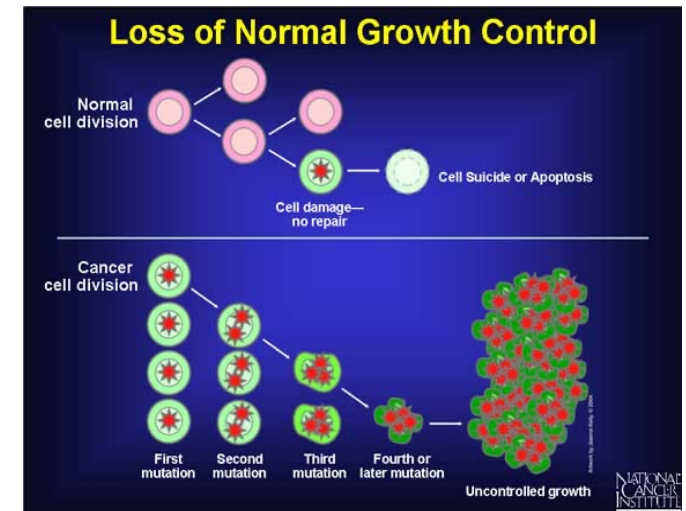
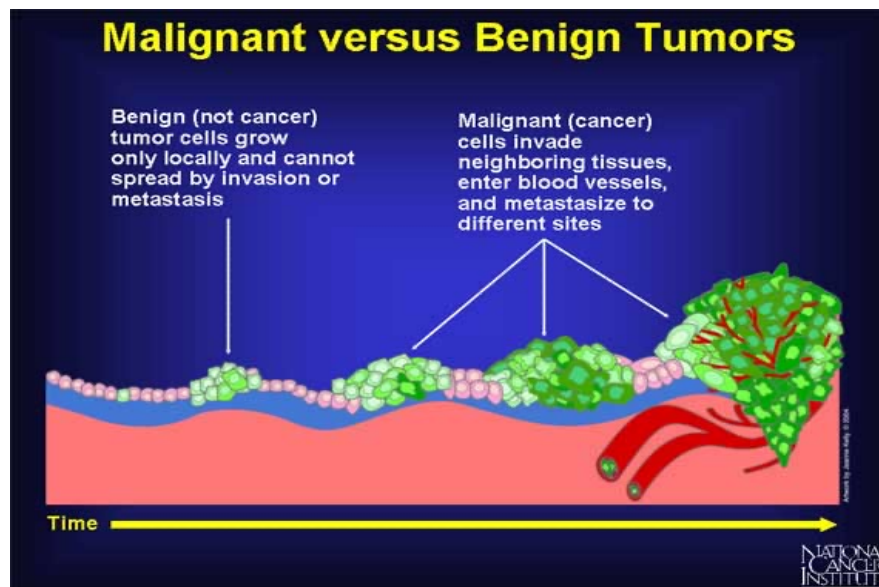


COMPOSTI ANTITUMORALI

Cancro, neoplasia e tumori

Neoplasia

Abnorme proliferazione cellulare
(tumore)



Benigna = non cancerosa

Contorni definiti

Non invasiva

Possibile rimozione chirurgica

Maligna = cancerosa

Contorni non definiti

Invasiva e metastatizzante

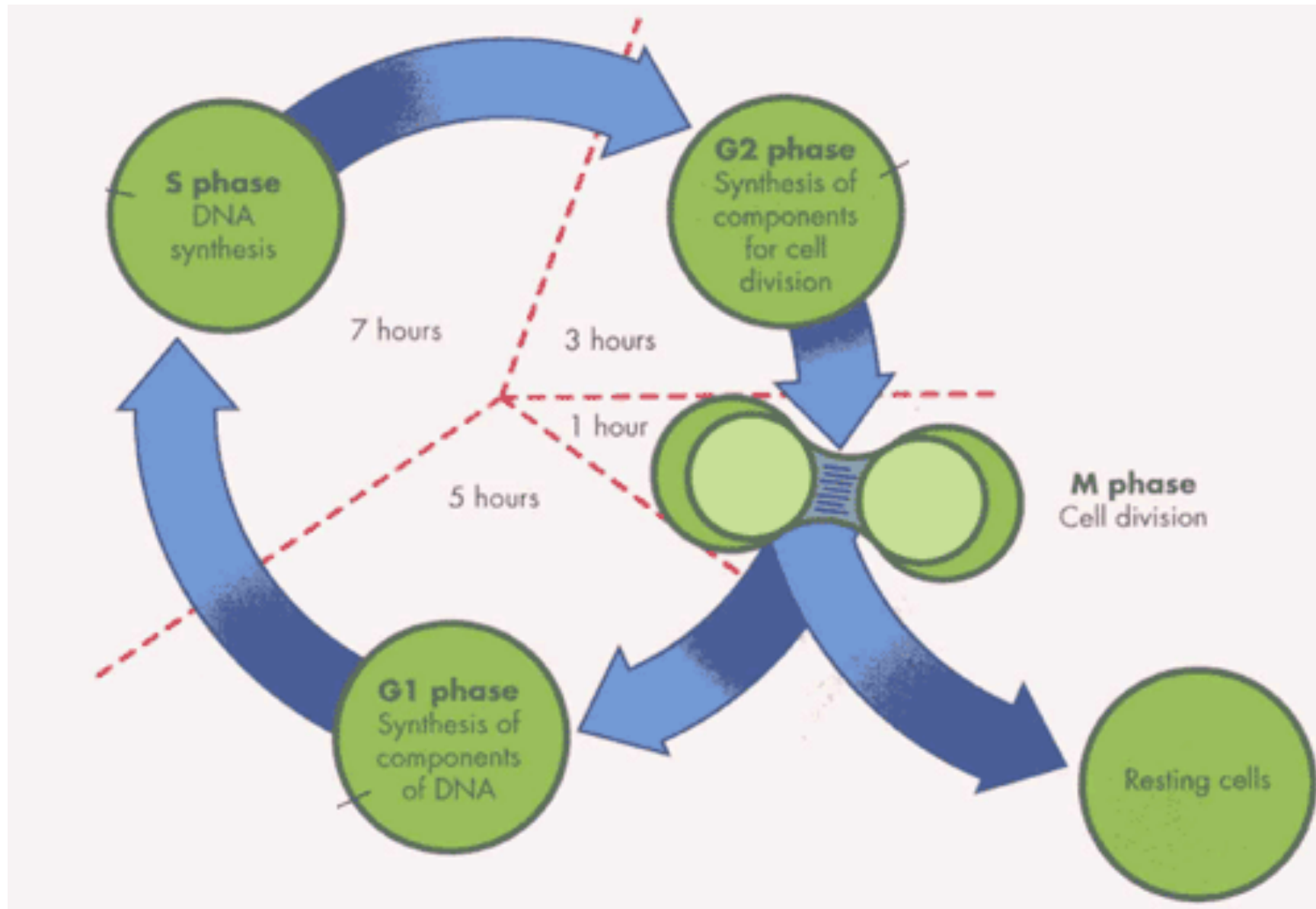
Difficile rimozione chirurgica

Classificazione dei tumori

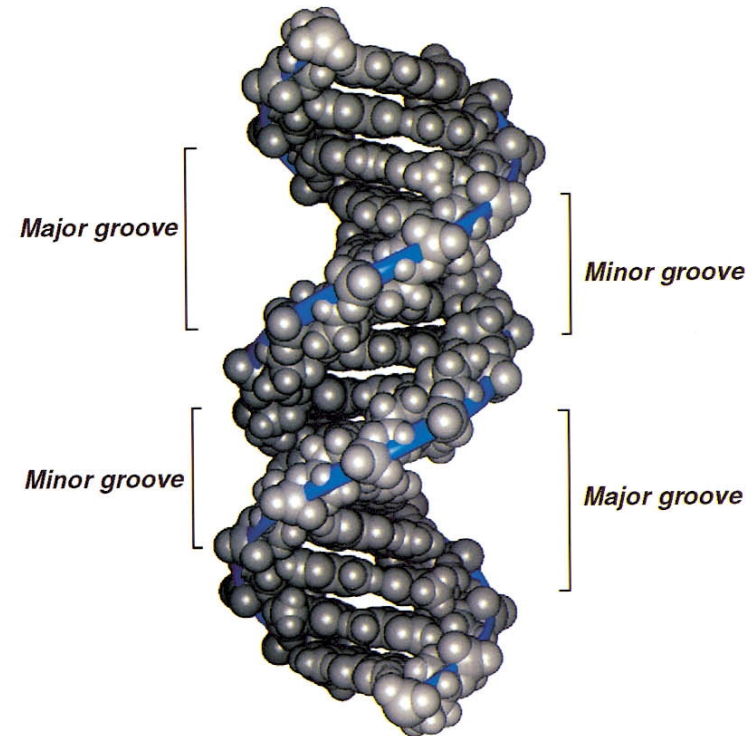
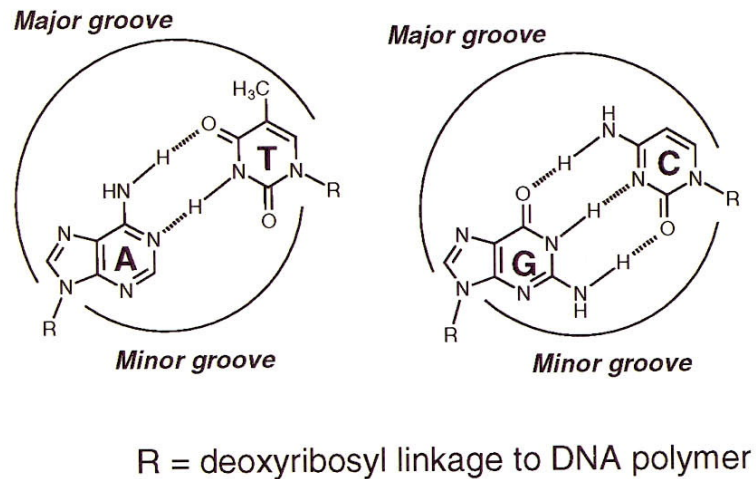
- **Classificazione in base al sito primario**
- **Classificazione istologica**

Tipo	Origine	Esempi
Carcinoma	Tessuto di origine epiteliale	Adenocarcinoma del colon, del polmone, prostata, seno, pancreas, ...; Carcinomi a cellule squamose della pelle, del polmone, del cavo orale,
Sarcoma	Tessuto di origine connettivale	Osteosarcoma, Condrosarcoma, Rabbdomiosarcoma, Leiomioma, Angiosarcoma, Fibrosarcoma, Liposarcoma, Glioma
Mieloma	Plasmacellule del midollo osseo	
Leucemia	Midollo osseo	“Tumori liquidi”: Leucemia granulocitica, linfoblastica, linfatica, eritemia
Linfoma	Nodi o ghiandole del sistema linfatico	Linfomi di Hodgkin Linfomi non-Hodgkin

Ciclo cellulare



Struttura del DNA



Aspetti cruciali per la sopravvivenza cellulare:

- Legami idrogeno (determinano la struttura a doppia elica del DNA)
- Capacità dei due filamenti di separarsi (fondamentale per la replicazione)

Classificazione dei chemioterapici antitumorali

Chemioterapici antitumorali classici

- Agenti alchilanti
- Intercalanti
- Antimetaboliti
- Terminatori di catena
- Inibitori della topoisomerasi
- Antimitotici

Farmaci a bersaglio molecolare (*“Target therapy”*)

Farmaci diretti in modo specifico contro molecole coinvolte nel processo di carcinogenesi (sviluppo o proliferazione)

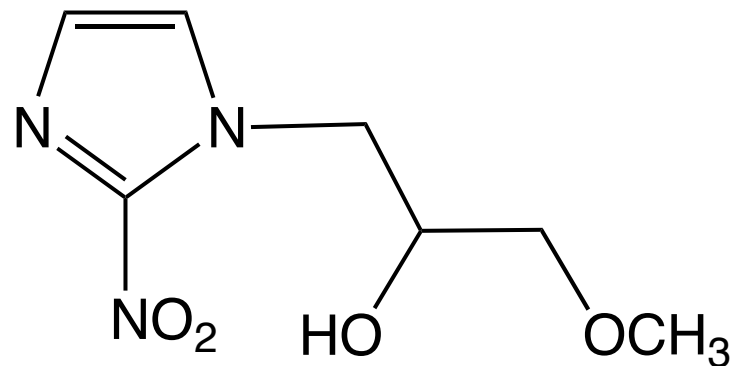
- Anticorpi monoclonali
- Piccole molecole
- Approccio antigene e antisenso

Approcci clinici

- Trattamento chirurgico
- Terapia fotoradiativa: PDT
- Terapia radiante: raggi X o raggi gamma (^{60}Co)
(possibili problemi di insorgenza di tumori causati dalla cura)
- Immunoterapia (specifica e aspecifica, volta a stimolare la risposta immunitaria)
- Chemioterapia antitumorale
- Terapia «biologica» (anticorpi monoclonali)

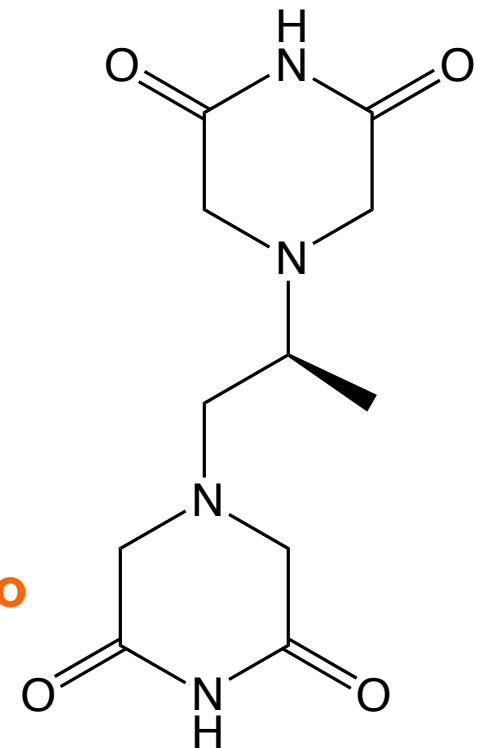
Approcci clinici

- Radiante: raggi X o raggi gamma (^{60}Co)
(anche in questo caso possibili problemi di insorgenza di tumori causati dalla cura)
- Utilizzo di SENSIBILIZZATORI
- Sostanze che potenziano l'effetto delle radiazioni
- Depletori del glutathione intracellulare
- Aumento della radiosensibilità delle cellule



Misonidazolo

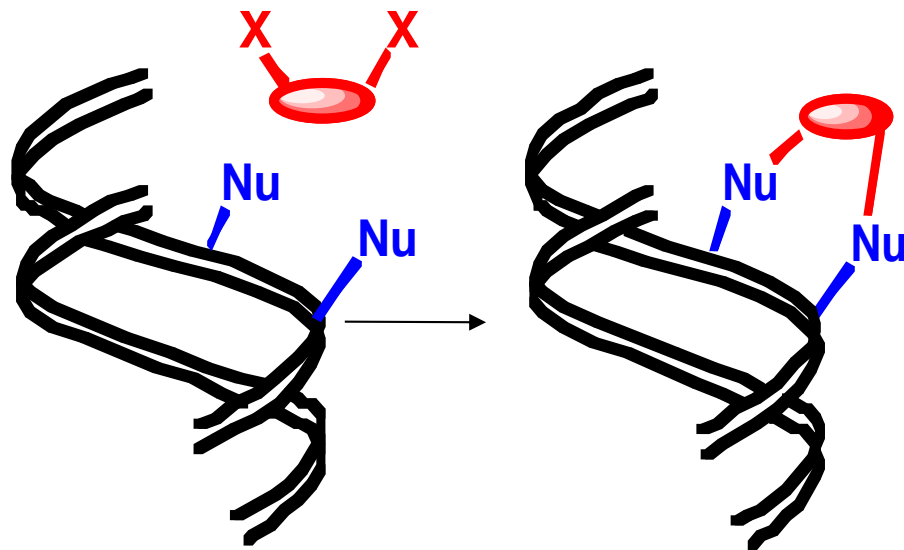
Razoxano



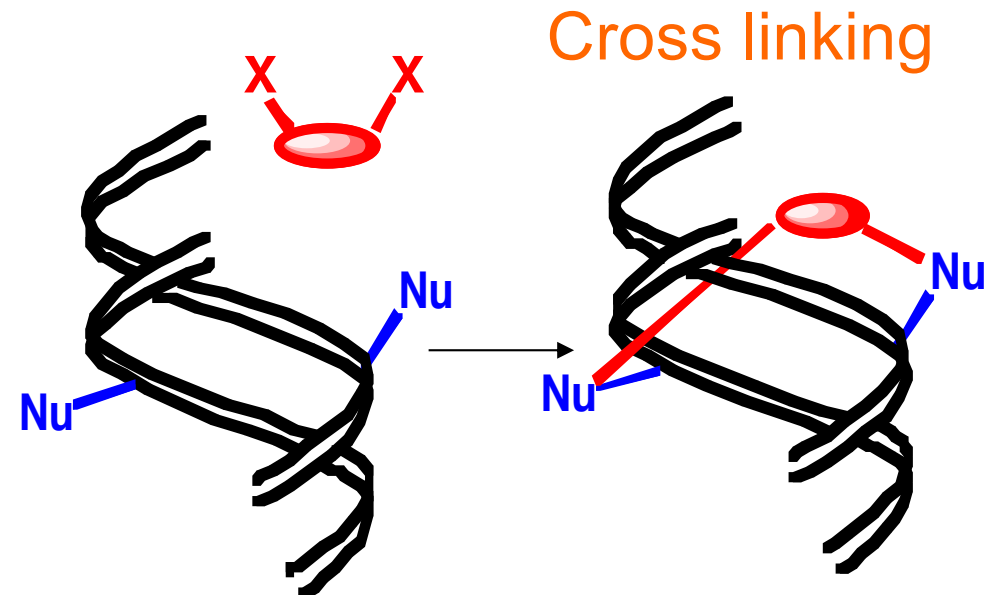
Approcci clinici

- Tumore da 100 g
 - Circa 10^{11} cellule
- Ciclo di chemioterapia antitumorale
 - Distruzione dal 99 al 99.9% delle cellule
 - 10^8 (troppe per essere eliminate dal sistema immunitario)
- SANTUARI FARMACOLOGICI
 - sistema nervoso centrale (barriera emato-encefalica)
 - testicolo (barriera emato-testicolare)
- ASSOCIAZIONE DI FARMACI (protocolli)

Agenti alchilanti

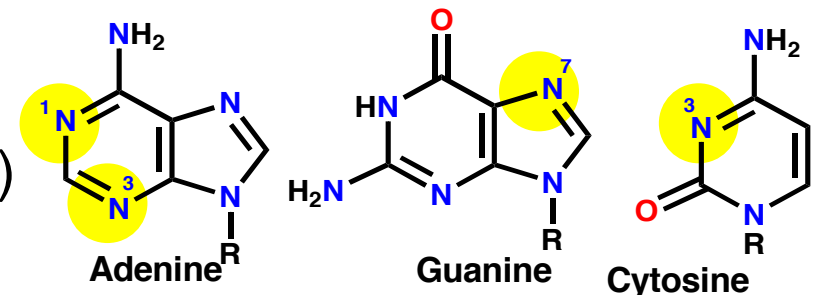


Intrastrand cross linking



Interstrand cross linking

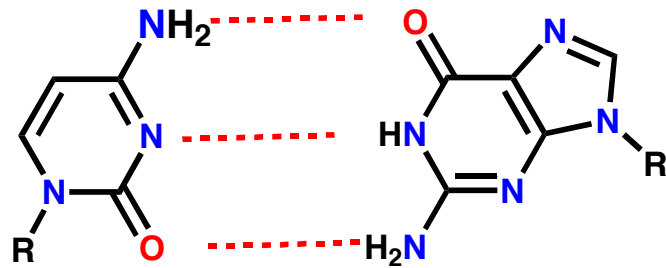
- Gruppi fortemente elettrofili
- Formazione di legami covalenti con i gruppi nucleofili delle basi (e.g. 7-N guanina)
- Blocco replicazione e trascrizione
- Effetti tossici (i.e. alchilazione delle proteine)
- Alchilazione delle basi: possibile miscoding



Miscoding dovuto a basi alchilate

Cytosine

Guanine

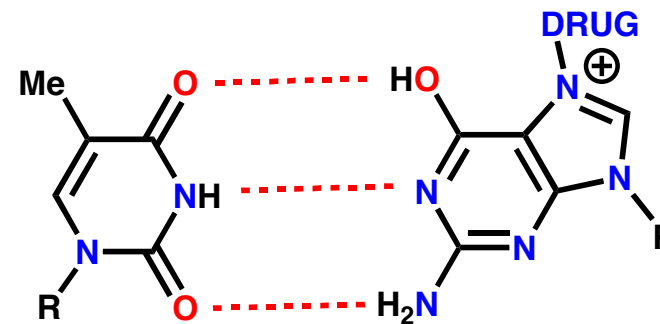


Normal base pairing

Guanina: tautomero chetonico preferito

Thymine

Guanine



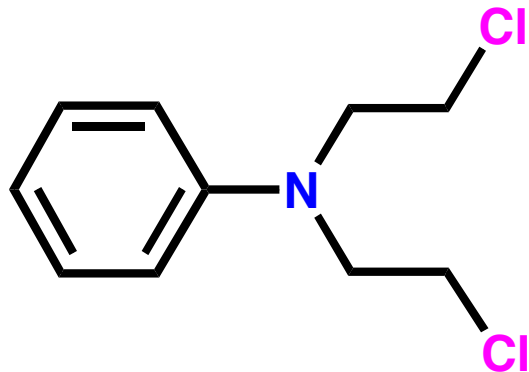
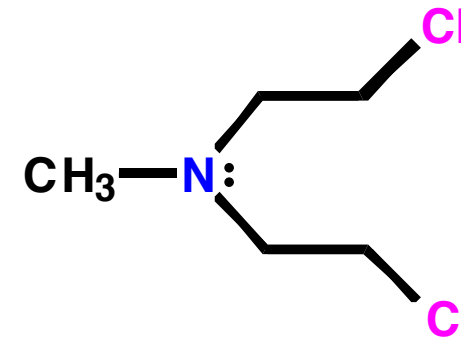
Abnormal base pairing

Guanina alchilata: tautomero enolico preferito

Agenti alchilanti

Mecloretamina

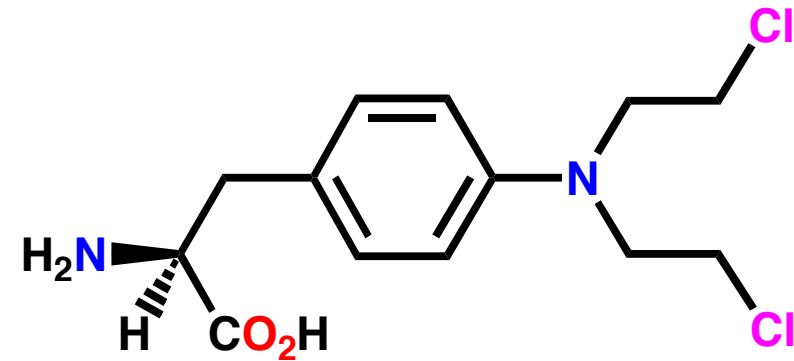
- 1942
- Mostarda azotata
- Cross-linking intrastrand e interstrand
- Blocco replicazione
- Possibile monoalchilazione della G



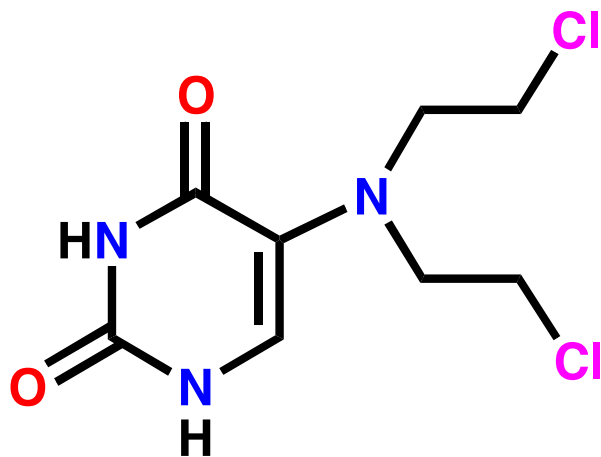
- Anello aromatico elettronattrattore
- Diminuzione del carattere nucleofilo dell'azoto
- Sistemi meno reattivi
- Minore effetti collaterali

Agenti alchilanti

- Anello aromatico
- Sistema meno reattivo
- Mimetica della fenilalanina
- Ingresso nelle cellule mediato da proteine di trasporto



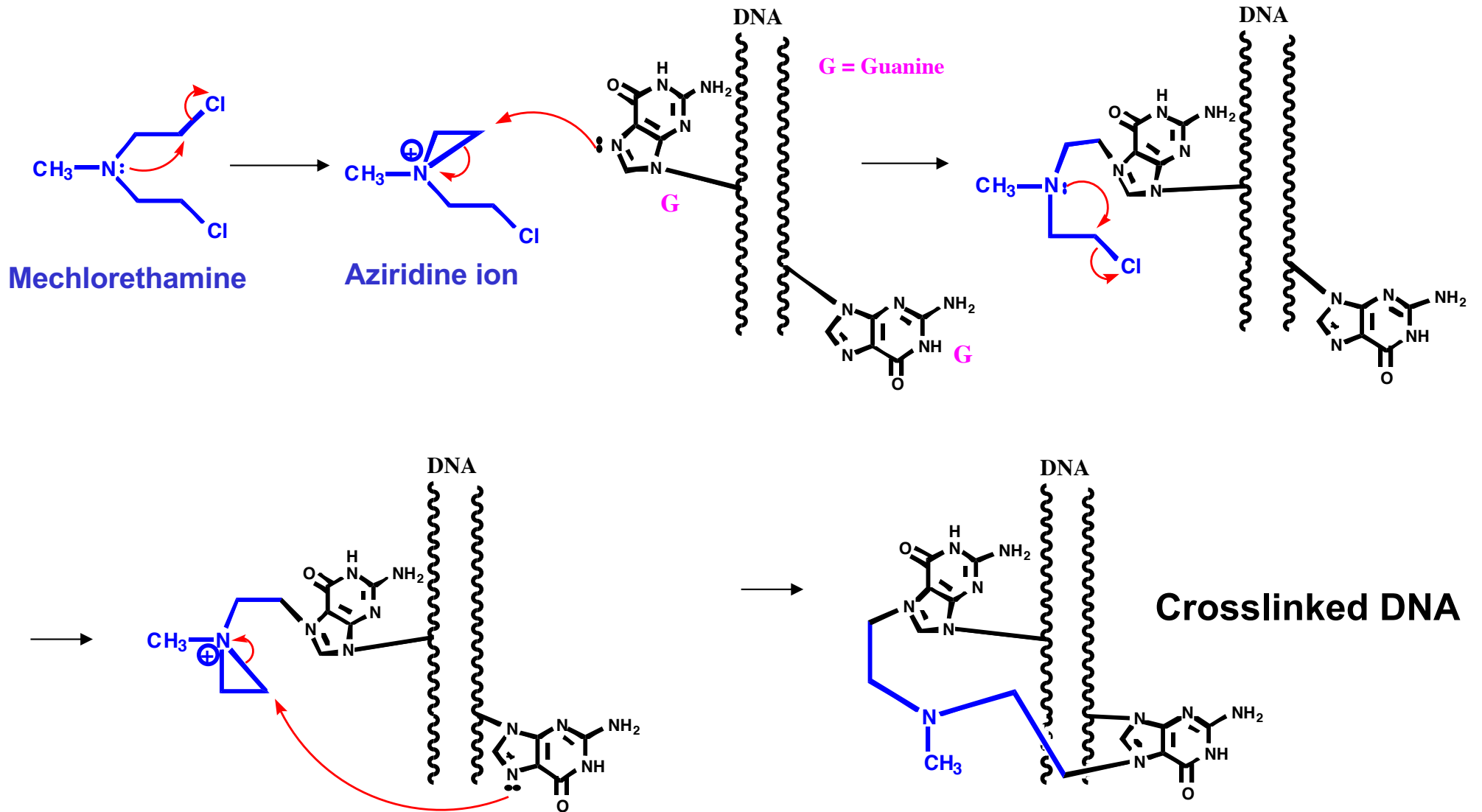
Melphalan



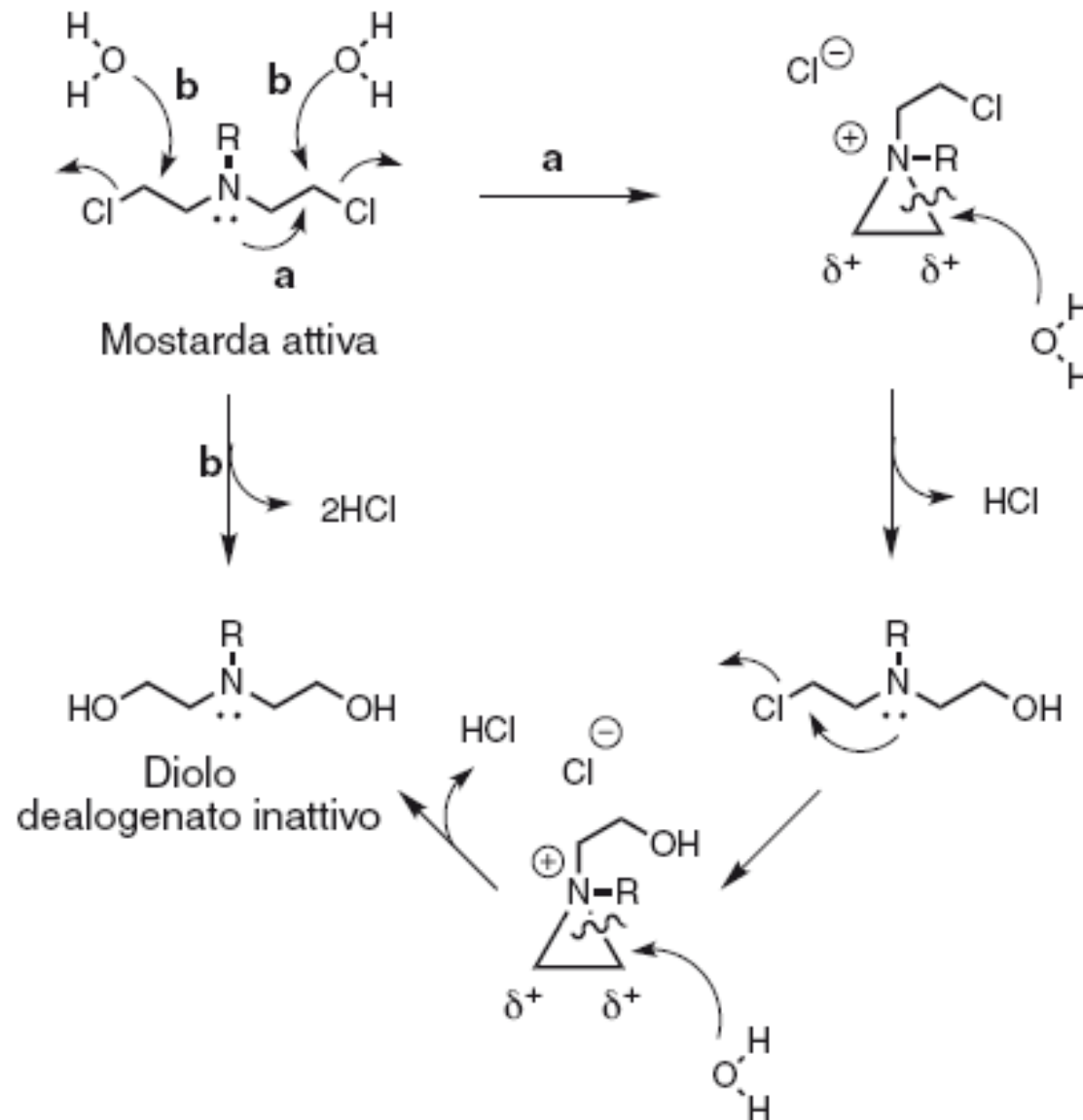
Mostarda uracile

- Anello uracilico elettron-attrattore
- Minore reattività
- Mimetico della base pirimidinica
- Buona concentrazione in cellule attive fase di crescita

Agenti alchilanti

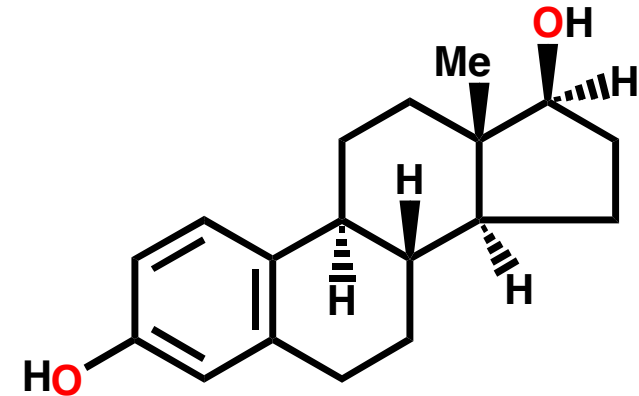
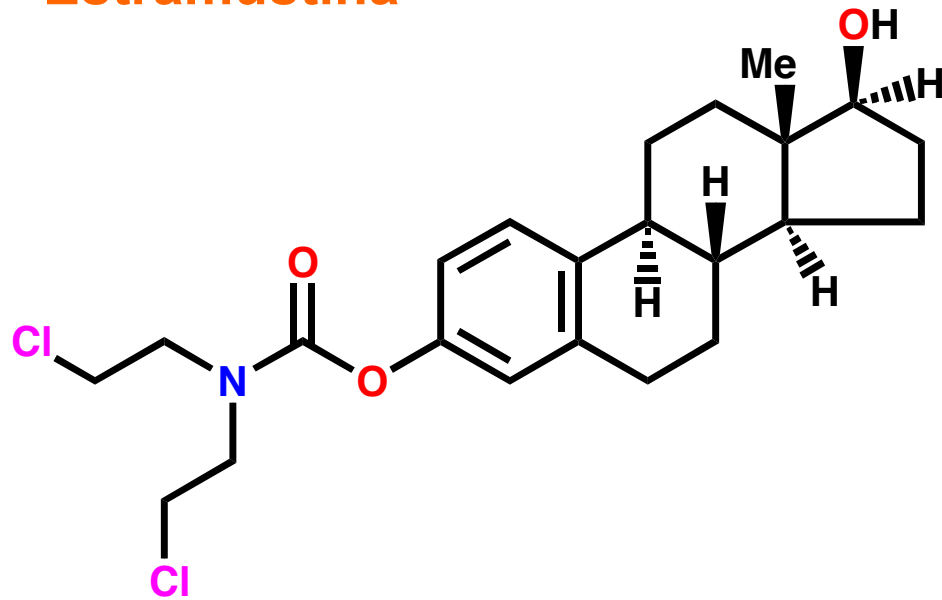


Agenti alchilanti



Agenti alchilanti

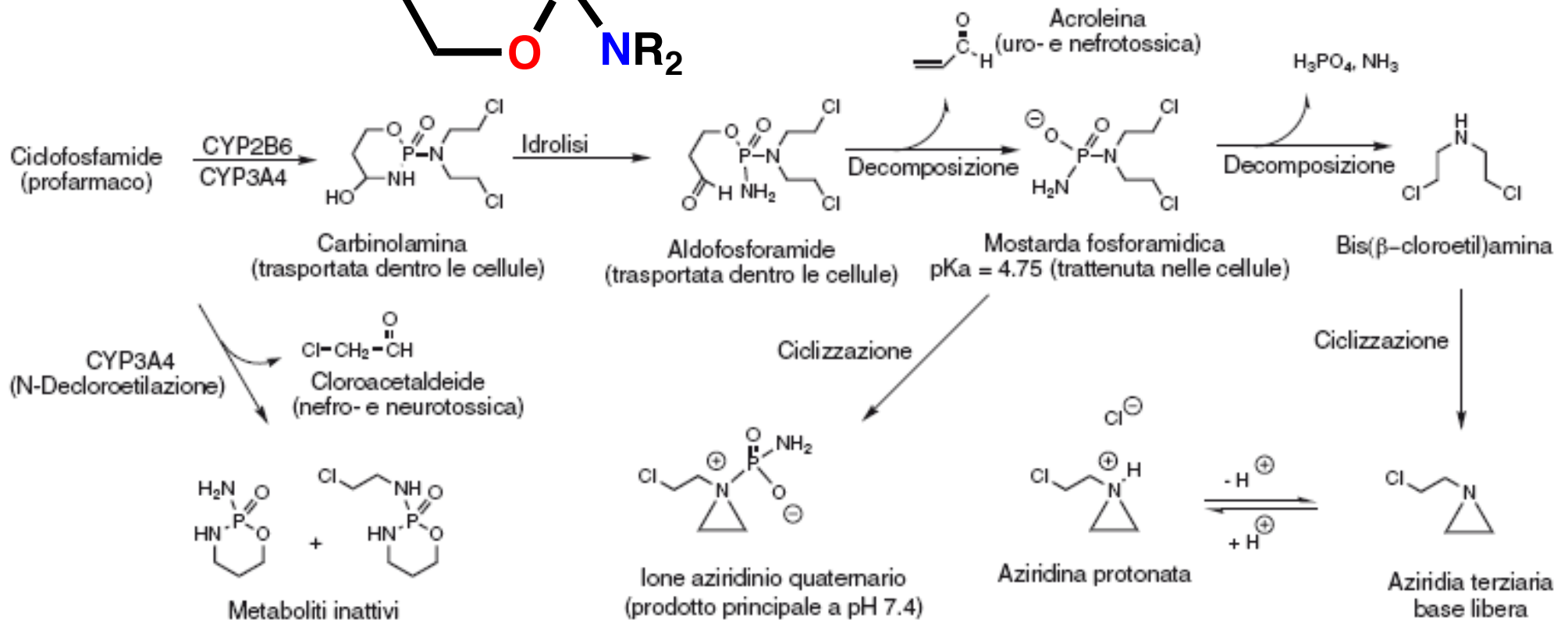
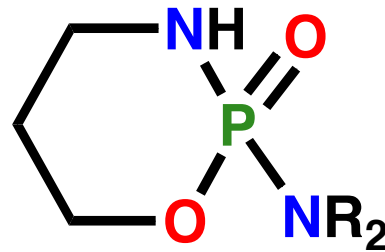
Estramustina



- Uretane: elettron-attrattore
- Diminuzione del carattere nucleofilo dell'azoto
- Estradiolo

Agenti alchilanti

Ciclofosfamide

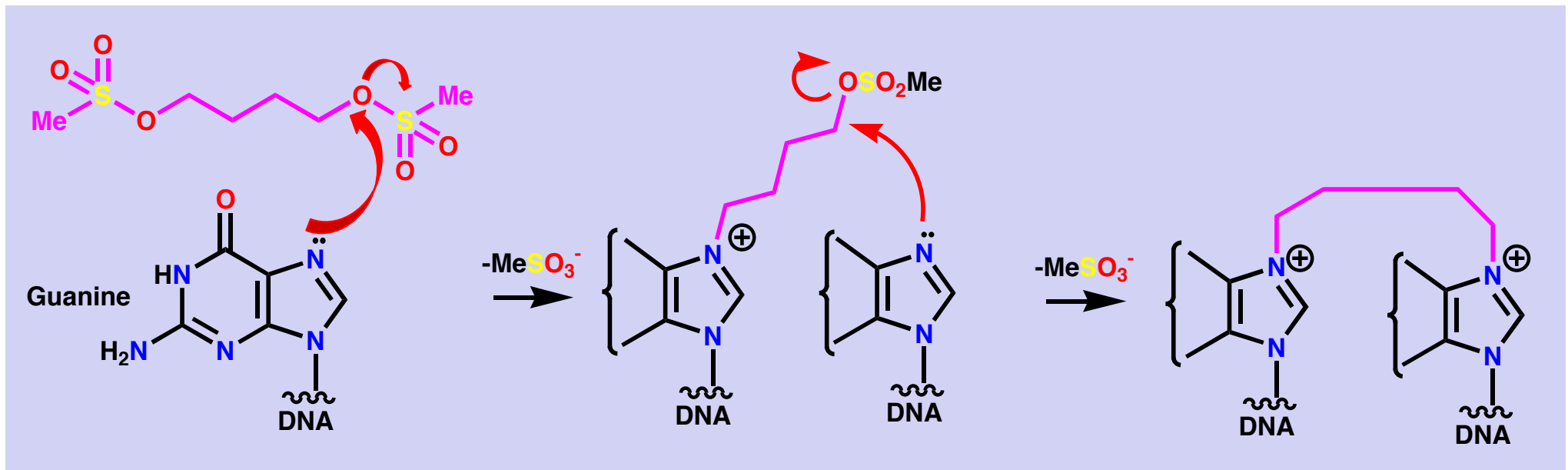
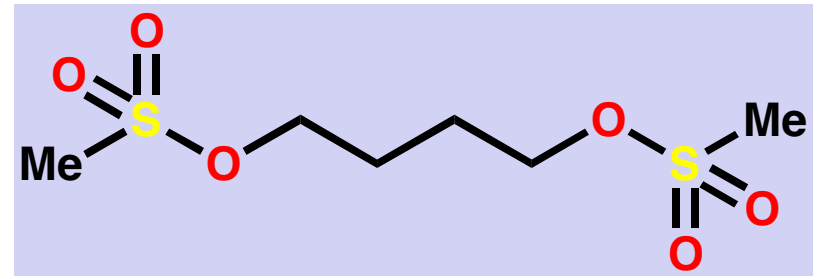


- Agente alchilante molto usato
- Profarmaco non tossico
- Somministrazione orale
- Acroleina: tossicità

Agenti alchilanti

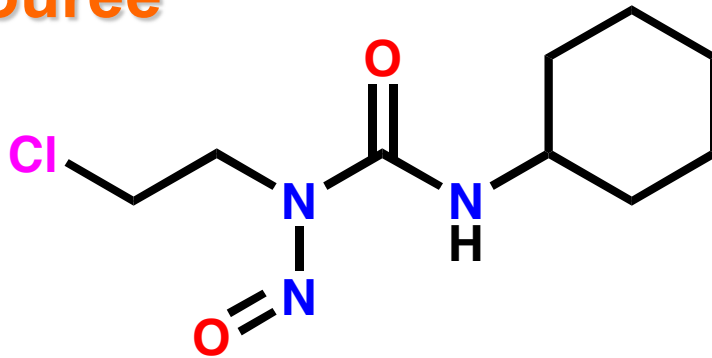
Busulfan

- Interstrand cross-linking

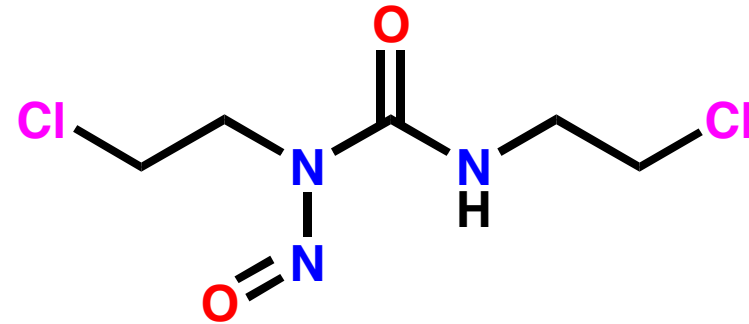


Agenti alchilanti

Nitrosouree

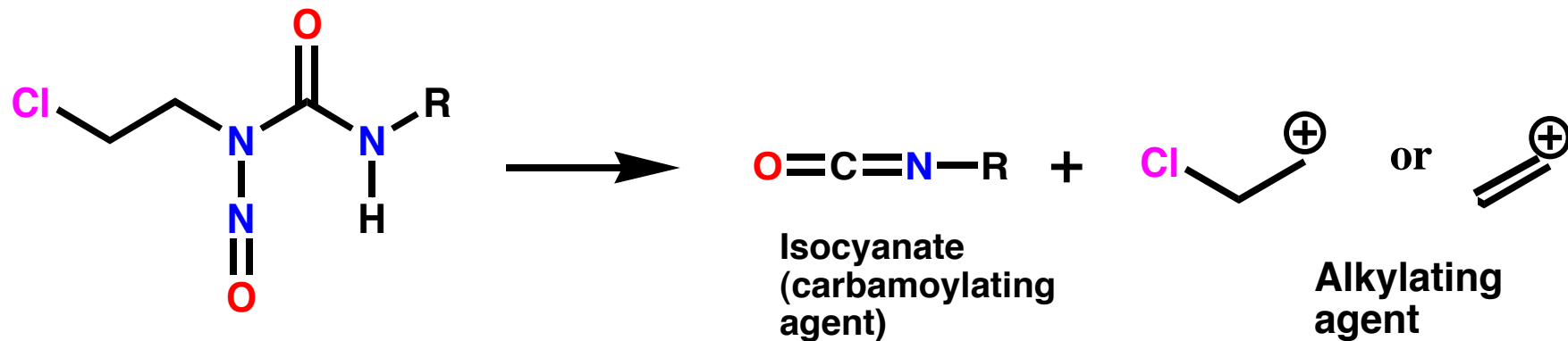


Lomustine



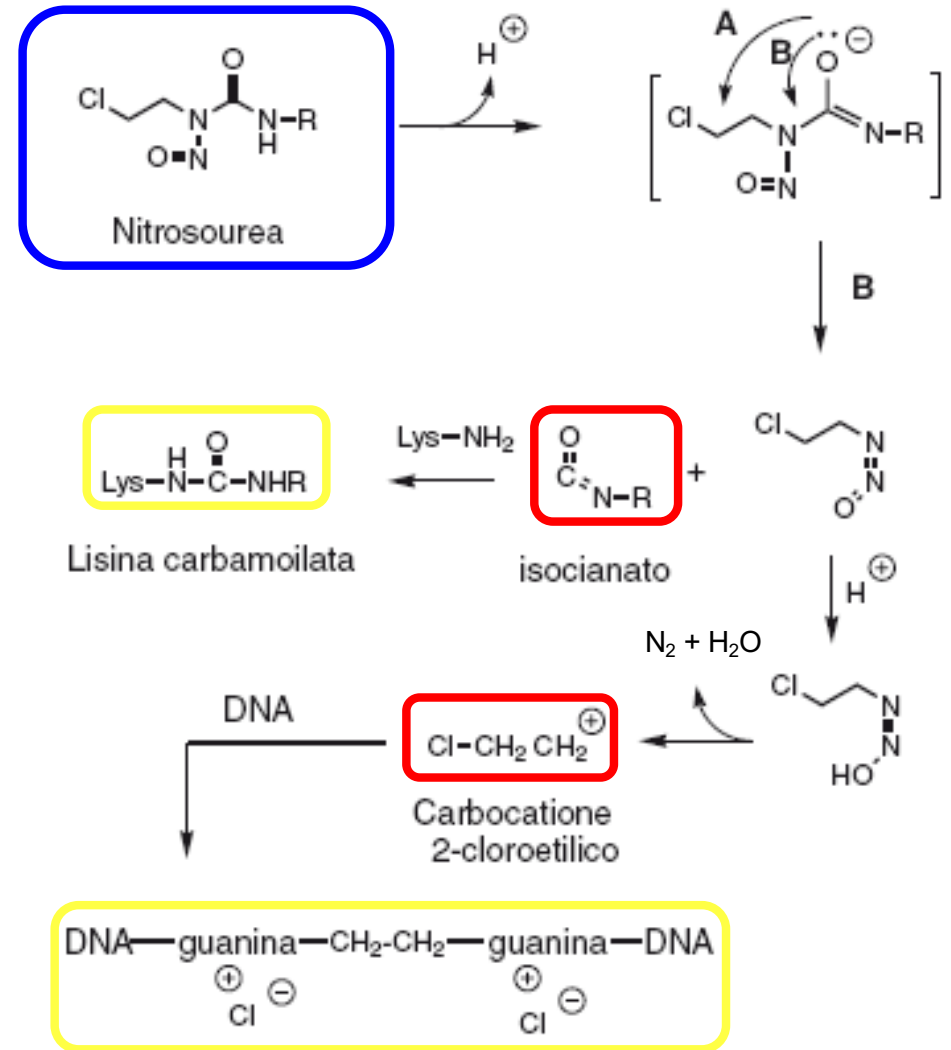
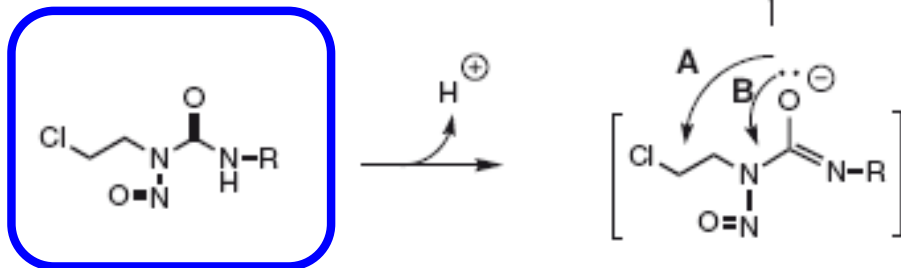
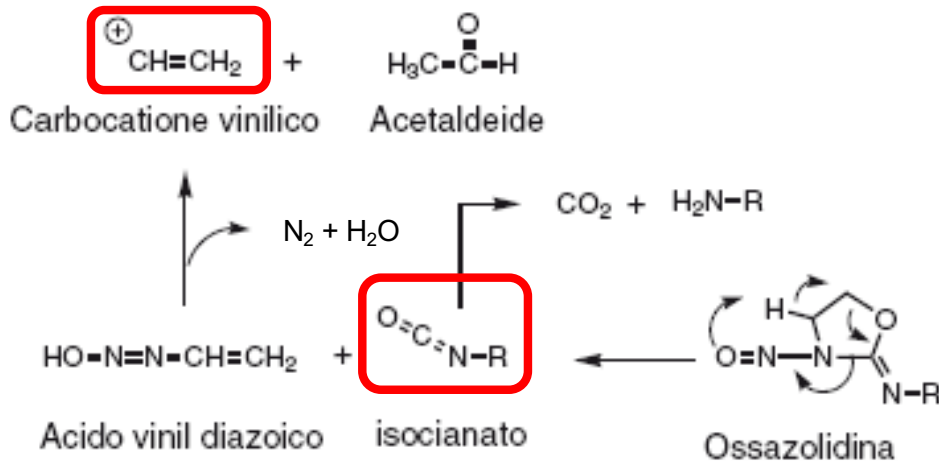
Carmustine

- Decomposizione in vivo
- Formazione di specie alchilanti e carbamoilanti



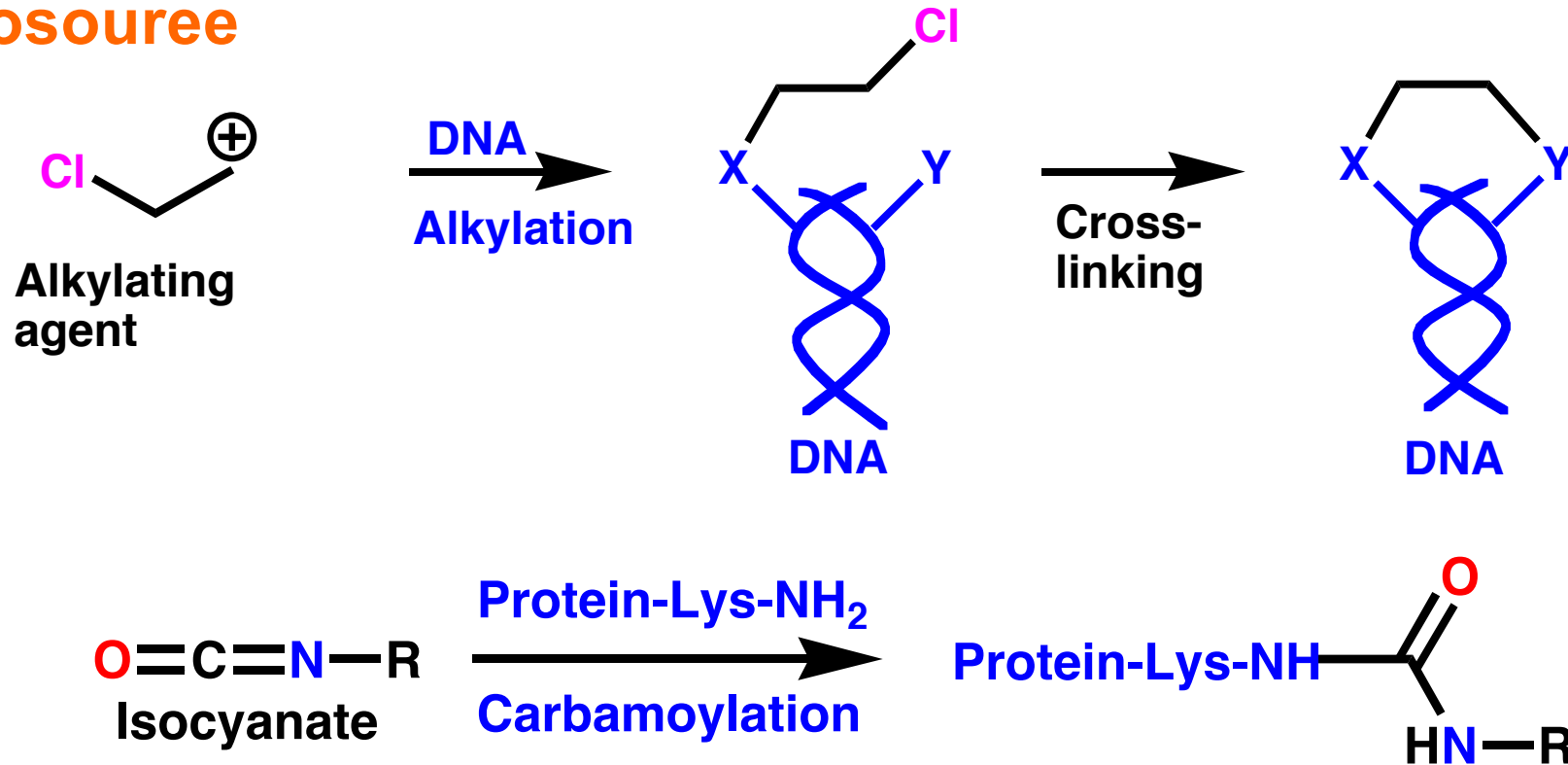
Agenti alchilanti

Nitrosouree



Agenti alchilanti

Nitrosouree

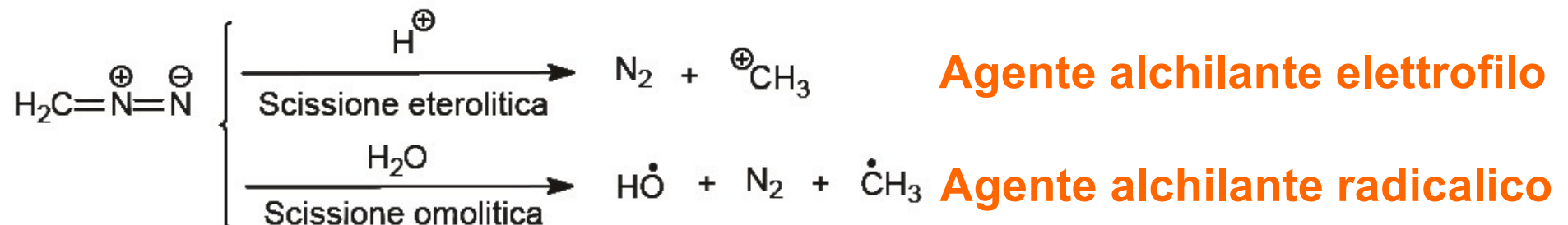
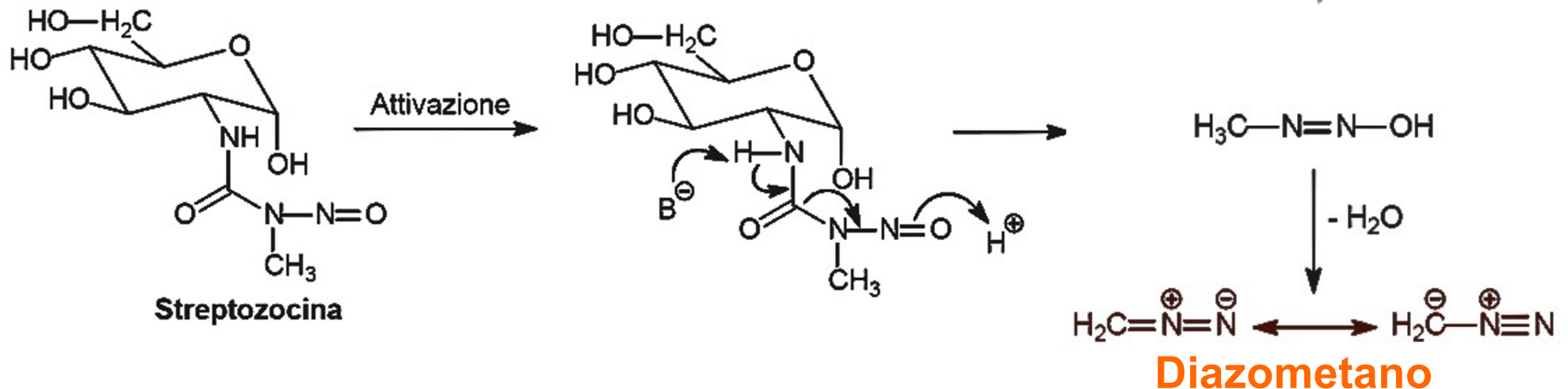
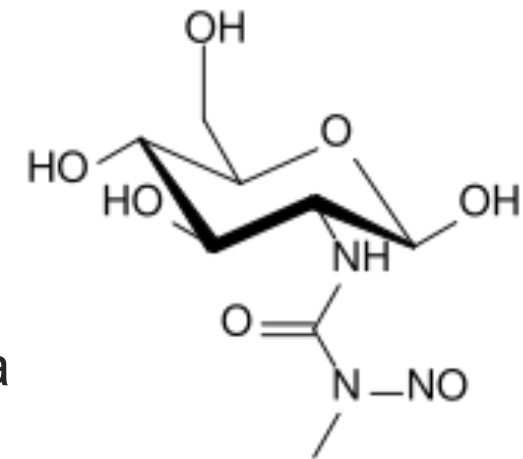


- Cross-linking inter-strand
- Cross linking tra G-G o G-C
- Carbamoilazione (lisine)
- Possibile inattivazione degli enzimi di riparazione del DNA

Agenti alchilanti

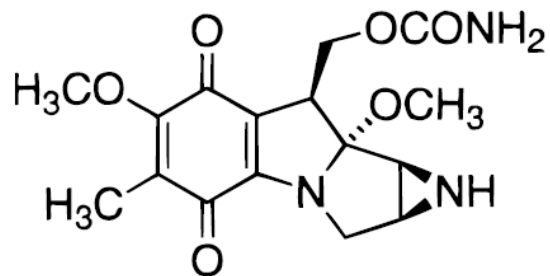
Nitrosouree

- **Streptozocina**
- Origine naturale
Streptomyces achromogenes
- Somministrazione endovenosa

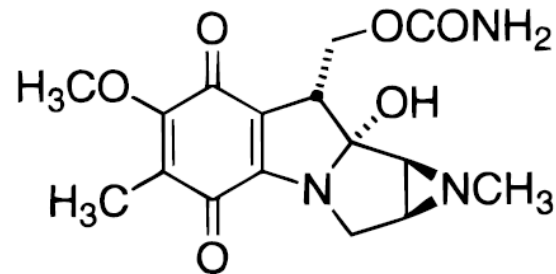


Agenti alchilanti

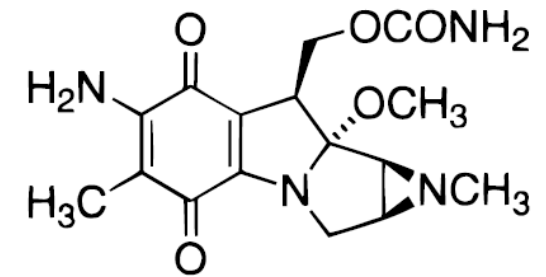
Mitomicina



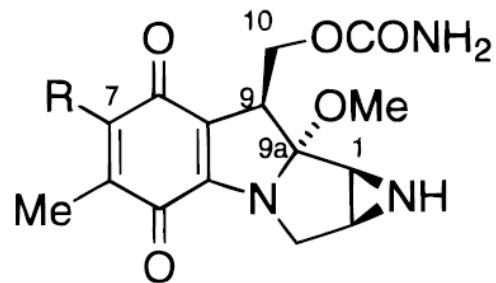
Mitomycin A



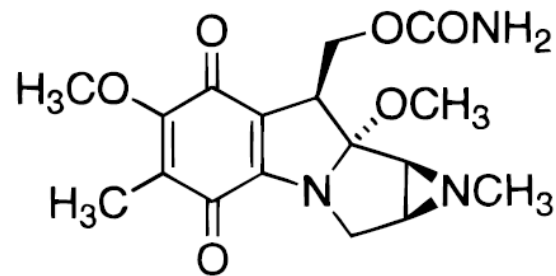
Mitomycin B



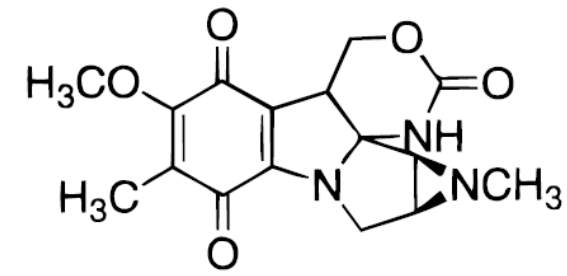
Porfiromycin



Mitomycin C



N-methylmitomycin A



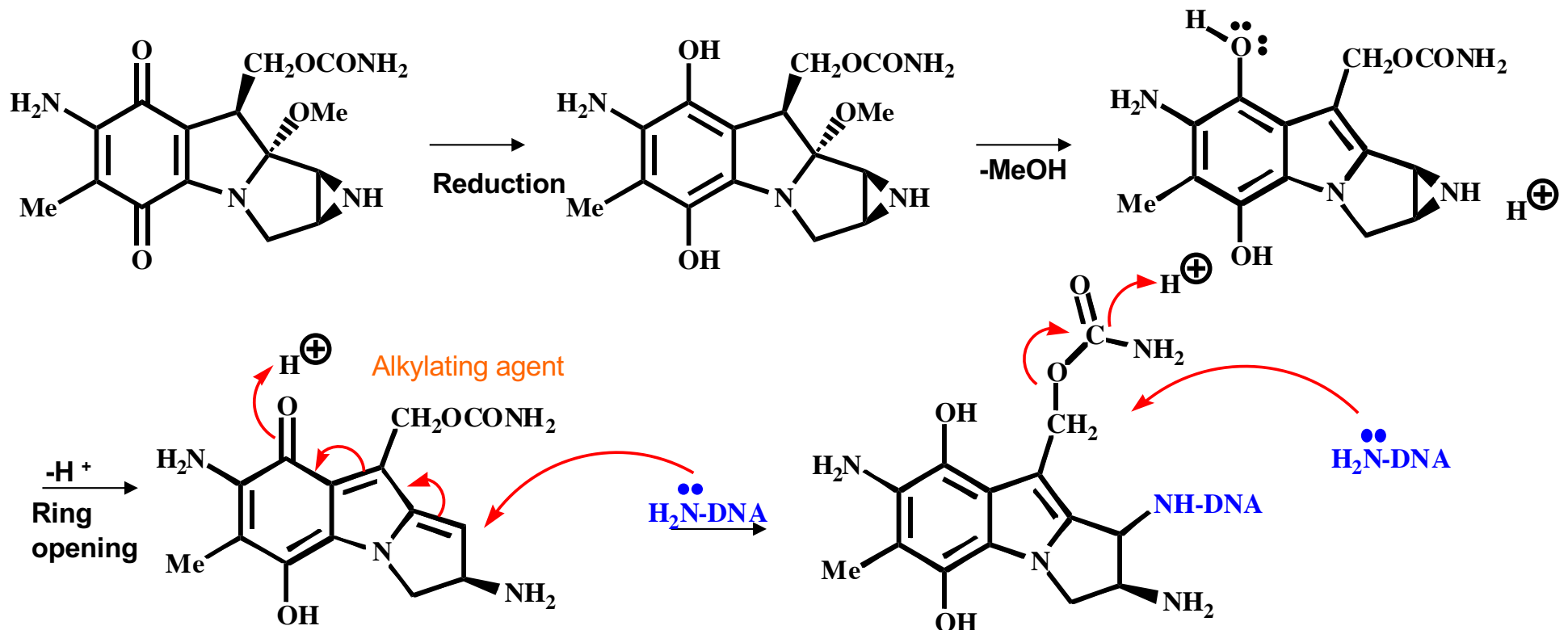
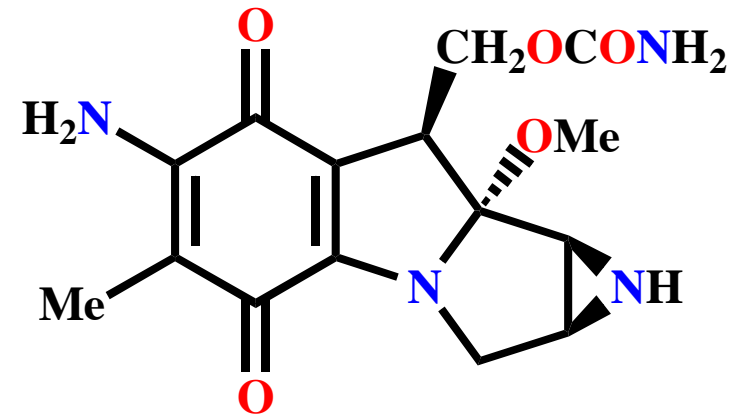
Mitiromycin

- *Streptomyces lavendulae*

Agenti alchilanti

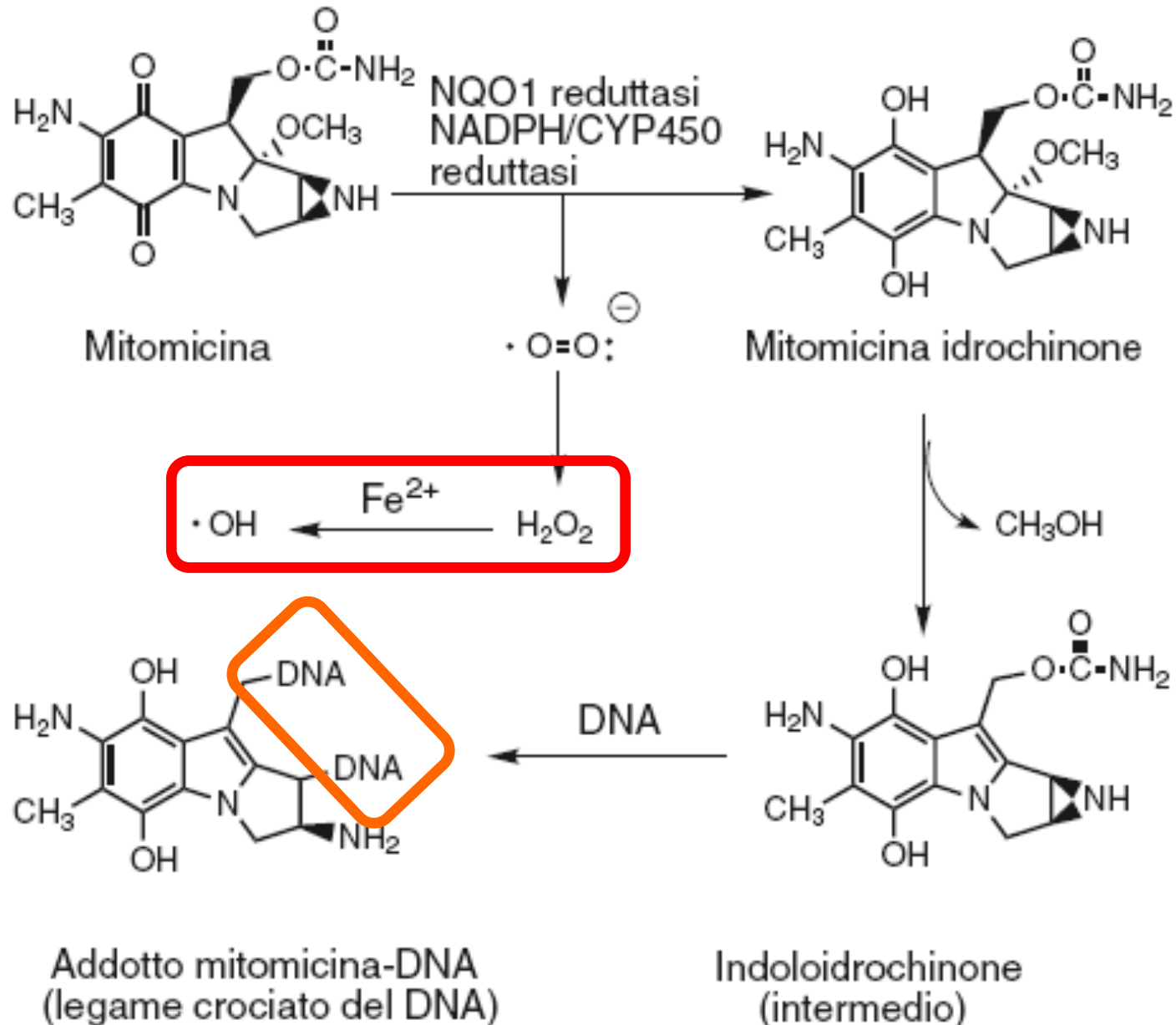
Mitomicina C

- Profarmaco
- Uno dei composti più usati in clinica



Agenti alchilanti

Mitomicina C

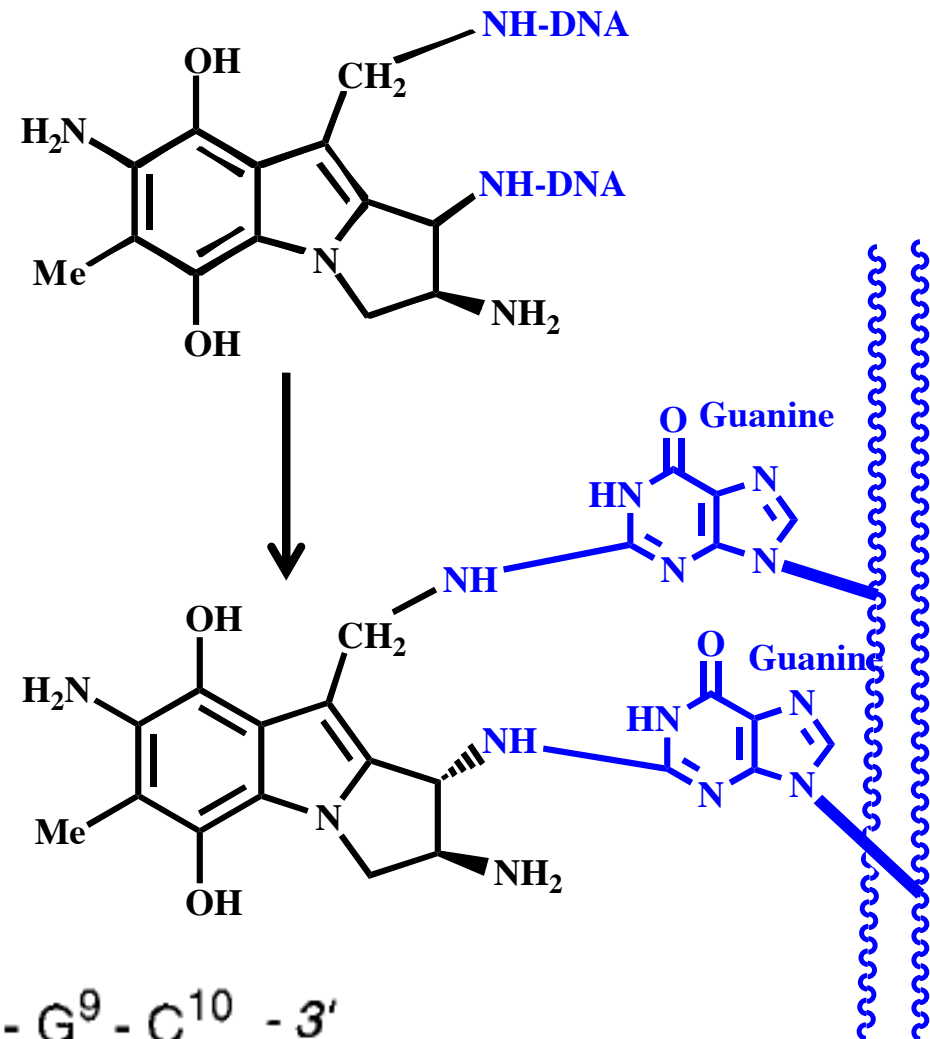


Agenti alchilanti

Mitomicina C

Sequenza specifica

Crosslinked DNA =



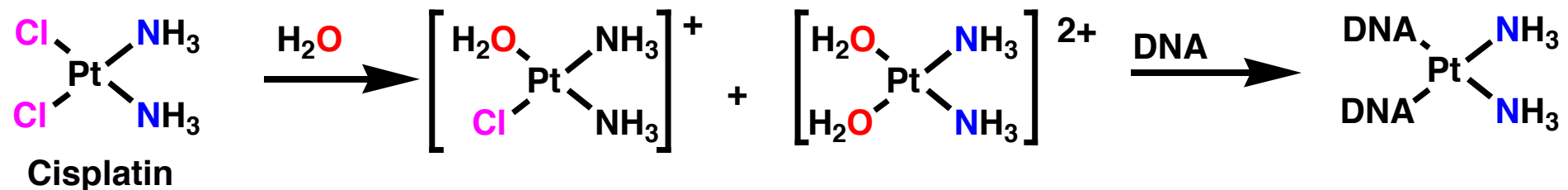
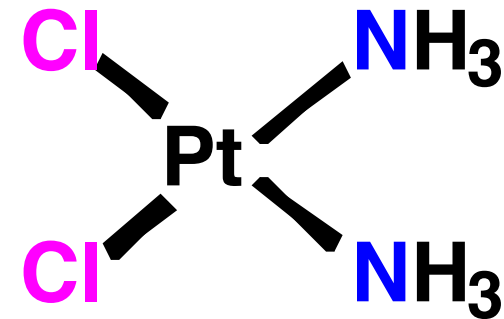
5' - G¹ - C² - A³ - T⁴ - C⁵ - G⁶ - A⁷ - T⁸ - G⁹ - C¹⁰ - 3'

3' - C₂₀ - G₁₉ - T₁₈ - A₁₇ - G₁₆ - C₁₅ - T₁₄ - A₁₃ - C₁₂ - G₁₁ - 5'

Agenti metallanti

Cisplatino

- Molecola neutra: profarmaco
- Pt-Cl: legame covalente
- NH₃: ligando
- Attivazione intracellulare ([Cl⁻] bassa)
- Cloro spiazzato da una molecola d'acqua
- Specie carica positivamente
- Reazione con il DNA



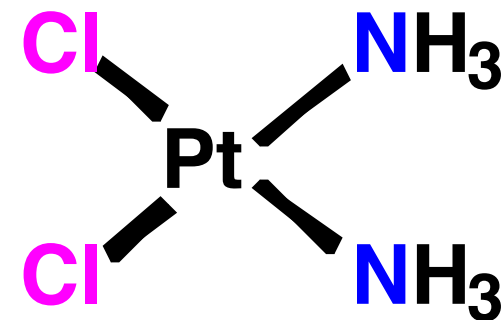
Agenti metallanti

Cisplatino

- Legame in regioni ricche in guanina
- **Legami intra-strand** (più frequenti che inter-strand)
- Blocco localizzato dello svolgimento della doppia elica
- Inibizione trascrizione

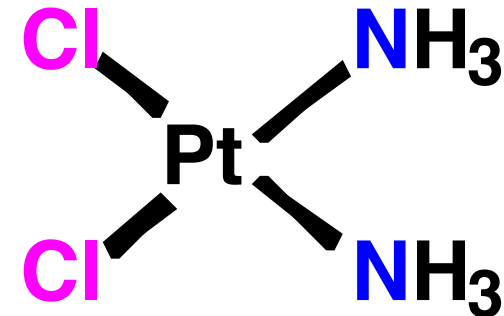


- *cis*
- Geometria *cis* **essenziale**
- Complessi *trans* citotossici, no attività antitumorale
- Pt
- Essenziale
- Analoghi (Pd e Ni) inattivi (cinetiche di dissociazione dei leganti troppo veloci)
- Composti di Pt(IV) attivi, ma **profarmaci**



Agenti metallanti

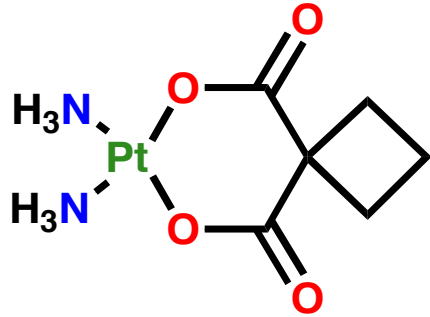
Cisplatino



- **X** = gruppo uscente anionico
- Variazioni di X: farmaci di II generazione (e.g. *carboplatino*)
- Gruppi molto labili (e.g. SO_4^{2-}): attivi ma più tossici
- Carbosilati chelanti (e.g. malonato): meno attivi, ma meno tossici
- **Ammina**
- Primaria o secondaria (simmetrica, asimmetrica, chelante o no)
- Necessaria una discreta solubilità in acqua del complesso
- Necessaria la presenza di almeno un gruppo NH
- Variazioni sulla natura delle ammine: farmaci di III generazione

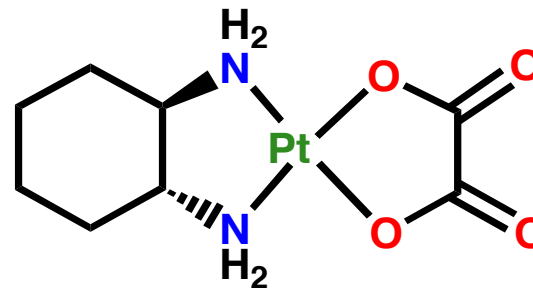
Agenti metallanti

Derivati del cisplatino



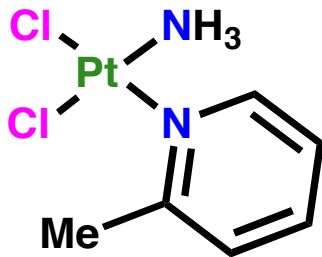
Carboplatino

Minori effetti collaterali

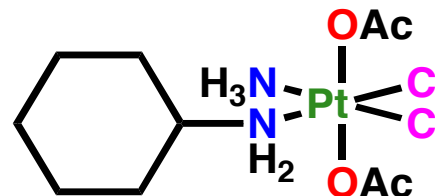


Oxaliplatin

Approvato nel 1999



Picoplatino



Satraplatino

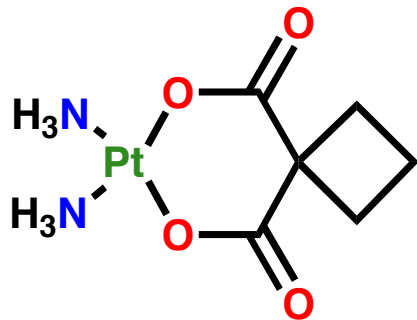
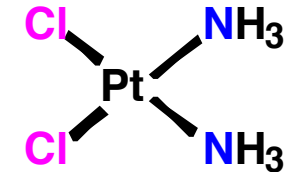
Buona biodisponibilità
per os
Non ancora approvato

Agenti metallanti

Blockbusters

Cisplatino (Platinol)

- FDA: 1978
- Vendite 1999: 100 milioni US \$
- Fuori brevetto da pochi anni

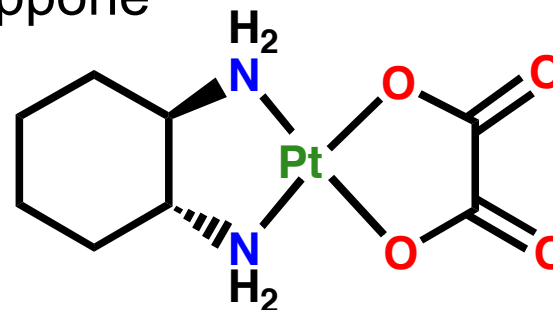


Carboplatino (Paraplatin)

- FDA 1989
- Vendite 2003: 905 milioni US \$
- Vendite 2004: 673 milioni US \$
- Generici
 - Ott 2004 in USA
 - 2000 in EU
 - 1998 in Giappone

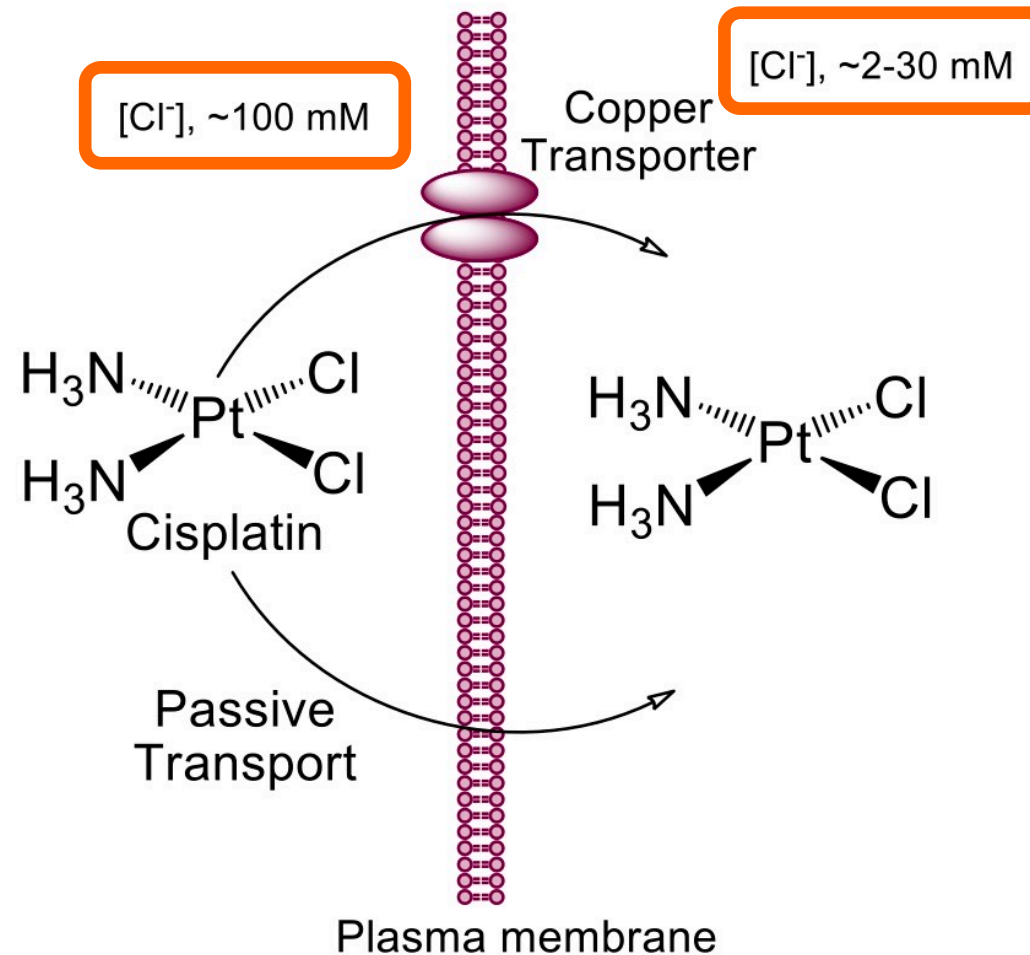
Oxaliplatin (Eloxatin)

- FDA 2002
- Vendite 2004: 1,525 miliardi US \$
- **Trattamento del tumore al colon**



Agenti metallanti

Uptake cellulare



Ctr1 = copper influx transporter

Agenti metallanti

Attivazione intracellulare

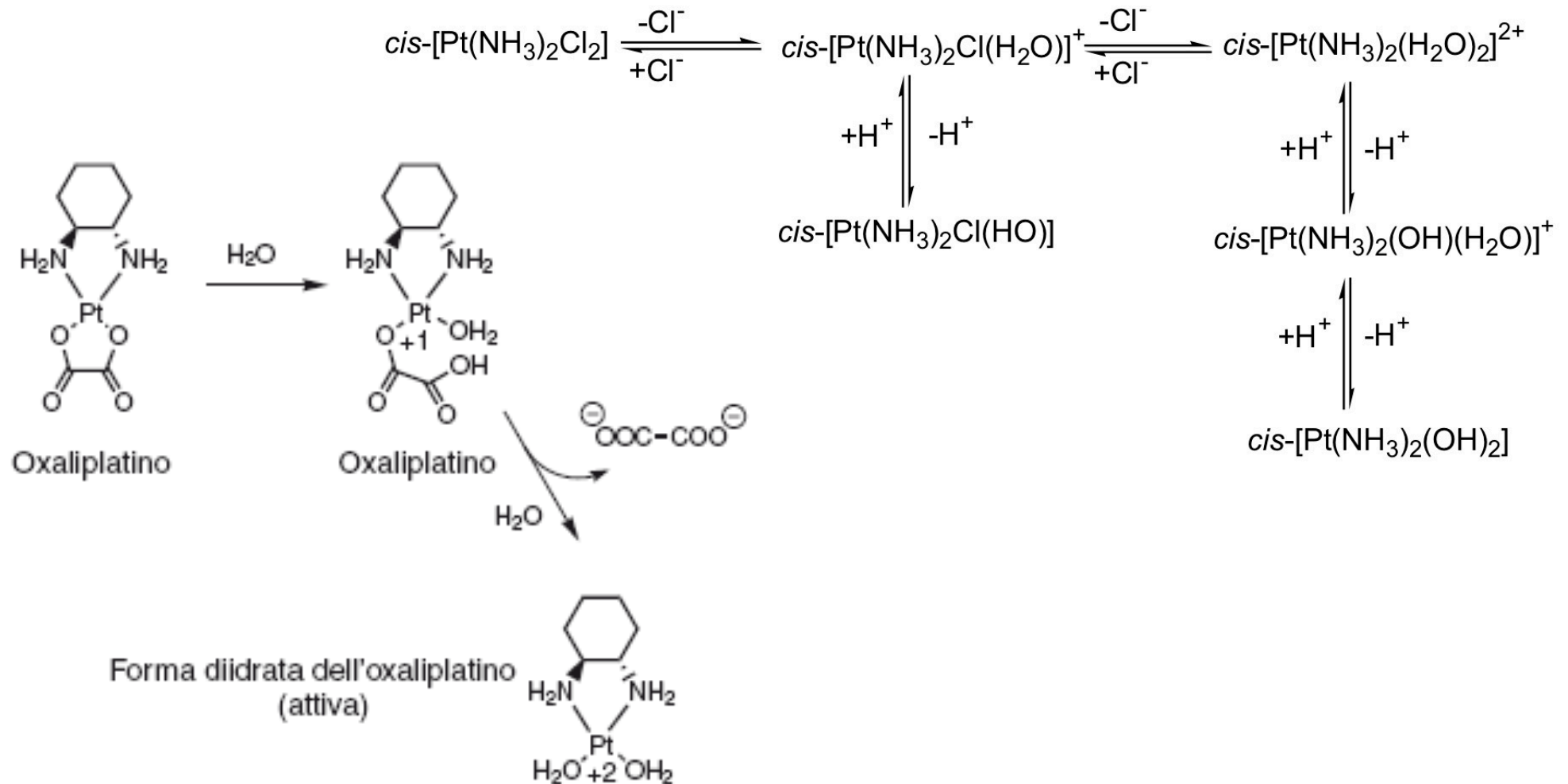
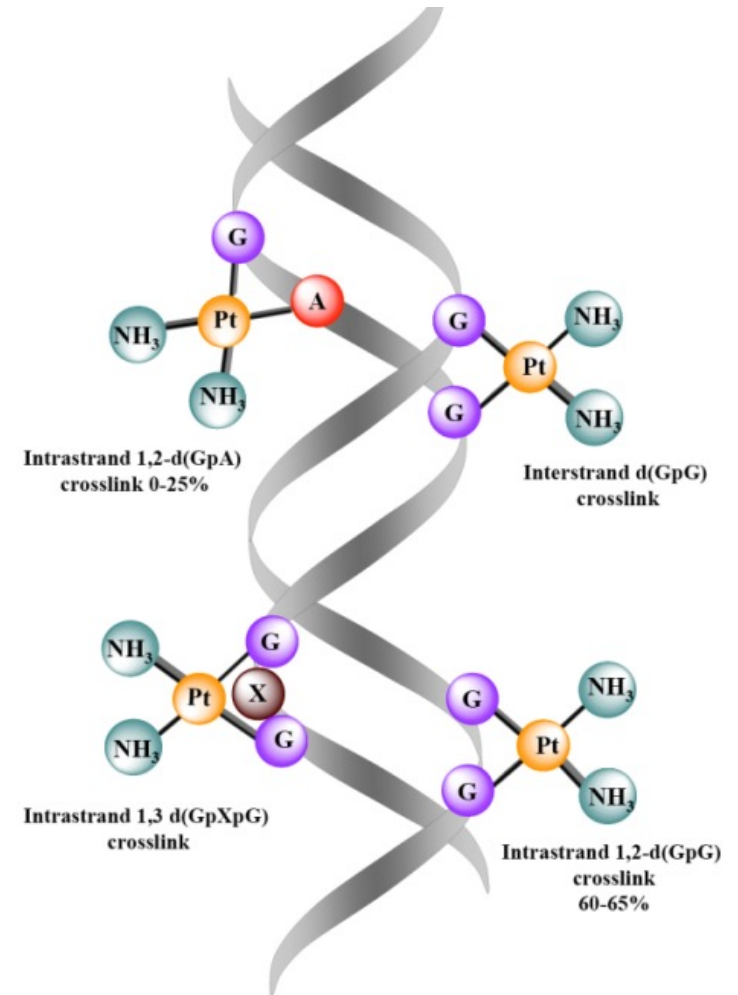
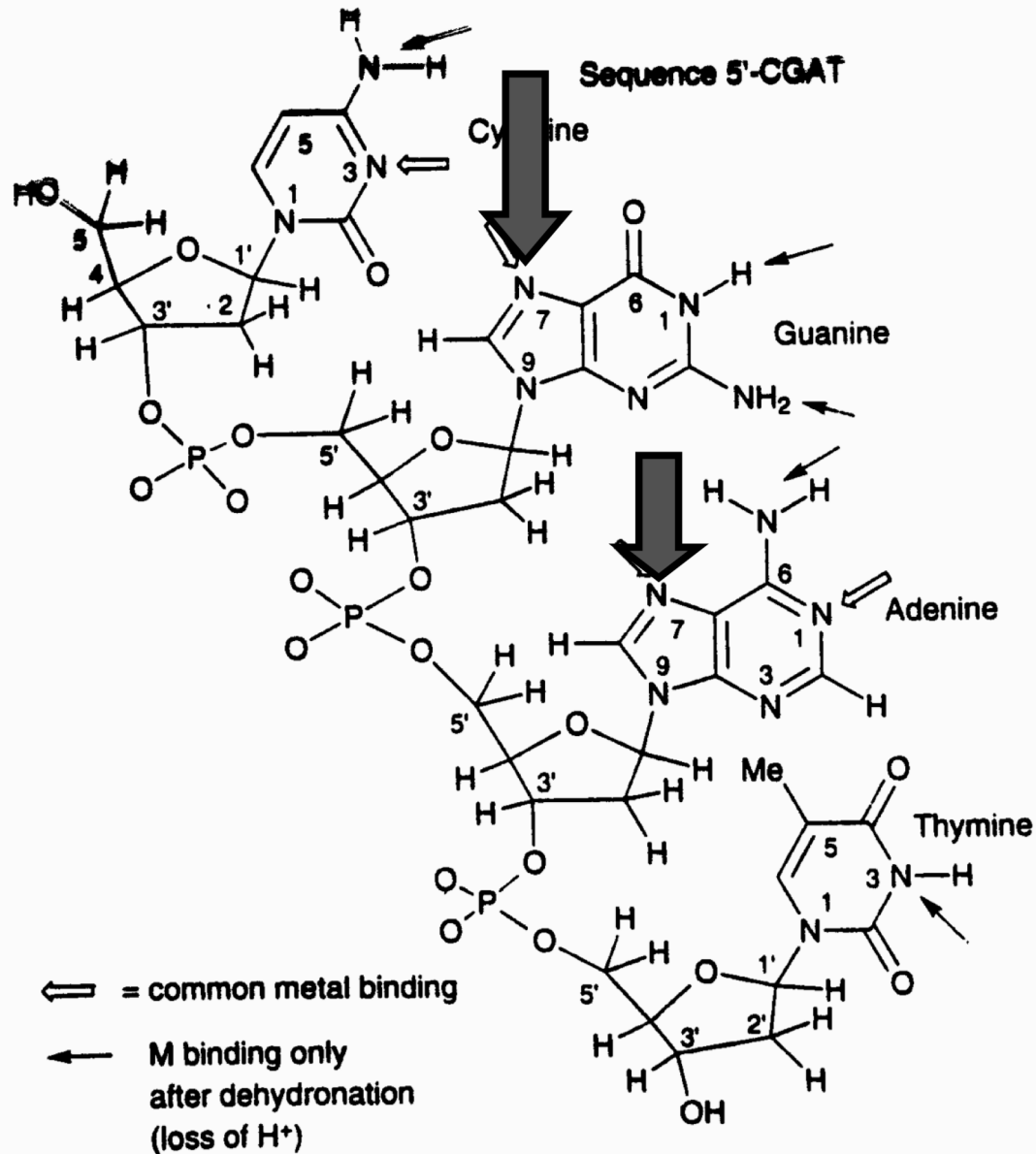


Fig. 42.16. Attivazione dell'oxaliplatino.

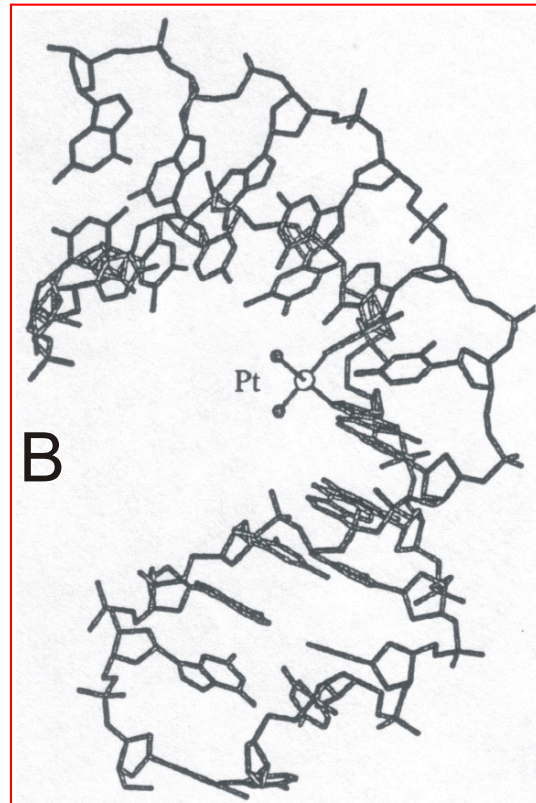
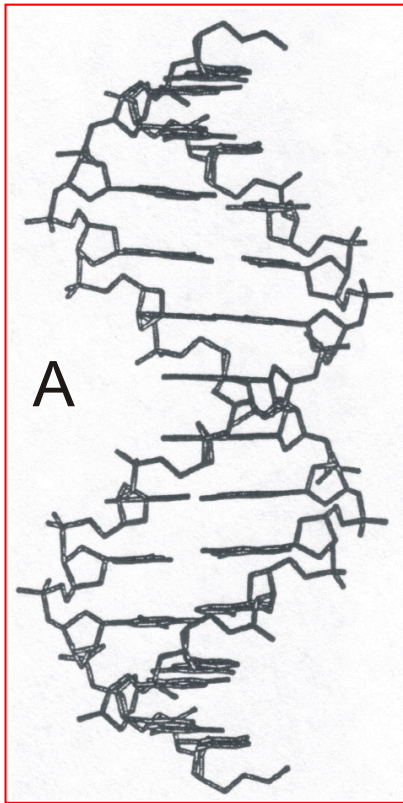
Agenti metallanti



Agenti metallanti

Cisplatino

No legame sulla sequenza 5'-GA



Distorsione del DNA: apoptosi

Agenti metallanti

Limitazioni

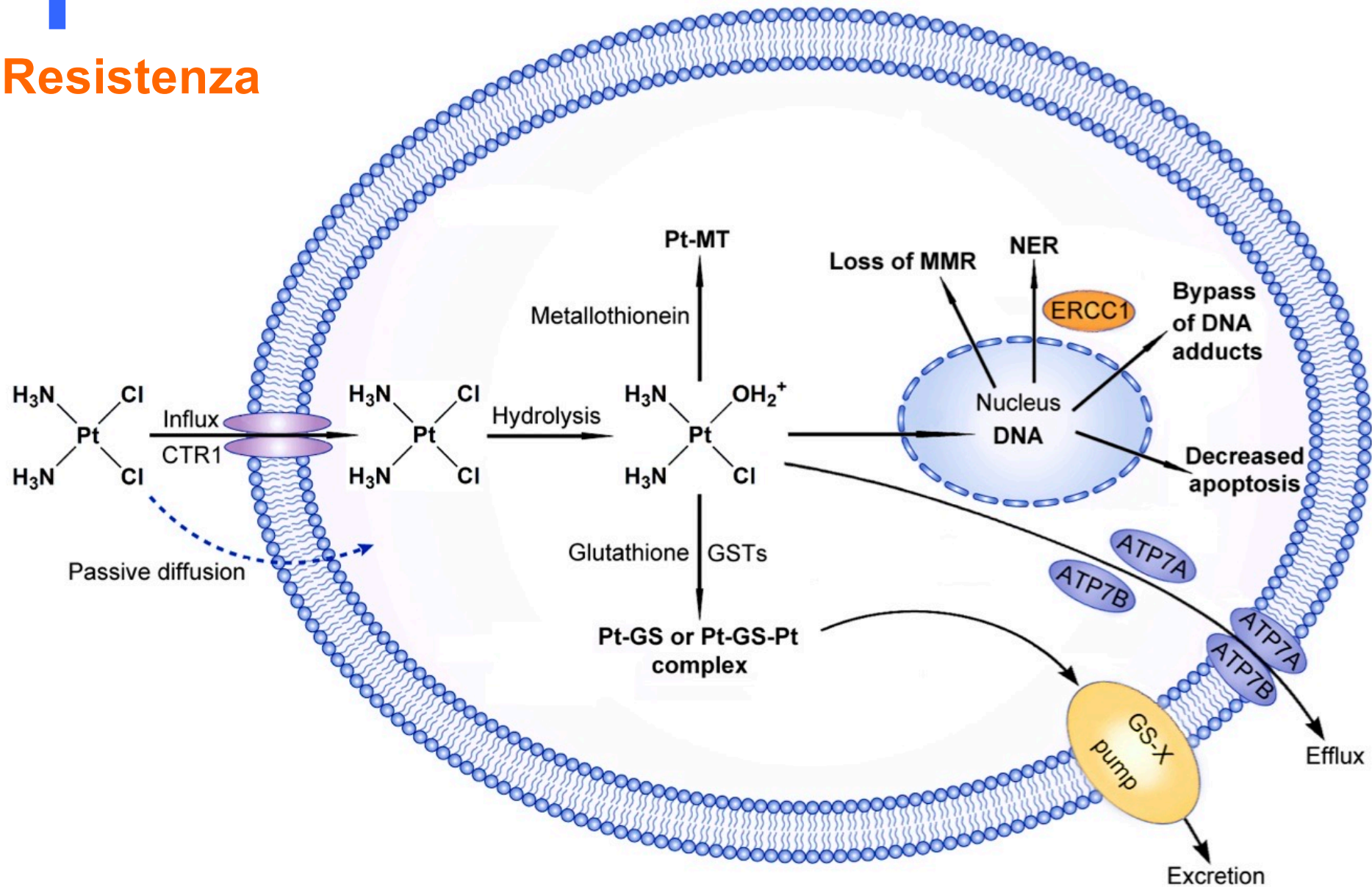
- Resistenza intrinseca
- Resistenza acquisita
- Tossicità

Meccanismi di resistenza

- Diminuzione dell'accumulo di farmaco
- Aumento dell'escrezione del farmaco dalla cellula
- Aumento dei meccanismi di detossificazione cellulare (-SH)
- Migliore "riparazione" del DNA
- Aumento della tolleranza al danno del DNA
- Modificazioni dei processi cellulari coinvolti nella regolazione della sopravvivenza e della morte cellulare

Agenti metallanti

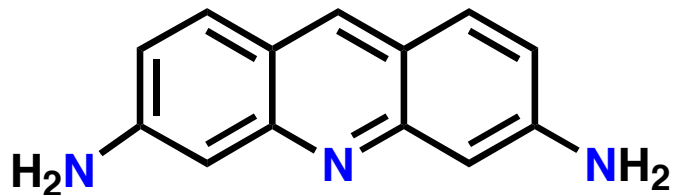
Resistenza



Agenti intercalanti

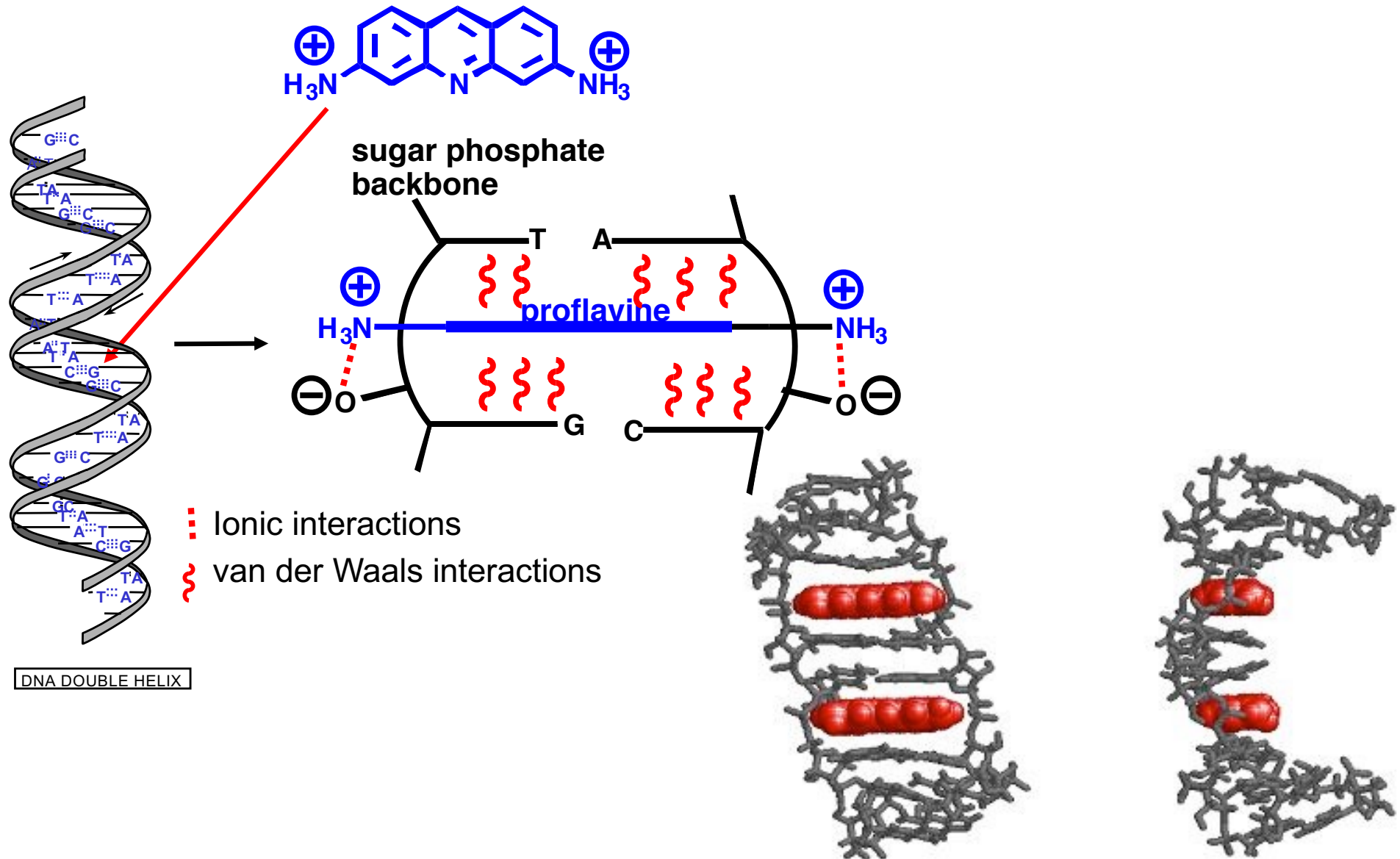
- Sistemi planari aromatici o eteroaromatici
- Intercalazione tra basi
- Variazioni della forma dell'elica
- Sovente preferenza o per il minor or il major groove
- Blocco replicazione e trascrizione
- Blocco delle topoisomerasi

Proflavina



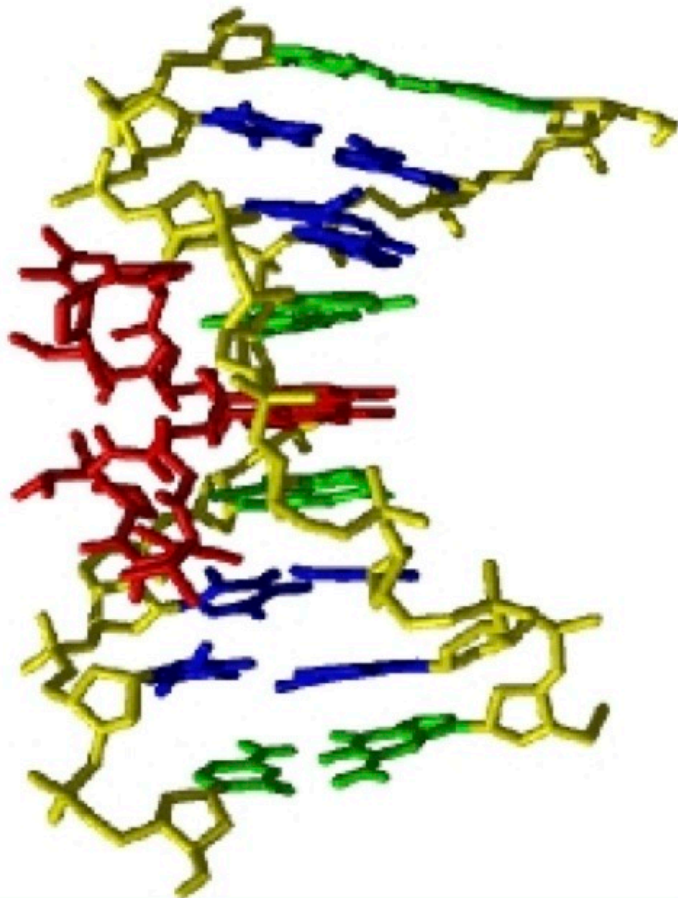
- Sistema tricyclico planare
- Gruppi ammoniacali
- Primo utilizzo: agente antibatterico (II guerra mondiale)
- Troppo tossico per uso sistemico

Agenti intercalanti

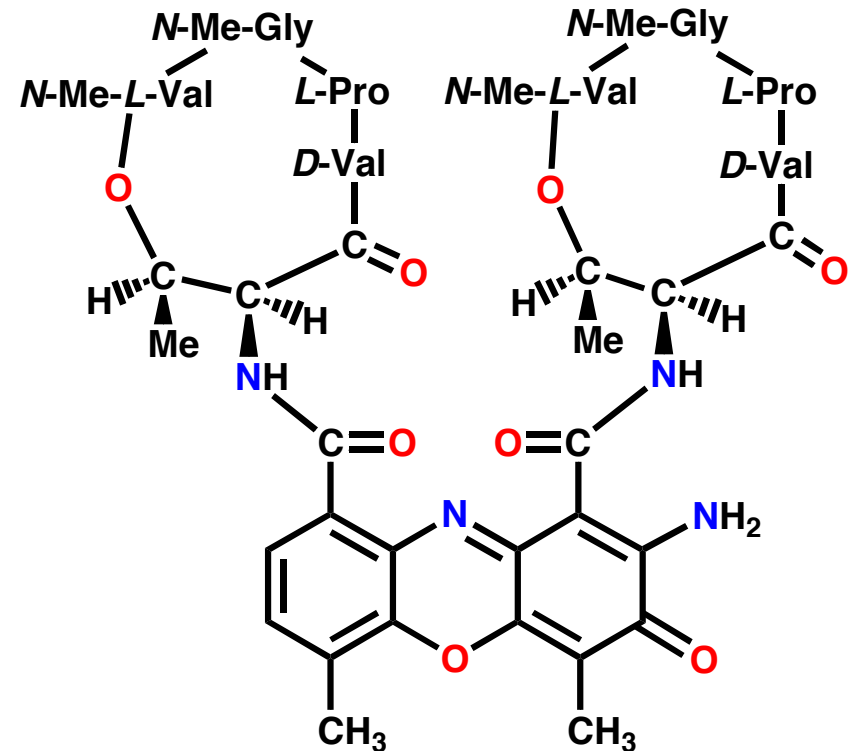


Agenti intercalanti

Dactinomicina



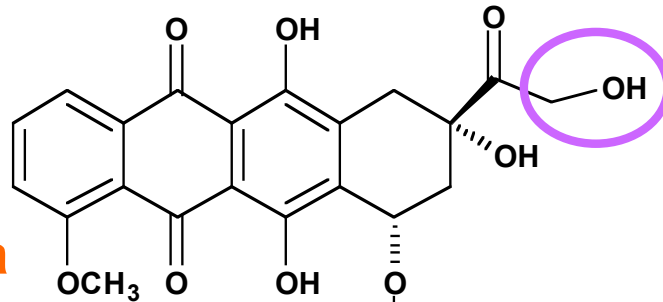
Rosso: dactinomicina
Verde: basi G, C
Blu: basi A, T
Giallo: scheletro fosfoglicidico



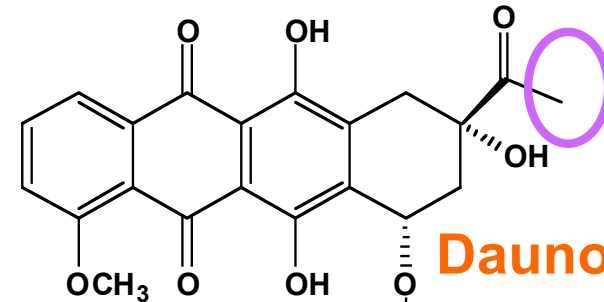
- Intercalazione nel minor groove del DNA
- Peptide: interazione con ribosio e fosfati
- Blocco dello svolgimento della doppia elica
- Blocco della RNA-Polimerasi DNA dipendente
- Blocco trascrizione

Agenti intercalanti

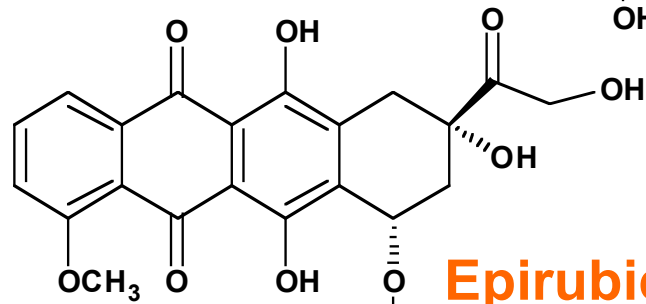
Antraciclina



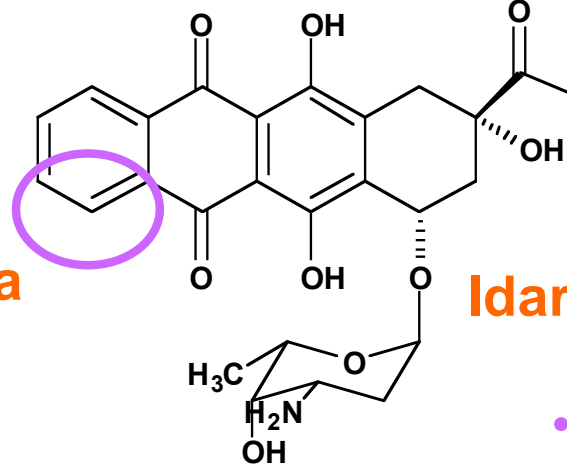
Doxorubicina



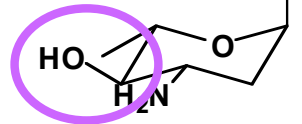
Daunorubicina



Epirubicina



Idarubicina



- Porzione agliconica
 - tetraciclo con sistema chinonico-idrochinonico
- Porzione zuccherina
 - daunosamina

- 1960
- *Streptomyces peucetius*

Agenti intercalanti

Antraciclina

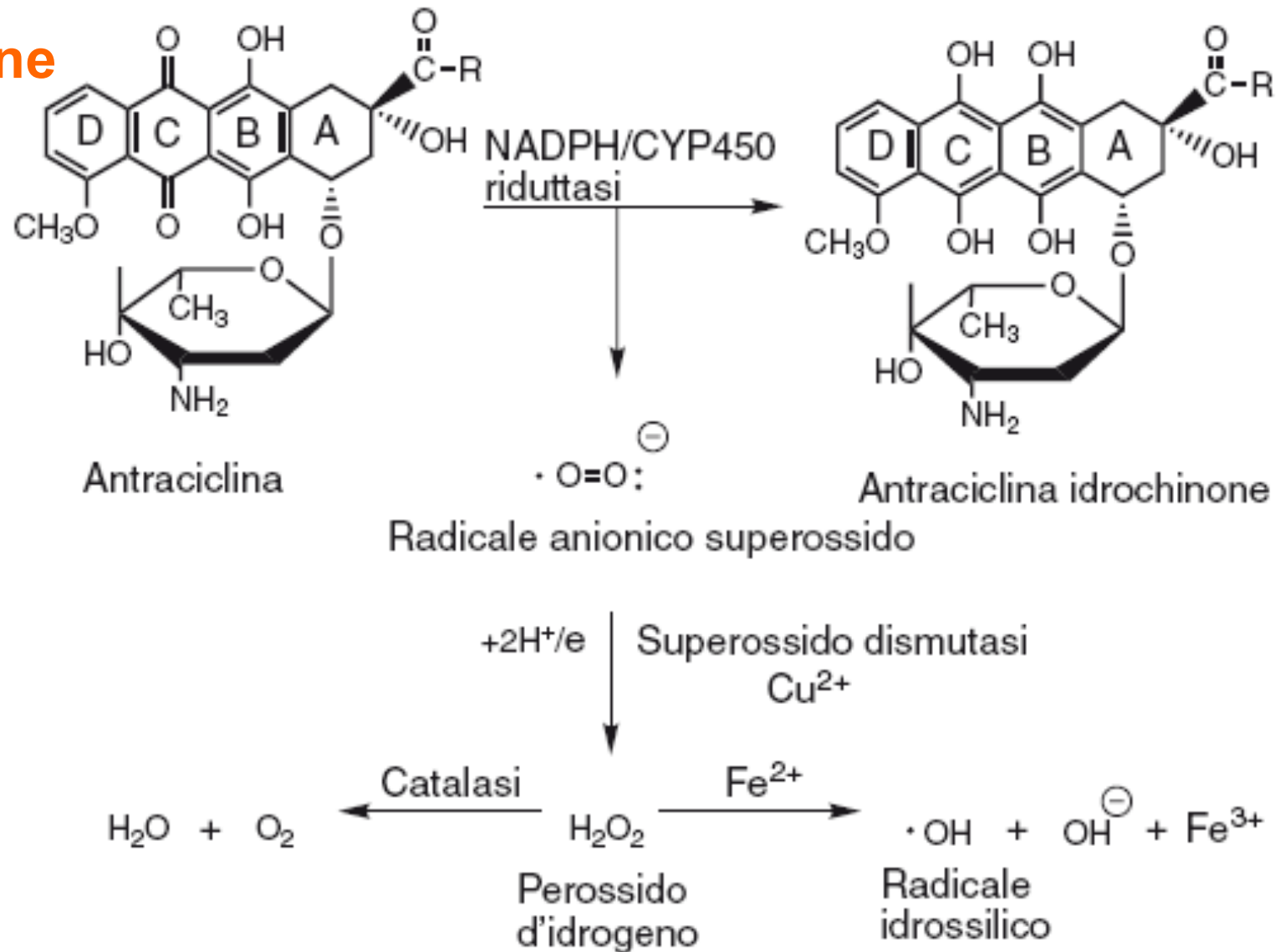
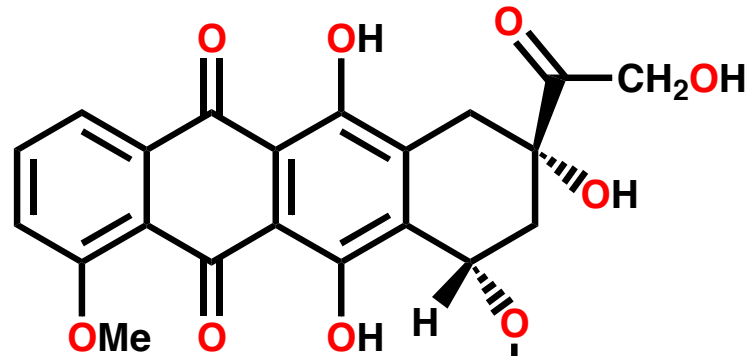
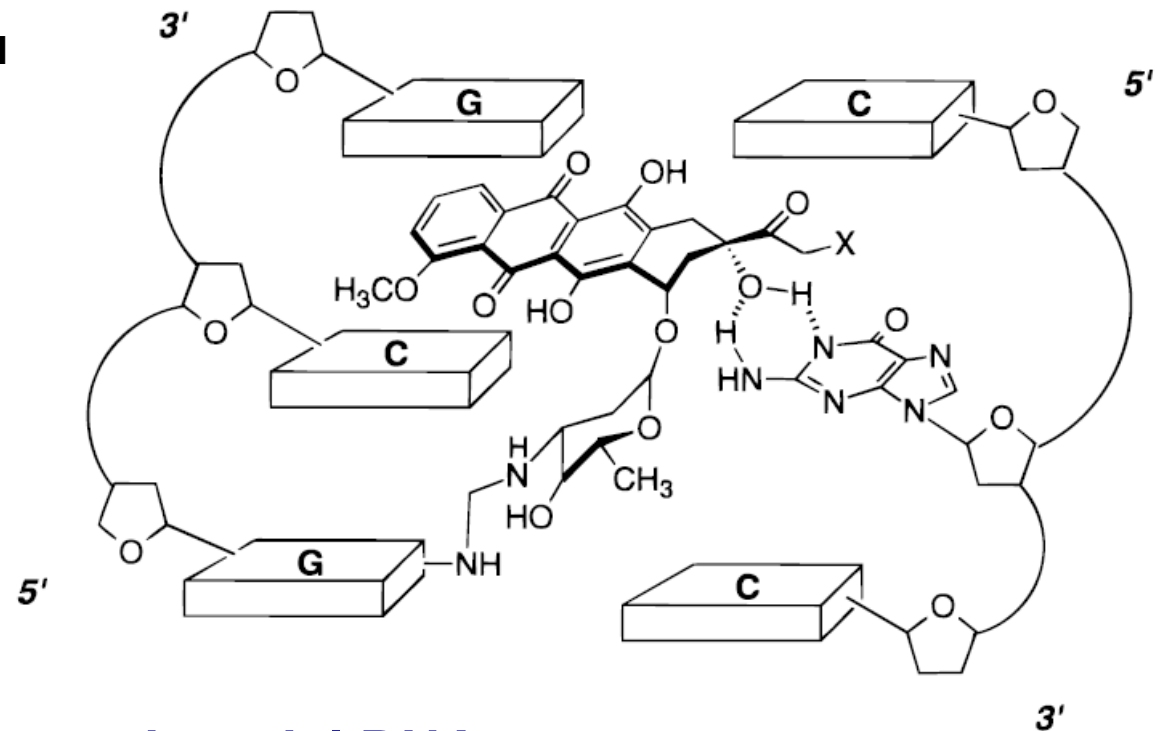
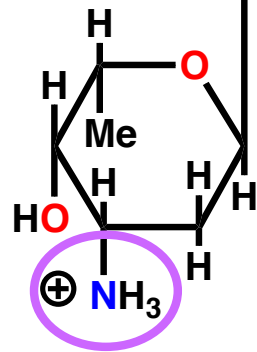


Fig. 42.18. Formazione di radicali mediata dall'antraciclina.

Agenti intercalanti



Ulteriore
interazione
con i fosfati



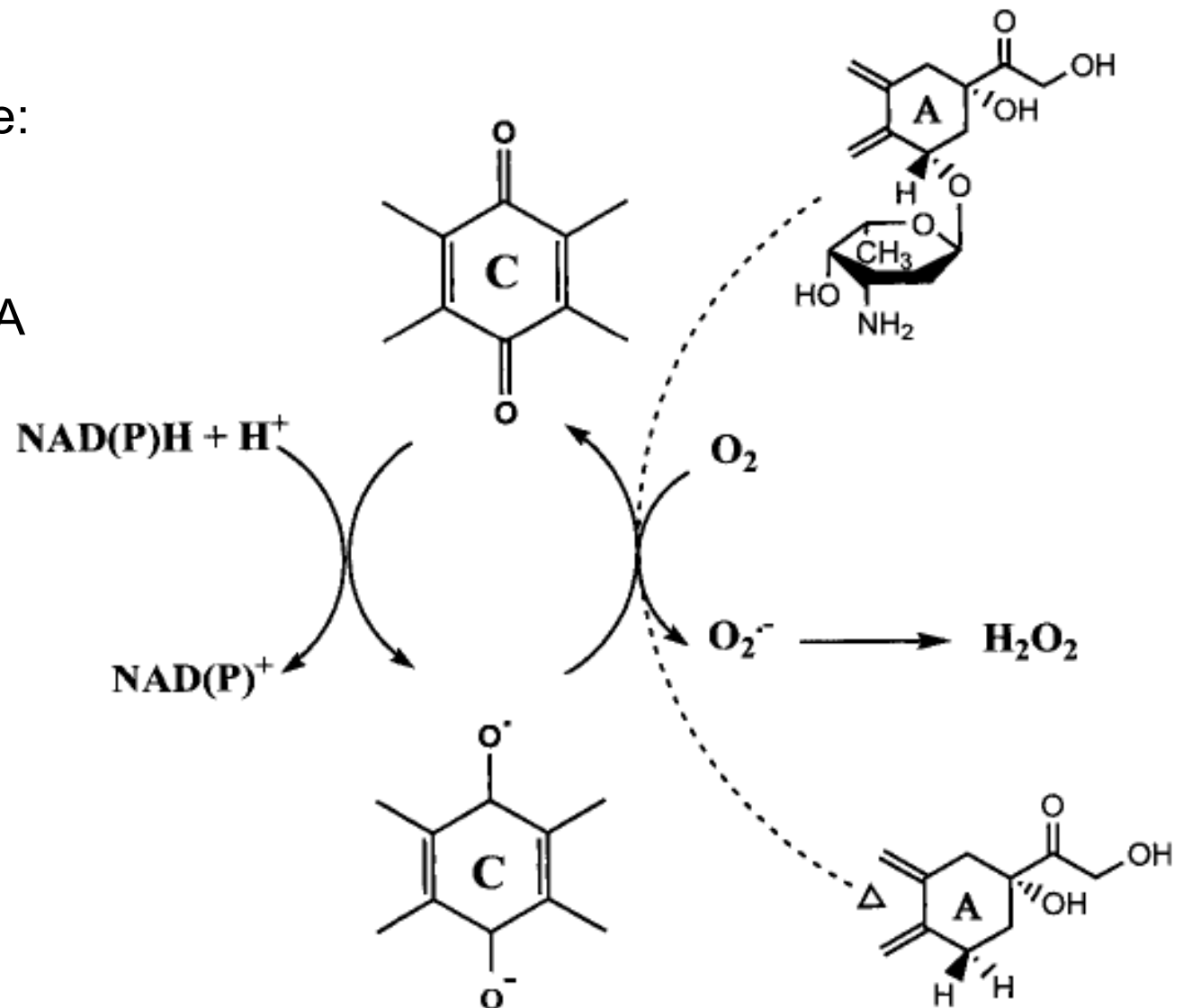
- Intercazione nel solco maggiore del DNA
- Blocco dell'attività della topoisomerasi II
- Stabilizzazione del complesso DNA-enzima
- Veleno delle topoisomerasi

Agenti intercalanti

Antracicline

Altri meccanismi d'azione:

- Attivazione del P53
 - Innesco apoptosi
- Danno ossidativo al DNA



Agenti intercalanti

Antracicline: necessario diminuire la tossicità

Formulazioni liposomiali (doxo e dauno)

- Accumulo selettivo nel tumore: EPR
- Rilascio del farmaco
- Riduzione della resistenza da sistemi Pgp
- Aumento del tempo di emivita
- Attività anche in pazienti che non rispondono alle antracicline
- Riduzione effetti tossici (cardiotossicità)

Immunoliposomi

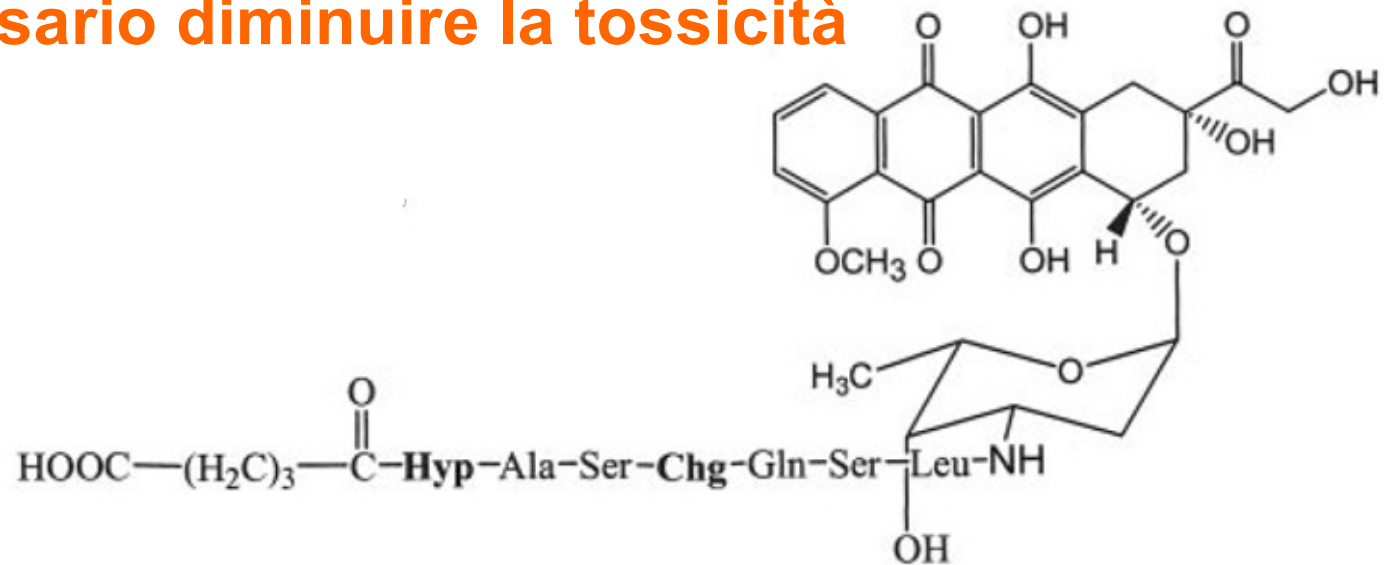
- Anticorpo monoclonale sul liposoma
- Ab specifico per antigeni presenti sulle cellule tumorali

Agenti intercalanti

Antracicline: necessario diminuire la tossicità

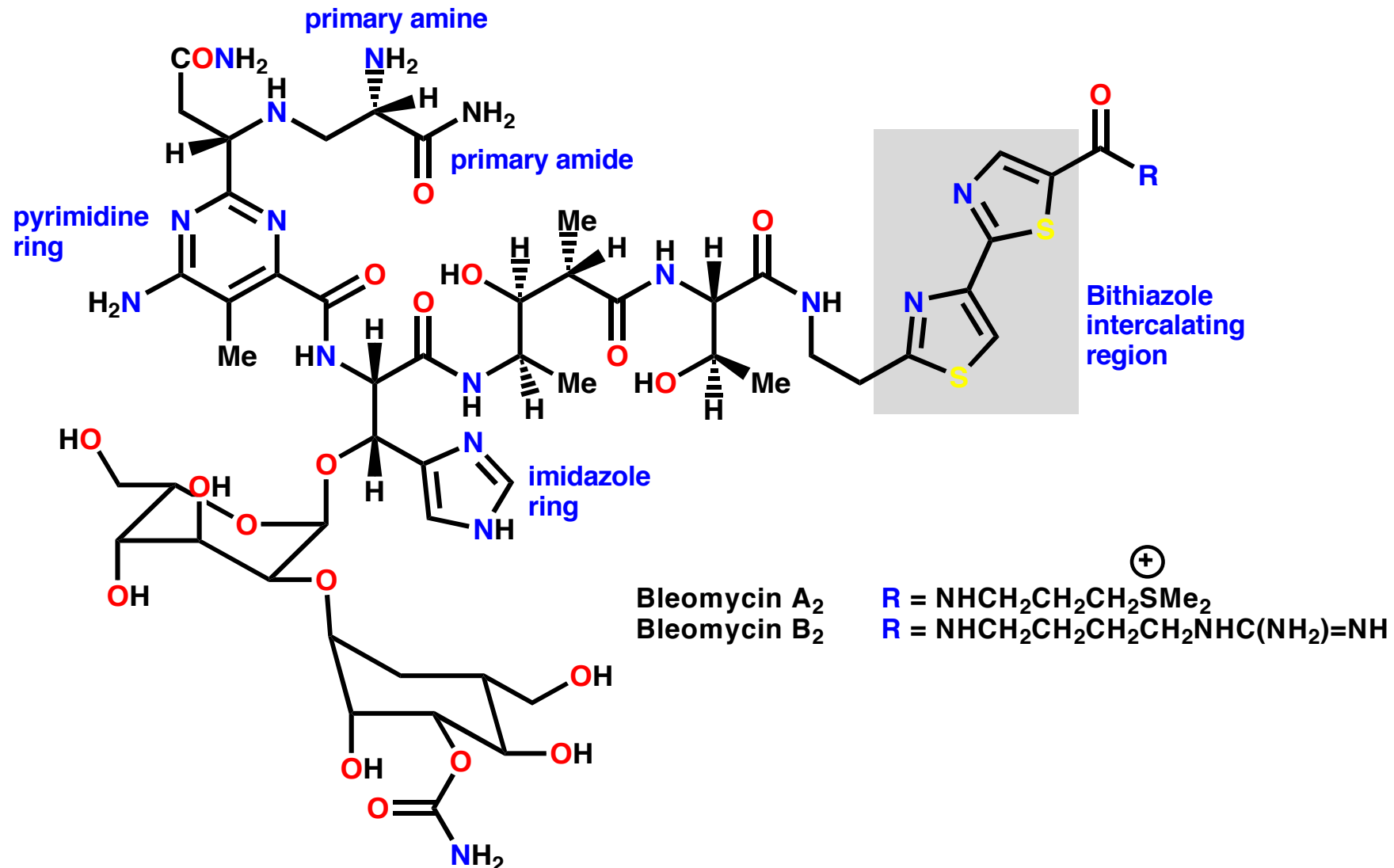
Profarmaci

- PSA: proteasi serinica
Forte espressione nelle cellule di tumore prostatico
- No attività proteolitica in circolo
- Coniugato DOXO-eptapeptide (substrato della PSA)
- Idrolisi selettiva in cellule che esprimono PSA
- Più attivo (15 volte) della DOXO nelle cellule di tumore prostatico
- Minori effetti collaterali



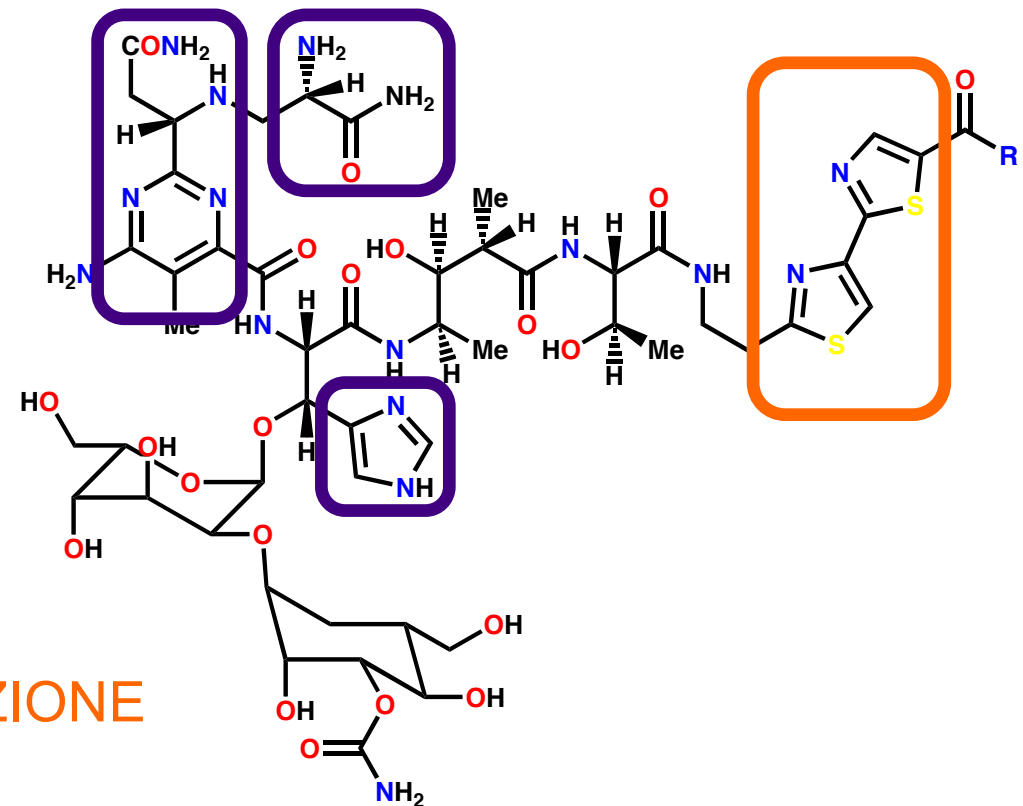
Agenti intercalanti e chain cutters

Bleomicina



Agenti intercalanti e chain cutters

Bleomicina

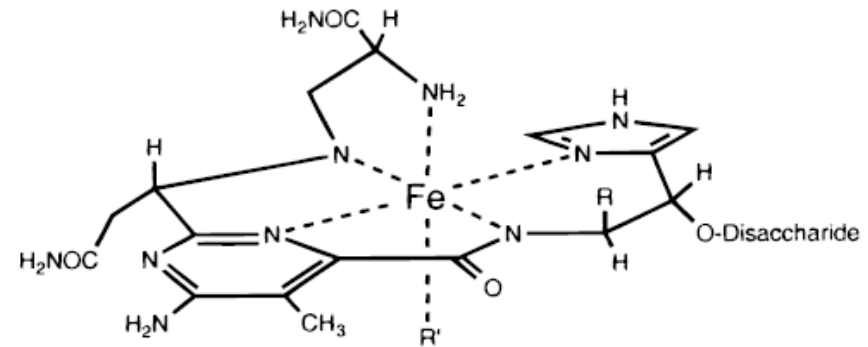


- Sistema bitiazolico: INTERCALAZIONE
- IONE FERROSO: chelato da N
 - ammina primaria, ammido, pirimidina e imidazolo
- Reazione con O₂: Ione FERRICO e ROS
- Formazione di radicali
- Scissione delle catene di DNA
- Inibizione della riparazione da parte di DNA ligasi

Agenti intercalanti e chain cutters

Bleomicina

Chelato Fe(II) - bleomicina



Fe(II)•bleomycin

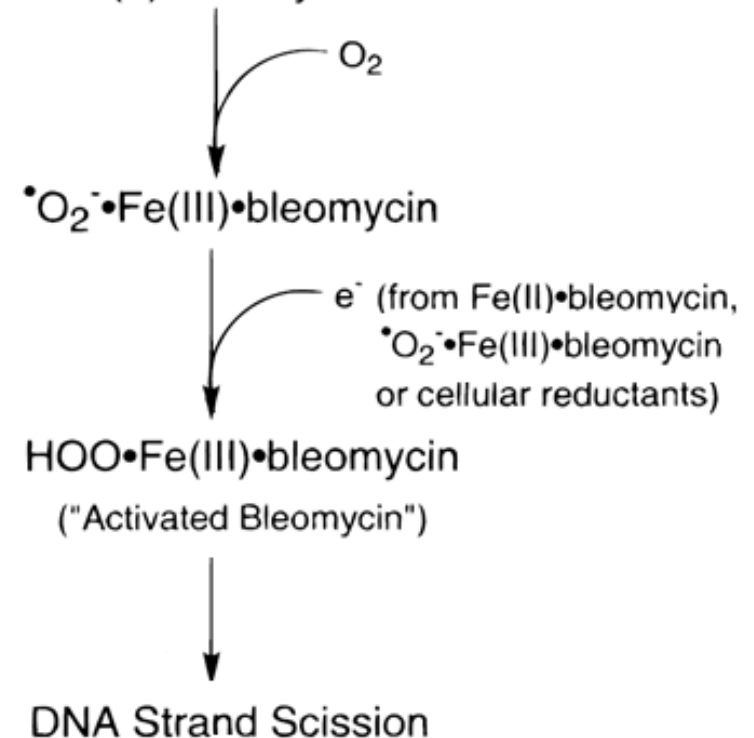
Reazione con O₂

Complesso superossido ferrico bleomicina

Riduzione

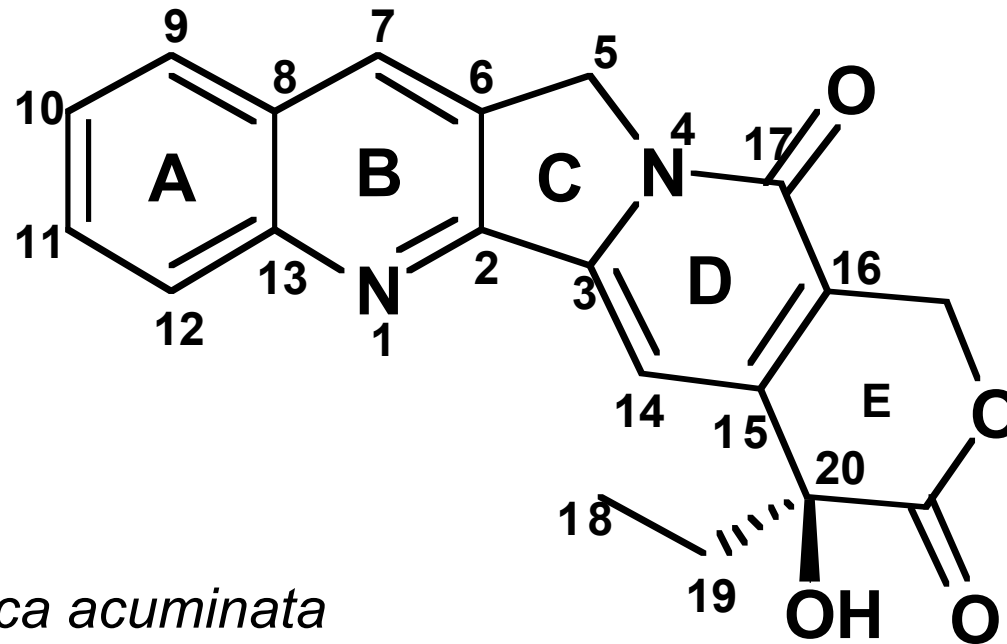
Complesso perossido ferrico bleomicina:
“bleomicina attivata”

Degradazione DNA
Effetto citotossico



Altri farmaci che agiscono sul DNA

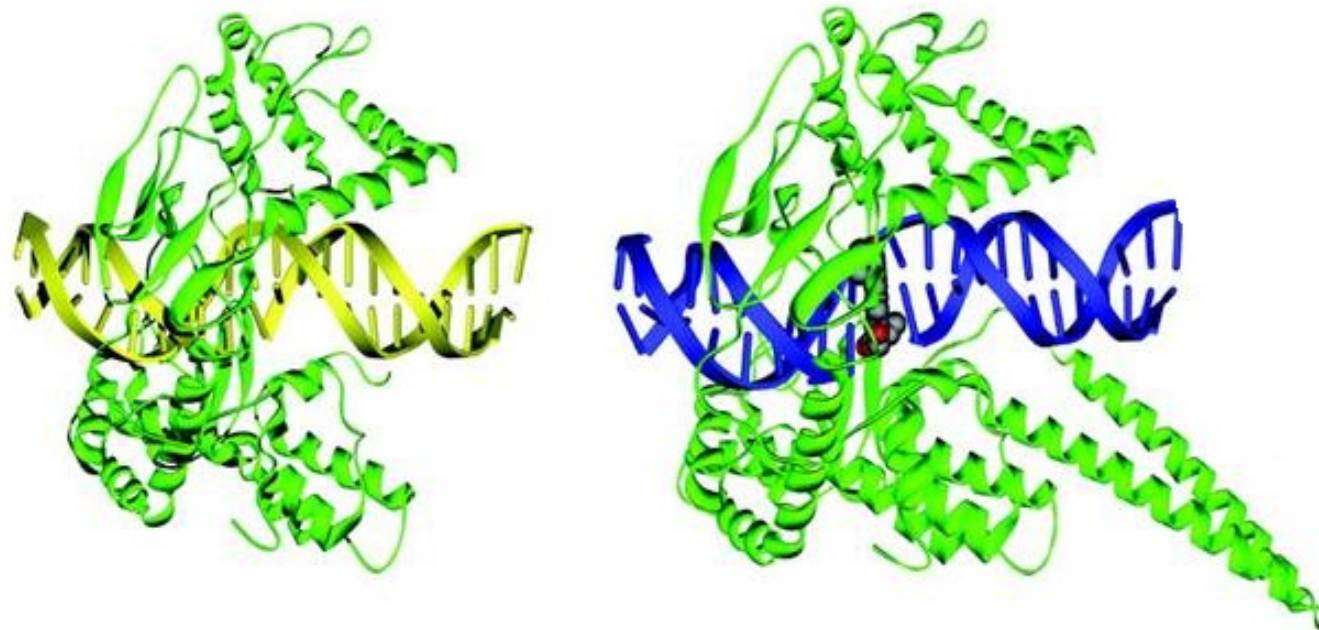
Camptotecina



- Chinolina
- *Camptotheca acuminata*
- Antitumorale
- Scarsa solubilità
- Forti effetti collaterali
- Derivati utili

Altri farmaci che agiscono sul DNA

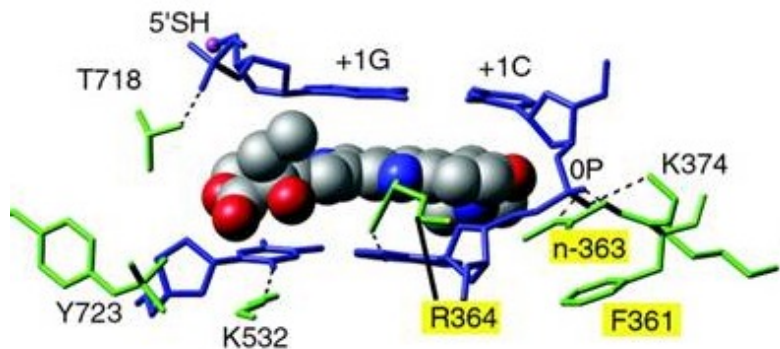
Camptotecina



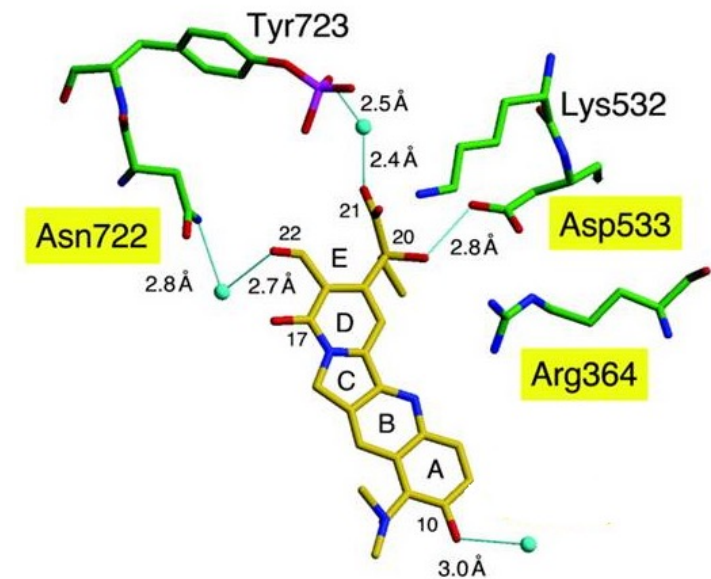
- Complesso TOPO1-DNA: formazione di un sistema ternario stabile
- Inibizione della formazione dei legami fosfodiesterici
- Accumulo di TOPO1-DNA: tossico
- Effetto citotossico specifico per la fase S

Altri farmaci che agiscono sul DNA

Camptotecina



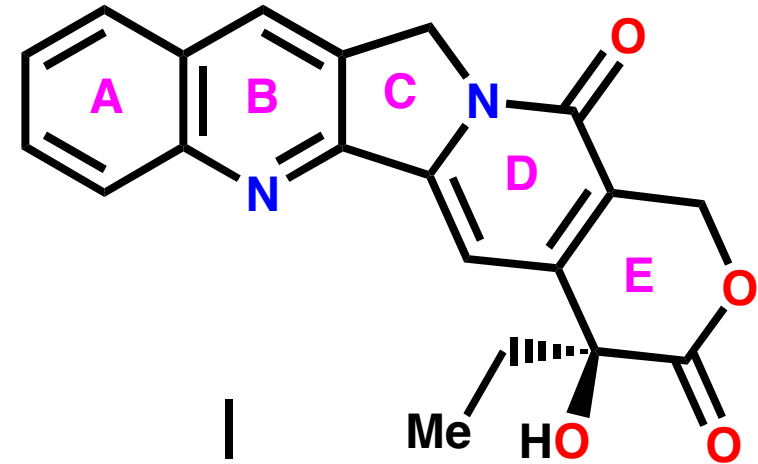
- Intercalazione tra le basi del DNA
- Struttura pentaciclica planare
- Intercalazione dopo la prima reazione di esterificazione



Altri farmaci che agiscono sul DNA

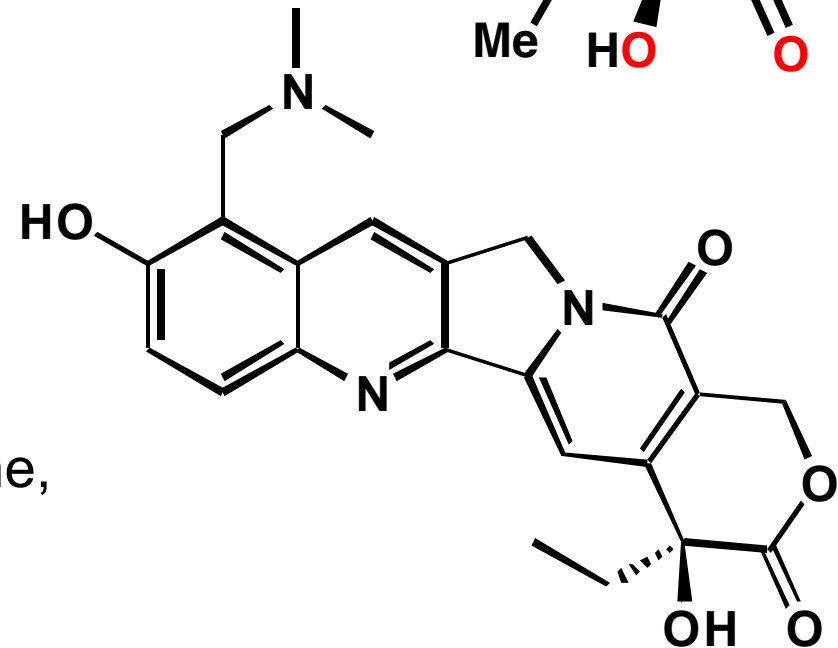
Camptotecina

- Stabilizzazione del complesso DNA e topoisomerasi I
- Rotture single-strand
- Rottura irreversibile del double-strand
- Analoghi semi-sintetici



Topotecano

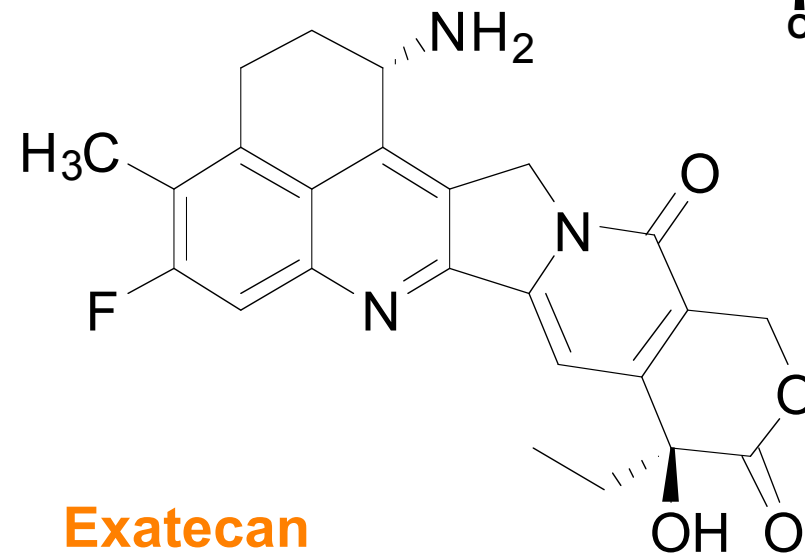
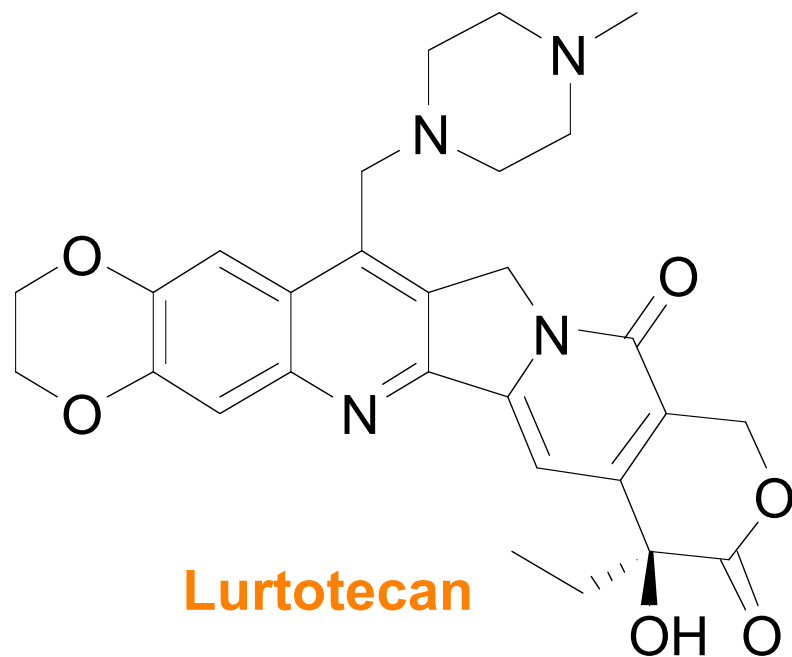
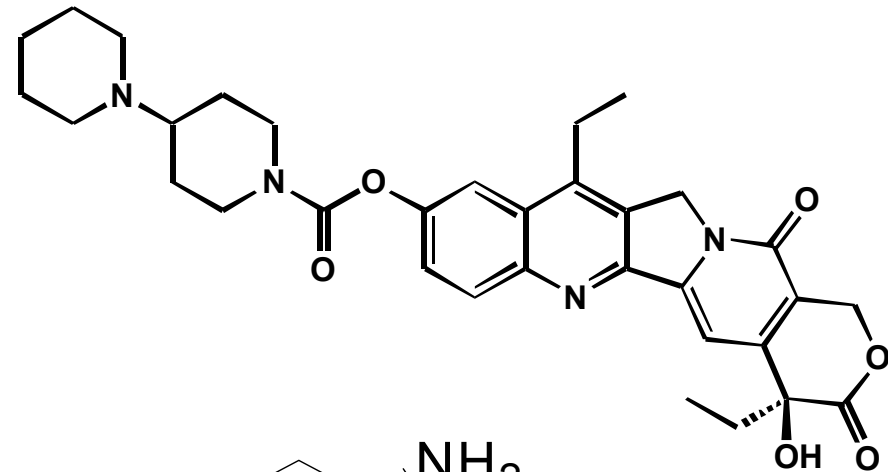
- Derivato idrosolubile
- Somministrazione IV e PO
- Effetti secondari: mielosoppressione, alopecia, astenia



Altri farmaci che agiscono sul DNA

Irinotecano

- Attivato mediante idrolisi (SN38)
- Amministrazione endovenosa
- Cancro al colon (FDA 1994)

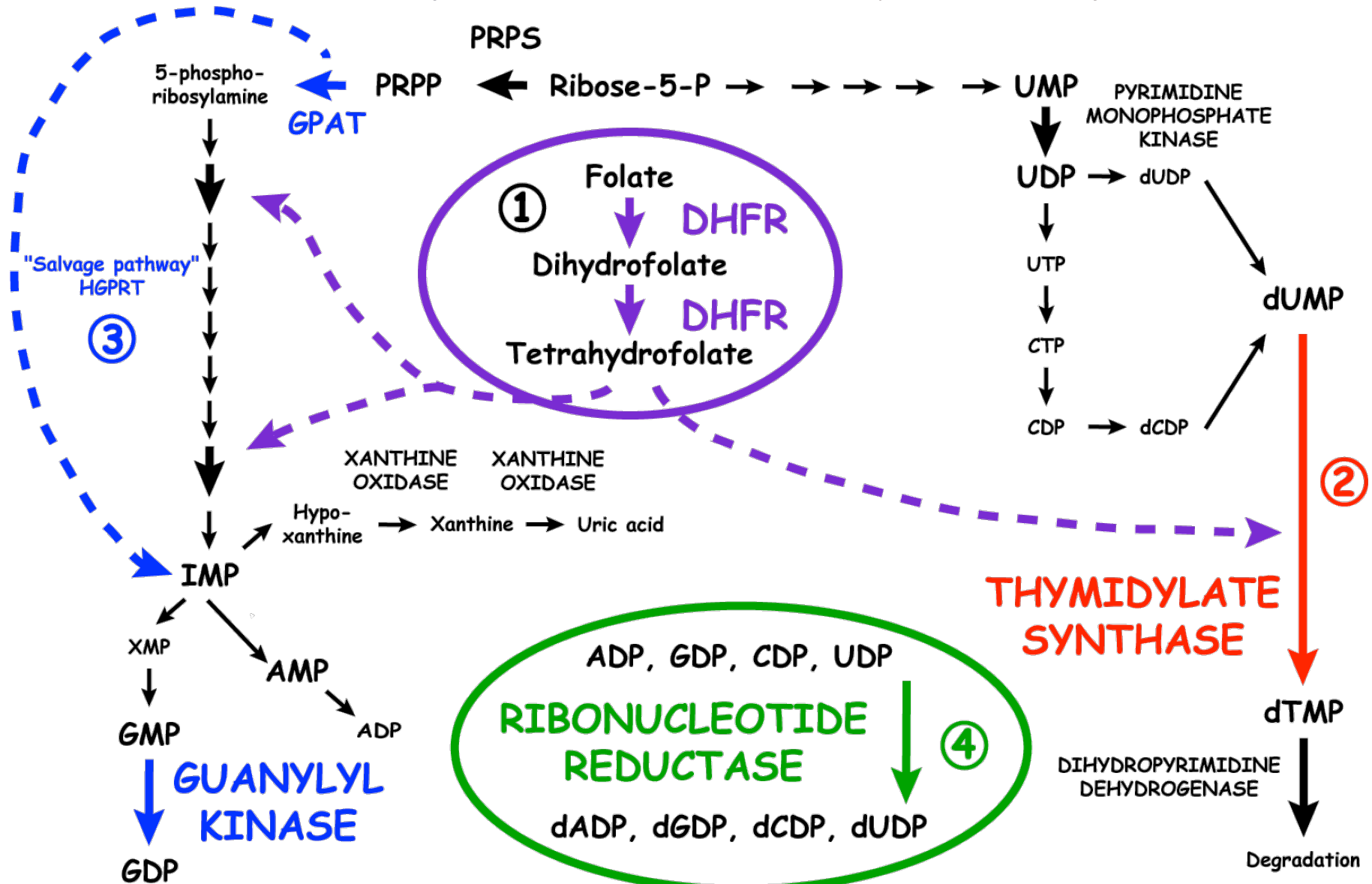


Composti in fase di investigazione

Antimetaboliti

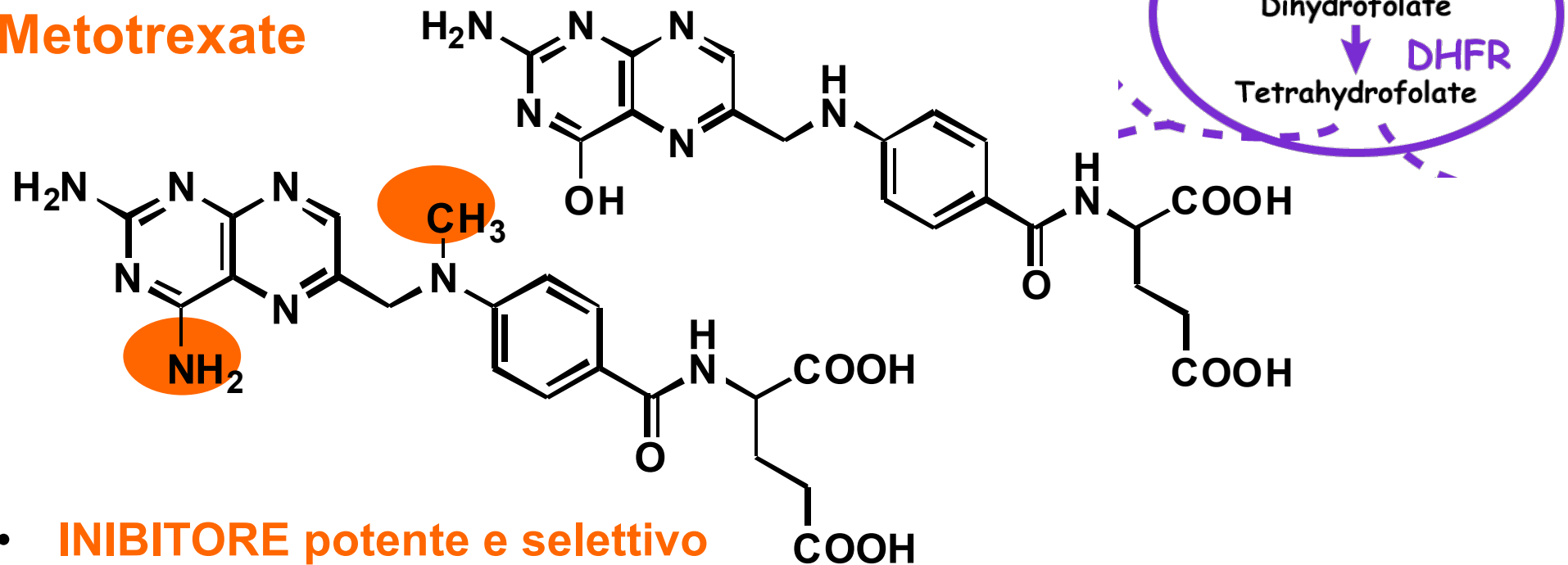
Purine Synthesis

Pyrimidine Synthesis



Antimetaboliti

Metotrexate



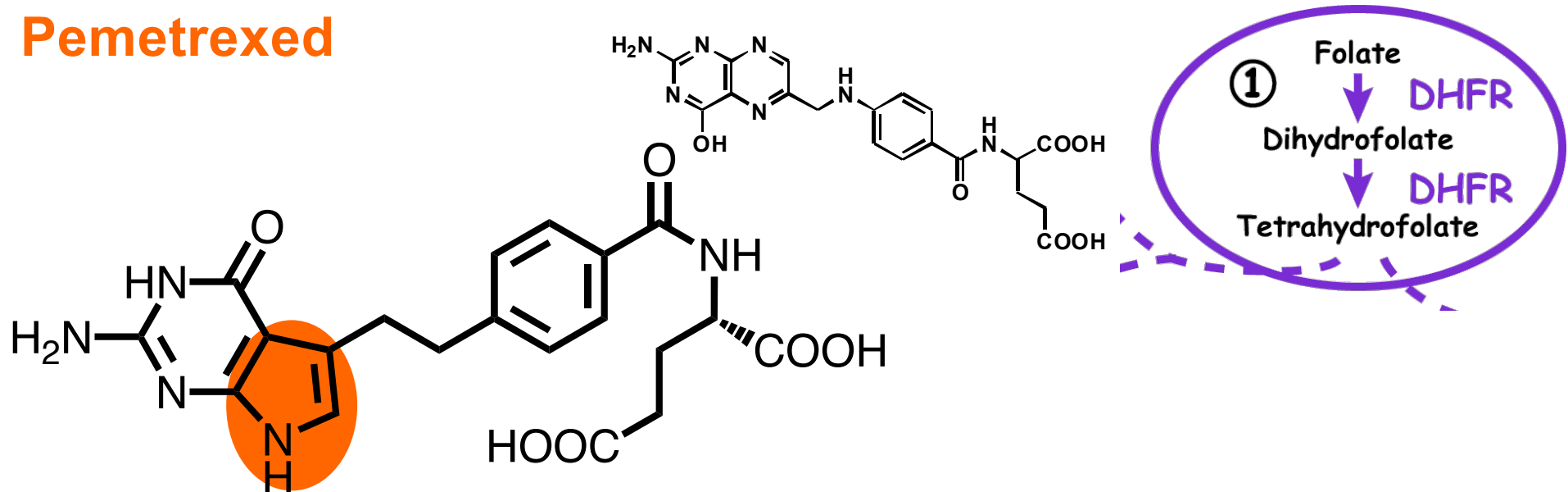
- **INIBITORE potente e selettivo della DHFR**
- **Analogo dell'acido folico**

Resistenza:

- Diminuzione del trasporto intracellulare
- Modificazione del sito attivo della DHFR
- Aumento della produzione di DHFR
- Aumento dei sistemi di efflusso

Antimetaboliti

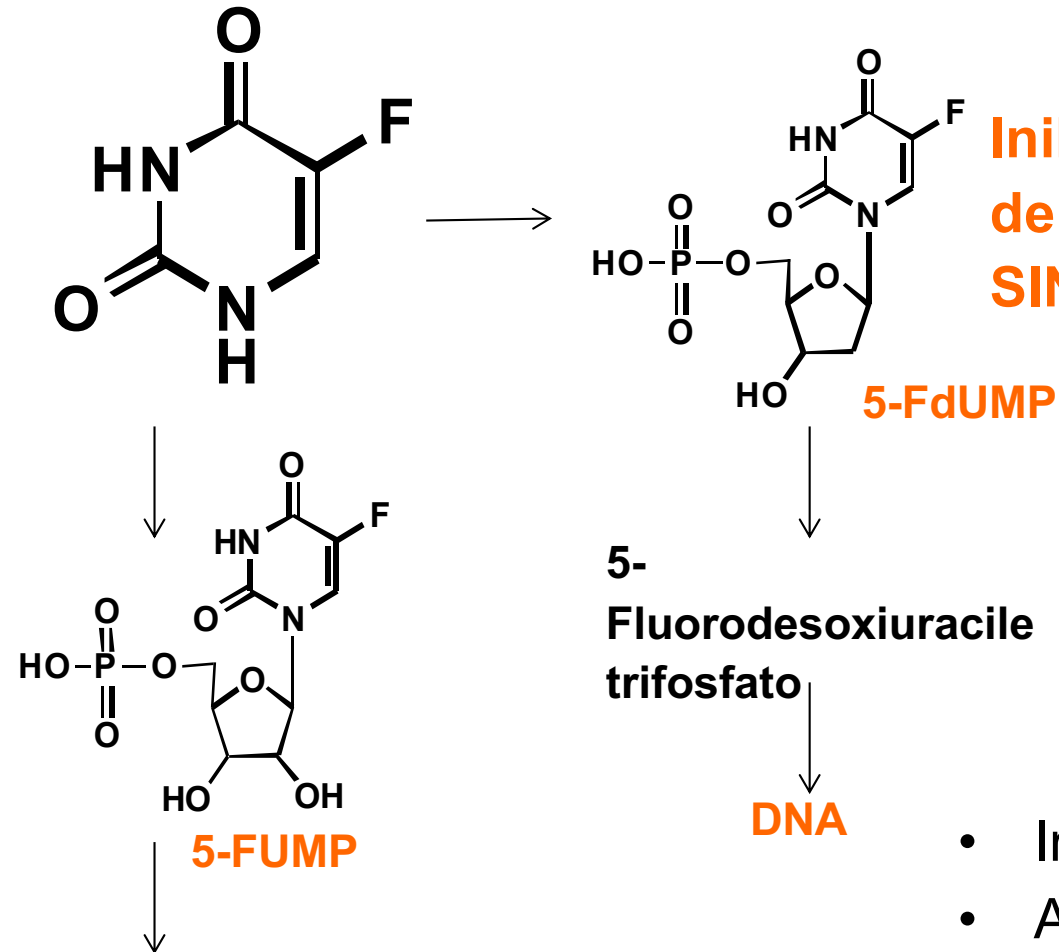
Pemetrexed



- **Derivato pirrolico con attività verso altri enzimi folato-dipendenti**
- Somministrazione ev
- Approvato nel 2004
- Mesotelioma pleurico
- Carcinoma polmonare non a piccole cellule

Antimetaboliti

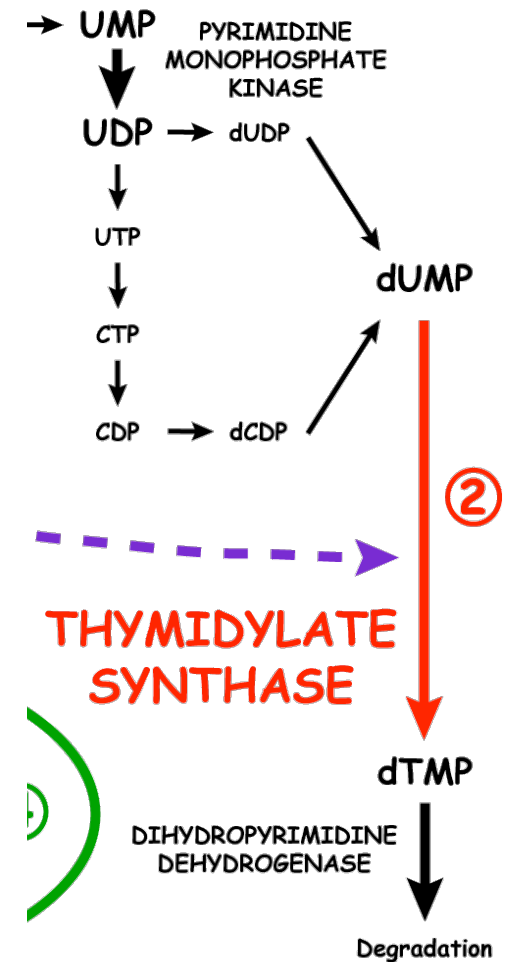
Analoghi pirimidinici: 5FU



5-Fluorouracile trifosfato → RNA

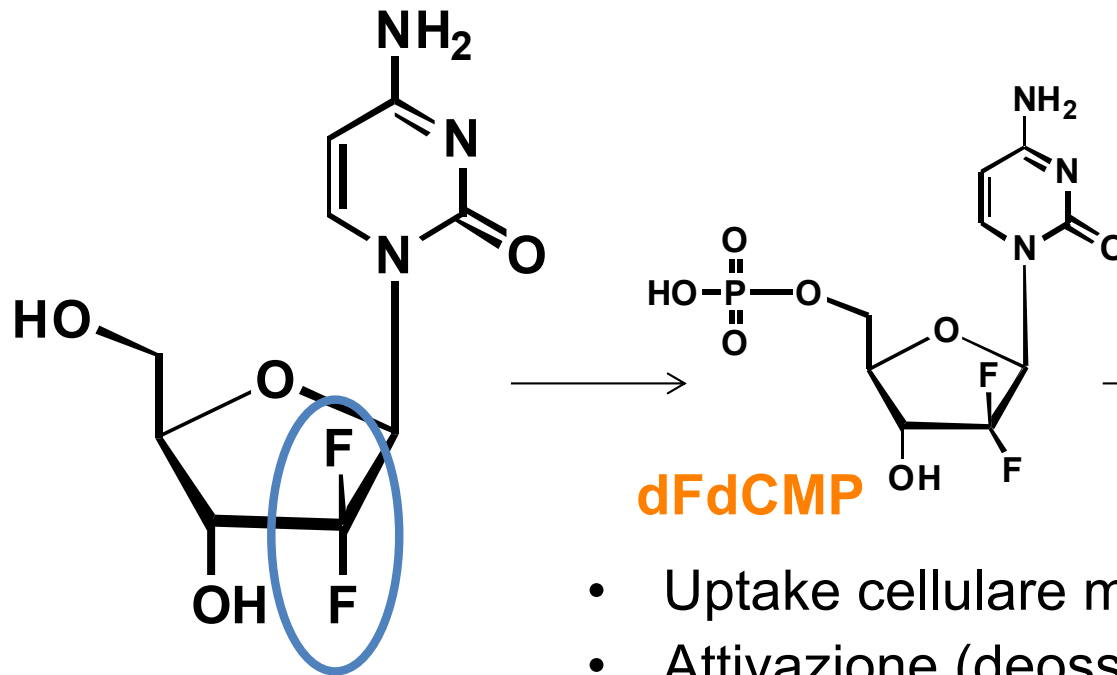
Inibitore suicida della TIMDILATO SINTASI

- Incorporazione nel DNA e nell'RNA
- Attività citotossica

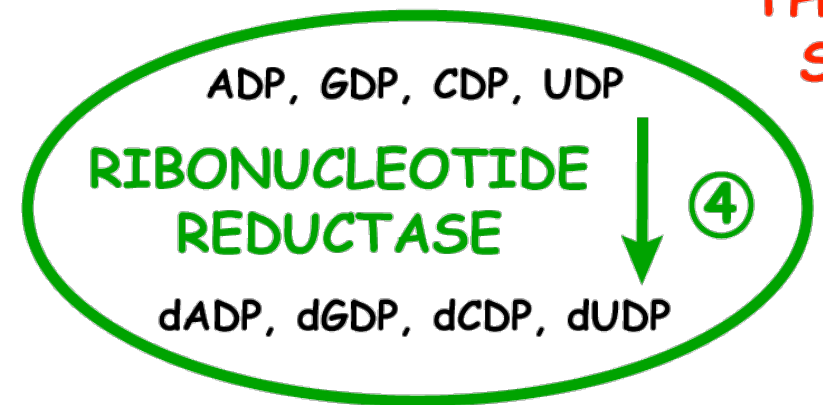


Antimetaboliti

Analoghi Pirimidinici: Gemcitabina



**Gemcitabina,
dFdC**



dFdCDP

dFdCTP

dFdCMP

- Uptake cellulare mediato da trasportatore
- Attivazione (deossicitidina chinasi)
- Inibizione della ribonucleotide reduttasi (dFdCDP)
- Incorporazione nel DNA (dFdCTP)
- Resistenza: alterazioni del sistema di attivazione
- Resistenza: aumento della produzione di ribonucleotide reduttasi

Microtubuli quali target

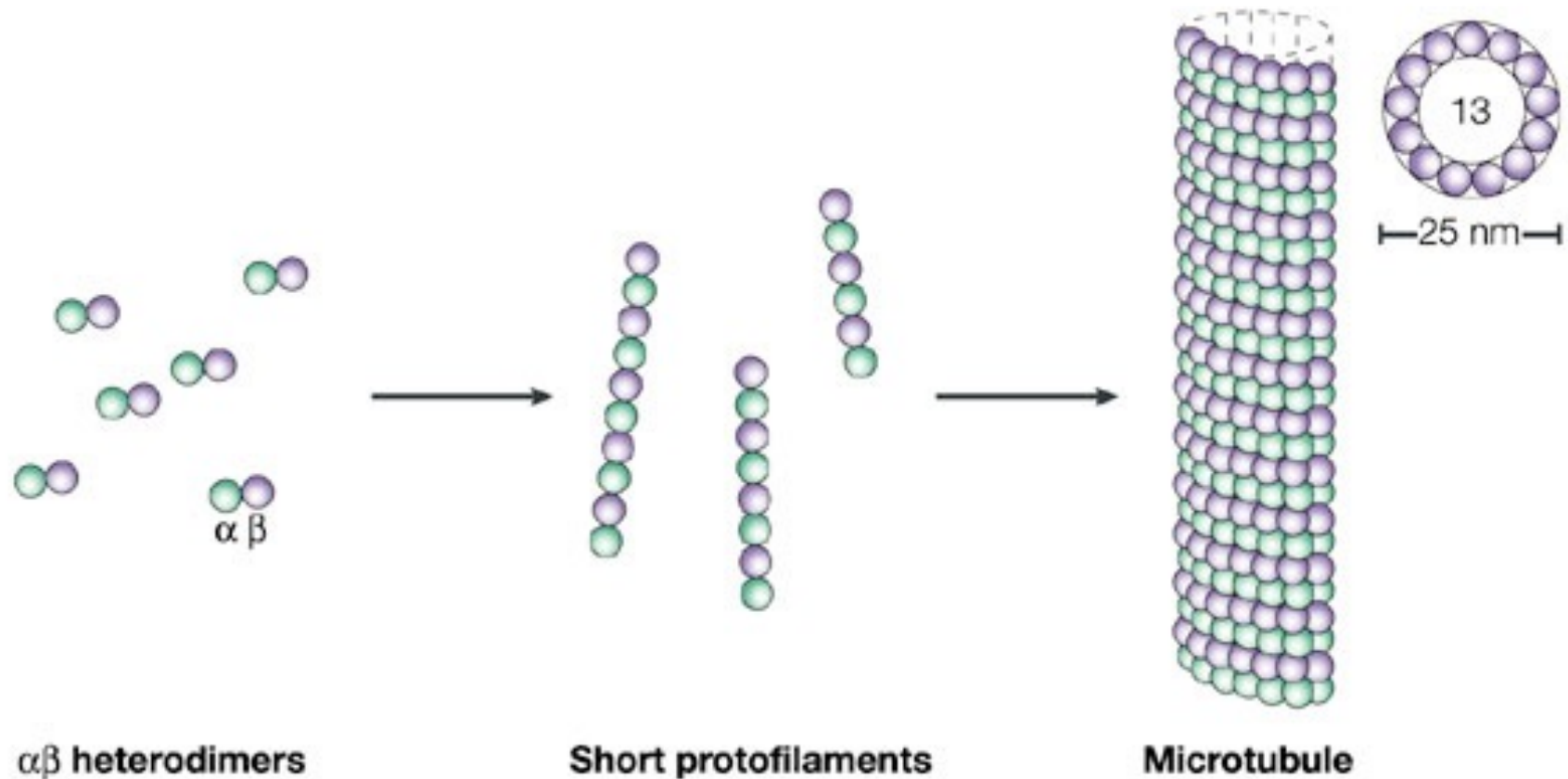
Microtubuli

- **Proteine filamentose**
- **Dimeri di α -tubulina e β -tubulina**
- **Funzione strutturale**
- **Coinvolti in diversi processi cellulari (mitosi, trasporto)**
- **Estremità + (β -tubulina) ed estremità – (α -tubulina)**

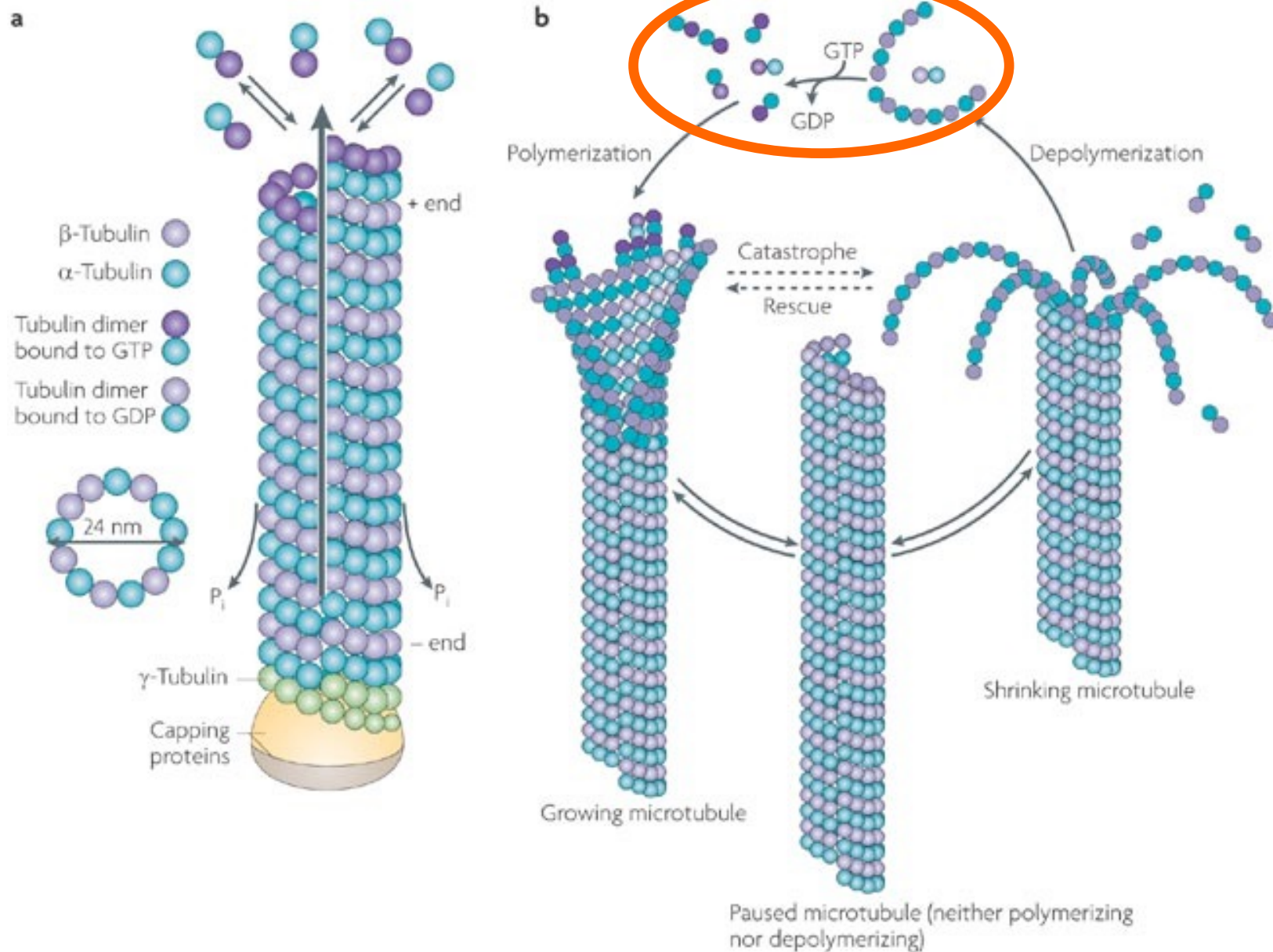
- **Molecole che alterano struttura e funzione dei microtubuli**
- **Blocco mitosi**
- **Apoptosi**
- **Specifici per la fase M**

Microtubuli quali target

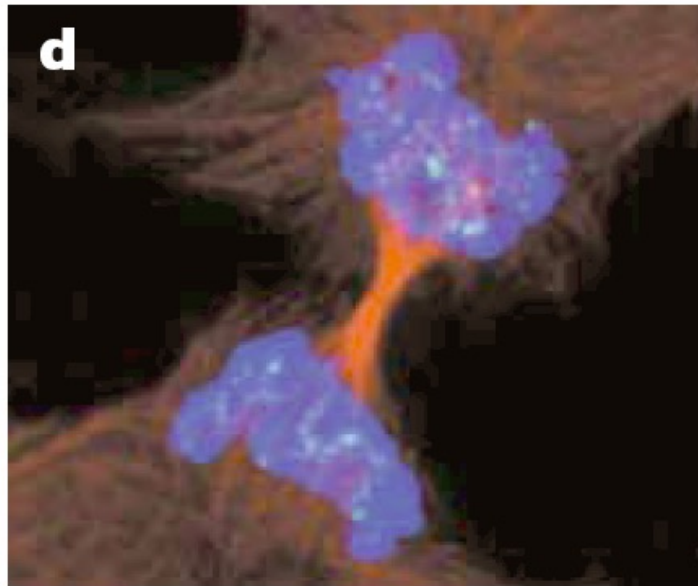
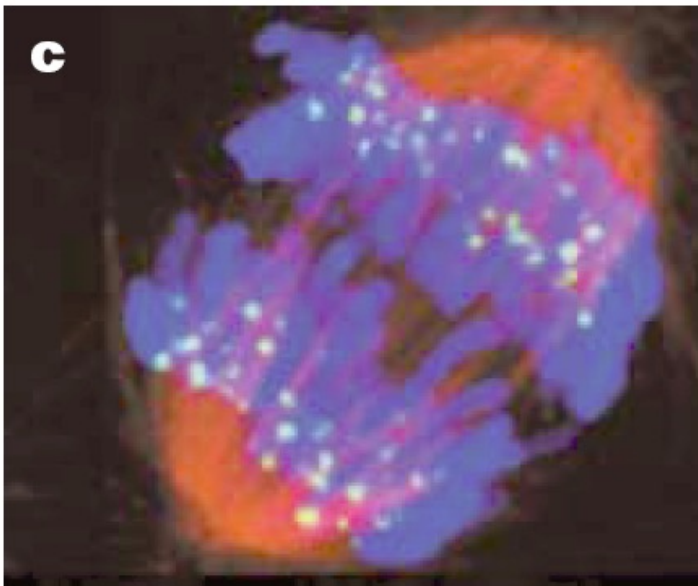
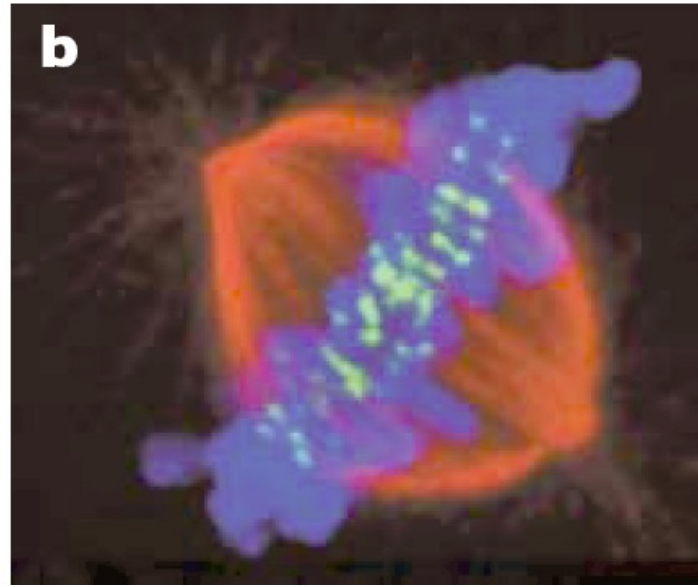
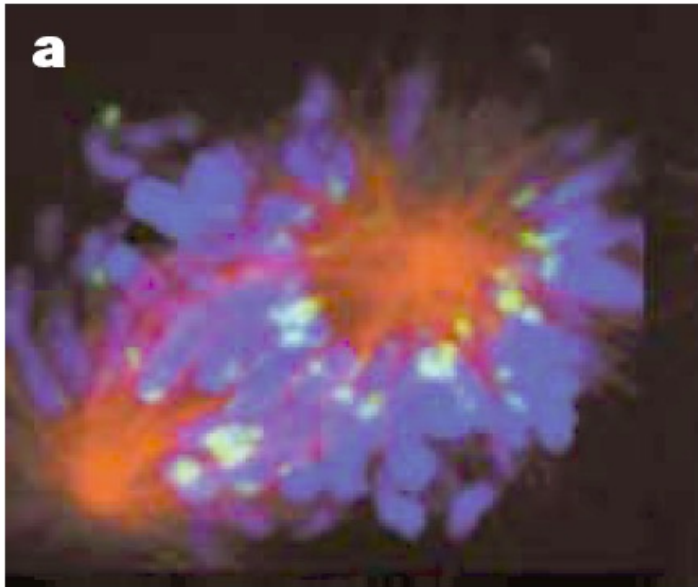
Microtubuli



Microtubuli quali target

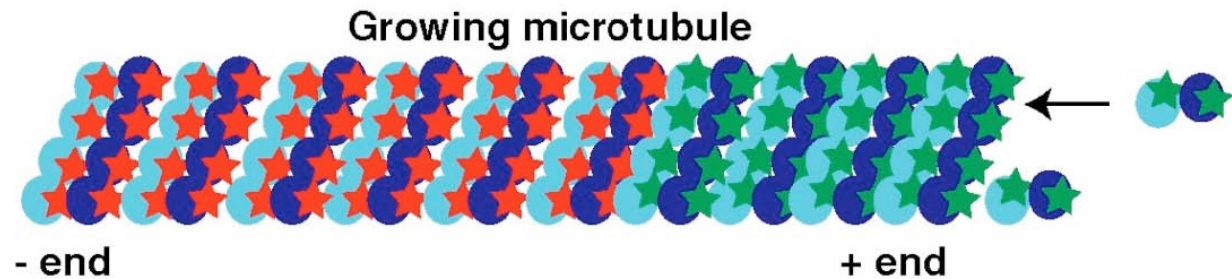


Microtubuli quali target

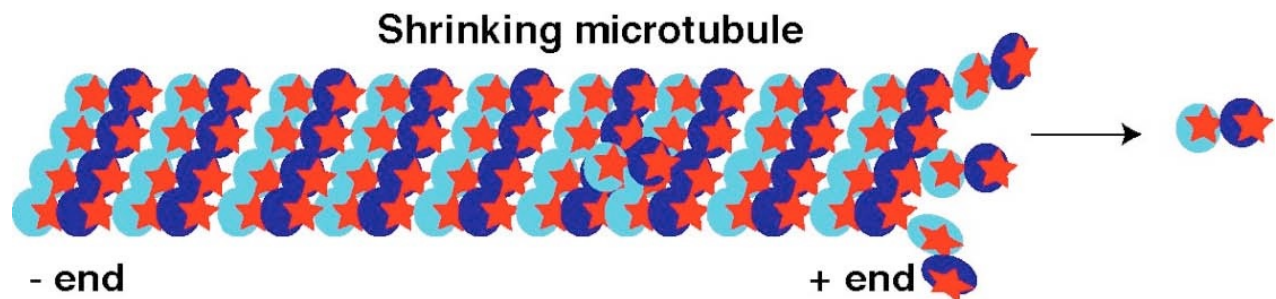
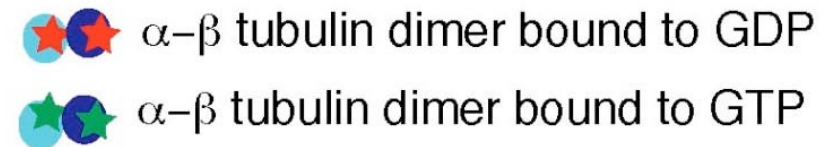


Microtubuli quali target

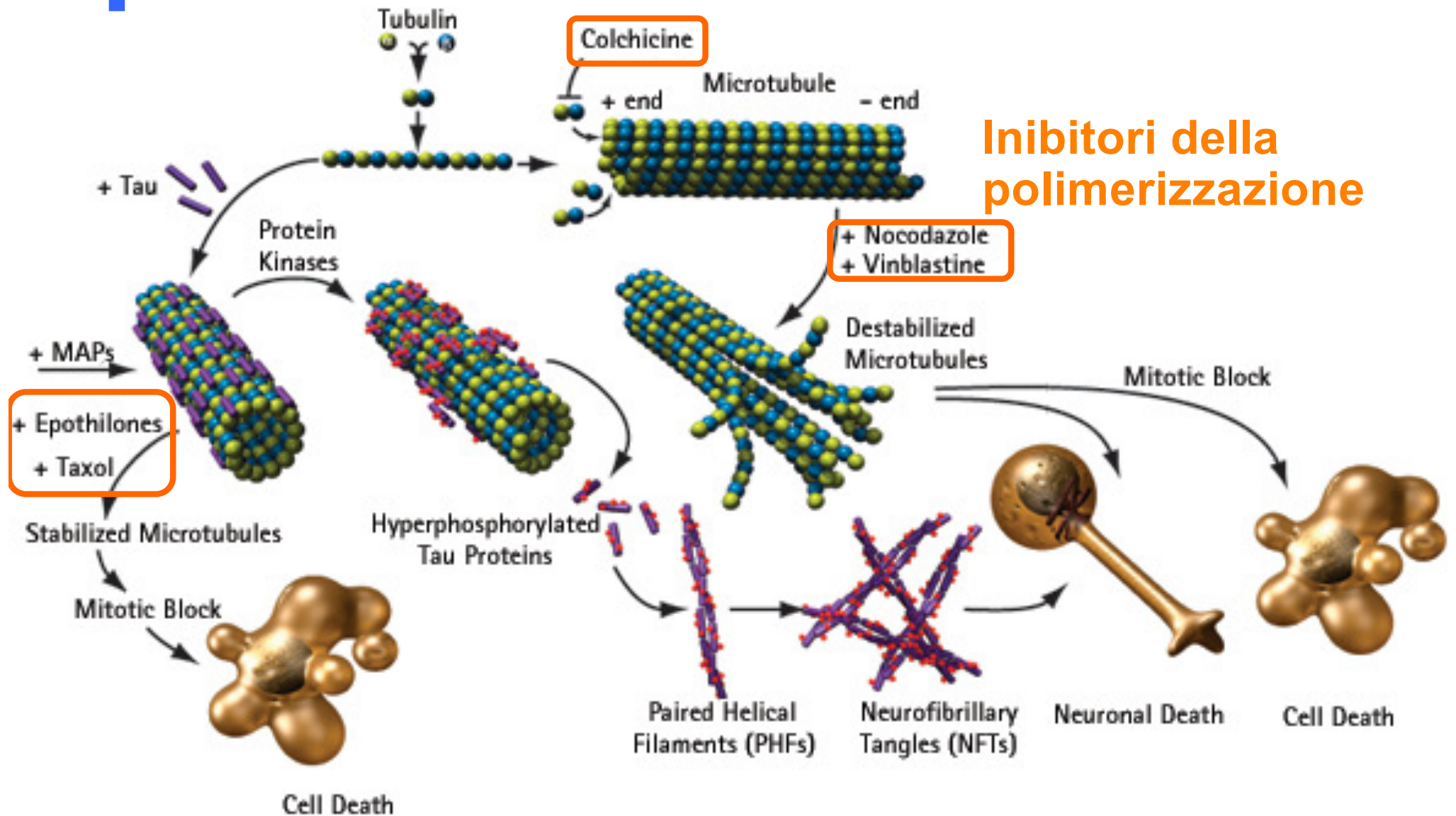
Sistema dinamico



- Assemblaggio e dissamblaggio
- Estremità: elongazione e accorciamento
- Estremità positiva e negativa
- Estremità positiva
 - Crescita e accorciamento più veloci della negativa



Microtubuli quali target



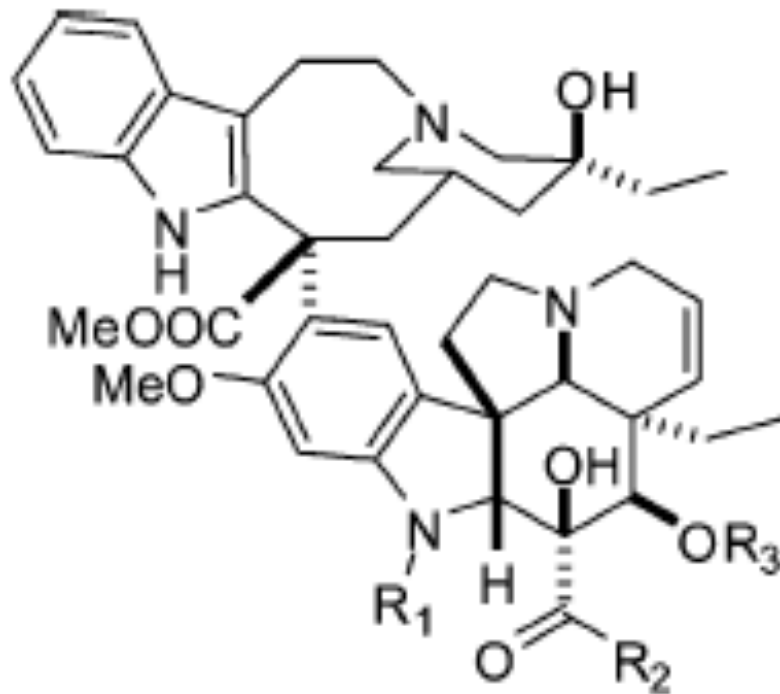
Inibitori della polimerizzazione

Attivatori della polimerizzazione

Antitumorali

Microtubuli quali target

Alcaloidi della vinca

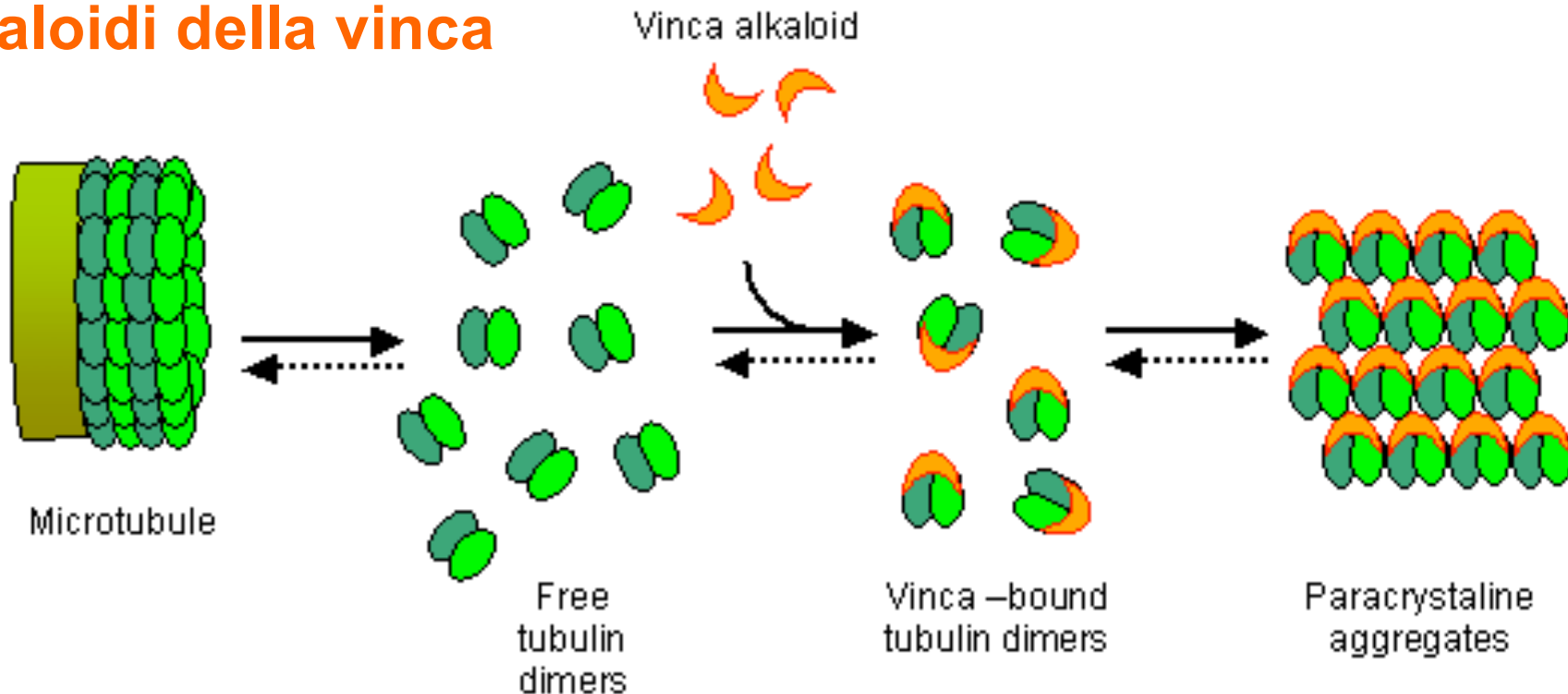


- *Vinca rosea*
- **Vinblastina**
- **Vincristina**
- **Vindesina**

	R ₁	R ₂	R ₃
vinblastine	Me	OMe	COMe
vincristine	CHO	OMe	COMe
vindesine	Me	NH ₂	H

Microtubuli quali target

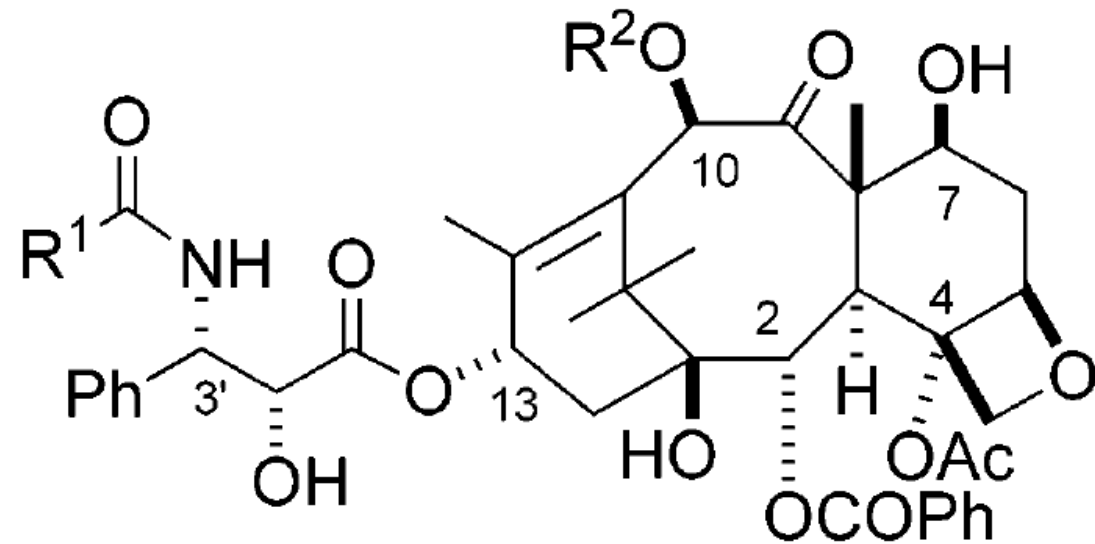
Alcaloidi della vinca



- Complesso farmaco-tubulina
- Microfilamento piegato
- Variazione della polimerizzazione (analogia colchicina)
- Depolimerizzazione dei microtubuli ad alte concentrazioni
- Stabilizzazione della dinamica a basse concentrazioni

Microtubuli quali target

Tassolo



1a $R^1 = \text{Ph}$, $R^2 = \text{Ac}$

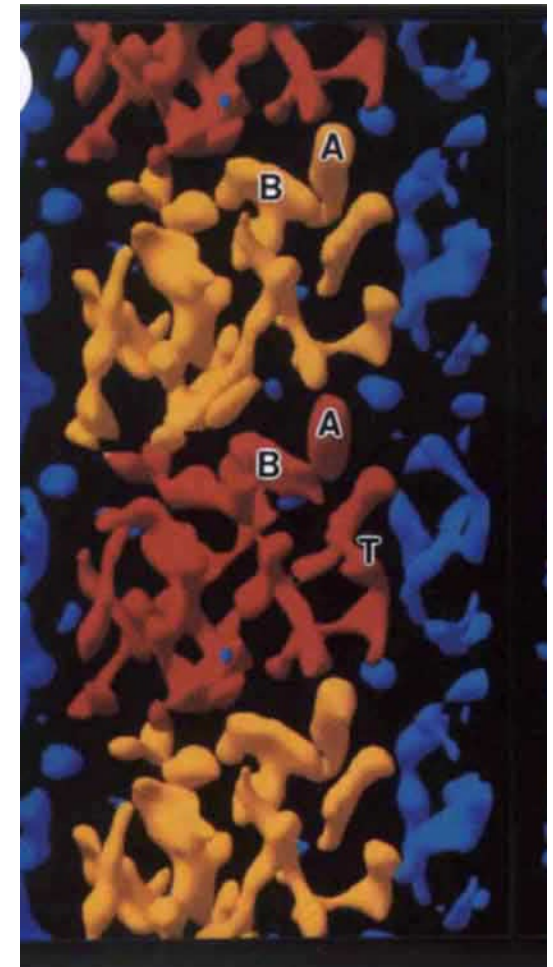
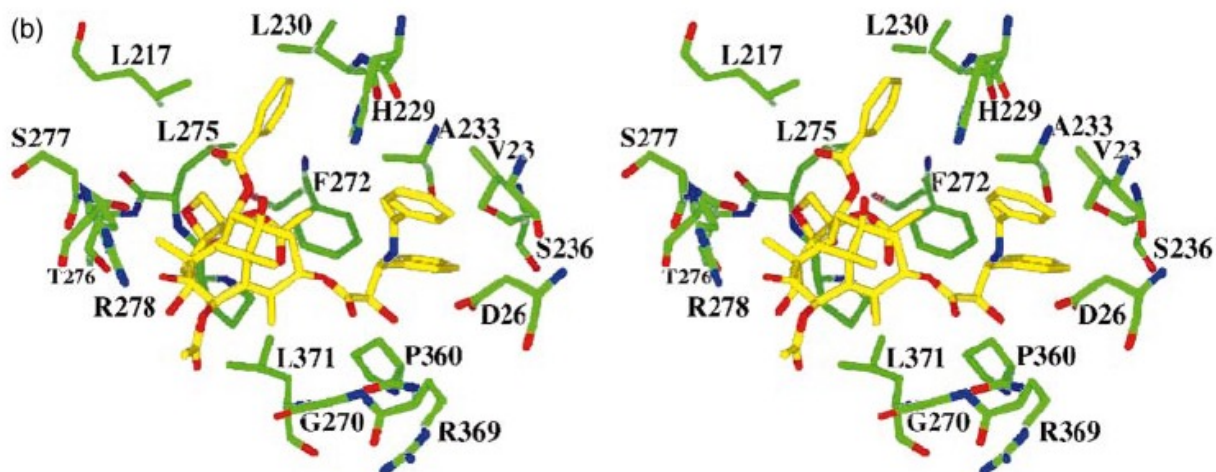
1b $R^1 = \text{Me}_3\text{CO}$, $R^2 = \text{H}$

- *Taxus brevifolia*
- Paclitaxel
- Docetaxel (semisintetico)

Microtubuli quali target

Tassolo

- Aumento stabilizzazione e polimerizzazione dei microtubuli
- Blocco delle cellule in fase G2 / M
- Legame sulla subunità α della tubulina polimerizzata



Classificazione dei chemioterapici antitumorali

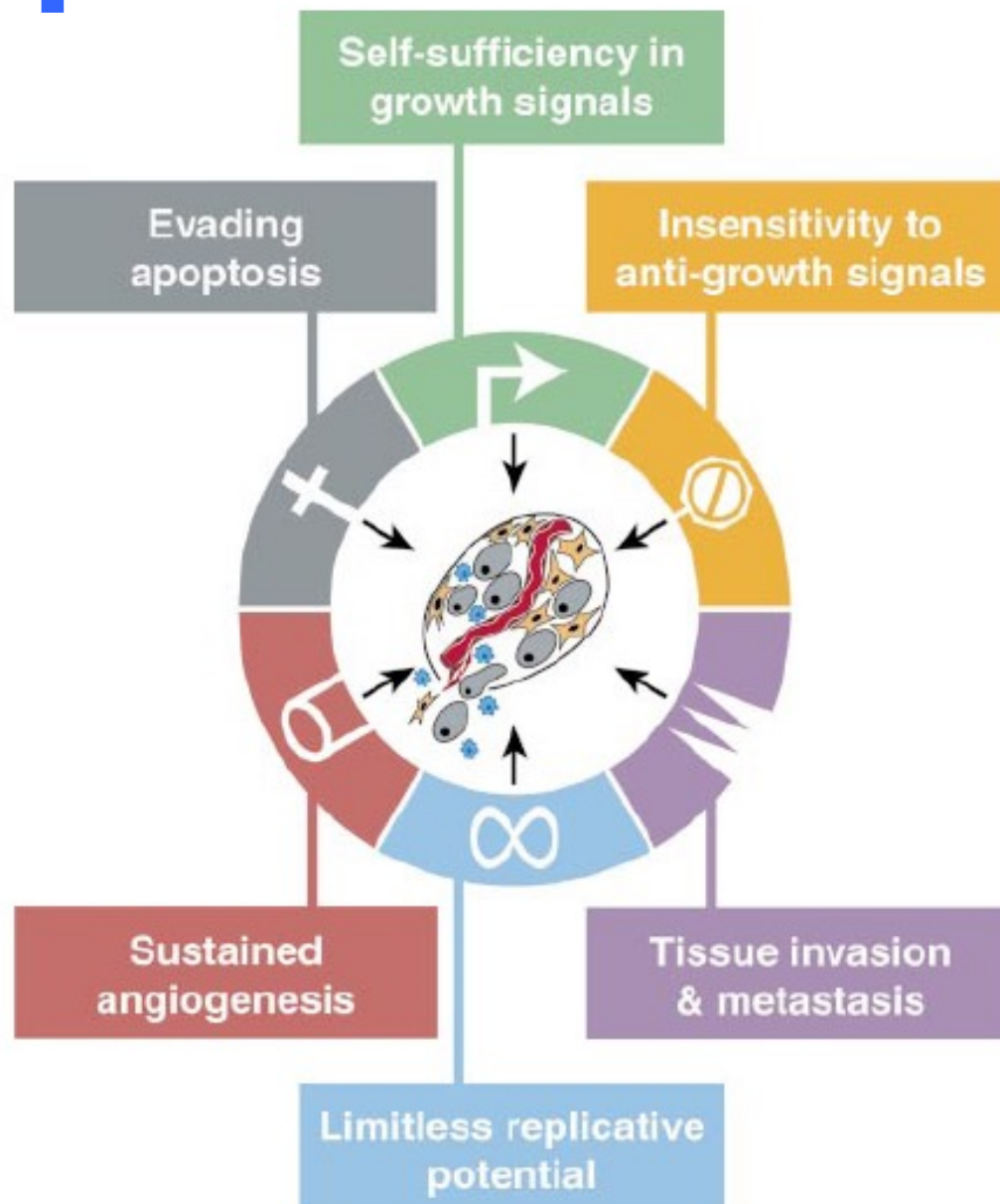
Chemioterapici antitumorali classici

- Agenti alchilanti
- Intercalanti
- Antimetaboliti
- Terminatori di catena
- Inibitori della topoisomerasi
- Antimitotici

Farmaci a bersaglio molecolare (“*Target therapy*”)

- Farmaci diretti in modo specifico contro molecole coinvolte nel processo di carcinogenesi (sviluppo o proliferazione)
- Approccio antigene e antisense
- Anticorpi monoclonali
- Piccole molecole

Farmaci a bersaglio molecolare



Chemioterapia convenzionale:

- Sviluppo di agenti citotossici

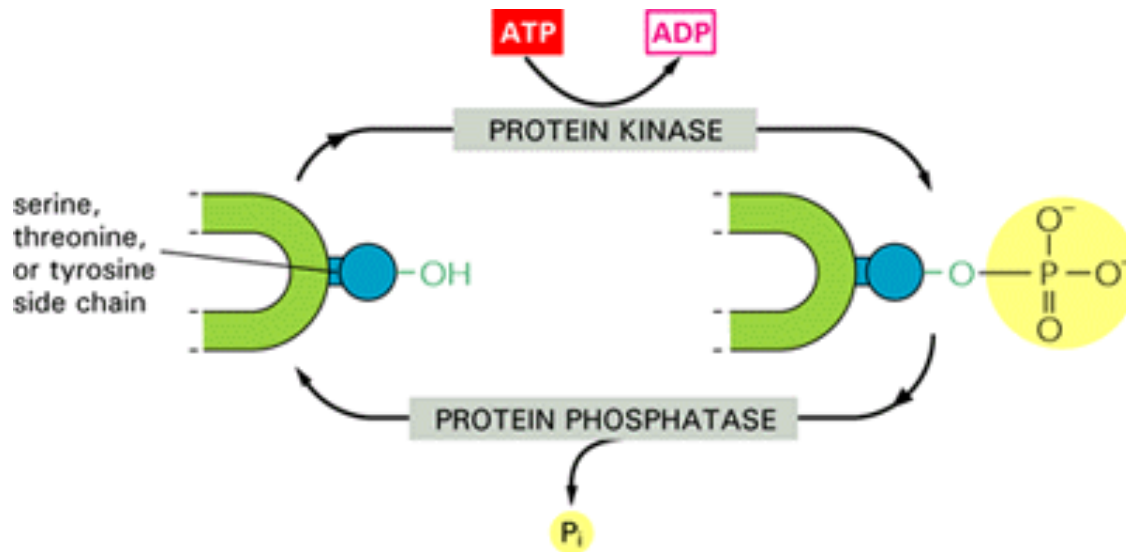
Target therapy:

- **Colpire macromolecole alterate in specifici processi neoplastici**
- **Blocco di processi cellulari associati allo sviluppo del tumore**

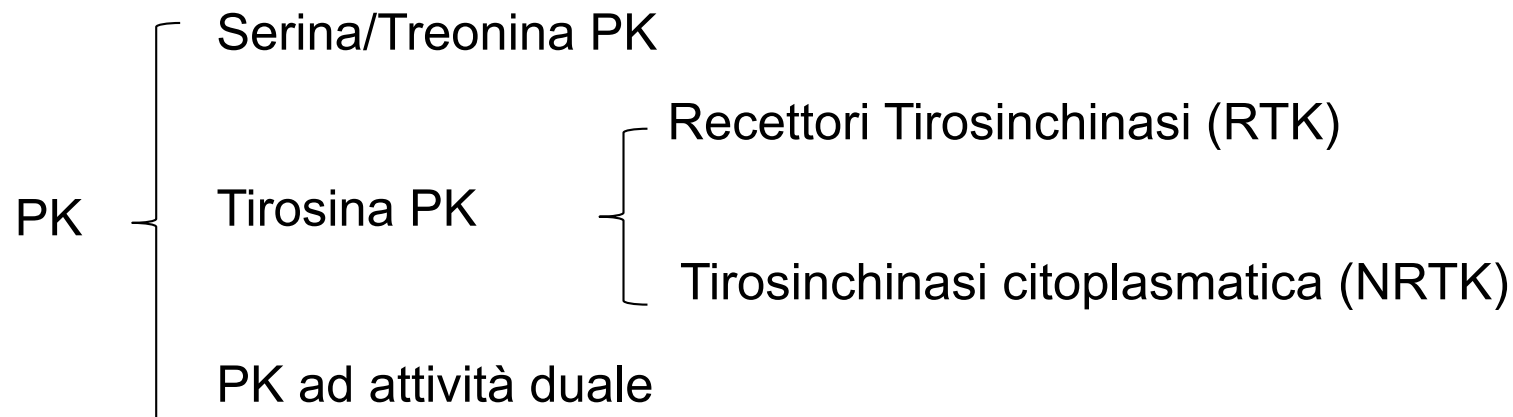
Approcci principali:

- **MAb**
- **Small molecules**

Protein-chinasi (PKs)



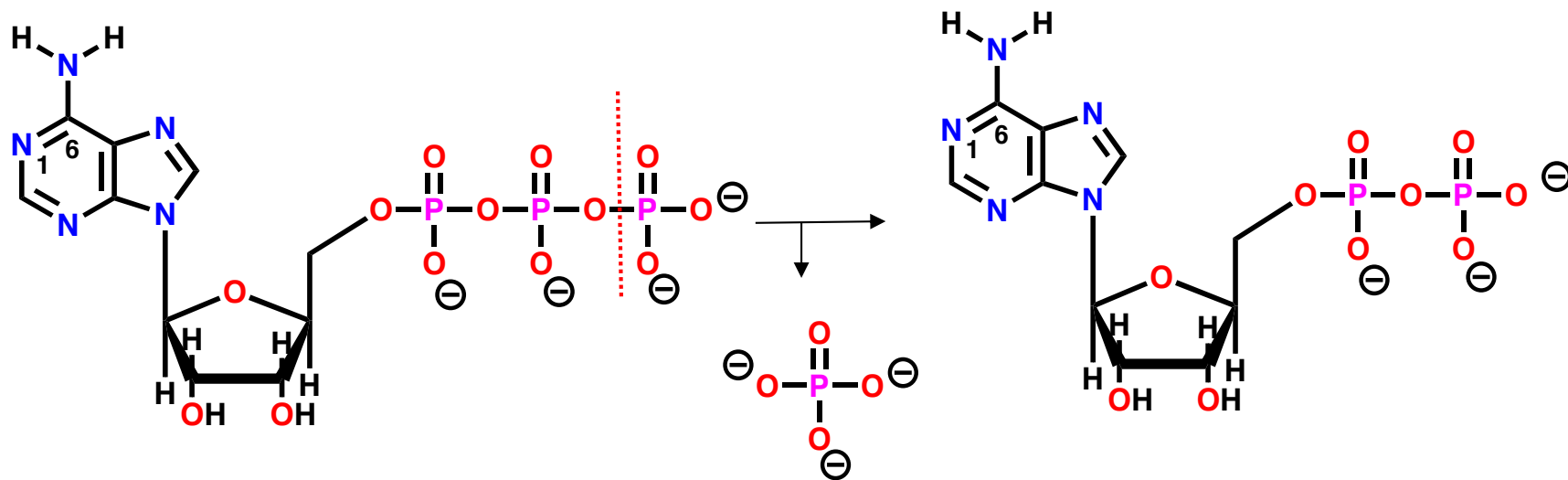
Classificazione



- Fosforilazione
 - importante modifica post-traduzionale
- Identificate più di 500 PK
- PK: 3 siti
 - un sito di legame per l'ATP
 - uno per il substrato
 - un dominio catalitico
- Sito di legame ATP: simile ma non identico in tutte le PK
- Possibile selettività d'inibizione

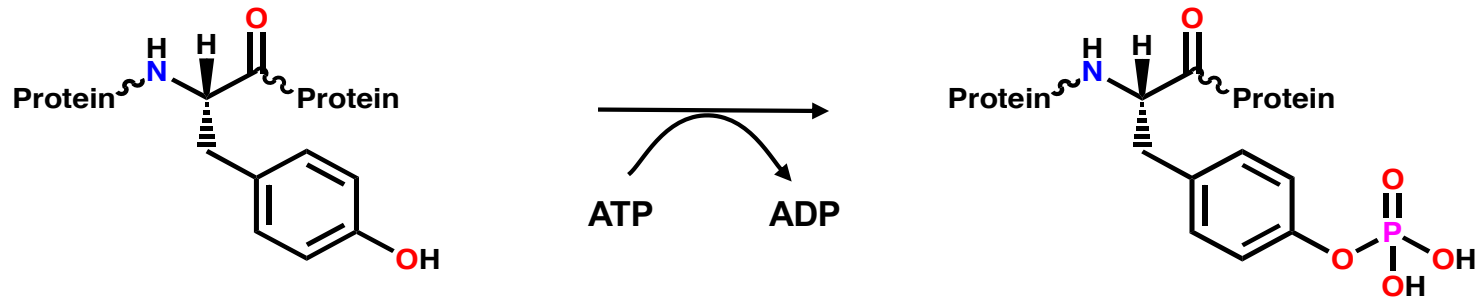
Protein-chinasi (PKs)

- Enzimi: reazioni di fosforilazione su proteine
- 500-2000 protein chinasi per cellula
- Citoplasmatici
- Recettori (doppio ruolo)
- Over-espressione: fattore tumorale
- ATP: cofattore - agente fosforilazione

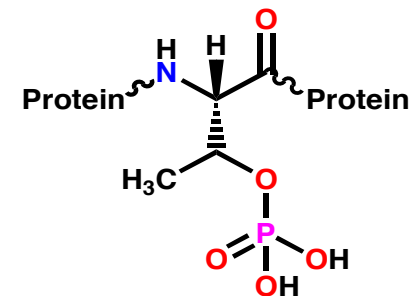
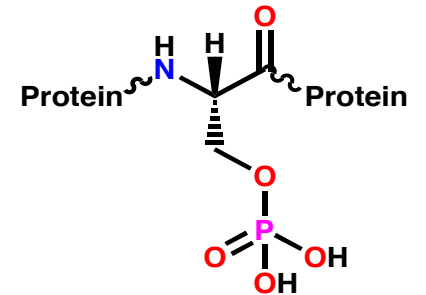
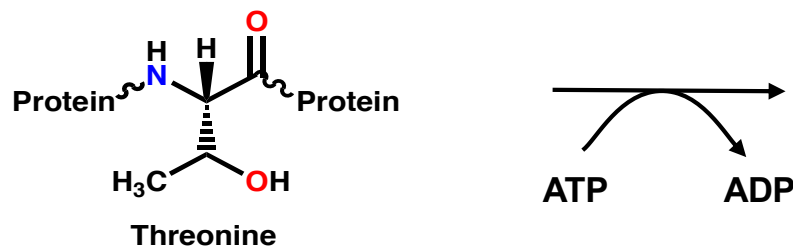
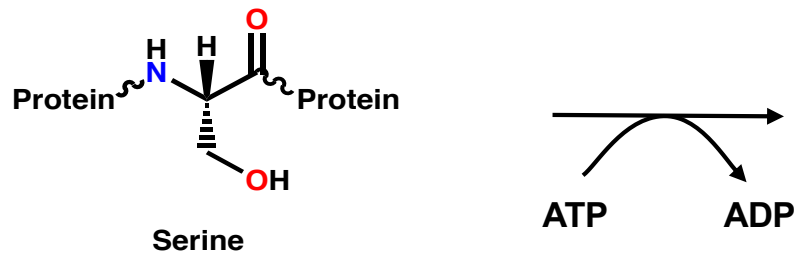


Protein-chinasi (PKs)

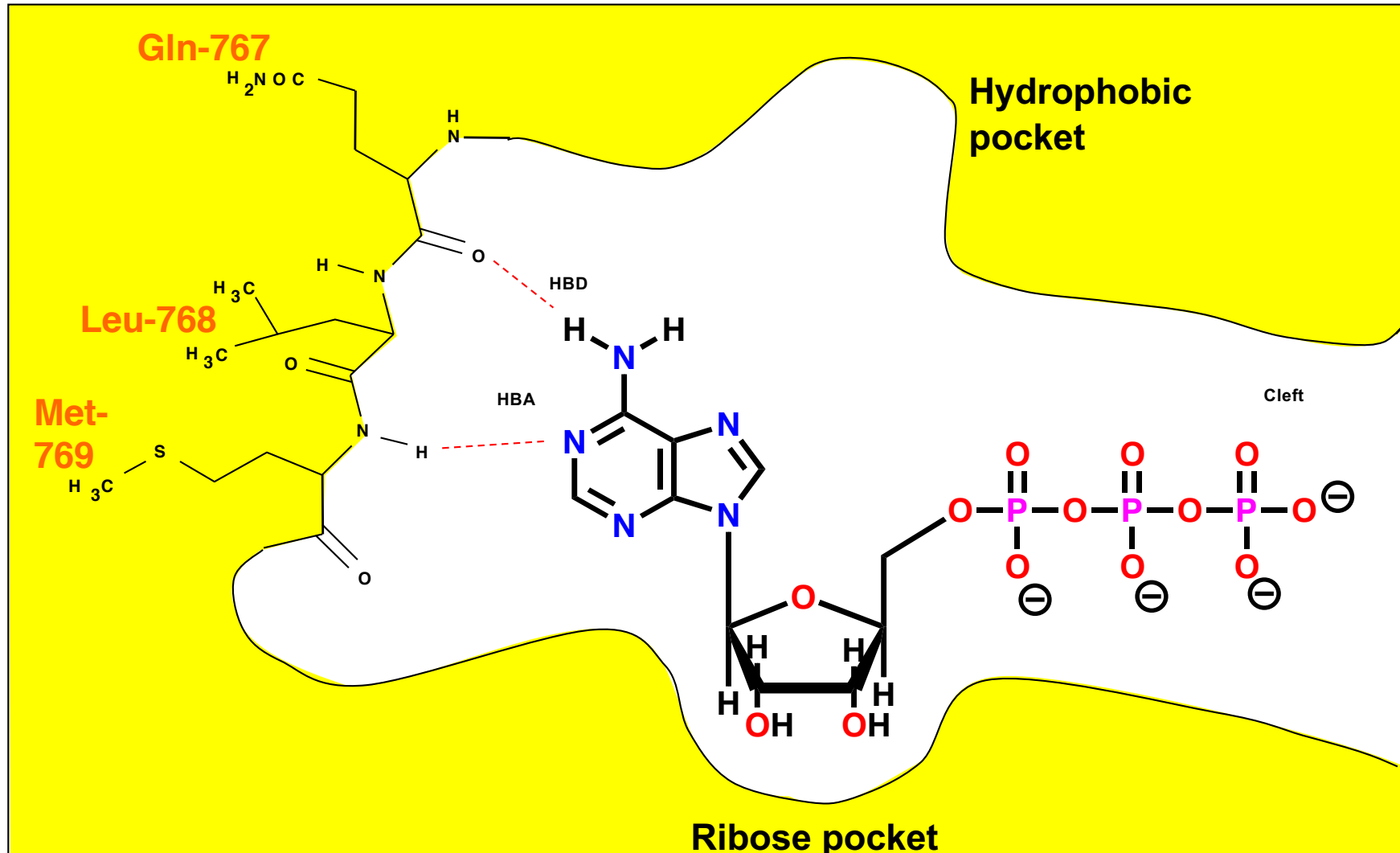
Tirosin chinasi



Serina-treonina chinasi

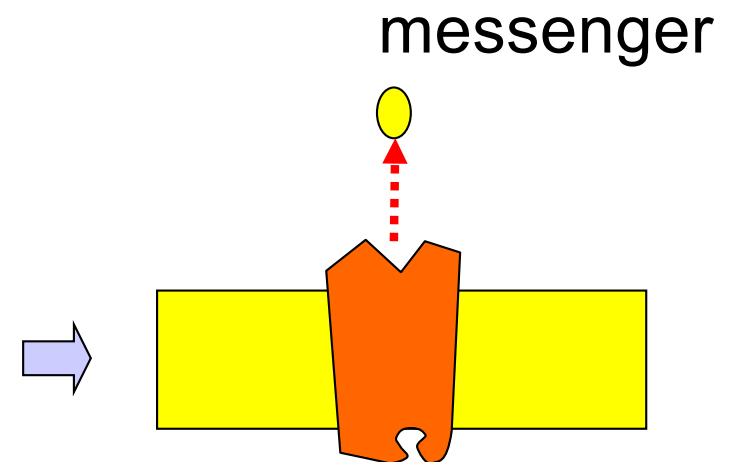


Protein-chinasi (PKs)

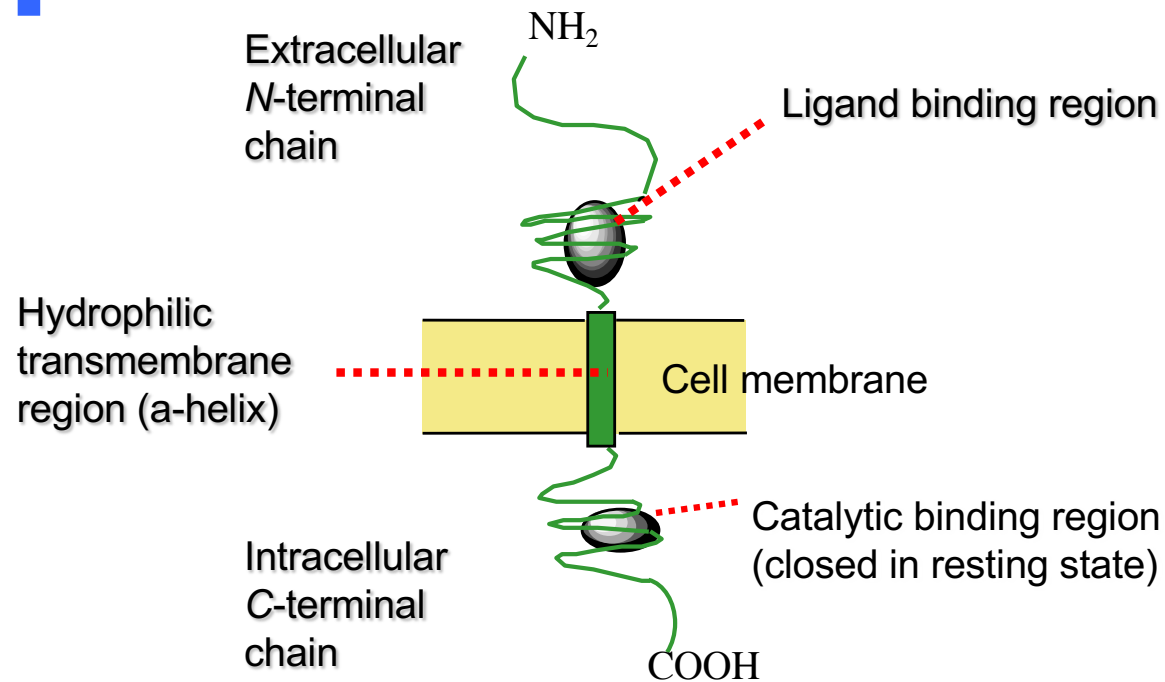


Recettori legati alle Protein-chinasi

- Doppio ruolo della proteina: recettore ed enzima
- **Attivazione da parte di ormoni**
- Recettore-messaggero: attivazione mediante induced fit
- Apertura del sito attivo
- Reazione catalizzata intracellularmente
- Sovraespressione correlata a molte malattie tumorali



Recettori legati alle Protein-chinasi

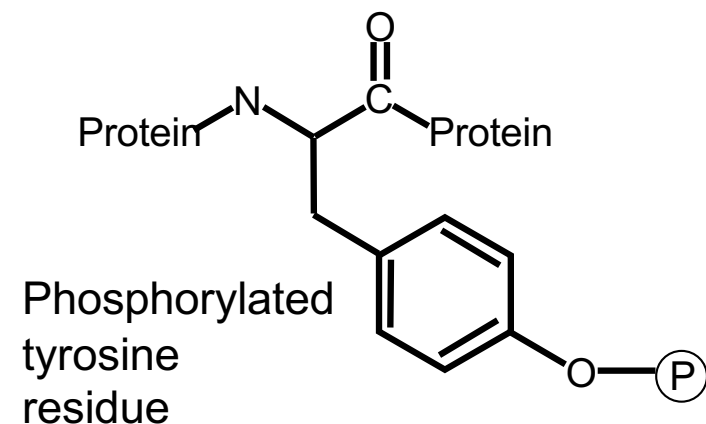
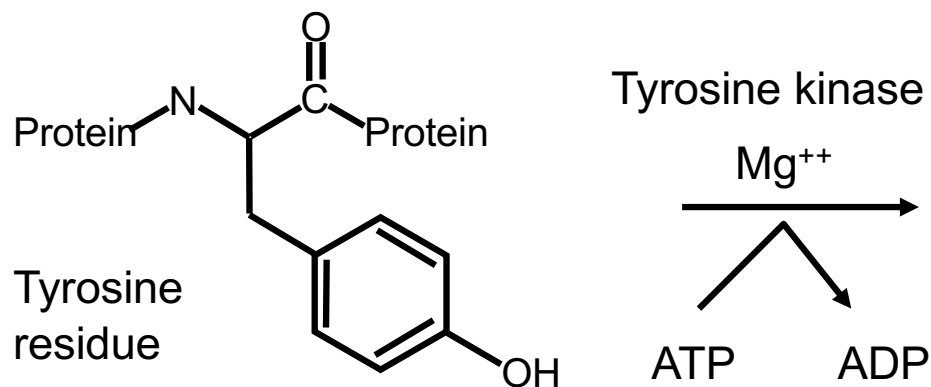


Famiglia ErbB o EGFR

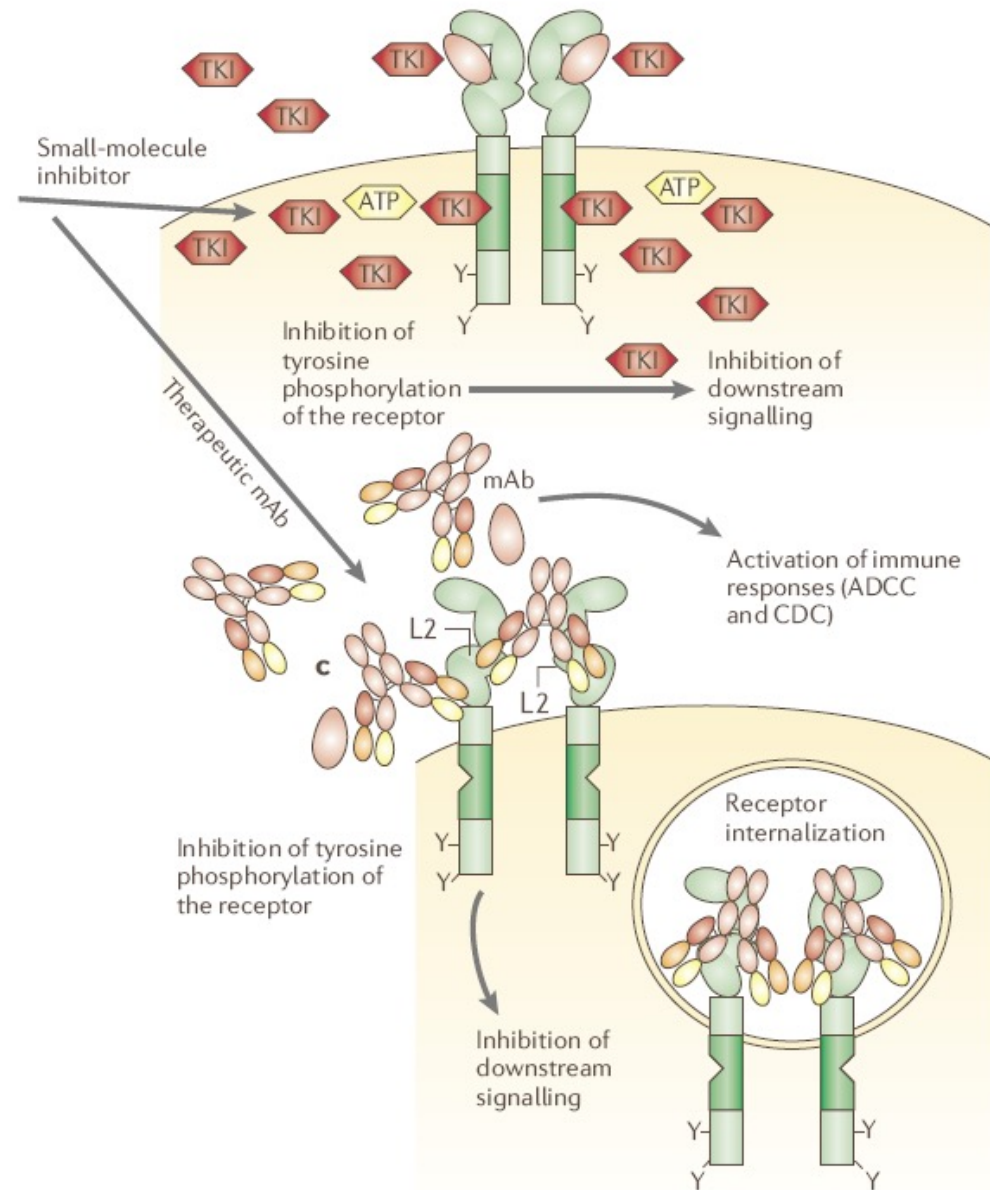
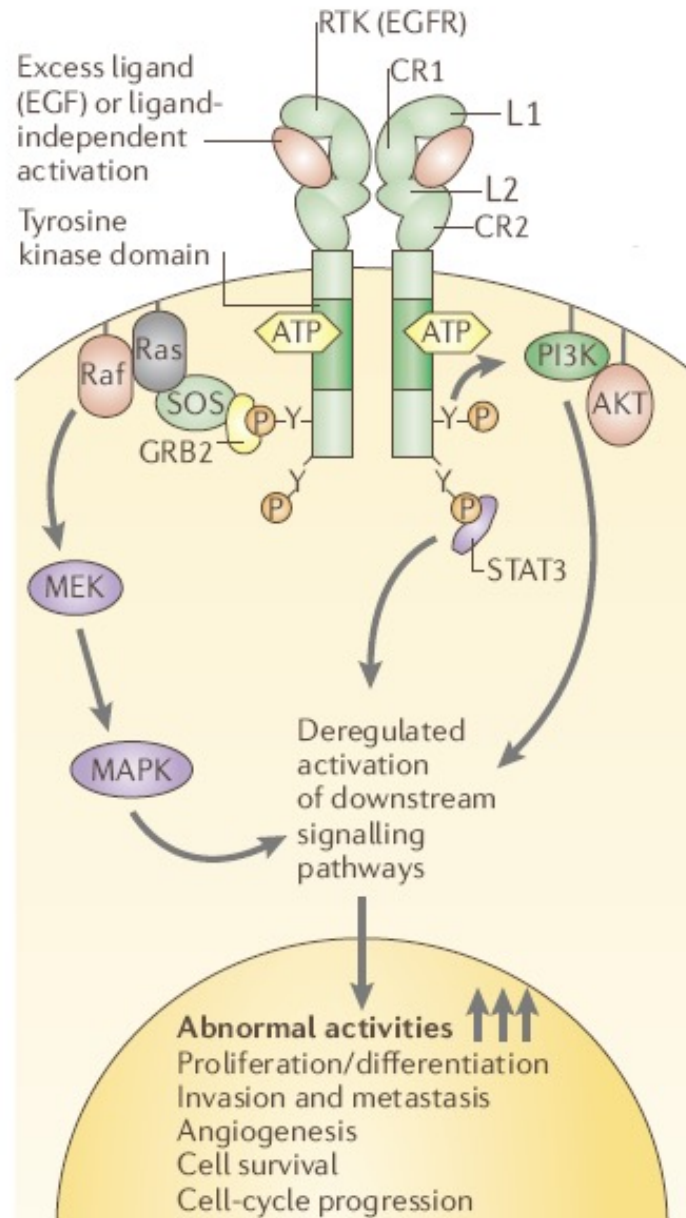
(*Epidermal Growth Factor Receptor*): associata a diversi tipi di tumore (ErbB-1 e ErbB-2)

Famiglia VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*):

VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR/Flk-1), VEGFR-3 (Flt-4) sono associati alla vasculogenesi e angiogenesi



PKs



Inibitori delle TKs

- **Inibitori di tipo I:** agiscono sulla **conformazione attiva** dell'enzima
- Inibitori di tipo I: **si legano al sito dell'ATP** bloccando l'accesso all'ATP
- **Inibitori di tipo II:** agiscono sulla **conformazione inattiva** dell'enzima
- Inibitori di tipo II: stabilizzano la conformazione inattiva dell'enzima
- Inibitori di tipo II: possono essere più selettivi
- **Inibitori di tipo III:** si legano a una tasca vicina alla sito dell'ATP inducendo uno spostamento dell'ATP
- **Inibitori di tipo IV:** allosterici (fuori dal dominio catalitico)
- **Inibitori di tipo V:** bivalenti

Inibitori di tipo I

Gefitinib, Erlotinib, SU11248, seliciclib

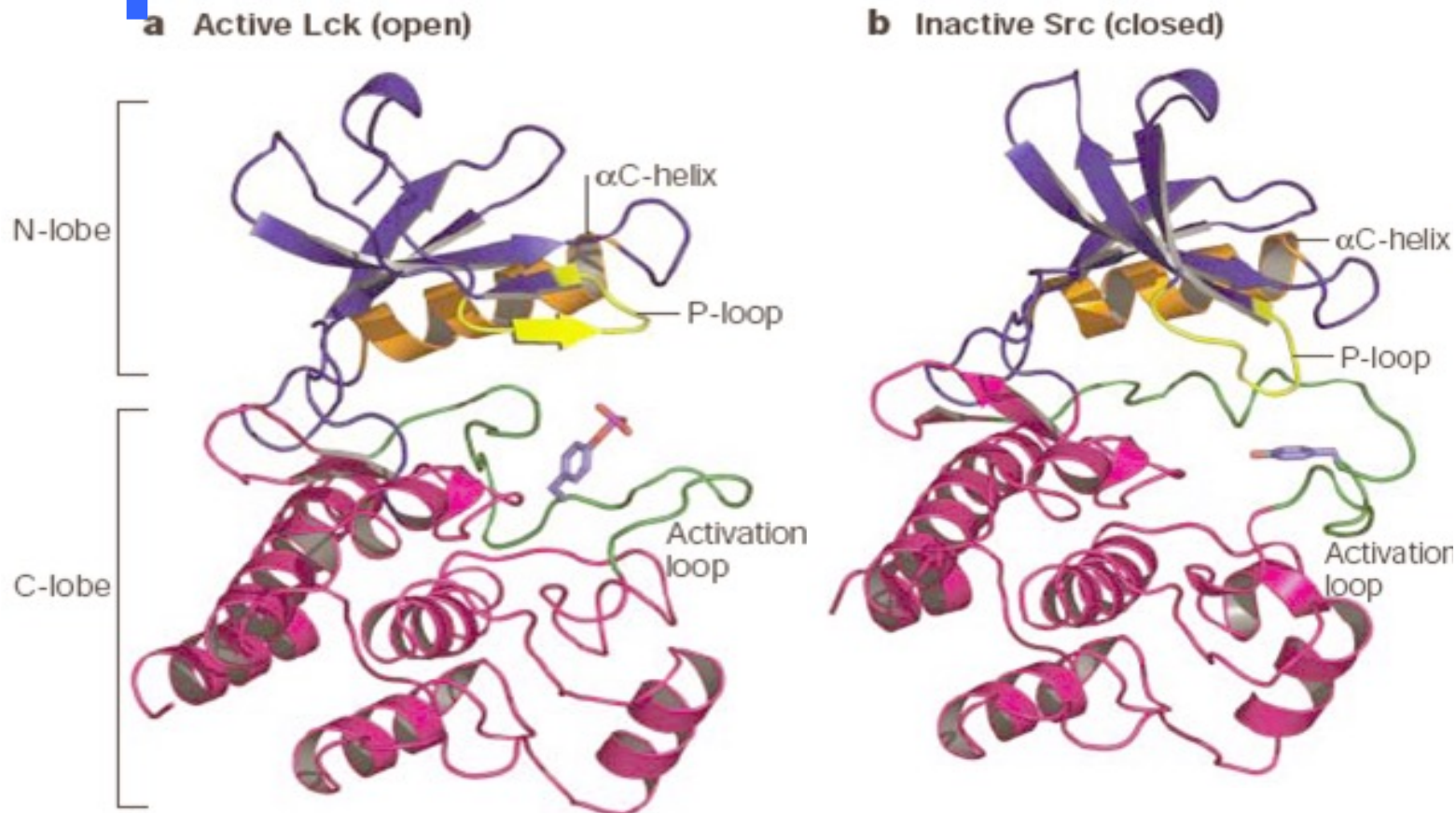
Inibitori di tipo II

Imatinib, lapatinib, sorafenib and vatalanib

Inibitori della TK citoplasmatica Bcr-Abl

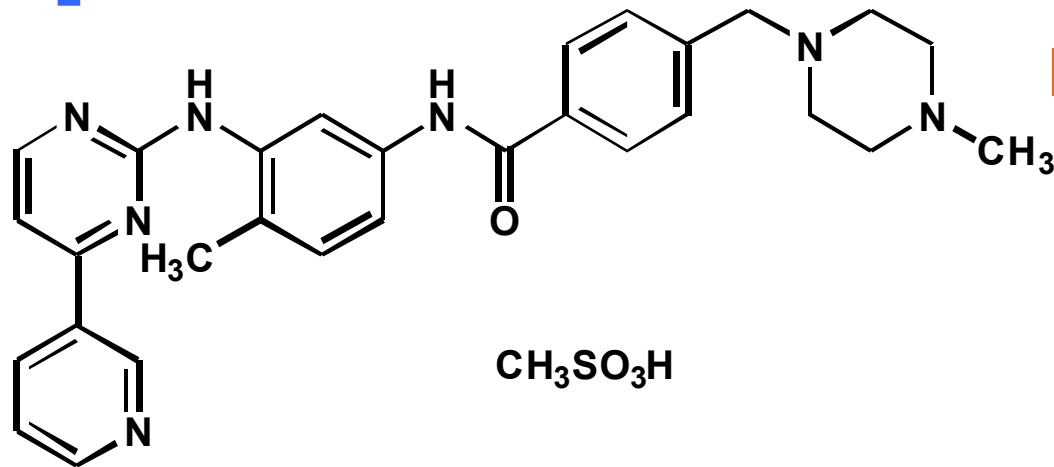
- Aberrante attività chinasi di c-Abl associata a diverse forme leucemiche
- 95% dei pazienti con leucemia mieloide cronica (CML) e il 30% con leucemia linfocitica acuta (ALL): un'anomalia genetica (cromosoma Philadelphia) con espressione di una variante costitutivamente attiva della c-Abl (Bcr-Abl)
- Espressione di Bcr-Abl con aumento della proliferazione, trasformazione morfologiche, eliminazione della dipendenza per la crescita dall'adesione o da fattori di crescita
 - Bcr-Abl: ottimo target per la terapia antitumorale

Inibitori della TK citoplasmatica Bcr-Abl



- 2 lobi (domini): lobo-N e lobo-C
- Sito di legame dell'ATP nella tasca tra i 2 lobi
- *P-loop*: contribuisce a coordinare il gruppo fosfato
- Importante anche la conformazione della elica α C
- Loop di attivazione: fondamentale per coordinazione e legame dell'ATP (motivo Asp-Phe-Gly)
- Conformazioni: aperta, stato attivo; chiusa (inattivo)

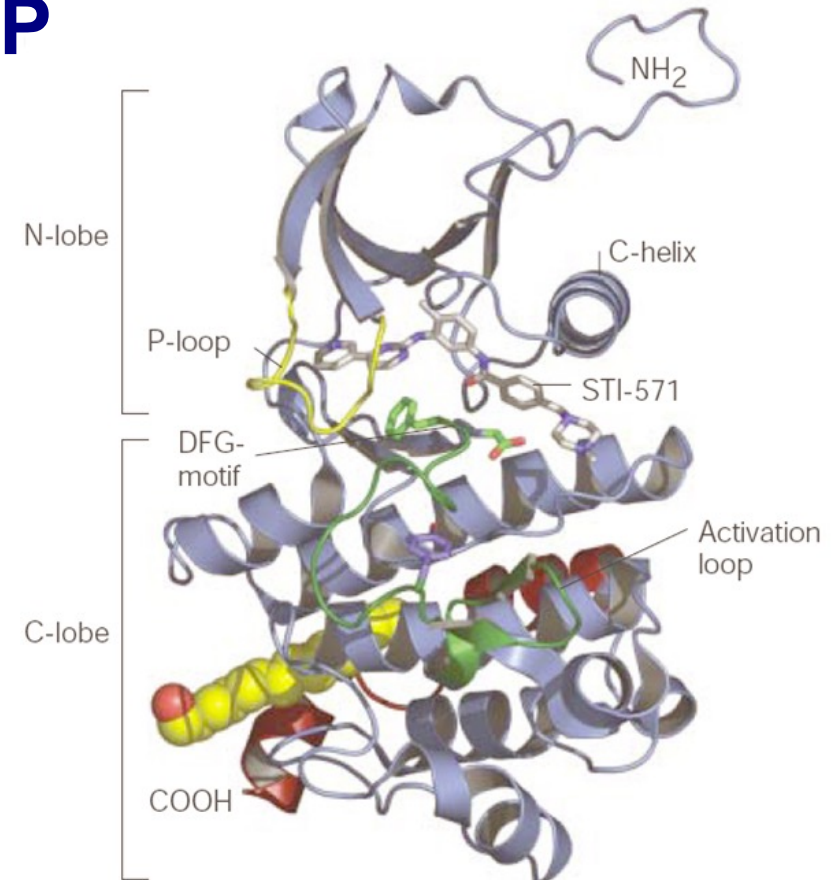
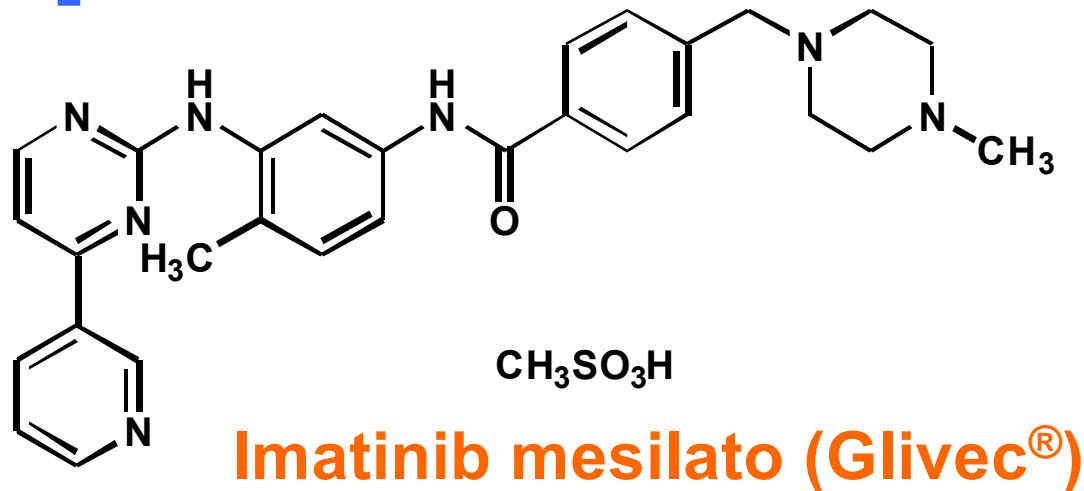
Inibitori competitivi dell'ATP



Imatinib mesilato (Glivec®)

- Dal 2001: farmaco di scelta nel trattamento della leucemia mieloide cronica (*Novartis*, disponibile PO)
- Approvato nel trattamento dei tumori stromali gastrointestinali (denominati GIST)
- Generalmente ben tollerato
- Inibizione selettiva di Bcr-Abl ($K_i=85$ nM)

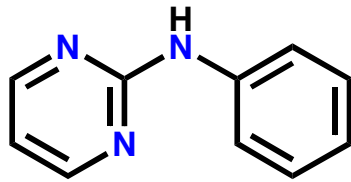
Inibitori competitivi dell'ATP



- Legame alla **conformazione inattiva**
- Blocco della stessa
- Sito di legame tra i 2 lobi: fondamentali 6 legami H e interazioni di van der Waals
- Resistenza (compare in fase avanzata)
 - Aumentata espressione della Bcr-Abl
 - Aumentata espressione della MDR-1
 - Aumento del legame con le proteine plasmatiche
 - Diminuita sensibilità dovuta a mutazioni puntiformi della Bcr-Abl

Imatinib

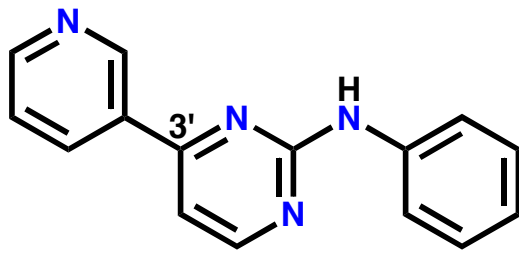
Lead compound



I

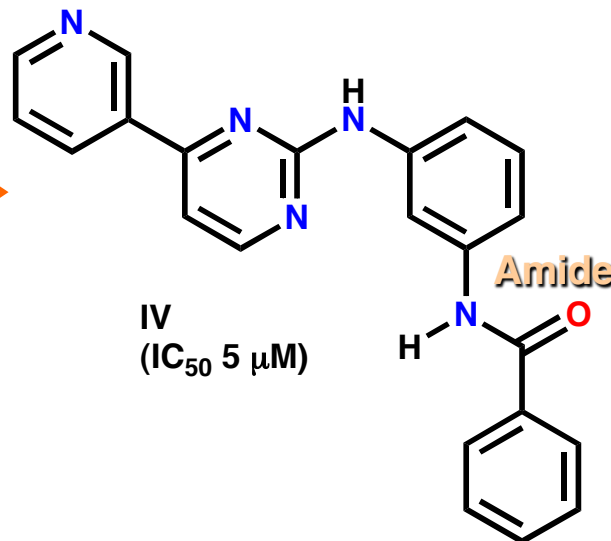
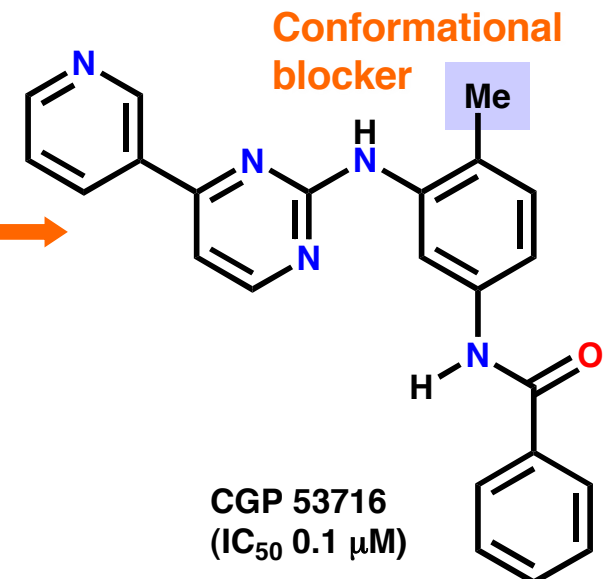
- Struttura fenilamminopirimidinica
- Da random screening di libraries
- Identificato originariamente come inibitore di PKC, una **serina-treonina chinasi**

Drug design



II

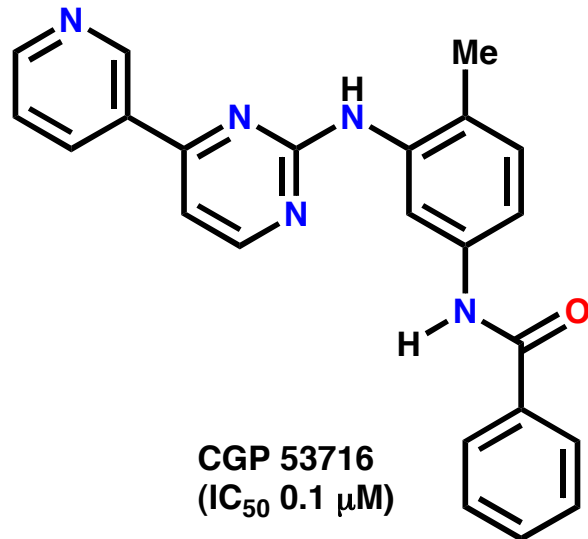
Increased inhibition of PKC

IV
(IC₅₀ 5 μM)Inhibits tyrosine
kinases as wellCGP 53716
(IC₅₀ 0.1 μM)

- Increased activity vs Tyr-K
- No activity against Ser/Thr-K

Imatinib

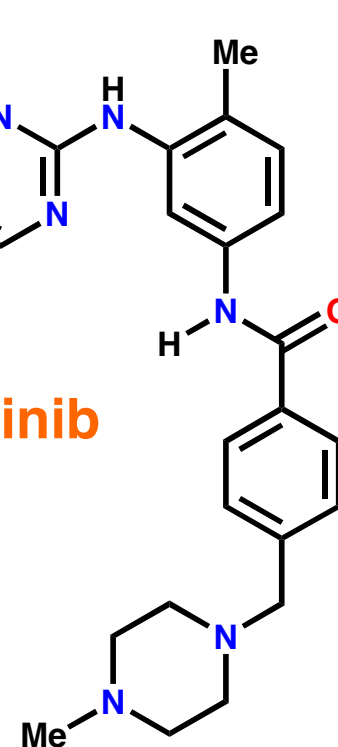
Drug design



- Increased activity vs Tyr-K
- No activity against Ser/Thr-K

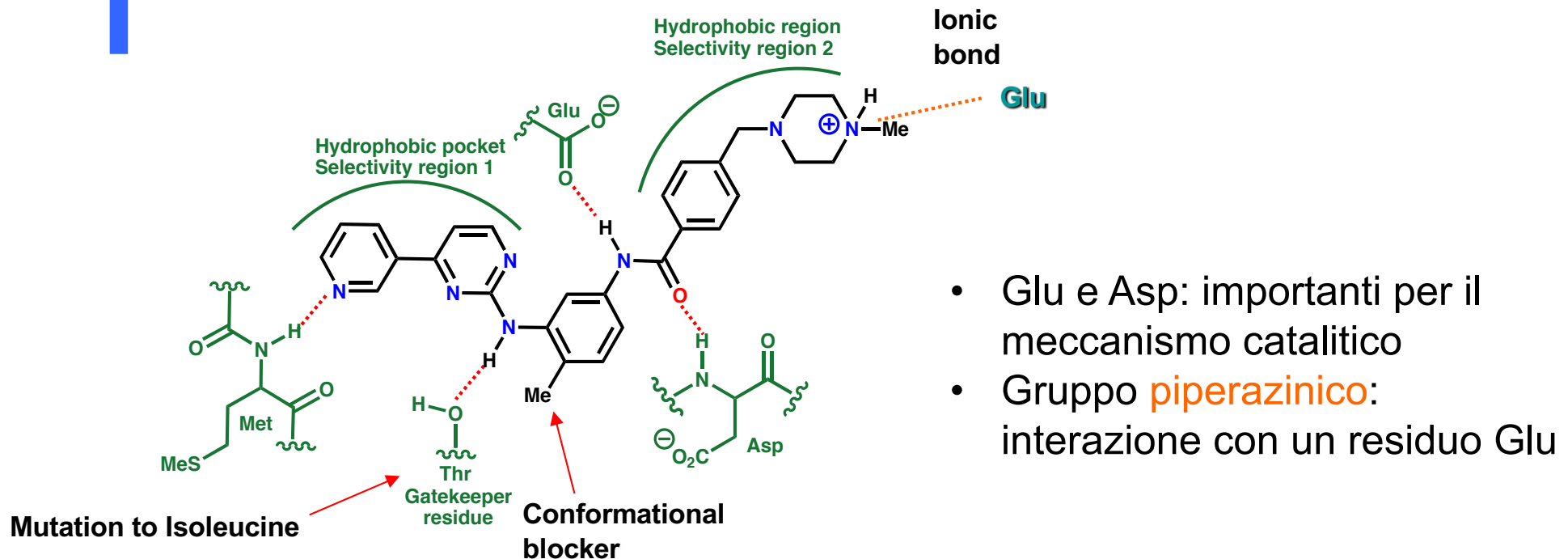


Imatinib



Piperazina: aumento dell'attività, della selettività e dell'idrosolubilità

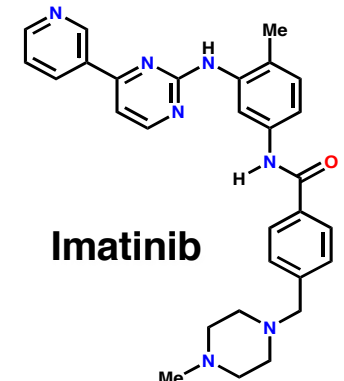
Imatinib



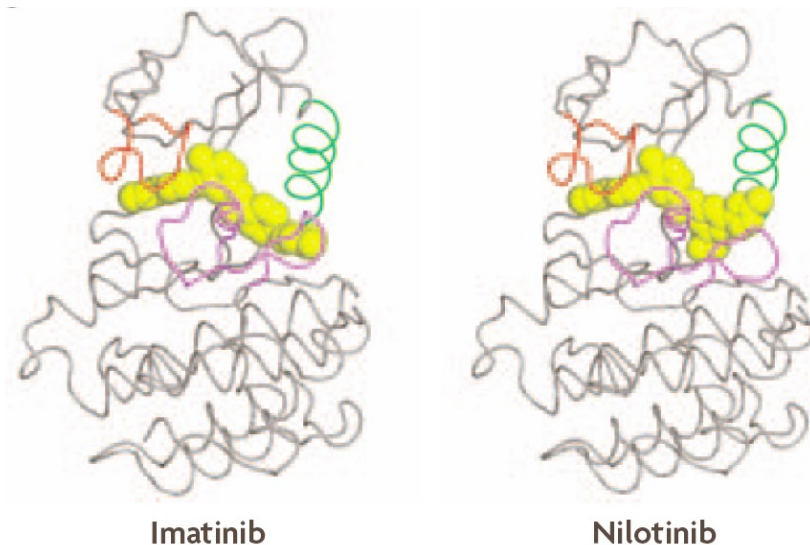
- Inibizione delle proteine chinasi contenenti questo residuo glutammato (Abl, c-Kit e PDGF-R)
- **Blocco conformazionale per selettività**
- Legame a una tasca idrofoba
- **Mutazione del residuo gatekeeper** isoleucina: resistenza (mutazione T315I)
- Isoleucina incapace di formare un importante legame idrogeno con l'ammina
- Altre interazioni con selettività bersaglio
- Legame idrogeno per il gatekeeper Thr: essenziale per l'attività
- N-alchilazione; no l'attività

Il generazione di inibitori di Bcr-Abl

- Analisi della struttura cristallina dell'imatinib-Abl
- Studio della modalità di legame
- Sviluppo di diversi derivati
- Dal 2007 usato nel trattamento (2^a linea) della CML (Novartis, disponibile PO)
- Sviluppato dall'imatinib (anello piperazinico non fondamentale per il legame)
- Inibizione selettiva di Bcr-Abl
- Modalità di legame simile a quella dell'imatinib
- Più potente dell'imatinib (30-50v) sia nelle linee resistenti che in quelle sensibili

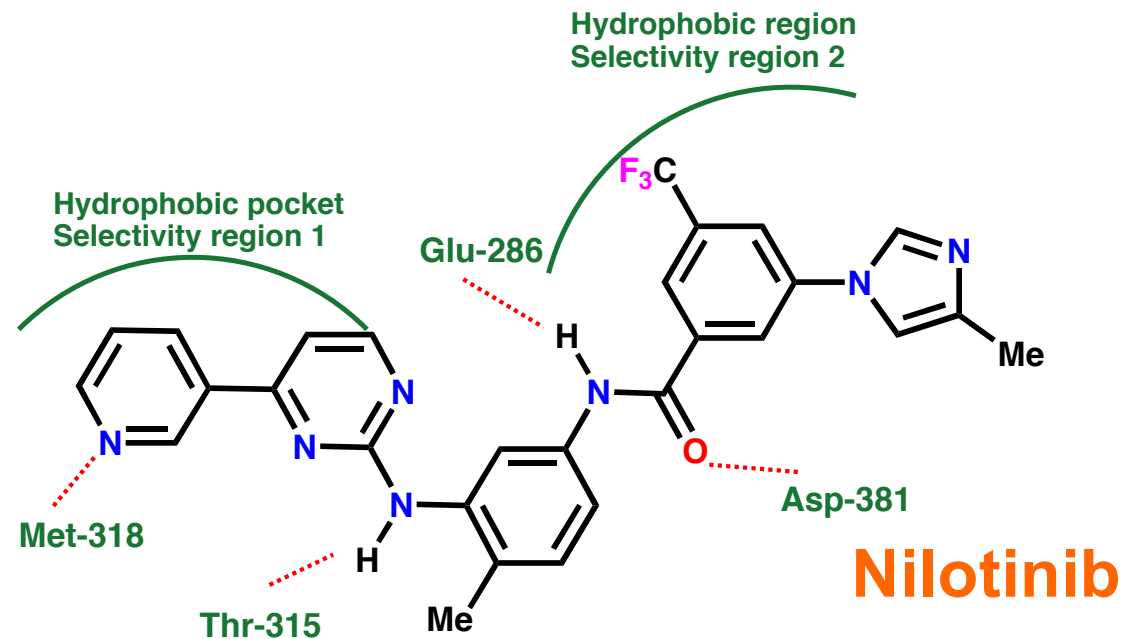


Imatinib



Imatinib

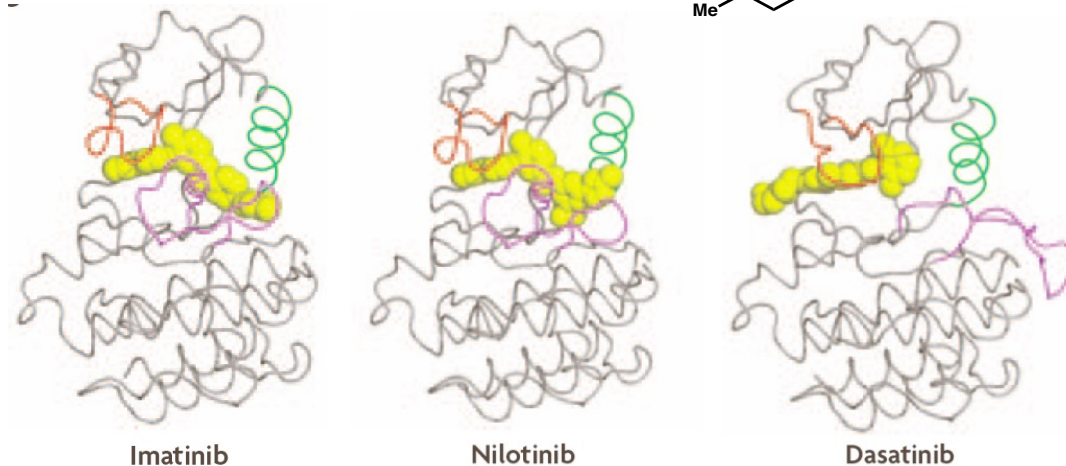
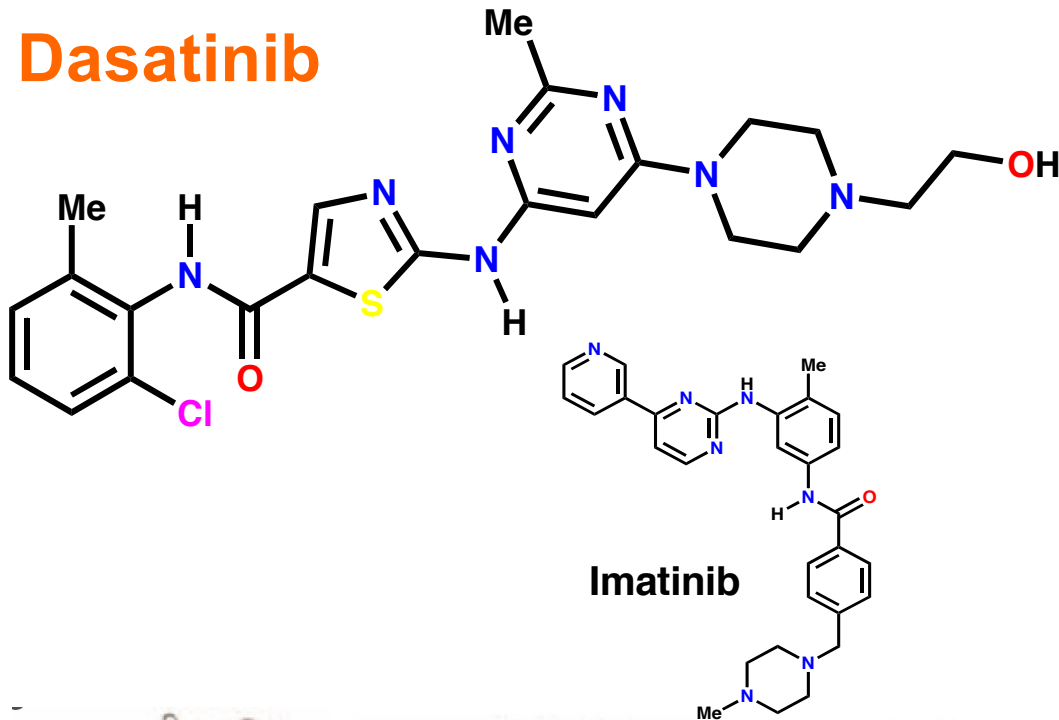
Nilotinib



Nilotinib

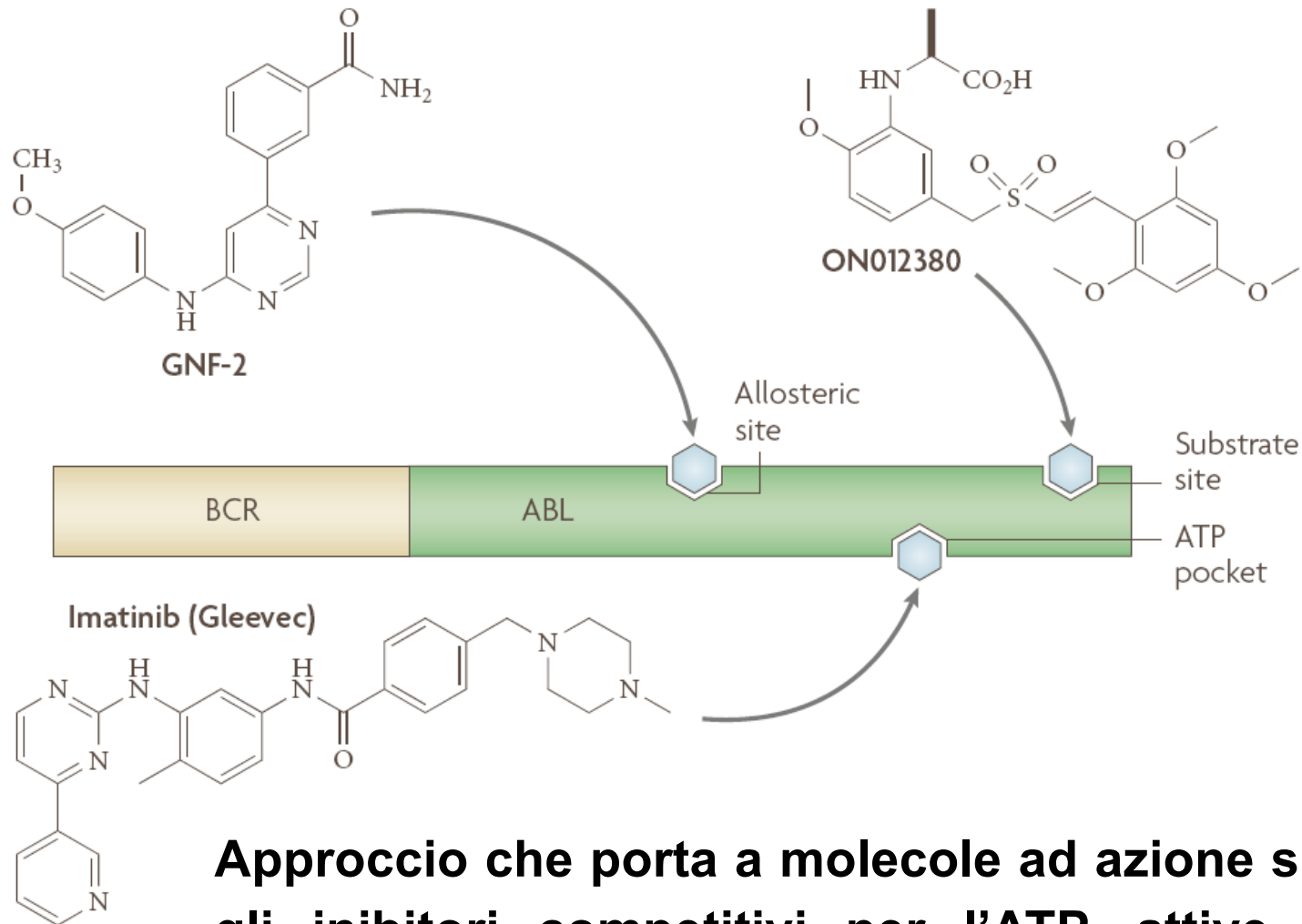
Il generazione di inibitori di Bcr-Abl

Dasatinib



- **INIBITORE DUALE**
- Src: tirosin chinasi strutturalmente correlata alla Abl e associata allo sviluppo della CML (leucemia mieloide cronica)
- Dal 2006 approvato per il trattamento (2^a linea) della CML (disponibile PO)
- Inibizione di Src (0.5 nM) e Abl (<1 nM) ma anche altre chinasi
- **Legame alla conformazione attiva dell'enzima**
- Legame con siti diversi da quelli coinvolti negli inibitori selettivi di Abl
- Attivo in diversi (non tutti) mutanti resistenti all'imatinib

Inibitori di Abl non competitivi per ATP



Approccio che porta a molecole ad azione sinergica con gli inibitori competitivi per l'ATP, attive sui mutanti resistenti

Inibitori delle Raf Chinasi

Raf chinasi come target di farmaci antitumorali

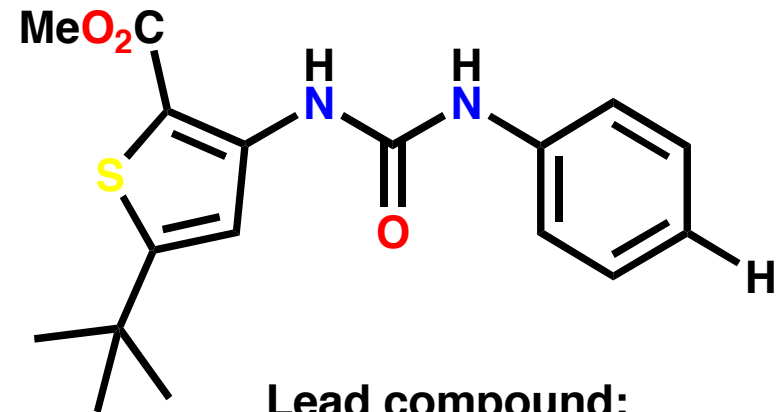
- Serina/ treonina chinasi: A-Raf, B-Raf e Raf1 (C-Raf)
- Prime chinasi nella cascata delle MAPK
- Fondamentali nella proliferazione cellulare
- Il 30% dei tumori umani presenta anomalie nei pathways mediati Raf
- La distruzione del gene raf1 (oligonucleotidi antisenso) inibisce lo sviluppo di diversi tumori umani sperimentali

Sviluppo di inibitori delle Raf come antitumorali

Inibitori delle Raf Chinasi

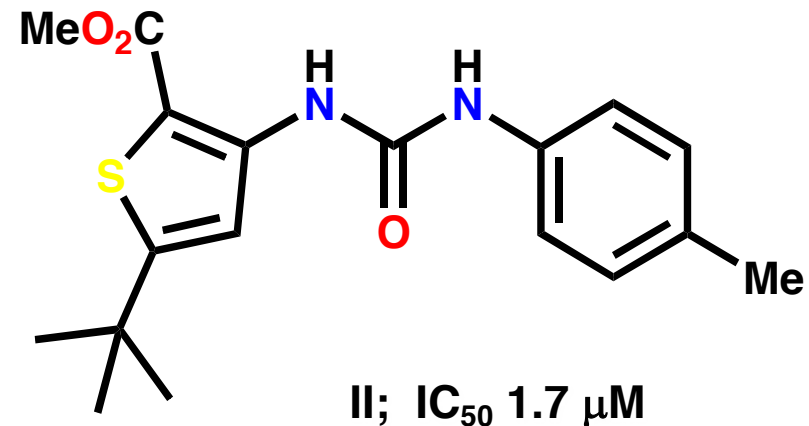
Design del sorafenib

- Lead compound mediante high throughput screening
- 200.000 composti testati
- Test su Raf-1 chinasi ricombinante



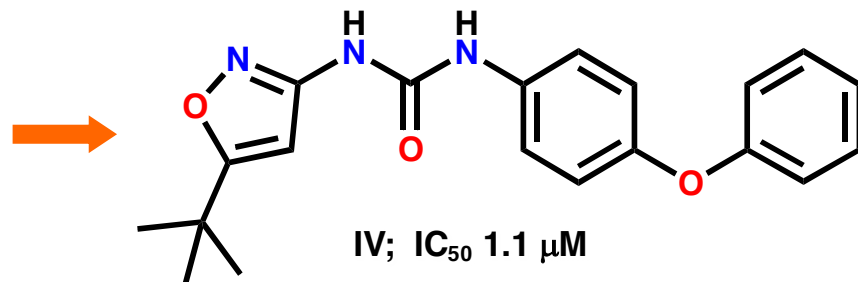
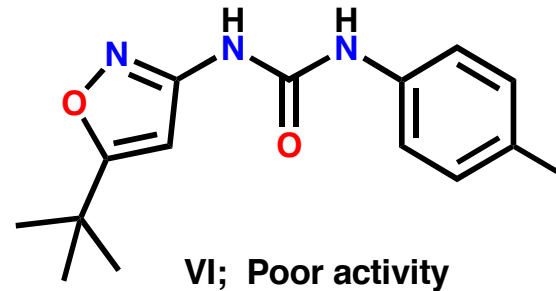
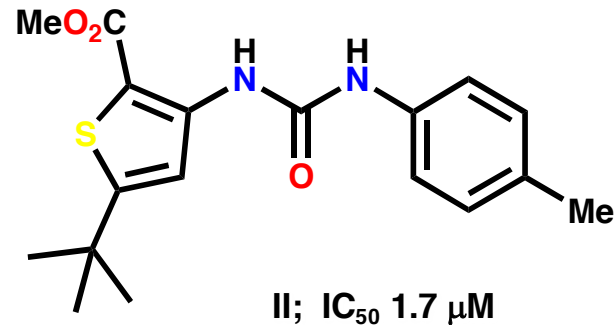
Lead compound;
IC₅₀ 17 μM

- Sostituito metilico ottimale per l'attività
- Aumento dell'attività di 10 volte



II; IC₅₀ 1.7 μM

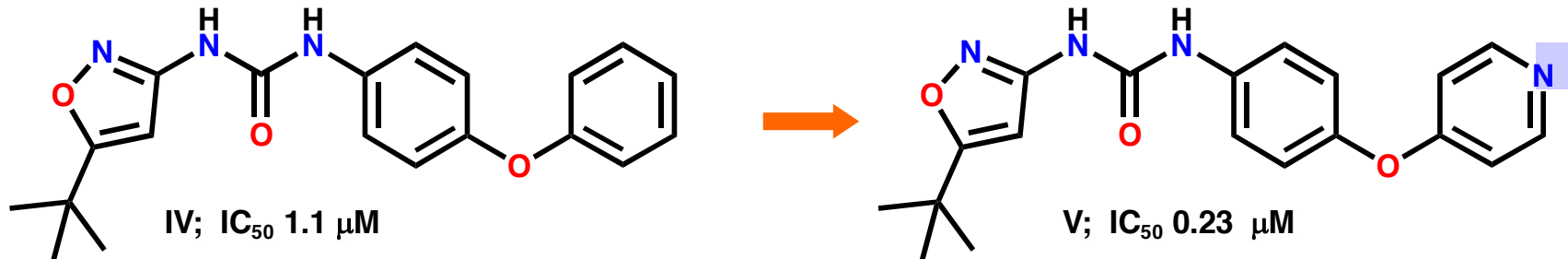
Inibitori delle Raf Chinasi: Sorafenib



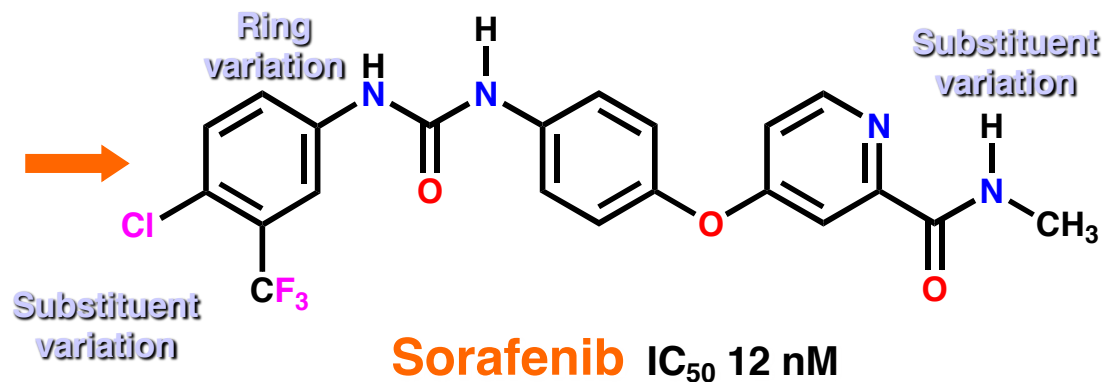
- Variazione di anelli sistematica
- Anello isossazolico: peggiora l'attività
- Convenzionali strategie di chimica farmaceutica: no ulteriore miglioramento

- Sintesi parallela - 1000 analoghi
- Struttura IV: lieve miglioramento dell'attività
- Anello isossazolico e fenossi: buoni sostituenti se presenti contemporaneamente
- IV: nuovo lead compound

Inibitori delle Raf Chinasi: Sorafenib

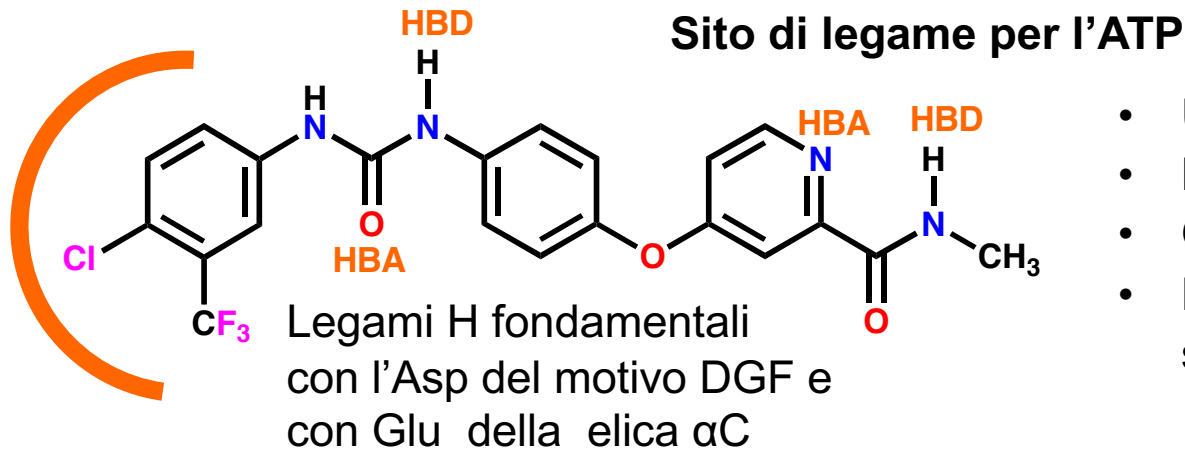


- Variazione dell'anello
- Aumento attività 5 volte
- Aumento solubilità in acqua e $LogP$



1000 volte migliore attività

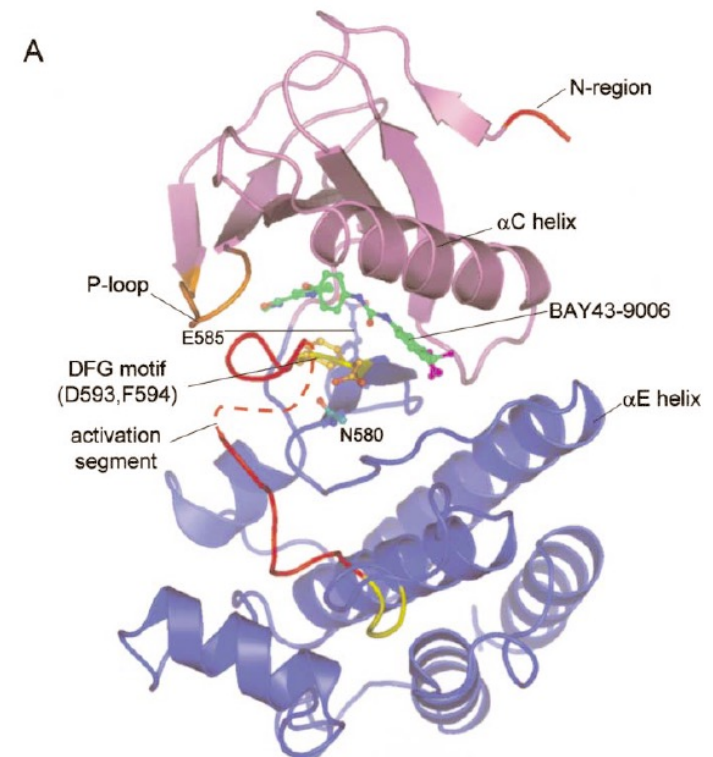
Inibitori delle Raf Chinasi: Sorafenib



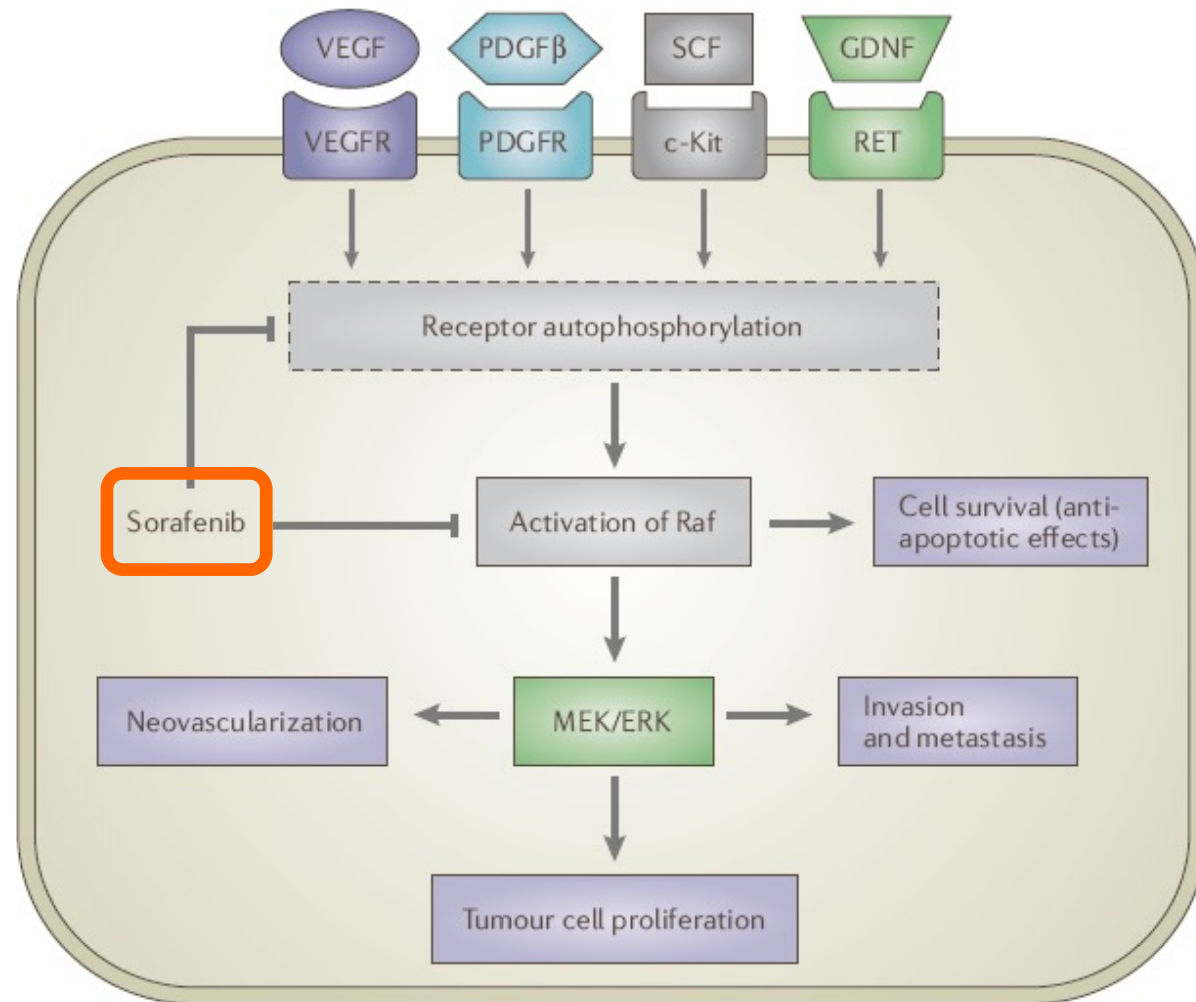
- Urea: binding anchor (confr. imatinib)
- Legami H formati con Asp e Glu
- Orientamento della molecola
- Posizionamento in due regioni di selettività

Interazioni con una tasca lipofila (motivo DFG, elica αC , P-loop)

- Effetto: stabilizza il motivo DFG in una **conformazione inattiva**
- La struttura cristallina ha razionalizzato le relazioni struttura attività inizialmente scoperte



Inibitori delle Raf Chinasi



SORAFENIB

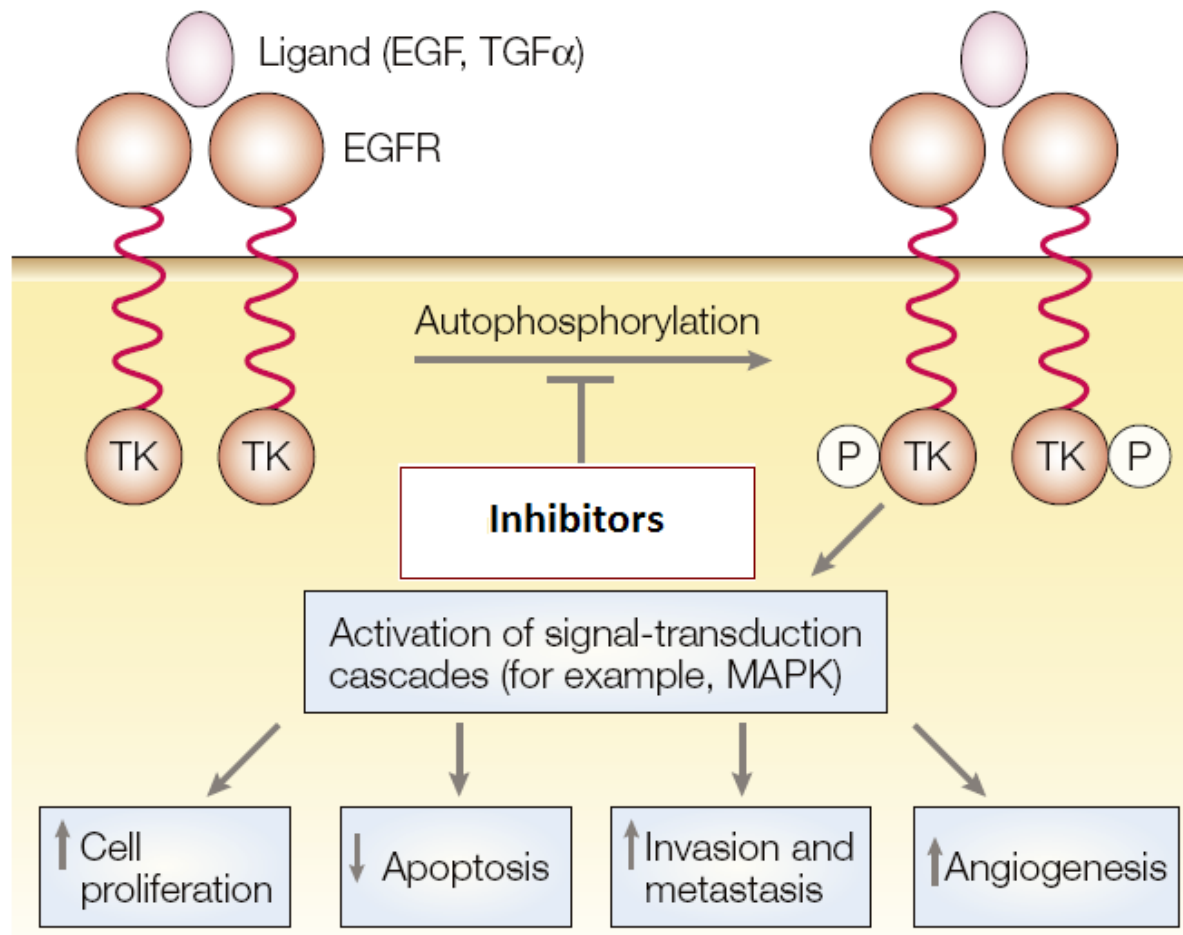
•Oltre alle Raf chinasi, inibisce direttamente l'autofosforilazione di diversi recettori tirosin-chinasici:

- **VEGFR**, vascular endothelial growth factor receptor
- **PDGFR**, Platelet-derived growth factor receptors)

•Approvato quale inibitore della chinasi VEGFR
 •Effetto antiangiogenico, effetto antiproliferativo e/o proapoptotico

Inibitori dei recettori TK ErbB (EGFR)

L'attivazione dei EGFR (recettori del fattore di crescita epidermico) è associata alla crescita e alla progressione del tumore

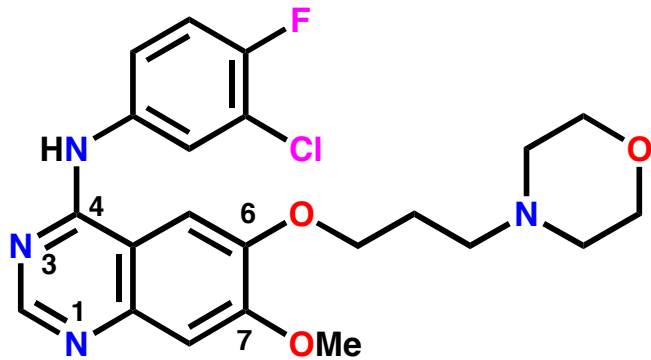


Tipi di inibitori:

- Anticorpi monoclonali
- Inibitori competitivi reversibili
- Inibitori competitivi irreversibili

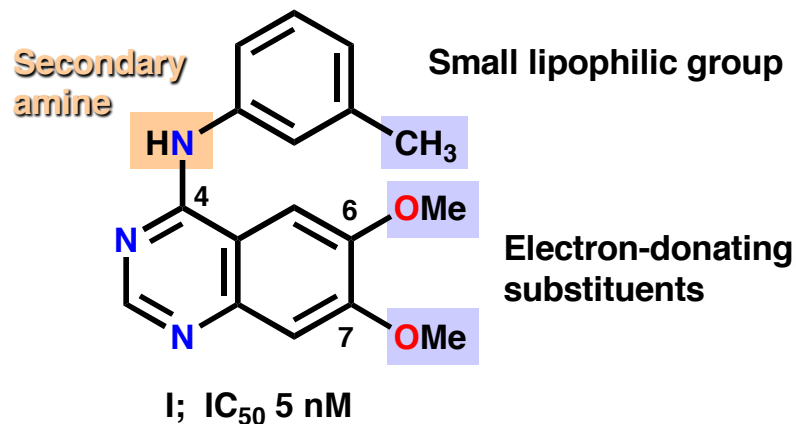
Inibitori di ErbB1 (EGFR) competitivi reversibili

Gefitinib (Iressa®)



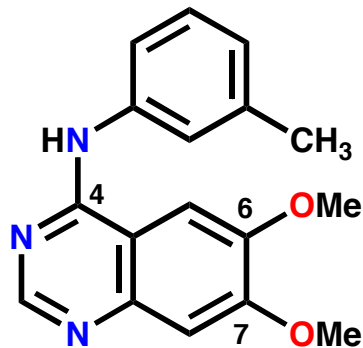
- Sviluppato da Astra Zeneca
- Inibizione del **sito attivo** della chinasi dell'EGFR (epidermal growth factor receptor)
- Recettore del fattore di crescita epidermico: recettore tirosin-chinasico
- **Gefitinib: 4-anilinochinazolina**

Lead compound

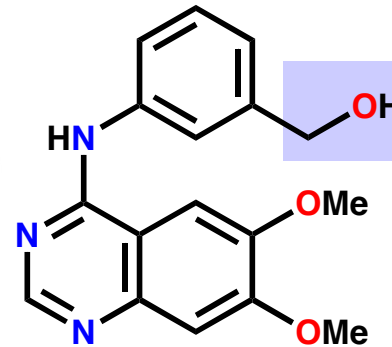


- Ammina secondaria
- Sostituito elettron-donatore
- Piccoli gruppi lipofili
- Attività *in vitro*
- Rapido metabolismo (bassa attività *in vivo*)
- Metabolizzato dai Cit P450

Gefitinib (Iressa®)

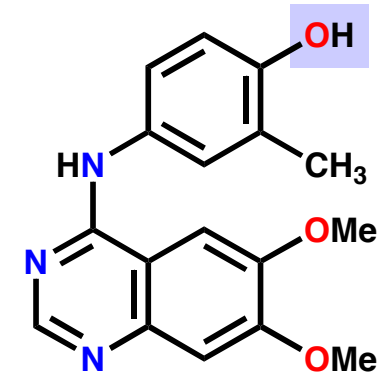
I; IC₅₀ 5 nM

Cytochrome
P450 enzymes
→
Oxidation



II

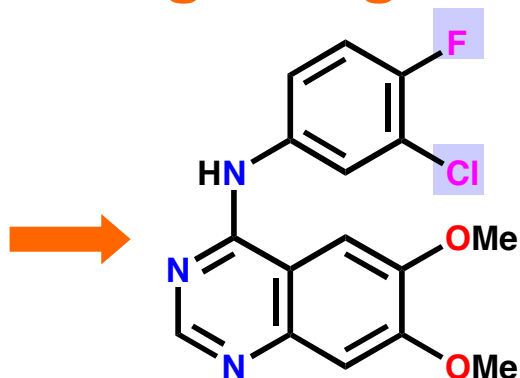
+



III

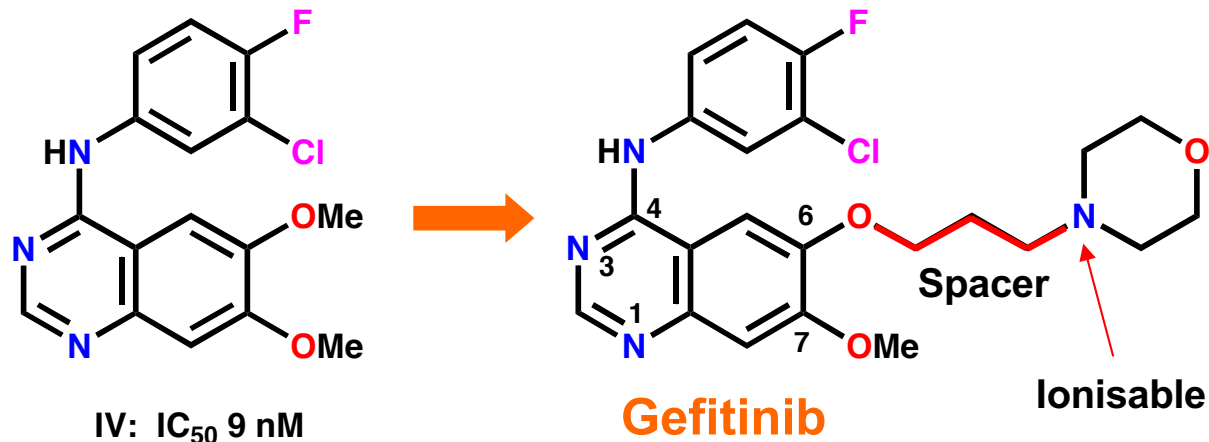
- Gruppo metile e posizione para dell'anilina: posizioni prone all'ossidazione
- Blocco della sua metabolizzazione

Drug design

IV: IC₅₀ 9 nM

- Fluoro in *para*
- Cloro al posto del metile (simili dimensioni e lipofilia)
- Cloro bio-isotere del metile in questo caso
- Cloro e fluoro resistenti all'ossidazione
- Composto meno attivo *in vitro*, ma più attivo *in vivo*

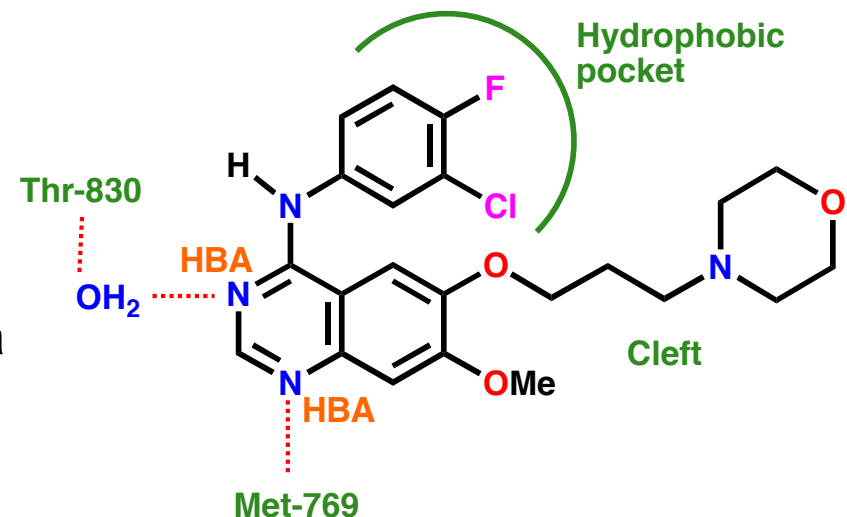
Gefitinib (Iressa®)



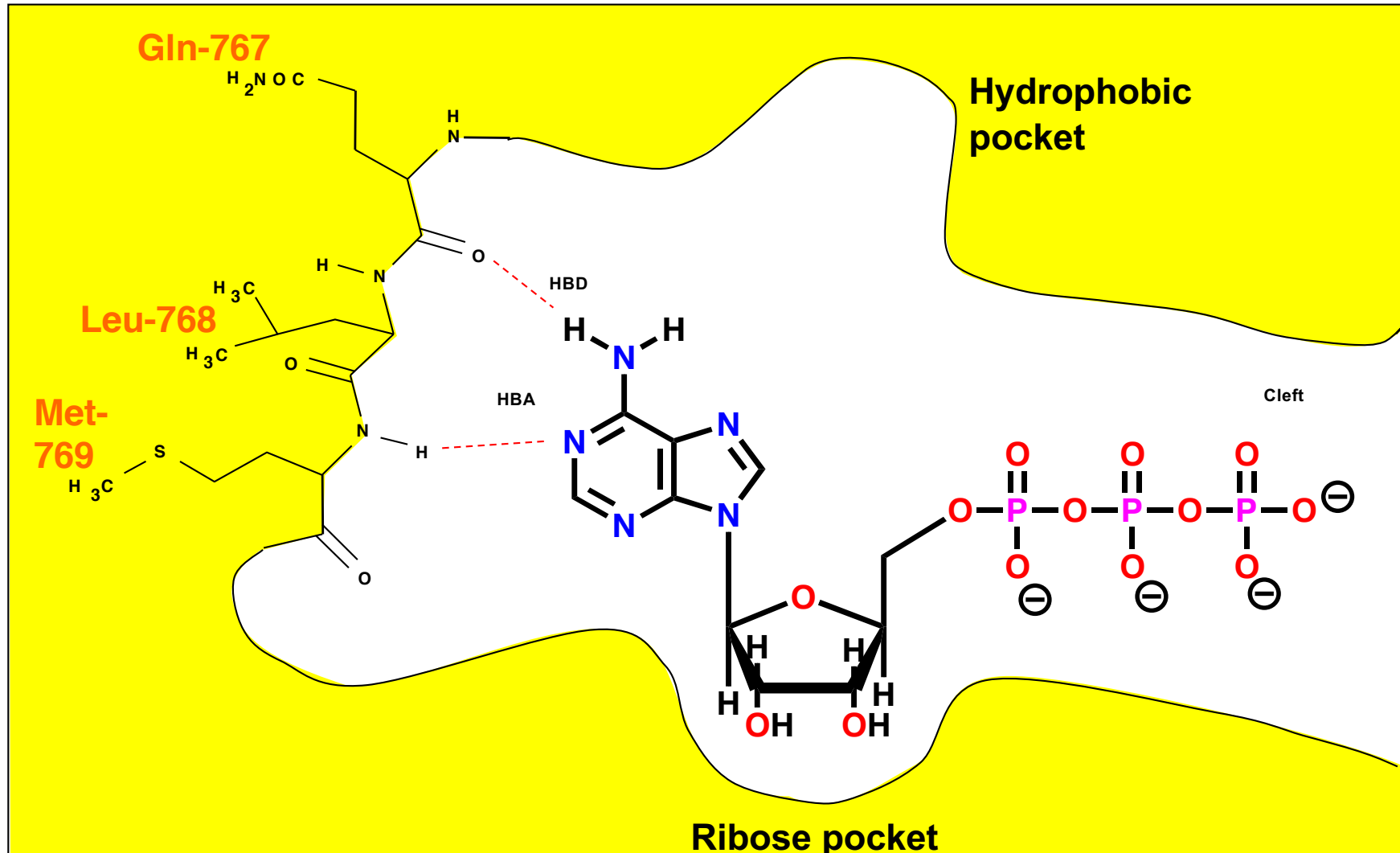
- Morfolina: aumento della solubilità in acqua
- Possibile quaternarizzazione dell'azoto morfolinico
- Spacer: morfolina esterna al sito attivo
- Resta solvatata quando il farmaco è legato

Interazioni con il target

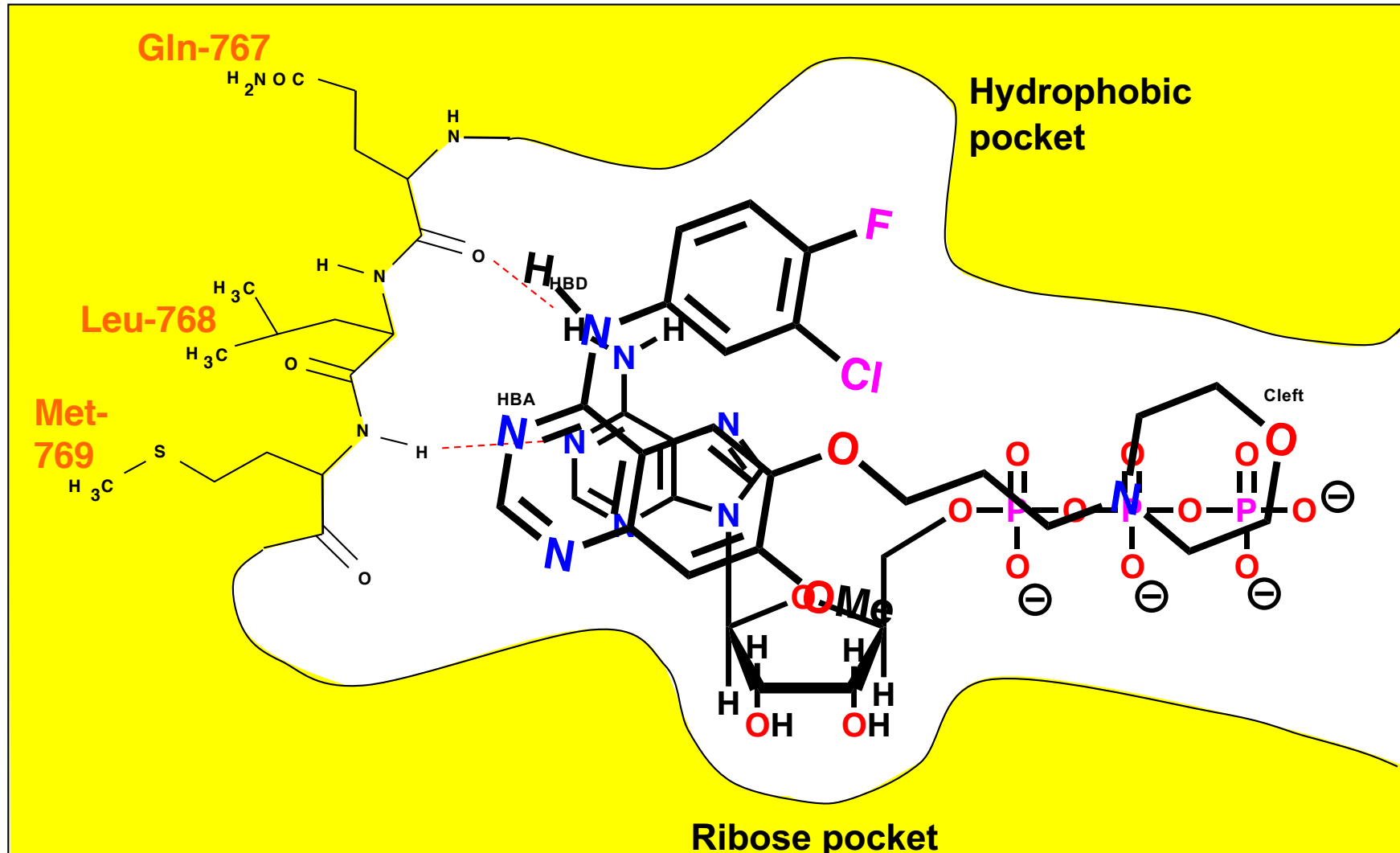
- Esperimenti di molecular modelling
- Legame al sito di binding dell'ATP
- Anilina nel sito idrofobico solitamente vuoto opposto al ribosio
- Chinazolina: legame con il sito in cui si lega l'adenina



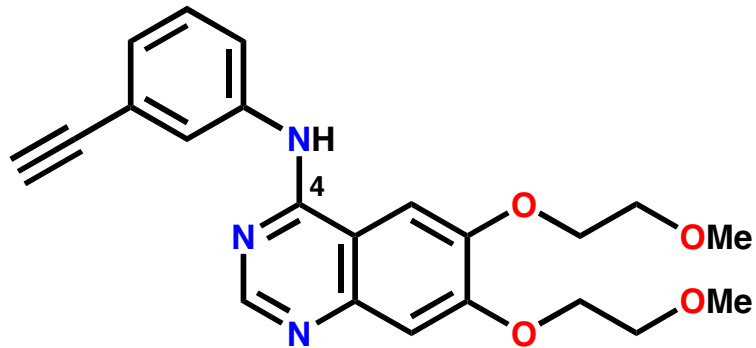
Protein Chinasi PKs



Protein Chinasi PKs

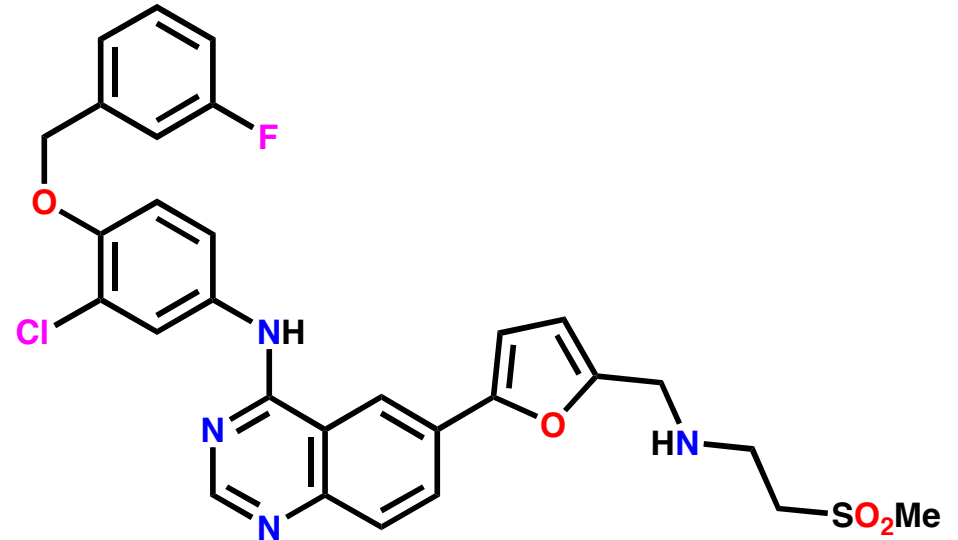


Inibitori di ErbB1 (EGFR) competitivi reversibili



Erlotinib IC₅₀ 2 nM

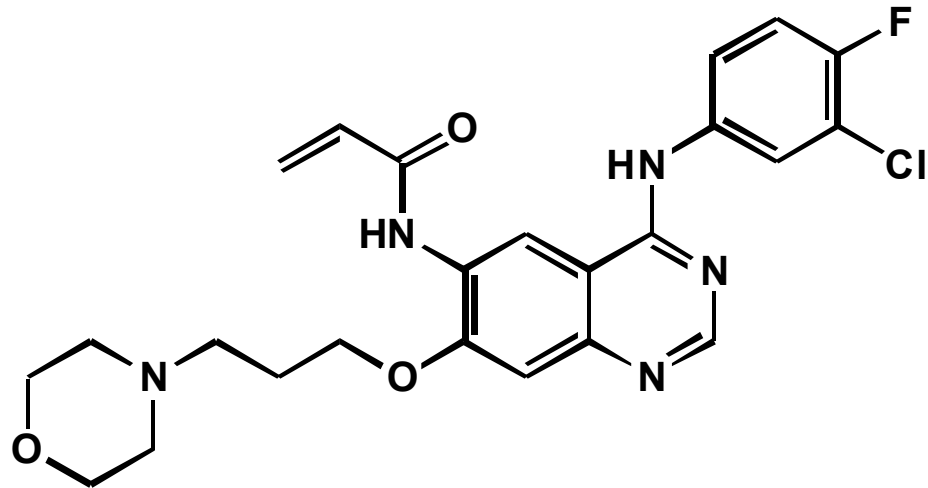
- erbB1 selettivo
- Si lega al sito di legame dell'ATP (chinazolina-adenina)
- Terapia "personalizzata" del carcinoma polmonare non a piccole cellule
- Somministrazione per os



Lapatinib

- Attivo su EGFR (ErbB-1) e HER2/c-neu (ErbB-2)
- Approvato (2007) per il trattamento del cancro al seno metastatico nei pazienti che sovra-esprimono HER e precedentemente trattati con antracicline taxani e trastuzumab
- Somministrazione per os

Inibitori di ErbB1 (EGFR) irreversibili

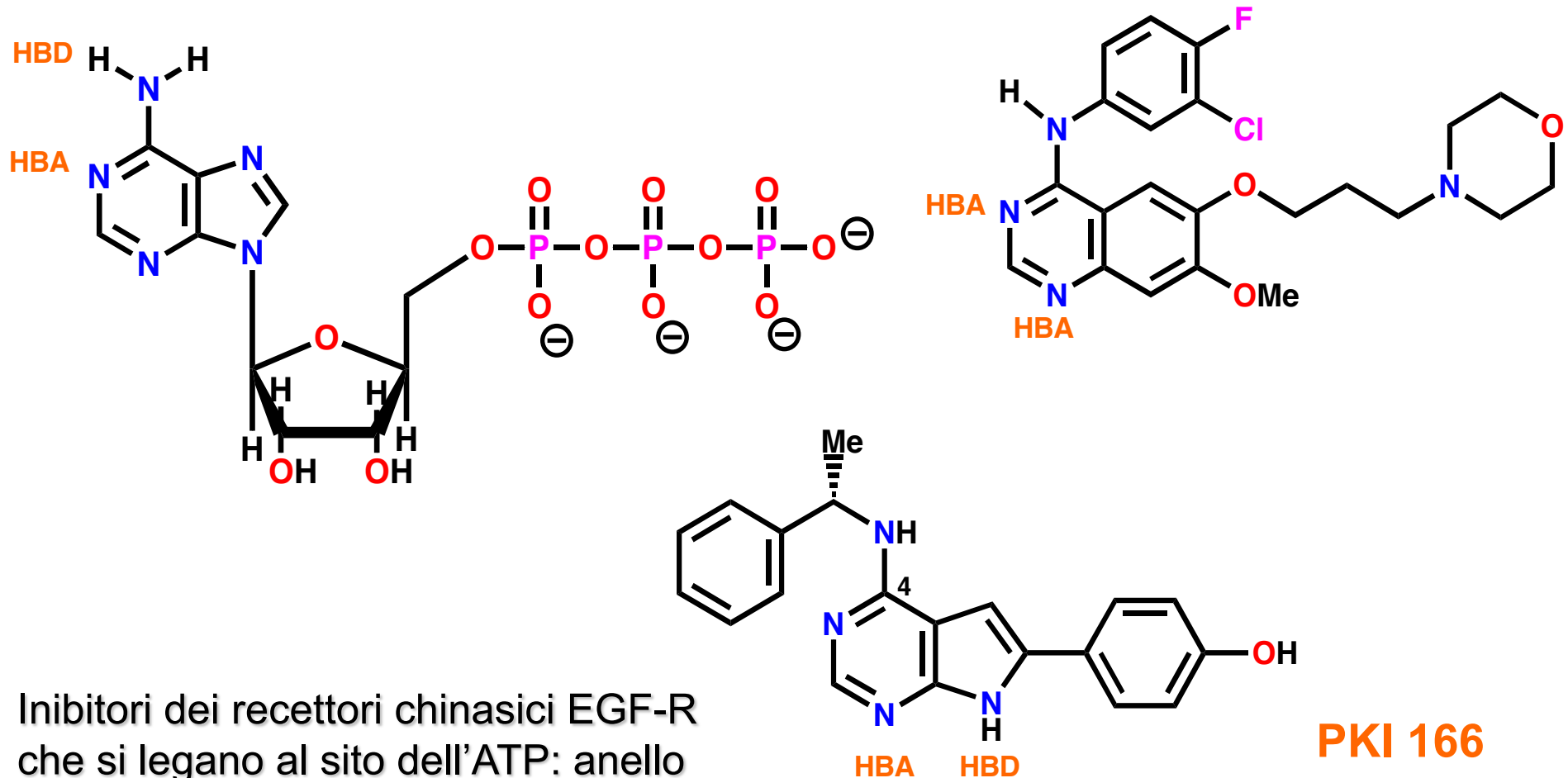


Canertinib

- Fase II di sperimentazione
- Correlato al gefitinib
- Presenta la funzione acrilammidica

- L'ATP è presente in grande quantità nelle cellule: utile sviluppare inibitori irreversibili
- I recettori della famiglia erbB hanno dei residui di cisteina nel sito di legame dell'ATP
- Sviluppo di inibitori competitivi per l'ATP contenenti dei gruppi accettori di Michael

Altri inibitori



- Inibitori dei recettori chinasici EGF-R che si legano al sito dell'ATP: anello pirimidinico
- Diverse modalità di binding

- Struttura pirrolopirimidinica
- Inibitore dell'EGF-R chinasi
- Binding diverso da ATP o anilinochinazoline

PKI 166

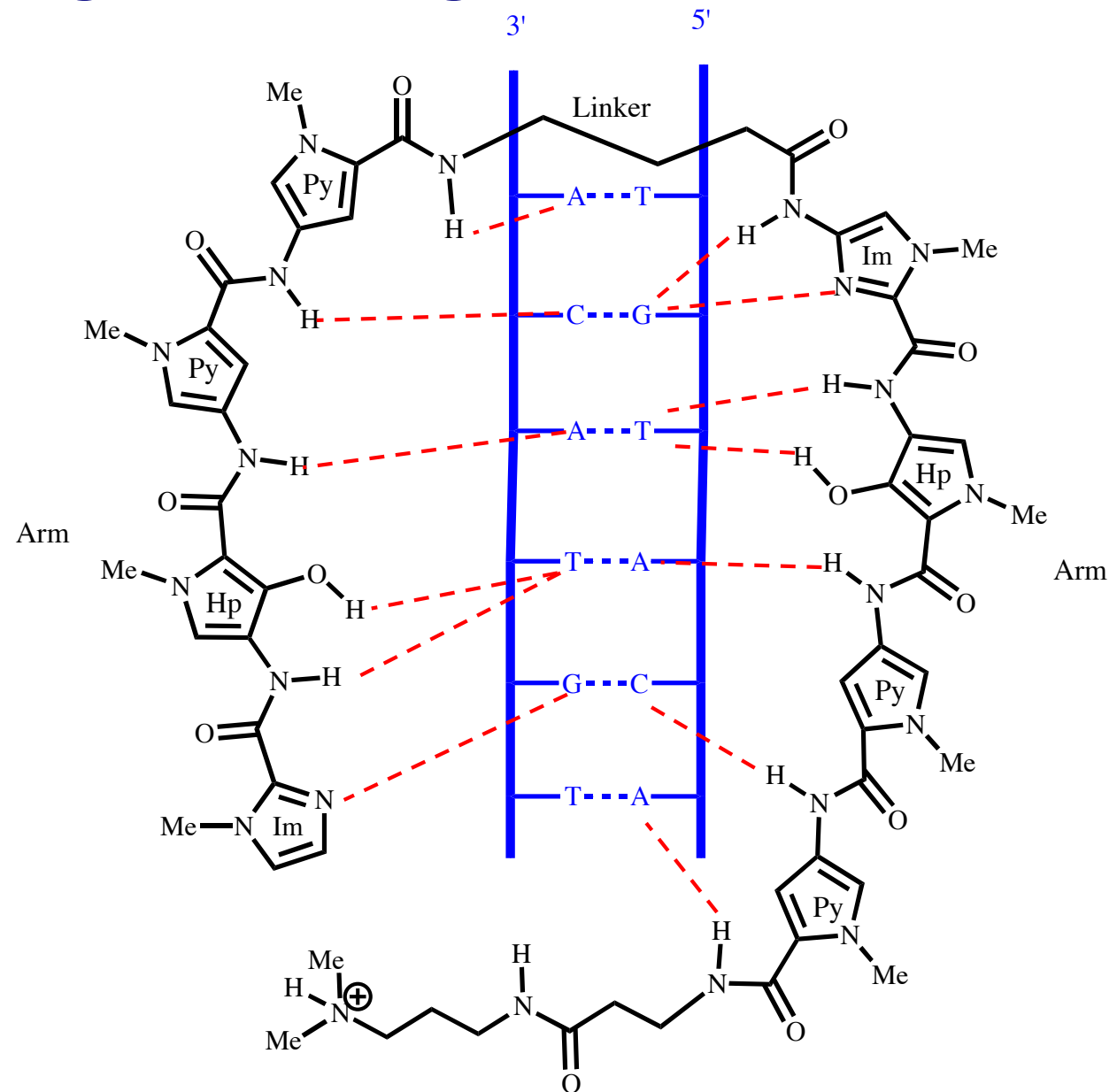
Farmaci che agiscono sugli AN

Controllo della trascrizione genica

- Design di molecole sintetiche in grado di controllare la trascrizione genica
- Molecole che riconoscono SPECIFICAMENTE sequenze
- Molecole che si legano specificamente
- Sistemi a forcina (hairpin) poliammidici
- Anelli eteroaromatici che legano il solco minore
- Legame tramite ammidi e eterocicli
- Particolari pattern di eterocicli per il riconoscimento della sequenza
- Inibizione della TRASCRIZIONE
- Ideati per legare elementi regolatori di un gene

Farmaci che agiscono sugli AN

Controllo della
trascrizione genica



Terapia Antigene



Terapia Antisenso



Altri farmaci che agiscono sul DNA

Terapia antisenso: shut down dell'espressione genica a livello di mRNA

Problemi di blocco prolungato dell'espressione genica

Terapia antigene: trattamento di targeting a livello di DNA con spegnimento delle funzioni del gene prescelto

Richiede che la molecola utilizzata

- a) entri nel nucleo,
- b) legni il DNA,
- c) blocchi la trascrizione e/o
- d) danneggi specificamente il DNA senza interagire con le normali funzioni cellulari

Altri farmaci che agiscono sul DNA

Triplex-Forming Oligonucleotides (TFOs)

Analoghi DNA/RNA o DNA/RNA con la tendenza di formare triple eliche con uno specifico tratto di dsDNA che è il target

Catene omopurine o omopirimidine

TFO legato a un composto che modifica il DNA per ottenere un danno sito-specifico a livello del dsDNA

Diversi analoghi DNA/RNA hanno dimostrato di aumentare la formazione di triple eliche, aumentando la loro capacità di agire quali agenti antigenici

Altri farmaci che agiscono sul DNA

Duplex



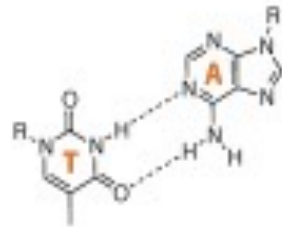
Triplex



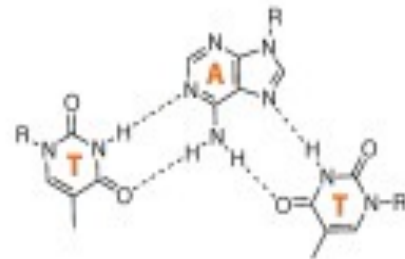
G-Triplex



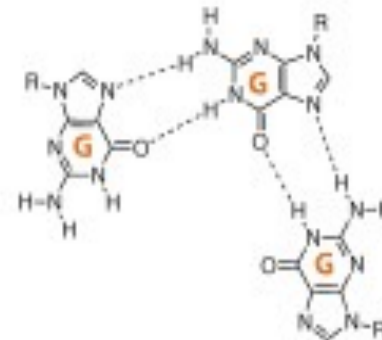
G-Quadruplex



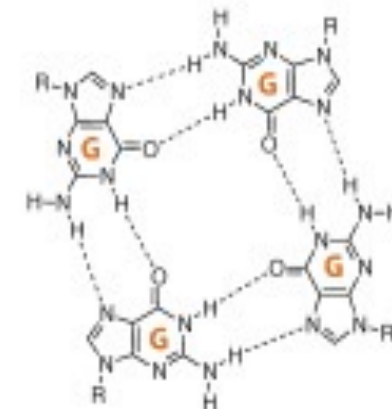
T-A base pair



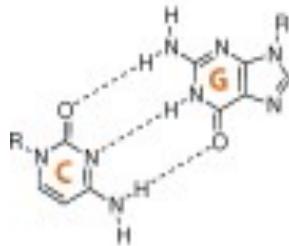
T-A:T triad



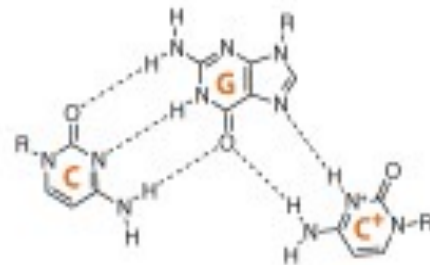
G-triad



G-tetrad



C-G base pair



C-G:C⁺ triad

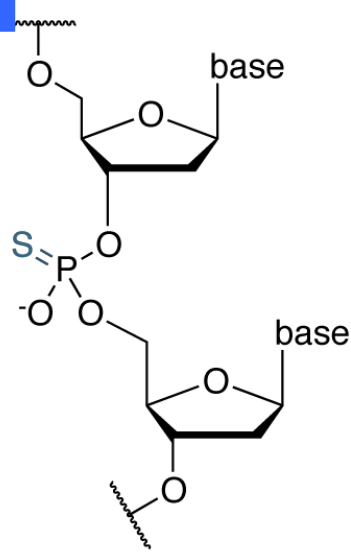
Approccio antigene e antisense

- DNA naturale: digerito dagli enzimi
- Innescò della risposta immunitaria
- DNA sintetico: non riconosciuto dagli enzimi
- Stabile
- No attivazione della risposta immunitaria

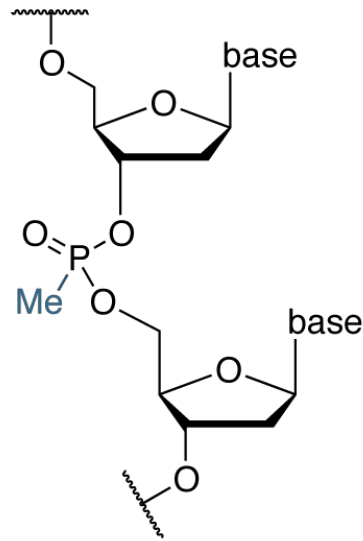
DNA Sintetico

- **possibile blocco selettivo dell'espressione genica**

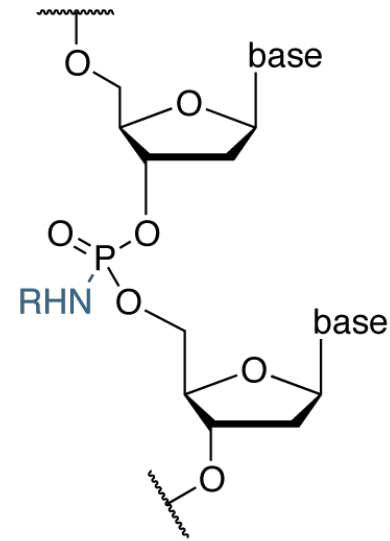
Approccio antigene e antisenso



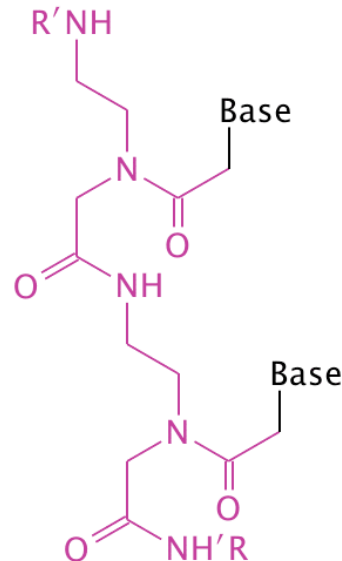
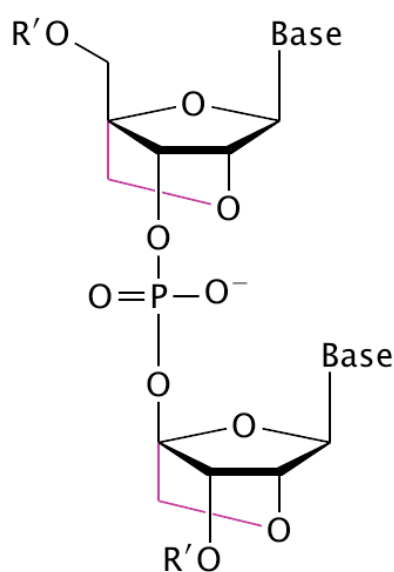
phosphorothioate



methyl phosphonate

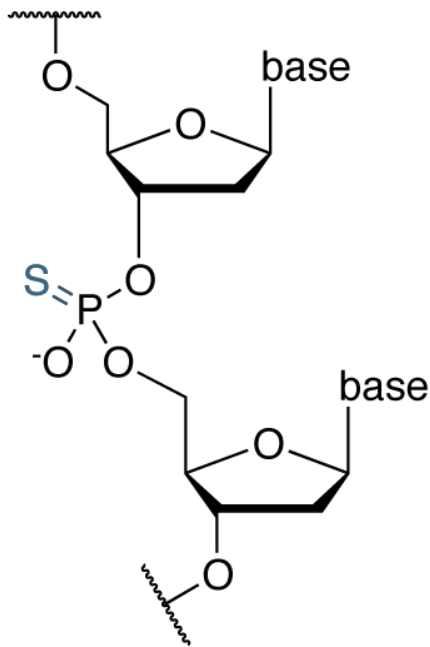


phosphoramidate



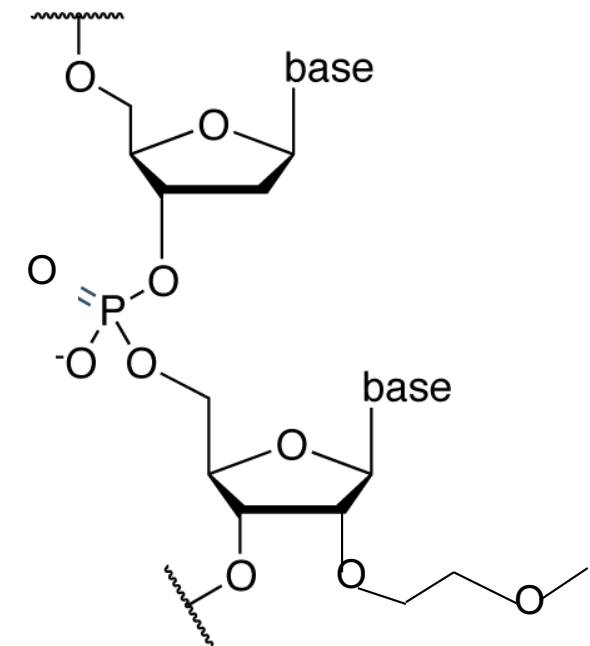
- **Resistenti alla degradazione**
- **Attivazione di H-RNAsi**
- **PNA**: Non chirali (di solito)
- Problemi di penetrazione nelle cellule

Approccio antigene e antisense



phosphorothioate

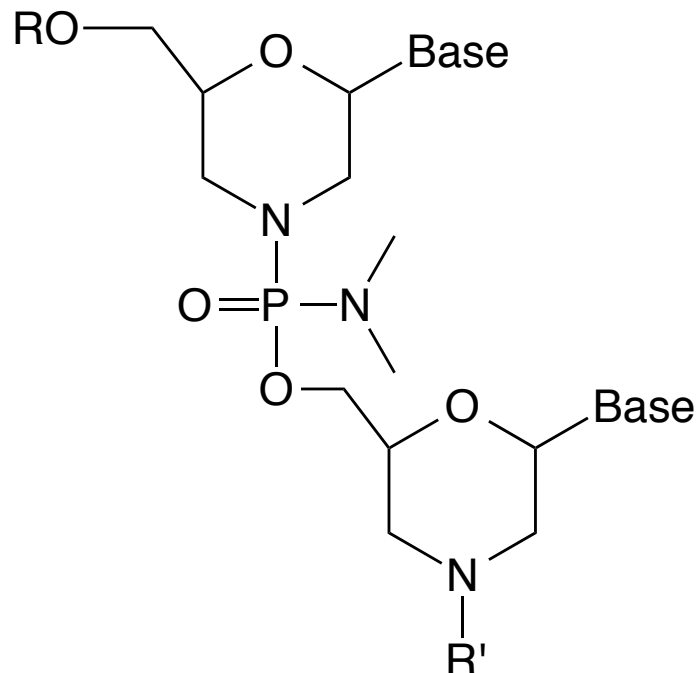
- Resistenza alle nucleasi
- Aumento tempo di emivita in vivo
- Legame alle proteine del siero
- Associazione talvolta indesiderata:
 - oligonucleotidi di controllo scrambled e mismatch
 - no oligomeri ricchi-G (formazione quadruplex)



- Modifiche in 2': 2'-O-Metil o 2'-metossietil RNA
- Aumento affinità
- Clinical trials

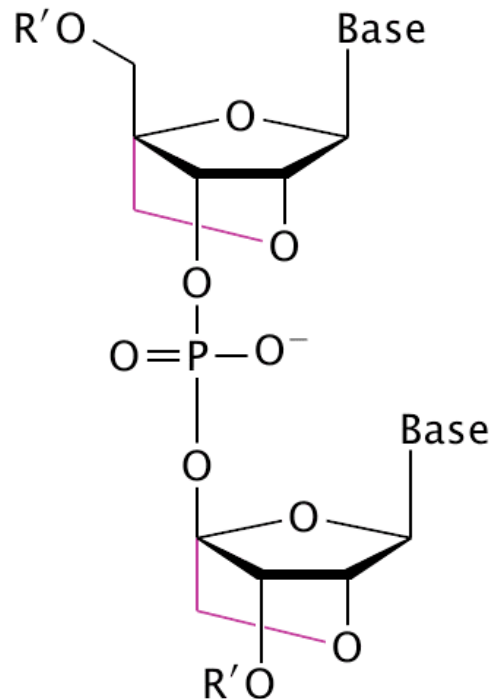
Approccio antigene e antisense

- Analogo non ionico
- Duplex RNA-derivato morfolinico
- No attivazione RNase H
- Affinità non molto alta
- Almeno 25 mer per attività
- Minori interazioni con proteine cellulari
- Migliore blocco della struttura secondaria dell'RNA (scheletro neutro)



Derivati Morfolinici

Approccio antigene e antisense



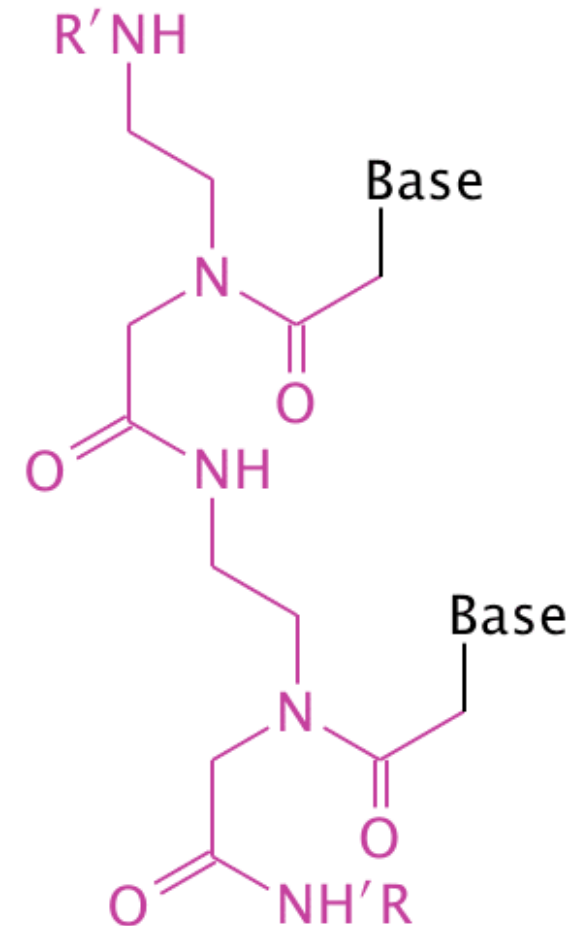
- Ibrido LNA-RNA
- No substrato per H-RNase
- Elevata affinità (10 ° C per elemento sostituito)
- Introduzione di LNA con metodi di sintesi standard DNA/RNA
- Chimeric “gapmers”: LNA-DNA-LNA
- Attività RNase H più specifica
- Costosi

Approccio antigene e antisense

- Peptide Nucleic Acid
- Scheletro neutro
- Buona affinità per DNA o RNA
- Stabilità chimica e biologica
- No legame alle proteine cellulari
- SPPS
- Aumento permeabilità cellulare
- Miglioramento solubilità

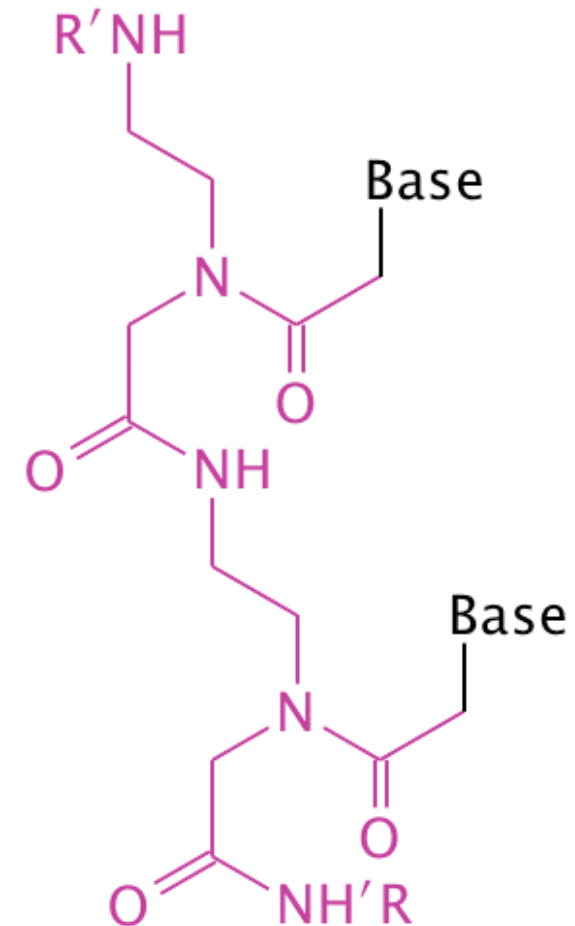
Miglioramento della permeabilità

- PNA + oligomeri carichi negativamente
- PNA + lipidi anionici
- PNA+ sequenze peptidiche
- PNA-RNA duplex: No substrato per RNase H

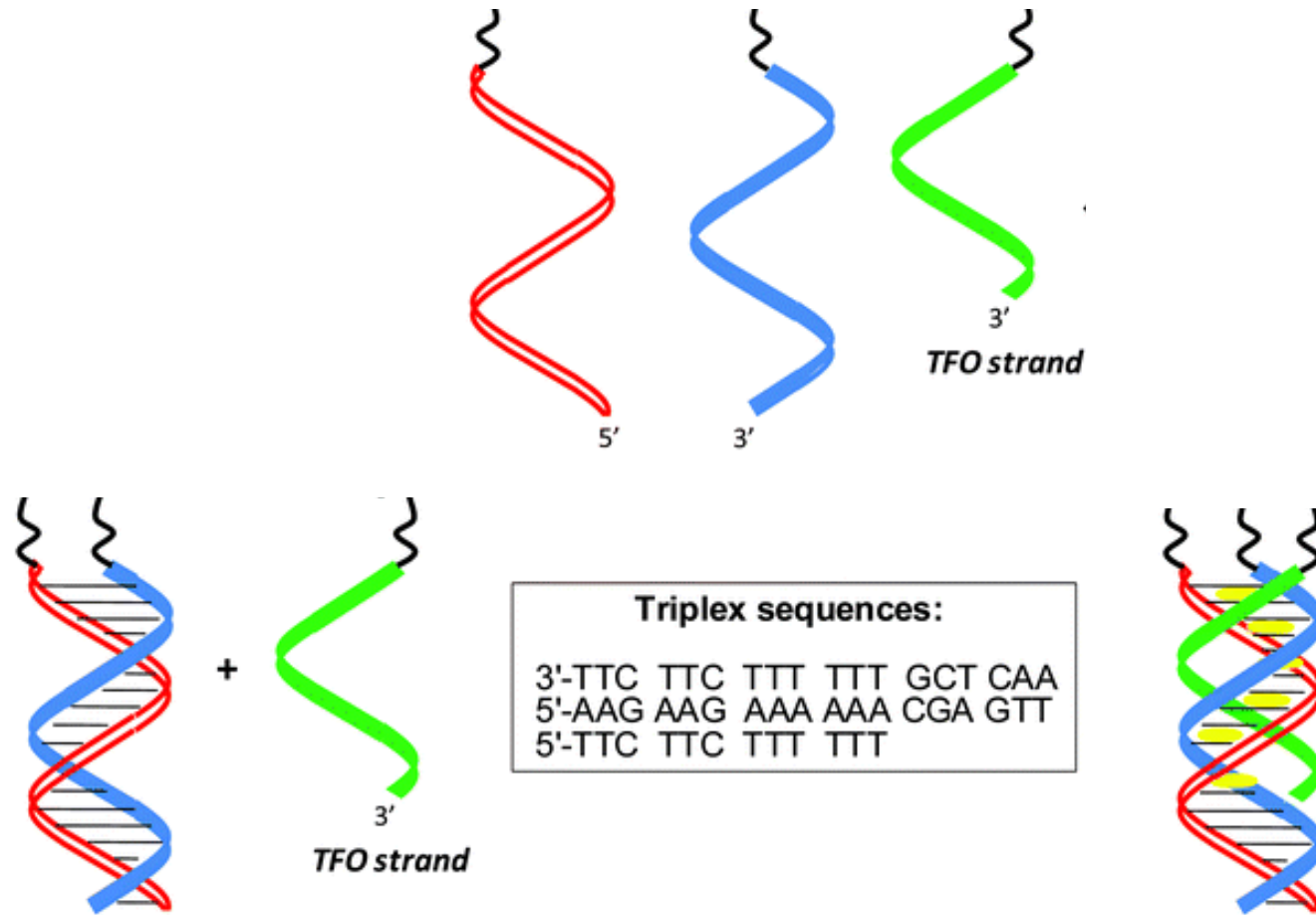


Composti che agiscono sul DNA

- Inibizione di TRASCRIZIONE
- Legame con formazione di triplex in regioni omopuriniche
- Triplex su regioni regolatorie
- Inibizione di modificazioni post-transcrizionali
- Inibizione di splicing di pre-mRNA
- Inibizione di TRASLAZIONE

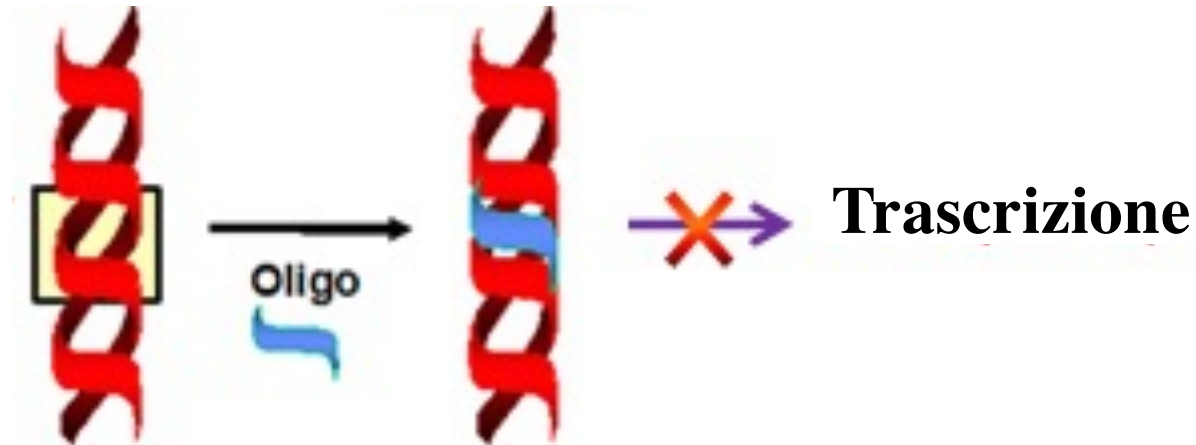


Approccio antigene e antisenso



Altri farmaci che agiscono sul DNA

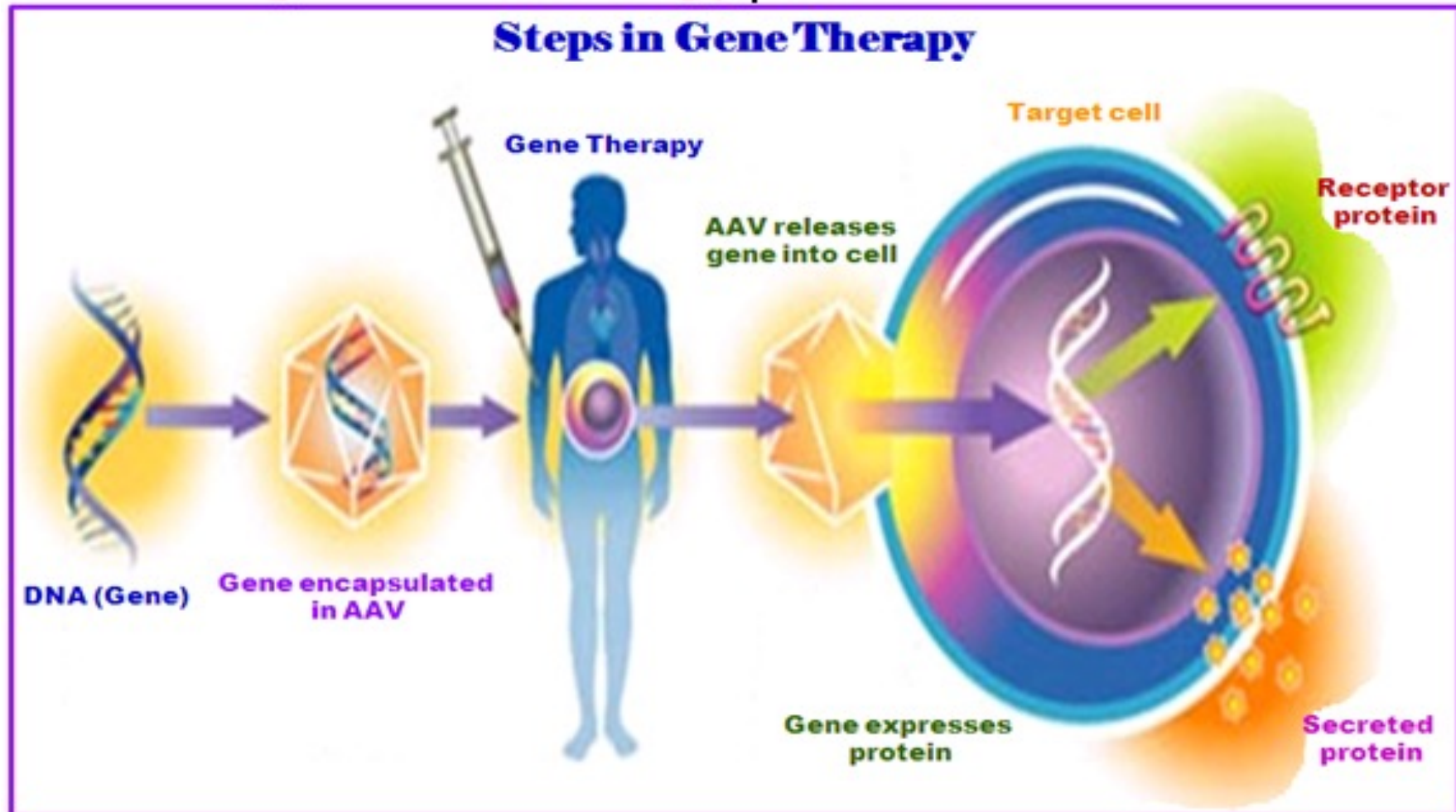
Sequenza riconosciuta da fattore di trascrizione



Cellule normali: DNA a doppio filamento e RNA a filamento singolo ma non RNA a doppio filamento (dsRNA).

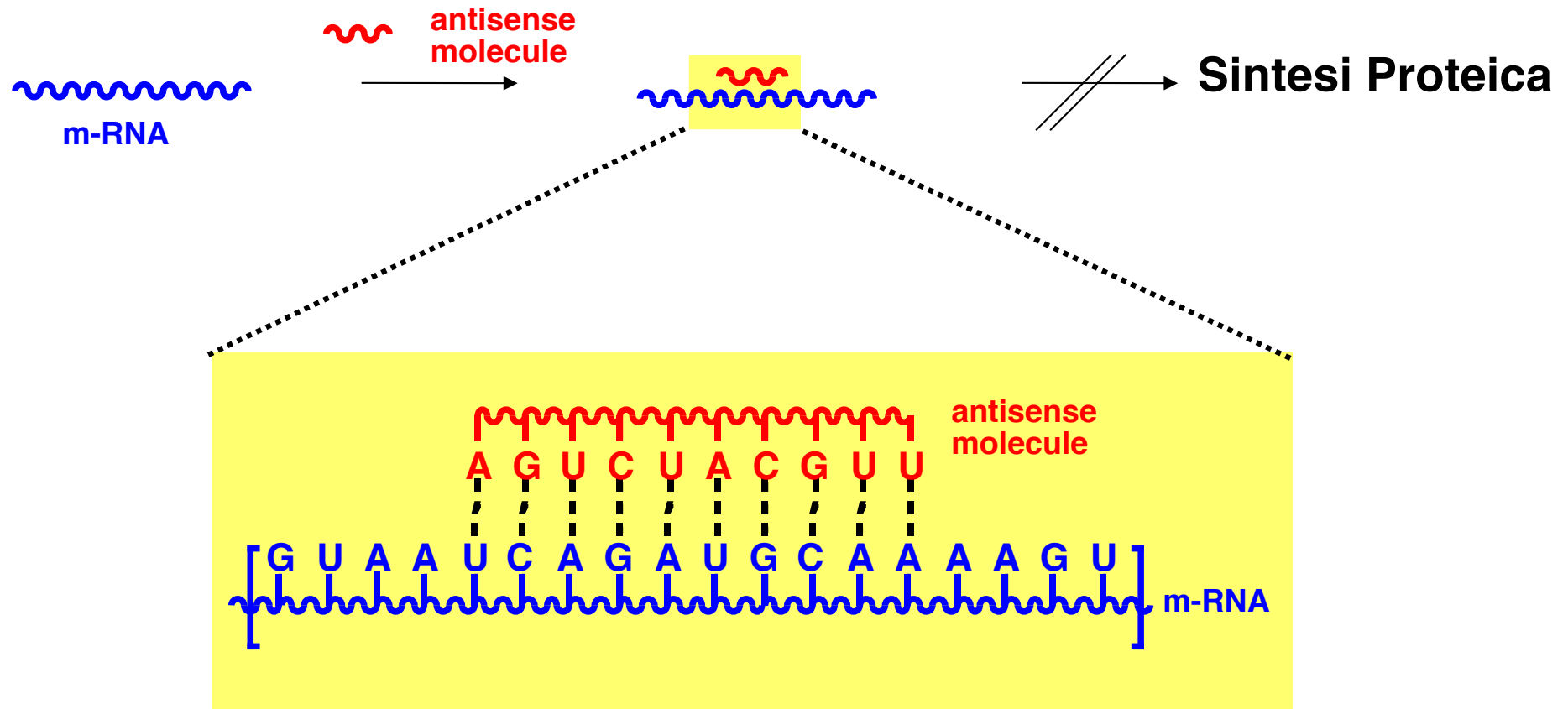
RNAi: tecnica in cui gli RNA esogeni a doppio filamento (dsRNA) complementari agli mRNA di interesse vengono introdotti in una cellula per distruggere specificamente quel particolare mRNA, diminuendo o abolendo in tal modo l'espressione genica.

Altri farmaci che agiscono sul DNA



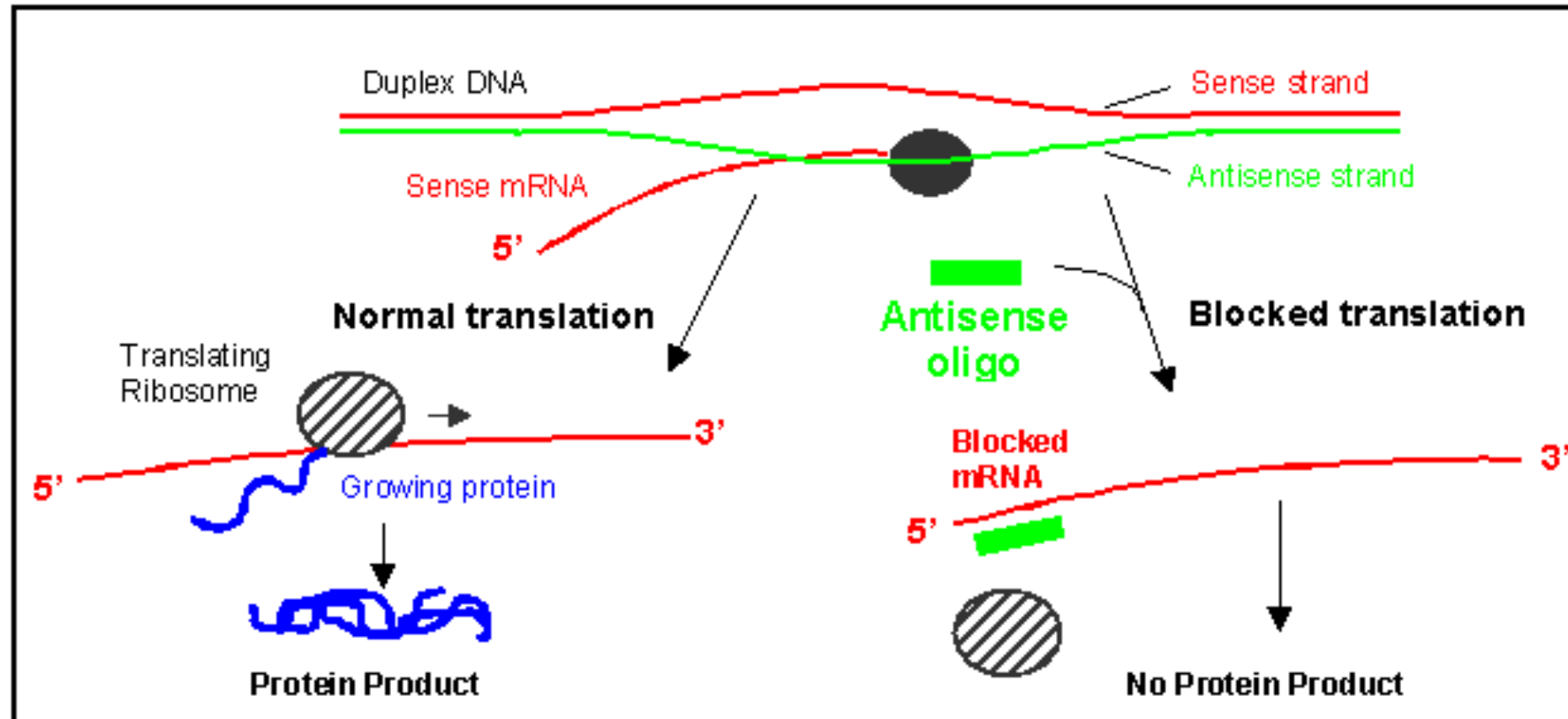
Farmaci che agiscono sugli AN

Terapia Antisenso



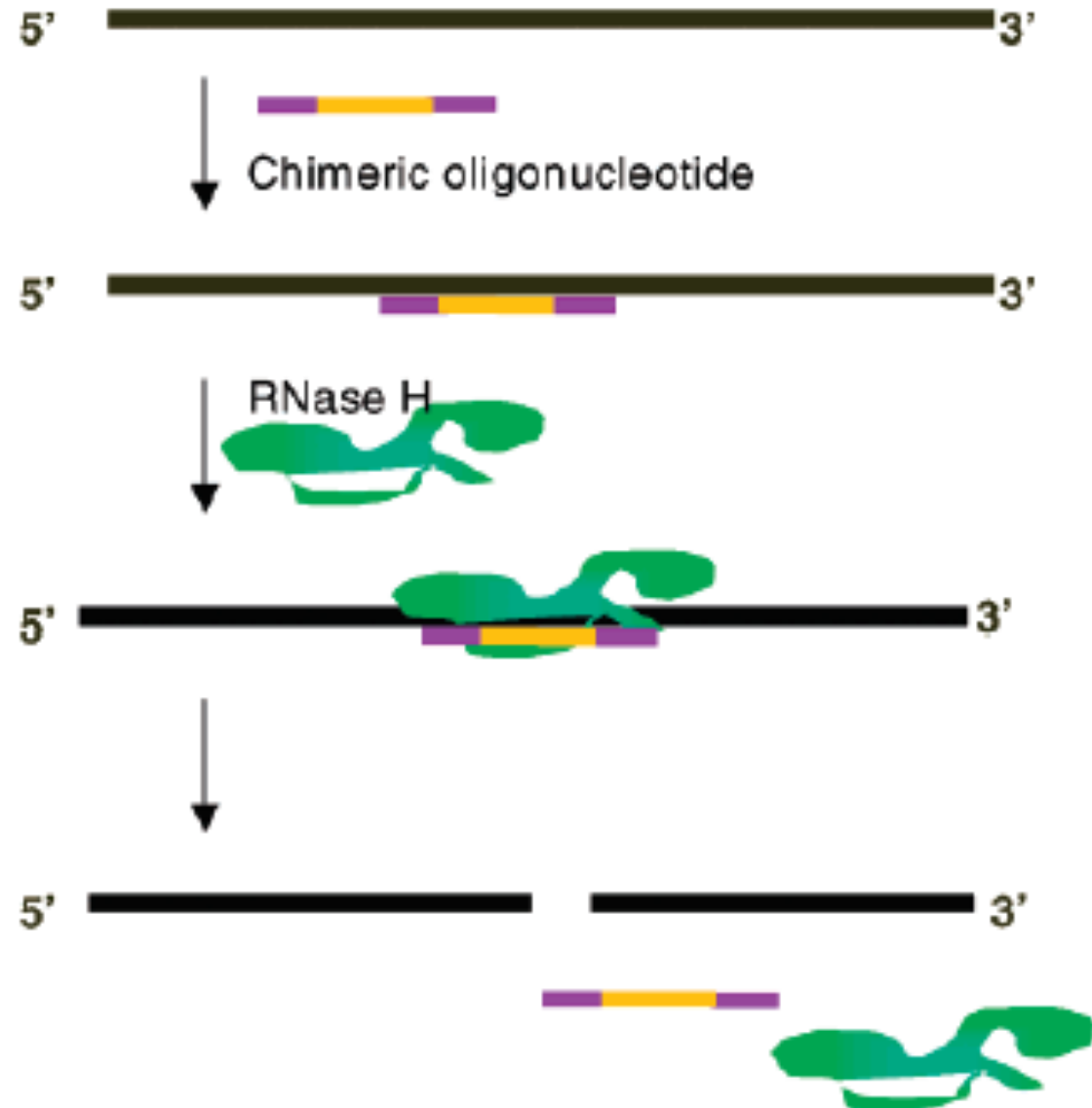
Farmaci che agiscono sugli AN

Terapia Antisenso



Composti che agiscono sul DNA

Chimeric Gapmers: LNA-DNA-LNA



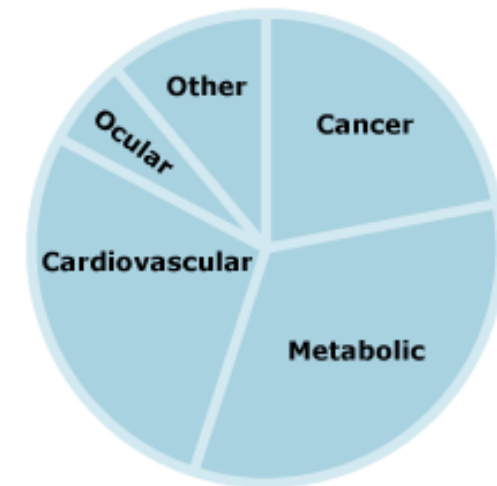
Farmaci che agiscono sugli AN

- Effetto analogo a quello di un inibitore enzimatico o di un antagonista recettoriale
- Elevata specificità (oligonucleotide ≥ 17 mer)
- Dosi inferiori rispetto a inibitori e antagonisti
- **Potenzialmente minori effetti tossici**

- Bersaglio: porzione di mRNA 'esposta'
- Instabilità e polarità degli oligonucleotidi (farmacocinetica)
- Breve tempo di emivita degli oligonucleotidi
- Scarso assorbimento attraverso le membrane cellulari

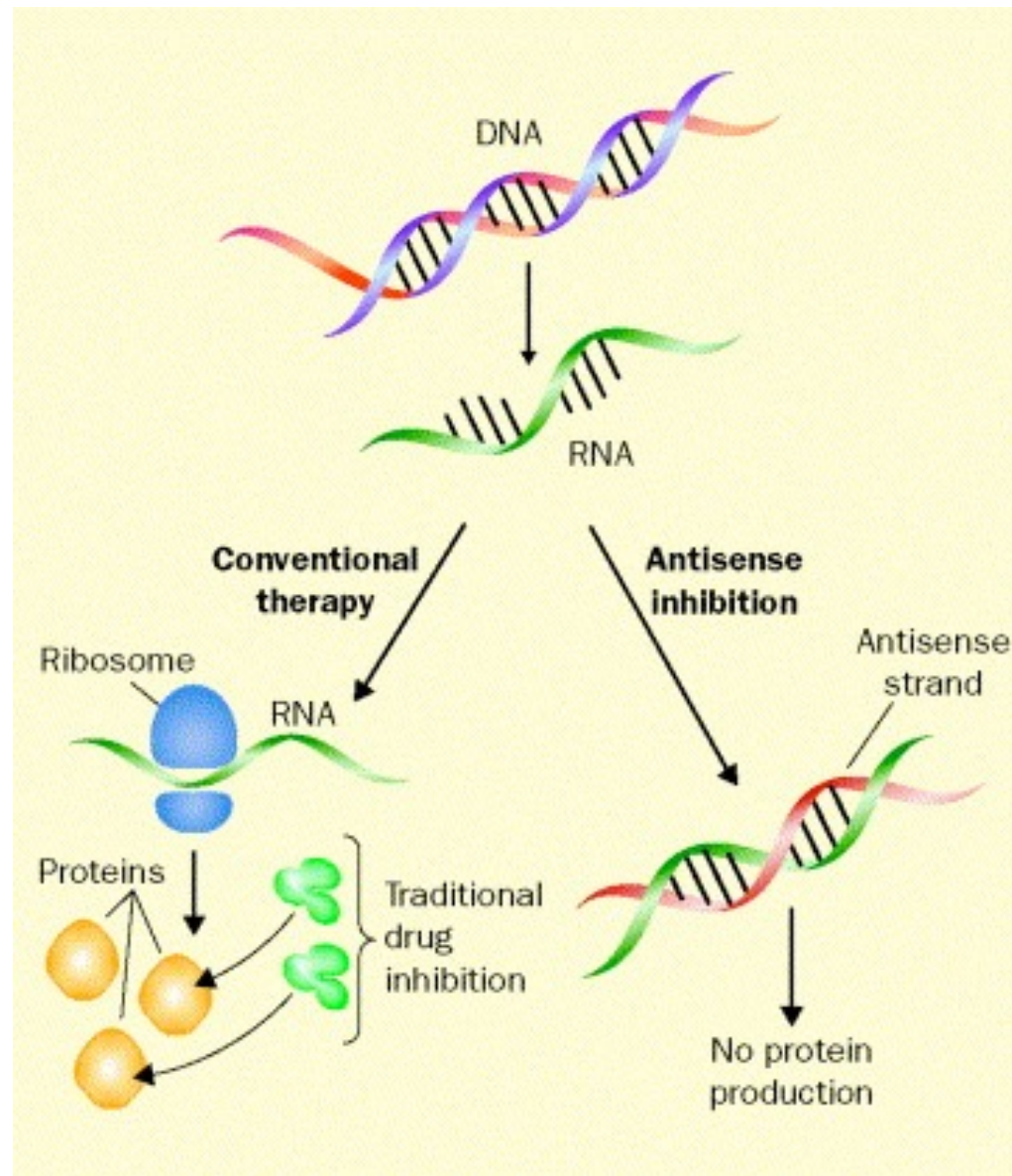
Approccio antisense

- Geni critici per i batteri o virus
- DNA per il blocco dell'espressione genica
- Morte batteri e virus
- Malattie curate
- Breve sequenza di DNA
- Corrispondente a mRNA trascritto dai geni mutati (patogenicità)
- DNA: legame con l'mRNA
- mRNA: Blocco sintesi proteica
- No proteine coinvolte nella malattia
- Malattie curate

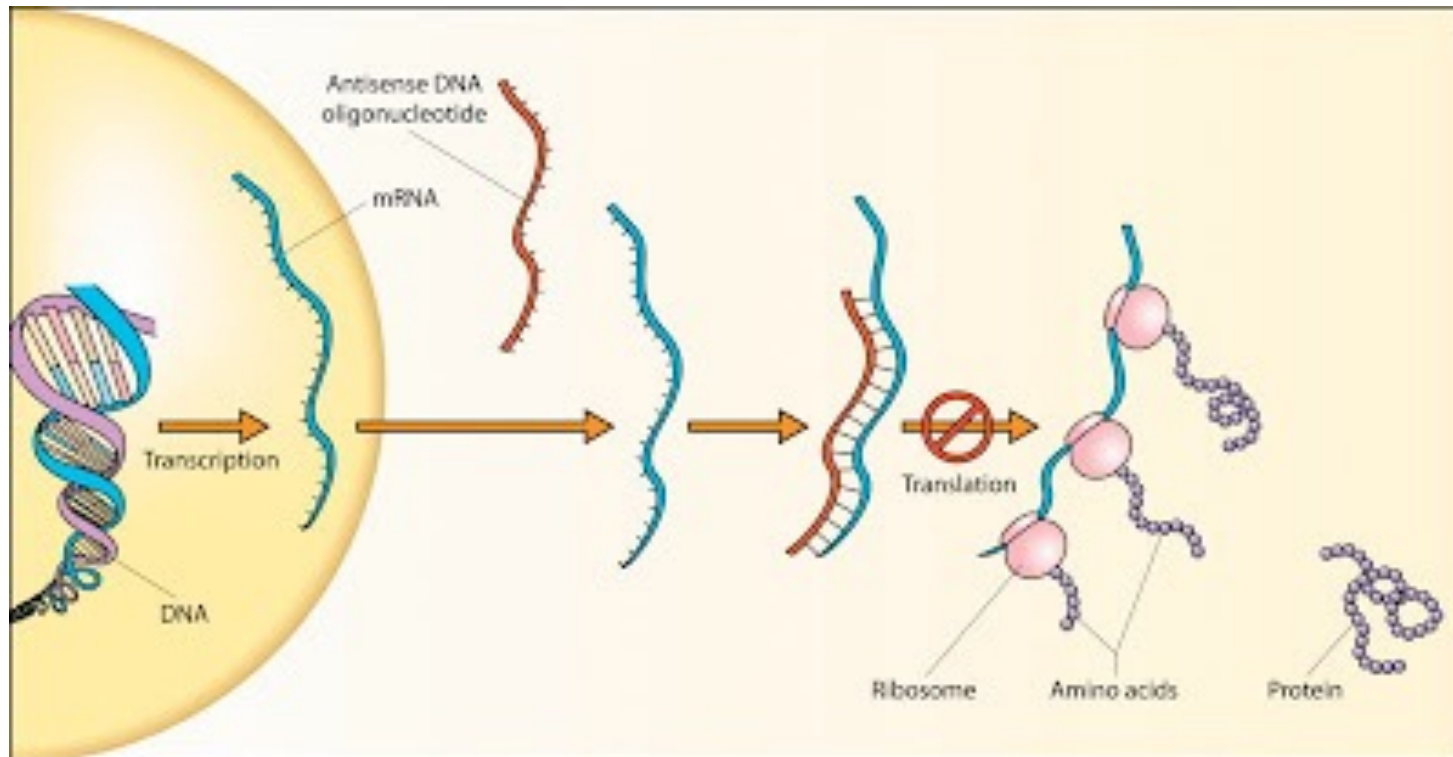


Therapeutic Areas of Research

Approccio antisense



Approccio antisense



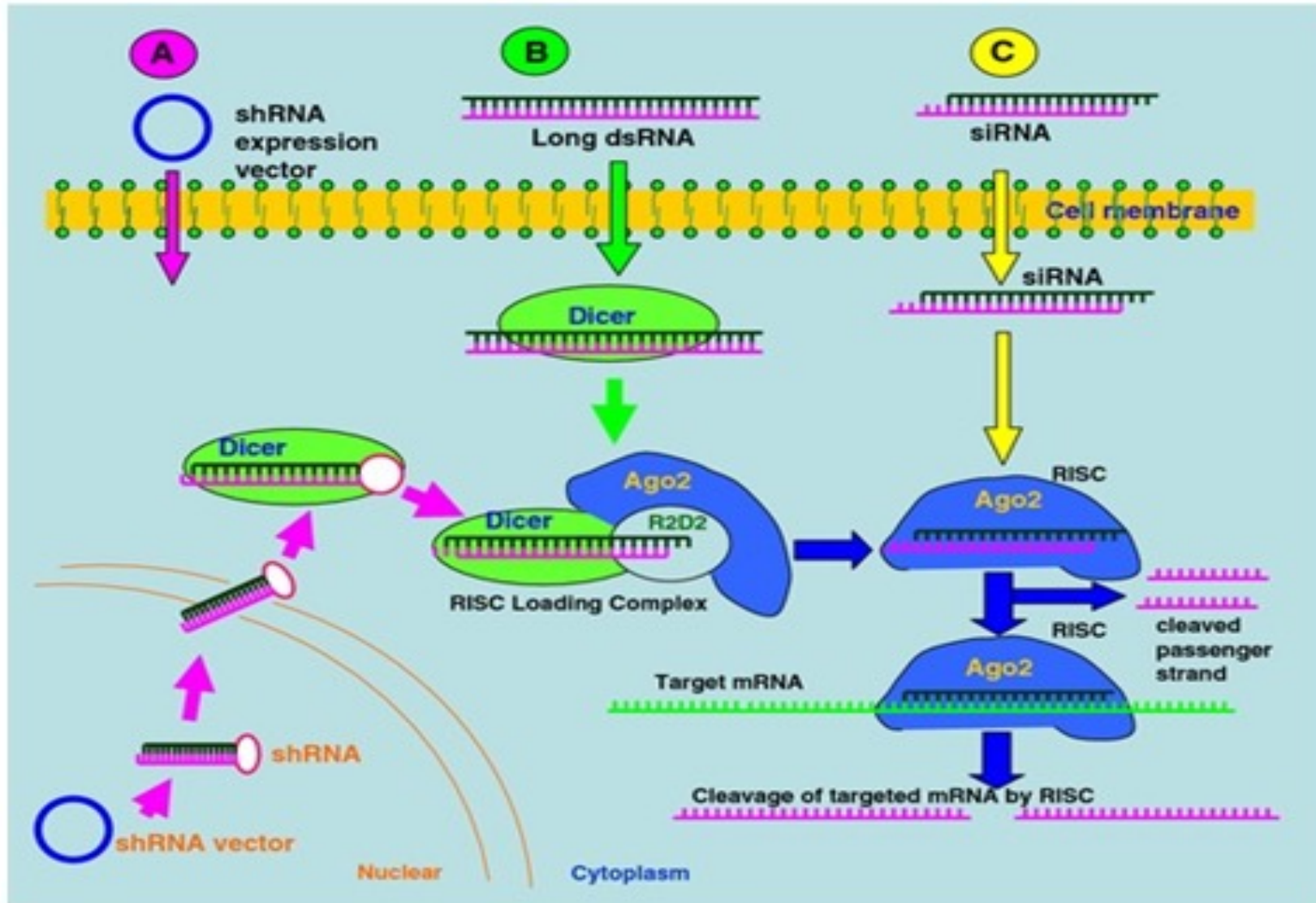
Altri farmaci che agiscono sul DNA

siRNA: small (oppure short) interfering RNA. classe di RNA a doppio filamento di 20-25 paia di basi. Possono essere introdotti artificialmente nelle cellule mediante vari metodi di trasfezione per determinare il knockdown specifico di un gene di interesse.

miRNA: microRNA. RNA a filamento singolo costituito da circa 21-23 nucleotidi. codificati da geni da cui sono trascritti, non sono tradotti in proteine (RNA non codificante). Ogni pri-miRNA viene trasformato in una struttura pre-miRNA e infine in un miRNA funzionale. Le molecole mature di miRNA sono parzialmente complementari a una o più molecole di RNA messaggero (mRNA) e la loro funzione principale è quella di regolare (diminuire) l'espressione genica.

shRNA: small (o short) RNA a forma di forcina. sequenza di RNA utilizzata per silenziare l'espressione genica attraverso l'interferenza del RNA. La struttura dell'shRNA viene scissa a livello cellulare in siRNA, poi legato al complesso di silenziamento indotto da RNA (RISC). Questo complesso si lega agli mRNA i che corrispondono al siRNA ad esso legato e li scinde.

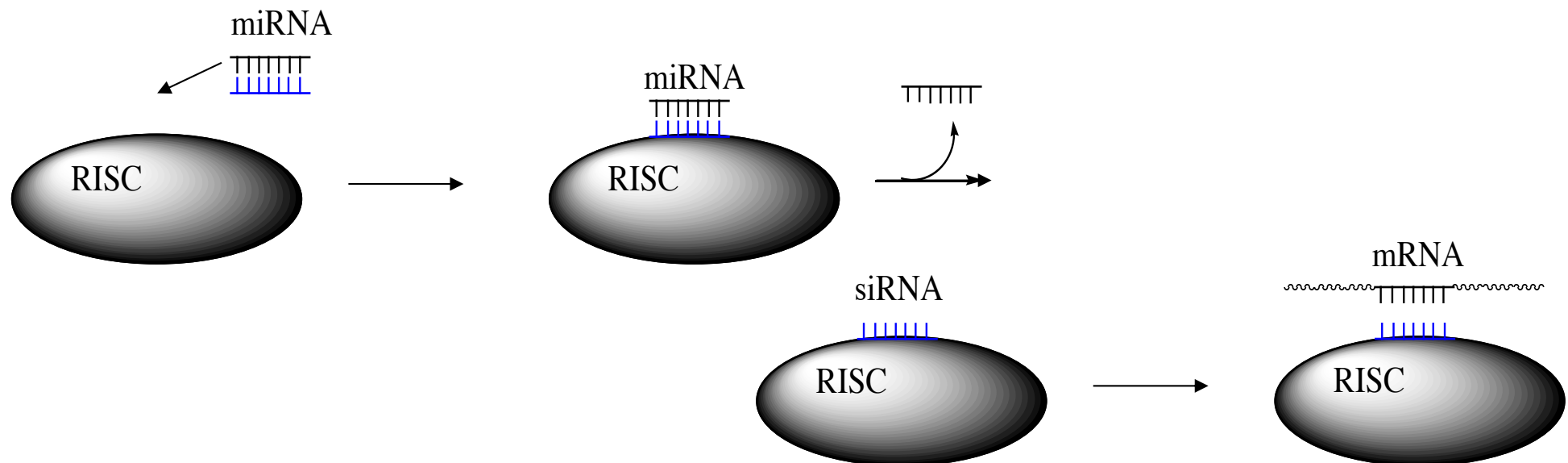
Altri farmaci che agiscono sul DNA



Composti che agiscono sugli AN

Micro-RNA (mi-RNA)

- Piccoli segmenti di RNA doppia elica
- Riconoscimento da parte di RISC
- Produzione di un singolo filamento di RNA: **small interfering or small inhibitory RNA (siRNA)**
- Legame alla regione complementare dell'mRNA
- mRNA: scissione da parte del complesso enzimatico



Approccio antisenso

USO ANTIVIRALE

Vitravene (fomivirsen)

- 5'-GCG TTT GCT CTT CTT CTT GCG-3'
- Trattamento retinite da Cytomegalovirus (CMV) in pazienti AIDS
- Farmaco Antisenso (Isis Pharmaceuticals)
- PRIMO farmaco antisenso commercializzato
- Inibizione della replicazione di CMV
- Blocco della retinite

USO ANTITUMORALE

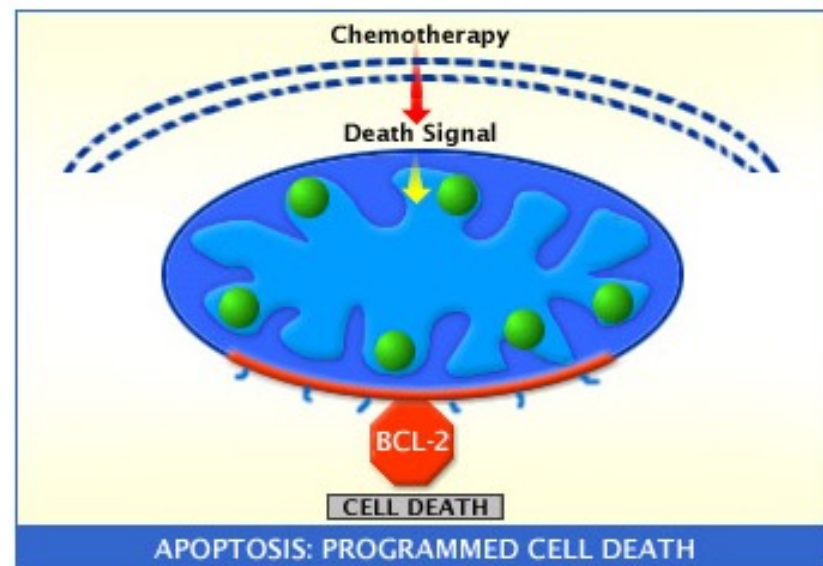
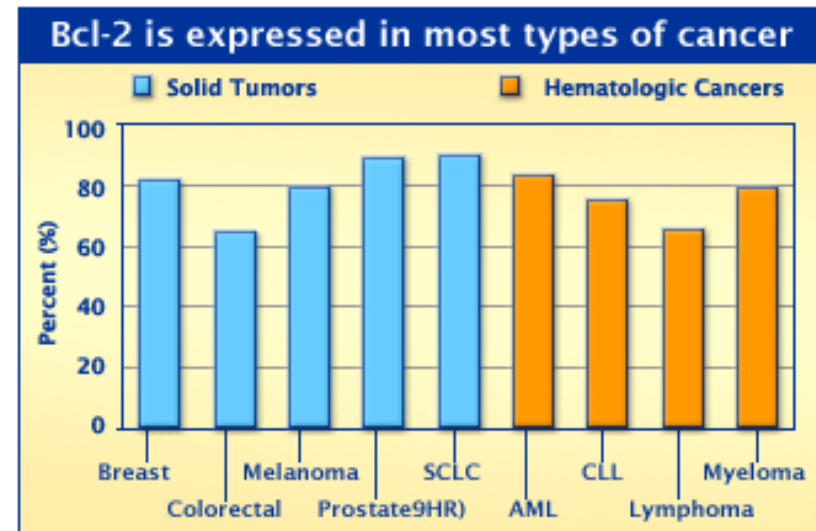
- Due farmaci antisenso in fase clinica (Fase III)
- Genassense (Genta): inibizione Bcl2
- ISIS 3521 (ISIS. Elly Lilly): inibizione di proteina chinasi C-alpha
- Efficace contro tumore non a piccole cellule del polmone

Approccio antisenso

Terapia antisenso

Bcl-2

- Blocco apoptosi
- Induzione di resistenza alla terapia anticancro
- Proteina di membrana mitocondriale
 - controllo rilascio di citocromo C
- Attivatore di cascata con risultato morte cellulare
- Alti livelli di bcl-2
 - Blocco rilascio di citocromo C innescato da terapia
- Terapia antisenso: inibizione espressione di bcl-2



Altri farmaci che agiscono sul DNA

Glybera

farmaco genetico approvato nel 2012 per curare un difetto ereditario che causa l'accumulo di grassi del sangue e determina pancreatite (1.000.000 \$ per paziente)

già ritirato dal mercato per scarso successo commerciale (malattia con una prevalenza di 1 su 1 milione di individui)

DNA (synthetic adeno-associated virus 1 vector AMT-011), complesso con le proteine VP1 (adeno-associated virus 1), VP2 (adeno-associated virus 1) e VP3 (adeno-associated virus 1)

Altri farmaci che agiscono sul DNA

Strimvelis

sviluppato a Milano per la terapia genica di un raro difetto del sistema immunitario (665.000 \$, pochi pazienti a causa del costo)

Si tratta di una preparazione che contiene cellule del midollo osseo del paziente cellule derivate dal midollo osseo del paziente stesso.

Alcune cellule (CD34 +) sono state geneticamente modificate per contenere un gene funzionante per l'ADA (Adenosina deaminasi). Strimvelis è un tipo di medicina per terapia avanzata chiamata "prodotto per terapia genica".

Altri farmaci che agiscono sul DNA

Luxturna

rara forma di cecità congenita, costa 435mila dollari per occhio.

DNA con virus per delivery

I due farmaci antitumorali Yescarta e Kymriah, che uccidono i linfociti tumorali in una forma di linfoma e leucemia rispettivamente, costano il primo 373mila e il secondo 475mila dollari a trattamento.

Yescarta: Chimeric Antigen Receptor T cell therapy. 2×10^6 cellule T CAR positive per kg di peso corporeo

Kymriah: CAR T Therapy

Farmaci che agiscono sugli AN

- siRNAs: potenziale uso in terapia genica
 - Ottima efficienza nel silenziamento di mRNA
 - Migliore di terapie antisenso convenzionali
 - 1 molecola di siRNA: induzione della scissione di molte molecole di mRNA
-
- siRNA: metabolicamente instabili
 - Necessità di raggiungere le cellule bersaglio
 - Problemi di ingresso nelle cellule