

Giovanni Russo
Dipartimento di Chimica Organica e Industriale
Università di Milano
giovanni.russo@unimi.it

VACCINI SACCARIDICI DI NUOVA CONCEZIONE

Contributo della Chimica organica

Si descrivono vaccini di nuovo tipo formati da sistemi polivalenti in cui antigeni sintetici e adiuvanti sono legati a nuclei centrali costituiti da oro, dendrimeri o nanoparticelle magnetiche. Come antigeni vengono descritti analoghi dell'unità ripetitiva del batterio *Neisseria meningitidis* tipo A.

Tra le applicazioni biomediche dei derivati di carboidrati, un settore di importante sviluppo è rappresentato dall'utilizzo di polisaccaridi capsulari batterici (CPSs) nella preparazione di vaccini. Infatti, è noto che il 40% dei casi di mortalità infantile provocata da infezioni può essere ricondotta ai soli batteri capsulari *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* e *Haemophilus influenzae* type b. I vaccini già ottenuti contro questi batteri, basati su frammenti puri-

ficati dei loro CPSs, hanno però mostrato una scarsa immunogenicità e non sono in grado di generare una memoria immunologica nei bambini al di sotto dei due anni di età [1], che rappresentano il gruppo maggiormente a rischio per queste infezioni. Una possibile soluzione a questo problema è quella di preparare glicoconiugati nei quali la porzione saccaridica sia legata ad una proteina carrier che ne amplifichi le proprietà immunogeniche. I vaccini a base di glicoconiugati sono però difficilmente caratterizzabili, e la necessità pressante di disporre, per le formulazioni farmaceutiche di vaccini, di composti puri e di struttura definita richiede l'utilizzo della sintesi chimica per fornire frammenti di CPSs dotati di

un elevato grado di purezza. I composti di sintesi infatti offrono i vantaggi di avere una formulazione nota e riproducibile, una composizione definita e una buona stabilità alla conservazione.

Un altro problema dei vaccini a base di carboidrati è la loro frequente instabilità chimica ed enzimatica. Nel caso dei CPSs di *Streptococcus* e *Neisseria* sopra menzionati, l'instabilità chimica è dovuta al ponte fosfodiesterico che unisce due unità ripetitive del CPS. È quindi necessaria la sintesi di strutture modificate (analoghi) che siano dotati delle proprietà biologiche dei composti naturali ma abbiano una maggiore stabilità chimica.

Un ulteriore aspetto riguardante i vaccini a

Al prof. Giovanni Russo è stata conferita la medaglia "Adolfo Quilico" 2006 dalla Divisione di Chimica organica della SCI.

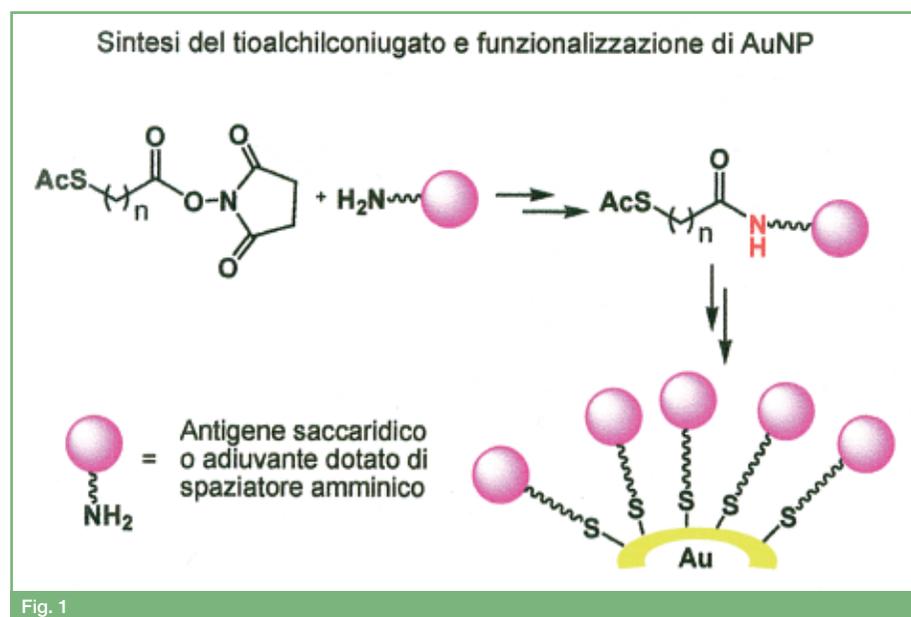
base di carboidrati è costituito dall'interazione tra un singolo epitopo e il suo recettore presente sulle cellule dendritiche (DCs) del sistema immunitario; tale interazione risulta spesso troppo debole per indurre una forte risposta immunitaria innata. Infatti, è noto che le catene saccaridiche, per essere immunogeniche, hanno bisogno di un certo numero di unità monosaccaridiche (dieci o più). In natura, l'aumento di affinità tra due ligandi è ottenuto attraverso la multivalenza: la reale trasmissione del segnale, piuttosto che derivare da una singola interazione carboidrato-proteina, è data quindi da strutture oligomeriche di epitopi saccaridici e ligandi. Tale fenomeno, noto come "cluster glycoside effect" [2], si manifesta anche nei CPS antigenici dei batteri capsulari, che sono costituiti da sequenze di unità ripetitive che possono essere considerate come "clusters".

Nella preparazione di farmaci sintetici, è possibile ottenere una multivalenza realizzando strutture saccaridiche oligomeriche che, dai dati pubblicati, hanno mostrato una maggiore attività rispetto ai corrispondenti ligandi monovalenti [3].

Un ultimo punto da considerare riguarda l'impiego di "adiuvanti". Infatti, la risposta all'attacco di patogeni da parte del sistema immunitario avviene attraverso due vie, denominate "risposta innata" e "risposta adattiva" (antigene-specifica). La prima [4], mediata dalle *antigen presenting cells* (APCs), rappresenta la prima linea di difesa immunitaria; si esplica nelle prime fasi dell'infezione (entro pochi minuti) mediante il riconoscimento di strutture molecolari presenti sull'agente patogeno (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs). Queste strutture, strutturalmente e chimicamente eterogenee, hanno la prerogativa

di essere ampiamente conservate nei patogeni ma assenti nelle cellule dell'organismo ospite. La risposta adattiva, mediata dai linfociti T e B, riconosce invece i patogeni con un'affinità altamente specifica, consentendo così l'eliminazione completa dell'agente patogeno e la generazione della memoria immunologica. Questo tipo di risposta avviene generalmente in tempi che vanno da alcuni giorni a poche settimane. Il riconoscimento dei PAMPs attiva il sistema immunitario innato inducendo una rapida attivazione di entrambe le risposte

necessario all'attivazione e alla differenziazione delle cellule T e all'avvio della risposta immunitaria di tipo adattivo. Per ottenere un'efficace protezione, un vaccino di nuova generazione dovrebbe comprendere un componente (adiuvante) in grado di attivare il meccanismo di riconoscimento antigene-indipendente proprio della risposta innata. A seconda della loro struttura, gli adiuvanti potrebbero stimolare le DCs legando uno o più TLRs, incrementando così la velocità e la durata della risposta immunitaria.



immunitarie. Le APCs (in particolare le cellule dendritiche, DCs) rappresentano un importante legame tra i due tipi di risposte. Esse riconoscono numerose strutture presenti sui PAMPs attraverso diversi recettori. Tra questi, particolarmente interessante è la famiglia di recettori Toll-like (TLRs), di recente scoperta [5]. Attivati dai PAMPs, questi recettori avviano il processo di maturazione delle DCs, che a loro volta creano il contesto pro-infiammatorio

Gli adiuvanti possono essere suddivisi in due categorie: sistemi di trasporto e immunostimolatori [4, 6]. Mentre i sistemi di trasporto aumentano la concentrazione locale dei componenti del vaccino, dirigendoli in particolare verso le APCs, gli immunostimolatori attivano direttamente queste cellule attraverso recettori specifici (per esempio i TLRs), inducendo la maturazione delle DCs e amplificando la risposta immunitaria innata. È possibile ottenere un'efficiente

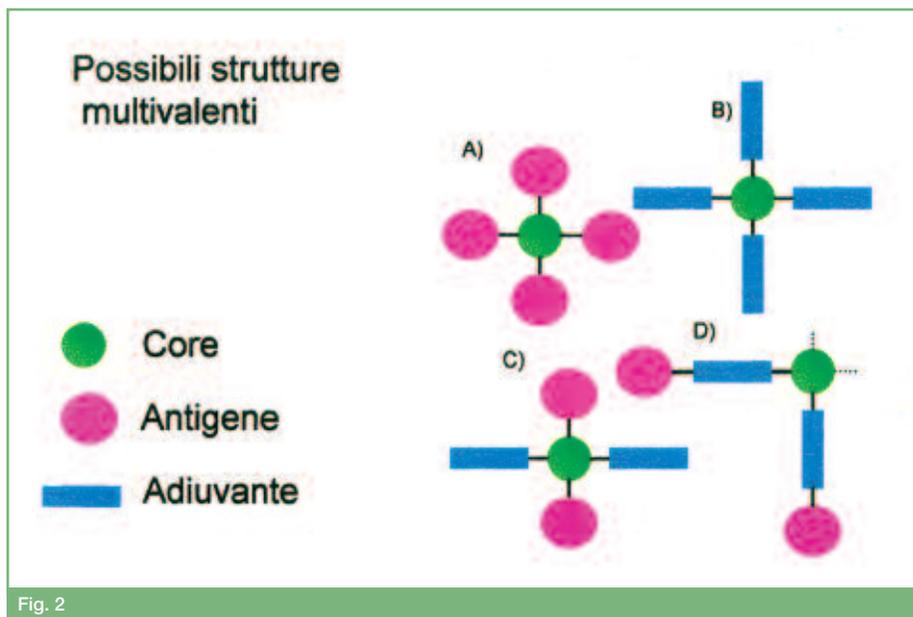


Fig. 2

attivazione del sistema immunitario anche somministrando strutture supramolecolari contenenti sia l'antigene che l'opportuno adiuvante.

Il core

Esistono diverse strutture in grado di presentare i leganti in forma multivalente.

A) Le nanoparticelle colloidali d'oro (AuNP) hanno suscitato negli ultimi anni un notevole interesse come nuovi sistemi per applicazioni nel campo della chimica supramolecolare, del riconoscimento molecolare, della biologia e della catalisi [7]. Inoltre, le AuNP sono state recentemente utilizzate per l'imaging cellulare, il trasporto di farmaci, la diagnostica e la terapia oncologica [8]. Le AuNP possono costituire degli eccellenti scaffold, essendo stabili sia in solventi polari che apolari. Inoltre esse sono facilmente funzionalizzabili e in grado di generare strutture multivalenti per auto-assemblaggio. In particolare, le AuNP funzionalizzate con oligosaccaridi formano

una superficie a glicocalice, di forma globulare e con composizione chimica ben definita, in grado di mimare la presentazione di cluster saccaridici (Fig. 1). Queste gliconanoparticelle (AuGNP), inoltre, sono molto solubili in acqua e stabili a lungo nelle

condizioni fisiologiche e, per questa ragione, costituiscono un nuovo strumento polivalente e tridimensionale per lo studio dei fenomeni di riconoscimento molecolare che coinvolgono carboidrati [9]. AuNP ricoperte di un monostrato di molecole organiche sono facilmente ottenibili per riduzione di composti di Au^{III} in presenza di lunghe catene di alcantioli: i nanocluster colloidali così ottenuti sono stabili e dotati di una dispersione ridotta, a causa della forte affinità tra Au e S. Sfruttando la capacità delle AuGNP di esporre uno strato multivalente e tridimensionale di carboidrati le AuNP possono essere decorate con: a) antigeni oligosaccaridici; b) molecole adiuvanti; c) una combinazione di a) e b) (Fig. 2). Per prima cosa, l'antigene saccaridico (o l'adiuvante) viene coniugato ad un linker bifunzionale tioalchilico S-protetto. Quindi il glicoconiugato viene utilizzato per funzionalizzare la superficie esterna di AuNP.

B) I dendrimeri sono una seconda classe di scaffold polifunzionali che vengono utilizza-

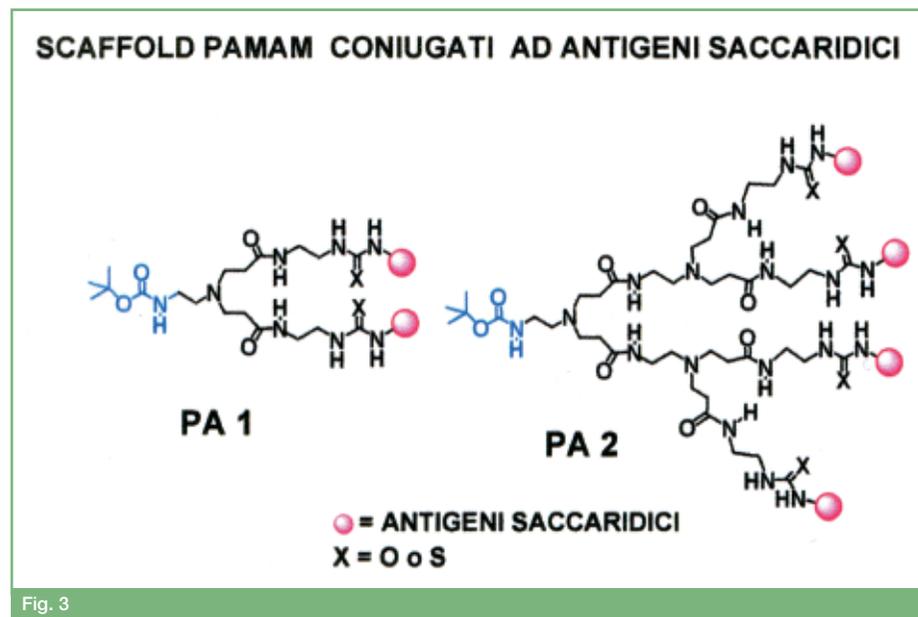
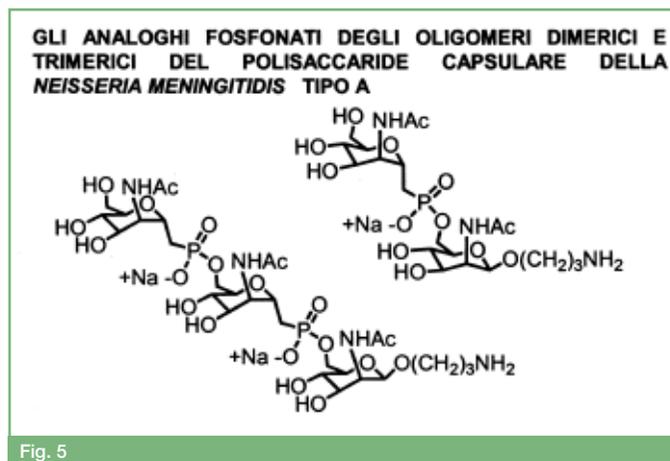
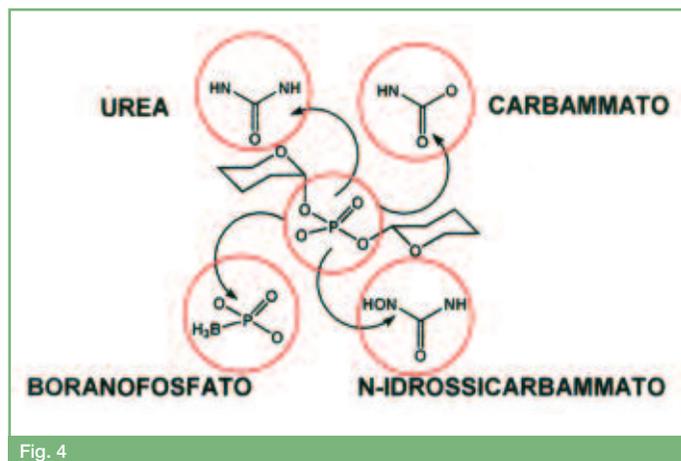


Fig. 3



ti per formare sistemi polivalenti. I dendrimeri sono composti macromolecolari caratterizzati da una serie di ramificazioni del core centrale e sono stati recentemente utilizzati come sistemi di trasporto per lo studio e la modulazione dei processi biologici [10]. I dendrimeri recanti molecole saccaridiche nella propria struttura sono definiti "glicodendrimeri". Questi ultimi sono stati utilizzati per numerose applicazioni di interesse biologico, tra cui lo studio delle interazioni proteine-carboidrati coinvolte in molti fenomeni di riconoscimento molecolare [11]. Il PAMAM (dendrimerico poli-ammidoamminico) è un tipico esempio di scaffold dendritico da decorare con antigeni saccaridici. Questi composti (Fig. 3), contenenti due (PA1), quattro (PA2) e otto (PA3) ramificazioni, sono disponibili per la coniugazione con l'antigene saccaridico attraverso legami ureidici o tioureidici. È da sot-

tolinare che il secondo gruppo amminico del core del PAMAM (evidenziato in blu nella Fig. 3) può essere deprotezionato ed utilizzato per la coniugazione a proteine immunogeniche (BSA, KLH) o a molecole adiuvanti.

C) Tra i vari core impiegati come supporto per la presentazione multivalente di antigeni e adiuvanti possono essere impiegate anche delle nanoparticelle superparamagnetiche. Si tratta essenzialmente di particelle di diametro da 5 a 100 nm, costituite da ossido di ferro monocristallino che può variare, a seconda dell'utilizzo, da Fe_3O_4 (magnetite) a $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (maghemite), per citare le forme più comunemente utilizzate. Il vantaggio nell'impiego delle nanoparticelle a base di ossido di ferro (SPION: SuperParamagnetic Iron Oxide Nanoparticles) risiede nelle loro proprietà magnetiche, che le

rendono particolarmente efficienti come sonde per la risonanza magnetica di immagine (MRI). Negli ultimi anni, infatti, le SPION si sono affermate come agenti cosiddetti "teranostici", essendo in grado di svolgere simultaneamente azione terapeutica e funzione diagnostica [12]. Infine, è stato dimostrato che tali nanoparticelle sono altamente biocompatibili, andando ad accrescere in modo insensibile il patrimonio di ferro dell'organismo. Pertanto, questi sistemi possono essere utilizzati sia per lo studio della localizzazione ed internalizzazione dei leganti che per l'analisi della distribuzione e del funzionamento dei target macromolecolari a livello di singola molecola e/o in colture di cellule intere. Inoltre, la multivalenza imposta dalla geometria della nanoparticella provoca un sostanziale aumento di affinità dei leganti, generando materiali

Saccharide Vaccines of New Type. A Contribution from Organic Chemistry

ABSTRACT

A novel concept of saccharide vaccines is described. These are formed by multivalent and multi-functional systems in which synthetic antigens and adjuvants of the immune system are linked to a central core of Au nanoparticles, dendrimers, or magnetic Fe oxides nanoparticles. A family of synthetic antigens formed by analogues of the repeating unit of the bacterium *Neisseria meningitidis* type A is described.

ideali per il targeting cellulare e l'imaging ad alta risoluzione di tessuti e di molecole. Possono essere ottenute nanoparticelle costituite da un core metallico e da un rivestimento (guscio) ottenuto tramite funzionalizzazione con molecole organiche. Tali nanoparticelle metalliche possono essere coniugate ad antigeni e/o ad adiuvanti. In questo modo è possibile ottenere strutture stabili dotate di funzionalità miste e ampia applicazione (es. esposizione simultanea di molecole adiuvanti e antigeni). Le SPION possono essere preparate in sospensione acquosa rivestite di matrice di destrano con funzionalità carbossiliche pronte per la coniugazione. Il vantaggio di queste particelle consiste nel fatto che esse hanno già dimostrato alta biocompatibilità e circolazione *in vivo* per circa 24-48 ore, tempo di vita ideale per lo sviluppo di un farmaco [13].

L'adiuvante

Si possono considerare come adiuvanti sia i sistemi di trasporto che i sistemi in grado di potenziare la risposta immunitaria. Le strutture chimiche degli adiuvanti sono

molteplici, andando dai lipopeptidi semplici, ai cluster glicopeptidici e agli adiuvanti commercialmente disponibili quali il monofosforil lipide A (MPL) e alcuni dei suoi potenti analoghi amminoalchil glucosaminide-4-fosfati (AGPs).

L'antigene

A partire dalla nostra esperienza nella sintesi di analoghi di carboidrati [14], abbiamo progettato la sintesi di frammenti stabili e strutturalmente definiti del polisaccaride naturale del batterio *Neisseria meningitidis* serotipo A (MenA), come anche la sintesi dei suoi glicconiugati con proteine immunogeniche.

Il serotipo A del *Neisseria meningitidis* (con unità ripetitiva monosaccaridica 6-alfa-D-(ManpNAC-1-PO₄-) presenta un'intrinseca instabilità chimica ed enzimatica della porzione saccaridica, principalmente imputabile alla labilità del ponte fosfodiesterico tra la posizione anomeric di un residuo saccaridico e un ossidrile del residuo successivo. È stata quindi realizzata una serie di monosaccaridi analoghi dell'unità ripetitiva del MenA dotati di sistemi analoghi stabili del ponte fosfato, atti a rendere stabile il

legame tra le unità saccaridiche ripetitive. In tali sistemi il ponte fosfato tra due unità saccaridiche è sostituito dal ponte borano-fosfato, dal ponte ureidico, dal ponte carbammato e dal ponte N-idrossicarbammato (Fig. 4).

Inoltre, sono stati sintetizzati oligomeri dell'analogo fosfonato del polisaccaride capsulare del *Neisseria meningitidis* serotipo A (Fig. 5).

Tali analoghi presentano una maggior stabilità rispetto agli oligomeri naturali, grazie alla sostituzione del fosfato che lega le unità ripetitive di N-acetil mannosammina del polimero naturale, con il più stabile fosfonato [15]. Essi recano inoltre in posizione anomeric un residuo amminopropilico che li rende coniugabili con le strutture di core. In questo contesto è in fase avanzata di realizzazione la sintesi di analoghi in cui viene modificata la struttura del sistema saccaridico ciclico. Ad esempio, verrà effettuata la sintesi di un sistema carbociclico in cui la sostituzione dell'ossigeno endociclico con un CH₂ stabilizza il legame fosfodiesterico sul carbonio anomeric, consentendo così la sintesi di oligomeri stabili.

Bibliografia

- [1] H.J. Jennings, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 1983, **41**, 155.
- [2] J.J. Lundquist, E.J. Toone, *Chem. Rev.*, 2002, **102**, 555.
- [3] a) K. Kakaota *et al.*, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2001, **47**, 113; b) K.E. Uhrich, *et al.*, *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 3181; c) E.E. Simanek *et al.*, *Chem. Rev.*, 1998, **98**, 833; d) U. Boas, M.H. Heegard, *Chem. Rev. Soc.*, 2004, **33**, 43.
- [4] D.T. O'Hagan, N.M. Valiante, *Nat. Rev.*, 2003, **2**, 727.
- [5] K. Takeda *et al.*, *Annu. Rev. Immunol.*, 2003, **21**, 335.
- [6] a) M. Singh, D.T. O'Hagan, *Pharm. Res.*, 2002, **19**, 715; b) R. McGeary *et al.*, *J. Peptide Sci.*, 2003, **9**, 405.
- [7] M.-C. Daniel, D. Astruc, *Chem Rev.*, 2004, **104**, 293 e riferimenti citati.
- [8] B.D. Chithrani *et al.*, *Nano Lett.*, 2006, **6**, 662 e riferimenti citati.
- [9] a) J.M. De la Fuente *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2001, **40**, 2258; b) J. Rojo *et al.*, *ChemBioChem*, 2004, **5**, 291.
- [10] a) M.J. Cloninger, *Curr. Op. Chem. Biol.*, 2002, **6**, 742 e riferimenti citati; b) S. Oruganti *et al.*, *Org. Biomol. Chem.*, 2005, **3**, 4252; c) M.L. Wolfenden, M.J. Cloninger, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 12168.
- [11] J.J. Lundquist, E. Toone, *Chem. Rev.*, 2002, **102**, 555.
- [12] A. Ito *et al.*, *J. Biosci. Bioengineer.*, 2005, **100**, 1.
- [13] R. Weissleder *et al.*, *Radiology*, 1990, **175**, 489.
- [14] a) F. Casero *et al.*, *J. Org. Chem.*, 1996, **61**, 3428; b) L. Lay *et al.*, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1997, 1469; c) U. Tedbark *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1998, **39**, 1815.
- [15] M.I. Torres-Sanchez *et al.*, *Synlett*, 2005, 1147.