

I neutroni al servizio della medicina

Per vincere le sfide della salute bisogna capire in profondità i processi vitali: la ricerca biomolecolare tramite neutroni ha proprio questo obiettivo.

Giovanna Fragneto,

Institut

Laue-Langevin,

Grenoble

Affrontare le sfide globali della salute con la progettazione di terapie sempre più efficienti impone una comprensione approfondita delle malattie e dei processi che regolano la vita, fino al livello molecolare. In effetti l'origine di molte malattie risale a errori nei processi biomolecolari: ad esempio, i virus invadono le cellule e si impossessano dei loro meccanismi molecolari finendo con l'uccidere le cellule stesse; i batteri invece possono rilasciare tossine che bloccano un'interazione molecolare vitale. Un obiettivo ambizioso di biologi e biofisici è dunque quello di osservare la struttura e il comportamento delle molecole all'interno dell'ambiente fisiologico al quale appartengono.

Se l'impiego dei raggi X per studiare i complessi processi biologici del nostro organismo è noto a molti studiosi, il ricorso ai neutroni nella ricerca medica è meno conosciuto: eppure, l'uso di neutroni è oggi molto utile per comporre l'enorme puzzle biologico della vita. Tramite molteplici tecni-

L'uso di neutroni è oggi molto utile per comporre l'enorme puzzle biologico della vita.

che, l'impiego dei neutroni nella ricerca aiuta a comprendere meglio le cause delle malattie e fornisce informazioni che hanno conseguenze dirette sull'innovazione farmaceutica, per mettere a punto nuove cure o perfezionare trattamenti già esistenti.

Le molecole della vita

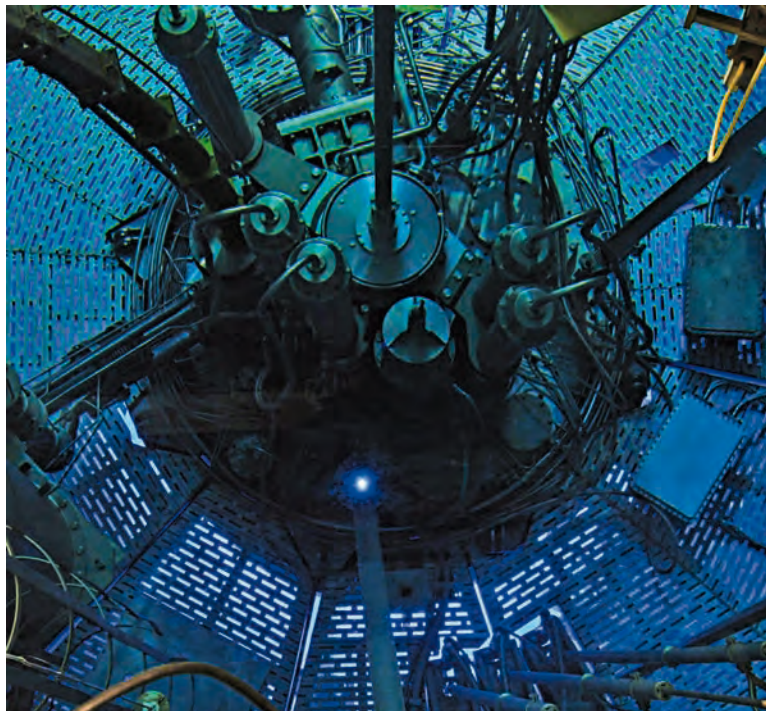
Il genoma umano specifica dalle 40 000 alle 100 000 diverse proteine. La struttura di ciascuna di esse è composta da una catena

di unità molecolari, gli amminoacidi, disposte in una caratteristica conformazione 3D che consente di effettuare un particolare compito. Molto spesso le proteine agiscono come componenti di strutture molecolari interattive complesse. Un esempio significativo di una struttura del genere è rappresentata dalla membrana cellulare: solo un'esplorazione dettagliata dell'organizzazione e del comportamento delle membrane permette di comprendere come i lipidi e le proteine interagiscano per consentire le complesse funzioni della membrana stessa.

Un altro importante campo di studi riguarda il modo in cui le proteine si organizzano in strutture tridimensionali (*foldings*). Lievi mutamenti nell'ambiente fisiologico possono scatenare errori in questa organizzazione e provocare così la formazione di strutture associate a malattie come l'Alzheimer o il Parkinson. Ecco dunque che la comprensione della struttura e della funzione delle proteine è essenziale per la progettazione dei farmaci e dei relativi metodi di rilascio.

I vantaggi dei neutroni

L'Institut Laue-Langevin (ILL), centro europeo per la ricerca sui neutroni, impiega un reattore nucleare che utilizza la fissione per produrre i fasci di neutroni più intensi del mondo. I neutroni, come le altre particelle descritte dalla fisica quantistica,



Il reattore dell'Institut Laue-Langevin.

possiedono una lunghezza d'onda caratteristica, direttamente correlata alla loro energia. La lunghezza d'onda di un neutrone è almeno 1000 volte inferiore a quella della luce visibile e per questo, come i raggi X, i neutroni possono essere utilizzati per osservare la materia su scale comprese tra i decimi di nanometro e i micrometri. I neutroni possono essere inoltre "sintonizzati" per penetrare in una struttura attraverso una tecnica chiamata *scattering*, che implica l'invio di fasci di neutroni verso un bersaglio (il campione che si vuole studiare), il quale ne provoca il cambio di traiettoria, ad esempio tramite diffrazione: il modo in cui i fasci di neutroni cambiano la loro traiettoria dà agli scienziati le informazioni necessarie per comprendere le caratteristiche del bersaglio.

Le varie declinazioni di questa tecnica oggi disponibili sono in grado di rivelare aspetti della struttura e del comportamento dinamico di macromolecole come le proteine non facilmente osservabili con altri metodi.

I fasci di neutroni risultano particolarmente adatti alla ricerca biologica poiché possono essere generati con energie e lunghezze d'onda appropriate per l'analisi di strutture biologiche che vanno dalle piccole molecole, come i cosiddetti peptidi, fino alle molecole più grandi e alle strutture molecolari come i virus. Non avendo carica

elettrica, i neutroni possono viaggiare in profondità all'interno della materia e, contrariamente ai raggi X, non sono distruttivi.

Sistemi avanzati per il rilascio dei farmaci

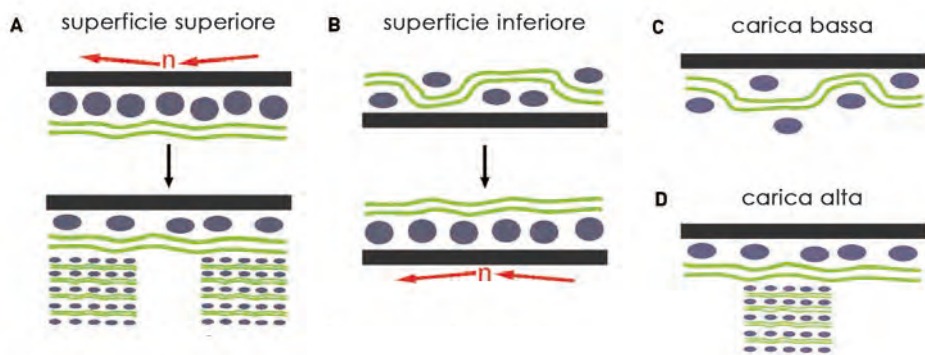
Un obiettivo chiave per chi progetta farmaci è capire come far arrivare in modo efficace gli agenti terapeutici presso la sede della malattia. I "trasportatori" ideali degli agenti terapeutici devono essere in grado di legarsi selettivamente alle cellule bersaglio e consentire in maniera controllata il passaggio di una concentrazione ottimale delle molecole del farmaco attraverso la membrana cellulare.

Un nuovo interessante approccio è quello di fissare dei "serbatoi" di farmaco alla membrana sotto forma di particelle a cristalli liquidi. Queste

particelle si formano spontaneamente da lipidi a lunga catena e molecole ramificate simili ad alberi, chiamate dendrimeri: sono le candidate ideali per trasportare attraverso le membrane cellulari grandi quantità di piccole molecole di farmaco affinché si diffondano all'interno della cellula. Sistemi di rilascio che si avvalgono di principi simili sono già attualmente in fase di test clinici. Tuttavia lo sviluppo di prodotti commerciali trarrebbe benefici da una maggiore comprensione delle interazioni tra membrane e dendrimeri.

In questo senso, recentemente sono stati condotti esperimenti tramite i neutroni per studiare le interazioni tra modelli di membrana cellulare ricostruiti su una superficie piana e una sospensione di particelle composte da lipidi-dendrimeri, progettate per costituire "serbatoi" di farmaco presso le membrane cellulari. I neutroni si sono rivelati un valido strumento di analisi, perché possiedono anche la capacità di essere riflessi dalle

I neutroni possono essere utilizzati per osservare la materia su scale comprese tra i decimi di nanometro e i micrometri.



Le interazioni fra membrane cellulari e molecole "serbatoi" di farmaco.

superfici ad angoli radenti (riflettometria), caratteristica molto utile per lo studio di strutture stratificate come le membrane cellulari. In questi esperimenti le superfici modello erano situate sia sopra che sotto la soluzione di particelle di lipidi-dendrimeri [1]. Attraverso i neutroni, gli scienziati hanno rilevato come i lipidi-dendrimeri interagivano in modo diverso con la superficie modello superiore rispetto a quella inferiore: le interazioni desiderate fra la superficie di membrana modello e le molecole "serbatoio" si verificavano solo con la superficie posta al di sopra della soluzione, dimostrando l'effetto sostanziale della forza di gravità. Di questo si dovrà tenere conto per lo sviluppo di farmaci più efficaci.

Farmaci antivirali più efficaci

La maggior parte dei farmaci funziona legandosi a uno specifico enzima coinvolto nella proliferazione della malattia, in modo da inibirne le funzioni. La moderna progettazione dei farmaci si concentra su come perfezionare le interazioni tra il farmaco e il suo target, e la cristallografia a raggi X è stata finora il metodo normalmente scelto per investigare questi dettagli strutturali. Tuttavia, visto che tali interazioni sono spesso mediate da legami a idrogeno, i raggi X rischiano di restituire risposte incomplete o fuorvianti, poiché non sono in grado di produrre immagini degli atomi di idrogeno. I neutroni, invece, possono identificare l'idrogeno presente in una struttura e fornire un potente strumento per analizzarne le interazioni con i farmaci. Una delle tecniche usate a questo scopo è la cristallografia di neutroni, oggi ottimizzata in centri come ILL per essere impiegata su cristalli sempre più piccoli (e quindi più facili da produrre).

Le potenzialità di questa tecnica sono state dimostrate in un recente studio sul legame tra

per creare le proteine necessarie alla produzione di nuove particelle virali infettive.

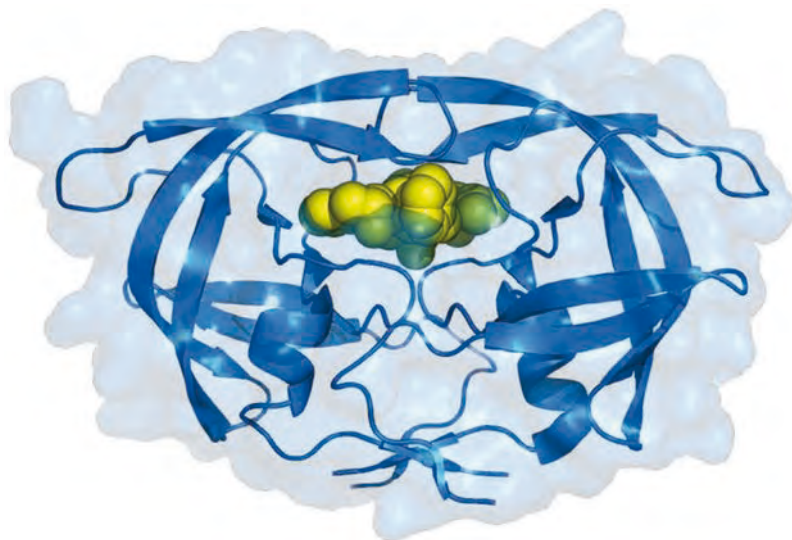
Usando la tecnica della cristallografia su un piccolo cristallo di HIV-1 proteasi legato all'amprenavir, i ricercatori hanno potuto individuare le posizioni degli atomi di idrogeno all'interno del complesso enzima-farmaco e identificare gli atomi che prendono parte al legame a idrogeno tra il farmaco e l'enzima, con risultati notevolmente superiori rispetto a quelli ottenuti negli studi precedenti con i raggi X. Le scoperte a cui si è giunti offrono agli scienziati farmaceutici nuove opportunità per rafforzare il legame a idrogeno fra l'enzima del virus HIV e il farmaco. Ciò è possibile attraverso sottili modifiche alla struttura molecolare di quest'ultimo, ad esempio con l'impiego di un atomo reattivo come il fluoro, aumentando l'efficacia e consentendo di ridurre il dosaggio necessario.

Sviluppare farmaci per infezioni resistenti agli antibiotici

L'amfotericina B (AmB) è un farmaco usato per curare le infezioni fungine potenzialmente letali in pazienti con sistema immunitario gravemente compromesso, come nel caso di chi si sottopone a chemioterapia o ha contratto l'AIDS. Di recente sono emersi organismi fungini patogeni resistenti

un farmaco per la cura dell'HIV, l'amprenavir, e il suo enzima target, la HIV-1 proteasi [2]. Questo è un enzima chiave nel ciclo di vita dell'HIV, il cui compito è spezzare le catene polipeptidiche del virus, cioè le catene di aminoacidi che lo compongono,

I neutroni possono identificare l'idrogeno presente in una struttura e fornire un potente strumento per analizzarne le interazioni con i farmaci.



L'amprenavir legato all'enzima HIV-1 proteasi.

ti all'AmB: questo ha portato a dover prescrivere dosi crescenti di amfotericina, che possono però provocare danni epatici. Esiste quindi l'urgente necessità di trovare nuovi farmaci che agiscano come l'AmB ma abbiano una struttura molecolare tale per cui i funghi non possano più evitarne gli effetti tossici.

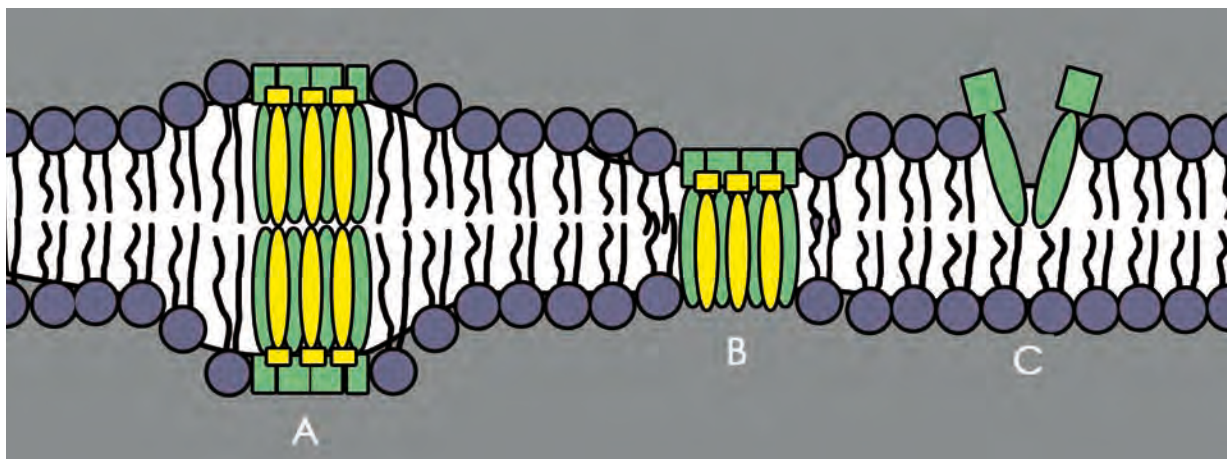
Anche se l'AmB è utilizzata clinicamente da oltre cinquant'anni, non se ne conosce ancora l'esatto funzionamento a livello molecolare. L'idea comunemente accettata è che la molecola alteri la struttura della membrana lipidica della cellula mediante formazione di pori. Si sa che le membrane delle cellule fungine sono leggermente diverse da quelle umane e che contengono ergosterolo anziché colesterolo. È stato determinato che l'AmB interagisce più efficacemente con l'ergosterolo rispetto al colesterolo, tuttavia resta poco

chiara la modalità con cui questo accade.

Si è quindi fatto ricorso alle tecniche di diffrazione e riflettometria di neutroni per capire la differenza tra le interazioni dell'AmB con le membrane contenenti colesterolo e quelle della stessa AmB con le membrane contenenti ergosterolo [3]. I risultati della diffrazione hanno mostrato che il farmaco si combina con entrambi gli steroli formando dei pori nella membrana lipidica, ma nel caso della membrana con ergosterolo, tipica delle cellule fungine, le molecole si estendono in modo diverso: ciò potrebbe aiutare a stabilizzare

canali continui attraverso la membrana. Inoltre, l'AmB provoca un'inclinazione diversa degli steroli rispetto alla membrana, con un effetto maggiore nel caso del colesterolo rispetto all'ergosterolo. La riflettometria in combinazione con l'utilizzo di estratti lipidici naturali ha mostrato l'estrazione di ergosterolo dalla membrana con formazione di uno strato di AmB ed ergosterolo sulla membrana che potrebbe essere la causa della morte delle cellule fungine.

Grazie a questi esperimenti, che hanno consentito di comprendere molto più in profondità il modo in cui l'AmB interagisce con le membrane delle cellule fungine e umane e dunque l'azione antifungina del farmaco, si stanno ora pianificando ulteriori studi, a partire dai quali si spera di poter mettere a punto nuovi farmaci antifungini privi degli effetti collaterali dell'AmB.



Interazione fra amfotericina e membrane.

Verso farmaci virati autoiniezzabili

Gli anticorpi monoclonali (mAb) costituiscono un importante strumento nella moderna farmacologia: queste grandi proteine sono la base di sempre più numerosi farmaci di successo per la cura dei tumori e di malattie autoimmuni come l'artrite e la sclerosi multipla. Gli mAb funzionano attaccandosi a specifiche proteine bersaglio (un antigene), per esempio a proteine di cellule cancerose.

Queste terapie comportano solitamente dosaggi elevati, che vengono somministrati per endovena in ospedale. Un metodo più pratico di somministrazione sottocutanea, come quello a cui ricorrono i diabetici, sarebbe certamente apprezzabile. I progressi in tal senso sono però stati ostacolati dal fatto che le soluzioni contenenti grandi quantità di proteine come gli mAb risultano notevolmente viscosi: ciò le rende difficili da somministrare e introduce considerevoli complicazioni per la loro produzione e purificazione su vasta scala. I ricercatori hanno quindi provato a capire la causa primaria di questo addensamento.

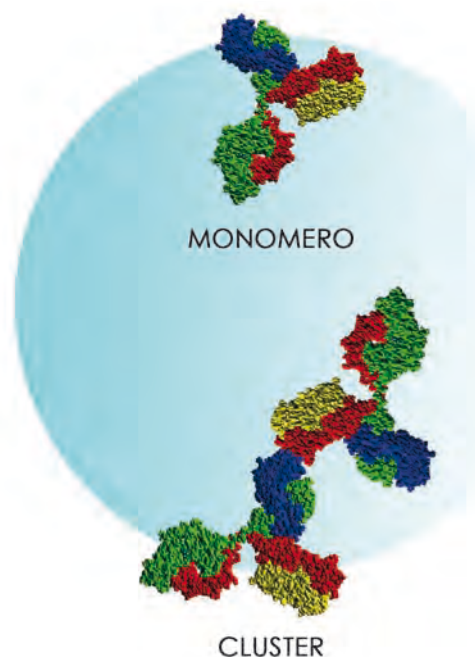
Il NIST Center of Neutron Research (NCNR) americano ha guidato una collaborazione tra i ricercatori della società di biotecnologie Genentech e quelli dell'Università del Delaware e dell'ILL per studiare due tipologie di anticorpo, di cui una nota per aumentare la viscosità della soluzione, grazie all'impiego di due diverse tecniche basate

sui neutroni [4]. È stato così possibile tracciare i movimenti individuali delle strutture di proteine che portano alla formazione di cluster di grandi molecole biologiche come gli mAb. I risultati dello studio hanno rivelato che le soluzioni di mAb ad alta viscosità sono dominate da piccoli cluster di mAb: una volta formati, questi cluster restano di dimensioni costanti attraverso un'ampia gamma di concentrazioni.

Questo studio costituisce la base per progettare un sistema ottimale per la somministrazione di biofarmaci iniettabili ad alta concentrazione. Fra l'altro, la questione del clustering di proteine è un'area estremamente interessante di per sé: molti fenomeni ben noti, come le cataratte oculari o il morbo di Alzheimer, sono infatti il risultato del clustering di proteine.

Il futuro

L'importanza che gli esperimenti basati su neutroni avranno in futuro per la comprensione dei processi biologici è destinata ad aumentare. La ricerca basata sui neutroni rivestirà un ruolo speciale non solo nella scoperta delle straordinarie sfumature dei processi viventi, ma anche nel contribuire alla ricerca di cure che consentano a tutti noi di vivere a lungo e in buona salute. L'Institut Laue-Langevin continuerà a sviluppare le tecniche e le strumentazioni occorrenti, fornendo supporto e conoscenza ai ricercatori specializzati nelle scienze della vita.



Le proteine degli anticorpi monoclonali formano cluster in soluzione, rendendola difficile da iniettare.

Riferimenti bibliografici

- [1] R.A. CAMPBELL *et al.*, "Key Factors Regulating the Mass Delivery of Macromolecules to Model Cell Membranes: Gravity and Electrostatics", *ACS Macro Letters*, 3, 2, 2014, pp. 121-125.
- [2] I.T. WEBER *et al.*, "Joint X-ray/Neutron Crystallographic Study of HIV-1 Protease with Clinical Inhibitor Amprenavir: Insights for Drug Design", *Journal of Medicinal Chemistry*, 56, 13, 2013, pp. 5631-5635.
- [3] F. FOGLIA *et al.*, "Neutron Diffraction Studies of the Interaction between Amphotericin B and Lipid-sterol Model Membranes", *Scientific Reports*, 2, 2012, p. 778. Si veda anche A. DE GHELLINCK *et al.*, "Lipid Polyunsaturation determines the Extent of Membrane Structural Changes induced by Amphotericin B in *Pichia Pastoris* Yeast", *BBA Biomembranes*, 1848, 10, 2015, pp. 1955-2325.
- [4] P.D. GODFRIN *et al.*, "Effect of Hierarchical Cluster Formation on the Viscosity of Concentrated Monoclonal Antibody Formulations Studied by Neutron Scattering", *The Journal of Physical Chemistry B*, 120, 2, 2016, pp. 278-291.