

Luigi Lay
Dipartimento di Chimica
Organica e Industriale
Università di Milano
luigi.lay@unimi.it

CARBOIDRATI E IMMUNOLOGIA

Negli ultimi anni si è assistito ad un crescente interesse nei confronti di antigeni saccaridici sintetici come costituenti di vaccini glicoconiugati. Oltre a fornire molecole di elevata purezza, la sintesi consente infatti di accedere a strutture dotate di una maggiore stabilità chimica ed enzimatica.

Insieme alle proteine e agli acidi nucleici, i carboidrati rappresentano una delle principali classi di biomolecole esistenti in natura [1], svolgendo ruoli fondamentali in diversi processi biologici essenziali quali lo sviluppo embrionale, le reazioni infiammatorie e le metastasi tumorali [2]. Tuttavia, nonostante gli enormi progressi compiuti nell'ultimo decennio nel settore della chimica dei carboidrati [3], essi rimangono ancora poco sfruttati come potenziali agenti terapeutici. Ad esempio, le cellule sono ricoperte da un denso strato di carboidrati complessi noto come glicocalice, costituito da glicoproteine, proteoglicani e glicolipidi, la cui esposizione sulla superficie le rende capaci di interagire con i componenti del sistema immunitario. D'altra parte, numerosi agenti patogeni, così come le cellule di diversi tipi di tumori, presentano sulla loro superficie strutture saccaridiche caratteristiche che, agendo come "determinanti antigenici" (ossia specie in grado di scatenare una risposta immunitaria), costituiscono dei bersagli di grande interesse per lo sviluppo di vaccini.

I vaccini polisaccaridici possiedono tuttavia una grave limitazione: essi non sono capaci di generare una memoria immunologica a lungo termine nei neonati, nei bambini e nei pazienti immunodepressi, mentre inducono una protezione di breve durata negli adulti [4]. La ridotta immunogenicità e conseguente scarsa efficacia clinica dei vaccini saccaridici è sostanzialmente dovuta al fatto che i carboidrati sono dei tipici antigeni T-indipendenti. Alcuni concetti chiave della moderna immunobiologia, illustrati di seguito, saranno utili per meglio comprendere questi aspetti.

Immunobiologia dei polisaccaridi

La risposta immunitaria si manifesta come una perfetta combinazione di versatilità e specificità grazie alla raffinata interconnessione fra la risposta immunitaria innata e la risposta adattiva. La risposta immunitaria innata è rapida e aspecifica e costituisce la prima linea di difesa dell'organismo contro i microbi. I principali componenti del sistema immunitario innato sono le cellule in grado di presentare gli antigeni (APC). La risposta innata si attiva nella fase immediatamente successiva all'infezione e svolge il compito di allertare il sistema immunitario e predisporre la successiva risposta adattiva. Quest'ultima è d'altra parte mediata da varie tipologie di cellule (specie i linfociti B e T) e riconosce i patogeni in modo altamente selettivo, fornendo la specificità antigenica in grado di debellare totalmente l'agente infettivo e di generare memoria immunitaria [5].

Una delle principali caratteristiche della risposta adattiva è la produzione di anticorpi da parte delle cellule B opportunamente attivate dall'interazione specifica con i linfociti T.

Quando un agente patogeno supera le barriere esterne di difesa dell'ospite, i suoi componenti antigenici di natura proteica vengono captati ed opportunamente elaborati dalle APC e infine presentati alle cellule T. In tal modo si stimola una risposta immunitaria cellulare T-dipendente, caratterizzata da elevate concentrazioni di anticorpi ad alta affinità e dall'induzione di memoria immunologica. Al contrario, gli antigeni saccaridici inducono una risposta cellulare T-indipendente, contraddistinta dalla produzione di anticorpi a bassa affinità e dall'assenza di

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.

memoria immunologica. L'immunogenicità dei polisaccaridi può essere incrementata mediante la loro coniugazione (o di loro frammenti) ad una proteina immunogenica con la funzione di *carrier*, generando glicoconiugati in grado di indurre la cooperazione delle cellule T e la proliferazione delle cellule della memoria [6].

L'introduzione dei vaccini glicoconiugati è stato uno dei maggiori successi nel settore delle scienze biomediche [7] e diverse versioni coniugate di vaccini polisaccaridici sono attualmente commercialmente disponibili o in via di sviluppo.

Vaccini saccaridici sintetici

Come già accennato, strutture polisaccaridiche espresse sulla superficie di agenti infettivi sono essenziali mediatori delle reazioni immunitarie. In particolare, batteri incapsulati come *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* e *Salmonella typhi* presentano un guscio polisaccaridico (noto come *capsula*, da cui il termine di polisaccaridi capsulari) che circonda la parete cellulare esercitando una funzione protettiva nei confronti della difesa immunitaria dell'ospite e rappresentando quindi un importante fattore di virulenza del microorganismo.

Ne consegue che i batteri incapsulati hanno un profondo impatto sulla salute pubblica e occupano la terza posizione tra le cause di morte nel mondo [8], con una particolare incidenza nei Paesi in via di sviluppo e nelle fasce di popolazione più deboli (neonati, bambini sotto i 2 anni, anziani). A causa del crescente fenomeno della resistenza, dovuto all'ampio uso di antibiotici, l'Organizzazione Mondiale della Sanità sostiene da tempo una campagna di sensibilizzazione per la prevenzione dalle malattie infettive, specialmente nei Paesi del terzo mondo, attraverso la pratica della vaccinazione, considerata come il metodo più efficiente ed economicamente sostenibile per fornire una protezione immunitaria a lungo termine alla popolazione. Secondo l'approccio tradizionale, tuttora perseguito nella gran parte delle industrie farmaceutiche, la messa a punto di un vaccino glicoconiugato prevede l'isolamento e la purificazione dei polisaccaridi capsulari dalla cellula batterica e la successiva coniugazione chimica con una proteina immunogenica.

Tale procedura può dare tuttavia origine a diversi problemi, dovuti all'inevitabile presenza di contaminanti biologici e impurezze provenienti dalla sorgente cellulare. D'altra parte, antigeni saccaridici di origine sintetica hanno l'indubbio vantaggio di avere una struttura chimica ben definita, oltre ad essere ottenibili con elevatissimi gradi di purezza. Come conseguenza, nel corso dell'ultimo decennio numerosi antigeni saccaridici sono stati sintetizzati e utilizzati per la preparazione di glicoconiugati [9].

Le enormi potenzialità di questo approccio sono testimoniate dall'introduzione nel mercato del vaccino Quimi-Hib diretto contro le infezioni da *Haemophilus influenzae* tipo b. Quimi-Hib è stato sviluppato nei laboratori de L'Avana del Prof. Verez-Bencomo e rappresenta il primo (e finora unico) esempio di vaccino commerciale contenente un antigene saccaridico completamente sintetico [10].

Sfruttando l'esperienza maturata nel nostro gruppo di ricerca nell'ambito della sintesi di oligosaccaridi, negli ultimi anni ci siamo fortemente interessati alla sintesi di strutture saccaridiche antigeniche (o di loro analoghi strutturali) strettamente associate ad agenti patogeni, in particolare batteri. Alcuni esempi illustrativi del nostro contributo a questo affascinante settore di ricerca sono riportati nella seguente sezione.

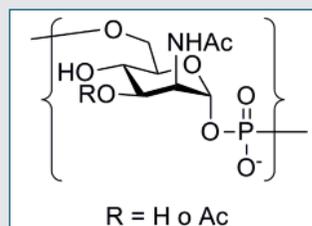


Fig. 1 - Struttura dell'unità ripetitiva del polisaccaride capsulare di *Neisseria meningitidis* A

Neisseria meningitidis tipo A

Il *Neisseria meningitidis* è un batterio incapsulato Gram-negativo comunemente presente all'interno del tratto superiore dell'apparato respiratorio. Insieme a *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*, esso costituisce una delle principali cause della meningite cerebrospinale, in particolar

modo nei Paesi in via di sviluppo [11]. Sono stati finora identificati 13 serotipi di *Neisseria meningitidis*, distinti sulla base della composizione chimica della capsula polisaccaridica, ma i più importanti da un punto di vista clinico sono i serotipi A, B, C, Y, W135 e X. Tuttavia, il serotipo A (Men A) è l'unico in grado di causare devastanti epidemie, localizzate soprattutto nella regione sub-sahariana dell'Africa nota come "cintura africana della meningite", popolata da circa 300 milioni di persone [12]. Per tale motivo, l'OMS ha da tempo identificato il Men A come un obiettivo ad elevata priorità per la messa a punto di un vaccino glicoconiugato. Lo sviluppo di tale vaccino è tuttavia fortemente ostacolato dalla notevole labilità chimica del polisaccaride capsulare del Men A, costituito da un omopolimero di (\rightarrow 6)-*N*-acetilmannosamina α -1-*O*-fosfato parzialmente acetilato (Fig. 1).

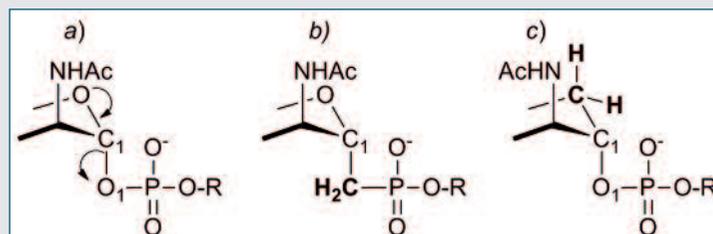


Fig. 2 - Meccanismo di idrolisi di glicosil fosfodiesteri (a) e possibili analoghi stabilizzati (b e c)

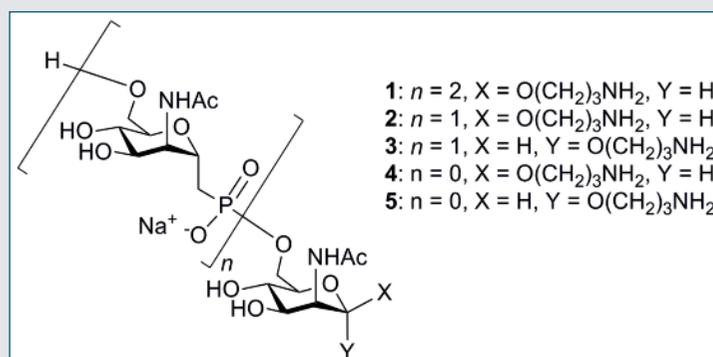
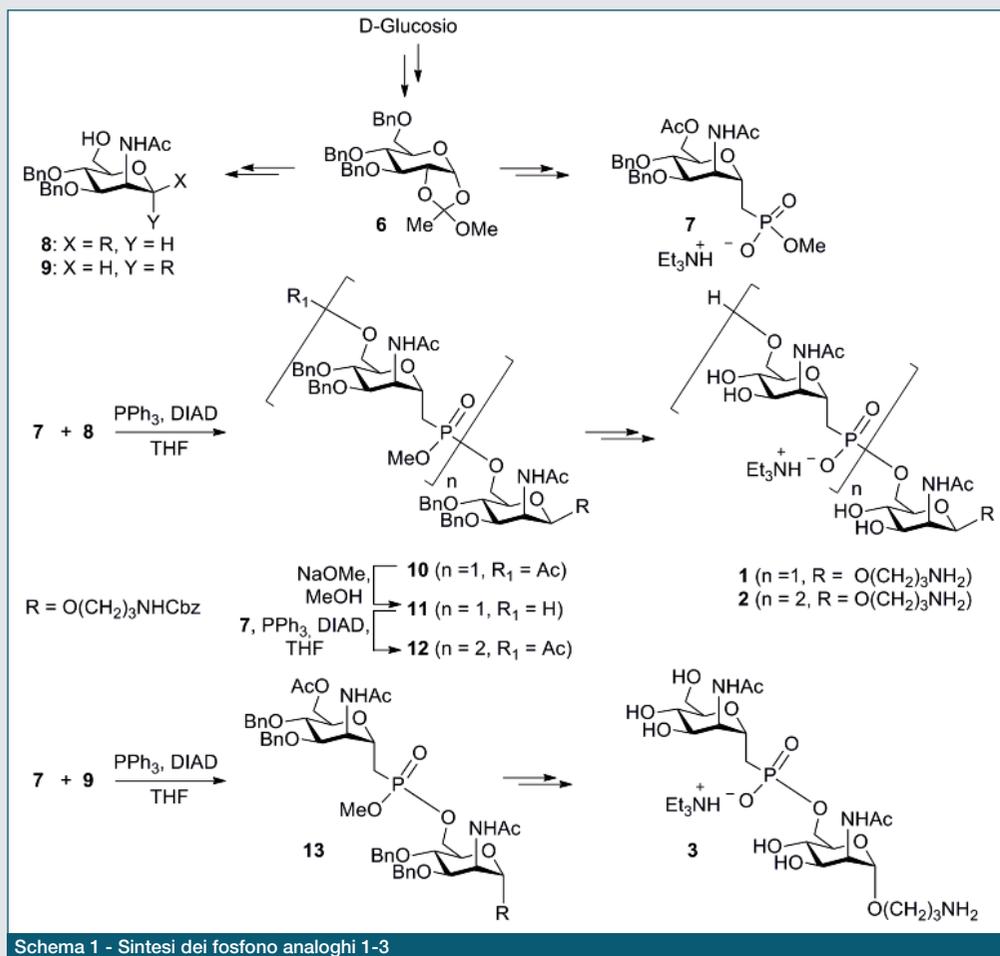


Fig. 3 - Strutture dei fosfono analoghi del polisaccaride capsulare del Men A

- 1: $n = 2$, $X = O(CH_2)_3NH_2$, $Y = H$
- 2: $n = 1$, $X = O(CH_2)_3NH_2$, $Y = H$
- 3: $n = 1$, $X = H$, $Y = O(CH_2)_3NH_2$
- 4: $n = 0$, $X = O(CH_2)_3NH_2$, $Y = H$
- 5: $n = 0$, $X = H$, $Y = O(CH_2)_3NH_2$



Schema 1 - Sintesi dei fosfono analoghi 1-3

Precedenti studi hanno evidenziato che, una volta isolato dalla cellula batterica, questo polisaccaride subisce una degradazione spontanea a temperature superiori ai 4 °C. Allo scopo di ovviare a questo problema, negli ultimi anni ci siamo interessati alla sintesi di oligomeri del polisaccaride del Men A contenenti analoghi chimicamente più stabili, ma allo stesso tempo dotati di un'immunogenicità paragonabile a quella del polisaccaride naturale. Come mostrato nella Fig. 2a, l'idrolisi dei gruppi fosfodiesteri anomeric interglicosidici procede principalmente attraverso la scissione del legame C1-O1, facilitata dall'assistenza dell'ossigeno endociclico.

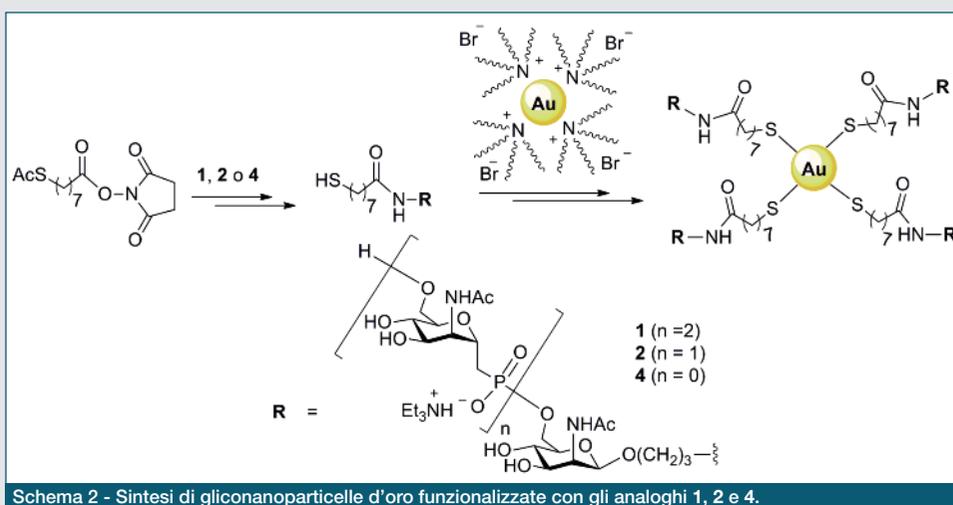
L'introduzione di sostanziali modifiche strutturali nel gruppo fosfodiesterio, ovvero la sostituzione dell'atomo di ossigeno endociclico piranosidico con un gruppo metilenico rappresentano dunque due possibili strategie per incrementare la stabilità dei glicosil fosfodiesteri. Una prima tipologia di analogo è stata ottenuta introducendo un gruppo metilenico al posto dell'ossigeno anomero, ossia sostituendo le unità fosfodiesterie con gruppi fosfonato (Fig. 2b). In tal modo, il legame C1-O1 è rimpiazzato da un legame C-C,

incrementando notevolmente la stabilità dei corrispondenti oligomeri. Sulla base di tali premesse, abbiamo realizzato la sintesi dei fosfono analoghi **1-5** del polisaccaride capsulare del Men A riportati nella Fig. 3.

Si può osservare che i derivati sintetici **1-5** sono muniti di un linker aminopropilico legato in posizione anomera allo scopo di consentirne la coniugazione ad altre entità molecolari. Inoltre, dei fosfonodisaccaridi **2-3** e monosaccaridi **4-5** sono stati preparati sia i β-glicosidi (composti **2** e **4**) sia i corrispondenti anomeri α (composti **3** e **5**), allo scopo di evidenziare l'eventuale influenza della configurazione anomera sull'attività biologica. La sintesi degli analoghi **1-3** è stata realizzata come illustrato brevemente nello Schema 1 [13]. Uno dei principali vantaggi della strategia sintetica consiste nell'intermedio chiave **6**, facilmente ottenibile in scala di decine di grammi a partire dal D-glucosio [14]. L'ortoestere **6** è stato convertito nel glicosil fosfonato **7** e nei monosaccaridi terminali **8** e **9** contenenti, rispettivamente, il linker aminopropilico con orientazione β e α. Il passaggio cruciale della sintesi è la formazione del fosfonoestere, ottenuto con ottime rese nelle condizioni di Mitsunobu.

Ulteriori manipolazioni degli intermedi e lo sblocco finale dei gruppi protettivi hanno quindi condotto agli oligomeri **1-3**, mentre i monosaccaridi di riferimento **4-5** sono stati semplicemente ottenuti per idrogenolisi dei rispettivi precursori **8** e **9**.

La valutazione biologica dei frammenti **1-5** è stata effettuata mediante test ELISA di tipo competitivo, ossia determinando la capacità delle molecole sintetiche di inibire il legame fra l'anticorpo specifico del poli-



Schema 2 - Sintesi di gliconanoparticelle d'oro funzionalizzate con gli analoghi 1, 2 e 4.

saccaride capsulare del Men A e lo stesso polisaccaride naturale [13b]. I risultati hanno mostrato che tali analoghi sono in grado di legare con buona affinità l'anticorpo, confermando che la sostituzione dell'atomo di ossigeno anomero con un gruppo metilenico non ne impedisce il riconoscimento, ma con una capacità di inibizione decisamente inferiore (almeno 3 ordini di grandezza) a quella riscontrata con il polisaccaride naturale. Questo è probabilmente dovuto alle piccole dimensioni degli inibitori sintetici, in accordo con numerosi dati riportati in letteratura secondo cui le proprietà antigeniche di composti saccaridici sono direttamente proporzionali alla lunghezza della catena polimerica. Un modo per ovviare alla bassa affinità degli oligomeri sintetici consiste nel far ricorso all'effetto della multivalenza. È così definito l'incremento di affinità legante-recettore derivante dal legame simultaneo di più leganti con un insieme multiplo di recettori. Le risultanti interazioni multivalenti possono essere complessivamente più forti della somma delle corrispondenti interazioni monovalenti [15].

Questo concetto può essere sfruttato nella progettazione di vaccini a base di antigeni saccaridici di sintesi che, come in questo caso, sono spesso troppo piccoli per un'efficiente attivazione della risposta immunitaria. Le interazioni multivalenti possono essere riprodotte artificialmente mediante la coniugazione di piccoli leganti dotati di attività biologica ad opportune molecole polifunzionali (scaffold) in grado di esporli verso l'esterno e di presentarli con la corretta geometria tridimensionale al rispettivo recettore. Fra i possibili scaffold descritti nella recente letteratura scientifica, ci siamo rivolti alle nanoparticelle a base di oro (AuNP) [16]. Mediante una procedura di *self-assembly*, esse generano infatti strutture multivalenti il cui monostato superficiale può essere facilmente funzionalizzato con diverse molecole organiche o biomolecole recanti lunghe catene alchiliche terminanti con un gruppo SH, grazie alla forte affinità tra Au e S.

La nostra ipotesi di lavoro è che le AuNP funzionalizzate con gli antigeni saccaridici sintetici **1-5** possono formare una superficie a glicocalice, di forma globulare e composizione chimica ben definita, in grado di mimare il polisaccaride naturale presente sulla superficie della cellula batterica, con una conseguente amplificazione della risposta immunitaria. I β oligomeri **1, 2 e 4** sono stati quindi impiegati nella preparazione di gliconanoparticelle d'oro come illustrato nello Schema 2 [17]. Le proprietà antigeniche delle gliconanoparticelle così ottenute sono state valutate tramite ELISA di tipo

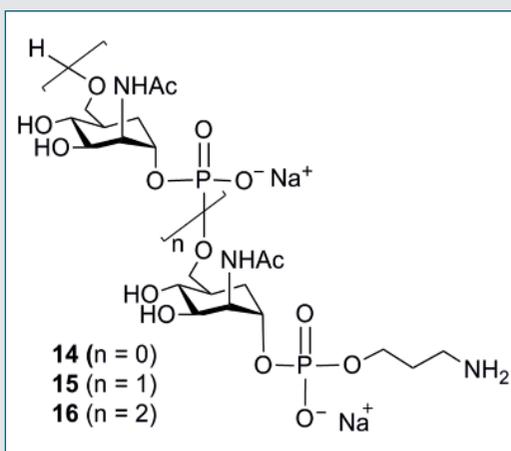
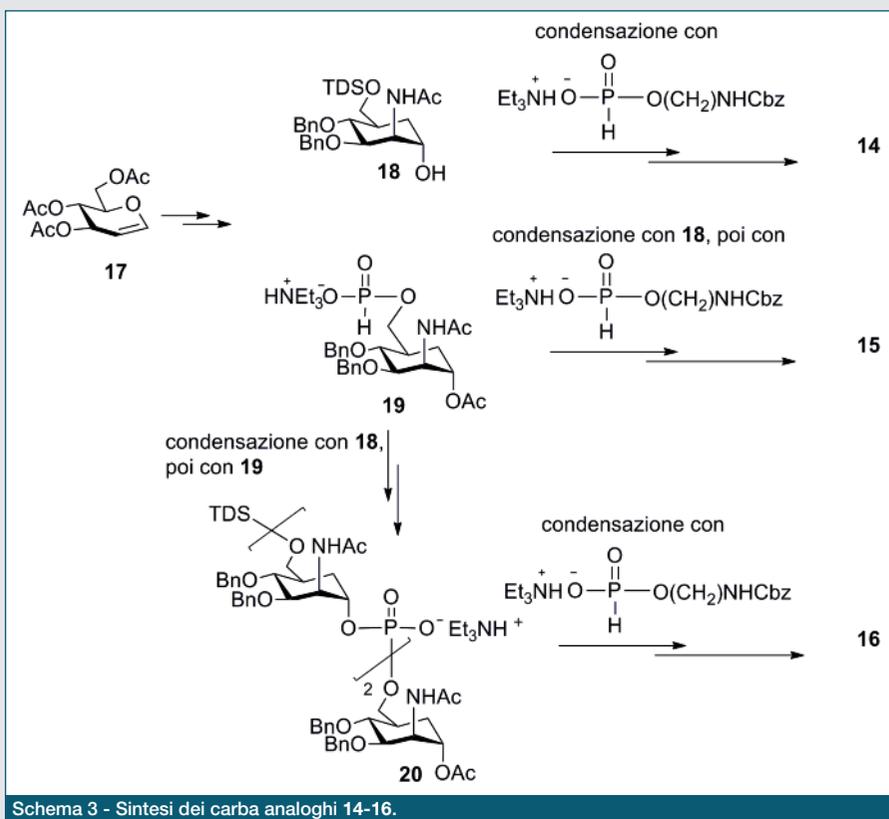


Fig. 4 - Strutture dei carba analoghi del polisaccaride capsulare del Men A

competitivo, mostrando un livello di inibizione del legame al polisaccaride del Men A significativamente più elevato (almeno 2 ordini di grandezza) rispetto ai corrispondenti oligomeri monovalenti ed evidenziando quindi un effetto dovuto ad interazioni multivalenti [18]. Ancora più interessante è risultata l'osservazione che analoghe gliconanoparticelle funzionalizzate con il fosfonodisaccaride **2** si sono dimostrate in grado di interagire efficacemente con le cellule del sistema immunitario [19]. Questo fatto apre interessanti prospettive su futuri sviluppi di vaccini a base di antigeni saccaridici sintetici di piccole dimensioni presentati in modo multivalente tramite coniugazione ad opportuni scaffold polifunzionali.

Un approccio alternativo volto a incrementare la stabilità dei legami fosfodiesteri del polisaccaride capsulare del Men A consiste nella sostituzione dell'atomo di ossigeno piranosidico con un gruppo metilenico, conducendo ad un analogo carbociclico (Fig. 2c). In tal modo viene rimosso il carattere acetalico del fosfodiesteri, generando oligomeri di stabilità paragonabile a quella degli oligonucleotidi. Sulla base di precedenti studi [20], il carba analogo sintetico della *N*-acetilmannosamina-1-*O*-fosfato è stato impiegato per la costruzione dei carba-oligomeri **14-16** (Fig. 4) dotati di una maggiore stabilità chimica rispetto al polimero naturale.



Schema 3 - Sintesi dei carba analoghi 14-16.

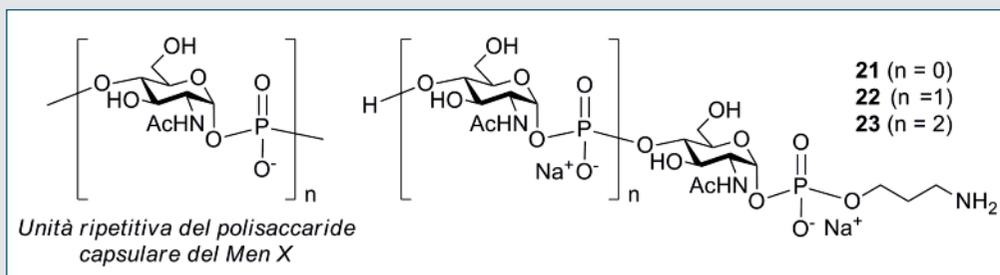


Fig. 5 - Struttura dell'unità ripetitiva del polisaccaride di *Neisseria meningitidis* X e dei corrispondenti oligomeri sintetici **21-23**

La sintesi degli oligomeri **14-16** [21] si basa sulla preparazione dei due intermedi chiave **18** e **19**, entrambi ottenuti a partire dal triacetilglucale **17** commercialmente disponibile (Schema 3).

La condensazione dei carbazuccheri **18** e **19** e il successivo assemblaggio degli oligomeri **14-16** è stato realizzato applicando il metodo dell'idrogenofosfonato, uno dei protocolli più diffusi e consolidati per la sintesi di glicosilfosfodiesteri [22].

È opportuno notare che anche in questo caso i carba analoghi sintetici **14-16** dispongono di un linker amminopropilico per la coniugazione ad una proteina *carrier* allo scopo di valutarne l'immunogenicità in modelli animali.

Neisseria meningitidis tipo X

Come detto in precedenza, la grande maggioranza delle infezioni ed epidemie di meningite nella regione sub-sahariana sono causate dal serotipo A di *Neisseria meningitidis*. Tuttavia, negli ultimi vent'anni è stato registrato un numero crescente di episodi di meningite batterica riconducibili a serotipi diversi.

In particolare, il *Neisseria meningitidis* tipo X (Men X) è emerso come responsabile di svariati casi di meningite nel Nord America, in Europa, in Australia, in Africa e, più recentemente, nel Ghana e soprattutto nel Niger e ai confini fra Kenia e Uganda [23]. Questo ha condotto l'OMS a dichiarare il Men X una sostanziale minaccia per la salute pubblica.

Tuttavia, i vaccini disponibili sul mercato contro le infezioni da meningococco, così come quelli in fase di sviluppo, non contengono il Men X fra gli antigeni componenti, e dunque non sarebbero in grado di offrire protezione contro le infezioni causate da questo serogruppo emergente. La struttura del polisaccaride capsulare del Men X è costituita da un omopolimero di residui di *N*-acetil-D-glucosammina- α -1-O-fosfato congiunti tramite legami 1 \rightarrow 4 fosfodiesteri (Fig. 5).

Non essendo note in letteratura sintesi di frammenti di questo polisaccaride,

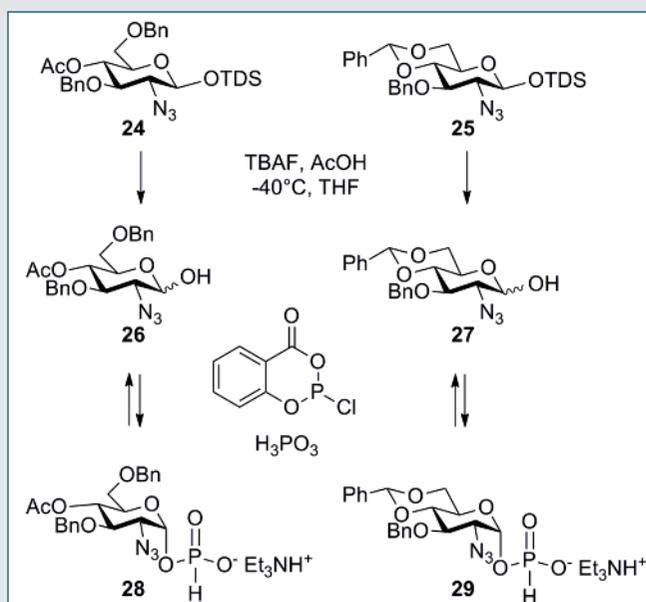
abbiamo affrontato la preparazione degli oligomeri **21-23** (Fig. 5) con struttura corrispondente al polimero naturale, ma eventualmente coniugabili ad una proteina carrier [24]. Un'analisi retrosintetica ha condotto ad identificare i monosaccaridi **24** e **25** (ottenibili dalla D-glucosammina) come intermedi chiave della sintesi (Schema 4), mentre la formazione dei glicosil fosfodiesteri è stata ancora una volta affidata al metodo dell'i-

drogenofosfonato. A tale proposito, la sintesi stereoselettiva dei legami α glicosil fosfodiesteri risulta possibile solo attraverso un accurato controllo stereochimico nella preparazione degli idrogenofosfonati anomerici **28** e **29** con stereochimica esclusivamente α , a partire dai rispettivi derivati emiacetalici **26** e **27** (Schema 4).

A seguito di un accurato studio delle condizioni di reazione, la sintesi degli idrogenofosfonati **28** e **29** è stata realizzata per trattamento degli emiacetali **26** e **27** con salicilclorofosfito in condizioni equilibranti e in presenza di acido fosforoso, in modo da consentire la formazione esclusiva dell'anomero α termodinamicamente più stabile, insieme al derivato emiacetalico non reagito che può essere tuttavia facilmente recuperato e riciclato (Schema 4).

La reazione richiede tempi piuttosto lunghi (8-9 giorni), ma il progresso della conversione può essere determinato registrando gli spettri NMR (^1H e ^{31}P) della miscela di reazione, osservando la progressiva formazione dell' α glicosil idrogenofosfonato a spese del corrispondente anomero β . Al termine del processo, la miscela risulta composta esclusivamente dall'anomero α dell'idrogenofosfonato e dallo stesso derivato emiacetalico non reagito.

Nella Fig. 6 è riportata una selezione degli spettri NMR (protoni e fosforo) che illustra la progressiva formazione dell'idrogenofosfonato



Schema 4 - Sintesi dei glicosil idrogenofosfonati **28** e **29**.

29. Un analogo andamento è stato osservato nella formazione dell'intermedio **28**. La successiva sintesi degli oligomeri **21-23** è stata realizzata come riassunto nello Schema 5, applicando una strategia iterativa e condensando gli idrogenofosfonati **28** o **29** e l'*N*-benzilossicarbonilamminopropanolo utilizzato come linker all'estremità riducente. Gli oligomeri sintetici **21-23** sono stati coniugati con una proteina immunogenica. La valutazione immunologica dei corrispondenti glicoconiugati, la cui caratterizzazione è tuttora in corso, fornirà preziose informazioni da sfruttare per la messa a punto di un vaccino anti-meningococco comprendente la protezione contro il serotipo X.

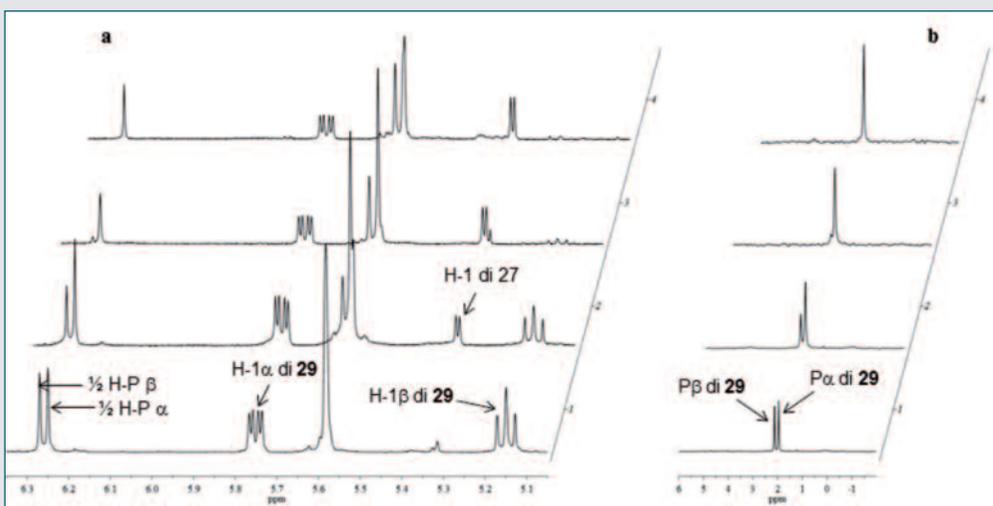


Fig. 6 - Progressiva formazione dell'idrogenofosfonato 29 evidenziata via NMR al protone (a) e al fosforo (b)

Conclusioni e prospettive future

Senza voler negare i grandi vantaggi introdotti dalla diffusione degli antibiotici nella nostra società, non ci sono più dubbi sul fatto che oggi le terapie preventive, e in particolare la pratica della vaccinazione, rappresentano l'arma più potente a disposizione dell'uomo per combattere le malattie infettive. Queste ultime hanno infatti ancora un notevolissimo impatto sociale ed economico su tutte le popolazioni, sia nei Paesi industrializzati sia in quelli in via di sviluppo. Dagli esperimenti pionieristici di Edward Jenner, alla fine del XVIII secolo, sono stati registrati enormi progressi nel campo dei vaccini antinfettivi, e dagli anni Novanta si sono anche intensificati gli studi volti alla loro applicazione in un settore meno tradizionale come quello dei tumori [25].

Limitatamente al settore dei vaccini a base saccaridica, una scoperta chiave è stata senza dubbio l'osservazione che un antigene saccaridico

cellula T-indipendente può essere trasformato in un immunogeno cellula T-dipendente tramite legame covalente ad una opportuna proteina *carrier*. Particolari recenti progressi in questo campo sono stati compiuti grazie al crescente ricorso alla sintesi organica di antigeni saccaridici di piccole dimensioni ma dotati di un grado di purezza non eguagliabile neanche con le più sofisticate tecnologie di isolamento e purificazione dalla sorgente naturale. La sintesi di antigeni saccaridici ha aperto nuovi e promettenti scenari sia per l'introduzione di nuovi vaccini sia per il miglioramento di quelli già esistenti. Il grande successo del vaccino sintetico contro *Haemophilus influenzae* tipo b, introdotto a Cuba nel 2004, rappresenta solo il primo esempio, mentre altri vaccini basati su antigeni

saccaridici di sintesi e diretti contro *Shigella dysenteriae* (la principale causa della dissenteria bacillare), tubercolosi e malaria sono tuttora in fase di sviluppo.

Tuttavia, nonostante i vaccini glicoconiugati mostrino un'eccellente attività clinica, rimangono ancora delle perplessità sulla loro reale efficacia, soprattutto in campagne di vaccinazione di massa.

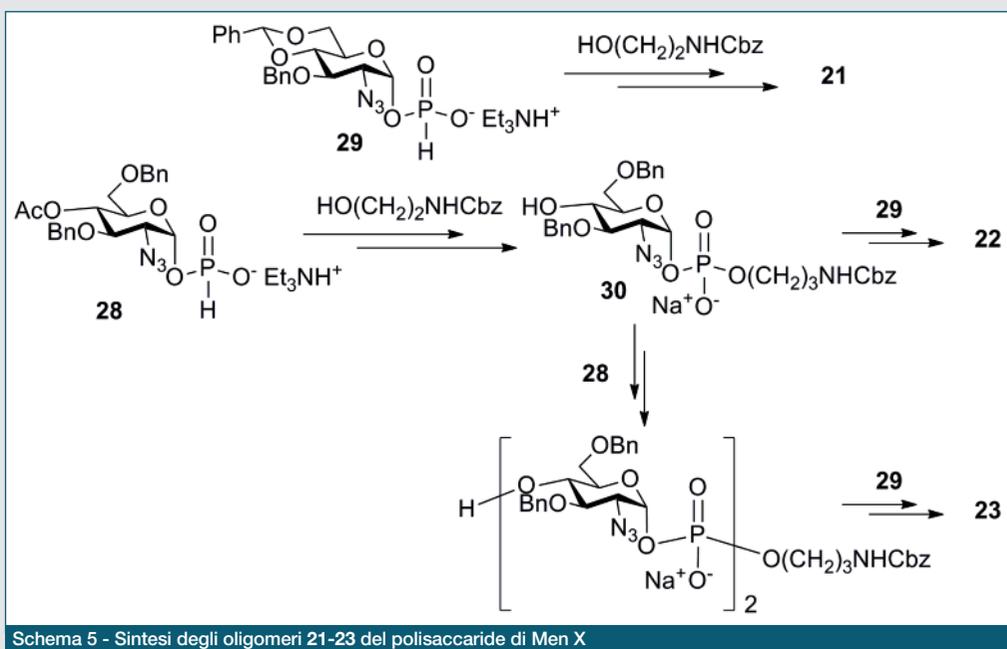
Sono stati ad esempio riportati problemi dovuti ad interferenza fra la risposta immunitaria al *carrier* e quella all'antigene saccaridico, oltre alle difficoltà e ai costi elevati derivanti dalle procedure sintetiche di coniugazione.

Gli straordinari progressi compiuti negli ultimi anni nel campo della glicoimmunologia hanno condotto alla progettazione dei cosiddetti vaccini sintetici multicomponente, che risultano molto promettenti.

Tali vaccini si basano sulla simultanea stimolazione di tutti i principali componenti del sistema immunitario (sistema innato e sistema adattivo) che dovrebbe condurre all'attivazione di una risposta completa, potente ed estremamente selettiva [26].

Un'ulteriore prospettiva nel campo dei vaccini saccaridici è emersa recentemente a seguito della scoperta di un nuovo gruppo di polisaccaridi batterici in grado di attivare direttamente le cellule del sistema immunitario attraverso il meccanismo cellula T-dipendente [27].

Nonostante queste molecole mostrino un'ampia variabilità strutturale, esse presentano la caratteristica comune di possedere delle cariche zwitterioniche distribuite lungo la catena polisaccaridica, cioè contengono sia cariche positive (ad es., NH_3^+) sia cariche negative (ad es.,



Schema 5 - Sintesi degli oligomeri 21-23 del polisaccaride di Men X

fosfati o carbossilati) all'interno delle unità ripetitive (polisaccaridi zwitterionici, ZPS). È opinione condivisa che il carattere zwitterionico sia responsabile della loro particolare attività immunologica, che non trova riscontro in altri polisaccaridi batterici.

Ad esempio, è stato dimostrato che la rimozione di uno dei due tipi di carica conduce ad un carboidrato immunologicamente inerte.

Al contrario, l'introduzione di un carattere zwitterionico in un polisaccaride non zwitterionico conferisce al risultante ZPS la capacità di attivare le cellule T [28].

Complessivamente, gli studi effettuati indicano che i ZPS si comporta-

no come convenzionali antigeni T-dipendenti. Essi rappresentano quindi una novità fondamentale nel tradizionale modello immunologico, secondo cui l'attivazione del sistema immunitario con meccanismo cellula T-dipendente è prerogativa dei soli antigeni proteici.

I ZPS potrebbero quindi rappresentare un'opportunità senza precedenti per la progettazione di una nuova classe di vaccini basati sull'introduzione di zwitterioni per modificazione chimica di glicani di batteri patogeni. Questo tipo di vaccini potrebbe essere estremamente utile per la prevenzione di molte malattie infettive, specialmente nell'area pediatrica, come preziosa alternativa ai vaccini glicoconiugati.

Bibliografia

- [1] a) A. Varki, *Glycobiology*, 1993, **3**, 97;
b) R.A. Dwek, *Chem. Rev.*, 1996, **96**, 683;
c) C. Bertozzi, L.L. Kiessling, *Science*, 2001, **291**, 2357;
d) K. Ohtsubo, J.D. Marth, *Cell*, 2006, **263**, 855.
- [2] a) N. Sharon, *Biochim. Biophys. Acta*, 2006, 527;
b) J. Balzarini, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2007, **5**, 583; c) B. Ernst, J.L. Magnani, *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2009, **8**, 661.
- [3] a) T.J. Boltje *et al.*, *Nature Chem.*, 2009, **1**, 611;
b) P.H. Seeberger, *Chem. Soc. Rev.*, 2008, **37**, 19;
c) B. Lepenies *et al.*, *Curr. Op. Chem. Biol.*, 2010, **14**, 404.
- [4] Á. González-Fernández *et al.*, *Vaccine*, 2008, **26**, 292.
- [5] G. Ada, D. Isaacs, *Clin. Microbiol. Infect.*, 2003, **9**, 79.
- [6] R.D. Astronomo, D.R. Burton, *Nature Rev. Drug Discov.*, 2010, **9**, 308.
- [7] a) G.B. Lesinski, M.A. Westerink, *Curr. Drug Targets Infect. Disord.*, 2001, **1**, 325; b) A. Weintraub, *Carbohydr. Res.*, 2003, **338**, 2539.
- [8] C.J.L. Murray, A.D. Lopez, *Lancet*, 1997, **349**, 1498.
- [9] L. Morelli *et al.*, *Eur. J. Org. Chem.*, 2011, 5723.
- [10] V. Verez-Bencomo *et al.*, *Science*, 2004, **305**, 522;
b) V. Fernández-Santana *et al.*, *Infect. Immun.*, 2004, **72**, 7115.
- [11] a) S. Segal, A.J. Pollard, *Br. Med. Bull.*, 2004, **72**, 65;
b) L.H. Harrison, *Clin. Microbiol. Rev.*, 2006, **19**, 142.
- [12] a) A.J. Pollard, C.E. Frasch, *Vaccine*, 2001, **19**, 1327;
b) S.L. Morley, A.J. Pollard, *Vaccine*, 2001, **20**, 666.
- [13] a) M.I. Torres-Sanchez, L. Lay *et al.*, *Synlett*, 2005, **7**, 1147;
b) M.I. Torres-Sanchez, L. Lay *et al.*, *Chem. Eur. J.*, 2007, **13**, 6623.
- [14] V. Draghetti, L. Lay *et al.*, *J. Carbohydr. Chem.*, 2001, **20**, 813.
- [15] a) G.M. Whitesides *et al.*, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1998, **37**, 2754; b) J.J. Lundquist, E.J. Toone, *Chem. Rev.*, 2002, **102**, 555.
- [16] M.-C. Daniel, D. Astruc, *Chem. Rev.*, 2004, **104**, 293.
- [17] L. Lay, P. Scrimin *et al.*, *Langmuir*, 2008, **24**, 4120.
- [18] L. Lay, P. Scrimin *et al.*, *Adv. Mater.*, 2008, **20**, 4348.
- [19] G. Lombardi, P. Scrimin, L. Lay *et al.*,
accettato per la pubblicazione.
- [20] L. Toma, L. Lay *et al.*, *Org. Biomol. Chem.*, 2009, **7**, 3734.
- [21] Q. Gao, L. Lay *et al.*, *Org. Biomol. Chem.*, 2012, **10**, 6673.
- [22] A.V. Nikolaev *et al.*, *Carbohydr. Res.*, 2007, **342**, 297.
- [23] a) P. Boisier *et al.*, *Clin. Infect. Dis.*, 2007, **44**, 657;
b) S. Materu *et al.*, *Emerg. Infect. Dis.*, 2007, **13**, 944.
- [24] L. Morelli, L. Lay, *ARKIVOC*, 2012, in corso di stampa.
- [25] Z. Guo, Q. Wang, *Curr. Op. Chem. Biol.*, 2009, **13**, 608.
- [26] a) G.-J. Boons *et al.*, *Nature Chem. Biol.*, 2007, **3**, 663;
b) O. Renaudet *et al.*, *ChemMedChem*, 2008, **3**, 737.
- [27] a) D.L. Kasper *et al.*, *Cell*, 2004, **117**, 677; b) S.K. Mazmanian, D.L. Kasper, *Nat. Rev. Immunol.*, 2006, **6**, 849.
- [28] a) S. Gallorini *et al.*, *J. Immunol.*, 2007, **179**, 8208; b) A. Wack, S. Gallorini, *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 2008, **30**, 761.

ABSTRACT

Carbohydrates and Immunology

Vaccination is considered by the World Health Organization to be the most cost-effective strategy for controlling infectious disease. Saccharide-based antigens have been employed in the formulation of glycoconjugate vaccines. In particular, during last years there has been a growing interest toward synthetic antigens, since organic synthesis may provide pure and chemically well-defined structures, but also structural analogues endowed with improved chemical stability.