

MOLECOLE ORGANICHE ATTIVE SUL RECETTORE UMANO TLR4: I FARMACI DEL FUTURO?

Francesco Peri

Dipartimento di Biotecnologie e Bioscienze

Università di Milano-Bicocca

francesco.peri@unimib.it

Recenti pubblicazioni suggeriscono che una serie di malattie autoimmuni ed infiammatorie acute e croniche (incluse alcune malattie rare) che a tutt'oggi non hanno un trattamento farmacologico specifico, potrebbero essere combattute efficacemente da terapie basate sulla modulazione dell'attività del recettore dell'immunità innata, il Toll-like Receptor 4 (TLR4). Piccole molecole organiche capaci di attivare il TLR4 (agonisti) hanno infatti già trovato applicazione clinica e farmacologica come adiuvanti vaccinali. In questa breve review si presentano le conoscenze attuali dei meccanismi molecolari di attivazione del TLR4. La conoscenza della relazione struttura/attività delle molecole attive nella modulazione del segnale del TLR4 potrebbe portare nei prossimi anni allo sviluppo di nuovi farmaci basati sull'inibizione del TLR4.

Small-molecule Toll-like Receptor 4 (TLR4) Modulators: New Therapeutic Perspectives

A growing body of data suggests that therapies based on Toll-like Receptors (TLR) targeting, in particular TLR4, holds promise in treating autoimmune and inflammatory pathologies still lacking specific treatment, included several rare diseases. While TLR4 activators (agonists) have already found successful clinical application as vaccine adjuvants, the use of TLR4 blockers (antagonists) as antiseptis agents or as agents against inflammatory diseases (including arthritis, multiple sclerosis, neuroinflammations) and cancer is still at a preclinical phase of development. This minireview focuses on recent achievements on the development of TLR4 modulators based on Lipid A structure simplification, in particular on compounds having disaccharide or monosaccharide structures. As the TLR4 activity of natural TLR4 ligands (lipopolysaccharide, LPS and its biologically active part, the Lipid A) depends on both the structure of endotoxin aggregates in solution and on single-molecule interaction with MD-2 and CD14 receptors, the rational design of TLR4 modulators should in principle take into account both these factors. In the light of the most recent advances in the field, in this minireview we discuss the structure-activity relationship in simplified Lipid A analogues, with cationic or anionic amphiphilic structures.

Il Toll-like Receptor 4 (TLR4): un bersaglio farmacologico emergente

Non più di 15 anni fa venivano scoperti i Toll-like Receptors (TLR)¹, molecole proteiche con la funzione di recettore, che hanno un ruolo fondamentale nell'uomo e negli animali nel riconoscimento di strutture molecolari conservate associate ai più comuni microorganismi patogeni (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*, PAMPs). Il riconoscimento molecolare dei diversi PAMPs provenienti da vari agenti patogeni microbici, tra cui virus, batteri, protozoi e funghi, da parte dei TLR, innesca la risposta immunitaria ed infiammatoria dell'organismo ospite¹. Tra i circa 12 tipi di TLR noti, il TLR4 è il sensore specifico delle endotossine batteriche, ed in particolare riconosce i lipopolisaccaridi (LPS) presenti sulla membrana esterna della parete dei batteri Gram-negativi o frammenti degli LPS, quali i lipooligosaccaridi (LOS) ed il lipide A^{2,3}. Il TLR4 riconosce anche un'ampia gamma di sostanze derivate da virus e micoplasma⁴. Il TLR4 ha dunque un ruolo protettivo per il nostro organismo, poiché innesca le risposte immunitaria ed infiammatoria come risposta alla presenza di patogeni. Tuttavia, se l'attivazione del TLR4 è troppo potente o troppo prolungata, il rilascio eccessivo di mediatori molecolari dell'infiammazione, chiamati citochine, causa una serie di patologie, tra cui la sepsi e lo shock settico.

Oltre che dai patogeni esterni, il TLR4 è attivato anche da fattori endogeni, cioè interni all'organismo, in particolare da molecole dette *Danger-Associated Molecular Patterns* (DAMP)⁵ che vengono rilasciate nel flusso sanguigno in conseguenza di lesioni ed infiammazioni.

Per quanto detto, molecole capaci di bloccare l'attivazione del TLR4, agendo quindi da antagonisti, sono importanti prototipi per lo sviluppo di farmaci attivi contro la sepsi acuta e lo shock settico⁶. Le stesse molecole, inibendo l'attivazione del TLR4 da parte dei fattori molecolari endogeni, potrebbero essere utilizzate come farmaci per una vasta gamma di patologie infiammatorie e autoimmuni. In questo contesto, il TLR4 è considerato un bersaglio molecolare emergente implicato in una serie di malattie tipiche della società moderna, tra cui le malattie autoimmuni, le infiammazioni croniche, le allergie, l'asma, le malattie neurodegenerative (tra cui la sclerosi laterale amiotrofica, SLA, ed il morbo di Alzheimer) ed alcuni tipi di tumore⁷.

La "chimica" del TLR4 e delle endotossine batteriche

Il complesso meccanismo molecolare dell'attivazione del TLR4 e della conseguente cascata di reazioni (segnalazione) che portano alla produzione delle citochine infiammatorie è stato quasi completamente chiarito negli ultimi anni nel caso in cui il TLR4 venga attivato dall'LPS batterico⁸. Tale conoscenza rappresenta una base essenziale per la progettazione di nuove molecole sintetiche che agiscono come modulatori TLR4. L'attivazione della risposta immunitaria innata da parte dell'LPS consiste, dal punto di vista molecolare, in una serie di interazioni specifiche tra l'LPS ed i recettori che agiscono in modo sequenziale legando l'LPS: la *Lipid Binding Protein* (LBP)⁹, il CD14¹⁰ (un antigene di differenziazione di monociti), ed il fattore di Differenziazione Mieloide 2 (MD-2)¹¹ in complesso con il TLR4 (Fig. 1A). Il processo molecolare di attivazione del TLR4 sulla superficie delle cellule, inizia dunque con l'estrazione di una singola molecola di LPS dagli aggregati in soluzione da parte di LBP, che trasferisce la molecola al CD14 il quale, a sua volta, la trasferisce al complesso dimerico MD-2.TLR4, formando il complesso molecolare omodimerico (LPS.MD-2.TLR4)₂ che, dalla superficie della cellula, avvia la segnalazione intracellulare. Una volta formato il complesso attivato, delle proteine adattatrici specifiche si legano al dominio intracellulare del TLR4, innescando due diverse vie di segnalazione che portano all'attivazione di fattori di trascrizione nucleare e alla produzione di mediatori chimici (citochine pro-infiammatorie)¹². Le citochine a loro volta attivano i meccanismi dell'infiammazione e dell'immunità innata, come mostrato nella Fig. 1A.

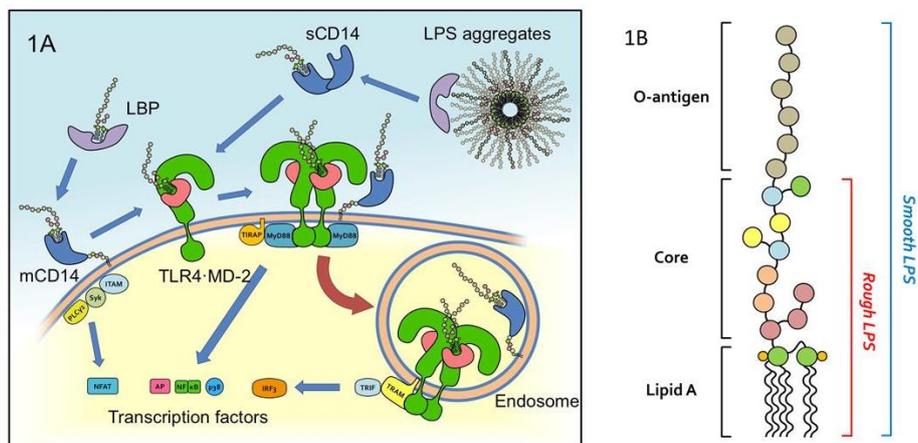


Fig. 1 - A) Schema dell'attivazione del TLR4 da parte delle endotossine batteriche e della conseguente segnalazione intracellulare; B) struttura molecolare dell'LPS batterico

L'LPS è la molecola naturale che lega ed attiva il TLR4 ed è composto da tre parti: 1) il lipide A, che grazie alle sue code idrofobiche ancora l'LPS alla membrana esterna dei batteri Gram negativi; 2) un nucleo oligosaccaridico contenente l'acido 3-desossi-D-manno-ottulosonico (Kdo); 3) il cosiddetto antigene-O, una lunga catena polisaccaridica formata da unità ripetute di oligosaccaridi (Fig. 1B). L'LPS completo contenente tutte e tre le regioni è definito LPS "liscio" (smooth), mentre l'LPS tronco, che manca dell'antigene-O e/o di porzioni del nucleo oligosaccaridico è chiamato LPS "ruvido" (rough) (Fig. 1B). Il lipide A è responsabile dell'effetto tossico di LPS ed è la parte di LPS che interagisce direttamente con i recettori CD14 ed MD-2. Nonostante una certa variabilità strutturale nelle diverse specie batteriche, il lipide A è generalmente costituito da un disaccaride, la β(1-6)D-glucosammina, recante due esteri fosforici nelle posizioni C-1 e C-4', e catene di acidi grassi mono-idrossilate legate come esteri (C-3, C-3') ed ammidi (C-2, C-2'). Due catene di

acidi grassi, quelle nelle posizioni C-2' e C-3', sono solitamente ramificate. In alcuni batteri gli esteri fosforici possono essere sostituiti da altri gruppi polari, come ad esempio la fosfo-etanolamina presente nel lipide A di *Campylobacter jejuni*, e l'acido galatturonico presente nel *Synechococcus cianobatteri*, oppure uno o entrambi i fosfati possono essere assenti.

La caratterizzazione della struttura di nuove varianti naturali di lipide A è un filone di ricerca in grande sviluppo ed il gruppo di ricerca di Antonio Molinaro dell'Università di Napoli rappresenta un riferimento internazionale in questo campo.

Sono note varianti del lipide A che differiscono per il grado di fosforilazione, per la presenza di vari gruppi chimici legati ai fosfati e per la struttura, la lunghezza, il numero e la posizione delle catene di acidi grassi. Il lipide A di *E. coli* è quello con l'attività maggiore come attivante del TLR4 (agonista) ed è costituito da un disaccaride della glucosammina recante 4 catene lipidiche (2 delle quali ramificate) e fosforilato in C-1 e C-4' (Fig. 2).

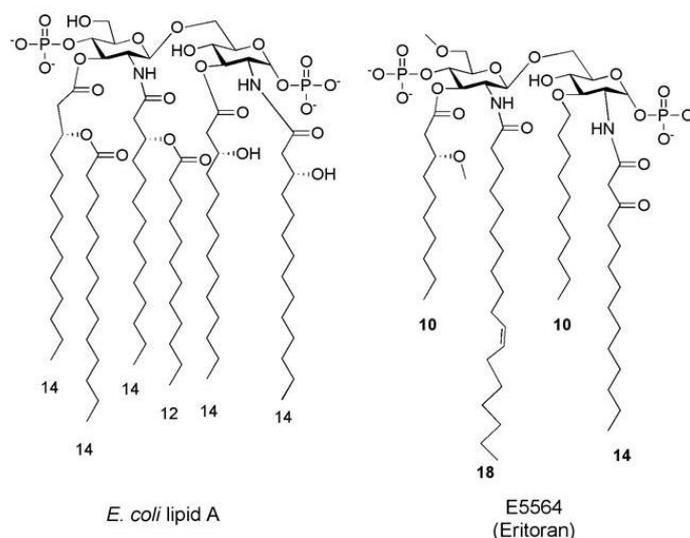


Fig. 2 - Lipide A di *E. coli* (agonista del TLR4), e l'Eritoran (antagonista)

L'analisi cristallografica dei complessi trimolecolari formati dal lipide A con il dimerico MD-2.TLR4 ha rivelato come gli agonisti e gli antagonisti si leghino al recettore MD-2 in modi diversi. Nel caso degli antagonisti del TLR4, come la molecola sintetica Eritoran¹³ ed il composto naturale lipide IVa (Fig. 2)¹⁴, tutte e quattro le catene di acidi grassi sono inserite nella tasca idrofobica di legame del recettore MD-2 umano, mentre nel caso del lipide A da *E. coli* solo cinque catene lipidiche sono inserite all'interno della cavità di legame, mentre la sesta catena è esposta sulla superficie di MD-2. Nel primo caso (attività antagonista), il ligando occupa il sito di legame dell'MD-2 senza innescare la dimerizzazione del TLR4 e quindi la sua attivazione, mentre nel secondo caso (attività agonista) la catena lipofila esposta sulla superficie di MD-2 concorre a formare il nucleo idrofobico per l'interazione con il secondo recettore TLR4 e quindi innesca la formazione del dimerico attivato (LPS.MD-2.TLR4)₂.

È stato recentemente scoperto che il lipide IVa agisce come un antagonista sul sistema TLR4/MD-2 umano ma come agonista sul TLR4/MD-2 di topo¹⁵. Questa attività specie-specifica del lipide IVa è attribuita, tra l'altro, alle differenze nella forma della tasca idrofobica di legame dei recettori MD-2 umani e murini¹⁶.

La recente conoscenza delle strutture cristallografiche del complesso attivato (LPS.MD-2.TLR4)₂ umano¹⁷ e di topo¹⁸, ha permesso la progettazione razionale di agonisti ed antagonisti del TLR4 basati su modifiche della struttura chimica del lipide A. Piccole modifiche, come per esempio la rimozione di uno dei due fosfati, hanno portato alla sintesi di analoghi non tossici del lipide A con attività agonista che attualmente sono utilizzati come adiuvanti vaccinali (cioè sostanze da formulare con il vaccino per aumentarne la potenza immunogenica)^{19,20}.

Altre modifiche strutturali del lipide A, come ad esempio la rimozione e modifica chimica di catene lipofile, hanno portato alla molecola sintetica Eritoran, con quattro catene, di cui una monoinsatura, che si è dimostrata molto attiva su modelli animali di sepsi acuta e shock settico, ma che non ha superato la fase clinica III e quindi non è divenuta farmaco²¹. La mancanza di attività di questo antagonista del TLR4 nei

pazienti affetti da setticemia, e quindi il fallimento della fase clinica, indica che le attuali strategie per bloccare il TLR4 possono e devono essere migliorate. C'è dunque una crescente necessità a livello clinico e farmacologico di avere sostanze efficaci nel bloccare il segnale del TLR4.

LPS batterico: relazione tra le conformazioni molecolari e supramolecolari e l'attività biologica

Le conformazioni a minima energia di alcune varianti di lipide A sono state riportate in funzione del valore dell'angolo formato tra l'asse del disaccaride diglucosamina e le catene lipofile (*tilt angle*), le quali si trovano in disposizione parallela tra loro²². Nel caso del lipide A da *E. coli*, questo angolo è $>50^\circ$, il che conferisce alla molecola una forma a tronco di cono (Fig. 3). Altre varianti hanno il *tilt angle* $<25^\circ$, come ad esempio il lipide IVa e il lipide A da *R. sphaeroides* ed *R. capsulatus*. Questo valore di *tilt angle* è associato ad una forma cilindrica. Alcune varianti di lipide A con un angolo compreso tra $25-50^\circ$, come il lipide A monofosforilato, presentano una conformazione intermedia. La natura anfifilica dell'LPS e del lipide A, che sono formati da un parte polare ed una apolare, fa sì che entrambe le molecole in soluzione acquosa formino aggregati supramolecolari molto stabili, con valori di concentrazione micellare critica (CMC) molto bassi, nell'ordine del pico-molare (10^{-12} molare)²³. La forma di questi aggregati è dipendente dalla conformazione molecolare del lipide A, variabile da lamellare per le specie di lipide A a forma cilindrica, a cubico o esagonale invertita II per le specie coniche (Fig. 3).

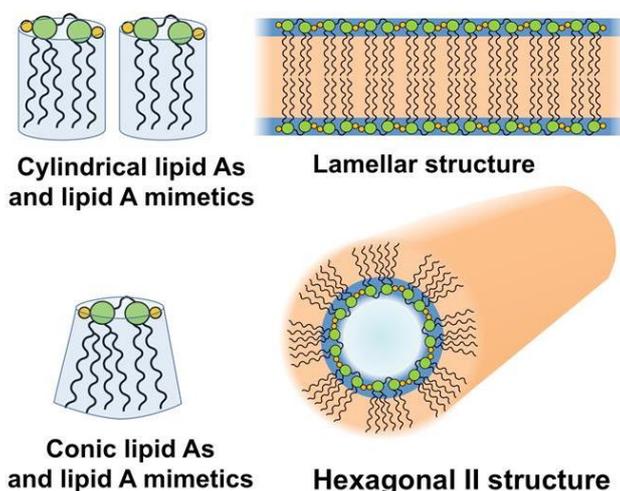


Fig. 3 - Relazioni tra struttura chimica delle varianti di lipide A e le strutture degli aggregati in soluzione acquosa

Sono state trovate delle importanti correlazioni tra le strutture degli aggregati supramolecolari delle varianti di lipide A e la relativa attività biologica: le molecole che danno origine ad aggregati lamellari (ad esempio le varianti con 4 e 5 catene lipofile), non sono in grado di attivare cellule immunocompetenti che esprimono il TLR4 ed hanno spesso attività di antagonisti²², mentre le molecole i cui aggregati assumono strutture cubiche o esagonali (generalmente con 6 catene lipofile) sono molto attive come agonisti del TLR4. Questa correlazione tra struttura delle singole molecole (cilindrica o conica), degli aggregati supramolecolari (lamellari o cubici/esagonali) e l'attività biologica (antagonista o agonista), può essere estesa anche a molecole di sintesi che "mimano" la struttura del lipide A, come nel caso dell'Eritoran (vedi sopra) e di monosaccaridi con 3 catene lipofile (tipo i lipidi A di Gifu, detti composti GLA)²⁴ ed alcuni fosfolipidi con struttura non-zuccherina²⁵.

Il processo di "semplificazione molecolare" del lipide A

L'attività biologica delle endotossine batteriche e di loro parti (lipide A, LPS, e LOS) e delle varianti sintetiche del lipide A è determinata dalla somma di due fattori: 1) la geometria dell'interazione di singole molecole di lipide A o LPS con la cavità idrofobica del recettore MD-2; 2) la struttura tridimensionale degli aggregati, che molto probabilmente influenza i primi stadi del processo di riconoscimento molecolare dell'LPS e di estrazione di una singola molecola di LPS dagli aggregati, a carico delle proteine LBP e CD14^{26,27}. Il disegno razionale di modulatori sintetici del TLR4 dovrebbe, in linea di principio, prendere in

considerazione ed ottimizzare entrambi questi aspetti, ma in realtà è molto difficile, con le conoscenze attuali, una previsione affidabile della relazione struttura-attività per nuovi composti attivi sul TLR4.

Inoltre la sintesi delle varianti naturali del lipide A o di suoi mimetici è un vero e proprio incubo per il chimico organico: la preparazione delle due unità monosaccaridiche, dette donatore ed accettore di glicosile, richiede l'uso di un insieme di gruppi protettori ortogonali che aumentano il numero di passaggi sintetici e abbassano la resa finale. La presenza di gruppi fosfato ed esteri carbossilici nel lipide A finale richiede l'uso di condizioni di reazione particolarmente miti, non sempre conciliabili con i reattivi necessari alle reazioni. La sintesi inoltre prevede due reazioni di glicosilazione, una per unire il donatore all'accettore con un legame $\beta(1-6)$ glicosidico, l'altra per introdurre il fosfato in posizione anomeric (α -1-fosfato). La stereochimica di entrambi questi legami glicosidici è molto importante per l'attività biologica²⁸. Le sintesi sono dunque impegnative e lunghe con decine di passaggi²⁹. Gli intermedi sintetici e le molecole finali sono inoltre composti anfifilici che tendono a formare micelle e aggregati complicando così ulteriormente la sintesi e l'uso finale delle molecole²⁴.

Per questi motivi si tende oggi a semplificare la struttura del lipide A, secondo una strategia comune allo sviluppo di farmaci derivanti da composti naturali a struttura particolarmente complessa. Sono state progettate e sintetizzate una serie di varianti semplificate del lipide A con lo scopo di preservarne parzialmente o totalmente l'attività biologica riducendone però la complessità chimica, e dunque rendendo più semplice la sintesi e migliorandone, dove possibile, le proprietà di solubilità. Sono state utilizzate diverse strade nella semplificazione strutturale del lipide A (Fig. 4): 1) la struttura disaccaridica è conservata e la sintesi è semplificata da una strategia convergente³⁰; 2) la struttura del disaccaride naturale è modificata in strutture simmetriche non naturali, anche utilizzando un linker di natura variabile per collegare le unità di monosaccaride^{31,32,33}; 3) lo zucchero riducente del disaccaride è sostituito da agliconi di altra natura^{34,35} o completamente rimosso^{36,37,38}, 4) la struttura saccharidica viene sostituita in toto da un'altra molecola³⁹.

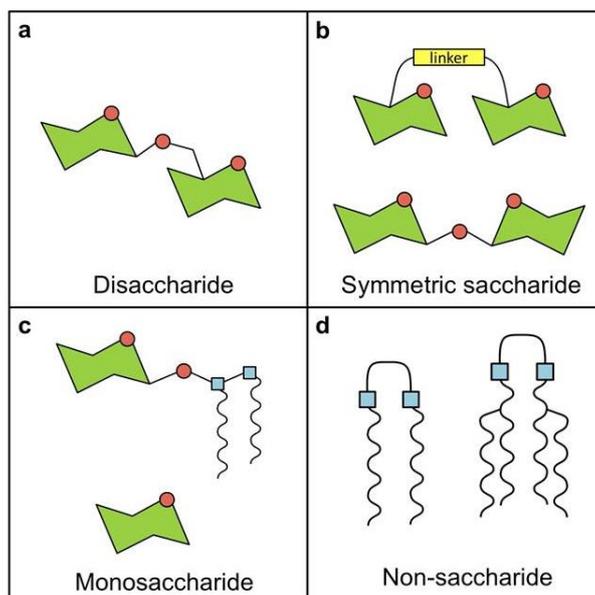


Fig. 4 - Diversi approcci alla semplificazione strutturale del lipide A

Glicolipidi anionici attivi sul TLR4

I modulatori chimici del TLR4 possono essere classificati anche in base alla loro natura cationica o anionica. I composti anionici di natura anfifilica (cioè costituiti da una parte polare, l'anione, ed una parte apolare, le catene grasse) descritti nella più recente letteratura scientifica sono rappresentati nella Fig. 5.

Sono stati recentemente sviluppati mimetici del lipide A basati sul disaccaride naturale trealosio³² ed è stato studiato l'effetto della rigidità conformazionale di questi composti sulla loro attività sul TLR4 (Fig. 5). Le conformazioni di minima energia dei derivati del trealosio legati al recettore MD-2 umano presentano le due unità monosaccaridiche di glucosamina in una disposizione co-planare. Queste conformazioni presentano un'orientazione dello zucchero molto simile a quanto si trova nella conformazioni del lipide IVa legato all'MD-2 umano. Al contrario, gli autori sottolineano che quando le due unità monosaccaridiche

sono mutuamente inclinate, come nel caso del lipide A naturale di *E. coli*, questa conformazione permette l'esposizione di una catena lipofila sulla superficie di MD-2, innescando, come descritto, la dimerizzazione e l'attivazione del TLR4. L'attività antagonista prevista dai calcoli di docking molecolare per i derivati del trealosio è stata confermata dai dati biologici. Tutti i composti hanno mostrato infatti un'attività antagonista nei confronti del TLR4 umano (hTLR4) e nessuna attività agonista in cellule modello HEK293 selettivamente ingegnerizzate con hTLR4. L'attività antagonista di questi composti è stata razionalizzata sulla base della rigidità conformazionale della struttura trealosio che una volta legato ad hMD-2, impedirebbe la dimerizzazione del complesso TLR4.MD³².

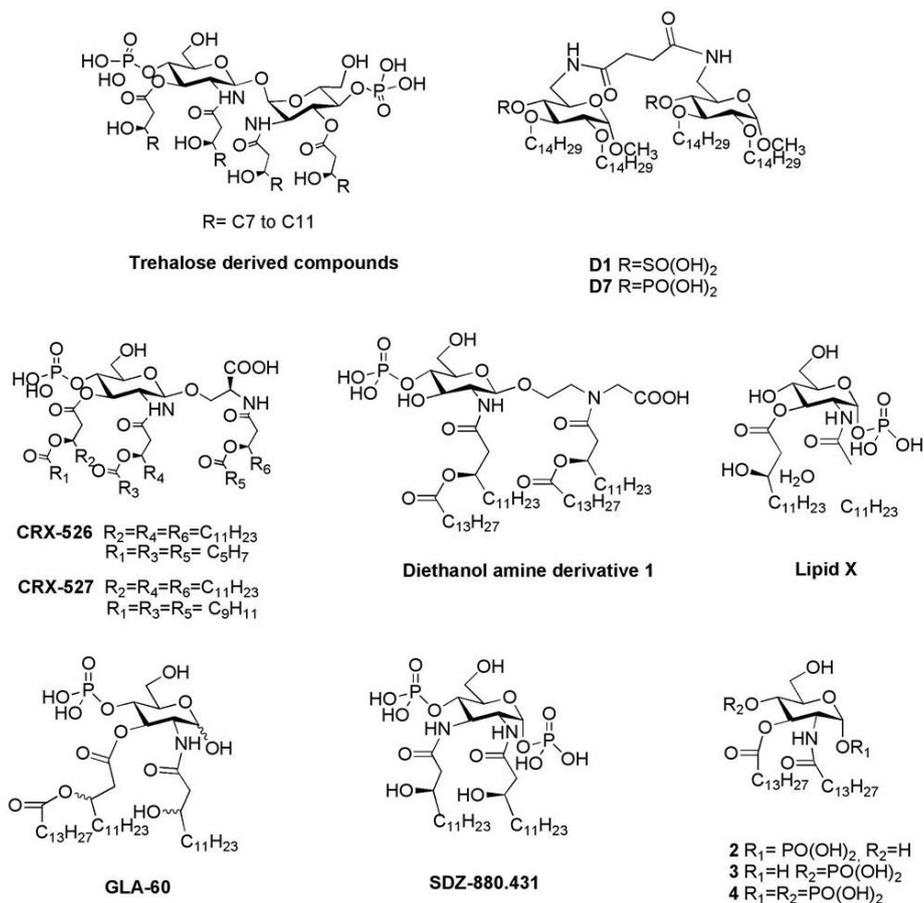


Fig. 5 - Anfifili anionici attivi sul TLR4

Il nostro gruppo di ricerca ha sintetizzato due analoghi lipide A (composti D1 e D7, Fig. 5) con simmetria rotazionale, utilizzando una strategia sintetica convergente³³. Due unità monosaccaridiche di glucosio sono legate attraverso un linker simmetrico. Studi preliminari di modellistica molecolare hanno suggerito che il ponte diammidico tra i due monosaccaridi garantisce la flessibilità conformazionale necessaria per consentire alle catene lipofile di adattarsi nella cavità di legame di MD-2. Nel composto D7 ci sono due fosfati nelle posizioni C-4 e C-4', mentre in D1 abbiamo sostituito i gruppi fosfato con i gruppi bio-isosteri solfati, che si trovano in forma di anioni a pH neutro. In sistemi cellulari esperimenti il TLR4 il composto D1 ha mostrato una duplice attività: si comporta come un antagonista del TLR4 quando co-somministrato con LOS da *Neisseria meningitidis*, e come agonista del TLR4 agonista quando somministrato da solo³³. Il meccanismo di azione di D1 è stato studiato nel dettaglio molecolare e gli esperimenti con recettori purificati (in collaborazione con J. Weiss e T. Gioannini dell'Università dell'Iowa, USA) hanno dimostrato che D1 inibisce l'interazione di LOS sia con CD14 che con il complesso MD-2.TLR4, presumibilmente occupando i recettori stessi siti di legame³³.

La complessità della struttura chimica del lipide A e di conseguenza la difficoltà della sintesi, hanno suggerito la progettazione e la sintesi di modulatori del TLR4 basati su strutture più semplici, per esempio monosaccaridi (Fig. 5). Molti derivati monosaccaridici in cui un aglicone lineare sostituisce lo zucchero riducente sono stati sintetizzati come mimetici del lipide A. Gli amminoalchil-glucosamina fosfati (AGPs)

costituiscono una famiglia di modulatori del TLR4 in cui uno dei due monosaccaridi è sostituito da un aminoacido o altri agliconi legati alle catene lipofile (CRX-526 e CRX-527, Fig. 5)^{40,41}. A seconda della lunghezza della catena lipofila gli AGPs si comportano da agonisti come il composto CRX-527^{41,42} o antagonisti come nel caso di CRX526 (Fig. 5)⁴³.

Il lipide X (Fig. 5) è un composto naturale, precursore biosintetico del lipide A, ed è noto per possedere attività antagonista nei macrofagi murini⁴⁴; è quindi stato utilizzato come struttura base per sviluppare alcuni analoghi strutturali. Tra questi, una vasta gamma di composti denominati lipidi A di Gifu (GLA)^{45,46}, presentano lo stesso monosaccaride legato ad una serie di catene lipofile di struttura differente (Fig. 5). Le catene lipofile sono legate al nucleo zuccherino con legami esterei, ammidici, eterei ed amminici. Il GLA ha uno o due gruppi fosfato nelle posizioni C-1 e/o C-4. La relazione struttura-attività è stata ampiamente studiata sui GLA. Il composto GLA-60 (Fig. 5) con due catene di acidi C14 in C-3 e un C14 lineare catena in C-2 ha mostrato attività di agonista del TLR4 nei macrofagi umani e di topo, mentre il composto SDZ-880.431 (Fig. 5)⁴⁷ ha mostrato l'attività antagonista più potente. Recentemente è stata studiata la correlazione tra le strutture chimiche di alcuni GLA, la conformazione dei loro aggregati in soluzione e la loro attività sul TLR4²⁴. Come già descritto per le varianti naturali di lipide A, l'esistenza di una struttura multilamellare è tipica per i GLA di forma cilindrica e corrisponde ad una bassa attività sul TLR4 ed in alcuni casi ad un'attività antagonista. I GLA che adottano una forma conica, invece, formano aggregati supramolecolari monolamellari o non-lamellari ed hanno una spiccata attività agonista²⁵.

Il nostro gruppo ha recentemente sintetizzato i composti **2-4**³⁸ (Fig. 5) che rappresentano un'ulteriore semplificazione strutturale rispetto ai monosaccaridi GLA che a loro volta mimano il lipide. Il composto **4** con due fosfati, è risultato l'unico composto attivo come antagonista del TLR4, inibendo in modo dose-dipendente l'attivazione da parte dell'LPS del TLR4 in cellule HEK-blueTM e in macrofagi murini. Per ottenere maggiori informazioni sulle possibili interazioni del monosaccaride **4** con CD14 ed MD-2, abbiamo analizzato l'internalizzazione dei recettori CD14 e del complesso recettoriale MD-2.TLR4 indotta dalla somministrazione del composto **4** a macrofagi derivati dal midollo osseo di topi³⁸. Gli esperimenti, in collaborazione con Francesca Granucci e Ivan Zanoni, hanno mostrato che **4** interagisce con alta affinità con entrambi i recettori CD14 ed MD-2.

Glicolipidi cationici attivi sul TLR4

La maggioranza degli anfifili cationici con attività sul TLR4 finora riportati in letteratura sono basati su strutture non saccaridiche. Poliammine anfifiliche modulano l'attivazione TLR4 operando a diversi livelli della via di segnalazione⁴⁸. Il primo livello di azione si basa sulla formazione di aggregati stabili con LPS. La natura anionica ed anfifilica dell'LPS favorisce l'interazione ionica con molecole caricate positivamente, che possono dunque agire come "sequestranti" dell'LPS, impedendone l'interazione con i recettori LBP, CD14 ed MD-2 e neutralizzando la sua tossicità. Il decapeptide cationico Polimixina B (PMB) (Fig. 6) è noto per essere un sequestrante con un'elevata affinità per l'LPS. PMB inibisce la tossicità dell'LPS *in vitro* e in modelli animali di endotossemia⁴⁹.

Tuttavia il PMB è utilizzato come antibiotico per applicazioni topiche poiché l'elevata tossicità ne preclude l'uso sistemico. Sono stati recentemente sviluppati derivati modificati del PMB non tossici, così come diverse categorie di anfifili cationici sintetici, tra cui alcune acil-omospermine⁵⁰ ed omospermine-sulfonamidi (Fig. 6)⁵¹. Gli anfifili cationici agiscono anche ad un secondo livello, competendo con l'LPS per il legame con i recettori LBP o CD14. Come esempio, la diC14-ammidina (Fig. 6), un lipide cationico con una testa polare e due catene lipofile, è un agonista del TLR4 ed induce una reazione infiammatoria simile all'LPS. Stimola la secrezione di citochine e chemochine in topo ed in cellule dendritiche umane, attivando la segnalazione del TLR4^{52,53}. L'attività immunostimolante dei lipidi cationici è tuttavia generalmente debole e non è sufficiente affinché possano essere utilizzati come vaccini adiuvanti. Per questo motivo, la maggior parte delle formulazioni adiuvanti a base di liposomi cationici contengono anche componenti batterici come immunostimolatori. Tuttavia, recenti risultati positivi ottenuti combinando alcuni lipidi cationici (per esempio DOTAP e diC14-ammidina, Fig. 6) ed antigeni, suggeriscono che le formulazioni di adiuvanti basate sui soli anfifili cationici saranno possibili nel prossimo futuro⁵⁴. Un'attività antagonista del TLR4 è stata trovata nella LipoFectaminaTM, una formulazione di liposomi cationici che aumenta la disponibilità di LPS alla membrana cellulare e sue successive incorporazioni⁵⁵. È stato riportato che i complessi di LipoFectaminaTM e LPS co-localizzano con il recettore CD14 sulla superficie dei macrofagi e all'interno delle

cellule, ma non co-localizzano con il complesso TLR4.MD-2. Inoltre la modulazione dell'espressione di TLR4.MD-2 sulla superficie cellulare, caratteristico dell'attivazione da LPS, non è stato osservato per i complessi LPS-LipoFectamina™, suggerendo che la LipoFectamina™ disaccoppia l'interazione LPS-CD14 da quella con TLR4.MD-2 sulla superficie cellulare. Da questi dati sembra probabile che l'interazione con CD14 sia fondamentale per l'azione antagonista della LipoFectamina™.

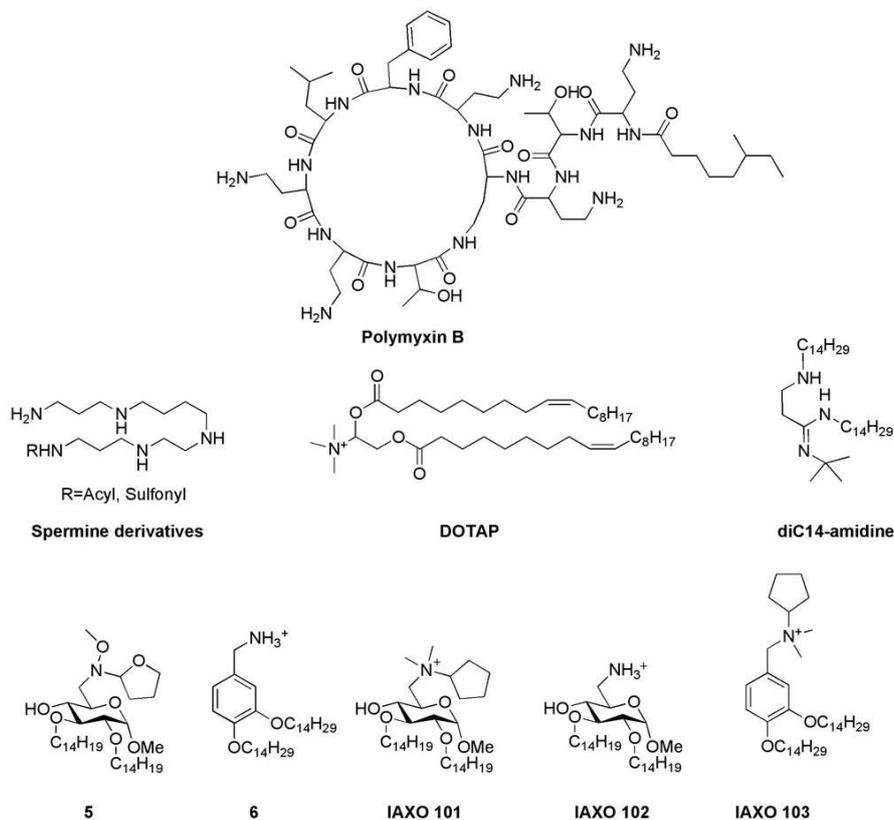


Fig. 6 - Anfili cationici attivi sul TLR4

Analogamente, glicolipidi cationici sviluppati dal nostro gruppo di ricerca hanno una potente azione antagonista nei confronti del TLR4, probabilmente basata sul targeting del recettore CD14. Nel 2007 il nostro gruppo di ricerca ha casualmente scoperto che il glicolipide **5** (Fig. 6)⁷ ha una debole attività antagonista del TLR4. Questo risultato ci ha spinto a sintetizzare glicolipidi di struttura simile, realizzando una piccola raccolta di glicolipidi (i composti IAXO³⁷ mostrati in Fig. 6). I composti IAXO-101 e IAXO-102, sono risultati non tossici, e dotati di una potente attività di antagonisti del TLR4. Questi composti sono tutti costituiti da una struttura di base di metil α -D-glucopiranoside con eteri a lunga catena nelle posizioni C-2 e C-3 e sostituito in posizione C-6 con un gruppo azotato: un sale di ammonio quaternario (IAXO101) o una ammina (IAXO102) protonata a pH fisiologico; IAXO103 e il composto **6** sono gli analoghi benzilammonici di IAXO101 e IAXO-102 in cui l'anello del monosaccaride è stato sostituito con un anello benzenico. Tra questi composti, IAXO102 e 103 sono risultati gli antagonisti più potenti sia *in vitro* che *in vivo*, con valori di IC₅₀ rispettivamente di 5,5 e 1,7 μ M, ed elevata attività in modelli *in vivo* di sepsi e shock settico³⁷. Il meccanismo di azione dei composti tipo IAXO è stato studiato con esperimenti biochimici con recettori purificati e tramite esperimenti di interazione ligando/proteina con NMR, ed i risultati hanno mostrato come gli IAXO abbiano una maggiore affinità per CD14 che per MD-2. Il composto IAXO-101 si è mostrato attivo nel ridurre o eliminare del tutto il dolore neuropatico⁵⁶, una delle patologie del sistema nervoso centrale in cui il TLR4 sembra giocare un ruolo essenziale, in modelli di topo ed i composti IAXO-102 e **6** (Fig. 6) si sono rivelati attivi in modelli sperimentali di neuroinfiammazione (dati ancora non pubblicati, in collaborazione con Massimiliano De Paola e Caterina Bendotti, Istituto Mario Negri, Milano). Composti cationici attivi sul TLR4 sono stati sviluppati anche a partire da peptidi antimicrobici sintetici che riproducono la regione che lega l'LPS della proteina di Limulus anti-LPS (LALF). Tali peptidi sono in grado di neutralizzare le endotossine batteriche⁵⁷. La sequenza completa del dominio di legame con l'LPS è stata

riprodotta in un peptide ciclico chiamato cLALF22, che ha mostrato un'alta affinità di legame per il lipide A^{58,59}. Recenti studi hanno dimostrato che la neutralizzazione di LPS da parte dei peptidi è associata ad una fluidificazione delle catene lipofile dell'LPS, da una forte interazione elettrostatica tra i due composti e da un drastico cambiamento del tipo di aggregati di LPS, da cubici a multilamellari, con conseguente inibizione dell'interazione con LBP e altre proteine di mammifero⁶⁰. Un polipeptide sintetizzato di recente⁶¹, neutralizza le risposte infiammatorie innescate sia da batteri Gram-negativi (*Salmonella enterica*) che da Gram-positivi (*Staphylococcus aureus*) e riduce i livelli di citochine infiammatorie in modelli murini di sepsi.

Conclusioni e prospettive future

Come discusso in questa review, il rapporto tra struttura chimica ed attività biologica/farmacologica (SAR) di modulatori del TLR4 basati sulla struttura del lipide A, è determinato da due fattori strettamente correlati: la forma tridimensionale assunta dagli aggregati in soluzione e l'orientamento della molecola nel sito di legame dei due recettori principali CD14 e MD-2. Lo stato di aggregazione e la forma degli aggregati influenzano maggiormente le prime fasi del riconoscimento molecolare dell'LPS da parte di LBP e altre proteine del siero, come l'ovalbumina, che estraggono monomeri di LPS dagli aggregati in soluzione.

Il secondo fattore è legato al riconoscimento molecolare specifico del lipide A da parte delle proteine CD14 ed MD-2, che precede immediatamente la formazione del complesso attivato (LPS.MD-2.TLR4)₂. Al variare del rapporto tra il volume della parte lipofila (le catene aciliche) e idrofila (la parte zuccherina e i fosfati) del lipide A, si passa da un'attività antagonista (legata ad una forma cilindrica della molecola) ad un'attività agonista (legata ad una forma conica). Questo paradigma ha finora guidato il disegno razionale di agonisti ed antagonisti del TLR4 basati su anifili anionici che mimano il lipide A o il suo precursore monosaccaridico, il lipide X. Nel caso degli anifili cationici, ancora mancano regole altrettanto precise per la progettazione razionale di modulatori del TLR4 ed il successo finora avuto nello sviluppo di agonisti ed antagonisti si è basato principalmente su un approccio sperimentale per tentativi successivi ed errori.

Tuttavia, mentre gli agonisti sintetici del lipide A ottenuti secondo l'approccio razionale descritto sono già usati in clinica come adiuvanti vaccinali, il più potente antagonista del TLR4 basato sullo stesso approccio non si è dimostrato sufficientemente attivo sull'uomo e non ha passato la fase di sperimentazione clinica III come farmaco anti-sepsi. Sembra, dunque, che il livello attuale di conoscenza dei meccanismi molecolari della segnalazione del TLR4 sia ancora incompleto. Nuove strategie sono quindi necessarie nella progettazione di antagonisti del TLR4. Un nuovo approccio è suggerito da studi più recenti sulla modulazione del TLR4 da parte composti sintetici, in particolare alcuni anifili cationici (ad esempio la LipoFectaminaTM, ed i composti IAXO) ed anifili anionici a base di monosaccaridi (ad esempio il composto **4**), i quali sembrano avere una maggiore affinità per CD14 che per MD-2.

Recenti dati di letteratura indicano che CD14 è una molecola versatile con molteplici funzioni⁶², con una serie di funzioni oltre a quella di assistere la presentazione dell'endotossina al TLR4. Il CD14 regola il ciclo di vita delle cellule dendritiche attraverso una via del segnale indipendente da quella del TLR4 che coinvolge l'attivazione del fattore nucleare di attivazione delle cellule T (NFAT)⁶³. CD14 è dunque anch'esso un target emergente in diverse patologie, tra cui la sepsi, e la scoperta di vie del segnale attivate esclusivamente dalla stimolazione di CD14 è un passo importante verso lo sviluppo di potenziali farmaci che interferiscano con questo segnale.

Probabilmente, per un targeting più efficace della via del TLR4 sarà necessario utilizzare sinergicamente sostanze che interferiscano con l'attività del CD14 e questa potrebbe essere la chiave per arrivare finalmente a farmaci attivi contro le patologie acute e croniche causate dall'attivazione del TLR4.

Bibliografia

- ¹S. Akira, K. Takeda, *Nat. Rev. Immunol.*, 2004, **4**(7), 499.
- ²A. Poltorak *et al.*, *Science*, 1998, **282**(5396), 2085.
- ³B. Beutler *et al.*, *Journal of Endotoxin Research*, 2001, **7**(4), 277.
- ⁴E. Jeong, Y.J. Lee, *Yonsei Med. J.*, 2011, **52**(3), 379.
- ⁵K. Lucas, M. Maes, *Mol. Neurobiol.*, 2013, **48**(1), 190.
- ⁶S.K. Cribbs, G.S. Martin, *Crit. Care Med.*, 2007, **35**(11), 2646.
- ⁷F. Peri, V. Calabrese, *Journal of Medicinal Chemistry*, 2014, **57**(9), 3612.
- ⁸R. Jerala, *Int. J. Med. Microbiol.*, 2007, **297**(5), 353.
- ⁹R. Schumann *et al.*, *Science*, 1990, **249**, 1429.

- ¹⁰S.R. Wright *et al.*, *Science*, 1990, **249**, 1431.
- ¹¹R. Shimazu *et al.*, *The Journal of Experimental Medicine*, 1999, **189**(11), 1777.
- ¹²L.A.J. O'Neill, *Nat. Rev. Immunol.*, 2007, **7**, 353.
- ¹³H. Kim *et al.*, *Cell*, 2007, **130**(5), 906.
- ¹⁴U. Ohto *et al.*, *Science*, 2007, **316**(5831), 1632.
- ¹⁵J. Meng *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2010, **285**(36), 27935.
- ¹⁶C. Walsh *et al.*, *J. Immunol.*, 2008, **181**(2), 1245.
- ¹⁷B. Park *et al.*, *Nature*, 2009, **458**(7242), 1191.
- ¹⁸U. Ohto *et al.*, *Proc. of the National Academy of Sciences*, 2012.
- ¹⁹W.S. Bowen *et al.*, *Sci. Signal.*, 2012, **5**(211), ra13.
- ²⁰V. Mata-Haro *et al.*, *Science*, 2007, **316**(5831), 1628.
- ²¹A. Barochia *et al.*, *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 2011, **7**(4), 479.
- ²²K. Brandenburg, A. Wiese, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2004, **4**(11), 1127.
- ²³Endotoxins: Structure, Function and Recognition (Subcellular Biochemistry Series), X. Wang, P.J. Quinn (Eds.), Springer, 2010, vol. 53, 1.
- ²⁴K. Brandenburg *et al.*, *Biophysical Journal*, 2002, **83**(1), 322.
- ²⁵U. Seydel *et al.*, *European Journal of Immunology*, 2003, **33**(6), 1586.
- ²⁶A.B. Schromm *et al.*, *European Journal of Biochemistry*, 2000, **267**(7), 2008.
- ²⁷T. Gutschmann *et al.*, *International Journal of Medical Microbiology*, 2007, **297**(5), 341.
- ²⁸E. Rietschel *et al.*, *FASEB J.*, 1994, **8**(2), 217.
- ²⁹K. Fukase *et al.*, *Tetrahedron*, 1998, **54**(16), 4033.
- ³⁰Y. Zhang *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**(16), 5200.
- ³¹J.D. Lewicky *et al.*, *Carbohydrate Research*, 2011, **346**(13), 1705.
- ³²D. Artner *et al.*, *ACS Chemical Biology*, 2013, **8**(11), 2423.
- ³³M. Piazza *et al.*, *ChemMedChem*, 2012, **7**(2), 213.
- ³⁴J.D. Lewicky *et al.*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2013, **21**(8), 2199.
- ³⁵Z.-H. Jiang, *et al.*, *Tetrahedron*, 2002, **58**(43), 8833.
- ³⁶F. Peri *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, 2006, **14**(1), 190.
- ³⁷M. Piazza *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2009, **52**(4), 1209.
- ³⁸R. Cighetti *et al.*, *Chembiochem*, 2014, **15**(2), 250.
- ³⁹E. Lien *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2001, **276**(3), 1873.
- ⁴⁰D.A. Johnson *et al.*, *Journal of Medicinal Chemistry*, 1999, **42**(22), 4640.
- ⁴¹D.A. Johnson *et al.*, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2008, **8**(2), 64.
- ⁴²J.R. Baldridge *et al.*, *Expert Opin. Biol. Th.*, 2004, **4**(7), 1129.
- ⁴³M.M. Fort *et al.*, *Journal of Immunology*, 2005, **174**(10), 6416.
- ⁴⁴C. Lam *et al.*, *Infection and Immunity*, 1991, **59**(7), 2351.
- ⁴⁵K. Funatogawa *et al.*, *Infect. Immun.*, 1998, **66**(12), 5792.
- ⁴⁶A.L. Van Dervort *et al.*, *J. Immunol.*, 1992, **149**(1), 359.
- ⁴⁷C.L. Manthey *et al.*, *J. Exp. Med.*, 1993, **178**(2), 695.
- ⁴⁸C. Loney *et al.*, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2012, **64**(15), 1749.
- ⁴⁹D.C. Morrison *et al.*, *Immunochemistry*, 1976, **13**(10), 813.
- ⁵⁰K.A. Miller *et al.*, *Journal of Medicinal Chemistry*, 2005, **48**(7), 2589.
- ⁵¹M.R. Burns *et al.*, *Journal of Medicinal Chemistry*, 2007, **50**(4), 877.
- ⁵²T. Tanaka *et al.*, *European Journal of Immunology*, 2008, **38**(5), 1351.
- ⁵³A. Wilmar *et al.*, *Vaccine*, 2012, **30**(2), 414.
- ⁵⁴W. Chen *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.*, 2008, **57**(4), 517.
- ⁵⁵J.R. Eldstrom *et al.*, *Biotechniques*, 2000, **28**(3), 510.
- ⁵⁶I. Bettoni *et al.*, *Glia*, 2008, **56**(12), 1312.
- ⁵⁷T. Schuerholz *et al.*, *Critical Care*, 2012, **16**(2), 207.
- ⁵⁸M.G. Vallespi *et al.*, *Clin. Diagn. Lab. Immun.*, 2000, **7**(4), 669.
- ⁵⁹C. Ried *et al.*, *Journal of Biological Chemistry*, 1996, **271**(45), 28120.
- ⁶⁰Y. Kaconis *et al.*, *Biophysical Journal* 2011, **100**(11), 2652.
- ⁶¹L. Heinbockel *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2013, **57**(3), 1480.
- ⁶²I. Zanoni *et al.*, *Cell*, 2011, **147**(4), 868.
- ⁶³I. Zanoni *et al.*, *Nature*, 2009, **460**(7252), 264.