

Rappresentazione schematica di un glicocongiugato

Francesco Berti, Paolo Costantino
 Novartis Vaccines and Diagnostics - Research
 Siena
 francesco.berti@novartis.com

VACCINI GLICOCONIUGATI

Il successo ottenuto dai vaccini glicocongiugati negli ultimi trent'anni ha portato a considerarli tra i più sicuri ed efficaci vaccini attualmente disponibili per la prevenzione di infezioni batteriche. Nuove tecnologie per migliorare ancora di più questi vaccini sono inoltre in fase di sviluppo.

I vaccini glicocongiugati rappresentano oggi uno degli strumenti più efficaci e sicuri per la prevenzione di infezioni batteriche prodotte ad esempio da *Haemophilus influenzae* tipo b, e diversi serotipi di *Streptococcus pneumoniae* e di *Neisseria meningitidis*.

Questi vaccini sono composti da un antigene saccaridico scarsamente immunogenico, generalmente un polisaccaride capsulare o un frammento di minore lunghezza ottenuto talvolta anche attraverso sintesi chimica, che, una volta legato covalentemente ad una proteina carrier, incrementa significativamente la propria immunogenicità. L'effetto della coniugazione chimica consente di convertire la risposta verso l'antigene saccaridico da T-indipendente a T-dipendente: l'aptene saccaridico per sé contiene epitopi, vale a dire parti dell'antigene, che sono riconosciuti dal sistema immunitario attraverso cellule B ma non attraverso le cellule T. Sebbene tale concetto sia noto dalla fine degli anni Venti [1], vaccini composti da soli polisaccaridi furono sviluppati fino alla fine degli anni Settanta, culminando nella registrazione di vaccini anti-meningococco e anti-pneumococco. A partire dagli anni Ottanta, in particolare per merito del gruppo di J.B. Robbins (NIH), lo sviluppo dei vaccini glicocongiugati ebbe un nuovo impulso che culminò con la registrazione del primo vaccino contro *Haemophilus influenzae* tipo b tra il 1987 e il 1990 [2-5]. Successivamente altri vaccini glicocongiugati preparati a partire da polisaccaridi batterici di *Neisseria meningitidis* e *Streptococcus pneumoniae* o prodotti con oligosaccaridi sintetici (*Haemophilus influenzae* tipo b) sono stati registrati [6-8], ed altri sono in fase di sviluppo clinico (i.e. Group B *Streptococcus*) [9]. Due principali approcci sono stati applicati per la coniugazione chimica covalente dell'aptene alla proteina

carrier, il primo basato sull'attivazione random di gruppi idrossilici o carbossilici presenti lungo la catena polisaccaridica nativa o leggermente ridotta mediante trattamento chimico, seguita dalla coniugazione a gruppi amminoacidici reattivi (ϵ -NH₂ di lisina, COOH di acido aspartico e acido glutammico, SH di cisteina) (Fig. 1A), il secondo basato sull'introduzione di una funzionalità reattiva al terminale riducente di oligosaccaridi più corti, in precedenza generati mediante trattamento chimico (Fig. 1B), oppure ottenuti per sintesi chimica (Hib) (Fig. 1C) [6, 8]. Un nuovo approccio chiamato bio-coniugazione (Fig. 1D), basato su

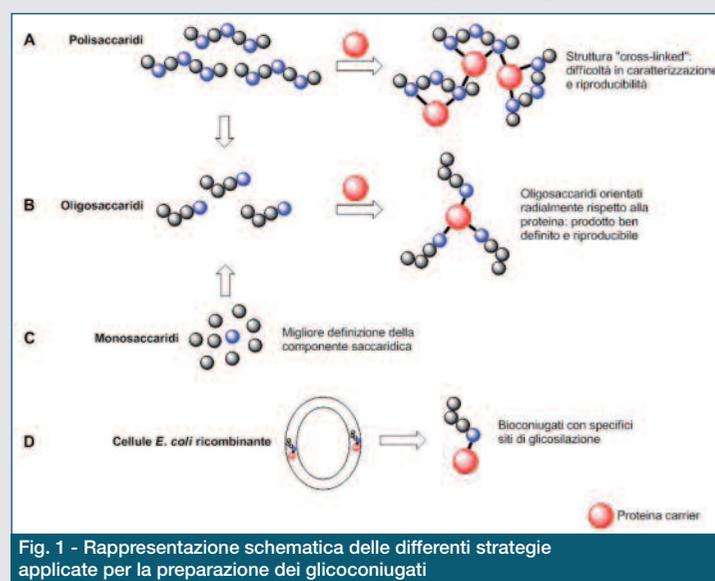


Fig. 1 - Rappresentazione schematica delle differenti strategie applicate per la preparazione dei glicocongiugati

Questo contributo è stato presentato alla VII edizione della manifestazione "Incontro con l'Università, il CNR e l'Industria", svoltasi lo scorso febbraio a Milano e avente per tema "Sintesi e metodologie innovative in chimica organica", organizzata dal Dipartimento di Chimica Organica e Industriale dell'Università di Milano.

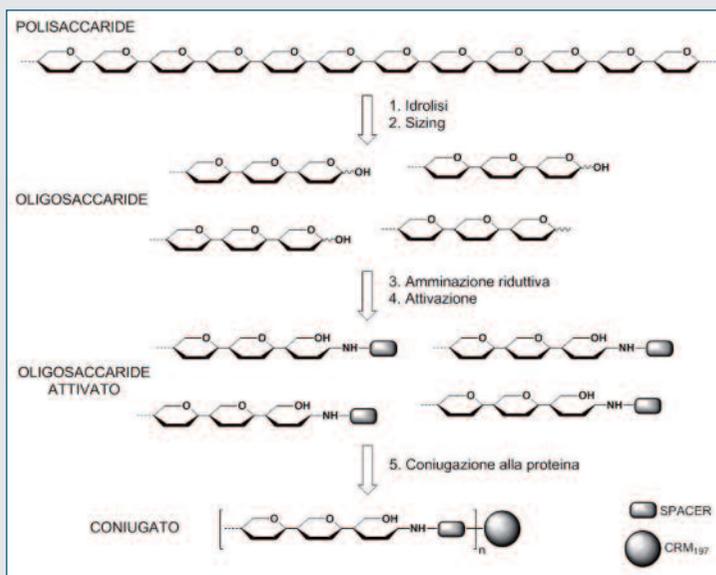


Fig. 2 - Processo di coniugazione del vaccino glicoconiugato Menvec® [12, 13]

glico-ingegneria della via di N-glicosilazione nei batteri, come ad esempio *E. coli*, sta inoltre recentemente riscontrando molto interesse. Polisaccaridi, codificati attraverso geni inseriti nel batterio, sono prodotti su un carrier poli-isoprenoide e quindi trasferiti ad un residuo di asparagina di una proteina carrier, anch'essa codificata attraverso geni inseriti nel batterio, la quale deve contenere almeno un sito di N-glicosilazione nativo o ingegnerizzato [10, 11].

La complessità nella preparazione e le numerose variabili (natura della proteina carrier, lunghezza della catena saccaridica, strategia e chimica di coniugazione, rapporto di glicosilazione espresso come saccaride/proteina) che possono influenzare l'efficienza dei glicoconiugati rappresentano sempre più aspetti chiave per lo sviluppo di questo tipo di vaccini [6]. Un'adeguata caratterizzazione chimico-fisica del prodotto, in aggiunta alla caratterizzazione immunochimica *in vitro* e *in vivo*, è inoltre fondamentale sia per garantire un'ottimale definizione del medesimo che per monitorare la consistenza in fase di produzione. Sebbene i glicoconiugati siano per loro natura delle macromolecole complesse, strutture omogenee ben definite e di elevata purezza, che si possono ad esempio ottenere attraverso oligosaccaridi con dimensione ridotta e definita (Fig. 1B) o preparati sinteticamente (Fig. 1C) coniugati per via terminale, hanno il vantaggio di facilitare la loro stessa caratterizzazione e di aumentare il livello di consistenza tra lotto e lotto. Il vaccino tetravalente contro infezioni da meningococco di gruppo A, C, W₁₃₅ e Y recentemente sviluppato e registrato in vari Paesi da Novartis Vaccines (Menvec®), rappresenta un esempio attuale in cui, attraverso l'applicazione di uno specifico approccio

tecnologico, che coinvolge la coniugazione di oligosaccaridi con definita lunghezza di catena, l'uso di una proteina carrier ben definita (CRM₁₉₇) e una coniugazione sito-specifica (terminale riducente del saccaride), è stato ottenuto un prodotto ben definito con alta riproducibilità in fase di produzione (Fig. 2) [12, 13].

La proteina carrier CRM₁₉₇ è un mutante non tossico della tossina difterica che differisce di un solo amminoacido in posizione 52, dove una glicina è sostituita da un acido glutammico (G52E) [14]. Essendo naturalmente non tossico, non è richiesto nessun trattamento chimico detossificante (es. con formaldeide) che produce strutture complesse "cross-linked" come ad esempio per la tossina difterica (DT) o tetanica (TT), CRM₁₉₇ è quindi un carrier ideale per vaccini glicoconiugati contro batteri capsulati come *Haemophilus influenzae*, pneumococco e meningococco. La recente pubblicazione della struttura cristallografica di CRM₁₉₇ e del suo complesso con NCA (nicotinammide come prodotto d'idrolisi di NAD) alla risoluzione di 2,0Å [15] ha permesso di comprendere il meccanismo molecolare che sta alla base della perdita di tossicità rispetto a DT. Sebbene globalmente le strutture cristallografiche di CRM₁₉₇ e DT siano pressoché identiche, la differenza funzionale tra le due proteine può essere spiegata dalla flessibilità del loop sito-attivo che copre la tasca di binding di NAD (Fig. 3).

Al fine di garantire consistenza in produzione e immunogenicità, la caratterizzazione strutturale ha acquisito oggi un ruolo fondamentale per il controllo dei materiali di partenza, dei vari intermedi di processo, del glicoconiugato purificato e del vaccino formulato finale. In aggiunta ai test analitici prevalentemente basati su analisi colorimetriche, negli ultimi anni sono state sviluppate complesse metodologie chimico-fisiche (metodi spettrofotometrici UV-visibile e fluorescenza, HPLC, spettrometria di massa, NMR) che consentono una caratterizzazione fine dei glicoconiugati. Il pannello analitico disponibile consente quindi di valutare molti attributi degli intermedi di processo e del vaccino formulato finale,

sia in merito agli aspetti strutturali che alla purezza dei prodotti (Tab. 1).

Sebbene i vaccini glicoconiugati, ad oggi per la maggior parte preparati a partire da poli-oligosaccaridi estratti e purificati da culture batteriche (un solo vaccino sintetico contro infezioni Hib è attualmente registrato per uso umano [16]), siano prodotti con elevatissimi livelli di purezza, l'eterogeneità delle catene saccaridiche e minime tracce di contaminanti batterici (endotossine, etc.) sono inevitabili. La sintesi chimica di carboidrati a partire da monosaccaridi (Fig. 1) fornisce invece strutture omogenee e ben definite (es. una sola distinta lunghezza di catena), in cui sono presenti anche specifiche funzionalità terminali utili per la coniugazione alla proteina carrier. L'uso di reagenti molto puri consente inoltre di ottenere prodotti finali di elevata purezza, per i quali è necessario veri-

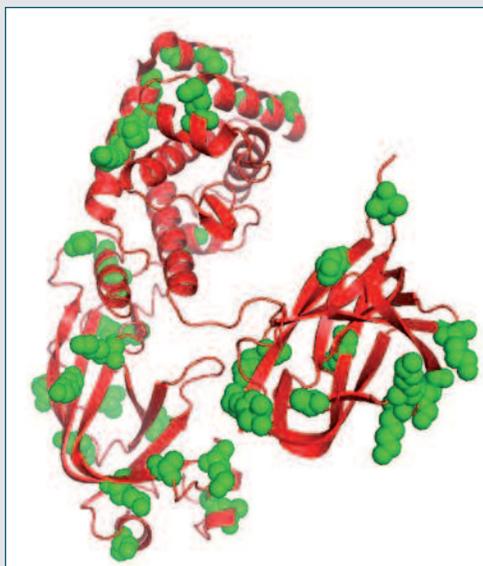


Fig. 3 - Struttura cristallografica di CRM₁₉₇ in cui sono evidenziate le lisine usate come siti per la coniugazione degli oligosaccaridi di meningococco

ficare solo i residui di processo. Grazie anche all'utilizzo di tecnologie automatizzate [17, 18], negli ultimi anni la chimica dei carboidrati ha reso possibile la sintesi di antigeni con rese di processo accettabili per studi di ricerca iniziali. Lo sviluppo e l'ottimizzazione degli schemi di sintesi richiedono comunque ulteriori sforzi per allargare l'applicabilità, preparare catene saccaridiche sufficientemente lunghe sulla base della defini-

zione dell'epitopo (paradigma di Kabat [19]), aumentare la scala di produzione, in particolare per quelle strutture caratterizzate da unità ripetenti più complesse (ad esempio le strutture non lineari sono tendenzialmente più difficili da sintetizzare). La combinazione di approcci chimici e chemo-enzimatici potrebbe inoltre essere utile per implementare questa via di produzione.

La sintesi chimica è inoltre molto utile per preparare molecole di riferimento utili per la caratterizzazione dei polisaccaridi estratti da sorgente biologica, come ad esempio la singola unità ripetente.

Per rendere ancora più uniformi i vaccini glicoconiugati, sono attualmente in fase di ricerca metodologie di coniugazione sito-specifica su specifici residui amminoacidici. Ad esempio l'utilizzo di amminoacidi non naturali [20] o di funzionalità chimiche sito-specifiche (legami tioeterei) [21] permette di ridurre la variabilità del pattern di glicosilazione che comunemente si ha per le coniugazioni con gruppi amminici (lisine) o carbossilici (acidi aspartici o glutammici).

Tab. 1 - Test analitici per il controllo di qualità dei vaccini glicoconiugati

Intermedio di processo	Attributo di qualità	
Polisaccaride	Struttura	- Identità - Dimensione molecolare e poli-dispersione - Composizione chimica - Gruppi O-acetile
	Purezza	- Proteine - Acidi nucleici - Cetavlon - Acqua - Sostanze volatili - Solventi organici - Bioburden (carica microbica) - Endotossine
Poli-, oligo-saccaride derivatizzato	Struttura	- Identità - Dimensione molecolare e poli-dispersione - Contenuto in saccaride - Grado di polimerizzazione (rapporto saccaride totale/gruppi terminali) - Gruppi O-acetile - Gruppi di derivatizzazione (es. diidrazide, bromo acetato, estere attivo)
	Purezza	- Impurezze di processo
Proteina carrier	Struttura	- Identità - Dimensione molecolare - Sequenza proteica - Folding proteico - Gruppi di derivatizzazione (es. diidrazide, bromo acetato)
	Purezza	- Acidi nucleici - Proteine di <i>E. coli</i> e altre proteine residue - Endotossine - Bioburden (carica microbica)
Coniugato	Struttura	- Identità - Coniugazione covalente saccaride-proteina - Saccaride coniugato e non-coniugato - Proteina coniugata e non-coniugata - Gruppi O-acetile - Dimensione molecolare
	Purezza	- Impurezze di processo - Endotossine - Bioburden (carica microbica)
Vaccino formulato	Struttura	- Identità - Saccaride coniugato e non-coniugato - Proteina coniugata e non-coniugata - Contenuto di adiuvante (es. alum) - Contenuto di conservanti (es. thimerosal) - Contenuto di eccipienti o diluenti (es. thimerosal) - Umidità residua in prodotti liofilici - Gruppi O-acetile - Dimensione molecolare
	Purezza	- Endotossine - Pirogenicità - Sterilità

References

- [1] O.T. Avery, W.F. Goebel, *J. Exp. Med.*, 1929, **50**, 533.
- [2] R. Schneerson *et al.*, *J. Exp. Med.*, 1980, **152**, 361.
- [3] J. Eskola *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1987, **317**, 717.
- [4] S.B. Black *et al.*, *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 1991, **10**, 97.
- [5] P.W. Anderson *et al.*, *J. Immunol.*, 1986, **137**, 1181.
- [6] P. Costantino *et al.*, *Expert Opin. Drug. Discov.*, 2011, **6**, 1045.
- [7] V. Verez-Bencomo *et al.*, *Science*, 2004, **305**, 522.
- [8] E.M. Riedmann, *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2012, **8**, 282.
- [9] P.T. Heath, *Expert Rev. Vaccines*, 2011, **10**, 685.
- [10] C.M. Szymanski *et al.*, *Mol. Microbiol.*, 1999, **32**, 1022.
- [11] M.F. Feldman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, **102**, 3016.
- [12] A. Bardotti *et al.*, *Vaccine*, 2008, **26**, 2284.
- [13] M. Broker *et al.*, *Vaccine*, 2009, **27**, 5574.
- [14] G. Giannini *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 1984, **12**, 4063.
- [15] E. Malito *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012, **109**, 5229.
- [16] V. Verez-Bencomo *et al.*, *Science*, 2004, **305**, 522.
- [17] P.H. Seeberger, *Chem. Soc. Rev.*, 2008, **37**, 19.
- [18] F.A. Jaipuri, N.L. Pohl, *Org. Biomol. Chem.*, 2008, **6**, 2686.
- [19] E.A. Kabat, *J. Immunol.*, 1960, **84**, 82.
- [20] W. Ou *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011, **108**, 10437.
- [21] E.J. Grayson *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2011, **50**, 4127.

ABSTRACT

Glycoconjugate Vaccines

The success of glycoconjugate vaccines during the last 30 years has provided evidence that these products are the safest and most efficacious vaccines currently available for prevention of bacterial infectious diseases. New technologies for vaccines improvement, such as the chemical synthesis of the carbohydrate antigens and the optimization of variables affecting immunogenicity (i.e. conjugation chemistry, saccharide chain length, carbohydrate-protein ratio, etc.), are currently under development.