



Il Nerviano Medical Sciences

*Daniele Donati
Nerviano Medical Sciences Srl
daniele.donati@nervianoms.com*

LA RICERCA ONCOLOGICA PRESSO NERVIANO MEDICAL SCIENCES

La strategia e le attività di ricerca oncologica presso Nerviano Medical Sciences (NMS) sono state presentate, unitamente ad alcuni recenti risultati, nell'ambito di un recente convegno organizzato dall'Università di Milano.

Durante il VII "Incontro con l'Università, il CNR e l'Industria", organizzato dal Dipartimento di Chimica Organica e Industriale dell'Università di Milano, sono state presentate le attività di ricerca svolte presso Nerviano Medical Sciences Srl (NMS). L'obiettivo principale della presentazione è stato duplice: illustrare l'approccio alla ricerca oncologica, unitamente alle metodologie ed alle piattaforme tecnologiche impiegate, ed evidenziare il ruolo ed il contributo di un ricercatore chimico in tale contesto di Ricerca e Sviluppo (R&D nell'accezione anglosassone). Conseguentemente, la presentazione si è sviluppata in tre parti principali, partendo da una breve descri-

zione della realtà NMS, con alcuni brevi cenni storici, e proseguendo attraverso l'illustrazione del processo di Drug Discovery (DD) e di come esso è sviluppato internamente, per poi concludere con un esempio recente di realizzazione di un progetto di ricerca e dei relativi risultati. La storia di NMS ben rappresenta l'evoluzione della R&D farmaceutica dai primi anni del Novecento, cioè dalla nascita dell'approccio razionale, lo sviluppo e la crescita, fino agli ultimi venti anni, con il tremendo impatto di continue riorganizzazioni, chiusure di centri di ricerca e spostamento di notevoli investimenti verso i mercati di Paesi emergenti.

Questo contributo è stato presentato alla VII edizione della manifestazione "Incontro con l'Università, il CNR e l'Industria", svoltasi lo scorso febbraio a Milano e avente per tema "Sintesi e metodologie innovative in chimica organica", organizzata dal Dipartimento di Chimica Organica e Industriale dell'Università di Milano.

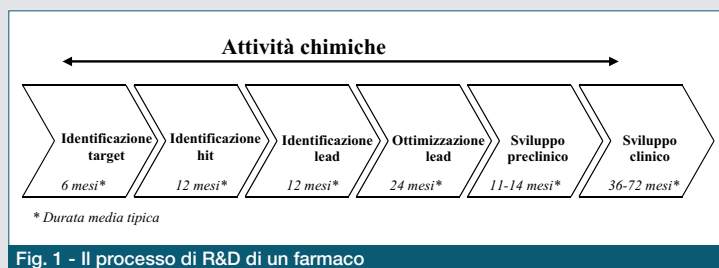


Fig. 1 - Il processo di R&D di un farmaco

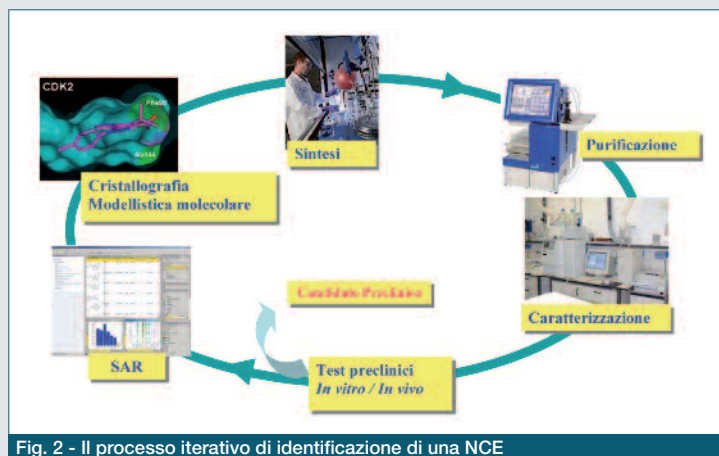


Fig. 2 - Il processo iterativo di identificazione di una NCE

Il Centro R&D di NMS, situato a Nerviano, un piccolo centro vicino Milano, è il più grande centro di ricerca farmaceutica italiano ed uno dei maggiori siti di ricerca oncologica in Europa. L'azienda ha origini ben lontane nel tempo e, nella seconda metà del secolo scorso, Farmitalia Carlo Erba ha fornito un fondamentale contributo alla ricerca di nuovi farmaci antitumorali, alcuni dei quali sono tuttora utilizzati, come doxorubicina ed examestano.

Dopo un'importante serie di fusioni ed acquisizioni, il sito è divenuto proprietà di Pfizer e da questa, a seguito di un'ulteriore riorganizzazione, è infine nata Nerviano Medical Sciences Srl nel 2004. La missione di NMS è scoprire e sviluppare farmaci innovativi per il trattamento delle patologie oncologiche, sfruttando sia le competenze e le piattaforme tecnologiche proprietarie sia attraverso collaborazioni con altre aziende biotecnologiche del settore e la comunità scientifica internazionale e nazionale.

Il processo di ricerca per l'identificazione e lo sviluppo di nuovi farmaci in NMS segue una strategia comune ad altri gruppi, è molto complesso, come rappresentato nella Fig. 1, ed è normalmente suddiviso in fasi che caratterizzano lo stato di avanzamento, le tecnologie e le competenze scientifiche coinvolte. Ogni fase è svolta mediamente nei tempi riportati nella figura; tipicamente, l'intero processo si svolge su un arco temporale superiore a 10 anni e comporta investimenti elevati (un farmaco che raggiunge il mercato richiede investimenti superiori al miliardo di euro).

Uno degli aspetti rilevanti dell'intero processo è l'identificazione e caratterizzazione di nuove entità chimiche (New Chemical Entity, NCE) che caratterizzano la definizione della proprietà intellettuale

attraverso il deposito di domande di brevetto specifiche. Durante il processo di drug discovery, sono impegnate molte e diverse professionalità, fra i quali fisici, chimici, biologi, informatici, medici ecc. In tale ambito, un ricercatore con competenze chimiche contribuisce a diverse fasi del processo (Fig. 2). Nell'ambito della ricerca in campo oncologico, che è di specifico interesse di Nerviano Medical Sciences, il chimico strutturista, con esperienza d'enzimologia e chimica delle proteine, contribuisce alla determinazione della struttura delle proteine di interesse e della loro interazione con specifici leganti a basso peso molecolare. I risultati di tale attività, unitamente a quelli derivanti dallo screening biologico ad alta capacità, portano all'identificazione di un certo numero di composti dotati di una minima attività biologica (definiti "hit") che sono poi utilizzati dal chimico computazionale e dal chimico medicinale per l'elaborazione della strategia sintetica per l'identificazione di una molecola, o classe di molecole, dotate sia dell'attività biologica sia del minimo profilo di tossicità desiderati (molecola/classe "lead").

Questa fase comporta sia la sintesi di molecole singole sia la preparazione di librerie chimiche mediante tecniche di sintesi parallela e/o combinatoriale. In seguito, il chimico medicinale, di concerto con i ricercatori di altre discipline (biologia, tossicologia, farmacocinetica ecc.) definisce ed implementa la strategia sintetica per trasformare il "lead" in quello che sarà poi il principio attivo di un nuovo farmaco (processo di "Lead Optimisation"). In questa fase il chimico medicinale dovrà anche identificare un processo sintetico per il principio attivo che sia affidabile e riproducibile per permetterne la preparazione su scala di qualche decina di grammi. Tale processo sarà poi ottimizzato dal chimico di processo al fine di renderlo industrialmente compatibile per preparazione su scala di produzione (da qualche decina di chili fino a 1.000 kg, in dipendenza dell'attività e della natura della sostanza).

Le attività di sintesi sono ovviamente monitorate, in tutte le fasi, con le varie tecniche analitiche, sia direttamente dal chimico medicinale sia da specialisti in chimica analitica (NMR, MS, HPLC e relative tecniche combinate). Tali tecniche sono d'uso comune anche in ambito farmacocinetico e, infatti, molti dei ricercatori afferenti a tale disciplina hanno un background chimico. Infine, è importante evidenziare che la gestione informatica dei dati originati dalle varie attività sperimentali è spesso affidata a chimici che hanno sviluppato una specifica esperienza in ambito chemo- e bioinformatico.

Da un punto di vista tecnologico, le attività di ricerca in NMS impiegano le tecnologie più moderne specifiche per varie aree. In ambito chimico, sono particolarmente rilevanti le tecnologie applicate alla sintesi combinatoriale/parallela, che permettono la sintesi di librerie di dimensione variabile (fino ad un massimo di 2.000 composti, tipicamente su scala di 5 mg, ciascuno caratterizzato in termini di identità e purezza) sia in fase solida che liquida.

Le tecnologie informatiche trovano applicazioni in tutte le fasi di ricerca e di particolare rilievo sono la gestione e l'elaborazione dei risulta-

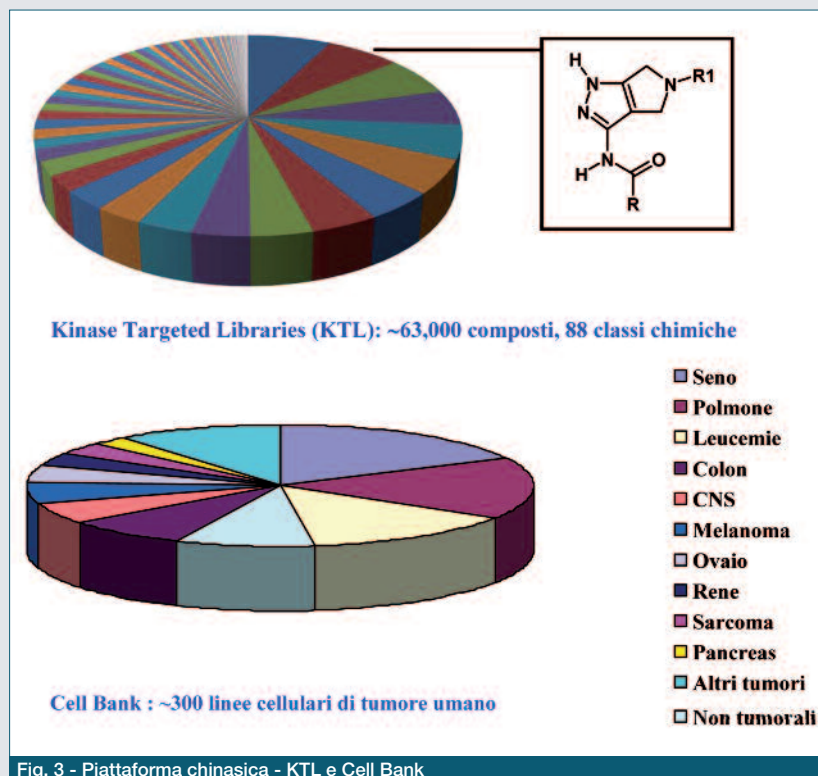


Fig. 3 - Piattaforma chinasica - KTL e Cell Bank

ti sperimentali, la definizione delle correlazioni di struttura-attività, il disegno razionale di librerie virtuali ed il modeling basato sui dati derivanti dalla chimica strutturistica. Quest'ultima è particolarmente rilevante nella comprensione della struttura tridimensionale delle proteine e delle loro interazioni con opportuni leganti. In NMS, esiste una forte e consolidata capacità per quanto riguarda l'isolamento e la purificazione delle proteine, la loro cristallizzazione (in assenza o presenza di leganti) e la determinazione strutturale mediante raggi X; NMS ha fino ad oggi ottenuto (e solo in parte pubblicato) più di 400 strutture cristallografiche di proteine, in maggior parte chinasi.

La disponibilità di dati strutturali ottenuti per cristallografia a raggi X è inoltre un importante complemento alle tecnologie di screening di frammenti (Fragment-Based Drug Discovery, FBDD), dove si vanno a studiare composti a basso peso molecolare (inferiore a 300 Da) e le loro deboli interazioni con un target proteico. Nello screening di frammenti, è molto importante anche la risonanza magnetica nucleare (NMR) ad alta frequenza; NMS ha sviluppato alcune metodologie fondamentali in questo campo [1] e le ha applicate, in combinazione con la cristallografia a raggi X per l'individuazione di nuovi hit.

L'utilizzo combinato di varie tecnologie (screening, disegno razionale di librerie chimiche, chimica strutturistica ecc.) e l'interesse specifico di NMS per le chinasi come target preferenziali per il trattamento di molte patologie tumorali, ha portato allo sviluppo di una piattaforma proprietaria integrata denominata Piattaforma Chinasica (Kinase Platform, KP). L'obiettivo principale nello sviluppo di questa piattaforma è stato quello di disegnare e sintetizzare un'ampia collezione di com-

posti (circa 63.000 composti costituenti la Kinase-Targeted Library, KTL, Fig. 3) caratterizzati da elevata probabilità di potersi legare al sito attivo di una chinasi, tenendo conto che tutte le chinasi condividono un unico legante naturale, l'ATP, e presentano quindi un'elevata omologia del relativo sito di legame. L'utilizzo di questa collezione specializzata permette normalmente di avere nello screening una probabilità di successo di 10-100 volte superiore a quello tipicamente ottenuto in un HTS di una collezione non-specializzata (unbiased random collection).

L'utilizzo di saggi biochimici di formato diverso in funzione del tipo di chinasi investigata, unitamente alla disponibilità di un'ampia collezione di linee cellulari derivanti da tumori umani (circa 300 linee sono disponibili presso NMS, Fig. 3) hanno permesso di caratterizzare molti dei composti appartenenti alla piattaforma chinasi per quanto riguarda la loro attività enzimatica su un ampio pannello di chinasi (Kinase Selectivity Screening, KSS) e la loro capacità di inibire la proliferazione di linee cellulari tumorali umane (per esempio, circa 15.000 composti sono stati testati su linea di tumore ovarico A2780). L'insieme di questi dati è quindi utilizzato nel processo decisionale per la prioritizzazione degli hit originati nelle campagne di screening di nuove chinasi e per la definizione delle strategie di espansione delle relative serie chimiche e la conseguente ottimizzazione.

Durante il Convegno, l'utilizzo della Piattaforma Chinasica è stato brevemente illustrato con un esempio di progetto di ricerca condotto presso NMS e relativo all'identificazione di un inibitore della chinasi MPS1 (MonoPolar Spindle 1), una proteina a doppia specificità (promuove la fosforilazione di serine e treonine) che è attivata durante il processo di mitosi cellulare ed è sovra-espressa in alcune forme di tumori, ad esempio nella prostata e nel colon [2].

In particolare, MPS1 interviene nella regolazione dell'allineamento e della segregazione dei cromosomi durante la formazione del fuso mitotico. L'inibizione di MPS1 genera l'accelerazione incontrollata del processo mitotico nelle cellule tumorali, che a sua volta determina un'errata segregazione dei cromosomi ed una conseguente aneuploidia associata con la morte cellulare.

L'identificazione di un inibitore selettivo di MPS1 può pertanto costituire un nuovo approccio nel trattamento di alcune patologie tumorali.

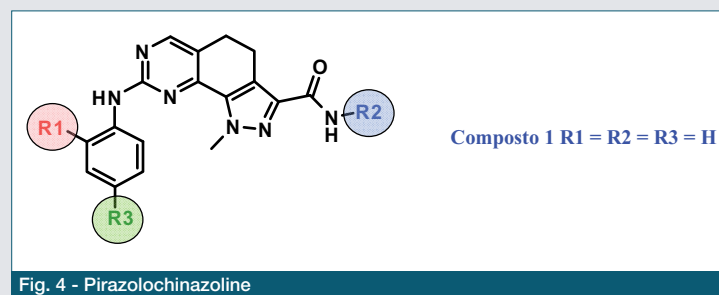


Fig. 4 - Pirazolochinazoline

li. Al momento in cui il progetto ha avuto inizio in NMS, non erano noti inibitori selettivi di MPS1 a basso peso molecolare (e fino ad oggi, non sono disponibili trattamenti terapeutici basati su questo meccanismo); pertanto la nostra ricerca ha utilizzato inizialmente uno screening ad alta capacità, dal quale sono emersi una serie di hit, tra i quali, sulla base dei dati contenuti nella nostra piattaforma, è stata identificata una serie di 4,5-diidropirazolo[4,3-*h*]chinazoline (Fig. 4) [3]. Questa serie di composti era già emersa in precedenza come dotata di attività nei confronti di altre chinasi, con profilo di selettività altamente dipendente dai vari sostituenti del

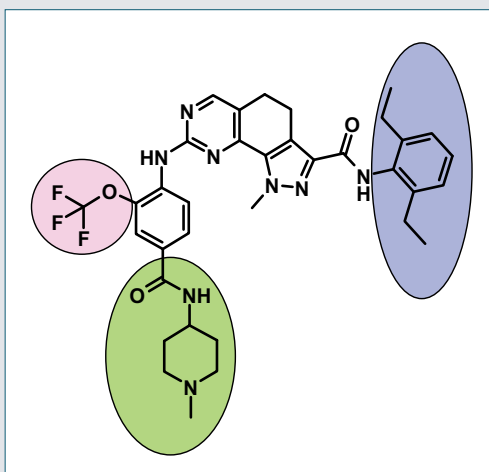


Fig. 5 - NMS-P715

nucleo centrale. In particolare, il composto capostipite 1 (Fig. 4) risulta dotato di buona attività sia a livello enzimatico ($IC_{50} = 0,500 \mu M$) sia a livello cellulare ($IC_{50} = 0,500 \mu M$ nei confronti di una linea di tumore ovarico, A2780) ed è stato quindi considerato un valido punto di partenza per un programma di chimica medicinale, con l'obiettivo di ottimizzare la serie chimica ed identificare un candidato preclinico avente il profilo di un farmaco somministrabile per via orale. La strategia di ottimizzazione è stata focalizzata sulla modifica dei sostituenti R1, R2 ed R3 in modo indipendente ed andando a valutare l'impatto di tali modifiche sul profilo di affinità per MPS1 e la selettività, nei confronti di un pannello esteso di altre chinasi, e sul profilo chimico-fisico delle molecole ottenute, con particolare attenzione alla loro solubilità (il composto 1 ha infatti scarsa selettività e risulta poco solubile).

Attraverso l'applicazione di schemi sintetici diversi, in base alla natura dei sostituenti desiderati, è stato possibile preparare un'ampia serie di composti e di selezionare i migliori sostituenti per le singole posizioni. L'opportuna combinazione di tali sostituenti e le informazioni ottenute dalla cristallografia a raggi X, hanno poi permesso di ottenere un ristretto numero di composti, che sono stati sottoposti a test più approfonditi, volti anche a valutarne il meccanismo di azione in cellula, il profilo metabolico e l'efficacia in modelli sperimentali di tumore. Questo processo di ottimizzazione ha portato all'identificazione di NMS-P715 (Fig. 5) un composto dotato di un valido profilo farmacologico ($IC_{50} = 0,182 \mu M$ contro MPS1 e $IC_{50} > 10 \mu M$ nei confronti di altre chinasi quali, ad esempio, Aurora, CDK2 e PLK1) e da un ottimo profilo farmacocinetico (il profilo PK in topo dopo sommini-

strazione a 10 mg/kg, sia per via iniettiva sia per via orale, è caratterizzato da bassa clearance, buona esposizione orale ed una biodisponibilità di circa 38%). Inoltre, attraverso la cristallografia a raggi X, è stato possibile dimostrare che NMS-P715 si lega al dominio catalitico di MPS1 (sito di legame dell'ATP) attraverso interazioni fondamentali con alcuni residui di amminoacidi, quali C604, G605 e N606 [4].

Sulla base di queste caratteristiche, NMS-P715 è stato selezionato per alcuni studi di efficacia in un modello sperimentale di tumore ovarico in topo. Il composto, somministrato per via orale alla dose di 90 mg/kg per 7

giorni ha mostrato, a fine trattamento, il 53% di inibizione della crescita della massa tumorale. Questo risultato ha dimostrato, per la prima volta, che l'inibizione della chinasi MPS1 si riflette nell'inibizione della crescita tumorale in modelli *in vivo*, confermando la validità del target molecolare nella identificazione di nuovi farmaci antitumorali. NMS-P715 costituisce un primo valido prototipo di questo tipo di farmaci e la ricerca prosegue con l'obiettivo di individuare un prodotto dotato di maggiore efficacia e tale da progredire nello sviluppo pre-clinico e clinico. Questo risultato ha altresì dimostrato la validità ed il valore della Piattaforma Chinasica di NMS per l'individuazione di meccanismi e farmaci innovativi nella terapia antitumorale.

Ringraziamenti: Il contenuto di questo articolo rappresenta un'estrema sintesi delle attività di NMS e dei risultati importanti di molti colleghi a cui va il mio sentito ringraziamento per il loro contributo nel tempo. Con particolare riferimento all'elaborazione del testo ed ai dati qui riportati, desidero ringraziare Marina Caldarelli, Riccardo Colombo, Eduard Felder e Arturo Galvani.

Bibliografia

- [1] C. Dalvit *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2002, **45**, 2610.
- [2] A. Musacchio, E.D. Salmon, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 2007, **8**, 379.
- [3] R. Colombo *et al.*, *Cancer Res.*, 2010, **190**, 89
- [4] M. Caldarelli *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2011, 4507.

ABSTRACT

The Oncology Research at Nerviano Medical Sciences (NMS)

The strategy, research activities and some recent results of Nerviano Medical Sciences (NMS) an oncology-focused, integrated research and development Company, based in Nerviano, have been presented at a recent symposia organized by the University of Milan.