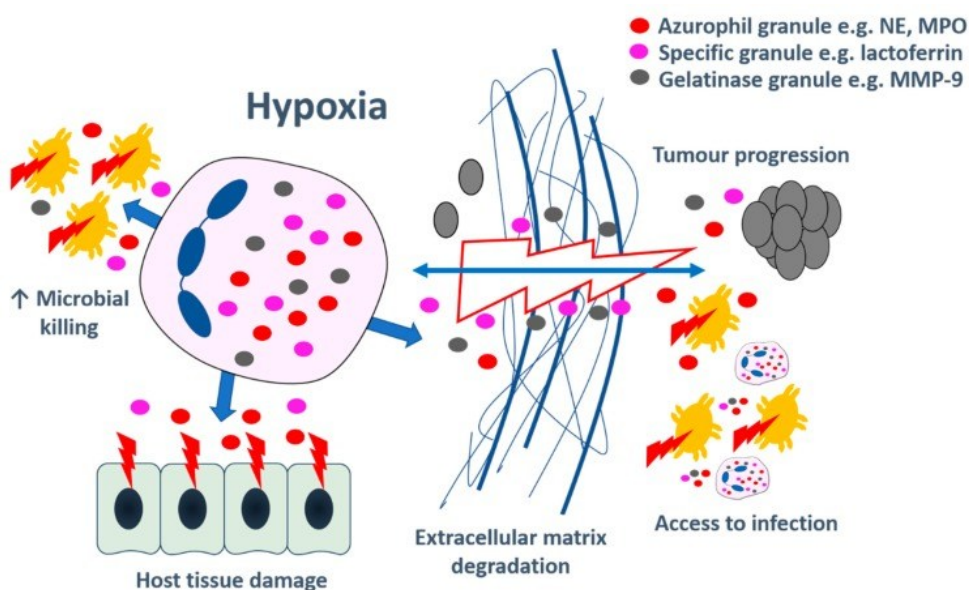


Figura 1. L'ipossia aumenta il rilascio delle diverse tipologie di granuli neutrofili e del loro contenuto. La liberazione amplificata di queste proteine può portare un effetto benefico oppure deleterio, a seconda del contesto [4].

I neutrofili attivati, in sintesi, esercitano risposte infiammatorie complesse, che si rivelano strategie efficaci nella difesa contro il patogeno, ma la cui eccessiva *upregulation* può portare a danni tissutali e sottendere alla patogenesi di svariate malattie polmonari acute e croniche.

Parallelamente ai processi sopra descritti quali la fagocitosi, il *burst* respiratorio con produzione di anione superossido e la degranulazione con rilascio di proteasi, i neutrofili sfruttano un ulteriore meccanismo di deterrenza nei confronti del patogeno, definito NETosi, ovvero la formazione di trappole extracellulari, in cui l'HNE svolge un ruolo di indubbia rilevanza [3,7].

1.1.2 Le trappole extracellulari dei neutrofili (NETs)

La NETosi è un meccanismo controllato di morte cellulare implicato nella risposta antimicrobica neutrofila, che comporta la rottura della membrana plasmatica e la conseguente liberazione di strutture definite *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs) [8]. I NETs sono reti di fibre di cromatina decondensata complessata con proteine granulari e citoplasmatiche ad attività microbica, quali l'elastasi neutrofila (HNE) e la mieloperossidasi (MPO), enzimi ossidanti e α -defensine. In contesti fisiologici, questi elementi operano in modo sinergico per intrappolare ed eliminare i microorganismi invasori, limitandone la diffusione [8,9].

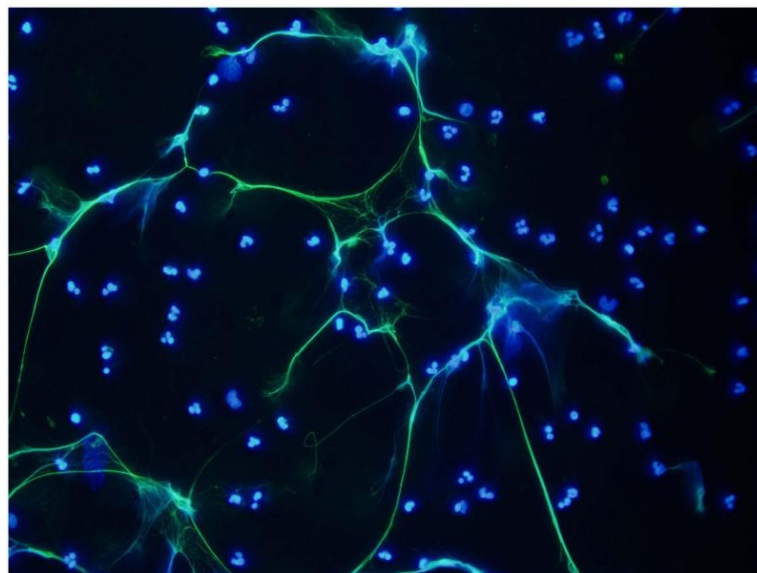


Figura 2. Immagine rappresentativa di NETs indotti in vitro da lipopolisaccaridi (LPS) in granulociti neutrofili umani. È possibile distinguere in verde l'HNE e in blu il materiale nucleare [10].

L'attivazione della NETosi può essere stimolata da una vasta gamma di fattori, tra cui ad esempio le infezioni virali e batteriche, anticorpi e complessi antigene-anticorpo, nonché lo sviluppo di un ambiente extracellulare particolarmente ossidativo, condizione correlata alla produzione di ROS [11]. Innescata dalla via di segnalazione RAF-MEK-ERK, la risposta dei neutrofili comporta il reclutamento del complesso della NADPH ossidasi per la generazione di ROS; tale evento promuove la traslocazione di HNE dai granuli azzurrofilici verso il nucleo, seguita dalla MPO. Una volta penetrate nel compartimento nucleare, entrambe le proteine favoriscono la decondensazione della cromatina attraverso la degradazione proteolitica degli istoni H1 ed H4. Parallelamente, l'enzima peptidilarginina deiminasi 4 (PAD4), altamente espresso nei neutrofili, catalizza la citrullinazione di tre dei quattro istoni *core* del nucleosoma attraverso la conversione di specifici residui di arginina in citrullina. L'attività di questo enzima è regolata dall'incremento della concentrazione di Ca^{2+} intracellulare e dalla produzione di ROS. Una volta completato il processamento della cromatina, avviene la rottura della membrana nucleare e plasmatica con il conseguente rilascio del contenuto nucleare nello spazio extracellulare e la formazione di NETs [8,11,12]. Al termine del processo infiammatorio, le NETs vengono rimosse; queste strutture risultano suscettibili all'azione dell'enzima Dnase1 e i frammenti residui vengono captati dai fagociti e dai macrofagi reclutati nel sito infiammatorio [11]. Sebbene i NETs ricoprano un ruolo protettivo fondamentale per l'immunità innata, una loro eccessiva formazione può risultare dannosa, in particolar modo a livello polmonare, dove il danno può propagarsi rapidamente al parenchima alveolare. I NETs e le molecole ad essi associate, tra cui l'HNE, sono in grado di indurre direttamente la morte delle cellule epiteliali e dei macrofagi alveolari. Per tali ragioni, una disregolazione nella formazione o nella rimozione dei NETs è correlata alla patogenesi di svariate patologie polmonari, inclusa la polmonite grave

da SARS-CoV-2; diversi studi hanno inoltre evidenziato la correlazione tra condizioni infiammatorie prolungate ed eventi avversi tromboembolici, in un contesto più ampio di danno multiorgano e tissutale [9,13].

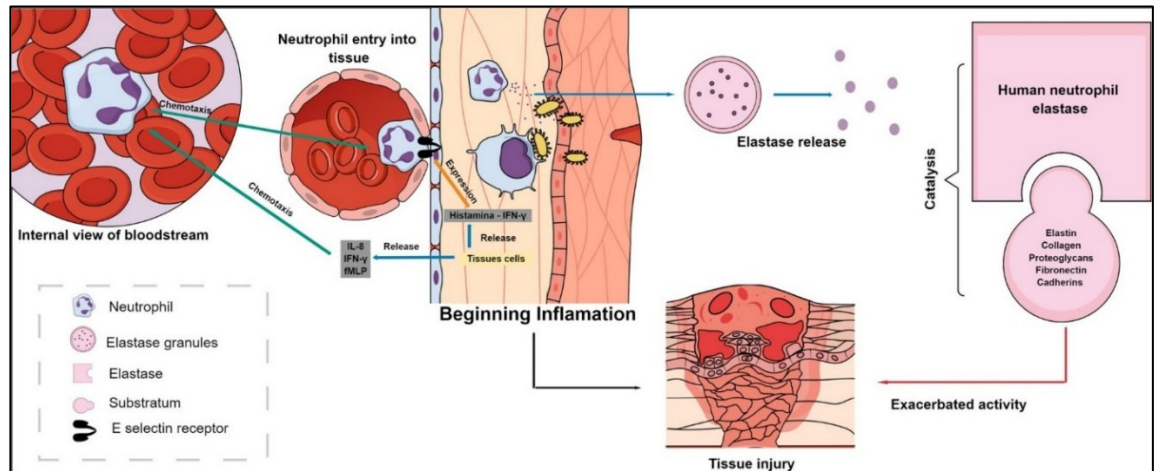


Figura 3. Nella figura viene illustrata la risposta infiammatoria neutrofilo-mediata percorrendo le sue fasi principali. I neutrofili vengono richiamati nel sito di infezione da citochine chemiotattiche come IL-8 o interferone- γ ; l'espressione della E-selectina sulla superficie delle cellule endoteliali permette l'extravasazione (nello specifico la diapedesi) dei neutrofili a livello del tessuto infiammato. Qui i neutrofili vengono attivati, permettendo loro di esplicare la propria funzione attraverso fagocitosi, degranulazione, produzione di ROS e delle NETs: in questa fase finale avviene il rilascio dell'Elastasi Neutrofila [14].

1.2 L'Elastasi Neutrofila Umana (HNE)

1.2.1 Struttura dell'HNE

L'elastasi neutrofila umana (HNE) è una glicoproteina globulare di 29,5 kDa, costituita da una singola catena polipeptidica di 218 aminoacidi. La proteina presenta due siti di N-glicosilazione (Asn95 e Asn144) e la sua struttura terziaria è stabilizzata dalla presenza di quattro ponti disolfuro (Cys42-Cys58, Cys136-Cys145, Cys191-Cys220, Cys168-Cys182). Grazie all'elevato contenuto di residui di arginina, l'HNE possiede spiccate proprietà basiche con un punto isoelettrico (pI) compreso tra 10 e 11 [15,16]. L'HNE è codificata dal gene ELANE (precedentemente noto come ELA2), localizzato nella regione terminale del braccio corto del cromosoma 19 (19p13.3). La sua azione proteolitica è dovuta alla presenza, nel suo sito attivo, di una triade catalitica costituita dai residui amminioacidici His57, Asp102 e Ser195 (Figura 4). La forma attiva dell'HNE è caratterizzata da un dominio N-terminale di attivazione e da loop flessibili che ne regolano l'accesso al sito attivo. La sua attività catalitica può essere modulata dalla presenza di gruppi idrofobici, ovvero inattivata da acidi grassi e attivata da alcoli grassi [15,16].

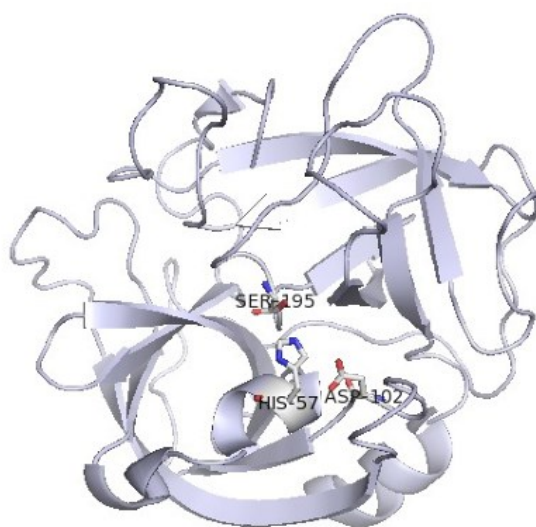


Figura 4. Struttura tridimensionale dell'HNE.

1.2.2 Ruolo biologico dell'HNE

L'HNE è l'endopeptidasi serinica più abbondante nei neutrofili, presente in concentrazioni superiori rispetto alla proteinasi 3, la catepsina G e la proteasi serinica 4 (NSP4). L'enzima è conservato in forma matura all'interno dei granuli azzurrofilari primari ad alte concentrazioni (circa 5,33 mM) ed è presente anche sulla membrana cellulare. A definirne la localizzazione è la serglycina, un proteoglicano con residui di condroitin solfato, che interagisce elettrostaticamente con i residui basici della proteasi. Appartenente alla famiglia delle S1-peptidasi (*chymotrypsin-like*), l'HNE catalizza l'idrolisi di legami peptidici in corrispondenza di amminoacidi neutri non aromatici, il che le conferisce la capacità di degradare una vasta gamma di substrati [12,15]. Dal punto di vista fisiologico, l'HNE è cruciale per la sua attività antimicrobica: citochine, chemochine, fattori dell'infiammazione o stimoli batterici innescano l'attivazione dei neutrofili, la degranulazione e la localizzazione dell'elastasi sulla superficie cellulare, indirizzando la chemiotassi verso il sito di infezione. L'HNE facilita inoltre la migrazione di neutrofili nelle giunzioni cellulari dell'endotelio vascolare, grazie alla degradazione delle molecole di adesione giunzionali [12,15]. All'interno dei fagolisosomi, l'enzima partecipa direttamente alla degradazione proteolitica dei patogeni (specialmente Gram-negativi) in sinergia con peptidi microbici e specie reattive dell'ossigeno (ROS) generate dalla NADPH ossidasi e dalla mieloperossidasi. Nonostante il ruolo protettivo nell'immunità innata, un'attività proteolitica incontrollata dell'HNE determina gravi danni tissutali. A livello polmonare, ciò si traduce nel rimodellamento del parenchima e nel mantenimento di uno stato infiammatorio cronico. Al fine di evitare tale scenario, l'organismo utilizza degli inibitori antiproteasici endogeni in grado di bilanciare adeguatamente la quantità di proteasi attivata e regolarne gli effetti distruttivi. Tuttavia, uno squilibrio

nell'omeostasi protasi-antiproteasi, si traduce in un aumento, a livello polmonare, di HNE libera che, data la sua capacità di scindere proteine della matrice extracellulare, fattori della coagulazione e del complemento e molecole di adesione, la rende protagonista di numerosi quadri patologici [12,15], tra cui la fibrosi cistica, la BPCO, le bronchiectasie, la fibrosi polmonare, la sarcoidosi, l'ARDS, la polmonite grave da SARS.CoV-2 e il danno ischemico da riperfusione post-trapianto [3,12,17-20].

1.2.3 Meccanismo catalitico dell'HNE

Il sito attivo dell'HNE ospita, oltre alla triade catalitica (His57, Asp102 e Ser195), specifici residui amminoacidici che garantiscono il corretto posizionamento del substrato. In particolare, l'enzima presenta una tasca idrofobica di specificità (S1), che accoglie la catena laterale dell'amminoacido (P1) adiacente al legame peptidico da idrolizzare, e un buco ossianionico (*oxyanion hole*) costituito dai gruppi amminici dei residui di Gly193 e Ser195. (Figura 5). Quest'organizzazione strutturale permette il corretto orientamento del substrato e la stabilizzazione degli stati di transizione.

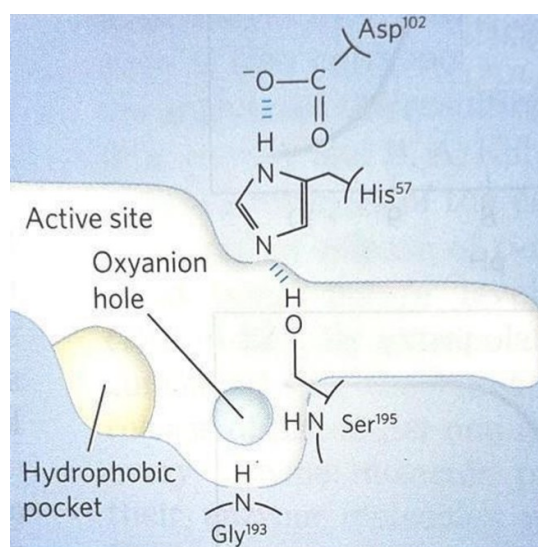


Figura 5. Rappresentazione grafica del sito attivo di HNE

L'idrolisi del legame peptidico avviene sequenzialmente attraverso la formazione di due intermedi tetraedrici, prodotti durante le fasi di acilazione e deacilazione. Inizialmente, l'interazione tra Ser195 e His57 (coadiuvata dall'Asp102) genera sulla serina uno ione alcossido, fortemente nucleofilo, che attacca il gruppo carbonilico del legame peptidico del substrato, generando il primo intermedio tetraedrico acil-enzima. In questa fase, l'ossigeno carbonilico del substrato acquisisce una carica negativa, stabilizzata dai legami idrogeno del buco ossianionico; tali interazioni riducono l'energia dello stato di transizione, accelerando la reazione. Il successivo collasso dell'intermedio è favorito dal trasferimento di un protone dall'His57 all'azoto amminico del legame peptidico, che agisce così da gruppo uscente; ne consegue la rottura del legame peptidico e la formazione dell'intermedio acil-enzima. Successivamente, una molecola d'acqua entra nel sito attivo e viene deprotonata per catalisi basica ad opera della medesima istidina, generando uno ione ossidrile nucleofilo; quest'ultimo attacca il legame estereo dell'acil-enzima, formando il secondo intermedio tetraedrico. Il collasso di quest'ultimo porta alla formazione di un anione carbossilato e al distacco dalla Ser195; l'allontanamento di questo secondo prodotto di reazione ripristina la forma originale e funzionale dell'enzima, rendendo il sito attivo disponibile per un nuovo ciclo catalitico [15,21].

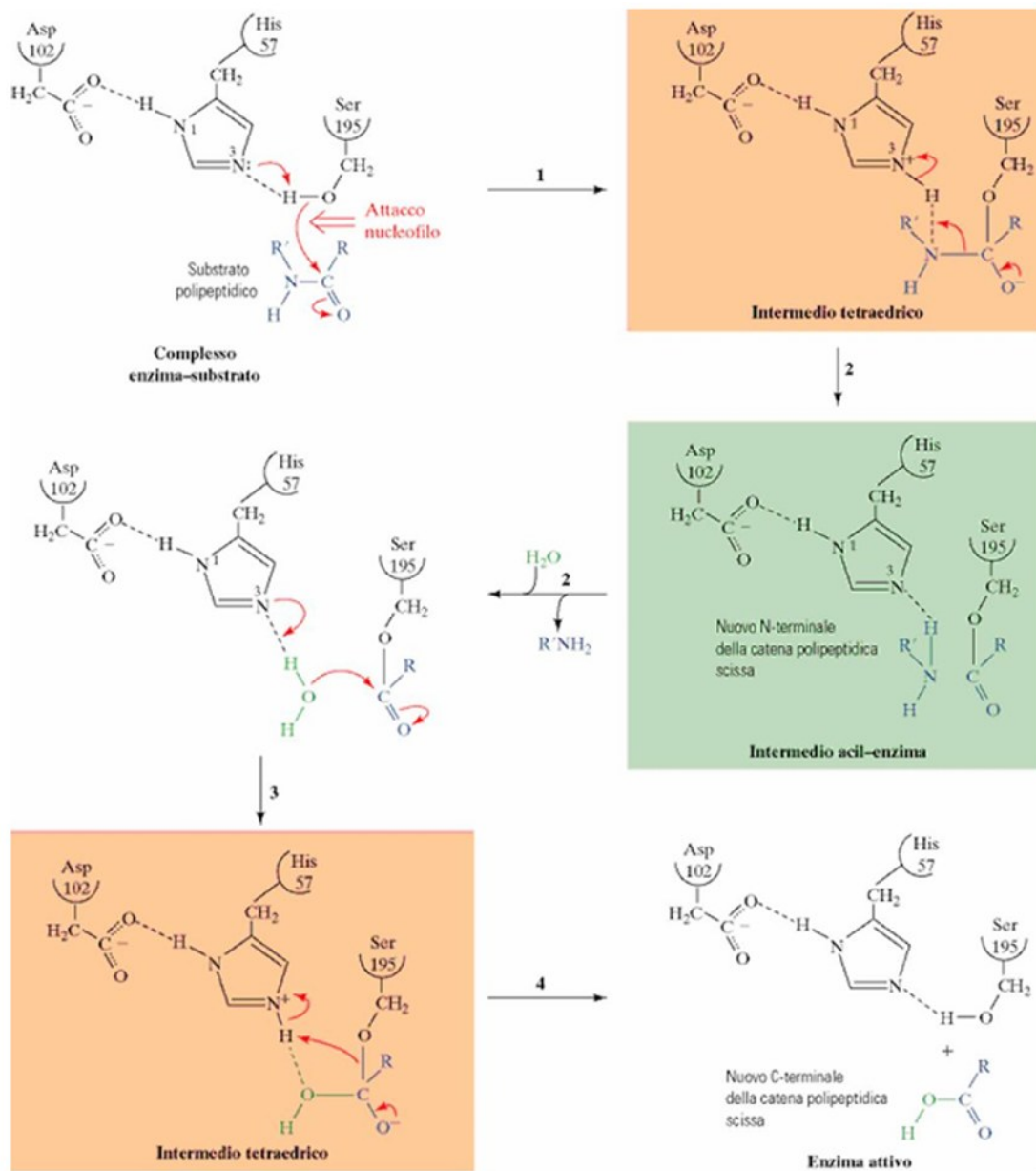


Figura 6. Meccanismo d'azione dell'HNE

1.3 L' α 1-Antitripsina (AAT) e il suo ruolo come inibitore endogeno dell'HNE

1.3.1 Struttura dell'AAT

L' α 1-Antitripsina (AAT) è una glicoproteina a catena singola appartenente alla superfamiglia delle Serpine (*Serine Protease Inhibitors*), codificata dal gene SERPINA1, anche noto come gene Pi, localizzato sul braccio più lungo del cromosoma 14. La proteina ha un peso molecolare di circa 52 kDa, un punto isoelettrico di 5.1 e viene sintetizzata come precursore di 418 amminoacidi, comprendente un peptide segnale N-terminale di 24 residui, la cui rimozione genera la forma attiva composta da 394 amminoacidi. La proteina presenta tre siti di N-glicosilazione (Asn46, Asn83, Asn247) le cui catene glucidiche, composte da N-acetilglucosammina, galattosio, mannosio e acido sialico, sono fondamentali per la stabilità plasmatica e l'emivita della proteina. L'AAT matura assume il caratteristico *folding* serpinico, 360 residui organizzati in tre foglietti- β e nove α -eliche. L'elemento funzionale chiave è il *Reactive Center Loop* (RCL), una porzione di 20 amminoacidi che sporge dal polo superiore della proteina e che contiene il sito di legame specifico P1-P1', identificato nella coppia Met358-Ser359. Il meccanismo di inibizione avviene tramite il riconoscimento del residuo Met358 da parte dell'HNE; l'attacco nucleofilo dell'enzima porta alla clivazione del legame peptidico P1-P1', innescando una drastica riorganizzazione conformazionale. Il RCL si inserisce come sesto filamento nel foglietto- β A, trascinando con sé l'HNE e formando un complesso covalente equimolare (1:1) irreversibile, che ne annulla l'attività catalitica. L'integrità della struttura terziaria è indispensabile per la funzione fisiologica di AAT, poiché alterazioni conformazionali, *misfolding* o polimerizzazione intracellulare ne compromettono l'attività e sono alla

base di una serie di patologie note come serpinopatie, tra cui il deficit di α 1-antitripsina rappresenta la manifestazione clinica più rilevante [22].

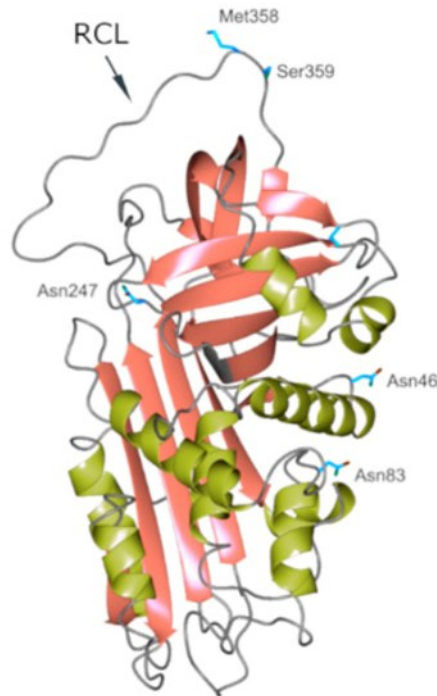


Figura 7. Struttura tridimensionale dell'AAT

1.3.2.1 Il ruolo fisiologico protettivo dell'AAT

L'AAT è una proteina plasmatica di fondamentale rilevanza biologica per il ruolo protettivo che ricopre quale inibitore endogeno di proteasi infiammatorie extracellulari. Sebbene l'AAT presenti un'elevata specificità d'azione nei confronti dell'HNE, è inoltre in grado di neutralizzare diverse altre tipologie di proteasi, tra cui la Cathepsina G, la proteinasi 3, le metalloproteasi di matrice, le cistein-proteasi e le aspartico-proteasi [22,23]. La sintesi di AAT avviene principalmente negli epatociti e, in misura minore, nei monociti e nelle cellule epiteliali bronchiali. Una volta rilasciata nel circolo ematico, la proteina diffonde nei tessuti esercitando un'azione protettiva diffusa contro i danni di natura proteolitica.

L'AAT viene considerata una proteina di fase acuta, riflettendo la sua partecipazione attiva nei meccanismi di regolazione della risposta immunitaria. Stimoli infiammatori sistemici possono determinare l'aumento della sua concentrazione plasmatica fino al raggiungimento di valori superiori a 4 volte il *range* standard, compreso tra 0.92.3 g/L. Al di là del suo canonico ruolo di antiproteasi, l'AAT è in grado di modulare risposte infiammatorie innate e adattative, quali l'inibizione dei *pathways* apoptotici, di influenzare l'attivazione di cellule immunitarie come il fattore di trascrizione Nuclear Factor-Kappa B (NF-kB) e di influire sulla produzione di citochine, nonché sull'equilibrio tra mediatori proinfiammatori e antiinfiammatori.

L'AAT promuove inoltre, l'induzione e la stabilizzazione di cellule T regolatorie e pare coinvolta nell'attivazione della protein fosfatasi 2A (PP2A) nei leucociti infiammatori, contribuendo all'inibizione di chinasi implicate nella trasduzione di segnali proinfiammatori. La sinergia di tali effetti risulta determinante nel circoscrivere la lesione tissutale e nel consolidare la funzione citoprotettiva dell'AAT in contesti di stress ossidativo. Tali evidenze hanno generato un crescente interesse verso l'impiego terapeutico di AAT anche nel contesto della trapiantologia cellulare e d'organo. In questo ambito il danno infiammatorio e immunomediato, tipico della riperfusione ischemica (IRI), rappresenta infatti una delle principali determinanti del rigetto precoce o del fallimento dell'innesto [23].

1.3.2.2 Formazione del complesso stabile AAT-HNE in condizioni fisiologiche

Il meccanismo molecolare alla base della formazione del complesso AAT-HNE è riconducibile alla cosiddetta “inibizione suicida”, basata su un modello cinetico sequenziale di tipo *mousetrap*. I residui critici Met358-

Ser359 del RCL dell'AAT vengono riconosciuti e attaccati dal sito attivo dell'HNE. La scissione del legame peptidico nel sito reattivo P1-P1' determina il rilascio del residuo P1' e del peptide C-terminale, con la contestuale formazione di un legame estere tra il carbonio carbonilico della Met358 e il gruppo ossidrilico della Ser195 (Figura 8) [23].

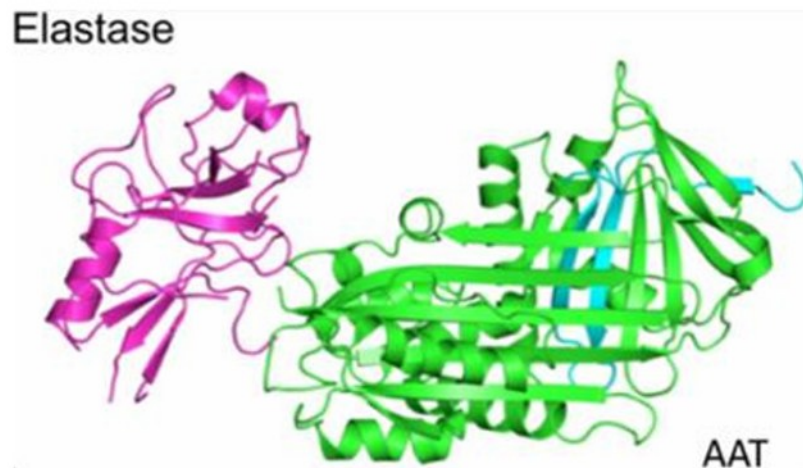


Figura 8. Struttura molecolare del complesso HNE-AAT [24]

La generazione dell'intermedio acil-enzima innesca l'inserimento dell'RCL come sesto filamento aggiuntivo nel foglietto β A, inducendo una profonda riorganizzazione conformazionale. Questa modificazione è caratterizzata dalla transizione di AAT da uno stato tensionato metastabile, con temperatura di fusione (T_m) di circa 55 °C, ad uno stato più rilassato e iperstabile, con T_m superiore ai 120°C, determinando un ribaltamento strutturale tra i poli della molecola [23,25]. Tale riassetto strutturale aumenta la stabilità termica della serpina e stabilizza l'intermedio acilico, impedendo la deacilazione del complesso. Nel dettaglio, la scissione dell'ansa reattiva provoca l'allontanamento repentino delle estremità clivate verso i poli opposti della proteina.

Dopo la formazione di un complesso iniziale non covalente, l'attacco nucleofilo della Ser195 sul carbonio carbonilico della Met358 genera il legame estere: questo spostamento forzato schiaccia la proteasi, inducendo la perdita di circa il 40% della sua struttura ordinata [23,25]. La serina catalitica della proteasi, ancorata all'ansa della serpina e trascinata durante il riassetto conformazionale, viene di fatto strappata dalla sua posizione all'interno della triade catalitica. La lunghezza limitata dell'ansa clivata (17 residui aminoacidici), crea una sovrapposizione sterica che distorce ulteriormente l'HNE, interrompendo la rete di legami a idrogeno essenziale per l'idrolisi dell'intermedio. L'irreversibilità di questo legame consente un'inibizione completa, fondamentale per il controllo fisiologico dei *pathways* proteolitici elastasici [25]. Il complesso AAT-HNE risultante presenta un peso molecolare di circa 80 kDa [22].

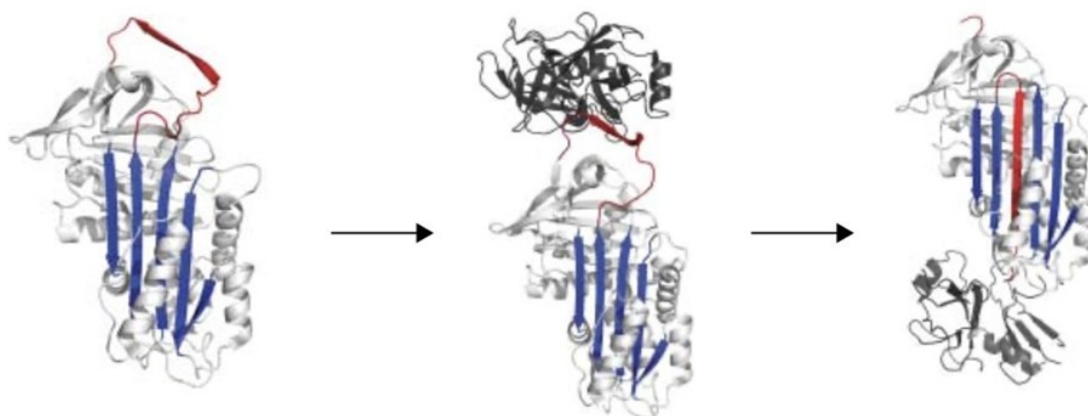


Figura 9. In rosso viene evidenziato il loop del sito reattivo dell'AAT, in grigio scuro l'HNE e in blu il foglietto β . Questo cambiamento conformazionale rende iperstabile la molecola di AAT; l'energia rilasciata da tale processo viene impiegata inoltre per deformare il sito attivo dell'HNE, vincolandola in un complesso irreversibile. [26]

1.3.3.1 Compromissione del complesso HNE-AAT in condizioni patologiche: squilibrio proteasi-antiproteasi

In un sistema biologico in equilibrio, l'attività dell'HNE è regolata dall'AAT attraverso la formazione di un complesso stechiometrico 1:1 stabile e irreversibile. Tuttavia, la letteratura [22,23,25] e le evidenze sperimentali preliminari indicano che, in contesti di infiammazione acuta o cronica, tale omeostasi può fallire, portando a una sovraespressione dell'attività elastasica che supera la capacità inibitoria del polmone. In particolare, studi preliminari [27] condotti presso il laboratorio in cui ho svolto il mio lavoro di tesi, hanno evidenziato differenze biochimiche sostanziali tra diverse patologie polmonari. L'analisi dei BALf di pazienti affetti da COVID-19 (figura 10) ha infatti dimostrato come l'AAT sia presente in forma libera (banda a 52 kDa) ma funzionalmente inattiva (*lanes 1 e 3*); l'aggiunta di HNE esogena non porta infatti alla formazione del complesso inibitorio a 80 kDa (*lanes 2 e 4*). Questo fenomeno suggerisce una severa compromissione strutturale o chimica della proteina, rendendola incapace di sequestrare l'enzima nonostante la sua presenza fisica nel sito del danno. Al contrario nei campioni di BALf provenienti da pazienti affetti da sindrome da bronchiolite obliterante (BOS) si osserva un profilo differente: l'AAT non solo forma il complesso stechiometrico 1:1 con l'HNE (*lanes 5 e 7*) ma mantiene la capacità di inibire ulteriore HNE addizionata ai campioni (*lanes 6 e 8*).

Tale scenario pone le basi per l'ipotesi sperimentale di questo lavoro di tesi: comprendere se l'inattivazione dell'AAT sia legata a modificazioni post-traduzionali (come l'ossidazione) e valutare l'efficacia di inibitori sintetici alternativi laddove il sistema endogeno risulti irrimediabilmente compromesso.

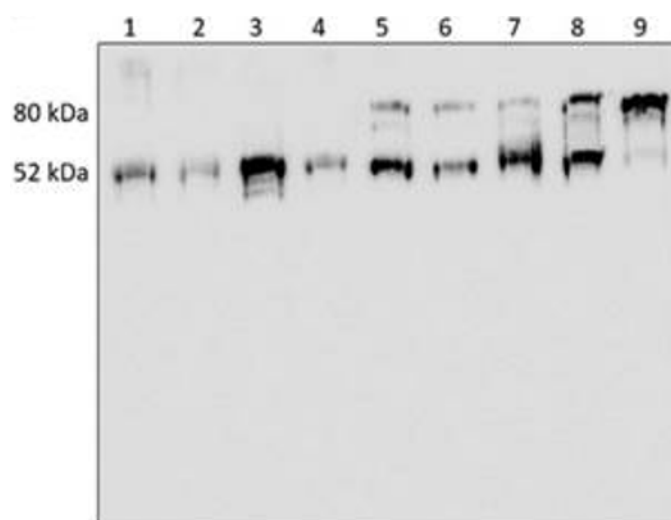


Figura 10. Western blot con anticorpo anti-AAT

Analisi condotte tramite doppia rilevazione immunologica con anticorpi specifici anti-AAT e anti-HNE hanno permesso inoltre di evidenziare nei campioni COVID-19 la presenza di HNE in forma libera (banda a 37 kDa, come mostrato in figura 11). La convergenza di queste evidenze sperimentali ha permesso di delineare l'ipotesi di una marcata disfunzione del meccanismo inibitorio suicida dell'AAT. Tale deficit funzionale, pur in presenza di una concentrazione proteica apparentemente adeguata, determina un microambiente polmonare cronicamente esposto all'azione proteolitica incontrollata dell'elastasi.

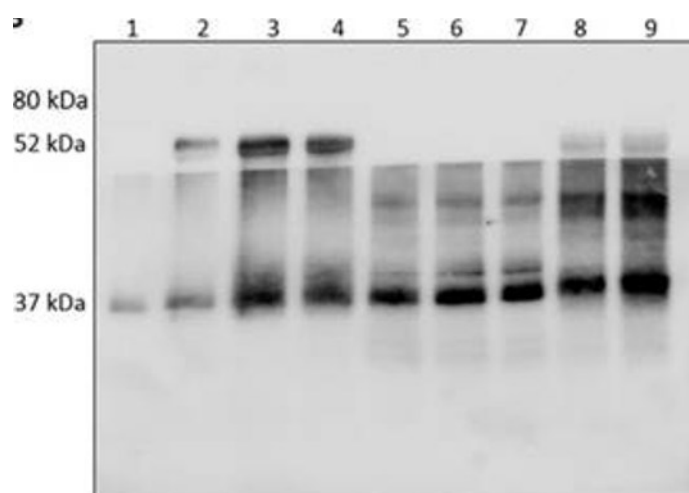


Figura 11. Western blot con anticorpi anti-AAT e anti-HNE

Tra le cause più accreditate di tale deficit funzionale, ricoprono un ruolo cardine l'ossidazione, con conseguente inattivazione, dell'AAT e il suo sequestro da parte dei NETs [27]. L'HNE in eccesso, non più soggetta a regolazione, agisce a livello polmonare influenzando numerosi processi. L'HNE in eccesso, non più regolata, esercita un pleiotropismo funzionale distruttivo che alimenta un circolo vizioso pro-infiammatorio attraverso diversi meccanismi.

Da una parte, infatti, l'HNE compromette la maturazione delle cellule dendritiche derivanti dai monociti, impedendo loro di attivare la proliferazione dei linfociti e la produzione di citochine in risposta all'antigene [12].

Parallelamente, l'attività non regolata dell'HNE compromette l'integrità funzionale dell'apparato respiratorio agendo su molteplici fronti a partire dall'alterazione della *clearance* mucociliare. La proteasi, infatti, contribuisce all'*up-regulation* delle mucine gel-formanti, in particolare MUC5AC, fondamentali per eliminare microbi ed inquinanti attraverso il trasporto mucociliare, ma la cui aumentata espressione porta ad iperconcentrazione di muco, mucostasi e conseguente ostruzione delle vie aeree. A questo quadro si aggiunge un marcato rimodellamento epiteliale dovuto alla metaplasia delle cellule caliciformi, che altera la normale composizione dell'epitelio ciliato riducendo l'efficienza del trasporto meccanico. Infine, l'HNE compromette l'idratazione del liquido di superficie delle vie aeree (ALF) degradando il canale del cloro CFTR e attivando il canale del sodio ENaC; lo squilibrio idroelettrolitico che ne deriva riduce drasticamente il volume dell'ALF, rendendo il muco eccessivamente disidratato e difficilmente espellibile, alimentando così il danno ostruttivo.

Oltre al danno a livello delle vie aeree, l'HNE degrada proteine della matrice extracellulare (ECM), quali il collagene, la fibronectina, i proteoglicani. e, in particolar modo, l'elastina, elemento strutturale

portante per il parenchima alveolare e le pareti vascolari. La proteolisi incontrollata dell'elastina conduce inevitabilmente alla perdita del ritorno elastico polmonare e all'insorgenza di enfisema. La degradazione dell'ECM induce il rilascio di TGF- β 1 (*transforming growth factor β*), un fattore pro-fibrotico che contribuisce all'ispessimento della membrana basale e alla fibrosi tissutale.

Infine, l'attività proteasica agisce sulle cellule epiteliali attraverso diversi *pathways*, collegati al rilascio di citochine pro-infiammatorie (IL-1 β , IL-6 e TNF- α), chemochine (CXCL1, CXCL8 e CCL) e metalloproteinasi della matrice (MMP-2 e MMP-9). L'HNE è inoltre in grado di degradare proteine contenenti gruppi eme nello spazio extracellulare; il conseguente rilascio di ferro libero, una volta captato dalle cellule catalizza la produzione di ROS, alimentando uno stato di stress ossidativo intracellulare.

Attraverso questa complessa rete di interazioni, l'HNE assume un ruolo centrale all'interno di un ciclo vizioso di segnali pro-infiammatori e accumulo di cellule danneggiate, manifestando un pleiotropismo funzionale cruciale per l'evoluzione di un quadro patologico polmonare di natura infiammatoria cronica ed acuta [12, 28].

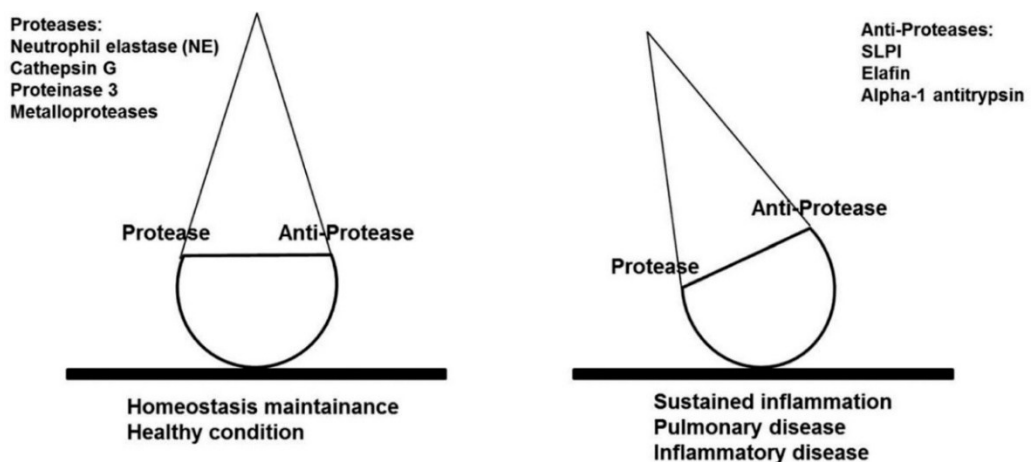


Figura 12. Schema rappresentativo dello sbilancio proteasi-antiproteasi nel contesto polmonare [15]

1.3.3.2 Lo stress ossidativo e l'ossidazione di AAT

Contestualmente a gravi infezioni virali o a patologie infiammatorie croniche delle vie aeree, la sovraespressione di HNE e la tempesta citochinica pro-infiammatoria generano un microambiente parenchimale estremamente ipossico. Tale scenario è correlato al conseguente rilascio di grandi quantità di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e dell'azoto (RSN) [29]. Nelle cellule ipossiche, lo squilibrio tra il flusso di elettroni provenienti dalle molecole combustibili e l'accettore finale (O_2) a livello della catena respiratoria mitocondriale, è alla base dell'aumento di tali specie reattive. Bassi livelli di ossigeno stimolano la sintesi del fattore inducibile da ipossia 1 (HIF-1), responsabile dell'*up-regulation* di enzimi glicolitici e dell'attivazione di *pathways* metabolici finalizzati a inibire la formazione di ROS. Tuttavia, in condizioni di infiammazione severa questi meccanismi antiossidanti protettivi vengono prevaricati dalla produzione di ROS, che non potendo essere adeguatamente rimossi o neutralizzati, determinano l'instaurarsi di un marcato sbilanciamento redox. Lo stress ossidativo generatosi è in grado di danneggiare componenti cellulari essenziali come proteine, carboidrati, lipidi di membrana, DNA e RNA.

Tra i ROS più rilevanti si annoverano l'anione superossido (O_2^-), il perossido di idrogeno (H_2O_2), il radicale idrossile ($HO^\cdot$), l'ossigeno singoletto (1O_2) e l'ozono (O_3). Tra gli RNS il più abbondante risulta essere l'ossido nitrico ($NO^\cdot$) che, a sua volta, può reagire con l'anione superossido per generare specie radicaliche altamente citotossiche come l'anione perossinitrito ($ONOO^-$) [30,31]. In questo microambiente reattivo, l'AAT subisce modificazioni post-traduzionali ossidative indotte sia da fattori esogeni (fumo di sigaretta) sia da fattori endogeni (mieloperossidasi rilasciata dai granulociti neutrofili).

L'ossidazione colpisce selettivamente i residui di metionina, che vengono convertiti in metionina solfossido. Sebbene diversi residui possano essere interessati, l'impatto clinico e biochimico maggiore si osserva su Met351 e, soprattutto, Met358 (Figura 13), situati nel cuore del *Reactive Center Loop* (RCL). La Met358 occupa la posizione chiave P1: la sua ossidazione impedisce il corretto allineamento dell'RCL e, di conseguenza, il riconoscimento del legame peptidico Met358-Ser359 da parte del sito attivo dell'HNE, causando la perdita dell'attività inibitoria dell'AAT e la mancata formazione del complesso covalente. Mentre l'ossidazione di altri residui di metionina può influenzare la flessibilità strutturale della proteina, quella di Met358 è la causa diretta della perdita della funzione antiproteasica. Per tali motivi, le forme ossidate di AAT rappresentano un *biomarker* ideale per la valutazione dello stress ossidativo sistemico in pazienti affetti da gravi patologie polmonari infiammatorie [24,29].

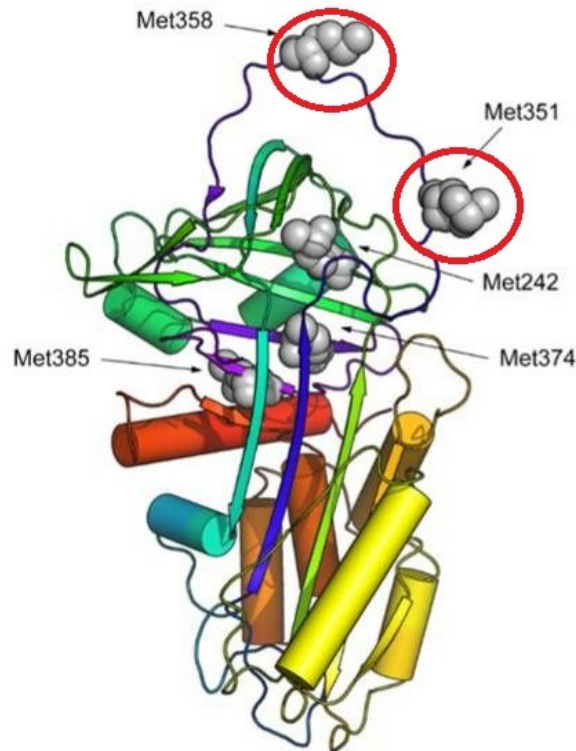


Figura 13. Struttura molecolare dell'AAT ossidata

1.3.3.3 Sequestro di AAT da parte dei NETs

Oltre all'inattivazione ossidativa, ulteriori indagini condotte nel laboratorio dove ho svolto il mio lavoro di tesi hanno esplorato meccanismi alternativi per spiegare la mancata formazione del complesso stabile AAT-HNE. È stato infatti evidenziato come, nei campioni di BALF di pazienti COVID-19, l'AAT sia in grado di legarsi agli istoni associati ai NETs. Tale interazione non covalente sembra esercitare un significativo impedimento sterico; il sequestro dell'AAT sulle impalcature di cromatina ne riduce la quota libera circolante e ne maschera il sito reattivo (*RCL*), rendendolo non disponibile per il legame con l'HNE e compromettendo, di fatto, la funzione citoprotettiva della proteina. In continuità con tali osservazioni precedenti sembra anche che l'AAT non sia in grado di inibire direttamente la formazione dei NETs [27].

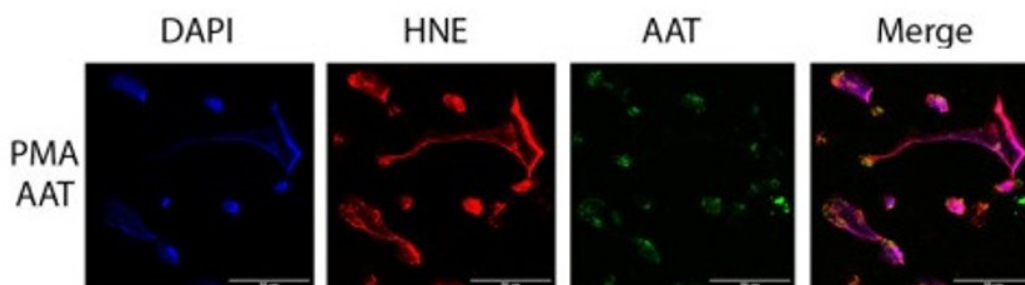


Figura 14. Immagini ottenute mediante microscopia confocale di neutrofili stimolati alla NETosi con PMA in presenza di α 1-antitripsina fluorescente (verde). Il DNA è stato marcato con DAPI, mentre l'HNE è stata rilevata mediante immunofluorescenza utilizzando un anticorpo specifico (rosso). Barra di scala = 50 μ m.

1.3.4 α 1-Antitrypsin deficiency (AATD)

L' *α 1-Antitrypsin deficiency* (deficit di α 1-antitripsina, AATD) è una malattia genetica rara caratterizzata da livelli sierici ridotti o assenti di AAT circolante, correlata ad un quadro clinico eterogeneo che coinvolge prevalentemente il parenchima epatico e l'apparato respiratorio. L'eziologia di tale disturbo risiede in mutazioni puntiformi nel gene SERPINA1; le varianti patogeniche più rilevanti vengono definite S e Z. La gravità della carenza varia in base alla combinazione tra gli alleli normali (variante M) e quelli mutati. Gli individui sani presentano generalmente il fenotipo omozigote MM e una concentrazione plasmatica di AAT compresa tra i 20 e 40 μ M. Al contrario, il fenotipo omozigote SS comporta una riduzione della proteina circolante di circa il 40-50%, mentre il fenotipo eterozigote SZ è caratterizzato da una concentrazione plasmatica della proteina compresa tra gli 8 e i 15 μ M. La soglia di protezione nei confronti delle proteasi coincide con il valore di 11 μ M, al di sotto del quale aumenta il rischio di insorgenza di modificazioni enfisematose. Il fenotipo omozigote ZZ, con valori plasmatici di AAT inferiori a 5 μ M, rappresenta la forma più grave; la variante Z è soggetta a fenomeni di polimerizzazione e aggregazione intracellulare a livello epatico, che ne impediscono la secrezione nel torrente ematico. Oltre al deficit quantitativo, la proteina Z mutata presenta un'efficacia inibitoria intrinsecamente ridotta, con un tasso di associazione con le proteasi marcatamente ridotto rispetto alla variante normale. I fenotipi caratterizzati dalla totale assenza di AAT vengono definiti NULL. In definitiva, l'ipoprotidemia cronica da AATD determina una degenerazione proteolitica irreversibile del tessuto polmonare, agendo come determinante primario nella patogenesi di malattie polmonari come BPCO, bronchiectasie ed enfisema [32-34].

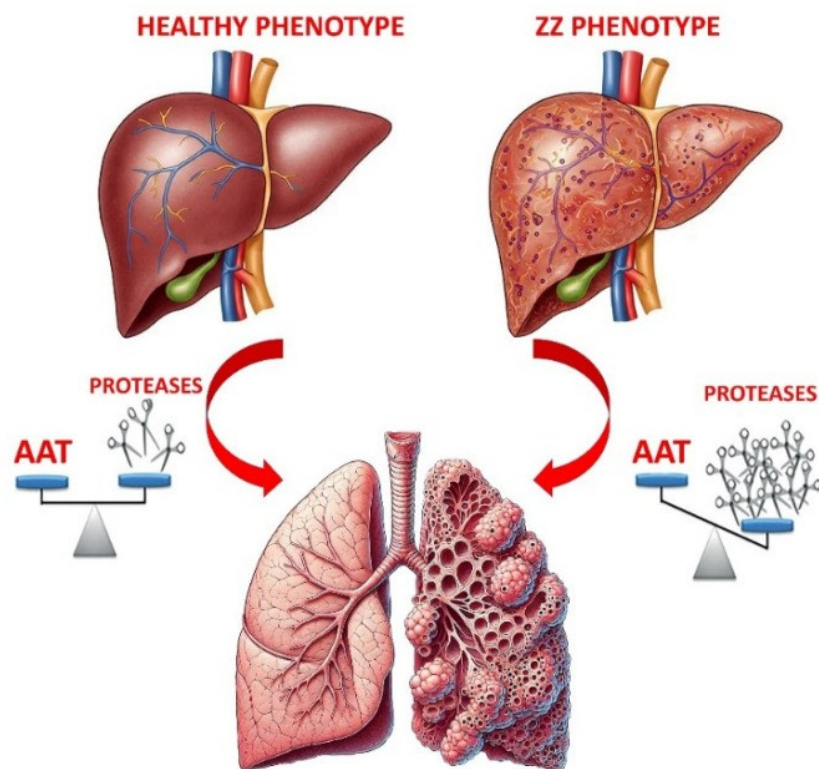


Figura 15. Rappresentazione grafica comparativa degli effetti dello squilibrio proteasi/antiproteasi in soggetti sani e individui affetti da AATD [32].

A causa della sua eterogeneità clinica, l'AATD risulta generalmente sottodiagnosticata, nonostante le linee guida internazionali raccomandino uno screening sistematico in tutti i pazienti affetti da BPCO per escludere la presenza silente di questa patologia. Riconosciuta nella maggior parte dei casi in stadi avanzati, la malattia segue un decorso lento e progressivo, influenzato dalla variabilità genotipica e fenotipica individuale, fattori che complicano ulteriormente lo sviluppo di strategie terapeutiche risolutive. Ad oggi non esiste una cura definitiva per l'AATD e i pochi trattamenti esistenti disponibili mirano soprattutto alla prevenzione di ulteriori danni e a migliorare la qualità di vita dei pazienti; per tali motivi una diagnosi precoce risulta decisiva. La terapia sostitutiva (*augmentation therapy*) rappresenta attualmente l'unico trattamento specifico approvato per la gestione delle manifestazioni polmonari; essa prevede una

somministrazione settimanale per infusione endovenosa di AAT purificata e proveniente da donatori sani, al fine di ripristinare i livelli protettivi di inibitore nel polmone. A supporto del quadro clinico, vengono comunemente impiegati protocolli standard per le malattie croniche ostruttive, quali l'uso di broncodilatatori e l'ossigenoterapia [32-34].

1.4 Inibitori sintetici dell'HNE

Per compensare il deficit o l'inattivazione degli inibitori endogeni protettivi, è emersa chiaramente la necessità di sviluppare inibitori sintetici specifici per l'HNE. Negli ultimi trent'anni, numerosi sforzi accademici e industriali hanno portato all'identificazione di un'ampia gamma di composti, classificabili principalmente in inibitori peptidici e non peptidici. Le evidenze maturate indicano che gli inibitori a basso peso molecolare, tipicamente non peptidici, offrono vantaggi significativi rispetto alle controparti peptidiche nella selezione di candidati clinici. Una maggiore selettività enzimatica, accompagnata da una buona biodisponibilità orale e da ridotti rischi di scatenare risposte immunogeniche o di essere inattivati proteoliticamente, sono fattori rilevanti per propendere all'utilizzo di potenziali farmaci non peptidici rispetto a quelli peptidici. Le molecole a basso peso molecolare risultano facilmente modificabili, permettendo manipolazioni che possano ottimizzarne le proprietà fisiche e farmacocinetiche.

Tali molecole sono infatti in grado di penetrare nel compartimento intracellulare o di agire sulla superficie cellulare, inibendo le proteasi associate alla membrana, un distretto in cui gli inibitori naturali voluminosi, come l'AAT, risultano stericamente limitati [15,35].

Nonostante le promettenti premesse farmacologiche dei composti non peptidici, il passaggio dalla sintesi chimica all'applicazione clinica ha incontrato notevoli ostacoli, limitando drasticamente il numero di farmaci attualmente approvati.

Ad oggi, infatti, il panorama terapeutico si divide tra l'impiego della proteina nativa e lo sviluppo di molecole di sintesi, che possono essere classificate in cinque generazioni in base alla loro evoluzione strutturale e meccanicistica.

La prima generazione comprende gli inibitori naturali di derivazione plasmatica o ricombinante, come l' α 1-Antitripsina e l' α 2-Macroglobulina. Un esempio clinico è il Prolastin®, utilizzato nella terapia sostitutiva per l'AATD; tuttavia, il suo impiego resta limitato dalla necessità di somministrazione endovenosa e dalla suscettibilità allo stress ossidativo e alla degradazione proteolitica.

Alla seconda generazione appartengono inibitori sintetici a basso peso molecolare che interferiscono con il sito attivo dell'HNE mediante meccanismi covalenti. Rientrano in questo gruppo Sivelestat (ONO-5046, Elaspol 100®) e Freselestat (ONO-6818), entrambi sviluppati dalla ONO Pharmaceutical (Chou-ku, Osaka, Giappone). Il Sivelestat, in particolare, è attualmente l'unico inibitore sintetico non peptidico approvato per l'uso umano, seppur limitatamente a Giappone e Corea del Sud, per il trattamento via endovenosa di ALI/ARDS associate a sindrome da risposta infiammatoria sistemica (SIRS). Nonostante il progresso tecnologico, questi composti presentano ancora un'efficacia clinica moderata e vincoli legati alla via di somministrazione [14,15,35].

La terza e quarta generazione di inibitori sintetici risultano strettamente correlate e comprendono inibitori reversibili, come Alvelestat (AZD9668 o MPH-966) e BAY-678. Mentre gli inibitori di terza generazione si legano alla tasca S1 del sito attivo di HNE, mostrando una prima interazione con la tasca S2, gli inibitori di quarta generazione sfruttano appieno quest'ultimo sito per instaurare interazioni idrofobiche e legami a idrogeno più specifici. Questa evoluzione strutturale ha permesso a tali molecole di affrontare *trials* clinici di fase I e II per la somministrazione orale, i cui risultati hanno evidenziato bassa tossicità, profili ottimali di sicurezza ed un'elevata selettività.

Infine, gli inibitori di quinta generazione presentano una conformazione bioattiva che favorisce un adattamento di legame ottimale con la proteasi, aumentando stabilità e potenza della molecola [14,35]. Un esempio di

questa categoria è BAY85-8501, già sottoposto a studi clinici di fase II per il trattamento di pazienti affetti da bronchiectasie non correlate alla fibrosi cistica; tuttavia, nonostante le eccellenti proprietà farmacodinamiche, tale molecola non ha ancora dimostrato benefici clinici statisticamente significativi in questa specifica popolazione di pazienti [35,36].

Recentemente, due molecole innovative hanno destato particolare interesse per il loro potenziale terapeutico. POL6014, somministrato per via inalatoria, ha dimostrato di poter raggiungere in sicurezza elevate concentrazioni nel microambiente polmonare di pazienti con fibrosi cistica, riducendo significativamente il carico di HNE nell'espettorato. Parallelamente, studi preclinici su Sirtinol hanno evidenziato una capacità dose-dipendente di contrastare l'edema polmonare indotto dall'HNE senza alterare la fisiologica funzione neutrofilica [28].

In letteratura sono riportati anche diversi inibitori derivati da prodotti naturali, per lo più estratti da specie vegetali, animali e microorganismi; essi sono stati ampiamente valutati sia *in vitro* che *in vivo* per analizzarne le proprietà chimico-fisiche correlate alla loro potenza inibitoria. Tra i vantaggi di questa tipologia di inibitori vi sono l'elevata solubilità e la ridotta tossicità; tuttavia, presentano generalmente problematiche legate soprattutto all'emivita, alla selettività ed alla stabilità metabolica, rendendone difficoltoso lo sviluppo come potenziali farmaci [14,15].

Rimane tuttora oggetto di dibattito il motivo per cui diversi inibitori elastasici presentino elevata affinità *in vitro* ma non producano i risultati clinici attesi *in vivo*. È ragionevole ipotizzare che tale discrepanza derivi da una farmacocinetica polmonare sub-ottimale, dalle condizioni chimico-fisiche ostili del microambiente flogistico, da effetti *off-target* o dalla marcata variabilità fenotipica dei pazienti [28]. In questo complesso scenario, il presente lavoro di tesi si è focalizzato sull'analisi di Sivelestat e Alvelestat, rappresentanti di spicco rispettivamente della seconda e della quarta generazione di inibitori sintetici. L'obiettivo è stato valutarne i

meccanismi d'azione e, soprattutto, la stabilità in ambiente ossidativo, fattore determinante per l'efficacia terapeutica nei contesti infiammatori acuti e cronici.

1.4.1 Sivelestat

1.4.1.1 Struttura e meccanismo molecolare

Sivelestat (ONO-5046, Elaspol 100®) è un inibitore sintetico a basso peso molecolare, competitivo e altamente selettivo per l'HNE, che possiede un valore di IC_{50} pari a 44 nM e una K_i pari a 200 nM. La sua struttura (figura 16) comprende una porzione glicinica, un gruppo fenilsulfonilamminico legato ad un benzoile e un gruppo pivalato. [15,37]

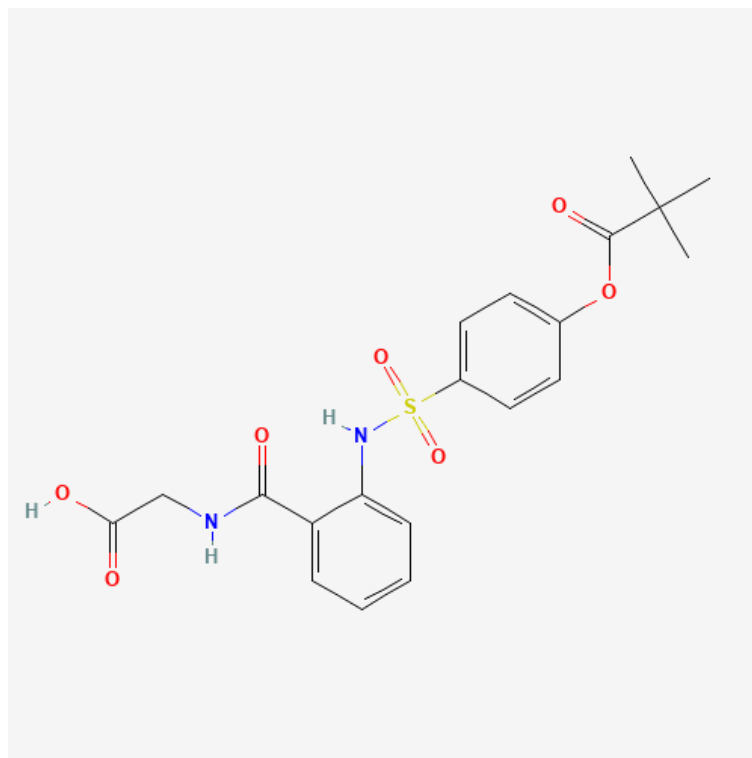


Figura 16. Struttura chimica di Sivelestat [38]

1.4.1.2 Applicazioni cliniche

Ad oggi Sivelestat è stato approvato per somministrazione endovenosa esclusivamente in Giappone e Corea del Sud per il trattamento di ALI/ARDS associati a SIRS. Il suo utilizzo su scala globale rimane comunque limitato a causa dei suoi risultati incostanti e controversi [37]. Tuttavia, diversi studi preclinici su linee murine hanno dimostrato il ruolo protettivo della molecola nel contesto del danno polmonare acuto, grazie ad una riduzione di stress ossidativo, apoptosi e infiammazione. Sivelestat sembra inoltre in grado di intervenire efficacemente sulla fase fibroproliferativa di ALI/ARDS, prevenendo lo sviluppo di fibrosi polmonare [28,39]. Numerosi *trials* clinici hanno corroborato la capacità del farmaco di inibire l'HNE, riducendo l'infiammazione polmonare, la permeabilità capillare e limitando la formazione di edema e danno tissutale. Attraverso il miglioramento dell'ossigenazione e della funzionalità respiratoria, il trattamento contribuirebbe a ridurre i tempi di ventilazione meccanica, la durata della degenza e il tasso di mortalità in condizioni severe di ARDS, incluse le forme indotte da COVID-19 [28,39,40]. Il protocollo terapeutico standard prevede un'infusione continua alla dose di 0,2 mg/kg/ora, per un periodo massimo di 14 giorni. È importante sottolineare come Sivelestat eserciti tali benefici senza compromettere la fondamentale funzione immunitaria e fagocitica dei neutrofili dell'ospite, mantenendo intatte le difese contro agenti patogeni [41].

1.4.2 Alvelestat

1.4.2.1 Struttura e meccanismo molecolare

Alvelestat (AZD9668 o MPH966) è un inibitore orale di quarta generazione, caratterizzato da un profilo a basso peso molecolare, un'elevata selettività e un meccanismo di inibizione reversibile dell'HNE. La sua struttura molecolare (Figura 17) comprende uno *scaffold* piridonico condensato con un anello pirazolico, a cui sono legati un gruppo fenilsulfonilato e una porzione fenilica recante un sostituito trifluorometile in posizione *meta* [37].

Tali motivi strutturali permettono alla molecola di instaurare interazioni specifiche con la triade catalitica dell'HNE. In particolare, Alvelestat è in grado di alloggiare nella tasca S2 dell'HNE, una regione fondamentale per garantire un'elevata selettività verso questa specifica proteasi. Tale precisione molecolare è cruciale per prevenire l'inibizione accidentale di altre serin-proteasi umane, limitando in questo modo effetti collaterali *off target* sistemici. Possedendo una costante di associazione paragonabile a quella dell'AAT nativa, questo inibitore sembra presentarsi come un valido sostituto funzionale dell'antiproteasi endogena [35].

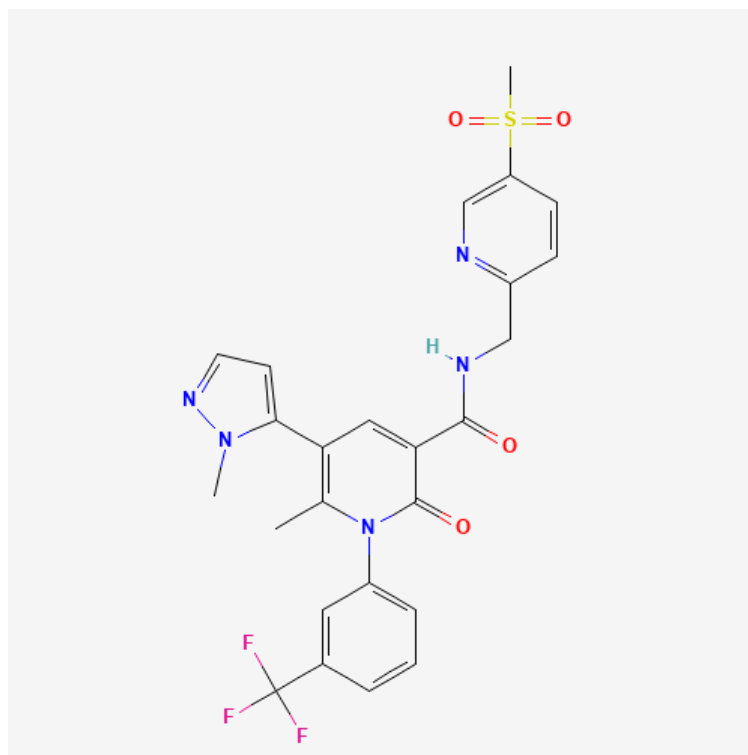


Figura 17. Struttura chimica di Alvelestat [42]

1.4.2.2 Applicazioni cliniche

Diversi studi preclinici in vivo su modelli murini affetti da ALI/ARDS hanno confermato che Alvelestat risulta efficace nell'inibire l'HNE diminuendo sia l'espressione dei NETs che la produzione di citochine pro-infiammatorie [43]. Sebbene non sia ancora stato approvato per l'impiego clinico su larga scala, Alvelestat è attualmente oggetto di diversi studi clinici di fase II volti a valutarne il potenziale impiego nel trattamento di BPCO, fibrosi cistica e bronchiectasie, con un focus particolare sull'utilizzo di questa molecola come protocollo terapeutico per l'AATD severa [33,37,44]. Alvelestat ha infatti ottenuto dalla FDA le designazioni di Orphan Drug e di Fast Track per il trattamento dell'AATD sia negli Stati Uniti che in Europa. Questi riconoscimenti sottolineano l'importanza dello sviluppo di farmaci destinati al trattamento di patologie gravi e della risoluzione di necessità terapeutiche non ancora soddisfatte. Al momento

sono stati portati a termine due principali studi clinici di fase II, definiti ASTRAEUS e ATALANTA, atti a valutare l'efficacia e la sicurezza del farmaco. Si tratta di due *trials* complementari, a doppio cieco, randomizzati e controllati con placebo, della durata di 12 settimane, durante i quali sono stati testati dosaggi di 120 mg e 240 mg, somministrati due volte al giorno a pazienti affetti da AATD. I risultati hanno evidenziato un'inibizione efficace dell'HNE a entrambi i dosaggi, con una diminuzione statisticamente significativa, particolarmente marcata alla dose di 240 mg, di *biomarkers* come la A α -Val³⁶⁰ e la desmosina (indice diretto della degradazione di elastina). Grazie a un profilo di sicurezza estremamente favorevole, si attende che i futuri esiti dei *trials* di fase III possano supportare l'approvazione definitiva di Alvelestat come primo trattamento orale specifico per l'AATD in USA ed Europa [33,44].

2. SCOPO DELLA RICERCA

L'elastasi neutrofila umana (HNE) è una serin proteasi di fondamentale importanza, rilasciata dai neutrofili attivati contestualmente a risposte infiammatorie acute e croniche. In condizioni fisiologiche l'attività di questo enzima è finemente regolata da inibitori endogeni, tra i quali l' α 1-Antitripsina (AAT) che rappresenta il principale attore nella coordinazione di questo sistema di controllo. L'AAT agisce infatti come un inibitore antiproteasico capace di neutralizzare l'azione proteolitica dell'HNE mediante la formazione di un complesso enzima-inibitore stabile, prevenendo così il danneggiamento e la degradazione dei componenti strutturali del parenchima polmonare, quali elastina, fibronectina e proteoglicani. Tuttavia, in diverse condizioni patologiche, caratterizzate da un'elevata componente infiammatoria e da un microambiente fortemente ossidativo, l'attività regolatoria dell'AAT risulta significativamente compromessa. Il presente lavoro di tesi si è posto come obiettivo primario quello di indagare lo stato funzionale di questo sistema in differenti quadri clinici, analizzando campioni di liquido di lavaggio broncoalveolare (BALf) provenienti da pazienti affetti da COVID-19, fibrosi polmonare, sarcoidosi e soggetti sottoposti a trapianto polmonare in fase di *follow up*. Attraverso un'analisi comparativa, si è voluto verificare se la presenza di HNE libera e non regolata fosse una caratteristica comune o peculiare delle diverse affezioni. I dati ottenuti hanno evidenziato come, mentre nelle altre patologie l'enzima risultasse parzialmente controllato o legato a proteine del complemento e immunoglobuline, nel contesto del COVID-19 l'HNE permanesse in forma libera e massiva. È stato infatti confermato, mediante purificazione e spettrometria di massa, che l'ossidazione dei residui metioninici critici dell'AAT ne avesse annullato l'affinità per la proteasi, impedendo la fisiologica protezione dei tessuti. Accertato il *deficit* funzionale delle

difese endogene nel quadro del COVID-19, il secondo scopo del lavoro di tesi è stato quello di valutare l'efficacia di una strategia terapeutica alternativa basata sull'impiego degli inibitori sintetici selettivi Alvelestat e Sivelestat. L'indagine ha mirato a definire, a livello atomistico, i meccanismi di legame e la stabilità di queste molecole in ambienti capaci di simulare lo stress ossidativo tipico dei tessuti infiammati. Attraverso l'integrazione di tecniche di modellistica molecolare e saggi enzimatici in vitro, la ricerca ha inteso fornire basi solide per lo sviluppo di inibitori di nuova generazione, in grado di garantire efficacia e resilienza strutturale laddove i meccanismi fisiologici di controllo risultassero neutralizzati dalla patologia.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Reagenti

L'Elastasi Neutrofila Umana (HNE) standard è stata acquistata presso Abcam (Cambridge, Regno Unito), così come gli anticorpi primari anti-AAT e i rispettivi anticorpi secondari anti-mouse. Gli anticorpi anti-HNE e anti-*rabbit* sono stati acquistati da Thermo Scientific (Rockford, USA). La quantificazione del contenuto proteico totale è stata eseguita mediante il saggio dell'acido bicinconinico (BCA), utilizzando il kit fornito da Thermo Scientific (Rockford, USA). La valutazione dell'attività enzimatica dell'HNE ha previsto l'impiego di p-nitroanilina (p-NA) come standard e del peptide MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-pNA come substrato specifico, entrambi acquistati presso Bachem (Bachem GmbH, Germania). Per gli studi di inibizione, sono stati utilizzati gli inibitori sintetici non peptidici Alvelestat e Sivelestat forniti rispettivamente da Selleckchem (Monaco di Baviera, Germania) e Abcam (cod. ab146184). Se non diversamente specificato, il resto dei reagenti di grado analitico utilizzati è stato fornito da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Tutti i tamponi impiegati in questo lavoro di tesi sono stati allestiti con acqua bidistillata tramite un sistema di purificazione Milli-Q (o Millipore, Bedford, MA, USA).

3.2 Pazienti e campioni

In questo lavoro di tesi sono stati studiati i fluidi da lavaggio broncoalveolare (BALf) di 38 pazienti ricoverati presso l'Ospedale Luigi Sacco di Milano e presso il Policlinico San Matteo di Pavia. La selezione dei campioni è stata strutturata in modo da includere patologie caratterizzate da profili immunologici e infiammatori profondamente distinti, permettendo così un'indagine comparativa sulla dinamica delle proteine nel microambiente polmonare. Nello specifico, sono stati

analizzati i campioni di 10 pazienti affetti da polmonite severa da COVID-19, scelti come modello prototipico di danno polmonare acuto dominato da un'intensa infiammazione neutrofila e da una massiva formazione di NET. Parallelamente, sono stati esaminati i fluidi di nove pazienti sottoposti a trapianto di polmone, analizzati durante il *follow-up* clinico o in corso di infezione da CMV. Lo studio è stato poi esteso a pazienti con sarcoidosi (n=10) e fibrosi polmonare (n=9), patologie caratterizzate da una disregolazione immunitaria e da un rimodellamento tissutale cronico piuttosto che da una flogosi neutrofila primaria.

In Tabella 1 sono riportate le caratteristiche demografiche delle diverse coorti di pazienti incluse nello studio, con indicazione dell'età media ($\pm$ deviazione standard) e della distribuzione per sesso.

Tabella 1. Caratteristiche demografiche delle coorti di pazienti incluse nello studio.

Pazienti	Età (media $\pm$ DS)	Sesso (M/F)
COVID-19 grave	58,3 $\pm$ 11,3	6/4
Trapianto polmonare (<i>follow-up</i>)	54,7 $\pm$ 9,7	7/2
Sarcoidosi	44,5 $\pm$ 8,2	4/6
Fibrosi polmonare	68,2 $\pm$ 5,4	6/3

La raccolta dei campioni è stata approvata dai comitati etici di entrambe le strutture (Comitato Etico di Area 1 prot. 20100005334 per l'ospedale Sacco e 20200046007 per l'IRCCS San Matteo) in accordo con i principi etici della dichiarazione di Helsinki. I pazienti, o i loro parenti, hanno dato il loro consenso informato per il prelievo dei campioni.

Il prelievo del liquido di lavaggio broncoalveolare (BAL) è stato effettuato nel corso di indagini broncoscopiche clinicamente indicate, seguendo protocolli standardizzati. In breve, l'estremità distale del broncoscopio è stata posizionata nel lobo medio o nel bronco linguare; successivamente, è stato instillato un volume totale di 150 mL di soluzione fisiologica sterile preriscaldata, suddiviso in cinque aliquote sequenziali da 30 mL, recuperate mediante aspirazione delicata. La prima aliquota raccolta è stata destinata alle analisi diagnostiche di routine, mentre le restanti sono state riunite (*pool*) e centrifugate a 1500 rpm per 10 minuti. Dalla stratificazione è stato ricavato il surnatante chiamato BALf (BAL fluid), composto fluido arricchito di componente proteica, privato della componente cellulare. I surnatanti così ottenuti sono stati suddivisi in aliquote e conservati a -80 °C fino al momento dell'utilizzo. I campioni di BALf dei pazienti affetti da polmonite severa da COVID-19 sono stati sottoposti a inattivazione tramite esposizione a radiazioni UV per 1 ora.

3.3 Dosaggio Proteico con BCA

Il titolo proteico dei BALf è stato determinato tramite il test biochimico di dosaggio proteico con acido bicinconinico (BCA) seguendo il protocollo sperimentale fornito dalla ditta. Per ricavare una retta di taratura, partendo da una soluzione madre di albumina sierica bovina (BSA) a concentrazione 2 µg/µL, sono state allestite 5 diluizioni standard differenti. Queste sono state preparate prelevando 5 aliquote di soluzione madre e ciascuna di esse è stata portata ad un volume finale di 50 µL con acqua bidistillata (ddH₂O) (tabella 2).

Tabella 2. Soluzioni contenenti BSA per la costruzione di una retta di taratura.

Vial	Soluzione madre di BSA	ddH ₂ O
A	2,5 µL (5 µg)	47,5 µL
B	5 µL (10 µg)	45 µL
C	7,5 µL (15 µg)	42,5 µL
D	10 µL (20 µg)	40 µL
E	12,5 µL (25 µg)	37,5 µL

Per ogni campione di BALf sono state preparate due aliquote, di cui una da 50 µL miscelando 5 µL di campione e 45 µL di ddH₂O, ed una ulteriore miscelando 10 µL di campione con 40 µL di ddH₂O. Ad ogni campione è stato aggiunto 1 mL di *working reagent* (costituito da Reagente A e Reagente B in rapporto 50:1), seguendo quindi *l'enhanced protocol* fornito dalla ditta. Il bianco, impiegato per tarare lo spettrofotometro, è stato allestito miscelando 50 µL di ddH₂O con 1 mL di *working reagent*. In seguito, i campioni sono stati incubati per 30 minuti a 60 °C in thermoblock. Una volta terminata l'incubazione le aliquote dei campioni e le soluzioni standard sono state lasciate a raffreddare per circa dieci minuti. In seguito, ogni campione standard è stato sottoposto ad una lettura spettrofotometrica ad una lunghezza d'onda (λ) di 562 nm, registrando per ciascuno di essi uno specifico valore di assorbanza; in questo modo, essendo note assorbanza e quantità in µg di BSA caratterizzanti ciascuna soluzione, è stato possibile ottenere una retta di taratura standard. Quest'ultima esprime la variazione di assorbanza (indicata in ordinata) in funzione della variazione della quantità in µg di BSA presente in soluzione (indicata in ascissa); tra queste grandezze intercorre un rapporto di proporzionalità diretta, come afferma la legge di Lambert-Beer.

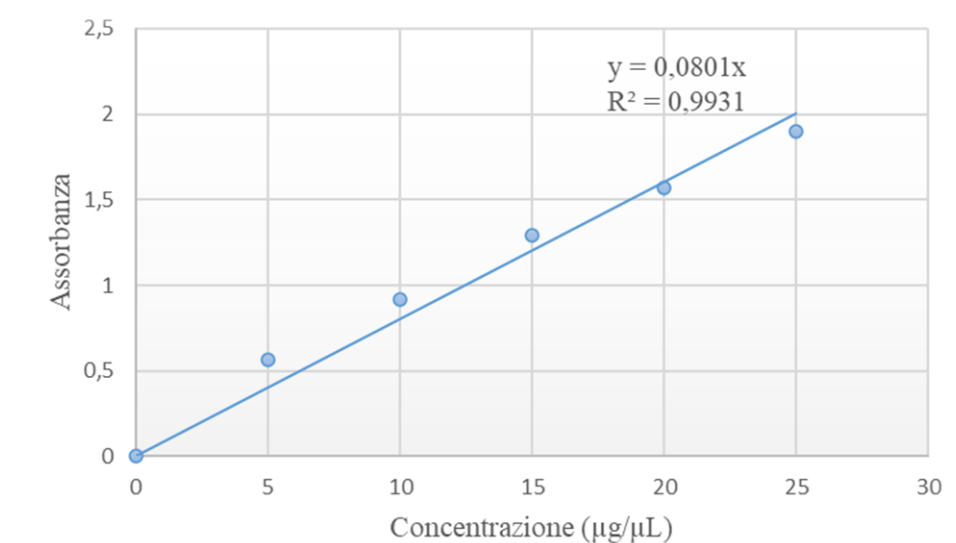


Figura 18. Retta di taratura.

Grazie alle varie funzioni di Excel è stata ricavata l'equazione della retta di taratura in termini $y=mx$ e parallelamente è stata verificata la bontà dei dati sperimentali rispetto al modello matematico lineare calcolando il coefficiente di correlazione quadratico (R^2). Analogamente, le aliquote dei campioni sono state analizzate allo spettrofotometro e sono stati registrati i vari valori di assorbanza, corretti grazie alla calibratura con il bianco. Pertanto, attraverso il valore di assorbanza registrato per ciascun campione e il suo inserimento all'interno dell'equazione della retta, è stato possibile ricavare la concentrazione proteica di ognuno di essi.

3.4 SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

Un'aliquota di ciascun campione di BALf, contenente circa 10 µg di proteine, è stata sottoposta a precipitazione con acido tricloroacetico (TCA), in rapporto 10:1, per 30 minuti in ghiaccio. Il campione è stato poi sottoposto a centrifugazione per 10 minuti a 11000 rpm, il surnatante è

stato rimosso e il pellet ottenuto è stato risospeso con circa 12 μ L di *Sample Buffer* e denaturato per 5 minuti a 95 °C in thermoblock. Il buffer in questione è composto da Tris-HCl 50 mM pH 6,8 contenente sodio dodecilsolfato (SDS) al 2 %, β mercaptoetanolo al 5%, blu di bromofenolo (BBF) allo 0,1% e glicerolo al 10%. Parallelamente alla fase preparativa dei campioni, è stato allestito un gel discontinuo di poliacrilamide composto da un *Running gel* al 12,5% o all'8%, in base alle condizioni sperimentali, e uno *Stacking gel* al 5%. Il *Running gel* è stato preparato e versato fra due lastre di dimensione 8 cm x 6 cm con spaziatore da 0.75 mm. La superficie è stata livellata mediante l'aggiunta di una piccola quantità di isopropanolo; questo ha consentito sia di ottenere una superficie piatta e uniforme, sia di impedire l'inibizione della polimerizzazione da parte dell'ossigeno. Una volta completata la polimerizzazione e rimosso lo strato di isopropanolo, lo *Stacking gel* è stato fatto colare al di sopra del *Running gel*, previo posizionamento di un "pettine" di plastica che, a gelificazione ultimata, è stato rimosso, generando così i pozzetti di alloggio per il caricamento dei campioni. Il gel di poliacrilammide così ottenuto è stato alloggiato nella cella elettroforetica verticale e l'elettroforesi è stata condotta utilizzando un tampone di corsa (*Running Buffer*) a base di Tris, glicina e SDS. La separazione è stata avviata impostando un voltaggio iniziale di 90 V; una volta che i campioni hanno attraversato l'interfaccia tra lo *Stacking gel* ed il *Running gel*, il potenziale è stato incrementato a 130 V per ottimizzare la risoluzione. La corsa elettroforetica è stata protratta per circa un'ora, fino al completamento della migrazione proteica. Qualora non destinato al trasferimento su membrana per Western Blot, il gel è stato sottoposto ad una fase di fissaggio in una soluzione di metanolo al 45% e acido acetico al 10% per 30 minuti. Successivamente, per consentire la visualizzazione e la successiva analisi delle bande proteiche, il gel è stato immerso in una

soluzione colorante a base di Blu di Comassie, mantenendolo in agitazione *overnight*.

Tabelle 3.A, 3.B, 3.C. Reagenti impiegati per l'allestimento dei gel per SDS-page.

Tabella 3.A

Running Gel 12,5 %	
ddH ₂ O	1,58 mL
Acrilamide/Bis	2,08 mL
Tris 1,5 M pH 8,80	1,25 mL
APS 10 %	50 µL
Temed	5 µL

Tabella 3.B

Running Gel 8 %	
ddH ₂ O	2,3 mL
Acrilamide/Bis	1,33 mL
Tris 1,5 M pH 8,80	1,25 mL
APS 10 %	50 µL
Temed	5 µL

Tabella 3.C

Stacking Gel 5 %	
ddH ₂ O	1,21 mL
Acrilamide/Bis	0,8 mL
Tris HCl 0,5 M pH 6,80	1,25 mL
APS 10 %	33 µL
Temed	3,3 µL

3.5 Western Blot

Le proteine separate elettroforeticamente sono state trasferite su una membrana di polivinilidenfluoruro (PVDF) (BioRad, Hercules, CA, USA) mediante il sistema Trans Blot (BioRad), impostando un trasferimento rapido a 25 V e 2,5 A per 7 minuti. Al termine del procedimento la membrana è stata lavata con circa 10 mL di tampone fosfato salino (PBS)

per 10 minuti, quindi incubata per un'ora in agitazione in 10 mL di una soluzione di latte al 5% in PBS, al fine di saturare i siti di legame non specifici. La fase di saturazione è stata seguita da 3 lavaggi di 10 minuti ciascuno con circa 10 mL di tampone PBST (PBS con 0,1 % di Tween 20). L'identificazione dei target proteici è stata eseguita tramite due procedure di blotting indipendenti, volte a rilevare rispettivamente l'eventuale presenza di AAT (52 kDa), di HNE (35 kDa), del complesso AAT-HNE (80 kDa) e dei complessi ad alto peso molecolare HNE-proteine infiammatorie (>100 kDa). Per l'analisi dell'AAT, sono stati utilizzati 4 µL di anticorpo anti-AAT (ab9400, Abcam, Cambridge, UK) con una diluizione 1:2500 in latte all'1% e PBST. Parallelamente, per la caratterizzazione dell'HNE sono stati impiegati 5 µL dell'anticorpo primario monoclonale anti-HNE (ma532548, ThermoFisher Scientific) con una diluizione 1:2000 nella medesima soluzione di saggio. In entrambi i casi, l'incubazione con l'anticorpo primario è stata condotta *overnight* alla temperatura di 4°C, garantendo le condizioni ottimali per il legame specifico con l'antigene *target*. Una volta terminata l'incubazione con gli anticorpi primari, le membrane sono state sottoposte a 3 lavaggi da 10 minuti ciascuno con 10 mL di PBST, per rimuovere l'eccesso di anticorpo non legato. Successivamente, è stata eseguita l'incubazione delle membrane con gli anticorpi secondari per un'ora a temperatura ambiente: per il protocollo relativo all'AAT sono stati impiegati 2 µL di anticorpo anti-*mouse* (diluizione 1:5000; ab6728, Abcam), mentre per la determinazione dell'HNE sono stati utilizzati 3,33 µL di anticorpo anti-*rabbit* (diluizione 1:3000; ab6721, Abcam). Al termine, sono stati eseguiti tre ulteriori lavaggi in PBST da 10 minuti ciascuno, al fine di rimuovere l'eccesso di anticorpo non legato. La visualizzazione delle bande proteiche di interesse è stata ottenuta mediante il metodo della chemiluminescenza potenziata (ECL). Il protocollo ha previsto l'impiego di un kit ECL (BioRad) basato sull'utilizzo di due reagenti di sviluppo miscelati in

rapporto 1:1 e lasciati agire sulla membrana per circa 1 minuto. In questa fase, l'enzima marcatore perossidasi (HRP), coniugato con l'anticorpo secondario, catalizza la reazione di ossidazione del luminolo in presenza di perossido di idrogeno, generando 3-amminoftalato, un intermedio instabile, il cui decadimento produce un'emissione luminosa rilevabile. Dopo l'esposizione, la membrana è stata asciugata e immediatamente trasferita nell'analizzatore ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare, Milano, Italia) per l'acquisizione delle immagini. La membrana è stata posizionata su un supporto lucido trasparente ad alta risoluzione per ottimizzarne la resa del segnale e la successiva analisi densitometrica.

3.6 Ossidazione in vitro dell'Alfa-1 Antitripsina

Per valutare l'impatto dello stress ossidativo sulla funzionalità dell'AAT, è stato sviluppato un modello di ossidazione *in vitro* volto a simulare il microambiente fortemente ossidativo caratteristico del polmone dei pazienti con polmonite grave da COVID-19. Il protocollo ha previsto l'impiego di 50 µg di AAT sciolti in tampone Tris 50 mM (pH 7,5). Lo stress ossidativo è stato indotto mediante l'aggiunta di 5 µL di H₂O₂, raggiungendo un volume finale di reazione pari a 100 µL. La miscela di reazione è stata lasciata in incubazione *overnight*, consentendo un'esposizione prolungata all'agente ossidante. Al termine dell'incubazione, la reazione di ossidazione è stata interrotta rimuovendo l'H₂O₂ in eccesso tramite cromatografia per esclusione molecolare (*desalting*); a tal fine è stata utilizzata una colonna pre-impaccata PD10 (Amersham Biosciences, Uppsala, Svezia), contenente 5 mL di fase stazionaria costituita da resina Sephadex G-25 M. Preliminarmente, la colonna è stata equilibrata con un volume di ddH₂O pari a 5 volumi di fase stazionaria, per un totale di 25 mL. Una volta terminata la fase preparativa, il campione ossidato (100 µL) è stato opportunamente diluito con ddH₂O

fino ad un volume di 2,5 mL e caricato in colonna. Dopo l'eluizione della fase mobile iniziale, sono stati addizionati ulteriori 3,5 mL di ddH₂O, raccogliendo l'intero volume dell'eluato in una provetta conica graduata; questa frazione contiene l'AAT purificata dal perossido.

Al termine della procedura, la resina è stata conservata in una soluzione di sodio azide allo 0,02% per prevenirne la contaminazione microbica. I 3,5 mL di eluato ottenuti sono stati infine concentrati mediante SpeedVac. Tale processo ha permesso di determinare il volume finale in eppendorf e di ricalcolare la concentrazione finale dell'AAT ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$), partendo dalla quantità nota di proteina inizialmente sottoposta a ossidazione.

3.7 Purificazione Alfa-1 Antitripsina

La purificazione dell'AAT dai campioni di BALf è stata eseguita tramite cromatografia per affinità utilizzando un sistema Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) ÄKTA Prime (Pharmacia Biotech, Uppsala, Svezia). La separazione è stata effettuata utilizzando una colonna (lunghezza 10 cm, raggio 0,5 cm) impaccata con la resina di affinità Alpha-1 Antitrypsin Select (Cytiva). L'altezza del letto cromatografico era pari a 5,1 cm, corrispondente a un volume di colonna (CV) di 4 mL. Per la procedura sono stati allestiti tre tamponi:

-*Binding Buffer*: Tris 20 mM, pH 7,40 contenente NaCl 150 mM, utilizzato per favorire il legame della proteina alla resina;

-*Elution Buffer*: Tris 20 mM, pH 7,40 contenente MgCl₂ 2 M, utilizzato per il rilascio selettivo della proteina;

-*Stripping Buffer*: PBS a pH 2, utilizzato per la rigenerazione finale della colonna.

Il campione è stato preventivamente diluito nel *Binding Buffer* fino a un volume di 2 mL e iniettato nel sistema.

La fase di caricamento e il successivo lavaggio delle proteine non legate sono stati eseguiti con un flusso di 2 mL/min di *Binding Buffer* per un volume pari a 4 CV. Successivamente, la proteina *target* è stata eluita mediante il passaggio di 4 CV di *Elution Buffer* alla medesima velocità di flusso, seguito da una fase di lavaggio drastico con 4 CV di *Stripping Buffer*. L'eluato è stato raccolto in modo frazionato (aliquote da 2 o 4 mL) mediante un raccoglitore automatico, consentendo il recupero mirato dell'AAT in provette coniche graduate. Al termine del processo, la colonna è stata riequilibrata con 10 CV di *Binding Buffer* ad 1 mL/min, per ripristinare le condizioni operative iniziali.

3.8 Reverse-Phase High Pressure Liquid Chromatography (RP-HPLC)

La separazione cromatografica è stata effettuata applicando il gradiente riportato in tabella 4.

Tabella 4. Gradiente di eluizione utilizzato nelle analisi RP-HPLC.

Tempo (min)	Fase mobile A	Fase mobile B
0,05	100 %	0 %
3,00	100 %	0 %
30,00	30 %	70 %
40,00	0 %	100 %
45,00	30 %	70 %
48,00	100 %	0 %
50,00	100 %	0 %

La fase mobile consisteva in una miscela di ddH₂O addizionata con lo 0,05% di acido trifluoroacetico (TFA, solvente A) e acetonitrile (ACN) contenente lo 0,05% di TFA (solvente B).

Al termine di ogni corsa analitica, la colonna è stata sottoposta a un lavaggio di 2 minuti con il 100% di solvente B, seguito da una fase di riequilibrio di 5 minuti con il 100% di solvente A per ripristinare le condizioni iniziali. Il flusso è stato mantenuto costante a 0,8 mL/min e, salvo diversa indicazione, il volume di iniezione per ciascun campione è stato di 20 µL. Gli analiti sono stati monitorati mediante spettrofotometria UV alla lunghezza d'onda di 220 nm.

Tutte le analisi sono state effettuate in triplicato.

3.9 Digestione Enzimatica In Situ

La digestione enzimatica delle proteine è stata eseguita seguendo il protocollo riportato in letteratura [45]. In breve, le bande proteiche di interesse sono state accuratamente escisse dal gel, trasferite in provette Eppendorf, frammentate e sottoposte a lavaggi con bicarbonato d'ammonio 100 mM (pH 7,8) in acetonitrile (ACN) al 50%, fino a ottenere la completa decolorazione dei frustoli. Successivamente, i frammenti di gel sono stati disidratati mediante l'aggiunta di 200 µL di ACN fino alla comparsa di una colorazione bianco-opaca.

Dopo la rimozione dell'acetonitrile, il gel è stato essiccato sottovuoto per 10 minuti e successivamente reidratato con 75 µL di bicarbonato d'ammonio 100 mM (pH 7,8), contenente tripsina *sequencing-grade* (20 ng/µL; Promega, Madison, WI, USA). La digestione è stata condotta *overnight* mediante incubazione a 37 °C. I peptidi risultanti sono stati estratti dalla matrice del gel attraverso tre passaggi sequenziali utilizzando, nell'ordine, 50 µL di ACN al 50%, acido trifluoroacetico (TFA) al 5% in acqua e, infine, ACN al 100%.

Ogni fase di estrazione ha previsto 10 minuti di agitazione seguiti da centrifugazione per il recupero del surnatante. Tutti i surnatanti sono stati riuniti (*pool*), essiccati e conservati a -80 °C fino al momento dell'analisi

spettrometrica. Prima dell'analisi, la miscela peptidica è stata risospesa in acido formico (FA) allo 0,1%.

3.10 Cromatografia liquida-spettrometria di massa in tandem (LC-MS/MS)

Tutte le analisi LC-MS/MS sono state effettuate mediante un sistema LC-MS/MS (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA), composto da una colonna termostata, un autosampler Surveyor mantenuto a 25 °C, una pompa Surveyor MS a gradiente quaternario dotata di rivelatore a diodi (DA) e uno spettrometro di massa a trappola lineare quadrupolare (LTQ) con sorgente a ionizzazione elettrospray (ESI), controllato dal software Xcalibur versione 1.4 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Gli analiti sono stati separati mediante RP-HPLC su colonna C18 Jupiter (Phenomenex, Torrance, CA, USA) da 150×2 mm, 4 μ m, 90 Å, utilizzando un gradiente lineare da 95% di solvente A (acido formico 0,1% in acqua) a 60% di solvente B (acetonitrile contenente 0,1% di acido formico) in 60 minuti. La velocità di flusso era pari a 0,2 mL/min. Gli spettri di massa sono stati acquisiti in modalità *positive ion*, mantenendo costanti le condizioni strumentali: tensione della sorgente, 5 kV; tensione del capillare, 46 V; flusso del gas di nebulizzazione (*sheath gas*), 40 unità arbitrarie; gas ausiliario, 10 unità arbitrarie; gas di *sweep*, 1 unità arbitraria; temperatura del capillare, 200 °C; tensione del tubo lente (*tube lens*), -105 V. Gli spettri MS/MS sono stati generati tramite dissociazione indotta da collisione (CID) nella trappola ionica lineare (LIT), utilizzando una finestra di isolamento di 3 Th (m/z). L'ampiezza dell'attivazione è stata impostata al 35% dell'ampiezza RF di espulsione, corrispondente a 1,58 V.

I dati sono stati elaborati utilizzando il software PEAKS Studio versione 4.5 (Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, Canada).

3.11 Saggi di attività enzimatica

L'attività enzimatica dell'HNE è stata valutata mediante un saggio colorimetrico basato sull'idrolisi del substrato peptidico sintetico MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-pNA, specifico per la serin-proteasi. L'idrolisi proteolitica del substrato determina il rilascio della p-nitroanilina (pNA), un gruppo cromogenico la cui formazione genera una variazione cromatica virante al giallo. L'intensità di tale colorazione, proporzionale alla quantità di pNA liberata, è stata quantificata mediante lettura spettrofotometrica a 410 nm, permettendo così di valutare indirettamente l'attività catalitica residua dell'enzima. In breve, 0,4 µg/µl di HNE sono stati incubati con diverse concentrazioni di substrato in un tampone di reazione composto da Tris 50 mM (pH 7,8) e NaCl 500 mM, per un volume finale di 200 µL. Il substrato è stato preventivamente solubilizzato in dimetilsolfossido (DMSO), come indicato dalle specifiche tecniche del produttore. Al fine di prevenire l'innescio prematuro della reazione enzimatica, l'aggiunta dell'HNE e degli eventuali inibitori è stata effettuata esclusivamente in seguito ad una fase di pre-incubazione di circa 15 minuti del tampone contenente il substrato.

La miscela è stata mantenuta a 37 °C e, a intervalli di tempo definiti (30, 45, 60 e 90 minuti), sono state prelevate delle aliquote per monitorare la cinetica di reazione. Il processo è stato arrestato mediante l'aggiunta di 20 µL di acido tricloroacetico (TCA) 0,45 M, promuovendo la denaturazione e la contestuale precipitazione delle proteine in soluzione. Dopo un passaggio di raffreddamento in ghiaccio per 30 minuti, i campioni sono stati centrifugati a 11.500 rpm per 10 minuti. Il surnatante, contenente pNA rilasciata dall'idrolisi proteolitica, è stato analizzato spettrofotometricamente misurando l'assorbanza a 410 nm, che ha fornito una stima dell'attività enzimatica. I parametri cinetici allo stato stazionario sono stati ricavati saggiando l'enzima a concentrazioni variabili di

substrato (0,075 mM-2,4 mM). Tutte le misurazioni sono state eseguite in triplicato e le costanti cinetiche sono state determinate mediante l'interpolazione dei dati secondo l'equazione di Michaelis-Menten mediante il software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, SanDiego, CA, USA). Parallelamente, l'attività dell'HNE è stata valutata in presenza dei due inibitori Alvelestat e Sivelestat a diverse concentrazioni (0,1 mM, 0,01 mM, 0,005 mM, 0,001 mM e 0,0001 mM) in presenza di una concentrazione fissa di substrato (0,15 mM). I valori di IC₅₀ sono stati stimati secondo l'equazione 1 dove A_[I] è l'attività enzimatica alla concentrazione di inibitore [I] e A_[0] è l'attività enzimatica senza inibitore.

Equazione 1

$$A_{[I]} = A_{[0]} \times \left(1 - \frac{[I]}{[I] + IC_{50}} \right)$$

Le costanti di inibizione K_i sono state determinate valutando l'attività della HNE a diverse concentrazioni di substrato e inibitori. I dati sperimentali sono stati elaborati mediante il software GraphPad Prism 8, applicando un'equazione specifica per il modello di inibizione competitiva (Equazione 2). Questo approccio ha permesso di determinare l'affinità degli inibitori per il sito attivo dell'enzima attraverso l'interpolazione non lineare dei dati cinetici.

Equazione 2

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{[S] + K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)}$$

3.12 Saggi di inibizione in presenza di H₂O₂

L'attività dell'HNE in condizioni ossidative è stata valutata mediante il saggio colorimetrico descritto in precedenza. In breve, l'HNE è stata pre-incubata con 1 µL di H₂O₂ al 30% (p/v) (concentrazione finale 44 mM in un volume totale di reazione pari a 200 µL) per 60 minuti a 37 °C. Le condizioni ossidative impiegate sono state concepite per promuovere modificazioni ossidative cumulative dell'HNE piuttosto che per riprodurre le concentrazioni fisiologiche delle ROS, consentendo di simulare uno stato di stress ossidativo tipico dei tessuti cronicamente infiammati, nei quali l'esposizione ripetuta ai ROS determina una progressiva ossidazione delle proteine.

I parametri cinetici dell'HNE ossidata sono stati determinati secondo il protocollo descritto precedentemente. Successivamente, i saggi di inibizione sono stati eseguiti avviando la reazione mediante aggiunta del substrato (concentrazione finale 0,15 mM) in presenza di concentrazioni crescenti di inibitore (0,1-100 µM). Le miscele di reazione sono quindi state incubate a 37 °C per 45 minuti, la reazione è stata bloccata mediante aggiunta di 20 µL di TCA 0,45 M ed i campioni sono stati successivamente raffreddati in ghiaccio, centrifugati e analizzati come descritto nel paragrafo 3.11. L'attività enzimatica residua (%) è stata calcolata rispetto all'attività dell'HNE in assenza di inibitore, assunta pari al 100%. Il valore minimo di attività osservato nelle condizioni sperimentali adottate è stato considerato come il livello massimo di inibizione raggiungibile nell'intervallo di concentrazioni analizzato.

3.13 Valutazione mediante spettrometria di massa della stabilità degli inibitori in condizioni ossidative

La stabilità chimica di Alvelestat e Sivelestat in condizioni ossidative è stata valutata mediante spettrometria di massa con ionizzazione elettrospray a infusione diretta (ESI-MS). Le analisi sono state eseguite

utilizzando uno spettrometro di massa expression® Compact Mass Spectrometer (CMS) (Advion Interchim Scientific, Ithaca, NY, USA), equipaggiato con sorgente ESI.

Soluzioni stock di ciascun inibitore sono state preparate in DMSO e successivamente diluite nel tampone utilizzato per i saggi di attività enzimatica fino a una concentrazione finale di 100 μ M (DMSO $\leq$ 1% v/v). Aliquote dei campioni sono state incubate in presenza o in assenza di H₂O₂ (concentrazione finale 44 mM) per 30 minuti a 37 °C, riproducendo le stesse condizioni ossidative impiegate nei saggi enzimatici.

Al termine dell'incubazione, i campioni sono stati diluiti 1:1 (v/v) con acqua contenente acido formico 0,1% e analizzati direttamente mediante ESI-MS sia in modalità di ionizzazione positiva sia in modalità di ionizzazione negativa. Gli spettri di massa sono stati elaborati utilizzando il software Mass Express, versione 5.1.

3.14 Modellistica molecolare

Gli studi di modellistica molecolare sono stati condotti in collaborazione con il Dipartimento di Scienze del Farmaco dell'Università degli Studi di Pavia

3.14.1 Docking molecolare

Le simulazioni di *docking* molecolare sono state eseguite utilizzando il software Flare (Cresset, versione 5). I modelli di partenza utilizzati sono stati recuperati dalla RCSB *Protein Data Bank* e si tratta nello specifico di due strutture cristallografiche dell'HNE: il complesso con il peptide SLPI (Inibitore della Proteasi Leucocitaria Secretoria; PDB ID: 2Z7F; risoluzione 1.70 Å) e il complesso con l'inibitore reversibile WQQ (PDB ID: 5ABW; risoluzione 1.85 Å). Per tutti i calcoli è stata selezionata la catena A, in quanto forniva informazioni strutturali complete e di elevata qualità. Eventuali atomi e catene laterali mancanti sono stati ricostruiti tramite gli strumenti di preparazione integrati di Flare.

Gli stati di protonazione dei residui ionizzabili sono stati assegnati a pH 7.4 utilizzando un algoritmo interno di predizione della pKa con conseguente aggiunta di atomi di idrogeno. La proteina è stata successivamente sottoposta a minimizzazione energetica vincolata utilizzando il campo di forza MMFF94 per attenuare i conflitti sterici locali.

Le strutture chimiche di Sivelestat e Alvelestat sono state generate tramite l'editor molecolare di Flare, mentre gli stati di protonazione e tautomeria a pH fisiologico sono stati definiti mediante il modulo Ligand Prep. Il sito di legame è stato centrato sull'atomo di ossigeno ossidrilico della Ser 195 catalitica, estendendo la griglia di *docking* fino a includere i sottositi S1-S4 e S1'-S2' (per la struttura di HNE in complesso con SLPI) e la cavità occupata dal ligando co-cristallizzato (per la struttura di HNE in complesso con WQQ). Per il *docking ensemble* sono stati utilizzati parametri standard e per ciascun ligando sono state generate dieci pose, analizzate visivamente per valutare le principali interazioni molecolari, quali legami a idrogeno, complementarità elettrostatica e contatti idrofobici.

La validazione del protocollo del flusso di lavoro di *docking* è stata effettuata mediante estrazione del ligando WQQ dalla struttura 5ABW e successivo *re-docking* nel sito di legame per l'HNE predisposto, ottenendo un RMSD (Root Mean Square Deviation) di 0.95 Å rispetto alla sua posizione co-cristallizzata e convalidando così la configurazione per il successivo *placement* e *scoring* del ligando.

3.14.2 Simulazioni di dinamica molecolare

Le simulazioni di dinamica molecolare (MD) sono state effettuate utilizzando il software GROMACS su GPU (NVIDIA GeForce RTX 3070). Il complesso proteina-ligando selezionato in base ai risultati del *docking*, è stato solvatato in una box cubica contenente acqua secondo il

modello TIP3P (*Three-site water model*), mantenendo una distanza minima di 1.0 nm tra il complesso e le pareti della box. Il sistema è stato neutralizzato mediante l'aggiunta di controioni Na^+ , e successivamente sottoposto a minimizzazione energetica fino ad una forza massima di 1000 KJ/mol/nm. Il sistema è stato equilibrato in due fasi distinte: la prima sotto condizioni di NVT (numero di particelle, volume e temperatura costanti) per 100 ps a 10 K con dinamica browniana, seguita da 12 ps con vincoli di posizione sugli atomi pesanti; la seconda sotto condizioni NPT (numero di particelle, pressione e temperatura costanti), senza vincoli, per 12 ps a 10 K e 24 ps a 300 K. La pressione è stata mantenuta costante a 1 bar utilizzando il barostato di Parrinello- Rahman, mentre per il controllo della temperatura è stato impiegato il termostato Berendsen modificato.

La simulazione MD è stata condotta per 300 ns a 300 K e 1 bar con passo di integrazione di 2 fs. Le traiettorie sono state campionate ogni 300 ps per un totale di 1000 frame.

Per valutare la stabilità del complesso proteina-ligando e identificare regioni di flessibilità conformazionale le analisi della deviazione quadratica media (RMSD) e della fluttuazione quadratica media (RMSF) sono state effettuate con strumenti di analisi GROMACS.

Per simulare l'effetto di uno stato di stress ossidativo sull'HNE, la struttura derivata dal modello cristallografico dell'elastasi complessata con SILP è stata opportunamente modificata: i ponti disolfuro Cys42-Cys58 e Cys191-Cys220 sono stati ridotti *in silico* e i residui di cisteina convertiti in acido solfonico. Anche in questo caso il sistema è stato solvatato, neutralizzato, minimizzato e sottoposto a simulazione MD in condizioni NPT per 50 ns a 310 K, applicando condizioni periodiche.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Analisi dei BALf mediante Western Blotting e LC-MS/MS

Alla luce di evidenze sperimentali che hanno dimostrato la capacità dell'HNE di formare complessi stabili con proteine infiammatorie, reagenti della fase acuta e componenti associati alle trappole extracellulari dei neutrofili (NETs) in condizioni infiammatorie [27], le interazioni dell'HNE nei BALf delle coorti di pazienti descritte nei Materiali e Metodi sono state studiate mediante un approccio proteomico integrato.

Le proteine totali del BALf sono state quantificate mediante saggio BCA e, aliquote contenenti quantità equivalenti di proteine sono state separate mediante SDS-PAGE e visualizzate con Blue Coomassie per valutare l'efficienza della separazione e individuare le regioni di interesse per le successive analisi immunochimiche e proteomiche. Tale strategia ha permesso di individuare le regioni del gel potenzialmente contenenti AAT, HNE e i relativi complessi. Come riportato nella Tabella 5, i campioni provenienti da pazienti affetti da COVID-19 hanno mostrato una concentrazione proteica media nettamente superiore rispetto alle altre coorti analizzate, verosimilmente in relazione all'intensa risposta infiammatoria e all'aumentata permeabilità della barriera alveolo-capillare caratteristiche della malattia.

Tabella 5. Concentrazione proteica dei campioni di BALf appartenenti alle diverse coorti di pazienti, determinata mediante saggio BCA. I dati sono espressi come media $\pm$ deviazione standard.

Gruppo di pazienti	n	Concentrazione proteica ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
Fibrosi polmonare	9	$0,212 \pm 0,084$
Sarcoidosi	10	$0,181 \pm 0,078$
Trapianto polmonare	9	$0,219 \pm 0,134$
COVID-19	10	$1,318 \pm 0,967$

La presenza di AAT libera e del complesso inibitorio HNE-AAT è stata inizialmente valutata mediante SDS-PAGE su gel di poliacrilammide al 12,5%, seguita da immunoblotting con anticorpi anti-AAT e anti-HNE. In queste condizioni, mentre l'immunorivelazione dell'AAT ha fornito segnali ben definiti e risolti, l'analisi dell'HNE ha evidenziato prevalentemente materiale ad elevato peso molecolare con migrazione limitata. Tale evidenza è risultata indicativa della presenza di grandi complessi contenenti HNE, scarsamente risolubili su matrici ad alta percentuale di acrilammide.

Alla luce di questi risultati, le analisi successive sono state condotte su gel di poliacrilammide all'8%, più adatti alla separazione di specie ad alto peso molecolare, consentendo una migliore migrazione, risoluzione e caratterizzazione dei complessi HNE presenti nel BALf.

Infine, per la caratterizzazione molecolare di questi complessi, le bande di interesse sono state escisse dal gel e sottoposte a digestione con tripsina, seguita da analisi mediante LC-MS/MS. Questo approccio ha consentito di identificare i partner di legame dell'HNE nei diversi fenotipi patologici analizzati.

4.1.1 Analisi dei BALf di pazienti con sarcoidosi

L'analisi del BALf dei 10 pazienti affetti da sarcoidosi (cinque campioni rappresentativi sono mostrati in Figura 19) ha evidenziato che l'AAT libera era scarsamente rilevabile in sei campioni e completamente assente nei restanti quattro. In nessun paziente è stato osservato il complesso inibitore canonico HNE-AAT di circa 80 kDa.

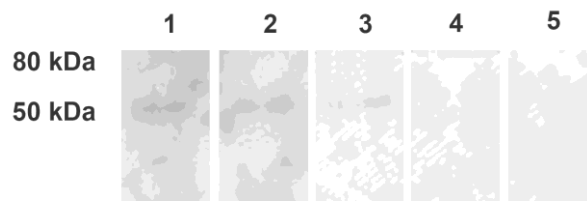


Figura 19: Western blot di campioni di BALf provenienti da 5 pazienti affetti da sarcoidosi (rappresentativi della coorte analizzata), eseguito utilizzando anticorpi anti-AAT. La banda a 50 kDa indica la presenza di AAT libera, mentre non si osserva alcun segnale a 80 kDa, in accordo con l'assenza di complessi HNE-AAT. La corsa elettroforetica è stata effettuata su gel al 12,5%.

L'analisi LC-MS/MS delle bande escisse (regioni 80 kDa e 50 kDa) ha confermato la presenza di peptidi derivati dall'AAT, verificando al contempo l'assenza di complessi inibitori stabili, suggerendo che la regolazione classica dell'HNE mediata da AAT non rappresenti il meccanismo predominante in questo contesto patologico.

La successiva immunorivelazione con anticorpi anti-HNE (Figura 20) ha mostrato in modo consistente la presenza dell'elastasi esclusivamente all'interno di assemblaggi ad elevato peso molecolare, senza evidenza di HNE libera (regione del gel corrispondente a 30 kDa).

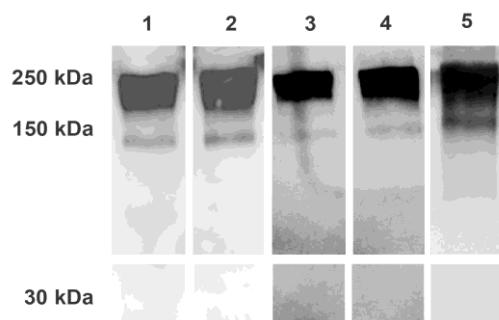


Figura 20: Western blot di campioni di BALf provenienti da 5 pazienti affetti da sarcoidosi (rappresentativi della coorte analizzata), eseguito utilizzando anticorpi anti-HNE. Le bande ad alto peso molecolare comprese tra 150 e 250 kDa indicano la presenza di HNE complessata con proteine infiammatorie. Non si osserva alcuna banda a 30 kDa, a conferma dell'assenza di HNE libera. La corsa elettroforetica è stata effettuata su gel all'8%.

La caratterizzazione proteomica di tali bande ad alto peso molecolare mediante LC-MS/MS ha identificato l'HNE in associazione con uno specifico insieme di proteine infiammatorie e immunitarie, dettagliate in Tabella 6.

Tabella 6: Principali proteine identificate mediante LC-MS/MS a seguito della digestione in-gel delle bande proteiche ad alto peso molecolare associate all'HNE.

Accession number	Gene name	Protein name	Score (%)	Coverage (%)	Peptide count
sp P01833 PIGR_HUMAN	PIGR	Polymeric immunoglobulin receptor	99	4,32	4
tr Q6NSB4 Q6NSB4_HUMAN	HP	Haptoglobin (HP protein)	91	16,01	3
sp P01024 C03_HUMAN	C3	Complement C3	99	5,17	10
sp P0C0L4 C04A_HUMAN	C4	Complement C4	86	6,12	2
sp P08246 ELNE_HUMAN	ELANE	Human Neutrophil Elastase	69	12,36	4

Tra le proteine associate all'HNE sono stati inoltre rilevati componenti delle immunoglobuline, inclusi catene leggere κ , catene γ , regioni costanti λ e domini costanti delle catene pesanti.

Se consideriamo le proteine identificate, meritano particolare attenzione l'Aptoglobina e il recettore polimerico delle immunoglobuline (pIgR). L'Aptoglobina è una proteina coinvolta nella regolazione della *clearance* dell'emoglobina libera a livello circolatorio e agisce come antiossidante, in particolar modo a livello polmonare; essa è inoltre implicata nella modulazione di alcune funzioni dei macrofagi (come la produzione di TNF- α indotta da LPS), nel rilascio di citochine da parte delle cellule T e nella proliferazione di cellule B [46-48]. Altrettanto rilevante è la presenza del pIgR, una proteina transmembrana espressa nelle mucose del tratto respiratorio, la cui funzione principale consiste nel legare le immunoglobuline polimeriche IgA e IgM per facilitarne il trasporto attraverso l'epitelio per transitosi [49].

Grazie alle analisi LC-MS/MS sono state rilevate grandi quantità di frammenti di IgA; l'HNE appare infatti in grado di clivare proteoliticamente il legame tra le immunoglobuline e il pIgR, promuovendo il rilascio di IgA e IgM polimeriche e impedendo così il loro corretto passaggio nel lume della mucosa, con una conseguente limitazione della difesa attiva contro le infezioni [50].

Nel complesso, questi risultati indicano che l'HNE risulta selettivamente incorporata in assemblaggi multiproteici, piuttosto che presente come proteasi libera e cataliticamente non regolata.

È rilevante notare come l'analisi proteomica abbia escluso la presenza di istoni extracellulari all'interno dei complessi contenenti HNE. L'assenza di istoni, unitamente alla mancanza di HNE libera e di complessi HNE-AAT, fornisce una solida evidenza biochimica contro il verificarsi di una NETosi classica. Al contrario, l'HNE appare efficacemente sequestrata, con una conseguente limitazione della sua attività proteolitica e della possibilità di danno tissutale mediato dalla cromatina.

Questo profilo molecolare risulta coerente con la patogenesi della sarcoidosi, patologia granulomatosa sostenuta prevalentemente dall'attivazione di macrofagi e linfociti T, piuttosto che da un massivo reclutamento neutrofilo e da un intenso *burst* ossidativo, condizioni tipicamente associate alla NETosi. Di conseguenza, la rilevazione di HNE sequestrata in assenza di estrusione di istoni suggerisce un coinvolgimento neutrofilo transitorio, regolato da meccanismi alternativi compatibili con un ambiente infiammatorio controllato.

4.1.2 Analisi dei BALf di pazienti con fibrosi polmonare

Le analisi sperimentali condotte sul BALf di pazienti affetti da fibrosi polmonare (n=9) hanno seguito il *workflow* sperimentale precedentemente descritto. L'immunoblotting con anticorpi anti-AAT (risultati rappresentativi in Figura 21) ha evidenziato l'assenza di AAT libera in tre

pazienti e la presenza di quantità solo residuali nei restanti sei, confermando una condizione generale di deplezione dell'antiproteasi. In nessun caso sono stati rilevati complessi inibitori HNE-AAT.

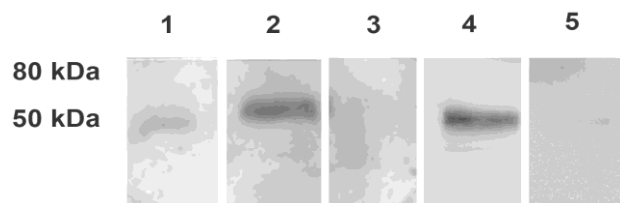


Figura 21: Western blot di campioni di BALf provenienti da 5 pazienti affetti da fibrosi polmonare (rappresentativi della coorte analizzata), eseguito utilizzando anticorpi anti-AAT. La banda a 50 kDa indica la presenza di AAT libera, mentre non si osserva alcun segnale a 80 kDa, in accordo con l'assenza di complessi HNE-AAT. La corsa elettroforetica (SDS-PAGE) è stata effettuata su gel al 12,5%.

L'analisi mediante spettrometria di massa delle bande escisse ha confermato l'identità dell'AAT residua, validando la specificità dei risultati ottenuti. In linea con quanto osservato nella coorte affetta da sarcoidosi, l'immunorivelazione con anticorpi anti-HNE (Figura 22) ha mostrato la presenza dell'elastasi esclusivamente all'interno di complessi ad elevato peso molecolare, senza evidenza di HNE libera.

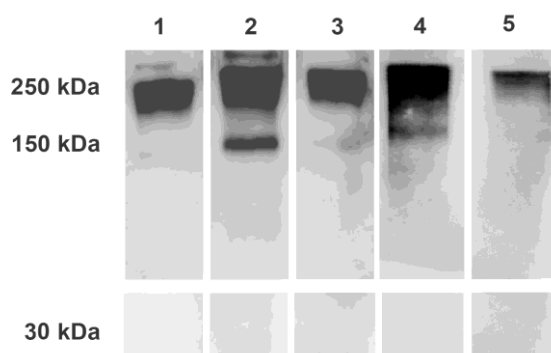


Figura 22: Western blot di campioni di BALf provenienti da 5 pazienti affetti da fibrosi polmonare (rappresentativi della coorte analizzata), eseguito utilizzando anticorpi anti-HNE. Le bande ad alto peso molecolare comprese tra 150 e 250 kDa indicano la presenza di HNE complessata con proteine infiammatorie. Non si osserva alcuna banda a 30 kDa, a conferma dell'assenza di HNE libera. La corsa elettroforetica è stata effettuata su gel all'8%.

La caratterizzazione proteomica di tali complessi ha confermato l'associazione dell'HNE con lo stesso pattern di proteine infiammatorie e immunitarie rilevate nei pazienti con sarcoidosi e, in modo rilevante, l'assenza di istoni extracellulari.

Nel complesso, questi risultati supportano un modello in cui l'attività dell'HNE nella fibrosi polmonare risulta efficacemente controllata mediante il suo sequestro in assemblaggi multiproteici, piuttosto che attraverso la classica inibizione mediata dall'AAT. L'assenza di evidenze di NETosi classica appare coerente con il quadro patogenetico della malattia, caratterizzata prevalentemente da danno epiteliale aberrante e da una riparazione tissutale disfunzionale, piuttosto che da un'inflammazione acuta a predominanza neutrofila.

Sebbene i neutrofili contribuiscano ai processi fibrotici attraverso il rilascio di proteasi e specie reattive dell'ossigeno, i dati ottenuti suggeriscono che, in questo contesto infiammatorio cronico e di basso grado, la loro attività favorisca meccanismi di degranulazione non litica piuttosto che l'estrusione di cromatina. Tale modalità consente una compartimentazione funzionale dell'elastasi, permettendo ai neutrofili di partecipare al rimodellamento tissutale senza innescare il danno massivo mediato dalle trappole neutrofiliche extracellulari tipico delle condizioni infiammatorie acute.

4.1.3 Analisi dei BALf di pazienti riceventi di trapianto polmonare in follow-up

I campioni di BALf ottenuti da riceventi di trapianto polmonare in follow-up clinico stabile (n=9) sono stati analizzati seguendo il *workflow* sperimentale consolidato. L'immunoblotting con anticorpi anti-AAT (risultati rappresentativi in Figura 23) ha evidenziato livelli variabili di AAT libera, rilevabile in cinque pazienti, di cui due con quantità solo in tracce, e assente nei restanti quattro. In linea con quanto osservato nelle

coorti precedenti, in nessun campione sono stati identificati complessi inibitori HNE-AAT.

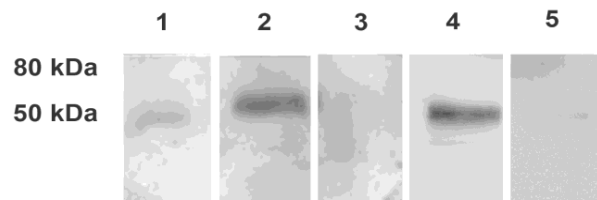


Figura 23: Western blot di campioni di BALf provenienti da 5 pazienti trapiantati in fase di follow-up (rappresentativi della coorte analizzata), eseguito utilizzando anticorpi anti-AAT. La banda a 50 kDa indica la presenza di AAT libera, mentre non si osserva alcun segnale a 80 kDa, in accordo con l'assenza di complessi HNE-AAT. La corsa elettroforetica (SDS-PAGE) è stata effettuata su gel al 12,5%.

L'immunorivelazione con anticorpi anti-HNE (Figura 24) ha confermato che l'elastasi era esclusivamente incorporata in complessi proteici ad elevato peso molecolare. L'analisi mediante spettrometria di massa ha identificato tali strutture come assemblaggi di natura infiammatoria e immunitaria e ha confermato la costante assenza sia di HNE libera sia di istoni extracellulari.

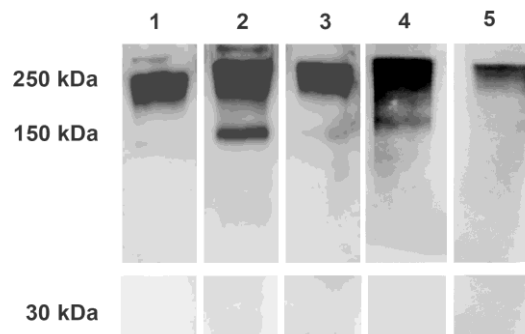


Figura 24: Western blot di campioni di BALf provenienti da 5 pazienti trapiantati in fase di follow-up (rappresentativi della coorte analizzata), eseguito utilizzando anticorpi anti-HNE. Le bande ad alto peso molecolare comprese tra 150 e 250 kDa indicano la presenza di HNE complessata con proteine infiammatorie. Non si osserva alcuna banda a 30 kDa, a conferma dell'assenza di HNE libera. La corsa elettroforetica è stata effettuata su gel all'8%.

Nel complesso, questi risultati indicano un efficace sequestro dell'elastasi in assenza di formazione di NET, in accordo con uno stato infiammatorio omeostatico o quasi omeostatico tipico dei riceventi di trapianto clinicamente stabili. In questo contesto, l'attivazione neutrofila appare strettamente regolata e contribuisce alla sorveglianza immunitaria senza evolvere verso processi di NETosi o danno tissutale mediato da proteasi. Nel loro insieme, il confronto dei dati ottenuti nelle coorti affette da sarcoidosi, fibrosi polmonare e nei riceventi di trapianto polmonare stabili dimostra che la NETosi classica non rappresenta una caratteristica universale dell'infiammazione polmonare. Al contrario, essa risulta assente in contesti cronici e regolati, nei quali l'HNE viene controllata attraverso meccanismi alternativi di sequestro piuttosto che mediante inibizione canonica o estrusione mediata dalle NET.

4.1.4 Analisi dei BALf di pazienti affetti da polmonite grave da Covid-19

L'analisi del BALf di pazienti affetti da polmonite grave da COVID-19 (n = 10) ha rivelato un profilo molecolare nettamente differente rispetto alle condizioni croniche precedentemente descritte.

L'immunoblotting con anticorpi anti-AAT (risultati rappresentativi in Figura 25) ha evidenziato elevati livelli di AAT libera in tutti i pazienti. Tuttavia, non sono stati rilevati complessi inibitori HNE-AAT, coerentemente con la nota inattivazione ossidativa dell'AAT associata a stati infiammatori gravi [29].

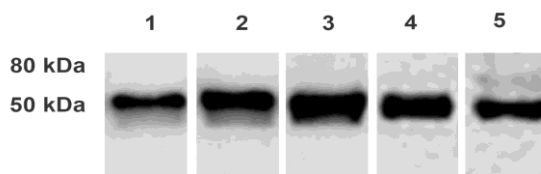


Figura 25: Western blot di campioni di BALf provenienti da 5 pazienti affetti da COVID-19 con polmonite severa (rappresentativi della coorte analizzata), eseguito utilizzando anticorpi anti-AAT. La banda a 50 kDa indica la presenza di AAT libera; in particolare, non è stato rilevato alcun segnale a 80 kDa, rivelando l'assenza di complessi inibitori stabili AAT-HNE. La corsa elettroforetica (SDS-PAGE) è stata effettuata su gel al 12,5%.

L'immunorivelazione con anticorpi anti-HNE (Figura 26) ha mostrato, a differenza delle coorti croniche, la presenza dell'elastasi sia in complessi ad alto peso molecolare sia nella sua forma libera in tutti i pazienti.

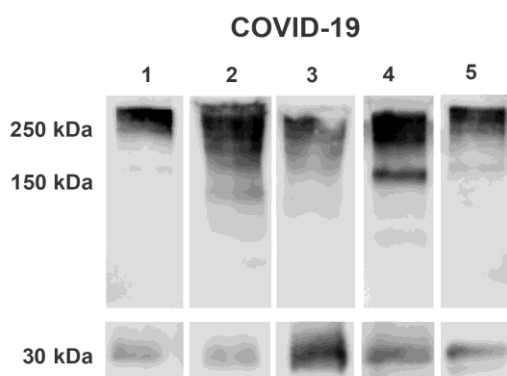


Figura 26: Western blot di campioni di BALf provenienti da 5 pazienti affetti da COVID-19 con polmonite severa (rappresentativi della coorte analizzata), eseguito utilizzando anticorpi anti-HNE. Le bande ad alto peso molecolare comprese tra 150 e 250 kDa indicano la presenza di HNE complessata con proteine infiammatorie. La banda a 30 kDa indica la presenza di HNE in forma libera. La corsa elettroforetica è stata effettuata su gel all'8%.

L'analisi proteomica dei complessi contenenti HNE ha identificato un repertorio più ampio di proteine infiammatorie e immunitarie rispetto a quanto osservato in sarcoidosi, fibrosi polmonare e trapianto polmonare, come riportato in Tabella 7.

Tabella 7: Principali proteine identificate mediante LC-MS/MS a seguito della digestione in-gel delle bande proteiche ad alto peso molecolare associate all'HNE.

Accession number	Gene name	Protein name	Score (%)	Coverage (%)	Peptide count
tr Q19KS2 Q19KS2_HUMAN	LTF	Lactoferrin	92	3,68	2
sp P61626 LYSC_HUMAN	LYZ	Lysozyme C	99	23,65	5
sp P02790 HEMO_HUMAN	HPX	Hemopexin	99	8,44	4
tr Q8WW76 Q8WW76_HUMAN	FGA	Fibrinogen alpha chain	99	20,18	6
sp P01833 PIGR_HUMAN	PIGR	Polymeric immunoglobulin receptor	99	4,32	4
tr Q6NSB4 Q6NSB4_HUMAN	HP	Haptoglobin (HP protein)	91	16,01	3
sp P01024 CO3_HUMAN	C3	Complement C3	99	5,17	10
tr H9KV48 H9KV48_HUMAN	SERPINC1	Plasma protease C1 inhibitor	90	5,18	4
sp P62807 H2B1C_HUMAN	H2BC4	Histone H2B	99	35,71	7
tr B2R5B3 B2R5B3_HUMAN	H2AFB1	Histone H2A	99	16,92	4
sp P62805 H4_HUMAN	H4C1	Histone H4	99	45,63	7
sp P08246 ELNE_HUMAN	ELANE	Human Neutrophil Elastase	69	12,36	4

Oltre alle proteine già identificate nei pazienti descritti precedentemente, un caso di particolare rilievo è rappresentato dalla lattoferrina (LF), una proteina che svolge un ruolo cruciale nella difesa dell'ospite grazie alle sue proprietà antibatteriche, antivirali, antifungine, antinfiammatorie e anticancerogene [51]. La LF è notoriamente associata ai NETs e, grazie alla sua capacità di sequestrare il ferro, crea microambienti sideropenici che inibiscono la crescita batterica. Parallelamente, è stato osservato come la LF possa sopprimere il rilascio dei NETs stessi, formando una sorta di "guscio" attorno ai neutrofili attivati; tali proprietà la rendono un inibitore intrinseco del rilascio di NETs nel circolo, suggerendo un suo ruolo centrale nel controllo della risposta immunitaria [52]. Inoltre, la LF mostra una spiccata attività antivirale contro un ampio spettro di virus a DNA e RNA [53].

Nel contesto specifico della difesa contro il SARS-CoV-2, la lattoferrina non agisce solo sequestrando il ferro e le molecole infiammatorie che aumentano drasticamente durante la tempesta citochinica, ma interviene bloccando l'ingresso del virus nelle cellule dell'ospite, impedendone l'attacco iniziale e l'accumulo sulla membrana cellulare. Risulta quindi logico ipotizzare che, se tale proteina venisse interamente o parzialmente legata dall'HNE nei complessi ad alto peso molecolare, la sua disponibilità per la difesa dell'organismo contro l'attacco virale risulterebbe significativamente ridotta.

Un altro partner molecolare identificato di grande interesse è l'emopexina (HPX), una proteina la cui sintesi è indotta in seguito a eventi infiammatori [54] e che possiede un'altissima affinità per il gruppo eme. Se presente in concentrazioni adeguate, l'HPX lega il gruppo eme bloccando la produzione di citochine pro-infiammatorie, responsabili dell'insufficienza multiorgano [55]. In questo modo, l'HPX riduce la risposta infiammatoria secondaria all'accumulo di eme, esercitando un ruolo protettivo fondamentale nelle patologie croniche delle vie aeree.

A differenza di quanto osservato nelle altre coorti, nei pazienti COVID-19 sono stati inoltre rilevati istoni extracellulari (H2A, H2B, H4), che rappresentano una firma biochimica tipica della NETosi. Questi risultati forniscono una solida evidenza biochimica di un'intensa attivazione neutrofila e della formazione attiva di NET nel compartimento alveolare. La concomitante presenza di HNE libera e AAT libera, in assenza di formazione di complessi inibitori stabili, evidenzia un disaccoppiamento funzionale dell'asse proteasi-antiproteasi, coerente con l'inattivazione ossidativa dell'AAT.

In sintesi, a differenza dell'attivazione regolata osservata in sarcoidosi, fibrosi e trapianto stabile, la polmonite grave da COVID-19 grave rappresenta una condizione acuta iper-infiammatoria in cui il reclutamento neutrofilo e il *burst* ossidativo convergono per indurre una NETosi

classica. La coesistenza di istoni extracellulari, LF sequestrata e HNE non inibita crea un ambiente altamente permissivo per danni tissutali mediati da proteasi.

Complessivamente, questi dati dimostrano che la NETosi alveolare è fortemente dipendente dal contesto: essa si manifesta principalmente in condizioni acute e di elevata intensità (COVID-19 grave, ARDS), mentre rimane assente negli stati infiammatori cronici o controllati. Questa distinzione ha implicazioni rilevanti per la progettazione di strategie terapeutiche mirate a controllare l'attività dell'HNE. Nelle condizioni croniche analizzate (sarcoidosi, fibrosi polmonare e riceventi di trapianto), l'HNE risulta costantemente sequestrata all'interno di assemblaggi multiproteici, eludendo la classica regolazione mediata dall'AAT. Al contrario, la COVID-19 grave presenta un apparente paradosso funzionale: nonostante una marcata attivazione neutrofila, i complessi inibitori protettivi HNE–AAT risultano sistematicamente assenti.

4.2 Studio delle modificazioni ossidative dell'AAT

Sulla base di precedenti studi condotti presso il laboratorio dove è stato svolto il presente lavoro di tesi, relativi all'ossidazione dell'AAT in un sottogruppo di pazienti con COVID-19 [29], è stata formulata l'ipotesi che il microambiente alveolare fortemente ossidante, caratteristico della polmonite virale grave, induca un'inattivazione strutturale dell'antiproteasi specifica di questa condizione patologica.

Per verificare tale ipotesi, l'AAT è stata purificata dai campioni di BALf dei pazienti con polmonite severa da COVID-19. Al fine di mappare sistematicamente le modificazioni post-traduzionali (PTM) di natura ossidativa responsabili del collasso funzionale dell'inibitore, i campioni di BALf provenienti da pazienti affetti da sarcoidosi, fibrosi polmonare e da pazienti trapiantati in fase di follow-up sono stati utilizzati come controlli comparativi. Tale approccio è stato fondamentale per distinguere le

modificazioni ossidative comuni agli stati infiammatori polmonari da quelle peculiari ed esclusive della patogenesi da SARS-CoV-2.

4.2.1 Purificazione dell'AAT

Come precedentemente riportato nella sezione Materiali e Metodi, l'AAT è stata purificata dal BALf mediante cromatografia di affinità. Il profilo cromatografico di un campione rappresentativo di BALf da paziente COVID-19 è riportato in Figura 27.

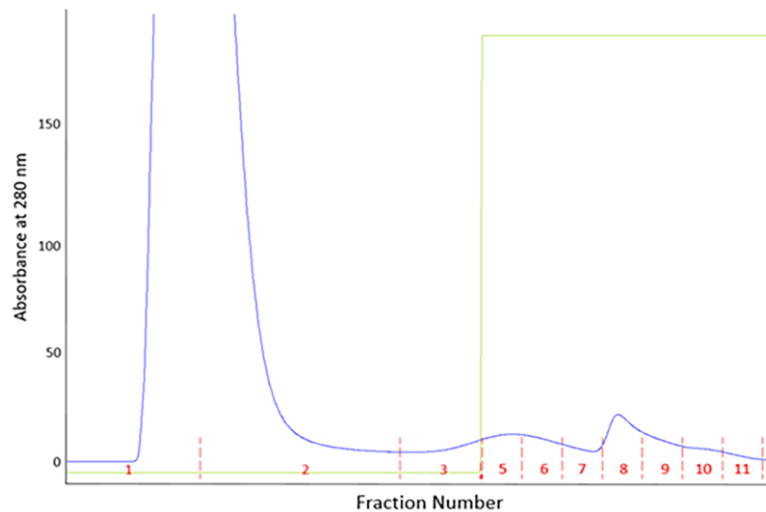


Figure 27: Profilo cromatografico della AAT purificata da campione BALf. Le frazioni dalla 8 alla 11 sono state raccolte e sottoposte a SDS-PAGE.

Al fine di garantire un input proteico comparabile e compensare la scarsa concentrazione di AAT in alcuni fenotipi, i campioni COVID-19 sono stati processati singolarmente, mentre quelli provenienti da sarcoidosi, fibrosi polmonare e riceventi di trapianto sono stati riuniti in *pools* rappresentativi. Le frazioni contenenti l'AAT purificata sono state verificate mediante SDS-PAGE e Western blot; successivamente, le frazioni positive sono state accorpate e concentrate per le analisi successive.

4.2.2 Analisi della AAT purificata tramite RP-HPLC

In conformità con le procedure descritte nella sezione Materiali e Metodi, l'analisi mediante RP-HPLC su colonna C18 è stata condotta su campioni di AAT standard, AAT standard sottoposta a ossidazione controllata e AAT purificata dai diversi gruppi di pazienti. I risultati hanno rivelato una marcata divergenza strutturale tra le condizioni analizzate (Figura 28).

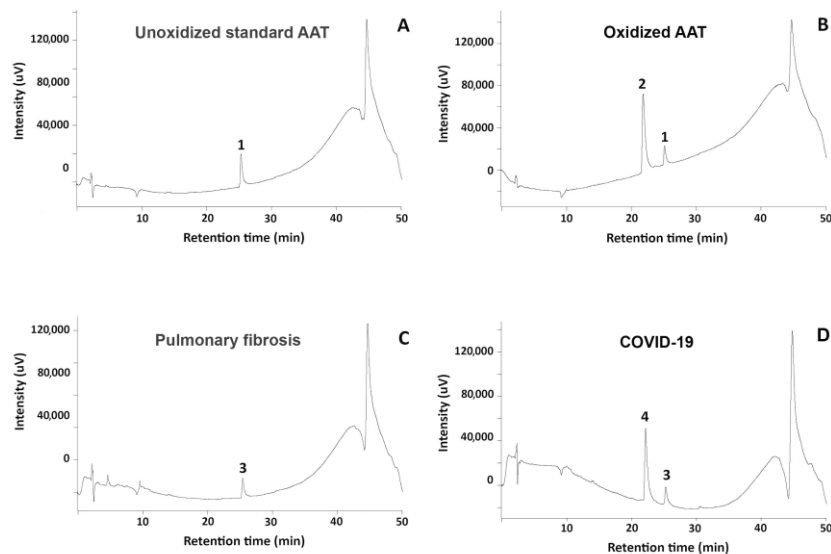


Figura 28: Profili RP-HPLC di AAT standard (pannello A), AAT standard ossidata in vitro (pannello B), AAT purificata da BALf di pazienti con fibrosi polmonare, rappresentativa dei gruppi sarcoidosi, fibrosi polmonare e trapianto di polmone (pannello C) e AAT purificata da BALf di pazienti COVID-19 (pannello D).

L'AAT standard non ossidata eluiva come un singolo picco a $24,30 \pm 0,5$ min (Pannello A). Di contro, l'AAT ossidata in vitro con H_2O_2 mostrava una caratteristica riduzione del tempo di ritenzione, con un'eluizione a $21,20 \pm 0,4$ min (Pannello B). Questo shift riflette l'aumento di polarità indotto dalle modificazioni ossidative, che riducono l'interazione della proteina con la fase stazionaria idrofobica della colonna.

L'AAT purificata dai pazienti con COVID-19 grave riproduceva fedelmente questo fenotipo ossidato (Pannello D),

mostrando il caratteristico picco anticipato (Picco 4: $21,15 \pm 0,4$ min) accanto al picco principale. In netto contrasto, il cromatogramma relativo all'AAT purificata dai pazienti con sarcoidosi, fibrosi polmonare e dai riceventi di trapianto (Pannello C) coincideva perfettamente con quello relativo ad AAT standard non ossidata, confermando l'assenza di alterazioni strutturali significative in queste patologie croniche.

4.2.3 Analisi delle modificazioni ossidative della AAT mediante spettrometria di massa

La comparsa del picco a eluizione anticipata, osservato nel profilo RP-HPLC dei pazienti COVID-19, risulta coerente con la presenza di modificazioni ossidative note per alterare il Reactive Center Loop (RCL) dell'antiproteasi. Tali alterazioni biochimiche aboliscono la capacità dell'AAT di legare e inibire l'HNE, fornendo una spiegazione meccanicistica al "paradosso" osservato nelle analisi immunoblot iniziali, in cui l'abbondanza di AAT non corrispondeva a un'efficace attività inibitoria. Per identificare i residui amminoacidici specificamente coinvolti in questo processo, il materiale sotteso ai picchi cromatografici è stato meticolosamente raccolto e sottoposto ad analisi mediante LC-MS/MS. Come riportato in Tabella 8, l'analisi spettrometrica ha permesso di mappare numerose PTM di natura ossidativa nell'AAT purificata dal BALf dei pazienti COVID-19.

Tabella 8. Analisi mediante LC-MS/MS delle frazioni corrispondenti ai picchi ottenuti mediante RP-HPLC.

Peak	Accession #	Score (%)	Coverage (%)	Description	Peptide	Mr	Start → End
1 and 3	sp P01009 A1AT_HUMAN	99	14,83	Alpha-1-antitrypsin OS=Homo sapiens	IVDLVK	685.437	169 → 174
					SVLGQLGITK	1014.61	301 → 310
					LSITGTYDLK	1109.59	291 → 300
2	sp P01009 A1AT_HUMAN	99	63,40	Alpha-1-antitrypsin OS=Homo sapiens	SPLF(OxM)GK	794.399	381 → 387
					KLSSWVLL(OxM)K	1219.7	234 → 243
					FNKPFVFL(OxM)IE QNTK	1870.965	366 → 380
					GTEAAGA(OxM)FL EAIP(OxM)SIPPEV K	2290.122	344 → 365
4	sp P01009 A1AT_HUMAN	99	23,44	Alpha-1-antitrypsin OS=Homo sapiens	LG(OxM)FNIQ(OxH)CKK	1349.65	224 → 234
					KLSSWVLL(OxM)K	1219.7	234 → 243
					GTEAAGA(OxM)FL EAIP(OxM)SIPPEV K	2290.122	344 → 365

I dati ottenuti confermano integralmente la firma molecolare precedentemente identificata per la polmonite grave da SARS-CoV-2 [29]. In particolare, è stata rilevata l'ossidazione dei residui Met351 e Met358 (sito P1), che inattiva la capacità inibitoria dell'AAT verso l'HNE, e del residuo His231. La presenza costante di His231 ossidata, assente nei controlli ossidati *in vitro* con H₂O₂, ribadisce il ruolo della mieloperossidasi (MPO) e dell'ossigeno singoletto nel microambiente alveolare COVID-19.

Al contrario, i campioni derivanti da sarcoidosi, fibrosi polmonare e trapianto non hanno mostrato alcuna ossidazione in questi siti critici. La riproducibilità di tali evidenze biochimiche nella presente coorte consolida l'ipotesi che l'inattivazione strutturale dell'AAT sia un evento patognomico della COVID-19 grave, distinguendola nettamente dalle altre condizioni infiammatorie croniche analizzate. L'ossidazione combinata dei residui metioninici del RCL, che impedisce il corretto accoppiamento inibitore–enzima, e del residuo His231, verosimilmente coinvolto nella stabilità

strutturale della proteina, spiega in modo definitivo l'assenza di complessi HNE-AAT. Nel loro insieme, questi dati identificano l'inattivazione ossidativa dell'AAT come il principale determinante della "tempesta proteolitica" osservata nel polmone dei pazienti con COVID-19 grave, sostenendo la persistenza della NETosi e il danno tissutale mediato da elastasi.

4.3 Studio comparativo degli inibitori sintetici Alvelestat e Sivelestat

La dimostrazione che lo stress ossidativo sia in grado di compromettere funzionalmente l'AAT endogena, come ampiamente discusso nei paragrafi precedenti, evidenzia una criticità terapeutica di primaria importanza nel contesto delle patologie polmonari infiammatorie. Tale osservazione ha motivato l'esplorazione di strategie alternative basate sull'impiego di inibitori sintetici a basso peso molecolare dell'HNE, potenzialmente meno suscettibili alle modificazioni ossidative che limitano l'efficacia dell'inibitore fisiologico. L'attenzione si è concentrata su due composti di particolare rilevanza clinica, ovvero Sivelestat e Alvelestat. Il primo è un inibitore covalente consolidato e ampiamente impiegato nel trattamento della sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS), mentre il secondo rappresenta una molecola di nuova generazione, caratterizzata da un legame non covalente e da un profilo farmacocinetico superiore che ne permette la somministrazione per via orale.

Alla luce della "tempesta proteolitica" e dell'intenso *burst* ossidativo documentati nella coorte di pazienti con COVID-19 grave, è risultato imprescindibile valutare in modo rigoroso se tali farmaci conservino la propria potenza inibitoria anche in condizioni di stress ossidativo. L'obiettivo è stato pertanto quello di confrontare il comportamento di Sivelestat e Alvelestat nei confronti dell'HNE nativa e ossidata, al fine di verificare se le modificazioni strutturali indotte dalle specie reattive

dell'ossigeno possano influenzare il meccanismo di inibizione e, di conseguenza, l'efficacia farmacologica dei due composti.

4.3.1 Caratterizzazione strutturale e dinamica delle modalità di legame all'HNE di Sivelestat e Alvelestat attraverso la modellistica molecolare

I *binding mode* di Alvelestat e Sivelestat sono stati delucidati mediante analisi di dinamica molecolare (MD) e seguendo un protocollo di *docking induced fit* (IFD), in modo da tener conto della flessibilità conformazionale intrinseca del sito attivo dell'HNE; è infatti ben nota l'elevata capacità adattativa della tasca di legame dell'enzima in questione [56], che può subire riarrangiamenti conformazionali rilevanti nel creare il legame con il ligando. Il *docking induced-fit* di Alvelestat sulla struttura cristallografica dell'HNE (PDB ID: 2Z7F) ha evidenziato una modalità di legame che si estende dal sottosito S1 al sottosito S4 della fessura catalitica. Il gruppo m-(trifluorometil)fenile si posiziona in maniera ottimale all'interno della tasca S1, dove stabilisce interazioni idrofobiche con Val216, Ala188, Phe192 e con la Ser195 catalitica, mentre lo *scaffold* centrale piridonico si posiziona principalmente nella tasca S2, dove forma due legami idrogeno stabili con il *backbone* della Val216. La porzione del N-metilpirazolo è orientata verso una regione più profonda della tasca S2, in accordo con un'apertura conformazionale locale di questo sottosito indotta dal legame del ligando (Figura 29).

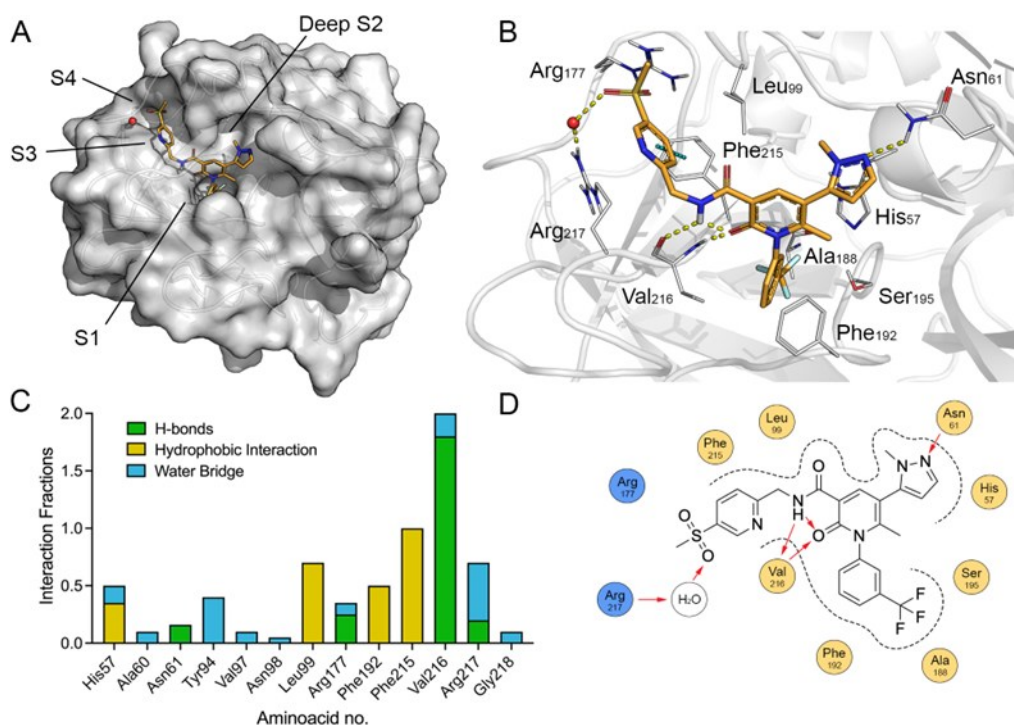


Figura 29. Panelli A e B. Predizione della binding mode di Alvelestat al sito attivo di HNE; i residui chiave sono indicati come linee grigie, i legami a idrogeno con delle linee tratteggiate gialle. Pannello C: Il grafico mostra la frazione di interazione tra Alvelestat e residui di HNE selezionati nel corso della simulazione di dinamica molecolare (MD). Pannello D: Il diagramma bidimensionale evidenzia i principali contatti formati da Alvelestat all'interno del sito attivo: azoto in blu, ossigeno in rosso, zolfo in giallo.

Per validare ulteriormente la modalità di legame prevista, sono stati condotti studi di *cross-docking* utilizzando la struttura cristallografica 5ABW dell'HNE co-cristallizzata con WQQ, un analogo strutturale di Alvelestat. I risultati hanno confermato una conformazione di legame sostanzialmente sovrapponibile a quella ottenuta sulla struttura 2Z7F. Di rilevante importanza è la presenza di una molecola d'acqua strutturata coinvolta nel mantenimento delle interazioni tra il gruppo sulfonilico di Alvelestat e Arg217, contribuendo alla stabilizzazione del legame nel sottosito S4.

La stabilità del complesso HNE-Alvelestat è stata successivamente valutata mediante simulazioni di dinamica molecolare della durata di 100 ns. Durante l'intera simulazione, il ligando ha mantenuto una conformazione stabile all'interno del sito attivo, conservando le principali

interazioni previste dagli studi di docking, inclusi i legami a idrogeno con Val216 e le interazioni con Phe215 e Arg217 (Figura 29). Nel complesso, questi risultati supportano la robustezza della modalità di legame proposta per Alvelestat e la sua elevata affinità per il sito attivo dell'HNE.

Sivelestat è un inibitore covalente reversibile, che agisce attraverso la formazione di un intermedio acil-enzima coinvolgente la Ser195 catalitica. Per caratterizzare la geometria del complesso pre-covalente, sono stati eseguiti studi di *docking induced-fit* utilizzando la struttura cristallografica dell'HNE (PDB ID: 2Z7F).

La conformazione prevista colloca il gruppo pivaloil-estere all'interno della tasca S1, dove stabilisce interazioni idrofobiche con Val216, Ala188 e Phe192, mentre la porzione aromatica e il gruppo sulfonilidico occupano rispettivamente le regioni S2 e S1' del sito attivo (Figura 30, pannelli A–D). Un elemento particolarmente rilevante è rappresentato dall'orientamento del gruppo carbonilico dell'estere, che forma legami a idrogeno con Gly193 e Ser195 all'interno del cosiddetto *oxyanion hole*, posizionando il carbonio elettrofilo in una configurazione favorevole all'attacco nucleofilo della Ser195. Il successivo docking covalente ha permesso di modellare l'intermedio acil-enzima, evidenziando una disposizione del gruppo pivaloilico coerente con quella osservata nelle strutture cristallografiche di complessi analoghi dell'elastasi (Figura 30, pannelli E–F). La stabilità del complesso pre-covalente Sivelestat-HNE è stata successivamente valutata mediante simulazioni di dinamica molecolare della durata di 100 ns (Figura 30, Pannelli C e D). Durante l'intera simulazione, il ligando ha mantenuto una configurazione stabile all'interno del sito attivo, conservando le principali interazioni con l'*oxyanion hole* e con i residui catalitici. Nel complesso, i risultati ottenuti supportano un meccanismo di inibizione basato sulla formazione di un intermedio covalente reversibile, favorito da un preciso orientamento del gruppo estereo reattivo all'interno della fessura catalitica dell'HNE.

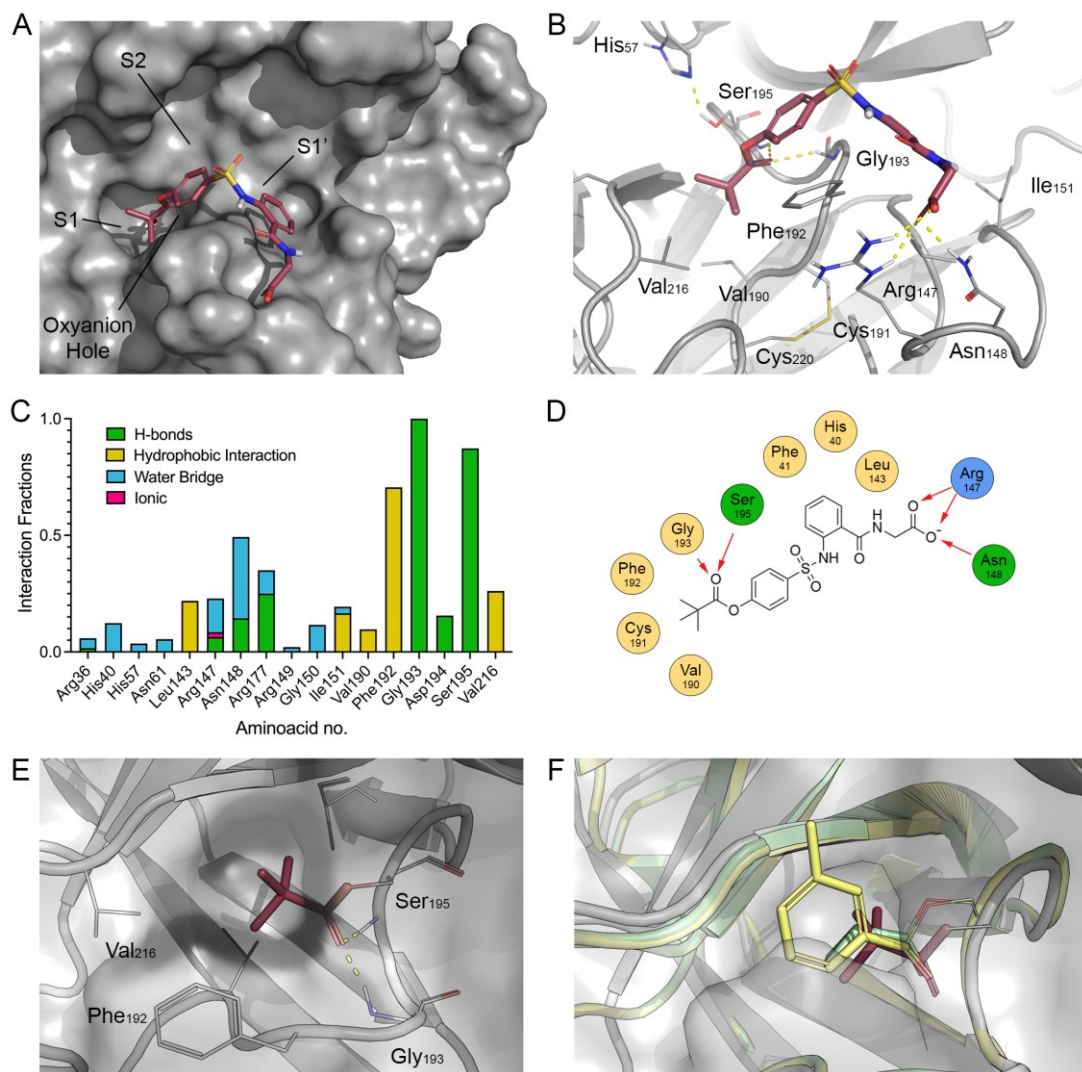


Figura 30. Analisi mediante docking e dinamica molecolare dell'interazione tra Sivelestat e HNE. (A, B) Modello del complesso pre-acilazione. (C) Frazione di interazione tra il ligando e i principali residui del sito attivo durante la simulazione. (D) Diagramma bidimensionale delle interazioni ligando-proteina. (E) Modello dell'intermedio acil-enzima ottenuto mediante docking covalente. (F) Confronto tra il complesso acilato predetto e strutture cristallografiche di riferimento. I legami a idrogeno e le interazioni π - π sono indicati rispettivamente da linee tratteggiate gialle e blu.

4.3.2 Valutazione in vitro del potere inibitorio di Alvelestat e Sivelestat nei confronti di HNE

Al fine di validare sperimentalmente le predizioni ottenute in silico, il potere inibitorio di Alvelestat e Sivelestat nei confronti dell'HNE è stato valutato utilizzando il peptide substrato sintetico Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNA. La caratterizzazione cinetica preliminare dell'HNE nativa ha evidenziato un valore di K_m di 0.30 ± 0.05 mM e un valore di K_{cat} di 15 s^{-1} , in linea con i dati riportati in letteratura per il medesimo saggio colorimetrico [57]. I successivi saggi di inibizione sono stati condotti ad una concentrazione di substrato sub-saturante (0,15 mM), per definire le concentrazioni inibitorie semimassimali (IC_{50}) (Figura 31). In queste condizioni, Alvelestat e Sivelestat hanno dimostrato di esercitare nei confronti dell'HNE una forte inibizione concentrazione-dipendente, con valori di IC_{50} rispettivamente di $2,84 \pm 0,33 \text{ } \mu\text{M}$ e $0,85 \pm 0,08 \text{ } \mu\text{M}$.

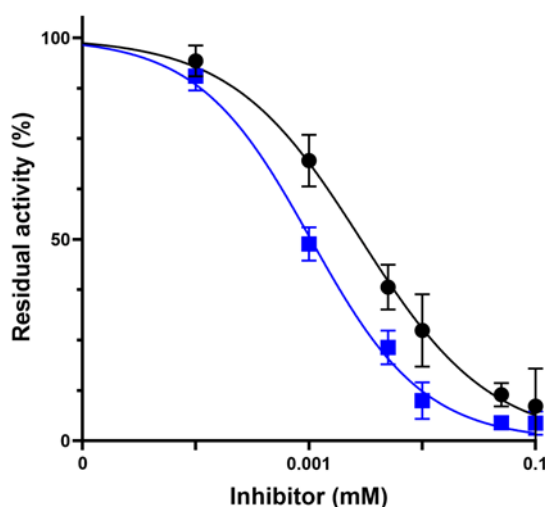


Figura 31. Determinazione dell' IC_{50} di Alvelestat (in nero) e Sivelestat (in blu) nei confronti di HNE. Per migliorare l'adattamento della curva dose-risposta e la definizione dei plateau superiore e inferiore, è stato utilizzato un ampio range di concentrazioni degli inibitori. I valori rappresentano la media $\pm$ deviazione standard di tre esperimenti indipendenti.

Al fine di elucidare ulteriormente la natura di questa inibizione, sono state eseguite analisi cinetiche allo stato stazionario utilizzando concentrazioni variabili di entrambi i composti (da 0,1 mM a 0,0001 mM).

Come mostrato in figura 32, i grafici reciproci globali di Lineweaver-Burk, esplicativi della cinetica di HNE in presenza di Alvelestat (pannello A) e Sivelestat (pannello B), hanno evidenziato come l'andamento di entrambi i composti risulti compatibile con un meccanismo di inibizione competitiva, con valori della costante di inibizione K_i rispettivamente di $11,0 \pm 0,4 \mu\text{M}$ e $7,0 \pm 0,9 \mu\text{M}$.

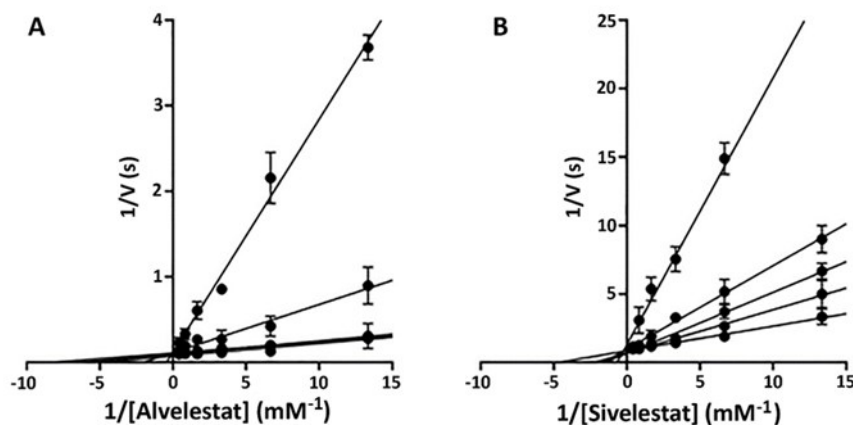


Figura 32. Grafico globale ottenuto dai dati dell'analisi cinetica allo stato stazionario di HNE in presenza di diverse concentrazioni (da $0,1 \mu\text{M}$ a $100 \mu\text{M}$) di Alvelestat e Sivelestat. È possibile osservare la convergenza delle linee di regressione in un'intercetta comune sull'asse Y. I valori rappresentano la media $\pm$ deviazione standard di tre esperimenti indipendenti.

I suddetti dati sperimentali validano i modelli di *docking* precedentemente delineati, mostrando come entrambi gli inibitori interagiscano efficacemente con il sito attivo dell'HNE; da tali analisi emerge un'apparente maggiore potenza inibitoria di Sivelestat in condizioni standard non ossidative, probabilmente correlata alla formazione dell'intermedio covalente acil-enzima, rispetto alla rete di interazioni non covalenti stabilizzanti di Alvelestat.

4.3.3 Valutazione dell'impatto dello stress ossidativo sull'inibizione di HNE e sulla stabilità enzimatica

Grazie a studi precedenti su pazienti con polmonite severa da COVID-19 [29] è stato possibile dimostrare che l'AAT, nonché inibitore fisiologico naturale dell'HNE, va incontro ad alterazioni di tipo ossidativo particolarmente impattanti che ne modificano la struttura e funzionalità. Verosimilmente queste modificazioni strutturali rappresentano la causa della mancata formazione di un complesso stabile tra l'AAT e l'HNE, favorendo un'attività proteolitica sregolata, sistemica e progressivamente degradante nei confronti del tessuto polmonare. Risulta pertanto cruciale valutare se Alvelestat e Sivelestat mantengano la loro efficacia inibitoria in condizioni di stress ossidativo. A tal fine sono stati allestiti saggi di inibizione in presenza di H_2O_2 (44 mM) così da poter riprodurre un ambiente biomimetico del contesto polmonare infiammatorio correlato alle patologie oggetto di studio. È importante sottolineare come tale concentrazione di H_2O_2 simuli un modello accelerato di danno ossidativo cumulativo piuttosto che una riproduzione diretta delle condizioni *in vivo*. Infatti, sebbene la concentrazione di H_2O_2 utilizzata ecceda i livelli micromolari transitori normalmente rilevati nei fluidi extracellulari, i ROS prodotti durante il *burst* ossidativo raggiungono concentrazioni localmente molto elevate e comprendono specie ossidanti particolarmente reattive, quali HOCl e $^1\text{O}_2$ [58], in grado di indurre modificazioni proteiche irreversibili, inclusa la sovraossidazione di residui di cisteina ad acido solfonico [59,60].

Dall'analisi del grafico riportato in figura 33 si può notare come Alvelestat mantenga pressoché inalterata la propria potenza inibitoria, sia in condizioni standard che in ambiente ossidante. Le curve dose-risposta risultano infatti sostanzialmente comparabili l'una all'altra, con un minimo spostamento dell' IC_{50} ($4,0 \pm 0,4 \mu\text{M}$ vs. $2,8 \pm 0,3 \mu\text{M}$). Questi dati

supportano pertanto l'efficacia di questo inibitore reversibile anche in presenza di un elevato stress ossidativo.

Al contrario, Sivelestat ha mostrato una marcata riduzione della propria potenza inibitoria in seguito al pretrattamento ossidativo. Pur mantenendo un'elevata efficacia nei confronti dell'HNE nativa, il composto non è stato in grado di determinare un'inibizione significativa dell'HNE ossidata, neppure alla massima concentrazione testata (100 μ M), con conseguente mantenimento di un'elevata attività enzimatica residua. Questi risultati indicano che l'ambiente ossidativo compromette selettivamente il meccanismo di inibizione di Sivelestat, senza influenzare in modo sostanziale l'attività catalitica dell'enzima.

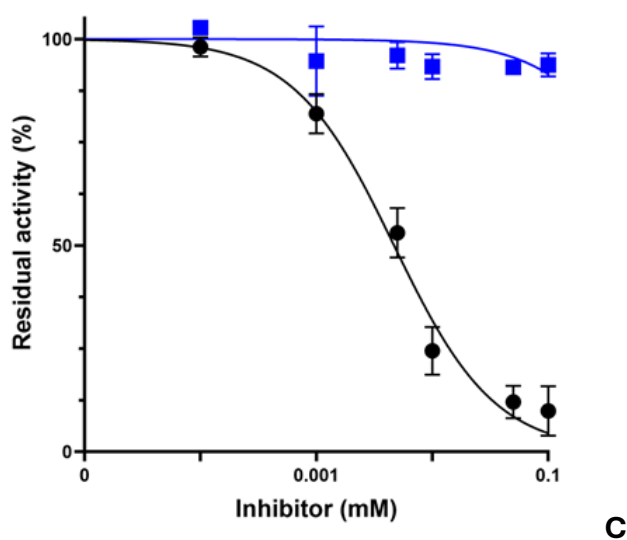


Figura 33. Determinazione dell' IC_{50} di Alvelestat (in nero) e Sivelestat (in blu)

Per verificare se il trattamento ossidativo alterasse le proprietà catalitiche intrinseche dell'HNE, i parametri cinetici allo stato stazionario sono stati determinati, dopo preincubazione dell'enzima con H_2O_2 . I valori ottenuti di K_m ($0,32 \pm 0,04$ mM) e k_{cat} (16 s $^{-1}$) erano sostanzialmente sovrapponibili a quelli rilevati in condizioni native, dimostrando come le modificazioni ossidative sembrino condizionare il meccanismo inibitorio di Sivelestat, piuttosto che la capacità catalitica intrinseca dell'HNE.

I valori dei parametri cinetici e dell'attività inibitoria, determinati in condizioni native e ossidative, sono riportati in Tabella 9.

Tabella 9: Confronto dei parametri cinetici e dell'attività inibitoria in condizioni native e ossidative

	K_m (mM)	k_{cat} (s⁻¹)	IC₅₀ Sivelestat (μM)	IC₅₀ Alvelestat (μM)	Attività enzimatica residua alla massima concentrazione di inibitore (%)
HNE nativa	0.30 ± 0.05	15	0.85 ± 0.08	2.84 ± 0.33	<20% (entrambi gli inibitori)
HNE ossidata	0.32 ± 0.04	16	>100 μM	4.0 ± 0.41	>80% (Sivelestat) <20% (Alvelestat)

Parallelamente è stata valutata la stabilità di entrambi gli inibitori in condizioni ossidanti, al fine di determinare se il razionale alla base delle diverse risposte di Sivelestat e Alvelestat risiedesse in una modificazione strutturale dell'enzima piuttosto che in una degradazione dei composti. A tal scopo entrambe le molecole sono state incubate in presenza di H₂O₂ 44 mM, utilizzando il protocollo riportato precedentemente, ma in assenza di HNE, per poi essere successivamente sottoposte a ESI-MS. Gli spettri di massa completi dei campioni trattati con H₂O₂ sono stati sovrapposti direttamente a quelli ottenuti dalle corrispondenti soluzioni degli inibitori non trattate. Sia per Alvelestat (Figura 34, pannelli A e B) sia per Sivelestat (Figura 34, pannelli C e D), i profili dei segnali m/z osservati dopo il trattamento ossidativo sono risultati identici e perfettamente sovrapponibili a quelli dei controlli, senza evidenza di picchi aggiuntivi, di variazioni sistematiche di massa riconducibili alla formazione di addotti ossidati o di frammenti di degradazione rilevabili entro i limiti di sensibilità del metodo. Pertanto, tali risultati sembrano suggerire che la motivazione più plausibile per una risposta inibitoria alterata risieda in

variazioni strutturali dell'HNE indotte dall'ossidazione piuttosto che da modificazioni dirette degli inibitori.

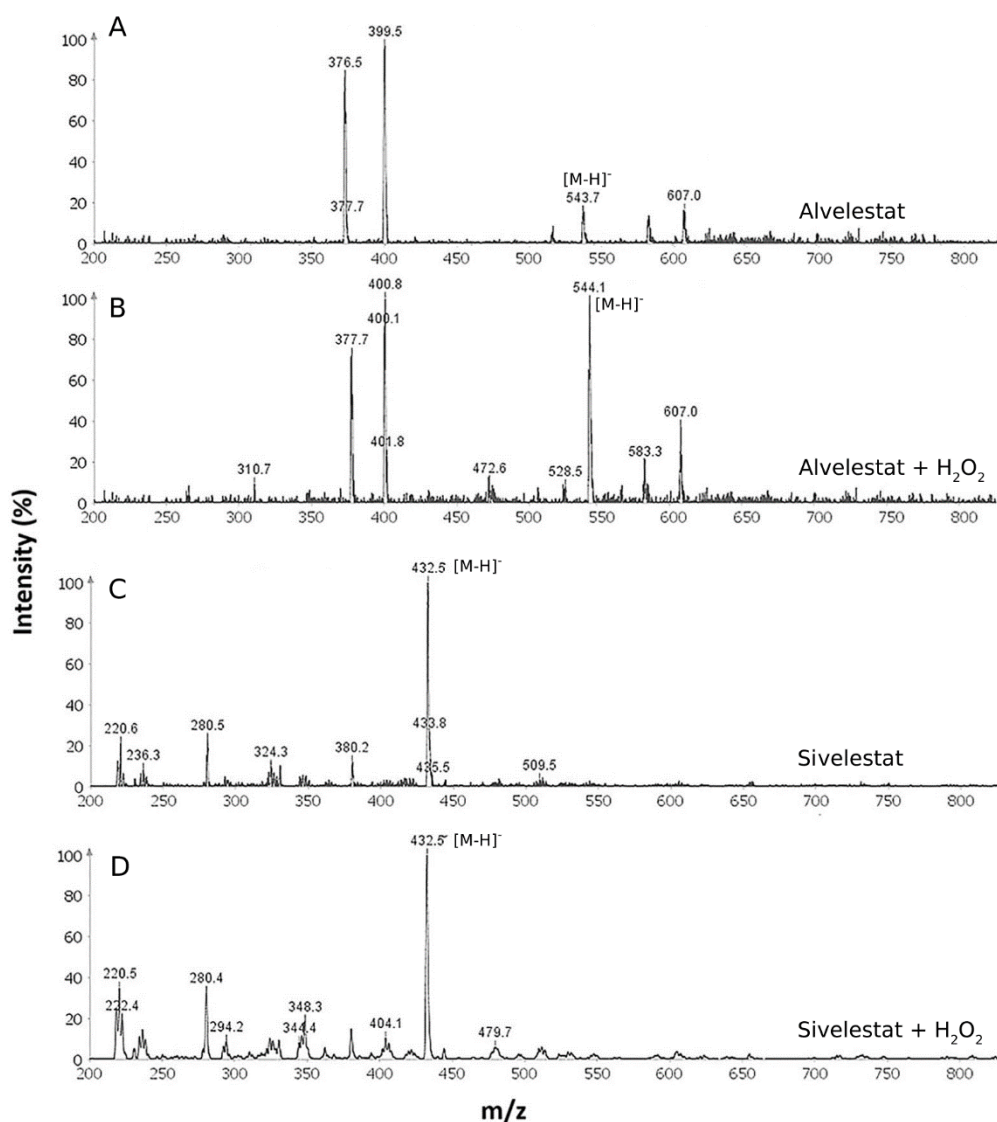


Figura 34. Spettri di massa di Alvelestat e Sivelestat in condizioni standard e in condizioni ossidative.

I residui di cisteina coinvolti nei quattro ponti disolfuro nativi dell'HNE, rappresentano potenziali bersagli di modificazioni ossidative; in condizioni di stress ossidativo prolungato possono infatti andare incontro a processi di ossidazione progressiva, con formazione di derivati solfenici e solfinici, fino alla generazione di derivati dell'acido solfonico [59]. Per valutare l'impatto di tali modificazioni sulla struttura e sulla funzione dell'enzima, sono stati sviluppati tre modelli strutturali: un modello *wild-*

type, caratterizzato dalla presenza dei quattro ponti disolfuro nativi, e due varianti ossidate, HNE_OX1 e HNE_OX2. Quest'ultime presentano modifiche selettive a carico dei ponti disolfuro Cys42-Cys58, localizzato in prossimità della triade catalitica, e Cys191-Cys220, situato nelle vicinanze della tasca S1 (Figura 35). La scelta di tali ponti disolfuro è stata dettata dalla loro posizione strategica rispetto al sito attivo, con l'obiettivo di valutare come eventi ossidativi localizzati possano influenzare la geometria catalitica e l'architettura della tasca S1.

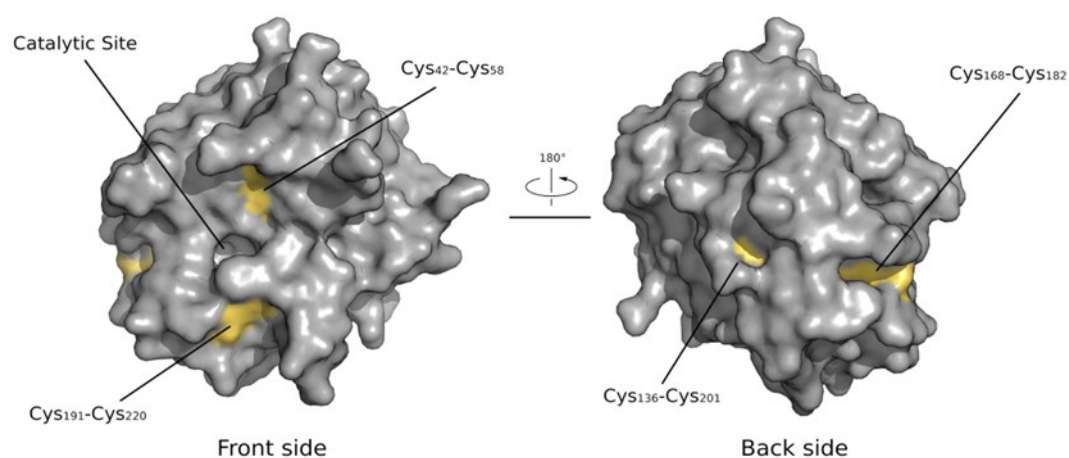


Figura 35. Struttura tridimensionale dell'HNE con evidenziati in giallo i quattro ponti disolfuro nativi. Nella vista mostrata sono visibili i ponti Cys42–Cys58 e Cys191–Cys220, situati rispettivamente in prossimità della triade catalitica e della tasca S1 e selezionati per gli studi di ossidazione. I ponti Cys136–Cys201 e Cys168–Cys182 sono invece localizzati sulla faccia opposta dell'enzima.

In ambedue i modelli, i ponti disolfuro selezionati sono stati convertiti ad acido solfonico (Cys-SO₃H), al fine di simulare una condizione di stress ossidativo severo e persistente. Le tre strutture sono state successivamente solvate in acqua esplicita, neutralizzate e sottoposte a simulazioni di dinamica molecolare. L'HNE *wild-type* ha rapidamente raggiunto l'equilibrio nei primi nanosecondi, mantenendo stabile la propria traiettoria per tutta la durata della simulazione, descrivendo una ben consolidata struttura terziaria e consistenti interazioni intramolecolari.

Nel modello HNE_OX1 l'ossidazione del ponte Cys42-Cys58 ha prodotto perturbazioni rilevabili nella struttura della triade catalitica. In particolare, la formazione di interazioni tra Ser195 e il residuo ossidato Cys42-SO₃H ha favorito il riarrangiamento locale dei residui coinvolti nella catalisi. Contrariamente, nel modello HNE_OX2 la sovraossidazione del ponte disolfuro non ha prodotto modificazioni significative nella geometria della triade catalitica che ha mantenuto caratteristiche comparabili a quelle osservate nell'enzima *wild-type*. Nonostante ciò, i valori RMSF degli atomi Ca della proteina ottenuti hanno evidenziato un aumento della mobilità nella zona limitrofa al ponte Cys191-Cys220, nel sottosito S1, mettendo in luce la presenza di perturbazioni strutturali più localizzate. Questi risultati indicano che il ponte disolfuro Cys191-Cys220 potrebbe rappresentare una regione redox-sensibile in grado di modulare la conformazione della tasca S1 e dell'*oxyanion hole*, senza compromettere in maniera sostanziale la funzionalità catalitica dell'enzima.

Per valutare l'effetto delle modificazioni ossidative sul riconoscimento degli inibitori, Sivelestat è stato sottoposto a docking sul modello HNE_OX2 e il complesso ottenuto è stato successivamente analizzato mediante simulazioni di dinamica molecolare della durata di 100 ns. Il confronto con il complesso formato dall'enzima *wild-type* ha evidenziato che, dopo una fase iniziale caratterizzata da una modalità di legame sostanzialmente conservata, il gruppo pivaloil-estere di Sivelestat tende progressivamente ad allontanarsi dalla tasca S1. Tale riarrangiamento è accompagnato dalla perdita delle interazioni con Gly193 e Ser195 all'interno della *oxyanion hole*, elementi fondamentali per il mantenimento della configurazione pre-reattiva necessaria alla formazione dell'intermedio covalente.

Parallelamente, l'aumentata flessibilità conformazionale osservata nella regione contenente il ponte disolfuro ossidato Cys191-Cys220 suggerisce che le perturbazioni strutturali localizzate del sottosito S1 possano

interferire con il corretto allineamento spaziale richiesto per il meccanismo di inibizione di Sivelestat. È importante sottolineare che tali modificazioni non sembrano compromettere in maniera significativa la funzionalità catalitica dell'enzima, ma piuttosto alterare selettivamente il riconoscimento dell'inibitore.

Contrariamente, la simulazione del complesso HNE_OX2/Alvelestat non ha mostrato variazioni significative della modalità di legame rispetto all'enzima nativo. Questo risultato suggerisce una maggiore tolleranza di Alvelestat nei confronti delle modificazioni conformazionali indotte dallo stress ossidativo, coerentemente con la sua capacità di mantenere una rete di interazioni stabile all'interno del sito attivo dell'HNE.

I risultati ottenuti suggeriscono che le modificazioni ossidative dell'HNE influenzino in maniera differenziale l'efficacia dei due inibitori studiati. Nel caso di Sivelestat, la perdita della corretta geometria del sottosito S1 e dell'*oxyanion hole* compromette la formazione della configurazione pre-reattiva necessaria all'inibizione covalente, determinando una marcata riduzione dell'attività inibitoria in condizioni ossidative. Al contrario, Alvelestat mantiene una modalità di legame sostanzialmente invariata anche in presenza delle perturbazioni strutturali indotte dall'ossidazione, mostrando una maggiore tolleranza nei confronti della flessibilità conformazionale del sito attivo.

Nel complesso, questi risultati indicano che lo stress ossidativo non compromette significativamente l'attività catalitica dell'HNE, ma può alterare selettivamente il riconoscimento degli inibitori. Sebbene Sivelestat risulti più potente nei confronti dell'enzima nativo, Alvelestat conserva la propria efficacia anche in condizioni ossidative, suggerendo un potenziale vantaggio in contesti patologici caratterizzati da infiammazione cronica e stress ossidativo elevato. Tali osservazioni evidenziano l'importanza di considerare il microambiente ossidativo nella progettazione di nuovi inibitori dell'elastasi neutrofila.

5. CONCLUSIONI

Il presente lavoro di tesi ha consentito di approfondire il ruolo dell'Elastasi Neutrofila Umana (HNE) in differenti patologie polmonari acute e croniche, evidenziando come i meccanismi che ne regolano l'attività risultino fortemente dipendenti dal contesto fisiopatologico.

L'analisi dei campioni biologici provenienti da pazienti affetti da sarcoidosi, fibrosi polmonare, sottoposti a trapianto polmonare e da pazienti con COVID-19 grave ha rivelato marcate differenze nelle modalità di interazione di HNE con le proteine presenti nel microambiente polmonare. Nelle patologie croniche e nei riceventi di trapianto, l'enzima è risultato prevalentemente associato a complessi multiproteici ad alto peso molecolare contenenti immunoglobuline, componenti del complemento, aptoglobina e pIgR, mentre il classico complesso HNE/ α 1-Antitripsina è risultato assente o scarsamente rappresentato. Questi dati suggeriscono l'esistenza di meccanismi alternativi di regolazione dell'attività proteolitica dell'enzima, basati sul suo sequestro all'interno di complessi multiproteici piuttosto che sull'inibizione diretta da parte dell'AAT.

Uno scenario differente è emerso nei pazienti affetti da COVID-19 grave, nei quali HNE è stata rilevata sia in forma libera sia complessata. L'analisi proteomica ha inoltre evidenziato la presenza di numerose proteine coinvolte nei processi infiammatori e nella risposta immunitaria, tra cui lattoferrina ed emopexina, nonché di istoni, assenti nelle altre coorti analizzate. Quest'ultima osservazione supporta il coinvolgimento della NETosi come elemento distintivo delle forme acute caratterizzate da intensa attivazione neutrofilica e marcato danno tissutale.

Particolarmente rilevanti risultano anche i dati relativi all'ossidazione dell' α 1-Antitripsina. Mentre nei pazienti con COVID-19 grave è stata confermata la presenza di modificazioni ossidative a carico dei residui

critici coinvolti nell'inibizione dell'HNE, tali alterazioni non sono state osservate nei campioni provenienti da pazienti affetti da sarcoidosi, fibrosi polmonare o sottoposti a trapianto polmonare. Questo risultato suggerisce che l'inattivazione ossidativa dell'AAT rappresenti un fenomeno strettamente associato a condizioni caratterizzate da elevato stress ossidativo e intensa risposta infiammatoria acuta.

Nel complesso, i risultati ottenuti evidenziano come l'attività dell'HNE sia modulata attraverso meccanismi differenti nelle patologie polmonari acute e croniche e sottolineano l'importanza di considerare simultaneamente processi proteolitici, risposta infiammatoria e stress ossidativo per comprendere il contributo di questo enzima alla progressione del danno polmonare.

Il secondo obiettivo della tesi ha riguardato la valutazione comparativa di due inibitori non peptidici dell'HNE, Sivelestat e Alvelestat, mediante un approccio integrato basato su modellistica molecolare, simulazioni di dinamica molecolare e saggi enzimatici condotti in condizioni native e ossidative.

Entrambi i composti hanno mostrato una significativa attività inibitoria nei confronti dell'HNE, evidenziando tuttavia differenze sostanziali nel comportamento farmacologico. In condizioni fisiologiche, Sivelestat ha dimostrato una maggiore potenza inibitoria, coerentemente con il suo meccanismo di azione basato sulla formazione di un intermedio covalente con il sito attivo dell'enzima.

Tuttavia, in presenza di stress ossidativo, la sua efficacia è risultata marcatamente ridotta. Le simulazioni molecolari hanno suggerito che le modificazioni ossidative localizzate nella regione della tasca S1 possano alterare la geometria pre-reattiva necessaria alla formazione del complesso enzima-inibitore, compromettendo selettivamente il processo di inibizione, pur senza influenzare in maniera significativa l'attività catalitica dell'HNE.

Al contrario, Alvelestat ha mantenuto una modalità di legame stabile e una significativa attività inibitoria anche nei confronti dell'enzima ossidato. Questa maggiore tolleranza alle modificazioni conformazionali del sito attivo appare compatibile con un meccanismo di riconoscimento basato su una rete più ampia di interazioni non covalenti, meno dipendente da un preciso orientamento geometrico richiesto per la formazione di un legame covalente.

Nel complesso, i risultati ottenuti evidenziano come lo stato ossidativo del microambiente possa rappresentare un fattore determinante nell'efficacia degli inibitori dell'HNE. Sebbene Sivelestat risulti più potente nei confronti dell'enzima nativo, Alvelestat conserva la propria attività anche in condizioni ossidative, suggerendo un potenziale vantaggio nei contesti patologici caratterizzati da intensa infiammazione neutrofilica e stress ossidativo. Queste osservazioni contribuiscono alla comprensione dei meccanismi che regolano l'interazione tra HNE e i suoi inibitori e forniscono indicazioni utili per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche rivolte alle patologie polmonari infiammatorie.

6. PROSPETTIVE FUTURE

I risultati ottenuti nel corso di questo studio suggeriscono che le caratteristiche strutturali e funzionali degli inibitori dell'HNE rivestano un ruolo determinante nel mantenimento dell'efficacia farmacologica in contesti caratterizzati da elevato stress ossidativo. In particolare, il confronto tra Sivelestat e Alvelestat ha evidenziato come la natura delle interazioni ligando-enzima possa influenzare in maniera significativa la risposta all'ossidazione del sito attivo, fornendo indicazioni utili per la progettazione di nuove molecole inibitorie.

In quest'ottica, future attività di ricerca potrebbero essere orientate allo sviluppo di composti capaci di combinare l'elevata potenza inibitoria osservata per Sivelestat con la maggiore tolleranza alle modificazioni ossidative mostrata da Alvelestat.

L'ottimizzazione degli *scaffold* molecolari e delle modalità di interazione con il sito attivo dell'HNE potrebbe infatti consentire l'ottenimento di inibitori caratterizzati da un migliore equilibrio tra affinità di legame, selettività e stabilità funzionale.

Sebbene i risultati ottenuti in vitro forniscano indicazioni incoraggianti, ulteriori studi saranno necessari per valutarne la rilevanza biologica e il potenziale traslazionale. In particolare, sarà importante verificare il comportamento di tali composti in modelli cellulari e animali di patologia polmonare infiammatoria, al fine di approfondirne le proprietà farmacocinetiche e farmacodinamiche e di confermarne l'efficacia in sistemi biologici più complessi.

Infine, considerando il ruolo centrale svolto da infiammazione, stress ossidativo e attività proteolitica nella progressione di numerose patologie respiratorie, potrebbe risultare di interesse valutare strategie terapeutiche integrate che associno l'inibizione dell'HNE ad approcci antinfiammatori o antiossidanti.

La combinazione di interventi rivolti a differenti meccanismi patogenetici potrebbe infatti contribuire a migliorare il controllo del danno tissutale e della risposta infiammatoria in condizioni caratterizzate da elevata complessità biologica.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Eichelberger KR, Goldman WE. Manipulating neutrophil degranulation as a bacterial virulence strategy. *PLoS Pathog.* **2020**;16(12):e1009054.
- [2] Faurschou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.* **2003**;5(14):1317-1327.
- [3] Liang X, Li Y, Tang Z, Luo Y, Liu Y. Neutrophils as key drivers of pulmonary fibrosis: unveiling mechanisms and therapeutic implications. *Front Immunol.* **2025**;16:1718092.
- [4] Lodge KM, Cowburn AS, Li W, Condliffe AM. The Impact of Hypoxia on Neutrophil Degranulation and Consequences for the Host. *Int J Mol Sci.* **2020**;21(4):1183.
- [5] Cowland JB, Borregaard N. Granulopoiesis and granules of human neutrophils. *Immunol Rev.* **2016**;273(1):11-28.
- [6] Hoenderdos K, Lodge KM, Hirst RA, Chen C, Palazzo SG, Emerenciana A, Summers C, Angyal A, Porter L, Juss JK, O'Callaghan C, Chilvers ER, Condliffe AM. Hypoxia upregulates neutrophil degranulation and potential for tissue injury. *Thorax.* **2016**;71(11):1030-1038.
- [7] Chiang CC, Korinek M, Cheng WJ, Hwang TL. Targeting Neutrophils to Treat Acute Respiratory Distress Syndrome in Coronavirus Disease. *Front Pharmacol.* **2020**;11:572009.
- [8] Torfs K, Vermeersch G, Gouwy M, Devos T, Proost P, Struyf S. Neutrophils as critical orchestrators of chronic inflammation. *Cell Mol Immunol.* **2026**;23(2):123-149.
- [9] Porto BN, Stein RT. Neutrophil Extracellular Traps in Pulmonary Diseases: Too Much of a Good Thing?. *Front Immunol.* **2016**;7:311.
- [10] Kaplan MJ, Radic M. Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *J Immunol.* **2012**;189(6):2689-2695.

- [11] Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin?. *J Cell Biol.* **2012**;198(5):773-783.
- [12] Voynow JA, Shinbashi M. Neutrophil Elastase and Chronic Lung Disease. *Biomolecules.* **2021**;11(8):1065.
- [13] Liana P, Liberty IA, Murti K, Hafy Z, Salim EM, Zulkarnain M, Umar TP. A systematic review on neutrophil extracellular traps and its prognostication role in COVID-19 patients. *Immunol Res.* **2022**;70(4):449-460.
- [14] Ocampo-Gallego JS, Pedroza-Escobar D, Caicedo-Ortega AR, Berumen-Murra MT, Novelo-Aguirre AL, de Sotelo-León RD, Delgadillo-Guzmán D. Human neutrophil elastase inhibitors: Classification, biological-synthetic sources and their relevance in related diseases. *Fundam Clin Pharmacol.* **2024**;38(1):13-32.
- [15] Crocetti L, Quinn MT, Schepetkin IA, Giovannoni MP. A patenting perspective on human neutrophil elastase (HNE) inhibitors (2014-2018) and their therapeutic applications. *Expert Opin Ther Pat.* **2019**;29(7):555-578.
- [16] Sinha S, Watorek W, Karr S, Giles J, Bode W, Travis J. Primary structure of human neutrophil elastase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1987**;84(8):2228-2232.
- [17] Belperio JA, Fishbein MC, Abtin F, Channick J, Balasubramanian SA, Lynch Iii JP. Pulmonary sarcoidosis: A comprehensive review: Past to present. *J Autoimmun.* **2024**;149:103107.
- [18] Al-Kuraishy HM, Al-Gareeb AI, Al-Hussaniy HA, Al-Harcen NAH, Alexiou A, Batiha GE. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) and Covid-19: A new frontiers for therapeutic modality. *Int Immunopharmacol.* **2022**;104:108516.
- [19] Korkmaz-Icöz S, Szabó G, Geldon A, McDonald PP, Dashkevich A, Yildirim AÖ, Korkmaz B. Protective effects of neutrophil serine protease inhibition against ischemia-reperfusion injury in lung or heart transplantation. *FEBS J.* **2025**;292(22):5877-5887.

- [20] Borges L, Pithon-Curi TC, Curi R, Hatanaka E. COVID-19 and Neutrophils: The Relationship between Hyperinflammation and Neutrophil Extracellular Traps. *Mediators Inflamm.* **2020**;2020:8829674.
- [21] Nelson D.L, Michael M Cox. I principi di biochimica di Lehninger, Zanichelli, settima edizione, capitolo 6, 218-219
- [22] Viglio S, Iadarola P, D'Amato M, Stolk J. Methods of Purification and Application Procedures of Alpha1 Antitrypsin: A Long-Lasting History. *Molecules.* **2020**;25(17):4014.
- [23] Berger M, Liu M, Uknis ME, Koulmanda M. Alpha-1-antitrypsin in cell and organ transplantation. *Am J Transplant.* **2018**;18(7):1589-1595.
- [24] Lechowicz U, Rudzinski S, Jezela-Stanek A, Janciauskiene S, Chorostowska-Wynimko J. Post-Translational Modifications of Circulating Alpha-1-Antitrypsin Protein. *Int J Mol Sci.* **2020**; 21(23):9187.
- [25] Huntington JA, Carrell RW. The serpins: nature's molecular mousetraps. *Sci Prog.* **2001**;84(Pt 2):125-136.
- [26] Gooptu B, Ekeowa UI, Lomas DA. Mechanisms of emphysema in alpha1-antitrypsin deficiency: molecular and cellular insights. *Eur Respir J.* **2009**;34(2):475-488.
- [27] D'Amato M, Vertui V, Pandolfi L, Bozzini S, Fossali T, Colombo R, Aliberti A, Fumagalli M, Iadarola P, Didò C, Viglio S, Meloni F. Investigating the Link between Alpha-1 Antitrypsin and Human Neutrophil Elastase in Bronchoalveolar Lavage Fluid of COVID-19 Patients. *Curr Issues Mol Biol.* **2022**;44(5):2122-2138.
- [28] Liang CC, Zhao J, Zhang YQ, Chen J, Wang Y. Research progress on the effect of neutrophil elastase and its inhibitors in respiratory diseases. *J Int Med Res.* **2025**;53(6):3000605251352789.
- [29] D'Amato M, Campagnoli M, Iadarola P, Bignami PM, Fumagalli M, Chiarelli LR, Stelitano G, Meloni F, Linciano P, Collina S, Pietrocola G, Vertui V, Aliberti A, Fossali T, Viglio S. Could the Oxidation of α 1-Antitrypsin Prevent

the Binding of Human Neutrophil Elastase in COVID-19 Patients?. *Int J Mol Sci.* **2023**; 24(17):13533.

[30] Nelson D.L., Michael M Cox. I principi di biochimica di Lehninger, Zanichelli, settima edizione, capitolo 19, 753.

[31] Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis K, Loridas S. Pulmonary oxidative stress, inflammation and cancer: respirable particulate matter, fibrous dusts and ozone as major causes of lung carcinogenesis through reactive oxygen species mechanisms. *Int J Environ Res Public Health.* **2013**;10(9):3886-3907.

[32] Grignano MA, D'Amato M, Gregorini M, Rampino T, Iadarola P, Viglio S. Can Proteomics Play a Significant Role in the Identification of Biomarkers for Alpha1-Antitrypsin Deficiency?. *Int J Mol Sci.* **2025**;26(11):5085.

[33] <https://www.mereobiopharma.com/>

[34] Chen CH, Crisford H, Scott A, Sapey E, Stockley RA. A novel *in vitro* cell model of the proteinase/antiproteinase balance observed in alpha-1 antitrypsin deficiency. *Front Pharmacol.* **2024**;15:1421598.

[35] Viglio S, Bak EG, Schouten IGM, Iadarola P, Stolk J. Protease-Specific Biomarkers to Analyse Protease Inhibitors for Emphysema Associated with Alpha 1-Antitrypsin Deficiency. An Overview of Current Approaches. *Int J Mol Sci.* **2021**;22(3):1065.

[36] Watz H, Nagelschmitz J, Kirsten A, Pedersen F, van der Mey D, Schwes S, Bandel TJ, Rabe KF. Safety and efficacy of the human neutrophil elastase inhibitor BAY 85-8501 for the treatment of non-cystic fibrosis bronchiectasis: A randomized controlled trial. *Pulm Pharmacol Ther.* **2019**;56:86-93.

[37] Singh V, Kumar Y, Bhatnagar S. Robustaflavone as a novel scaffold for inhibitors of native and auto-proteolysed human neutrophil elastase. *SAR QSAR Environ Res.* **2024**;35(8):729-756.

[38] National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 107706, Sivelestat.

- [39] Xie W, Chen X, Wang Q, Yan C, Liu Y, Zhang M, Sun Y, Yan X, Guo B, Chen B. Sivelestat sodium: a novel therapeutic agent in a mouse model of acute exacerbation pulmonary fibrosis through multiple mechanisms. *J Thorac Dis.* **2025**;17(7):5024-5043.
- [40] Zhang XY, Chen H. Efficacy of sivelestat sodium for patients with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: a protocol for systematic review and meta-analysis. *Syst Rev.* **2026**;15(1):86.
- [41] Aikawa N, Kawasaki Y. Clinical utility of the neutrophil elastase inhibitor sivelestat for the treatment of acute respiratory distress syndrome. *Ther Clin Risk Manag.* **2014**;10:621-629.
- [42] National Center for Biotechnology Information, PubChem Compound Summary for CID 46861623, Alvelestat
- [43] Li H, Zhou X, Tan H, Hu Y, Zhang L, Liu S, Dai M, Li Y, Li Q, Mao Z, Pan P, Su X, Hu C. Neutrophil extracellular traps contribute to the pathogenesis of acid-aspiration-induced ALI/ARDS. *Oncotarget.* **2017**;9(2):1772-1784.
- [44] Wells JM, Titlestad IL, Tanash H, Turner AM, Chapman KR, Hatipoğlu UŞ, Goldklang MP, D'Armiento JM, Pirozzi CS, Drummond MB, Barjaktarevic IZ, Chatila WM, Devine MS, Strange C, Sandhaus RA, Parkin JM, Westfall E, Lin VY, Parks R, Kuo HC, Ekue A, Moffitt KL, Inshaw J, Aban I, Dransfield MT, Stockley RA. Two randomised controlled phase 2 studies of the oral neutrophil elastase inhibitor alvelestat in alpha-1 antitrypsin deficiency. *Eur Respir J.* **2025**;66(6):2501019.
- [45] Di Venere M, Fumagalli M, Cafiso A, De Marco L, Epis S, Plantard O, Bardoni A, Salvini R, Viglio S, Bazzocchi C, Iadarola P, Sassera D. Ixodes ricinus and Its Endosymbiont Midichloria mitochondrii: A Comparative Proteomic Analysis of Salivary Glands and Ovaries. *PLoS One.* **2015**;10(9):e0138842.
- [46] Masi A, De Simone G, Ciaccio C, D'Orso S, Coletta M, Ascenzi P. Haptoglobin: From hemoglobin scavenging to human health. *Mol Aspects Med.* **2020**;73:100851.

- [47] Naryzny SN, Legina OK. Haptoglobin as a Biomarker. *Biochem Mosc Suppl B Biomed Chem.* **2021**;15(3):184-198.
- [48] Schaer DJ, Vinchi F, Ingoglia G, Tolosano E, Buehler PW. Haptoglobin, hemopexin, and related defense pathways-basic science, clinical perspectives, and drug development. *Front Physiol.* **2014**;5:415.
- [49] Wei H, Wang JY. Role of Polymeric Immunoglobulin Receptor in IgA and IgM Transcytosis. *Int J Mol Sci.* **2021**;22(5):2284.
- [50] Pilette C, Ouadrhiri Y, Dimanche F, Vaerman JP, Sibille Y. Secretory component is cleaved by neutrophil serine proteinases but its epithelial production is increased by neutrophils through NF-kappa B- and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanisms. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **2003**;28(4):485-498.
- [51] Kell, D.B.; Heyden, E.L.; Pretorius E. The Biology of Lactoferrin, an Iron-Binding Protein That Can Help Defend Against Viruses and Bacteria. *Front Immunol* **2020**, *11*, 1221.
- [52] Kühnle, A.; Lütteke, T.; Bornhöfft, K.F.; Galuska, S.P. Polysialic Acid Modulates the Binding of External Lactoferrin in Neutrophil Extracellular Traps. *Biology (Basel)* **2019**, *8*(2), 20.
- [53] Redwan, E.M.; Uversky, V.N.; El-Fakharany, E.M.; Al-Mehdar, H. Potential lactoferrin activity against pathogenic viruses. *C R Biol* **2014**, *337*(10), 581–595.
- [54] Tolosano, E.; Altruda, F. Hemopexin: structure, function, and regulation. *DNA Cell Biol* **2002**, *21*(4), 297-306.
- [55] Sirivongrangson P, Kulvichit W, Payungporn S, Pisitkun T, Chindamporn A, Peerapornratana S, Pisitkun P, Chitcharoen S, Sawaswong V, Worasilchai N, Kampunya S, Putcharoen O, Thawitsri T, Leelayuwatanakul N, Kongpolprom N, Phoophiboon V, Sriprasart T, Samransamruajkit R, Tungsanga S, Tiankanon K, Lumlertgul N, Leelahavanichkul A, Sriphojanart T, Tantawichien T, Thisyakorn U, Chirathaworn C, Praditpornsilpa K, Tungsanga K, Eiam-Ong S,

Sitprija V, Kellum JA, Srisawat N. Endotoxemia and circulating bacteriome in severe COVID-19 patients. *Intensive Care Med Exp* **2020**, *8(1)*, 72.

[56] Hansen, G.; Gielen-Haertwig, H.; Reinemer, P.; Schomburg, D.; Harrenga, A.; Niefind, K. Unexpected active-site flexibility in the structure of human neutrophil elastase in complex with a new dihydropyrimidone inhibitor. *J. Mol. Biol.* **2011**, *409*, 681–691.

[57] Viglio, S.; Zanaboni, G.; Luisetti, M.; Cetta, G.; Guglielminetti, M.; Iadarola, P. Micellar electrokinetic chromatography: a convenient alternative to colorimetric and high performance liquid chromatographic detection to monitor protease activity. *Electrophoresis* **1998**, *19*, 2083–208.

[58] Lin W, Chen H, Chen X, Guo C. The Roles of Neutrophil-Derived Myeloperoxidase (MPO) in Diseases: The New Progress. *Antioxidants (Basel)*. **2024**;13(1):132.

[59] Garrido Ruiz D, Sandoval-Perez A, Rangarajan AV, Gunderson EL, Jacobson MP. Cysteine Oxidation in Proteins: Structure, Biophysics, and Simulation. *Biochemistry*. **2022**;61(20):2165-2176.

[60] Peskin AV, Winterbourn CC. Kinetics of the reactions of hypochlorous acid and amino acid chloramines with thiols, methionine, and ascorbate. *Free Radic Biol Med*. **2001**;30(5):572-579.