

Quillaja saponini kao adjuvanti

Jambreušić, Lorena

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:700142>

Rights / Prava: [Attribution 4.0 International](#) / [Imenovanje 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-13**

Repository / Repozitorij:

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Preddiplomski sveučilišni studij
„Biotehnologija i istraživanje lijekova“

Lorena Jambreušić
Quillaja saponini kao ajuvanti
Završni rad

Rijeka, 2023.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Preddiplomski sveučilišni studij
„Biotehnologija i istraživanje lijekova“

Lorena Jambreušić
Quillaja saponini kao adjuvanti
Završni rad

Rijeka, 2023.

Mentor rada: Doc. dr. sc. Stribor Marković

Završni rad obranjen je dana _____

Pred povjerenstvom:

1. _____

2. _____

3. _____

Rad ima _____ stranica, _____ slika, _____ tablica i _____ literaturnih
navoda.

Sažetak

Saponini su biološki aktivne tvari izolirane iz *Quillaja saponaria* Molina i *Quillaja brasiliensis* i sposobni su povećati imunogeničnost antigena u antigen-adjuvant kombinaciji. Adjuvantske sposobnosti saponina prvi puta je primijetio francuski veterinar Gaston Ramon, 1925. godine kada je induciran humoralni odgovor protiv difterije i tetanusa. Daljnji istraživački naponi doveli su do otkrivanja palete kemijskih struktura saponina. QS-21 izoliran iz Quil-A, primarnog ekstrakta kore *Q. saponaria*, odabran je za kliničku uporabu na temelju fizikalno-kemijskih svojstava i pripadajućih terapijskih učinaka. Iako farmakofor saponina nije definiran, postuliranim teorijama predlaže se mehanizam djelovanja. Receptor-posredovani mehanizam nalaže saponin-CD2 receptorsku interakciju na T limfocitima dok receptor-neovisna kolesterol-posredujuća internalizacija i dalje nije odbačena. U svakom slučaju, QS-21 povećava broj antigen-preuzetih antigen prezentirajućih stanica (APC) i potenciranom unakrsnom prezentacijom uzrokuje robusniji Th1/Th2 miješani imunološki odgovor. Osim adjuvantskih, saponini pos

odabrana kombinacija. Tako je za bolesti čiji uzročnici unutarstanično parazitiraju, potreban miješani Th1/Th2 odgovor uz Th1 i CTL citotoksično predvođenje. U prilog tome, dokazano je da robusniji imunološki odgovor pokreću adjuvantske kombinacije (AS) u usporedbi sa samostalnim adjuvantom. AS01 i AS15 liposom-bazirane te AS02 emulzija-bazirana formulacija su najintenzivnije predklinički ispitane. Jedini je kliničku upotrebu ostvario AS01 s optimalnim rizik/korist omjerom u cjepivima protiv malarije i herpes zoster.

Ključne riječi: saponini, adjuvant, QS-21, Th1/Th2 odgovor, adjuvantne kombinacije

Summary:

Saponins are biologically active molecules isolated from *Quillaja saponaria* Molina and *Quillaja brasiliensis* and are capable of increasing the immunogenicity of antigens in an antigen-adjuvant combination. Saponin adjuvant capabilities were first presented in the 1925 by French veterinarian Gaston Ramon when humoral response was induced while working on diphtheria and tetanus vaccines. Further investigations succeeded in reviling the whole palette of chemically different saponins. QS-21 isolated from Quil-A, the primary bark extract of *Q.saponaria*, is chosen for clinical use based on its physical and chemical uniqueness and belonging therapeutic effects. Despite saponin farmakofor being unknown, there are a few postulated theories that suggest mechanisms of action. Receptor-dependent mechanism proposes saponin interaction with CD2 receptors present on T lymphocytes while receptor-independent, cholesterol-associated internalization still hasn't been rejected. Either way, QS-21 increases the number of antigen-loaded antigen presenting cells (APCs), makes cross-presentation more robust while inducing a mixed Th1/Th2 immune response. Saponins are vaccinologically usable for their antibacterial, antiviral and antitumor properties as well. In attempts for farmakofor reveal, sugar moieties are considered biologically relevant in processes such as receptor stimulation and molecular mimicry of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), C-23 positioned aldehyde group crucial for receptor-associated mechanism and hydrofobic aglicone essential for cholesterol-associated internalization. Structure and activity studies (SAR) are aligned in the opinion that chemical completeness, not the presence or absence of certain functional group, is farmakofor creditable. Also, the synthesis of alternative analogs is needed for the improvement of the toxicity/activity ratio of QS-21, currently the only saponin adjuvant in approved vaccines. With saponin incorporation in immunostimulatory complexes (ISCOM) increasment in stability and decreasment in hemolytic activity is reached. In efficient vaccine design,

antigen-adjuvant combination is decisive. Thus, in battle with diseases whose pathogen is intracellular, dominant Th1/Th2 and CTL cytotoxic immune response is necessary. It is proved that more robust immune response have adjuvant combinations in comparison with adjuvants alone. AS01 and AS15 liposome-based and AS02 emulsion-based formulations are the most intensely studied among all. AS01 is the only one that found its usage in clinical practice because of a suitable risk/benefit ratio for dealing with diseases such as malaria and herpes zoster.

Key words: saponins, adjuvant, QS-21, Th1/Th2 mixed immune response, adjuvant combination

Sadržaj:

1. Uvod	1
2. Ekstrakcijske tehnike saponina	6
2.1. Konvencionalne metode.....	6
2.2. Nekonvencionalne metode	7
3. Kemijska struktura	9
4. Fizikalna svojstva	11
5. Mehanizam djelovanja	13
5.1. Adjuvantska aktivnost	13
5.2. Mehanizam antitumorskog i antibakterijskog djelovanja	15
6. Alternativni QS-21 analozi.....	17
6.1. Saponinski farmakofor.....	17
6.2. Poboljšavanje terapijskog učinka	18
7. Saponinska upotreba u formulacijama	20
7.1. Liposom-bazirane adjuvantske kombinacije.....	21
7.1.1. Predklinička i klinička upotreba AS01	22
7.1.1.1. AS01 sadržano RTS,S antimalarijsko cjepivo Mosquirix™.....	22
7.1.1.2. AS01 sadržano cjepivo protiv herpes zoster - Shringix™	23
7.1.2. Tumorska indikacija AS15 i predklinička upotreba.....	24
7.2. Emulzija-bazirane adjuvantske kombinacije	25
7.2.1. Predklinička primjena AS02	26
8. Literatura	28
9. Životopis.....	32

1. Uvod

Cjepiva su jedna od najefikasnijih preventivnih metoda od zaraznih bolesti. S obzirom na aktivnost patogena, cjepiva se dijele na živa atenuirana, mrtva ili oslabjela i podjedinična cjepiva. Dok živa atenuirana i oslabjela cjepiva sadrže patogensku cjelovitost koja osigurava robustan imunološki odgovor, podjedinična cjepiva iako najsigurnija, slabo su imunogenična. Zbog toga što rekombinantno dobiveni proteinski antigeni (podjedinice) aktiviraju uzak raspon imunoloških puteva, za dugotrajniju zaštitu podjediničnim cjepivima neophodno je kombiniranje s adjuvantima ili adjuvantskim kombinacijama. Adjuvanti (*lat. adjuvare* - pomoći) su tvari (čestične ili molekulske prirode) koje svojim prisutstvom u cjepivu povećavaju imunogeničnost antigena. Zasluge adjuvantskom postojanju prepisuju se francuskom veterinaru Gastonu Ramonu koji je 1930-ih utemeljio koncept koji danas prati definicija adjuvanata i prvi klasificirao aluminijske soli kao adjuvantski aktivne agense, a koji pronalaze svoju kliničku upotrebu i u cjepivima današnjice¹. Adjuvantom patentirano cjepivo zahtijeva manje doze antigena i smanjeni broj imunizacija čime se postiže isplativija i jednostavnija učinkovitost. Klasifikacija adjuvanata svrstava saponine u nečestične surfaktantske adjuvante.

Saponini su glikozilirane triterpenske strukture s aglikonskom osnovom i gorkog su okusa. Već sami nazivi spoja „saponin“ (*lat. pjeniti se*) i biljke kao izvora „quillan“ (*šp. prati*), opisuju prvu upotrebu saponina u higijenske svrhe. Iako postoji 50 biljnih i 4 životinjskih vrsta koje sadrže saponine, trenutni komercijalno najdostupniji izvor je iz biljnog roda *Quillaja*.² Saponini se u najvećim koncentracijama nalaze u kori *Quillaja saponaria* Molina (~18%) te u kori i lišću *Quillaja brasiliensis* u periodu travnja (0.085 %).³ Prirodna staništa ovih endemičnih vrsta koja su ujedno i najveća eksploatacijska područja su Bolivija, Brazil, Čile i Argentina. Prema podatku iz Brazilskog nacionalnog centra za očuvanje flore iz 2012.g. ova zimzelena vrsta bila je ugrožena, no nakon plantažiranja njihov je broj uvećan u komercijalne svrhe i od 2018. g. se

za njihovo izumiranje ne strahuje sudeći prema Internacionalnom udruženju za očuvanje prirode. Zbog široke industrijske primjene saponina kao sirovine, biomasa koja zadovoljava svjetske godišnje potrebe procjenjuje se na raspon od 40 000 do 48 000 tona.³ Relativno niska saponinska zastupljenost u biljnim organima i činjenica da je isplativost tek na habitusu starijem od 25 godina, dovode do scenarija da je za dvije tone biomase potrebno 230 000 hektara prostorne i 15 godina vremenske angažiranosti.³ Za maksimalizaciju iskorištavanja, saponin-sadržano lišće ovih biljaka razmatrano je kao dodatni izvor, ali ideja nije provedena zbog koncepata industrijskih protokola. Također, prije plantažiranja provedena je selekcija jedinki s najboljim genetskim profilom i njegove manifestacije na rast i saponinski prinos.

Iako je usmjerenost ovog rada sažeti farmakološku korisnost saponina, njihova upotreba seže sve do prehrambene i kozmetičke industrije. Specifična kemijsko-fizikalna svojstva karakteriziraju saponine kao dobre adjuvante, emulgatore, surfaktante i površinski aktivne tvari. Nadalje, razna istraživanja utvrdila su antibakterijska, antivirusna, antifungalna, antitumorska, insekticidna i hemolitička svojstva. Unatoč svim napredcima vakcinologije, licencirani adjuvant koji samostalno može biti siguran, stabilan i učinkovit, netoksičan te bez nuspojava, biorazgradiv i neimunogeničan, ne postoji. Zato se, u kliničkim istraživanjima prijavljuju, a u kliničkoj praksi koriste adjuvantske kombinacije koje se sinergističkim djelovanjem približavaju osobinama idealnog adjuvanta. Uz navedene, za dugotrajnu zaštitu od patogena ključna adjuvantska sposobnost je stimulacija humoralnog i staničnog odgovora. Kako bi naglasili važnost adjuvantske aktivnosti potrebno je objasniti osnove funkcioniranja imunološkog sustava prilikom invazije patogena.

Stanice urođene imunosti, koje su koncentrirane na potencijalnim mjestima ulaska parazita (dišni, probavni, urogenitalni trakt), posjeduju patogen prepoznavajuće receptore (PRR) uključujući Toll-like (TLR) i Nod-like receptore (NLR) koji su specijalizirani za prepoznavanje evolucijski konzerviranih patogenskih PAMP struktura. Nakon PAMP-PRR interakcije,

diferencirane APC prerađuju internalizirani sadržaj kojeg izlažu na molekulama tkivne histokompatibilnosti tip I i II (MHC-I/II). U sekundarnim limfnim tkivima je za potpunu diferencijaciju stanica stečene imunosti, T i B limfocita, potrebna MHC-I/MHC-II -TCR- CD4/CD8 receptorska interakcija uz kompatibilno kostimulacijsko prepoznavanje. Nakon MHC-II/TCR/CD4 interakcije, CD4 limfociti T se ovisno o citokinskom okruženju diferenciraju u Th1, Th2 ili Th17 (T-helper) pomagalačke stanice. Th1 usmjereni odgovor događa se u uvjetima prisutnosti proupalnih interleukina IL-12 i interferona INF- γ i specijaliziran je za obranu od unutarstaničnih parazita. Izlučivanjem IFN- γ , Th1 stanice stimuliraju reaktivnost fagocitirajućih stanica urođene imunosti te B limfocite za proizvodnju IgG, najboljih patogen-oblagajućih i komplement-vezujućih protutijela. Za protutijelno opredjeljenje diferenciranih B limfocita nužne su Th2 pomagalačke stanice koje citokinskim okruženjem određuju vrstu protutijela i bivaju ključne u borbi protiv vanstaničnih patogena. CD8 diferencirani, citotoksični limfociti T (CTL) sposobni su direktno inducirati apoptozu stanica zaraženih unutarstaničnim parazitom nakon MHC-I-TCR-CD8 interakcije.

Ovisno o fizikalno-kemijskim svojstvima, adjuvanti mogu modulirati upalni odgovor različitim mehanizmima. Adjuvantska aktivnost molekularno se može ostvariti molekularnom mimikrijom PAMP-ova, indukcijom ekspresije citokina, regrutacijom stanica urođene imunosti na mjestu administracije, uspješnijom internalizacijom i preradom antigena na MHC-I/II te sporijim otpuštanjem antigena uz kontinuirani terapijski učinak.⁴ Usprkos stalnom razvoju vakcinologije, za neke bolesti kao što su malarija, HIV i AIDS nema licenciranih cjepiva ili ona licencirana predstavljaju kratkotrajnu zaštitu. Nove formulacije cjepiva, u kojima bi od ključne važnosti mogle biti upravo adjuvantske kombinacije, intenzivno se istražuju. Početkom prošlog stoljeća izolirana je heterogena smjesa Quil-A u kojoj je upravo saponinska forma QS-21 ukazivala na najpotentniju adjuvatsku aktivnost. Kada su Higuchi i kolege 1986. publicirali strukturu dva deacetilirana saponina, uslijedile su SAR studije

te studije za otkrivanje fizikalno-kemijskih svojstava. Početak njihove farmakološke primjene bio je odgođen zbog i danas u detalje nepoznatog mehanizma djelovanja i citotoksičnosti ovisne o dozi. U pokušajima razotkrivanja saponinskog farmakofora, rezultati studija odaju kontradiktorne i neistoznačne obrasce saponinskog ponašanja nazvanog „saponinski paradoks“. Ipak, dovoljno su relevantni da doprinose sintezi alternativnih saponina kao preteče poboljšanih adjuvantskih kombinacija.

Svrha ovog preglednog rada je dati uvid u farmakološku upotrebu *Quillaja* saponina kao adjuvantnih agenasa, s fokusom na QS-21 saponin kao vodećeg u adjuvant priželjkivanom Th1/Th2 imunološkom odgovoru. Kroz sadržaj biti će opisan put kojim su se saponini iz primitivne higijenske primjene približili, ako ne i nadmašili usporedive adjuvante prve i druge generacije i tako postali intenzivno istraživani. Zainteresiranost znanstvenih krugova za vakcinološkom primjenom saponina je velika, sudeći prema 243 publicirana rada od početka 2000. godine do danas (Pubmed pretraživanje). Nadalje, potrebno je kritički se osvrnuti na komercijalne nedostatke i predložiti način njihovog razrješavanja u svrhu minimalizacije prirodnih devastacija, barem do otkrivanja sintetskih, biorazgradivih analoga. Na temelju kemijske strukture i pripadajućeg kemijsko-fizikalnog profila u radu će se nastojati objasniti njihov angažman u mehanizmu djelovanja. Postulirani, ali do danas eksperimentalno nepotpuno potkrijepljenim mehanizmima djelovanja također će se nastojati dati pregledan uvid u interakcije QS-21 adjuvanta s komponentama imunološkog sustava. Velika raznolikost biološke manifestacije saponina, uključujući antibakterijsku i antitumorsku, koja su također adjuvantno iskoristiva, su u ovom radu samo površno opisane. Nadalje, usporedba sintetskih saponina i njihovih prirodnih preteča biti će razrađena od strukturalnih do molekularnih manifestacija u svrhu izbora onog s najbenefitnijim omjerom koristi i rizika. Odabrani, inkorporiraju se u ISCOM komplekse pa će biti izložena *in vitro* i *in vivo* predklinička te klinička istraživanja i njihovi zaključci. Do danas samo je QS-21 uspio proći III. fazu kliničkih ispitivanja pa će biti iznijet njegov značaj u sklopu

formulacija. Adjuvantske kombinacije mogle bi biti ključ u iskorjenjivanju bolesti kompleksnih priroda pa je zbog toga njihovo daljnje progresivno istraživanje nužnost. Iz prikupljene literature, probrani su sintetički saponini kao potencijalni adjuvanti treće generacije uz naglasak da je biljni svijet i dalje vrlo važan izvor biološki aktivnih tvari. Ovaj literaturni pregled nastoji kroz metodološku, molekularnu i kliničku perspektivu objediniti upletenost *Quillaja* saponina u vakcinologiji.

2. Ekstrakcijske tehnike saponina

Za maksimalno iskorištenje i minimalizaciju devastacija *Quillaja* šuma, iskorištava se činjenica da je akumulacija saponina najveća u periodu travnja.³ Saponini predstavljaju molekularne markere naprezanja obrambenog sustava biljaka i njihova je koncentracija veća uslijed oksidativnog stresa, mehaničkog oštećenja itd. Stimulacijom obrambenog sustava biljaka u laboratorijskim uvjetima moguće je doprinijeti „saponinskom urodu“. Prikupljeni uzorci *Quillaja* kore se peru, suše i usitnjavaju, a konačni proizvod je fini prah.

2.1. Konvencionalne metode

Iako nepodobne za komercijalnu upotrebu konvencionalne metode ekstrakcije saponina najkorištenije su u laboratorijskoj praksi (Slika 1). Upotreba 50-98% otopine alkohola ili vode kao ekstrakcijskih otapala zajedničko im je svojstvo.⁵ Iako je jednostavnost postupka i nekompleksnost aparatura konvencionalnih metoda privlačna, veliko ekstrakcijsko vrijeme i velika potrošnja otapala uz mali saponinski prinos neki su od razloga njihove industrijske neupotrebljivosti.

Zbog jednostavne amfifilne prirode, najkorištenija ekstrakcijska otapala u maceracijskom postupku su voda, alkohol (etanol ili metanol) ili njihova kombinacija. Uzastopno ponovljena ekstrakcija osigurava manje heterogeni supernatant prikupljen nakon filtracije. Tretman suhog supernatanta s eterom se provodi zbog delipidizacije, a za uklanjanje neželjenih proteina koristi se kloroform.⁶ Za ubrzavanje precipitacije poželjno je koristiti metanol. Precipitiranjem i sušenjem materijala nastaju svijetlosmeđi kristali saponina. Za maksimalnu iskoristivost koriste se uvjeti koji zbog svoje nespecifičnosti ne eliminiraju nečistoće pa se za postizanje homogenosti poseže za dodatnim purifikacijskim metodama. Također, molekule slične polarnosti onoj saponinskoj, mogu proći neopaženo nakon separacijskih tehnika kao što je tankoslojna

kromatografija. Najčešći purifikacijski korak je inkapsulacija saponina između faza vode i organskog otapala. Iako s većom topljivosti u vodi, amfifilna priroda saponina im omogućuje topljivost u oba otapala što se iskorištava zamjenom emulzija; iz voda u ulju (W/O) s ulje u vodi (O/W) emulzijom pod pretpostavkom da su nečistoće topive u vodi.⁷

2.2. Nekonvencionalne metode

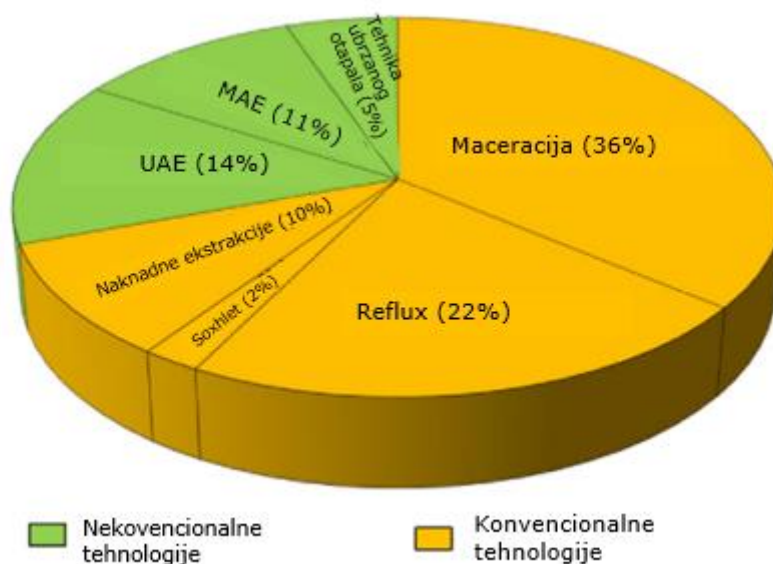
Uvećani zahtjevi globalnog tržišta ubrzali su prilagođavanje ekstrakcijskih i izolacijskih tehnika na one koje mogu pratiti izazove proizvodnje velikih razmjera. Bolji omjer prinosa i ekstrakcijskog vremena čine ih ekonomski, a korištenje malih količina otapala, ekološki pogodnima. Suprotno, skupe i kompleksne aparature naizgled unazaduju njihovu primjenu koja je, dugoročno gledano, ipak isplativa. Nekonvencionalne, ekološki neinvazivne, „zelene“ metode su mikrovalno potpomognuta ekstrakcija (MAE), ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija (UAE) i ekstrakcija superkritičnim fluidom.

MAE je ekstrakcijska tehnika koja djeluje na principu mikrovalnog zagrijavanja otapala u kojem se otapaju saponini. Odabir otapala i ekstrakcijsko vrijeme dva su najvažnija MAE parametra. U usporedbi sa konvencionalnim metodama kod kojih je ekstrakcijsko vrijeme na skali dana (reflux) pa čak i tjedana (maceracija), MAE iziskuje svega 10 do 20-minutno izlaganje saponinske otopine valovima mikrovalnog spektra u rasponu od 0.3–300 GHz.⁵ Degradacija analita prilikom povišenja temperature može predstavljati problem u ekstrakciji termički nestabilnih saponina.

Ultrazvučno posredovana ekstrakcija rješava problem degradacije termosenzibilnih analita. UAE je termički neinvazivna ekstrakcijska tehnika koja uz vodena ili alkoholna otapala koristi ultrazvuk za izvlačenje saponina iz biljnog materijala.⁸ Ekstrakcijski efekt temelji se na ultrazvučno potpomognutoj degradaciji stanične membrane koji omogućuje eksteralizaciju saponina kao unutarstaničnih metabolita.

UAE čest je izbor u ekstrakciji bioaktivnih komponenti iz biljnih izvora upravo zbog očuvanja njihove funkcionalnosti uz podešavanje frekvencije, snage i vrste otapala specifično prema prirodi bioaktivnog analita.

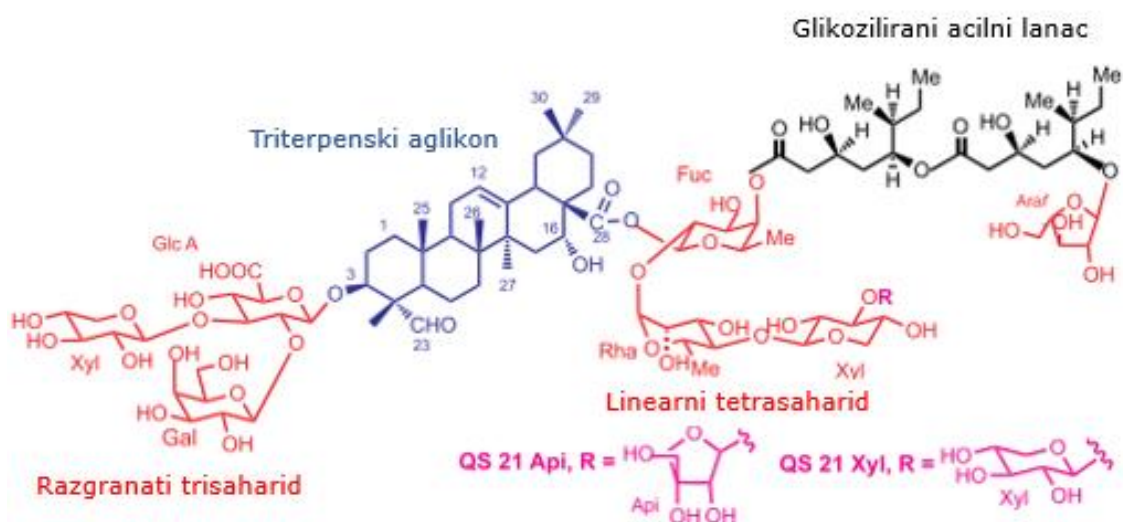
Ekstrakcijska tehnika osmišljena 1800.g čiji je puni potencijal prepoznat tek nedavno je ekstrakcija superkritičnim fluidom. Superkritični fluid je fluid koji doveden na temperaturu veću od njegove kritične temperature ne može biti ukapljen i koji tada može prodirati u svaku poru materijala što je karakteristika plina i pritom ga otapati što je karakteristika tekućine. Najkorišteniji fluid koji zbog svoje ne toksičnosti, lake dostupnosti, kemijske inercije, niske kritične temperature i odvojivosti od otapala je ugljični dioksid (CO_2).⁹ Fino podešavanje temperature i tlaka daje mogućnost odvajanja više komponenti jednim postupkom, dok je mala energetska potrošnja i smanjenje organskih otapala svrstavaju u jedne od „najzelenijih tehnika“. S obzirom da su saponini male polarne molekule, za njihovu ekstrakciju se uz CO_2 dodatno koriste alkoholi ili voda kao otapala.



Slika 1. Ekstrakcijske tehnike saponina iz biljnih materijala.

3. Kemijska struktura

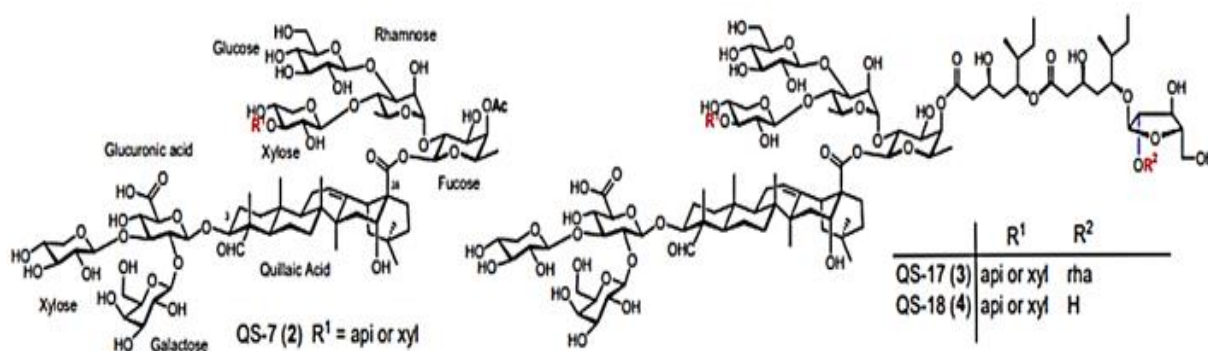
Saponini su aglikonske strukture na koje su glikozidnom vezom pričvršćeni šećerni motivi. Najpojavljiviji šećeri u saponinskoj strukturi su glukoza (Glc), galaktoza (Gal), fukoza (Fuc), arabinoza (Ara), ramnoza (Rha), apioza (Api) i ksiloza (Xyl) (Slika 2). S obzirom da su saponini sekundarni metaboliti biljaka, možemo ih razlikovati prema biosintetskom putu na steroidne i triterpenske. Triterpenski QS-21 ekstrakt zapravo je heterogena mješavina dvaju izomera: QS-21 apioza (QS-21_{Api}) i QS-21 ksiloza (QS-21_{Xyl}). Razlikuju se po istoimenim šećerima na nereducirajućem kraju linearnog tetrasaharida i u količinskom su omjeru 65% i 35%.¹⁰ Glavne kemijske značajke triterpenskog saponina su aglikonska kiselina kao triterpenska osnovica sa razgraničenjima na C-3 i C-28 pozicijama. Dvostruka razgranatost klasificira QS-21 u didezmičke saponine. Eterskom vezom na C-3 poziciji aglikona je vezan razgranati trisaharid dok je esterskom vezom na C-28 vezan linearni tetrasaharid. Dodatno, na C-4 poziciji šećera fukoze kao sastavnice linearnog tetrasaharida, esterskom vezom pričvršćen je acilni lanac hidrofnog karaktera (Slika 2).



Slika 2. Kemijska struktura QS-21 saponina.

Ključne funkcionalne grupe QS-21 su trisaharid na C-3, hidroksilna grupa na C-16 poziciji aglikonskog kostura, aldehidna grupa na poziciji C-23 i tetrasaharidom i acilnim lancem ukrašeni fukozni ostatak. Mijenjajući vrstu i veličinu šećernih podjedinica, utječe se na smanjenje adjuvantske aktivnosti ¹¹, najvjerojatnije zbog narušavanja molekularnog prepoznavanja kao glavnu ulogu glikoziliranih molekula.

Quil-A, primarni ekstrakt kore *Quilaja saponaria*, je heterogena smjesa QS-7, QS-17, QS-18 i QS-21 saponina. QS-7 strukturalno se razlikuje od svojih srodnih analoga po nedostatku glikoziliranog acilnog lanca na fukozi. U usporedbi sa QS-21, QS-7 zadržava adjuvantsku aktivnost sa smanjenim toksičnim efektom. QS-17/QS-18 saponini posjeduju dodatni šećerni motiv na linearnom tetrasaharidu što ih razlikuje od QS-21, a međusobno se razlikuju po monosaharidnom i disaharidnom terminalnom motivu acilnog lanca (Slika 3). Iako svi QS-21 analozi zadržavaju sličnu adjuvantsku aktivnost, veća toksičnost objavljena je za QS-17/18 saponine.¹² Također, ne postoje publikacije o mogućim indikacijama sinergističkog adjuvatskog djelovanja u heterogenoj cjepnoj smjesi QS-17/18 i QS-21. Postulirano je da je razlog veće citotoksičnosti dodatni šećerni motiv na QS-18, ali mnoge SAR studije sve više upućuju da je cjelovitost molekule ključ farmakokinetičkog profila, a ne postojanje ili odsutnost određene kemijske skupine.



Slika 3. Kemijska struktura QS-7 (lijevo) i QS-17/18 (desno).

4. Fizikalna svojstva

Amfifilna priroda saponina proizlazi iz hidrofobnosti triterpenskog aglikona i hidrofilnosti šećernih ogranka. Amfifilnost molekula je fizikalna osnova površinski aktivnih agenasa i deterdžentskih ponašanja zbog tendencije formiranja micela. Iako je dokazano da saponinska micelarna formacija nije presuđujuća za adjuvantsko ponašanje, novija istraživanja otkrila su da je ona ključan stabilizirajući faktor.¹⁰ Prostorno izložena esterska veza između fukoze i acilnog lanca u velikoj je mjeri osjetljiva na hidrolizu što dovodi do zaključka da kompaktnije slaganje QS-21 u micale doprinosi adjuvantskoj stabilnosti.

U pozadini surfaktantske prirode saponina ponovo stoji amfifilnost. Površinski aktivni agensi ili surfaktanti su tvari koje smanjuju napetost prijelazne faze dviju nemješivih tekućina. Surfaktantska tendencija saponina za maksimalno homogeniziranim sustavom se temelji na smanjenju njegove ukupne energije što se ostvaruje afinitetnim hidrofonim/hidrofilnim umetanjem između netopivih tekućina. Iako se opisano svojstvo najviše iskorištava u kozmetičkoj industriji, saponini kao brzo adsorbirajući surfaktanti u kombinaciji sa sporo adsorbirajućim proteinima ostvaruju antigen-surfaktantski sustav i požuruju interakciju antigena s komponentama imunološkog sustava.²

Surfaktantsko svojstvo saponine klasificira u emulgatore – tvari koje stabiliziraju emulzije, sustave s kontinuiranom i disperznom fazom. Emulgatori smanjuju Gibbsovu energiju miješanja faznih sustava i rezultiraju formulacijom sferičnih kapljica disperzne faze u kontinuiranoj, što će se iskorištavati u adjuvantskim kombinacijama baziranim na emulziji (Slika 5). Saponini kao stabilizatori pjena i emulgatori pronalaze upotrebu u herbicidima, deterdžentima i sapunima. Kritična micelarna koncentracija (CMC) je minimalna koncentracija tvari deterdžentnih svojstava za formiranje micela, a ona je za saponine u rasponu od 0.1 do 0.8 g/L što je puno više od nekih jačih emulgatora.¹³ Posljedično, veće količine saponina su potrebne za stabilizaciju emulzije. Za trovanja

deterdžentima i sredstvima za čišćenje najčešće nisu odgovorni saponini, ali njihova smrtonosna doza je 200 mg/kg. Zbog obilježja saponina kao sluznica-nadražujućih agenasa, oni se farmakološki iskorištavaju u sredstvima za kihanje i za izazivanje povraćanja (emetici).

5. Mehanizam djelovanja

Općenito, svrha adjuvanata je antigen pojačavajućom imunogeničnosti inducirati urođenu imunost koja će aktivacijom specifične imunosti rezultirati dugoročnom zaštitom. Rani događaji u mehanizmu adjuvantskog, imunostimulativnog djelovanja su: depo-efektom produljena interakcija antigena i komponentata imunološkog sustava, imunomodulativno djelovanje otpuštanjem posrednika upale (citokina i kemokina) i lokalna regrutacija stanica imunološkog sustava na mjestu administracije. Time se postiže povećani unos antigena, ekspresija MHC-I/MHC-II i odgovarajuće kostimulacije koji će dovesti do diferencijacije APC. Limfoproliferativno svojstvo adjuvanata temelji se na simultanoj indirektnoj (preko APC) i direktnoj aktivaciji antigen-specifičnog limfocita i njegovom masovnom dijeljenju u sekundarnim limfnim tkivima nakon kojeg će biti efektorske u zaštiti od antigena.

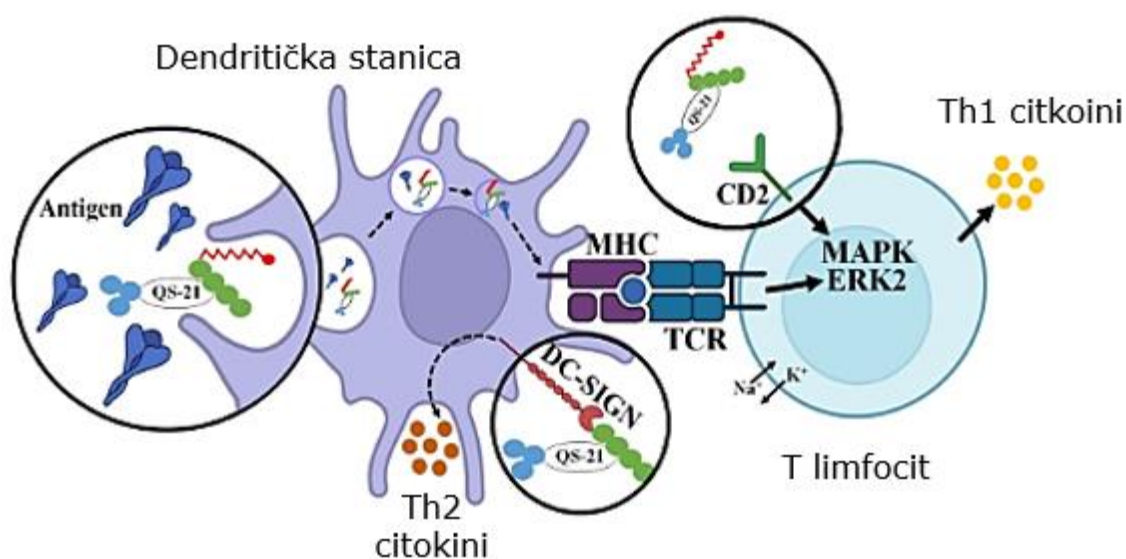
5.1. Adjuvantska aktivnost

Mehanizam djelovanja QS-21 nije u potpunosti poznat, ali postoji dovoljno istraživanja da možemo izvesti ključne zaključke. Na temelju vremena potrebnog za regrutaciju imunoloških stanica miša nakon administracije QS-21/kolesterol/fosfolipidi kombiniranog, antigen-izostavljenog cjepiva poznato je da QS-21 ne podliježe mehanizmu depo-efekta.¹⁴ Nadalje, amfifilno svojstvo saponina moglo bi biti ključno u mehanizmu djelovanja jer objašnjuje kolesterol favoriziranu interakciju. Kolesterol posredovana endocitoza dokazana je pomoću fluorescentnih derivata BODIPY-QS-21 koji su odašiljali signal i nakon tretmana tripsinom kojim je uništen integritet membrane i odbačena mogućnost saponinskog pasivnog transporta u stanicu.¹⁵ Nakon kolesterol ovisne endocitoze, QS-21-antigen kompleks internaliziran u lizosomu destabilizira lizosomski fosfolipidni dvosloj formacijom pora (Slika 4). Citosolna progresija egzogenog antigena ubrzava vlastitu prezentaciju na MHC molekulama.

Diferencijacija CD8 citotoksične loze T limfocita, ključne u borbi protiv unutarstaničnih parazita i tumorskih stanica, može biti direktno inducirana MHC-I prepoznavanjem ili Th1 i Th2 potpomognuta. Činjenica da saponinski-potpomognuta unakrsna prezentacija egzogenih antigena na MHC-I molekulama i direktna CD8 aktivacija nije u detalje razjašnjena, o indirektnoj Th1/Th2 indukciji CD8 također se diskutira.

S druge strane, uništenje integriteta lizosoma vodi ka otpuštanju njegovog sadržaja, uključujući lizosomalne enzime. Nizvodni događaji podražuju citosolne, inflamatornostimulativne NLR receptore. NLRP3 inflamatom su proteinski kompleksi koji posreduju u sazrijevanju kaspaze-1, proteina uključenog u signalne puteve apoptoze i inflamacije stanice, a koja preteče citokina pretvara u proupalne efekte. Sukladno tome, antigen-QS-21 kompleksom podražena APC mišje koštane srži, *in vitro* je inducirala proizvodnju klasičnih proupalnih interleukina IL-1 β i IL-18.¹⁶ Niski titri protutijela IgG1 i IgG2 ukazuju da IL-1 β bogata citokinska okolina promovira Th17 sustav. Iskustveno se IgG2 uzima za molekularnog markera Th1 usmjerenog, a IgG1 za Th2 usmjereni odgovor. Zaključno, NLRP3-kaspaza-1 posredovan inflamacijski put, u kontrolnim stanicama smanjuje efektivnost cjepiva jer je Th17 opredjeljenje koje odvraća od Th1/Th2 staničnog opredjeljenja, veće nego u NLRP3 utišanim mišjim stanicama.

Predloženi receptor-ovisan mehanizam djelovanja direktno uključuje T limfocite. QS-21 bi ostvarivao interakciju preko C-23 pozicionirane aldehidne skupine na triterpenskoj osnovi s amino-skupinom membranskog T limfocitnog CD2 receptora (Slika 4).¹⁷ Novonastala imin QS-21/CD2 interakcija osiguravala bi pravilnu imunološku sinapsu uz valjanu MHC-TCR interakciju prouzročenu utjecajem QS-21 na APC-u. Nizvodna, amplifikacijska signalna kaskada aktivira dvije proupalne kinaze, ERK2 i MAPK, čije su uloge u indukciji Th1 citokina poznate.



Slika 4. Mehanizam djelovanja QS-21 adjuvanta.

Zaključno, vjerojatnost da saponini ostvaruju mehanizam djelovanja preko kolesterol ovisne internalizacije na APC, simultano sa CD2 receptorskom interakcijom na T limfocitu je velika. Ako istinito, uz ovakvu interakcijsku svestranost, robustan Th1/Th2 imunološki odgovor QS-21 ne začinjuje.

5.2. Mehanizam antitumorskog i antibakterijskog djelovanja

U adjuvantsku aktivnost indirektno se upliću antitumorsko i antibakterijsko djelovanje koje može dodatno farmakološki pridonijeti. Anti-proliferativnost, anti-angiogenost i sprječavanje metastaza ključne su odlike saponina u borbi protiv raka. Antitumorska označja temelje se na selektivnom izazivanju mitohondrijskog oksidativnog stresa i disrupciji homeostaze kalcija koji će aktivacijom klasičnih proteina smrti, kaspaze-3 i citokroma-C dovesti do apoptoze (ekstracelularnim ili celularnim putem).¹⁸ Postulirano je da saponinska selektivnost prema tumorima postoji zbog uvećanog udjela kolesterola u membranama tumorskih stanica i kolesterolnom afinitetu saponina na temelju kojeg ih razlikuje. Također, saponinska antitumorska potentnost ponovo ovisi o različitim

cjelovitostima molekula, njihovim bočnim ograncima, vrsti i jačini veza kojima su vezani na triterpensku osnovu i drugim kemijskim svojstvima.

U istraživanju antibakterijskog mehanizma djelovanja, digitalna simulacija molekularne dinamike dokazala je saponinski afinitet za fosfatidiletanolaminom (POPE) u odnosu na fosfoglicerol (POPG) i fosfatidilglicerol (DPPG), u vjerodostojno dizajniranoj membrani Gram-negativnih bakterija s POPE:POPG:DPPG fosfolipidnim omjerom 80:15:5%. Posljedično, permeabilizirana bakterijska stanična membrana u većoj je mjeri izložena adjuvant-kombiniranim lijekovima kao što su antibiotici.²

6. Alternativni QS-21 analozi

S obzirom da svjetsko tržište zadnjih desetljeća iskazuje uvećan interes za uvozom saponina kao sirovine, za osiguravanje njihovog izvora, bez prirodnih devastacija, potrebno je razviti metode sinteze novih saponina. Usprkos mnogim prednostima QS-21, toksičnost ovisna o dozi, heterogenost i kemijska nestabilnost i dalje predstavljaju ograničenja ovog potentnog adjuvanta. Modificirani saponini trebali bi predstavljati upravo dostupniju, sigurniju i stabilniju formu QS-21. Studije koje razmatraju ovisnost aktivnosti o kemijskoj strukturi imaju za cilj modifikacijama unaprijediti terapijski učinak molekula.

6.1. Saponinski farmakofor

Iako je molekularni mehanizam do detalja nepoznat, podaci SAR studija upućuju na biološki aktivnije dijelove QS-21. Modifikacija tetrasaharida u trisaharidnu varijantu i acilnog lanca u terminalni amin omogućuje molekulima da bude fluorescentno praćena nakon UV osvjetljavanja zbog mogućnosti supstitucije sa fluorescentnim ili jodiranim supstituentom.¹⁷ Trisaharid je odbačen kao farmakofor kada je dokazana adjuvantska aktivnost nakon njegove supstitucije aril jodidom. Teorija receptor-ovisnog mehanizma saponina u kojem aldehidna grupa vrši interakciju sa CD2 limfocitnim receptorom, potpomognuta je eksperimentalno dobivenim rezultatima u kojima je adjuvantna aktivnost modifikacijama aldehidnog farmakofora smanjena, a eliminacijom uklonjena.¹¹ Unatoč tome, postoje saponini koji u nedostatku aldehidne skupine ostvaruju imunostimulirajući odgovor.¹⁹ Suprotno, triterpenski glikozidi primjer su strukturalno srodnih molekula QS-21 saponinu koji ne posjeduju adjuvantske osobine.

QS-21 jedan je od rijetkih saponina sa acilnim lancem na reducirajućem kraju fukoze. U ispitivanju acetilnih farmakoforskih svojstava prijavljeno je da QS-21 deacetilacijom gubi CTL limfoproliferativnu moć, ali ostaje aktivan u Th2 indukciji.²⁰ Predložena

hipoteza postdeacetiliranih događaja ukazuje na DC-SIGN posredovanu interakciju deacetilirane fukoze. DC-SIGN signalni put uključuje lektinske receptore na membrani dendritičkih stanica čija aktivacija nizvodnih sudionika opredjeljuje na Th2 odgovor (Slika 4).²¹ Također, osim šećera, za ligand-receptor specifičnu interakciju SIGN receptora, drugi ligandi nisu prijavljivani. Dokazan fukozni doprinos molekulskoj dinamici postaje paradoksalan činjenicom da je ona zasjenjena acilnim lancem u izvornom QS-21 saponinu koji je Th2 inducibilan.²⁰ Potvrдно, QS-7 saponin s prirodno uskraćenim acilnim lancem, nakon acetilacije rezultira manjim IgG2/IgG1 omjerom što ponovo upućuje na Th2 opredijeljeni odgovor.¹¹ SAR studije saponina ne ispoljavaju istoznačne rezultate oko kojih bi se moglo zaključiti o farmakoforu. Vjerojatnije je za naslutiti da jedinstveni farmakokinetički profili QS-21 i analoga postoje zbog pojedinačne strukturalne cjelovitosti.

6.2. Poboljšavanje terapijskog učinka

Za postizanje bolje inačice QS-21, potrebno je razdijeliti terapijski učinak od onog toksičnog na razini molekularnih događanja što znači da je modifikacijama moguće smanjiti toksičnost uz očuvanje efektivnosti i obratno. Postojanje, ali ne i strogo definirana kemijska predodređenost bočnog lanca saponina od značajne je važnosti za adjuvantnu aktivnost. Semisintetski QS-21 analog GPI-0100, modificiran je dodecilamidnim lancem umjesto acilnog bočnog lanca.²² Analiza IgG2/IgG1 omjera ukazuje da je nakon GPI-0100 stimulacije zadržan celularni i humoralni odgovor, a toksičnost drastično smanjena. Sukladno, izvješteno je na modelu miša da GPI-0100 posjeduje veću smrtonosnu dozu (LD₅₀) od QS-21 za kojeg je LD₅₀ 20 µg²³ i potencijalna je zamjena QS-21. Predklinička evaluacija GPI-0100 adjuvantiranog cjepiva protiv influenze ističe Th1 potentiran odgovor već pri malim antigen dozama.²³ Nadalje, alternativni QS-21, u kojem C-3 pozicionirana masna kiselina privezana peptidnom vezom zamjenjuje eterskom vezom privezan trisaharid, ukazuje na veću

stabilnost.¹¹ Buduća SAR istraživanja doprinijeti će bržem razvoju stabilnijih QS-21 analoga sa poboljšanim aktivnost/toksičnost profilima.

7. Saponinska upotreba u formulacijama

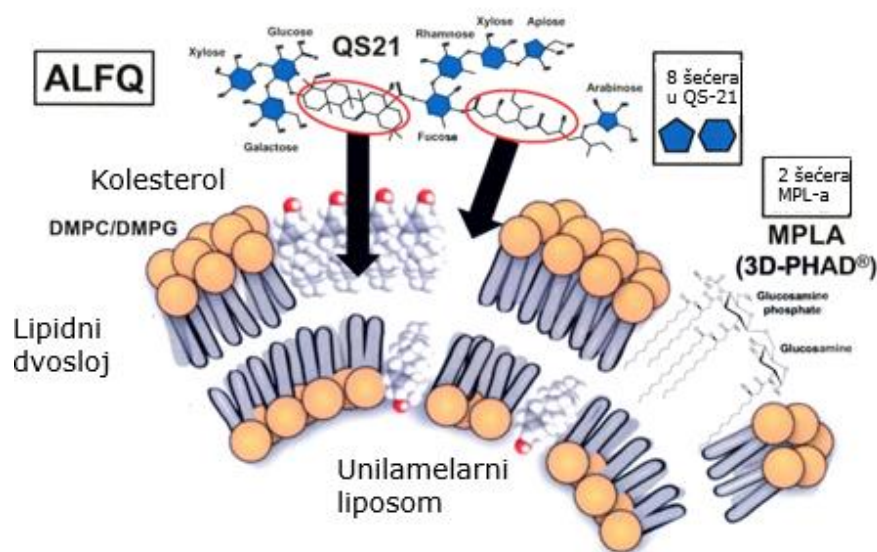
Jedan od obećavajućih pristupa u formulacijama cjepiva protiv zahtjevnih patogena je adjuvantna kombinacija koja će sinergistički sudjelovati u stvaranju dugotrajne imunosti. Prema fizikalno-kemijskim svojstvima adjuvante je moguće razdijeliti na aktivne imunostimulatore (dijelovi bakterijskog paptidoglikana), surfaktante (saponini), sustave za dostavu (liposomi, emulzije, nanočestice), čestične adjuvante (alum) i nosioce (konjuganti antigena i proteina). Novi istupci u molekularno-tehnološkom polju doprinijeli su odmaku od prve generacije adjuvanata kao što su aluminijske soli (alum) i uljne emulzije. Respektivno, prednost adjuvatnske primjene QS-21 nad adjuvansima prve generacije je Th1/Th2 imunopotencirajući učinak koji za razliku od alum inducirajućeg Th2 učinka postiže brzu i dugoročnu zaštitu.

Ideja o adjuvant kombiniranim formulacijama pojavila se ranih 1990-ih godina kada je imunologija kao znanost u kombinaciji sa tehnološkim napretkom mogla razviti istovremeno sigurna i učinkovita cjepiva.¹ Adjuvantni sustavi nužnost su u cjepivima protiv patogena sa kompleksnim životnim ciklusom (*Plasmodium falciparum*), višestrukim sojevima (*Streptococcus pneumoniae*) i koji uzrokuju opasnosti kao što su „antigenski drift“ (*Bordetella pertussis*) i intracelularna infekcija (*Mycobacterium tuberculosis*). Ograničena efikasnost i kratko vrijeme zaštite još su neki izazovi koje treba razriješiti u borbi protiv zdravstveno opterećujućih bolesti globalnih razmjera. Važnije, zbog nedegeneriranosti AS-a, oni nisu sposobni rezultirati istom razinom efektivnosti za različite antigene pa je uz prigodan adjuvant-adjuvant odabir nužna i zadovoljavajuća antigen-adjuvant kombinacija. AS imaju ključnu ulogu u stimulaciji imunokomprimiranog, nezrelog (pedijatrijska populacija) i ne reaktivnog (starija populacija) imunološkog sustava. Adjuvantni sistemi koji sadrže QS-21 koriste se u nekoliko licenciranih i više od 100 cjepiva u stadiju kliničkih ispitivanja.¹²

ISCOM sustavi za dostavu antigena uz antigen i adjuvant dodatno sadrže fosfolipide i kolesterol koji se prema organizaciji mogu klasificirati na liposome i uljne emulzije. Nosači bogati fosfolipidnim dvoslojima u vezikularnom obliku su liposomi. Liposomi osiguravaju ciljanu dostavu antigena pritom štiteći ga od razgradnje, a zbog neizbirljive ugradnje antigena i depo-efekta česti su odabir kao platforme za dostavu lijeka. Uz liposome razlikujemo i adjuvantske kombinacije bazirane na emulziji. Uljne emulzije, sustavi sa kontinuiranom i disperznom fazom vode u ulju (W/O) ili ulja u vodi (O/W), djeluju na principu depo-efekta i preusmjeravaju imunološki odgovor na proizvodnju antigen-specifičnih protutijela. Neki od kombiniranih, QS-21 sadržanih, adjuvantskih sustava su AS01, AS02 i AS015 (Tablica 1).

7.1. Liposom-bazirane adjuvantske kombinacije

QS-21 sadržana formulacija bazirana na liposomima (ALFQ- adjuvant army liposom based formulations containing QS-21) oformljuje se zbog afiniteta prema kolesterolu. Naime, triterpenska hidrofbna domena izravno se veže na kolesterol, formirajući kanal u kojem će se usidriti fleksibilna regija acilnog lanca između fukoze i arabinoze (Slika 4).²⁴



Slika 5. Shematski prikaz izrade liposom-baziranih adjuvantskih sustava.

Očekivanja saponinske ugradnje u liposome se nisu ostvarila: ugradnjom hidrofnog triterpenskog aglikona biti će onemogućena adjuvantska aktivnost zbog spriječene kolesterol-posredovane internalizacije saponina. U suprotnom, ALFQ ukazivala su na jednaku imunostimulativnu moć kao i slobodni QS-21, uz povećanu stabilnost.¹

7.1.1. Predklinička i klinička upotreba AS01

AS01 je liposom-bazirana kombinacija monofosforil lipida A (MPLA) i QS-21, dva diskretna imunopotencijatora za koje je poznato da posjeduju adjuvantske sposobnosti zasebno. MPLA kao derivatizirani analog bakterijskog lipopolisaharida (LPS), po svojoj je prirodi TLR-4 agonist i rekombinantno se dobiva iz *Salmonella minnesota*. QS-21 i MPLA zajedno ugrađeni u unilamelarni liposom izlažu sveukupno 10 šećernih motiva spremnih za molekularno prepoznavanje i receptorsko podraživanje (Slika 4). Njihovo sinergističko djelovanje dokazano je *in vivo* u miševima obrađenim *varicella zoster* specifičnim antigenom, glikoproteinom E (gE). Rezultati na temelju specifičnih CD4 aktivnih citokina, IFN- γ i IL-2, ukazuju na jači imunološki odgovor miševa izloženih gE/AS01 u usporedbi sa gE/liposom+QS-21 i gE/liposom+MPL zasebno izlaganim formulacijama.²⁵ Sinergističko djelovanje je postulirano na većem broju antigen preuzetih APC-a, ne i na uvećanom preuzimanju antigena. AS01 istraživanja su nastavljena u kliničkim ispitivanjima u kojima se utvrđuje sigurnost AS01 formuliranih cjepiva.²⁶

7.1.1.1. AS01 sadržano RTS,S antimalarijsko cjepivo Mosquirix™

Malarija predstavlja veliki zdravstveni problem u tropskim i suptropskim područjima u kojim svjetska zdravstvena organizacija (WHO) godišnje izvješćuje o 247 milijuna slučajeva zaraze i 619 tisuća slučajeva smrtnog ishoda. Unatoč insekticidnim i antimalarijskim intervencijama, supresirani prenosioci komarci i plazmodijski uzročnici, sve više su rezistentni na

antimalarike, a vektori pokazuju povećanu otpornost na insekticide. Izazovi u suzbijanju malarije postoje zbog kompleksnog životnog ciklusa jednog od najčešćih uzročnika malarije, *Plasmodium falciparuma*. Cjepivom je potrebno inducirati staničnu i humoralnu imunost kako bi se utjecalo na vanstanično i unutarstanično parazitiranje tijekom pre-eritrocitnog i eritrocitnog stadija života plazmodija. Upravo je AS01 adjuvantska formulacija sa zadovoljavajućim korist/rizik omjerom evaluirana kao najpogodnija pa je 2022. godine licencirana u sklopu RTS,S cjepiva od strane WHO-a. RTS,S je jedino odobreno antimalarijsko cjepivo i prvi odabir u prevenciji malarije. Ovo pre-eritrocitno cjepivo, komercijalno prepoznatljivo pod imenom Mosquirix™, uz AS01 sadrži rekombinantno dobiveni RTS, hibrid cirkumsporozoidnog proteina (CSP) *Plazmodij falciparuma* i površinskog antigena hepatitis B virusnog uzročnika. U II. fazi kliničkih istraživanja RTS,S/AS01 formulacije izvješteno je o zadovoljavajućoj toleranciji, ali istodobni humoralni i stanični odgovor bio je ključan na putu do odobravanja svjetskih zdravstvenih regulatornih institucija. Naime, zabilježene su zadovoljavajuće koncentracije anti-CSP IgG specifičnih-protutijela i plazma indikatora CD4 aktivnih T limfocita: IL-2, IFN- γ i TNF- α . Pilot projekti procjepljivanja u 7 afričkih država i posljedične evaluacijske studije sigurnosti i efikasnosti ispoljile su skromnu 36%-tnu efikasnost koja je do danas najbolja dostupna zaštita i koja je dovoljna da se provode rutinski imunizacijski programi na područjima riskantnim zaraze.²⁷

7.1.1.2. AS01 sadržano cjepivo protiv herpes zoster – Shringix™

Herpes zoster je virusna infekcija uzročnika *varicella zoster* koja ima veću frekvenciju pojavnosti kod imunokomprimiranih pojedinaca i starijoj populaciji. Bolest se javlja reaktivacijom virusa nakon primarne infekcije poznatije kao vodene kozice, karakteristično bolnih i iritabilnih kožnih plikova. Naizgled neopasni, simptomi u starijoj populaciji mogu dovesti do ozbiljnih komplikacija neuralgijske prirode. Za „imunološki trening“

potrebno je cjepivom održavati imunološku memoriju stečenu u djetinjstvu. Ponovno, AS01 adjuvatska formulacija našla je primjenu u Shringix™ cjepivu sa rekombinantno dobivenim gE kao površinskim antigenom virusa *varicella zoster*. Iskustveno se sigurnost Shringix cjepiva očekivala, a eksperimentalno dokazala na fuziranoj I/II fazi kliničkih ispitivanja na kojoj je također utvrđen i jači humoralni odgovor od živog atenuiranog cjepiva.¹⁷ U placebo studiji, dvije skupine ispitanika, obje starije od 40 godina, randomizacijom su primali placebo/cjepivo s dozom od 50 µg gE kako bi se ispitala njegova efektivnost. Zbog više od 90%-tne zaštite, svjetske regulativne institucije za lijekove, FDA i EMA, su 2017.g i 2018.g odobrile i plasirale Shringix™ cjepivo na tržište.¹⁷

7.1.2. Tumorska indikacija AS15 i predklinička upotreba

Saponini se istražuju i potencijalno su revolucionarni agensi u antitumorskom polju vakcinologije. Cilj antitumorskog cjepiva više je orijentirana na ozdravljenje oboljelih nego na prevenciju zdravih osoba. Iako je izvještavano uglavnom o antikancerogenim osobinama *Ginseng*, *Ginsenosides* i *Gypenosides* saponina¹⁸, saponini roda *Quillaja* također su zauzeli mjesto u kliničkim istraživanjima antitumorskih cjepiva. Selektivni antitumorski i antiproliferativni utjecaj zasebnih QS-21 i aglikonske osnove (QA) dokazan je *in vitro* na stanicama ljudskog tumora želuca.²⁸ *Quillaja* saponini ukazivali su na 3 puta manju IC₅₀ vrijednost što je analogno 3 puta većoj citotoksičnosti od saponina iz drugih izvora. Studija nalaže da bi upravo acilni lanac na C-28 poziciji mogao biti razlog citotoksičnosti QS-21. Tako, kemijski stabilni sintetski saponini koji postižu antitumorski efekt QS-21 često budu prvi odabir u evaluacijskim programima antitumorskih cjepiva.²⁹ QS-21 i GPI-0100 adjuvantirana cjepiva protiv dva ugljikohidratna tumor-specifična antigena isproban je *in vivo* na modelu miša.³⁰ Tumorsupresorska zasluga GPI-0100 objedinjuje izraženiji imunopotencirajući i utišani toksični učinak te veću

opskrbljenost antitijelima protiv tumor-specifičnih antigena, u usporedbi sa QS-21.

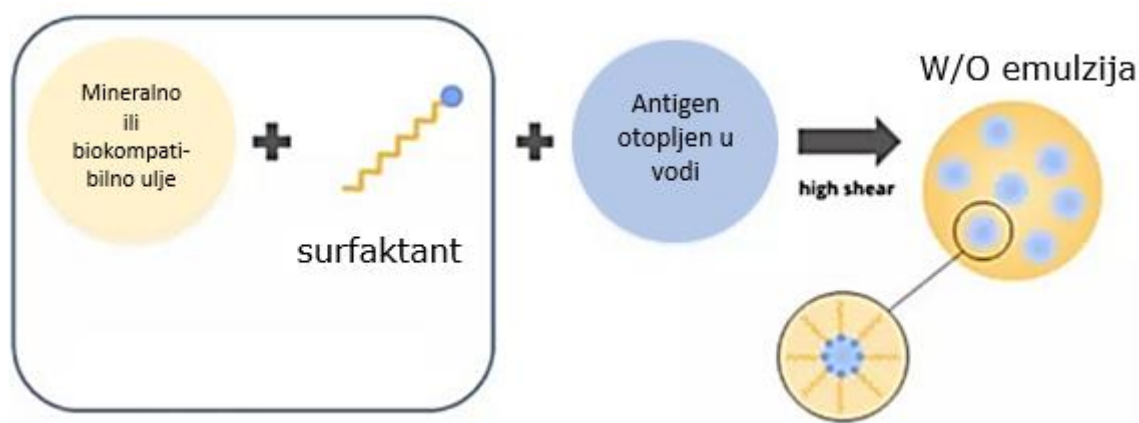
AS15 liposom-bazirana formulacija još je jedna od onih sa kliničkom upotrebom, ovog puta u antitumorskoj vakcinologiji. AS15 sadrži MPL/QS-21 poznatu adjuvantsku kombinaciju uz CpG imunopotencijator kao novitet. Nemetilirani citozin gvanozin dinukleotid (CpG) evolucijski je konzervirana PAMP odrednica nekih prokariota protiv kojih će biti induciran CTL citotoksičan i/ili Th1 odgovor nakon podražaja endosomalnog TLR-9 receptora. Melanomski antigen obitelji 3 (MAGE-3) odabran je kao antigenska sastavnica cjepiva s AS15 formulacijom zbog njegove pretjerane ekspresije u melanomima. MAGE-A3/AS15 cjepivo provedeno je kroz III. fazu kliničkog ispitivanja placebo studijom u kojoj nije nađena statistički značajna razlika u vremenu ponovnog javljanja tumora u cjepivom/placebom tretiranih ispitanika zbog čega je njegov razvoj zaustavljen.¹⁷ U budućnosti, uz ostale biljne antitumorske lijekove kao što su vinkristin i kolhicin, saponini i derivati mogli bi obogatiti ionako siromašan izbor antitumorskih lijekova iz prirodnih izvora i time se približiti ostvarivanju ultimativnog cilja: povećati stopu preživljavanja pacijenata oboljelih rakom.

7.2. Emulzija-bazirane adjuvantske kombinacije

Emulzije su mješavine dviju tekućina s većom tendencijom odvajanja faza nego miješanja, stabilizirane surfaktantom. Iako je emulzijska primjena raširenija u veterinarskoj vakcinologiji, licencirana adjuvantna ulja kao što su skvalensko i uljne emulzije, u humanoj primjeni koriste se već više od 20 godina.³¹ Ono što ih čini poželjnima je uspješno izazivanje imunokompetentne okoline uključujući regrutaciju APC-a na mjestu administracije čija progresija, s druge strane, može rezultirati granulomima. Ipak, u kombinaciji s adjuvantom uspješno induciraju miješani Th1/Th2 odgovor, dugoživeće plazma stanice i raznovrsnost memorijskih B limfocita.

7.2.1. Predklinička primjena AS02

Jedini sastojak koji AS02 razlikuje od AS01 je emulzija ulja u vodi (O/W). Ugradnja saponina u područja prijelaza kontinuirane u disperznu fazu moguća je upravo zbog njihovih surfaktantskih svojstava (Slika 5).



Slika 6. Shematski prikaz emulzija-baziranog adjuvantnog sustava.

RTS,S/AS02 bilo je prvo osmišljeno i klinički ispitano pre-eritrocitno cjepivo protiv malarije no zbog nižih titri protutijela adjuvatska kombinacija zamijenjena je s AS01.³² Inicijativa za unaprijeđenim cjepivom protiv tuberkuloze javlja se proporcionalno intenzivnijim prijavljivanjima nuspojava u odraslih pojedinaca cijepljenim BCG (Bacillus Calmette–Guérin) cjepivom, izuzetno učinkovitim cjepivom pedijatrijske populacije koje je odobreno još 1921.g.¹⁷ *Mycobacterium tuberculosis* je unutarstanično parazitirajuća bakterija koja nakon fagocitoze APC-a uništavanjem integriteta membrane endosoma izbjegava smrt i uzrokuje unutarstaničnu infekciju. Imunogeničan antigen tuberkuloze, M72, udružen s AS02 u studiji evaluacije anti-tuberkuloznog cjepiva, predstavljaju kombinaciju s robusnim anti-M72 odgovorom. Ovom studijom je dokazano da nakon 4 imunizacijska ciklusa zdravih odraslih ispitanika, M27/AS02 pokazuje zadovoljavajuće sigurnosne i učinkovite profile za kliničku upotrebu na odrasle, ne i na djecu.³³

Adjuvantski sistem	Sadržaj	Klinička istraživanja	Licencirana cjepiva
AS01	QS-21/MPL kombinacija inkapsulirana u liposom	RTS,S antimalarijsko cjepivo, Herpes zoster cjepivo	Mosquirix (2022.g.) Shingrix (FDA 2017.g., EMA 2018.g.)
AS02	QS-21/MPL kombinacija na bazi O/W emulzije	Cjepiva protiv melanoma, tuberkuloze, HIV-a i malarije	/
AS15	QS-21/MPL/CpG kombinacija inkapsulirana u liposom	Cjepivo za suzbijanje MAGE-A3 raka pluća	/

QS-21 – saponin iz ekstrakta *Q. saponaria* Molina
MPL – derivatizirani lipopolisaharid
O/W – ulje u vodi emulzija
CpG – imunostimulatorni nukleotid

Tablica 1. QS-21 sadržane adjuvantske kombinacije.

8. Literatura

- 1 Garçon N, Di Pasquale A. From discovery to licensure, the Adjuvant System story. *Hum Vaccines Immunother* 2017; **13**: 19–33.
- 2 Reichert CL, Salminen H, Weiss J. *Quillaja* Saponin Characteristics and Functional Properties. *Annu Rev Food Sci Technol* 2019; **10**: 43–73.
- 3 Guerra F, Sepúlveda S. Saponin production from *Quillaja* genus species. An insight into its applications and biology. *Sci Agric* 2021; **78**: e20190305.
- 4 Guimarães LE, Baker B, Perricone C, Shoenfeld Y. Vaccines, adjuvants and autoimmunity. *Pharmacol Res* 2015; **100**: 190–209.
- 5 Rai S, Acharya-Siwakoti E, Kafle A, Devkota HP, Bhattarai A. Plant-Derived Saponins: A Review of Their Surfactant Properties and Applications. *Sci* 2021; **3**: 44.
- 6 Rohit S, Nidhi S. CONVENTIONAL METHOD FOR SAPONIN EXTRACTION FROM. 2014; **3**.
- 7 Obasi TC, Moldovan R, Toiu A, Braicu C, Bodoki E, Berindan-Neagoe I *et al*. Molecular-trapping in Emulsion's Monolayer: A New Strategy for Production and Purification of Bioactive Saponins. *Sci Rep* 2017; **7**: 14511.
- 8 Moghimipour E, Handali S. Saponin: Properties, Methods of Evaluation and Applications. *Annu Res Rev Biol* 2015; **5**: 207–220.
- 9 Uwineza PA, Waśkiewicz A. Recent Advances in Supercritical Fluid Extraction of Natural Bioactive Compounds from Natural Plant Materials. *Molecules* 2020; **25**: 3847.
- 10 Pedebos C, Pol-Fachin L, Pons R, Teixeira C, Verli H. Atomic Model and Micelle Dynamics of QS-21 Saponin. *Molecules* 2014; **19**: 3744–3760.
- 11 Wang P. Natural and Synthetic Saponins as Vaccine Adjuvants. *Vaccines* 2021; **9**: 222.
- 12 Wang P, Škalamera Đ, Sui X, Zhang P, Michalek SM. Synthesis and Evaluation of a QS-17/18-Based Vaccine Adjuvant. *J Med Chem* 2019; **62**: 1669–1676.
- 13 Schreiner TB, Dias MM, Barreiro MF, Pinho SP. Saponins as Natural Emulsifiers for Nanoemulsions. *J Agric Food Chem* 2022; **70**: 6573–6590.

- 14 Fernández-Tejada A, Chea EK, George C, Pillarsetty N, Gardner JR, Livingston PO *et al.* Development of a minimal saponin vaccine adjuvant based on QS-21. *Nat Chem* 2014; **6**: 635–643.
- 15 Welsby I, Detienne S, N’Kuli F, Thomas S, Wouters S, Bechtold V *et al.* Lysosome-Dependent Activation of Human Dendritic Cells by the Vaccine Adjuvant QS-21. *Front Immunol* 2017; **7**. doi:10.3389/fimmu.2016.00663.
- 16 Marty-Roix R, Vladimer GI, Pouliot K, Weng D, Buglione-Corbett R, West K *et al.* Identification of QS-21 as an Inflammasome-activating Molecular Component of Saponin Adjuvants. *J Biol Chem* 2016; **291**: 1123–1136.
- 17 Lacaille-Dubois M-A. Updated insights into the mechanism of action and clinical profile of the immunoadjuvant QS-21: A review. *Phytomedicine* 2019; **60**: 152905.
- 18 Elekofehinti OO, Iwaloye O, Olawale F, Ariyo EO. Saponins in Cancer Treatment: Current Progress and Future Prospects. *Pathophysiology* 2021; **28**: 250–272.
- 19 Qi L-W, Wang C-Z, Yuan C-S. Ginsenosides from American ginseng: Chemical and pharmacological diversity. *Phytochemistry* 2011; **72**: 689–699.
- 20 Marciani DJ. Is fucose the answer to the immunomodulatory paradox of Quillaja saponins? *Int Immunopharmacol* 2015; **29**: 908–913.
- 21 Švajger U, Anderluh M, Jeras M, Obermajer N. C-type lectin DC-SIGN: An adhesion, signalling and antigen-uptake molecule that guides dendritic cells in immunity. *Cell Signal* 2010; **22**: 1397–1405.
- 22 Fernández-Tejada A, Tan DS, Gin DY. Development of Improved Vaccine Adjuvants Based on the Saponin Natural Product QS-21 through Chemical Synthesis. *Acc Chem Res* 2016; **49**: 1741–1756.
- 23 Liu H, Bungener L, Ter Veer W, Collier B-A, Wilschut J, Huckriede A. Preclinical evaluation of the saponin derivative GPI-0100 as an immunostimulating and dose-sparing adjuvant for pandemic influenza vaccines. *Vaccine* 2011; **29**: 2037–2043.
- 24 Alving CR, Rao M, Matyas GR. Similarities and differences of chemical compositions and physical and functional properties of adjuvant system 01 and army liposome formulation with QS21. *Front Immunol* 2023; **14**: 1102524.
- 25 Del Giudice G, Rappuoli R, Didierlaurent AM. Correlates of adjuvanticity: A review on adjuvants in licensed vaccines. *Semin Immunol* 2018; **39**: 14–21.

- 26 Stadtmauer EA, Sullivan KM, Marty FM, Dadwal SS, Papanicolaou GA, Shea TC *et al.* A phase 1/2 study of an adjuvanted varicella-zoster virus subunit vaccine in autologous hematopoietic cell transplant recipients. *Blood* 2014; **124**: 2921–2929.
- 27 Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. *The Lancet* 2015; **386**: 31–45.
- 28 Guzmán L, Villalón K, Marchant MJ, Tarnok ME, Cárdenas P, Aquea G *et al.* In vitro evaluation and molecular docking of QS-21 and quillaic acid from *Quillaja saponaria* Molina as gastric cancer agents. *Sci Rep* 2020; **10**: 10534.
- 29 Adams MM, Damani P, Perl NR, Won A, Hong F, Livingston PO *et al.* Design and Synthesis of Potent *Quillaja* Saponin Vaccine Adjuvants. *J Am Chem Soc* 2010; **132**: 1939–1945.
- 30 Ragupathi G, Coltart DM, Williams LJ, Koide F, Kagan E, Allen J *et al.* On the power of chemical synthesis: Immunological evaluation of models for multiantigenic carbohydrate-based cancer vaccines. *Proc Natl Acad Sci* 2002; **99**: 13699–13704.
- 31 O'Hagan DT, Van Der Most R, Lodaya RN, Coccia M, Lofano G. "World in motion" – emulsion adjuvants rising to meet the pandemic challenges. *Npj Vaccines* 2021; **6**: 158.
- 32 Pirahmadi S, Zakeri S, Djadid ND, Mehrizi AA. A review of combination adjuvants for malaria vaccines: a promising approach for vaccine development. *Int J Parasitol* 2021; **51**: 699–717.
- 33 Leroux-Roels I, Leroux-Roels G, Ofori-Anyinam O, Moris P, De Kock E, Clement F *et al.* Evaluation of the Safety and Immunogenicity of Two Antigen Concentrations of the Mtb72F/AS02_A Candidate Tuberculosis Vaccine in Purified Protein Derivative-Negative Adults. *Clin Vaccine Immunol* 2010; **17**: 1763–1771.

Izvor slika:

Slika 1.

Cheok CY, Salman HAK, Sulaiman R. Extraction and quantification of saponins: A review. *Food Res Int* 2014; 59: 16–40.

Slika 2.

Lacaille-Dubois M-A. Updated insights into the mechanism of action and clinical profile of the immunoadjuvant QS-21: A review. *Phytomedicine* 2019; 60: 152905.

Slika 3.

Wang P. Natural and Synthetic Saponins as Vaccine Adjuvants. *Vaccines* 2021; 9: 222.

Slika 4.

Mieres-Castro D, Mora-Poblete F. Saponins: Research Progress and Their Potential Role in the Post-COVID-19 Pandemic Era. *Pharmaceutics* 2023; 15: 348.

Slika 5.

Alving CR, Rao M, Matyas GR. Similarities and differences of chemical compositions and physical and functional properties of adjuvant system 01 and army liposome formulation with QS21. *Front Immunol* 2023; 14: 1102524.

Slika 6.

<https://www.seppic.com/en/pharmaceuticals/human-vaccine-adjuvants>

Tablica 1.

Rai S, Acharya-Siwakoti E, Kafle A, Devkota HP, Bhattarai A. Plant-Derived Saponins: A Review of Their Surfactant Properties and Applications. *Sci* 2021; **3**: 44.



Lorena Jambreušć

Državljanstvo: hrvatsko **Datum rođenja:** 16/03/2001 **Spol:** Žensko **Telefonski broj:** (+385) 919141681

E-adresa: ljambreusic@gmail.com

Kućna: Varaždinska 24, Subotica podravska, 48000 Koprivnica (Hrvatska)

O MENI

Uporna, vrlo odgovorna te fokusirana i predana obavezama.

RADNO ISKUSTVO

Praktikantica u mikrobiološkom laboratoriju

Podravka d.d. [29/08/2022 – 09/09/2022]

Mjesto: Koprivnica

Zemlja: Hrvatska

Usvajanje osnova rada u mikrobiološkom laboratoriju što uključuje: razvrstavanje kemijskog posuđa i pribora, uzorkovanje i prijem uzoraka, priprema uzoraka za mikrobiološku analizu, priprema hranjivih podloga, nasađivanje uzoraka na hranjive podloge, pregled uzoraka nakon inkubacije, uvid u statističku preradu podataka, mikrobiološka analiza vode i atmosfere.

Pomoćna radnica u prehrambenoj industriji

Podravka d.d. [01/02/2021 – 31/07/2021]

Mjesto: Koprivnica

Zemlja: Hrvatska

Lijepljenje ambalažnih naljepnica, pakiranje i paletiranje prehrambenih proizvoda.

Djelatnica u trgovini odjevnih predmeta

C&A [01/11/2021 – 30/11/2021]

Mjesto: Koprivnica

Zemlja: Hrvatska

Razvrstavanje robe, održavanje urednosti trgovine i povremeni rad na blagajni.

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

Studentica

Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju i istraživanje lijekova [09/10/2021 – Trenutačno]

Adresa: Radmile Matejčić 2, 51000 Rijeka (Hrvatska)

Internetska stranica: <https://www.biotech.uniri.hr/hr/>

Studentica

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, Odjel za biologiju [19/07/2019 – 22/09/2021]

Adresa: Ulica cara Hadrijana 8/A, 31000 Osijek (Hrvatska)

Internetska stranica: <https://www.biologija.unios.hr/>

Gimnazija Fran Galović [07/09/2015 – 15/06/2019]

Adresa: Ul. doktora Željka Selinger, 48000 Koprivnica (Hrvatska)

Internetska stranica: <http://www.gimnazija-fgalovic-koprivnica.skole.hr/>

JEZIČNE VJEŠTINE

Materinski jezik/jezici: **hrvatski**

Drugi jezici:

engleski

SLUŠANJE B2 ČITANJE B2 PISANJE B2

GOVORNA PRODUKCIJA B2

GOVORNA INTERAKCIJA B2

DIGITALNE VJEŠTINE

Komunikacijski programi (Skype, Zoom, TeamViewer) / MS Office (Word Excel PowerPoint) / Internet / Informacije i komunikacija (pretraživanje interneta) / Osnovne vještine korištenja programa: PyMol, Chimerra, Avogadro, MarvinSketch, GAMESS-MacMolPlot, VMD Visual Molecular Dynamics

SOCIJALNE VJEŠTINE

Timski rad / Prilagodljivost / Dobro organizirana / Sposobna raditi u timu / Pristupačna / Sposobnost prilagođavanja promjenama / S lakoćom prihvaćam i rješavam nove izazove kroz koje napredujem