



Sergio Penco
Milano

COLLABORAZIONE TRA ENTI PUBBLICI E PRIVATI PER LO SVILUPPO DI NUOVI FARMACI ANTITUMORALI

Si presentano alcuni esempi recenti di collaborazione tra industria e università e/o altri enti di ricerca per lo sviluppo di nuovi farmaci antitumorali, con diversi obiettivi terapeutici.

Le ricerche riguardano nuovi derivati citotossici della camptotecina, nuovi composti proapoptotici analoghi di retinoidi e nuovi antiangiogenici appartenenti alla classe degli antagonisti delle integrine.

In questi ultimi anni la ricerca biomedica per lo sviluppo di nuovi farmaci antitumorali si avvale sia delle conoscenze sempre più approfondite sui meccanismi che sono alla base della trasformazione di una cellula normale in maligna, sia sulla disponibilità, resa possibile dalle biotecnologie, di una serie di proteine quali fattori di crescita, recettori, enzimi, da utilizzare come target molecolari specifici per la modulazione o inibizione sempre più selettiva della proliferazione incontrollata delle cellule tumorali.

L'approccio terapeutico rivolto a bloccare

la trasmissione del segnale di proliferazione inibendo l'attività di una serie di recettori cellulari importanti per lo sviluppo di un tumore, quali EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), VEGFR (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor), IGF-1-R (Insulin-like Type 1 Growth Factor Receptor), PDGFR (Platelet-derived Growth Factor Receptor), ha portato allo sviluppo di numerosi anticorpi che impediscono l'interazione fattore di crescita-recettore. Alcuni di questi anticorpi sono già di uso clinico, quali Herceptin (Trastuzumab) della Genentech per il tratta-

mento del tumore della mammella metastatico e Cetuximab della Imclone Systems per il trattamento del carcinoma del colon metastatico. Altri anticorpi sono in fase avanzata di sperimentazione clinica. L'attività di fosforilazione dei recettori può essere inibita, con conseguente blocco del segnale di proliferazione, anche mediante l'uso di piccole molecole che interagiscono col sito di legame dell'ATP nel dominio chinasi del recettore. Molte molecole sintetiche sono in sviluppo, alcune sono già di uso clinico, come l'Iressa (Astra-Zeneca) e il Gleevec (Novartis) (Fig. 1).

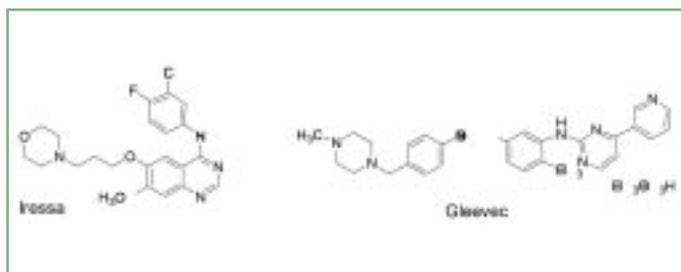


Figura 1

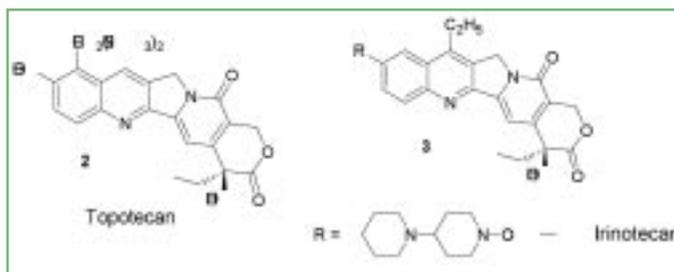


Figura 2

La chemioterapia antitumorale più efficace però rimane quella basata sull'uso di agenti antiproliferativi che interferiscono con le funzioni del DNA cellulare. Questa azione ha lo svantaggio di essere meno selettiva rispetto a quella degli anticorpi, in quanto può colpire anche il DNA delle cellule normali.

In questo articolo vengono descritti alcuni risultati di una ricerca che vede coinvolti in stretta collaborazione il Dipartimento di Scienze Molecolari Agroalimentari dell'Università di Milano, l'Istituto di Chimica e Biochimica "G. Ronzoni" di Milano, l'Istituto per lo Studio e la Cura dei Tumori di Milano, e, come componente industriale, la Società farmaceutica Sigma-Tau di Roma.

L'attività di ricerca è articolata su diversi obiettivi terapeutici che vanno dallo sviluppo di nuovi citotossici di origine naturale a quello di composti sintetici capaci di indurre morte cellulare (apoptosi), allo sviluppo di composti capaci di inibire l'angiogenesi (neoformazione di vasi nel tessuto tumorale) e la metastasi.

Farmaci citotossici

Tra gli agenti citotossici la classe degli inibitori delle topoisomerasi (enzimi nucleari che rompendo le catene del DNA inducono modificazioni topologiche dello stesso necessarie per processi importanti quali la duplicazione, la replicazione e il riparo), benché sia un'area matura, rimane un campo fertile per la scoperta di nuovi farmaci, con molti nuovi composti che si trovano in varie fasi di sviluppo.

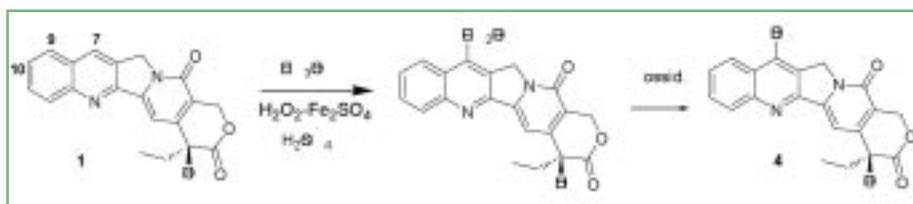
Le considerazioni che ci hanno suggerito di

investigare la sintesi e l'attività antitumorale di derivati della camptotecina (**1**), sostanza naturale estratta dalla corteccia della *Camptotheca acuminata*, sono da collegare all'importanza clinica di due derivati idrosolubili della sostanza naturale, Topotecan (Hy-camtin **2**) e Irinotecan (Camptosar **3**), al loro specifico meccanismo di azione come inibitori della topoisomerasi I, all'individuazione di uno spazio brevettuale e alla disponibilità commerciale della camptotecina come materia prima per i nostri studi chimici (Fig. 2). La camptotecina e i suoi derivati si legano al complesso topoisomerasi I-DNA dando origine ad un accumulo di rotture a singolo e a doppio filamento. A seguito di questo evento il ciclo cellulare si arresta e, se i meccanismi di riparo sono inefficaci, le cellule vanno in apoptosi. L'enzima topoisomerasi I è espresso in quantità più elevate nei tessuti tumorali che non in quelli normali ed in quantità diversa in tumori differenti: per esempio il tumore della cervice, del polmone, del colon-retto presentano alti livelli di espressione dell'enzima. A causa della reversibilità del complesso ternario farmaco-topoisomerasi I-DNA, per ottenere un effetto tossico ottimale è necessaria una prolungata esposizione al farmaco. Il razionale che ci ha guidato nel disegno di nuove

campototecine è stato quello di apportare delle modifiche in grado di aumentare la lipofilia della molecola e possibilmente favorire così sia un maggior uptake del farmaco ed accumulo intracellulare, sia una possibile maggiore persistenza del complesso topoisomerasi I-DNA-farmaco. Sulla base di queste considerazioni, sono stati sintetizzati una serie di derivati della camptotecina aventi in posizione 7 catene lipofile. Per la sintesi di tali derivati è stata usata come materiale di partenza la camptotecina-7-aldeide (**4**), preparata da **1** attraverso una reazione di idrossimetilazione radicalica (reazione di Minisci) e successiva ossidazione (Schema 1).

L'aldeide è stata sottoposta quindi a reazioni di condensazione con fosforani, ammine, idrossilammine O-sostituite, fornendo una serie di composti molto citotossici sulla linea cellulare H-460 (carcinoma polmonare umano non-microcitoma), caratterizzato da una overespressione di topoisomerasi I [1]. Nei test *in vitro* la maggior parte dei composti sono risultati più citotossici del Topotecan, e tra i più potenti il derivato 7-tert-butossiminometilcamptotecina (**5**) è stato scelto per lo sviluppo (Fig. 3).

Il composto, cui è stato dato il nome generico di Gimatécán, ha mostrato, dopo som-



Schema 1

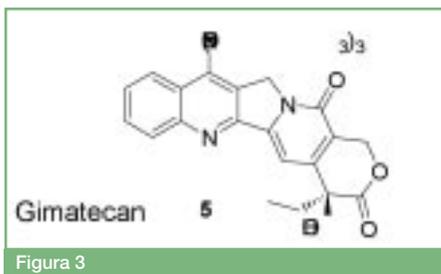


Figura 3

ministrazione per via orale su una serie di modelli sperimentali nel topo, un notevole effetto antitumorale *in vivo*. I dati più significativi sono stati osservati su carcinomi polmonari non-microcitoma, su melanomi ed osteosarcomi, con alta percentuale di risposte complete, cioè scomparsa del tumore fino ad almeno dieci giorni dall'ultimo trattamento, ed un'alta percentuale di cure, cioè scomparsa del tumore alla fine dell'esperimento (ca. 100 giorni) [2]. Il Gimitecan, a differenza di Topotecan ed Irinotecan, non è riconosciuto dai sistemi di trasporto implicati nei fenomeni di resistenza. Negli studi clinici di fase 1 il farmaco ha presentato nell'uomo un profilo di tossicità e di proprietà farmacocinetiche molto favorevoli. Sulla base dei dati preclinici e clinici, il prodotto è stato acquistato in licenza dalla società Novartis.

Farmaci proapoptotici

Un secondo approccio da noi affrontato è quello di indurre nelle cellule tumorali l'apoptosi, o morte cellulare programmata, mediante piccole molecole capaci di riattivare i meccanismi proapoptotici, che risultano alterati nella cellula maligna.

È da sottolineare che l'apoptosi è anche un importante fenomeno indotto dalla chemioterapia. L'efficacia del trattamento chemio-

terapico è limitata dall'insorgenza di resistenze ai farmaci. Tra i numerosi meccanismi coinvolti nella resistenza, è stato messo in evidenza il fatto che a causa del trattamento si instaurano alcuni cambiamenti nelle sequenze di eventi che portano alla morte cellulare. Infatti la progressione del tumore è stata associata ad una ridotta abilità delle cellule ad andare in apoptosi. Sulla base di queste evidenze c'è un grande interesse per l'identificazione di nuove strategie per indurre apoptosi. Fra i composti proapoptotici i retinoidi cosiddetti atipici rappresentano una nuova classe di agenti con alto potenziale terapeutico [3]. Infatti una caratteristica rilevante di questi agenti è l'abilità di attivare apoptosi p53-indipendente. La mutazione della p53 (una proteina coinvolta nella soppressione del tumore) è una frequente alterazione delle cellule tumorali ed è implicata nella resistenza agli agenti che danneggiano il DNA.

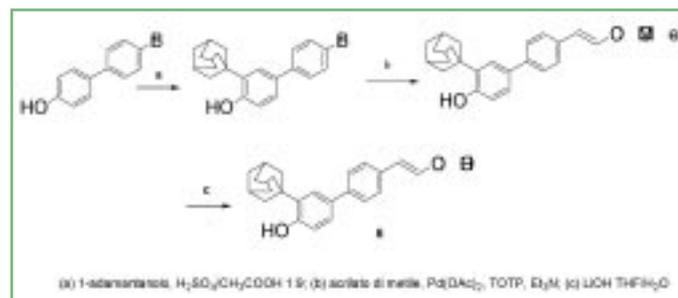
Fra un certo numero di composti sintetizzati abbiamo identificato il composto **6** (ST 1926) dotato di potente attività antiproliferativa e proapoptotica su una serie di linee cellulari di tumori umani. Il composto viene preparato con alte rese in tre passaggi (Schema 2), mediante reazione di Friedel-Crafts dell'1-adamantanolo con 4-idrossi-4'-bromobifenile (disponibile in commercio), successiva reazione di Heck con acrilato di metile e infine idrolisi alcalina [4].

Le concentrazioni richieste per l'inibi-

zione del 50% della crescita (IC_{50}) variano da 0,1 a 0,3 $\mu\text{mol/l}$, concentrazioni che sono farmacologicamente rilevanti. Il trattamento con **6** causa un accumulo nella fase del ciclo cellulare G1/S o S dipendente dalla linea cellulare stessa. Il composto è ben tollerato *in vivo* dopo somministrazione orale e causa una significativa riduzione della crescita del carcinoma ovarico umano A-2780/DX e del melanoma umano MeWo trapiantati su topi nudi [5]. Studi clinici di fase 1 sono previsti nel corrente anno.

Farmaci antiangiogenici

Un terzo approccio terapeutico da noi studiato è quello relativo all'inibizione dell'angiogenesi. L'angiogenesi (formazione di nuovi capillari sanguigni) costituisce parte integrante della crescita dei tumori ed è legata alla capacità delle cellule endoteliali di aderire ad altre cellule ed alle proteine della matrice extracellulare. Tra i recettori della superficie extracellulare specificamente coinvolti nell'adesione, i più importanti sono quelli della famiglia delle integrine. Diverse integrine, in particolare $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_v\beta_5$, vengono espresse dalle cellule tumorali e come tali costituiscono un bersaglio tera-

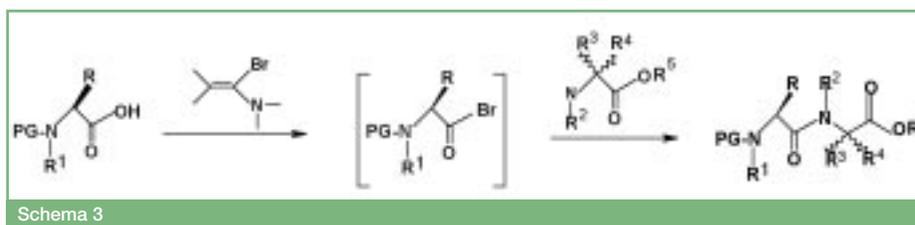


Schema 2

Cooperation between State and Private Institutions in Development of Antitumour Drugs

Some recent examples are illustrated of fruitful cooperation between industry, university and/or research institutions toward the development of new antitumour drugs, aimed to diverse therapeutic targets. The research activity concerns new cytotoxic derivatives of camptothecin, new proapoptotic analogues of retinoids, and new antiangiogenic compounds belonging to the family of integrine antagonists.

ABSTRACT



per la difficoltà di ottenerli allo stato puro. È stato ora possibile ottenere bromuri acilici puri partendo da aminoacidi opportunamente N-protetti e utilizzando l'1-bromo-*N,N*-2-trimetil-1-propenilammina, in condizioni del tutto neutre [7]. Il bromuro si forma quasi istantaneamente in soluzione e reagisce in modo efficiente con il trifluoroalchilamminoacido, dando il corrispondente dipeptide con alte rese (Schema 3).

Seguendo questo metodo, sono stati ottenuti una serie di ciclopeptidi con il fluoroalchilamminoacido inserito in diverse posizioni (Fig. 4) [8]. Le affinità con le integrine $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_v\beta_5$ sono risultate simili e in alcuni casi superiori a quelle dei peptidi di Kessler. Da un punto di vista generale, gli α -trifluorometilamminoacidi possono essere considerati dei nuovi tools per aumentare la diversità nella progettazione di librerie nella chimica combinatoriale. Inoltre l'incorporazione di tali aminoacidi è in grado di facilitare studi conformazionali di peptidi o proteine mediante l'uso di ^{19}F -NMR.

Conclusioni

I risultati qui succintamente descritti rappresentano un buon esempio della possibilità di produrre innovazione mediante l'uso sinergico di competenze nelle varie discipline, in particolare chimiche e biomediche, presenti in una realtà italiana priva di grandi industrie farmaceutiche e in un contesto di limitate risorse per la ricerca.

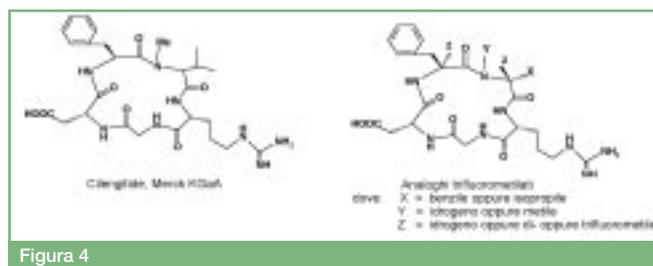
peutico. Questi recettori di membrana riconoscono le proteine della matrice attraverso una sequenza peptidica in esse contenuta costituita da tre aminoacidi, arginina-glicina-acido aspartico (RGD).

Innumerevoli analoghi di queste sequenze peptidiche, che possono funzionare da antagonisti delle sequenze naturali, sono stati studiati dai più importanti gruppi di ricerca accademici ed industriali. In particolare il gruppo di Kessler dell'Università di Monaco ha progettato e sintetizzato un peptide ciclico che contiene la sequenza RGD nella conformazione ideale per interagire con le integrine α_v , arrivando a sviluppare insieme alla società Merck KGaA un prodotto (cilengitide) con affinità circa nanomolare per il recettore, che al momento viene studiato in fase clinica [6].

Nell'ambito di un nostro programma di ricerca di analoghi del cilengitide, sono stati sintetizzati composti in cui un gruppo alchilico fluorurato è stato incorporato nella posizione α di alcuni degli aminoacidi che costituiscono il ciclopeptide. L'interesse per questo tipo di sostituzione è originato dall'osservazione che analoghi fluorurati di sostanze biologicamente attive hanno rivelato particolari proprietà farmacologiche. Nel caso specifico della sostituzione dell'idrogeno in α di un aminoacido naturale con un fluoroalchile, gli effetti attesi

sono: irrigidimento della conformazione, diminuita rotazione attorno al legame ammidico, diminuita capacità del fluoro di dare legami idrogeno che possono interferire nella interazione con il sito del recettore, notevole aumento del carattere idrofobico, che dovrebbe migliorare la biodisponibilità, protezione dalle peptidasi e di conseguenza maggiore stabilità *in vivo* della molecola.

La sintesi di fluoroalchilamminoacidi utilizza il fluoropiruvato come intermedio per preparare l'immina corrispondente e di seguito introdurre la catena laterale dell'amminoacido desiderato con reazione di Grignard. Questi aminoacidi possono essere introdotti facilmente nella posizione N-terminale dei peptidi, ma la difficoltà di allungamento della catena per derivatizzazione del gruppo amminico a causa della sua bassa basicità, è stata superata solo recentemente utilizzando i bromuri acilici degli aminoacidi. I bromuri non sono mai stati utilizzati nella sintesi dei peptidi a causa della loro grande instabilità e



Bibliografia

- [1] S. Dallavalle *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2000, **43**, 3963; S. Dallavalle *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Letters*, 2001, **11**, 291; S. Dallavalle *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2001, **44**, 3264.
- [2] G. Pratesi *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 2002, **8**, 3904.
- [3] E. Garattini *et al.*, *Curr. Pharm. Design*, 2004, **10**, 433.
- [4] R. Cincinelli *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2003, **46**, 909.
- [5] C. Pisano *et al.*, *J. Chemother.*, 2004, **16**(4), 74.
- [6] R. Haubner *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1997, **36**, 1375.
- [7] A. Dal Pozzo *et al.*, *J. Org. Chem.*, 2002, **67**, 6372.
- [8] A. Dal Pozzo *et al.*, *Proc. Am. Pept. Soc.*, 2003, 711; *WO Pat.* 2004011487.