



Alberto Dal Corso
Dipartimento di Chimica
Università Degli Studi Di Milano
alberto.dalcorso@unimi.it

CHEMIOTERAPIA A BERSAGLIO MOLECOLARE

Trattamenti anticancro innovativi consistono nella coniugazione covalente di agenti citotossici a specifici veicoli (anticorpi, peptidi, ecc.) in grado di legarsi selettivamente ad antigeni tumorali. Mentre alcuni di questi coniugati sono già disponibili sul mercato, le attività di ricerca in campo chimico mirano al loro progressivo miglioramento, a partire da ogni componente strutturale.

Nell'immaginario collettivo, il termine *chemioterapia* viene associato ad una fase molto critica della vita di un malato di cancro. Spesso questa fase si svolge in tempi lunghi, scandita dal susseguirsi di diversi "cicli di chemio" e i cui effetti si manifestano sia sull'aspetto fisico che psicologico del paziente. Il ricorso frequente a questo trattamento si deve al fatto che, a seconda del tipo di tumore, del suo grado di avanzamento e delle condizioni generali del paziente, i farmaci chemioterapici possono rallentare o fermare la crescita della massa tumorale, fino a ridurre le dimensioni e agevolare la rimozione chirurgica. In alcuni casi, il trattamento farmacologico può addirittura portare ad una definitiva eliminazione della malattia o evitarne la ricomparsa nel paziente dopo un'apparente guarigione. Dal punto di vista farmacologico, la chemioterapia antineoplastica consiste nell'uso di agenti citotossici, capaci di uccidere le cellule tumorali durante il loro processo di replicazione. Molte di queste tossine sono state studiate come antitumorali sin dalla metà del secolo scorso, ma ancora oggi la loro somministrazione sistemica non esercita un'azione selettiva contro il tumore e colpisce anche cellule e organi sani in cui questi farmaci si accumulano. I pesanti effetti collaterali che ne derivano allungano i tempi di terapia e limitano fortemente l'efficacia del trattamento farmacologico, in quanto implicano l'abbassamento delle dosi al paziente e l'uso di diverse combinazioni di farmaci con profili complementari di attività e tossicità. Negli ultimi decenni sono state sviluppate tecno-

logie in grado di aumentare la selettività dell'azione citotossica dei farmaci antitumorali. In genere, il meccanismo di azione di questi nuovi preparati può essere descritto efficacemente con il concetto di "Cavallo di Troia", ossia la creazione di un veicolo in grado di mascherare l'azione di un agente citotossico e di rilasciarlo solo nel sito d'interesse terapeutico. Spesso il farmaco viene coniugato al veicolo (*carrier*) tramite un legame covalente ed è farmacologicamente attivo solo quando questo legame (*linker*) viene tagliato. Oltre alle caratteristiche strutturali e terapeutiche del principio attivo da modificare e coniugare, la scelta del tipo di *carrier* e *linker*, nonché il design del costrutto finale mirano allo sfruttamento alcuni tratti caratteristici del tumore (i cosiddetti **hallmarks of cancer**), come il metabolismo cellulare alterato, la sovra-espressione o la mutazione di recettori e altre proteine ecc. Attualmente, la più avanzata fra queste tecnologie è quella dei coniugati anticorpo-farmaco (Antibody-Drug Conjugates, ADC, Fig. 1A), che veicolano farmaci nel tumore sfruttando la capacità di specifici anticorpi monoclonali di riconoscere e legare un determinato recettore tumorale con elevata affinità e selettività. Il tipico meccanismo di azione degli ADC prevede il riconoscimento da parte dell'anticorpo di recettori espressi sulla membrana di cellule tumorali e la successiva internalizzazione del coniugato (endocitosi recettore-mediata). La rottura del linker avviene tipicamente all'interno della cellula tumorale per effetto di specifici enzimi, come la cathepsina B o la β -glucuronidasi. Studi in

Al dott. Alberto Dal Corso la Divisione di Chimica Organica ha conferito il Premio Junior 2019 "Chimica Organica per le Scienze della Vita".

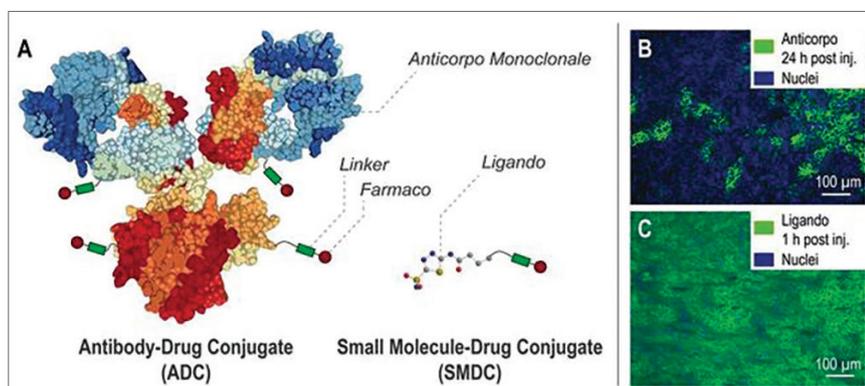


Fig. 1 - A) Rappresentazione delle strutture di ADC e SMDC per il rilascio di agenti citotossici. A destra, analisi mediante microscopia a fluorescenza di sezioni di tessuto di carcinoma a cellule renali (cellule SKRC52, nuclei colorati in blu) in modello murino *ex vivo*, a seguito della somministrazione di un anticorpo monoclonale (B) e di un ligando fluorescente (C), in grado di riconoscere lo stesso recettore tumorale (anidrasi carbonica 9). Le dimensioni ridotte del ligando portano ad una rapida fuoriuscita dai vasi sanguigni (extravasazione) e ad una diffusione nella massa tumorale molto più omogenea rispetto all'anticorpo, che viene bloccato dalle cellule a ridosso dei vasi, portando ad una diffusione nel tumore "a macchie" (adattato da [2], copyright © 2018 American Chemical Society)

vivo hanno dimostrato che il meccanismo di endocitosi non è fondamentale per la rottura del *linker*, in quanto gli enzimi coinvolti possono essere rilasciati in regioni extracellulari da cellule morte ed accumularsi nella massa tumorale [1]. Inoltre, per impedire che la vicinanza del farmaco antitumorale al punto di rottura del *linker* blocchi l'azione enzimatica, vengono spesso inseriti degli appositi spaziatori tra il *linker* e il farmaco, che vengono definiti "self-immolative spacer", in quanto sono in grado di degradarsi spontaneamente e rilasciare il farmaco in forma attiva. Oltre ai sette diversi ADC già disponibili sul mercato per il trattamento di alcuni tipi di leucemie, linfomi e tumori solidi (sottoclassi di tumori a mammella e vescica), circa un centinaio di questi costrutti sono attualmente in fase di studio clinico. Il successo degli ADC ha confermato le potenzialità terapeutiche della veicolazione tumore-specifica di agenti citotossici e ha portato allo sviluppo di nuove tecnologie per il riconoscimento di recettori tumorali. In particolare, alcuni di questi recettori sono stati studiati come bersagli per ligandi più piccoli dei tradizionali anticorpi, come peptidi e piccole molecole organiche, le cui strutture chimiche possono essere opportunamente modificate per la coniugazione e il rilascio selettivo di farmaci nel sito tumorale. Questi nuovi coniugati (Small Molecule-Drug Conjugates, SMDC, Fig. 1A) hanno un peso molecolare molto minore rispetto agli

ADC (2-3 kDa contro i circa 150 kDa degli ADC) e, al contrario di anticorpi e farmaci biologici, possono essere prodotti interamente con metodologie di sintesi e purificazione tipiche delle piccole molecole organiche, agevolando le fasi di sviluppo industriale. Inoltre, le piccole dimensioni degli SMDC influiscono notevolmente sulle proprietà farmacocinetiche del coniugato, portando, ad esempio, ad una diminuzione dei tempi di emivita rispetto ad un ADC e ad una rapida eliminazione per via renale.

Le immagini di Fig. 1B e 1C mostrano come gli SMDC siano in grado di raggiungere il sito patologico più rapidamente degli ADC e di diffondere

in modo omogeneo all'interno della massa tumorale [2]. Questi dati evidenziano come ADC e SMDC siano due tecnologie molto diverse, sebbene entrambe costituite dall'unione di più moduli (veicolo, *linker*, *spacer* e farmaco, Fig. 2A). La ricerca preclinica in questo settore vede il forte contributo di competenze chimico-sintetiche e biotecnologiche, concentrate in larga parte sull'ottimizzazione di ogni singolo modulo ai fini di un miglioramento generale delle performance terapeutiche dell'intero coniugato. Per esempio, la tecnologia SMDC potrebbe essere sostanzialmente avanzata dallo sviluppo di piccole molecole in grado di legare recettori tumorali con affinità molto elevata (come avviene nel riconoscimento antigene-anticorpo), che permetta una lunga permanenza del costrutto SMDC nel tumore e massimizzi il rilascio del farmaco nel sito patologico. A questo proposito, un'interessante tematica di ricerca prevede lo sviluppo di ligandi in grado di creare **interazioni covalenti** con la proteina bersaglio. Ad esempio, questa può presentare in alcuni casi dei residui amminoacidici nucleofili, situati in prossimità della tasca dove avviene l'interazione ligando-proteina (Fig. 2B). È stato recentemente verificato che la modifica del ligando con gruppi funzionali elettrofili può portare ad un sensibile aumento dell'affinità di legame, risultante dalla sinergia tra l'affinità intrinseca del ligando per la proteina bersaglio e la com-

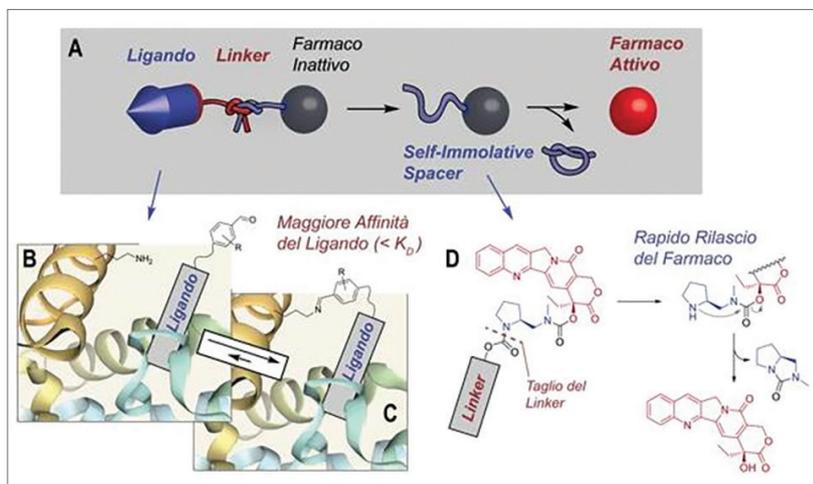
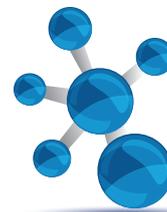


Fig. 2 - Rappresentazione schematica del meccanismo di rilascio di farmaci da parte di coniugati covalenti (A, rottura del *linker* e degradazione del *self-immolative spacer*) con esempi di recenti sviluppi strutturali per l'aumento di affinità di un ligando per il suo recettore (B, C formazione di legami covalenti reversibili con la proteina bersaglio [3]) o per aumentare la velocità di degradazione del *self-immolative spacer* (D, *spacer* diamminico derivato dalla prolina [5])

ponente del legame covalente formato tra il gruppo elettrofilo e la proteina (Fig. 2C) [3].

Altri progressi delle tecnologie di ADC e SMDC hanno recentemente riguardato la sintesi e l'indagine di nuovi farmaci che, oltre alla forte citotossicità, presentino caratteristiche particolarmente funzionali all'attività terapeutica, come la stimolazione del sistema immunitario a contribuire alla neutralizzazione del tumore (si parla in questo caso di “**immunogenic cell death**”) o la capacità di esercitare un'azione citotossica nei confronti di diversi tipi di cellule tumorali, indipendentemente dalla loro espressione della proteina bersaglio (il cosiddetto effetto di “**by-stander killing**”). Inoltre, lo sviluppo di nuovi *linker* è attualmente una tematica di grande interesse sia in ambito industriale che accademico ed è mirata ad un rilascio del farmaco sempre più efficace e controllato. Per esempio, sono stati recentemente sviluppati nuovi tipi di *linker* in cui il legame covalente con il farmaco viene tagliato a seguito dell'irradiazione con luce ultravioletta o nel vicino infrarosso, il che apre ad interessanti applicazioni terapeutiche nel caso di tumori visibili e superficiali, come quelli della pelle [4]. Inoltre, i progressi nel campo dei *linker* sono strettamente connessi allo sviluppo di nuovi *self-immolative spacer* che, come menzionato sopra, permettono connessioni *linker*-farmaco versatili, con una progressiva riduzione dei vincoli di compatibilità

tra gruppi funzionali. Il nostro gruppo ha recentemente lavorato sulla struttura dei *self-immolative spacer* per le connessioni di *linker* a gruppi ossidrilici presenti su farmaci. In particolare, è stato sviluppato un nuovo *spacer* che si connette al farmaco mediante un legame carbammato molto stabile, ma che viene rapidamente degradato dall'attacco intramolecolare di un gruppo amminico generato dalla rottura del *linker*, dando luogo alla formazione di un'urea ciclica e alla liberazione del gruppo ossidrilico del farmaco (Fig. 2D) [5].

In conclusione, lo sviluppo di coniugati covalenti per il rilascio selettivo di farmaci è un settore di ricerca molto ampio, la cui validità concettuale è già stata certificata a livello clinico e che potrà essere

ulteriormente migliorato in futuro, attraverso la sinergia di competenze in diversi ambiti scientifici.

BIBLIOGRAFIA

- [1] a) A. Dal Corso, D. Neri *et al.*, *J. Control. Release*, 2017, **264**, 211; b) A. Dal Corso, S. Cazzamalli, D. Neri, *Innovations for Next-Generation Antibody-Drug Conjugates*, Springer, New York, 2018, 299.
- [2] S. Cazzamalli, A. Dal Corso, D. Neri *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2018, **140**, 1617.
- [3] A. Dal Corso, M. Catalano *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2018, **57**, 17178.
- [4] A. Dal Corso, C. Gennari *et al.*, *Chem. Eur. J.*, 2019, **25**, 14740.
- [5] A. Dal Corso, C. Gennari *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2020, **59**, 4176.

Targeted Delivery of Chemotherapeutics

Emerging therapeutic strategies in oncology consist in the covalent conjugation of cytotoxic agents to specific vehicles (e.g. antibodies, peptides, etc.) capable of selective binding to tumor-associated antigens. While some of these constructs have already gained marketing authorization, chemical research efforts are being made to improve each individual component of their modular structure.