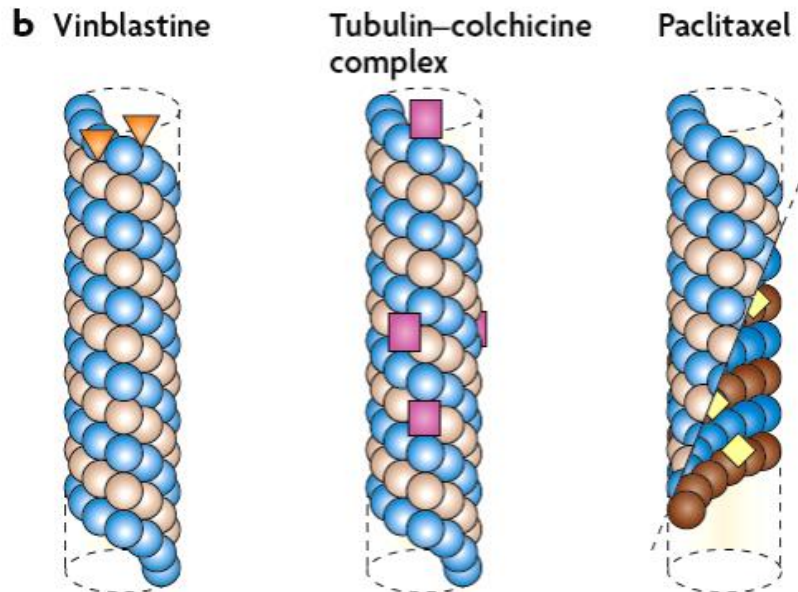
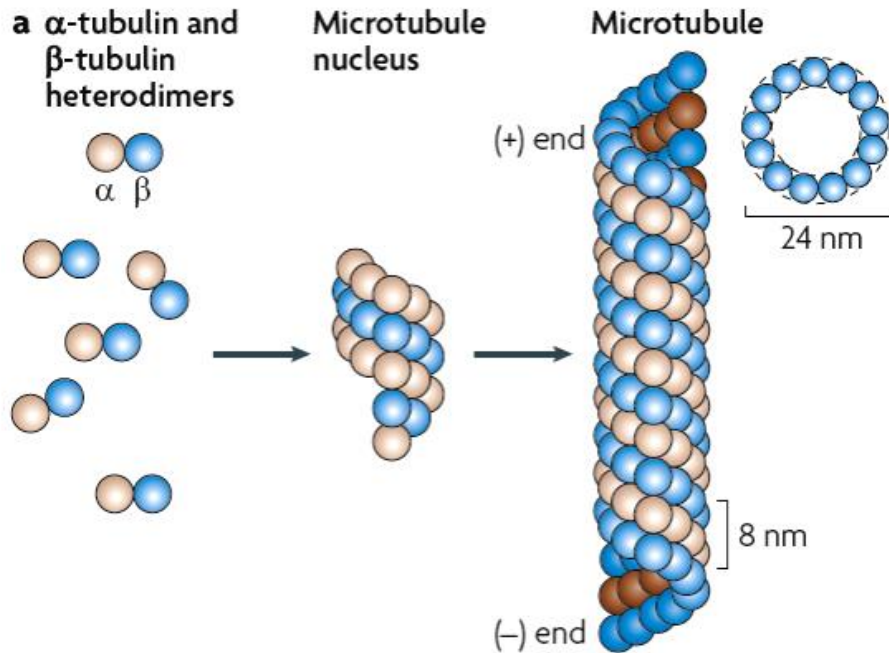


Chimica Farmaceutica e Tossicologica 2

Antitumorali IV parte

- **Modulatori stabilità microtubuli:**
 - Alcaloidi della Vinca (sito della Vinca);
 - Tassani (sito del tassolo);
 - Colchicina e Combretastatina (sito della colchicina);
- **Inibitori proteín-kinasi:**
 - Imatinib, Dasatinib, Nilotinib



- Strutture intracellulari responsabili della morfologia e movimento. Negli eucarioti formano il citoscheletro (microtubuli).
- 13 protofilamente paralleli in equilibrio dinamico (polim-depolim) con dimeri della tubulina (subunità α e β).
- Microtubuli-fusi mitotici-segregazione cromosomi durante mitosi;
- **Antimitotici**: chemioterapici che alterano l'equilibrio pol/depol;
- **Inibitori polimerizzazione** (agenti destabilizzanti);
- **Inibitori depolimerizzazione** (agenti stimolanti polimerizzazione, stabilizzanti);
- Emivita microtubuli ~ 15 sec;
- effetto sinergico in associazione (riduzione dose somministrata).

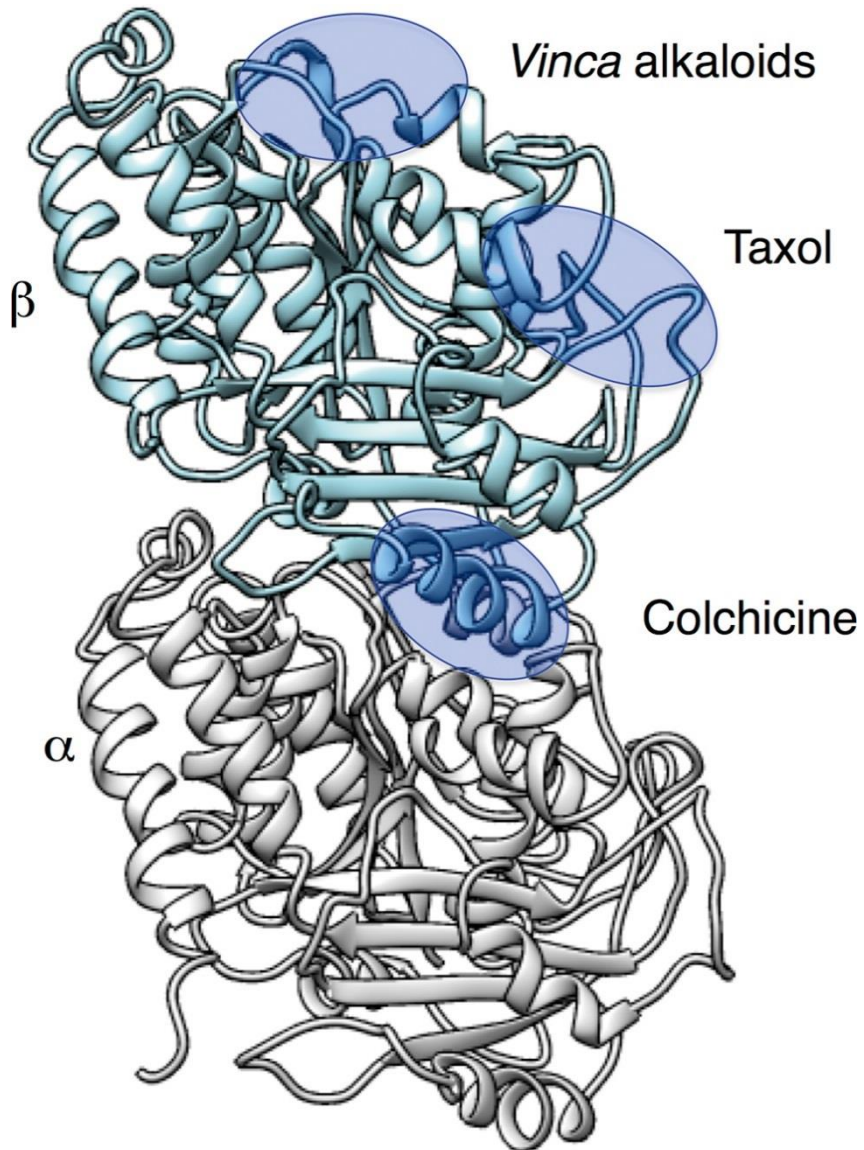
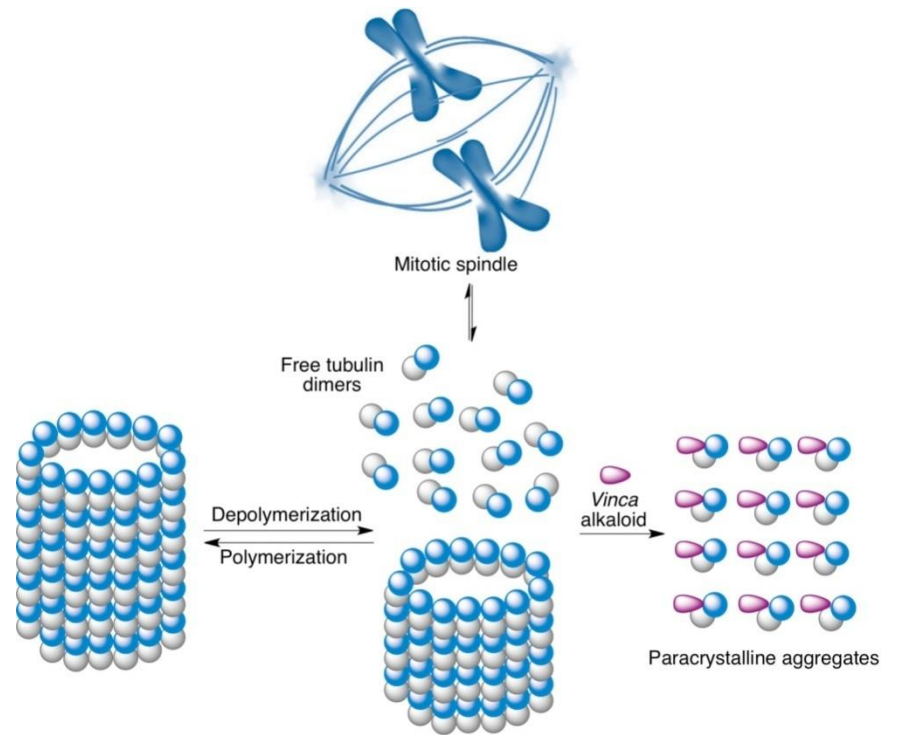


Figure 9.02

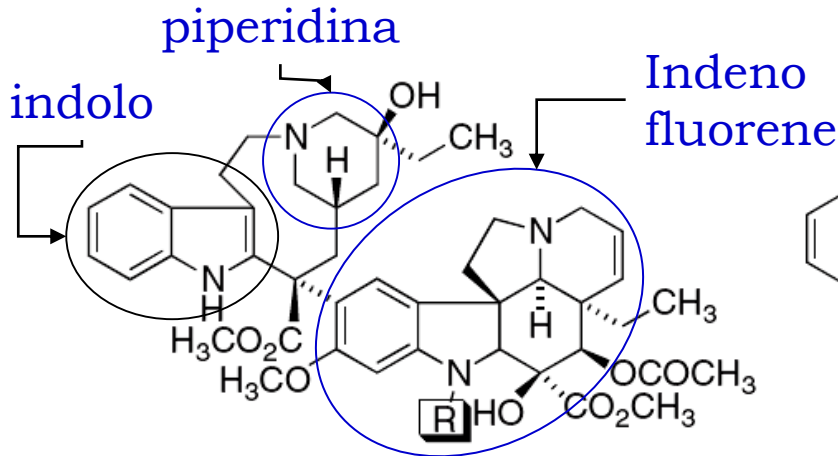


Equilibria are displaced towards depolymerization

Figure 9.03

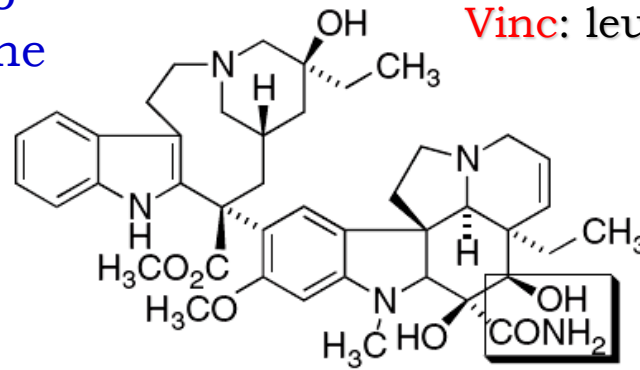
Alcaloidi della vinca e analoghi sintetici ('60)

Inibitori della polimerizzazione dei microtubuli ad elevate concentrazioni: **Binding al sito della Vinca** (alcaloidi della vinca, *Catharanthus roseus* (Vinca rosea)).

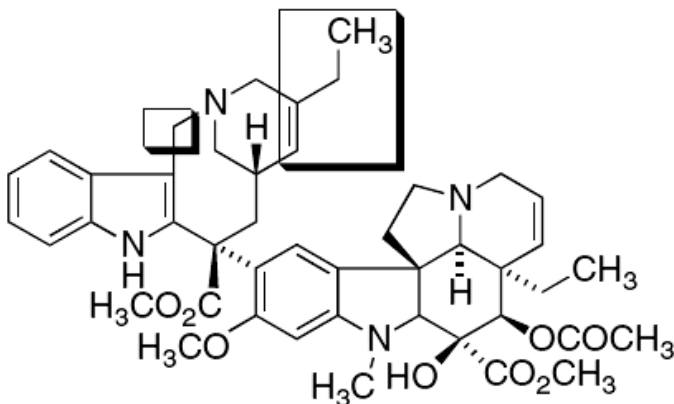


R=CHO **Vincristina**
R=CH₃ **Vinblastina**

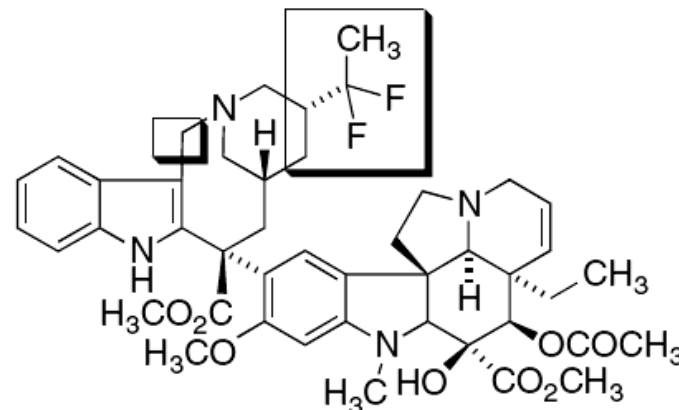
Vinb: linfoma di Hodgkin (ABVD) tum testicolari,
Vinc: leucemia, linfoma;



Vindesina melanoma, tum polm,

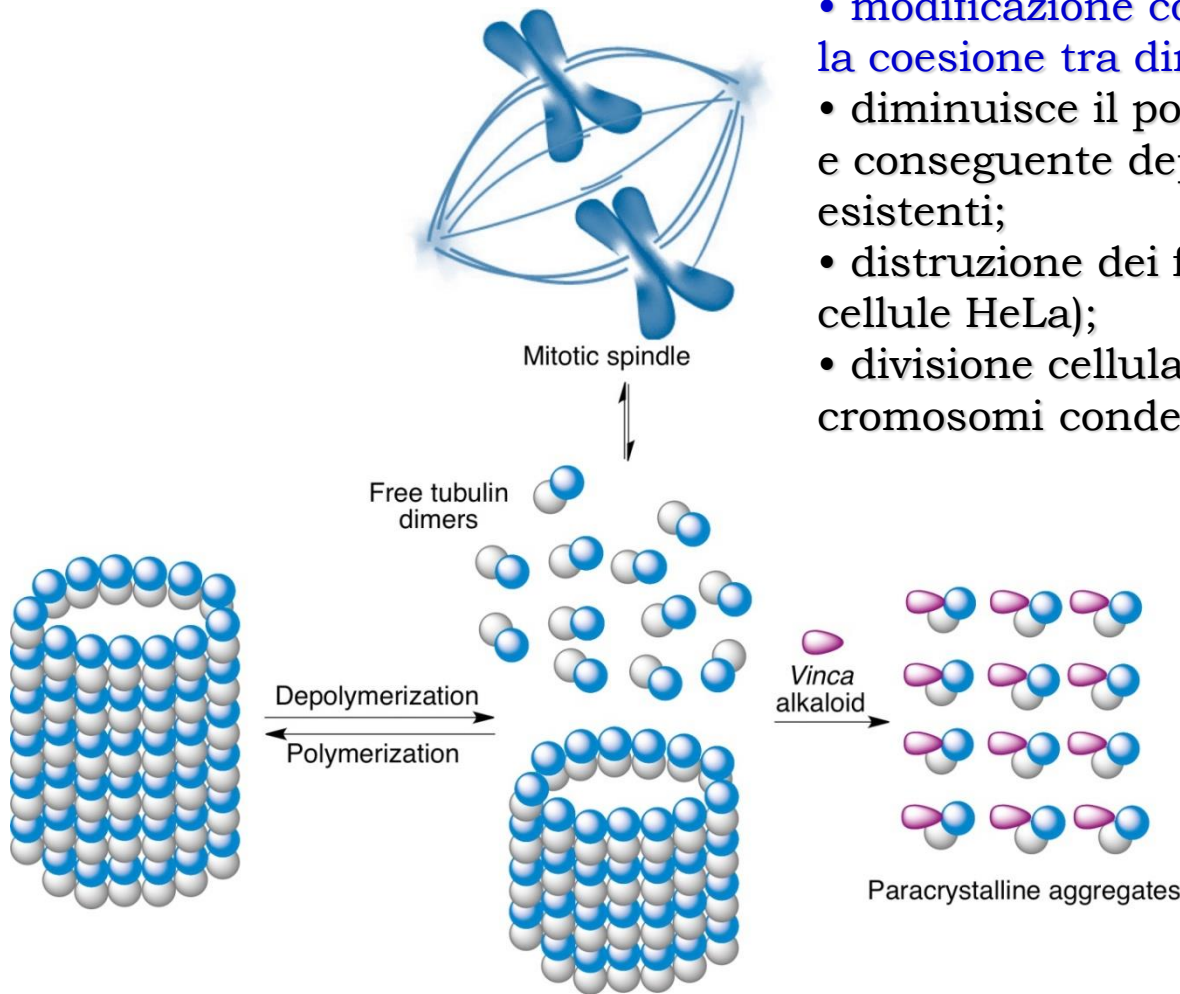


Tum polm non a piccole cellule **Vinorelbina**



Vinflunina Sviluppo clinico, approv tum vescica

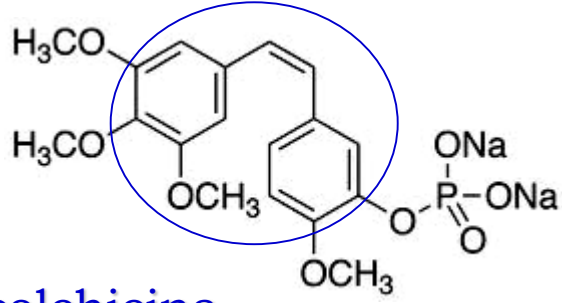
- binding specifico alla subunità β dei dimeri della tubulina (Vinca domain).
- binding rapido e reversibile;
- modificazione conformazionale che incrementa la coesione tra dimeri \rightarrow **aggregati paracristallini**.
- diminuisce il pool di tubulina libera disponibile e conseguente depolimerizzazione dei microtubuli esistenti;
- distruzione dei fusi mitotici (10-100nM in cellule HeLa);
- divisione cellulare bloccata in mitosi con cromosomi condensati



Equilibria are displaced towards depolymerization

Neurotossicità, rapido insorgere di resistenza (P-gp)

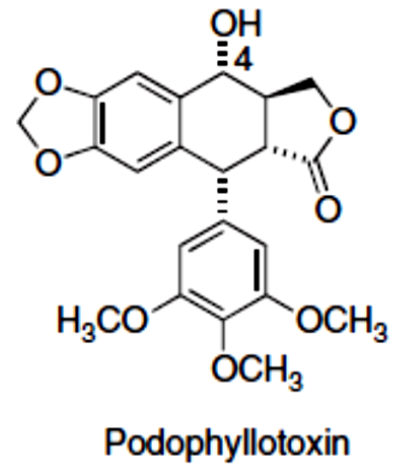
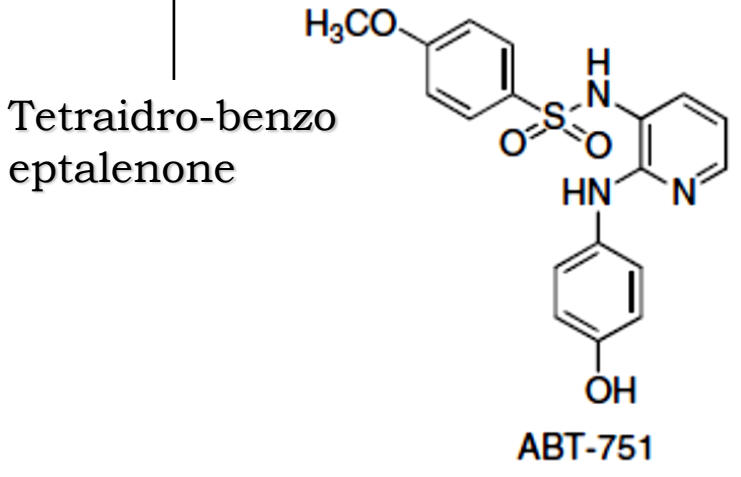
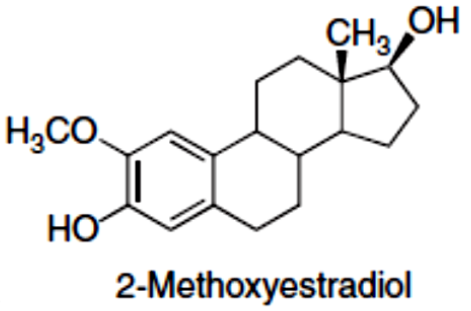
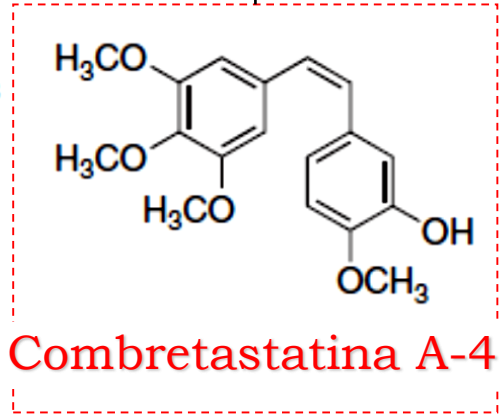
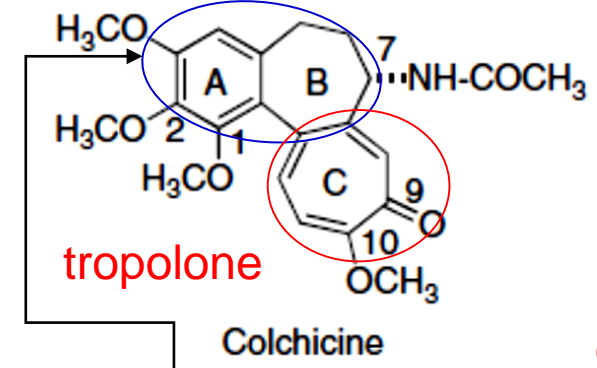
Inibitori della polimerizzazione dei microtubuli: **Binding al sito della Colchicina** (*Colchicum autumnale*)



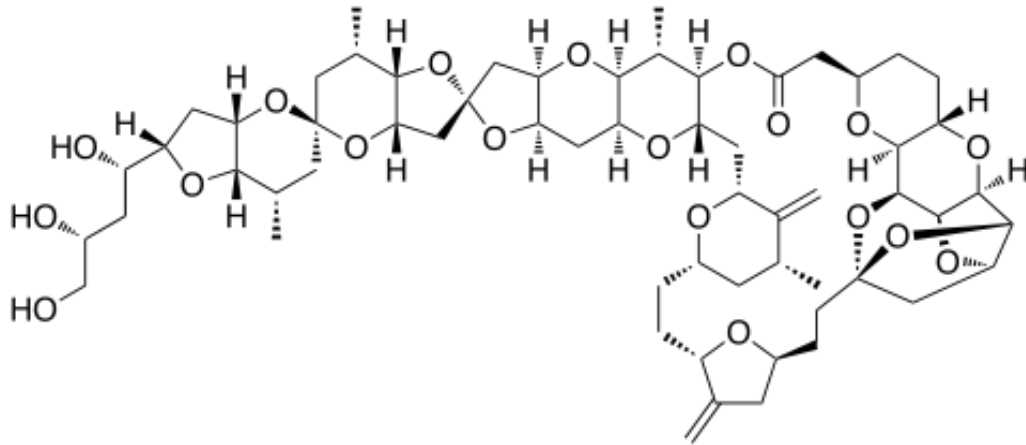
azione vascolare (VDAs, angiogenesis inhibitors)



Zybrestat (fosfato)



Altri antimitotici di origine naturale (sito di binding alcaloidi della Vinca)





MOLECULES THAT CHANGED THE WORLD

K. C. NICOLAOU • T. MONTAGNON



Il ***Taxus brevifolia***, noto come Tasso del pacifico è un albero originario delle regioni nord-occidentali dell'America



Conifera sempre verde, crescita lenta, circa 10 mt; corteccia liscia bruna-rossastra, squama età avanzata, frutto rosso, unico seme in arillo carnoso.

Foglie, corteccia e seme contengono miscela di alcaloidi, tossici, di origine terpenica.



Taxus brevifolia

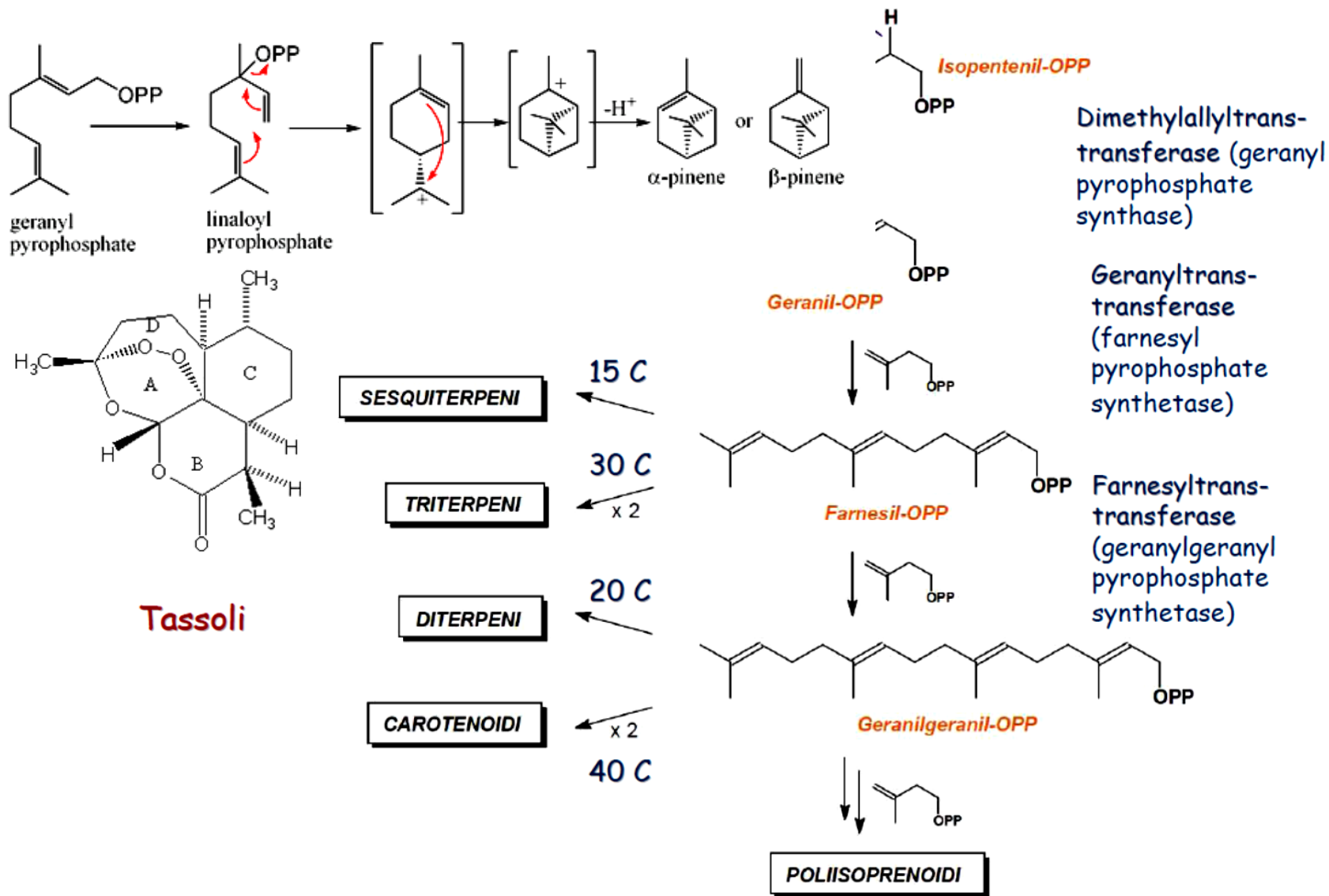
- ~ 500 a.C. Teofrasto: piante velenosa per gli equini;
- ~ 50 d.C. Plinio il Vecchio: pericoloso dormire sotto tasso o bere vino da botti di tasso (freccie, lance)

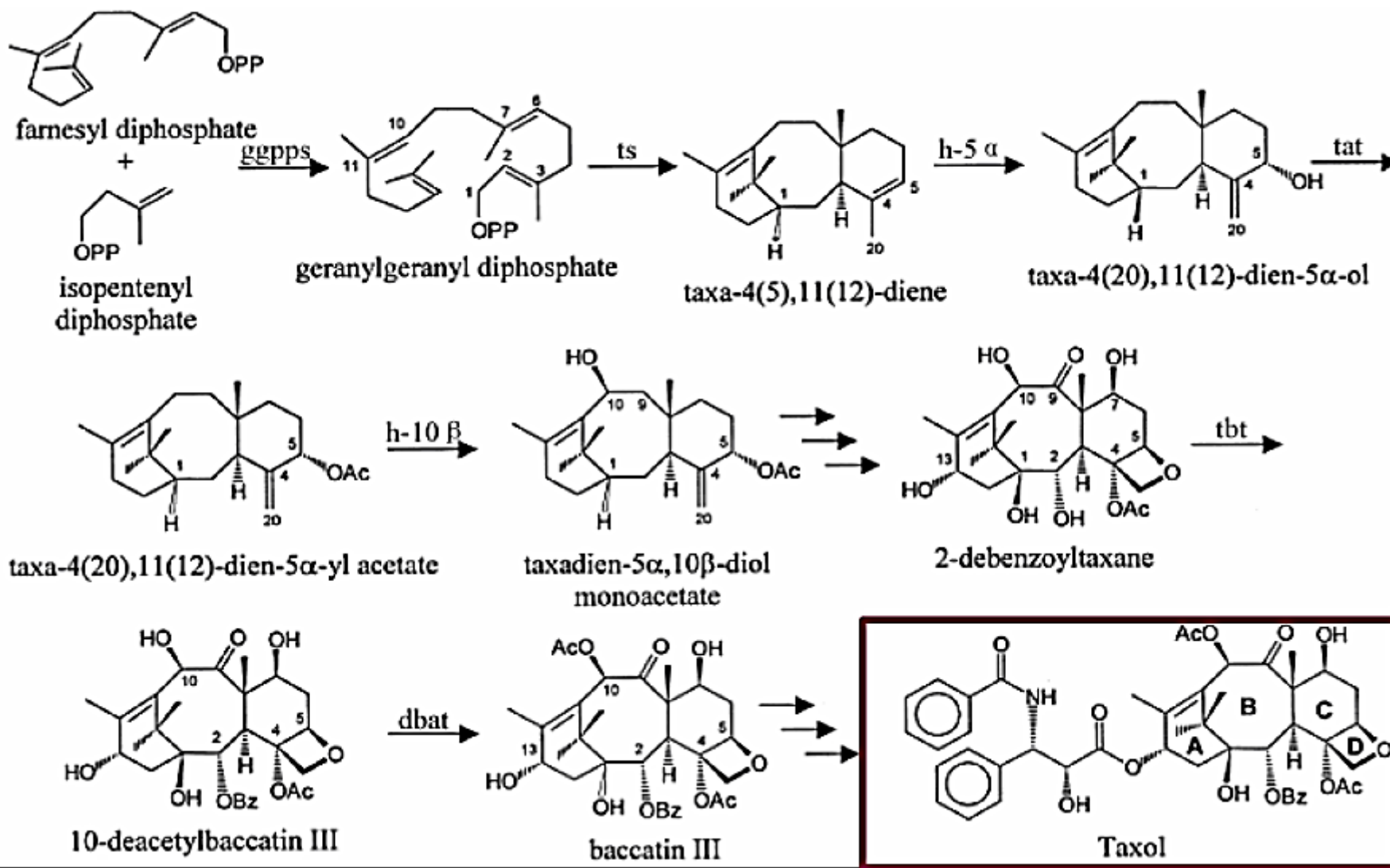
1958: Il National Cancer Institute (NCI) avvia un programma per esaminare 35.000 specie botaniche allo scopo di trovare un principio attivo contro le cellule cancerose. Uno dei campioni era la corteccia del *Taxus brevifolia*;

1963: Monroe Wall e M.C. Wani (Research Triangle Institute-North Carolina) scoprono che l'estratto è in grado di rallentare la crescita tumorale nei topi;

1971: identificano il composto 17 come principio attivo, battezzato successivamente con il nome di **Taxol**.

B) Formazione delle catene poliisopreniche





Stabilizzanti microtubuli-Tassani: **Binding al sito del tassolo**

Screening NCI-1960
(corteccia -*Taxus brevifolia*,
Pacifico)

estrazione complessa, basse rese, crescita lenta
albero (4000 alberi → 360g di tassolo → per ogni
trial clinico)

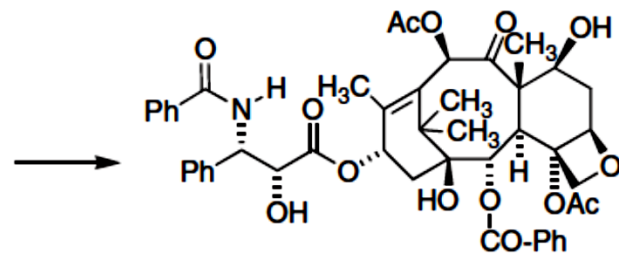
Elevata produzione, alte
rese da estrazione di
ramoscelli ed aghi (1g/Kg),
fonte rinnovabile

1994 : Due gruppi di ricerca sono stati in grado di
raggiungere la sintesi totale da semplici materiali di
partenza (Holton et al 1994 ; Nicolaou et al 1994)

- 1. La sintesi richiede 20 steps
- 2. Rese basse

World Health Organization's List of Essential
Medicines,

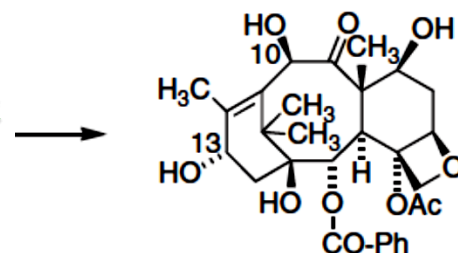
Pacific yew (*Taxus brevifolia*)
Bark



Paclitaxel (tassolo)

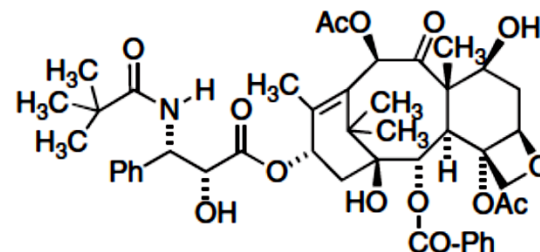
↑ Semisynthesis

Foglie *Taxus baccata*
(europa)



deacetylbaecatina

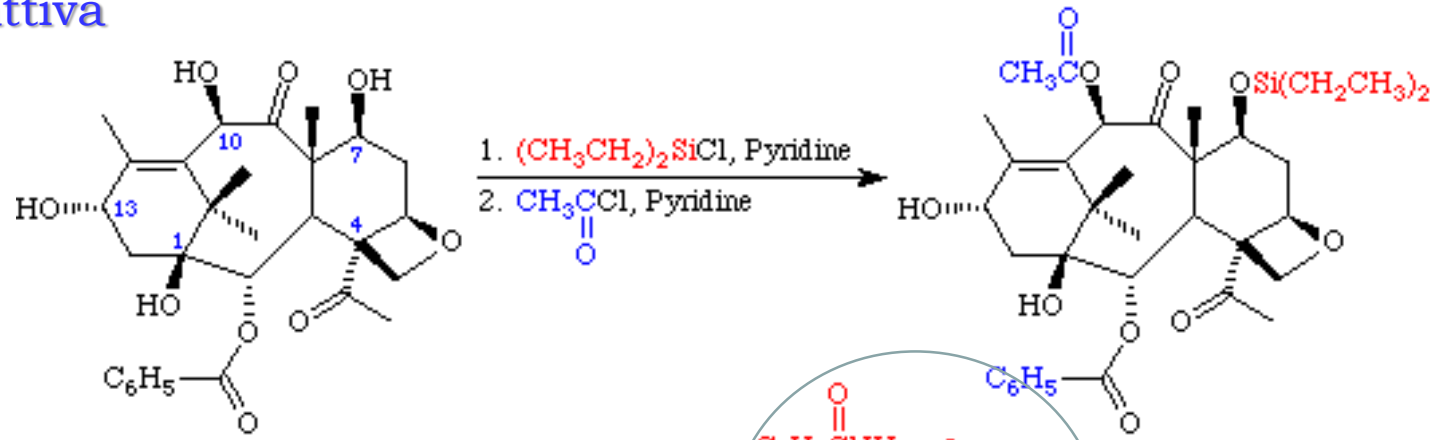
↓ Semisynthesis



docetaxel

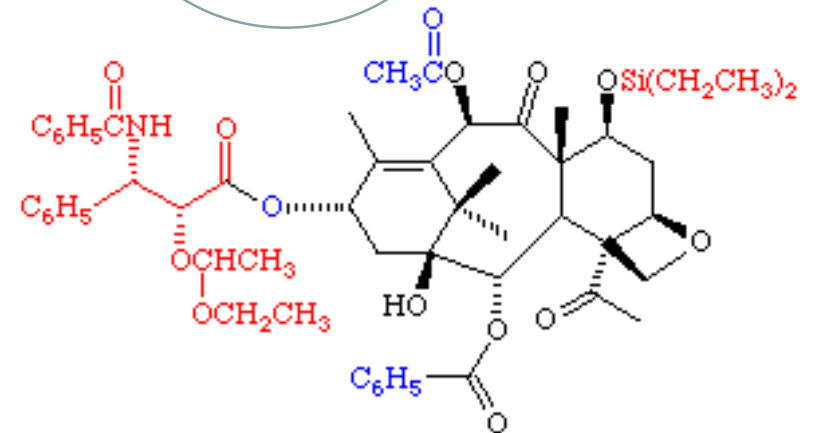
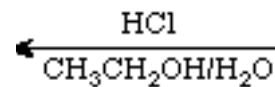
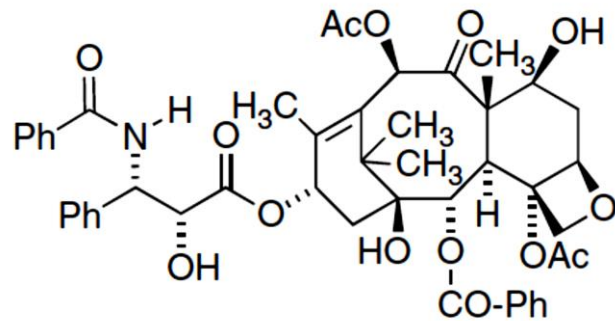
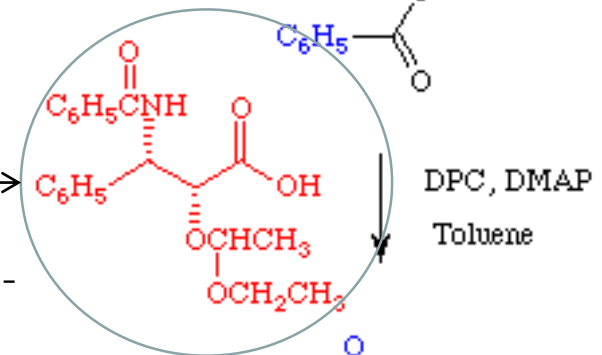
FIGURE 8.3 Semisynthesis of taxanes.

Non attiva



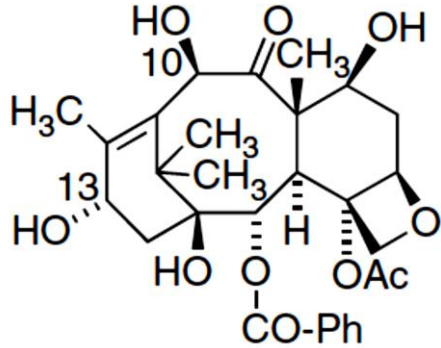
10-deacetylbaccatin III

Acido 2-(1-etossietossi)-3 (benzamido)-3-fenil propanoico

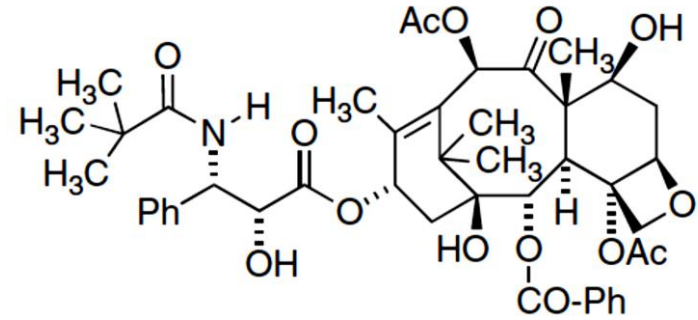


Stabilizzanti microtubuli-Tassani: **Binding al sito del tassolo**

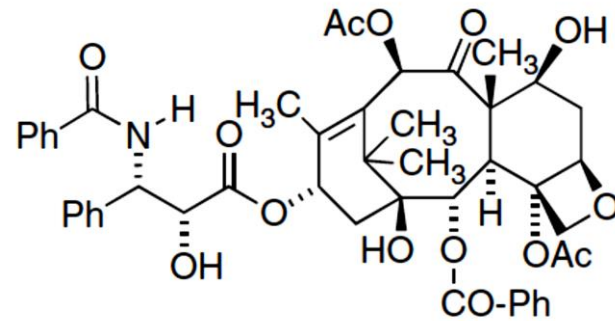
Tumore seno, ovarico, polmonare



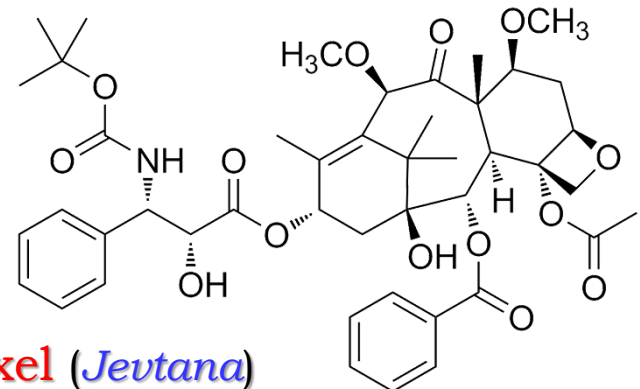
10-Deacetylbaccatin III



Docetaxel (*Taxotere e equivalenti*)

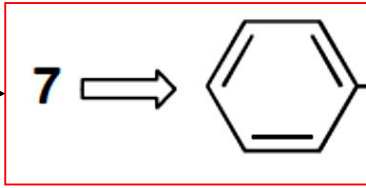
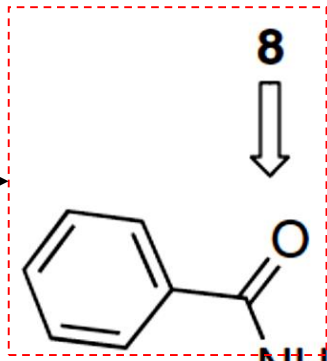
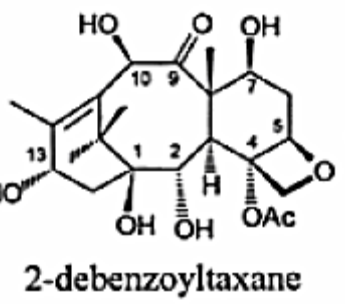


Paclitaxel (*Anzatax, Taxol e equivalenti*)



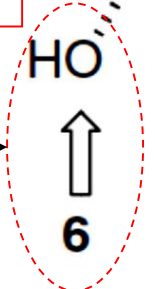
Cabazitaxel (*Jevtana*)

- stadio G2/M, stabilizzazione dei fusi, arresto mitosi, binding subunità β , Aumenta la massa dei microtubuli (*bundling*); resistenza per mutazione della tubulina
- insolubile acqua, ☒ o.s., formulazioni con olio di castoreo poliossietilato (Cremophor EL)

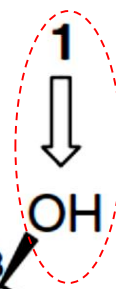
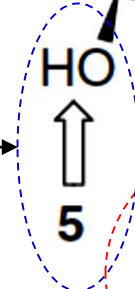


essenziale

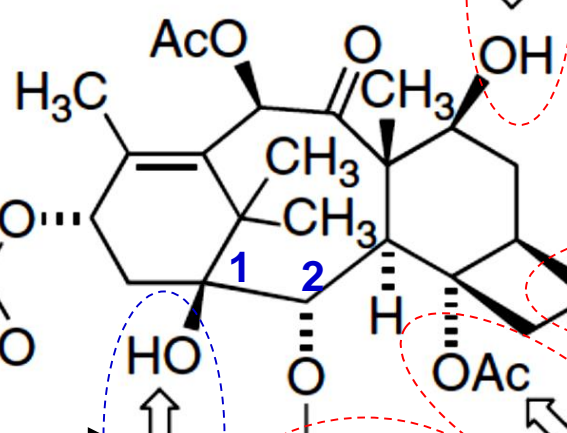
Essenziale, esteri idrolizzabili (profarmaci)



non essenziale

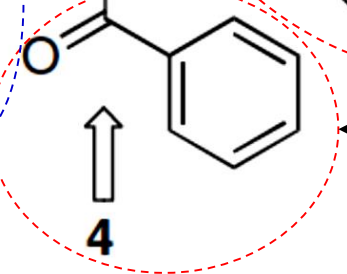
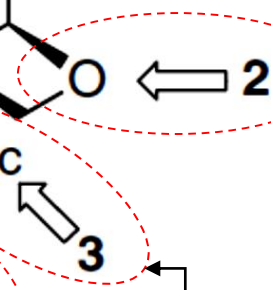


Non essenziale, può essere rimosso, epimerizzato o esterificato



essenziale

essenziale



Genoma Umano-Albero filogenetico Protein chinasi.

3 tipi: TSK (tirosin kinasi); Serina-treonina kinasi; Istidina kinasi

Kinasi catalizzano il trasferimento di un gruppo γ -fosfato di ATP ad un substrato, attivando (mediando) la maggior parte delle trasduzioni di segnale nei processi metabolici cellulari (proliferazione, apoptosi, trascrizione, differenziazione....)

Target per numerose patologie: cancro, infiammazione, malattie cardiovascolari, disordini CNS, processi dismetabolici

1968- protein kinasi A;

'80-primi inibitori EGFR

'90: decade cascata protein kinasi

(MAPK/ERK, JAK, PI3K;

2001-imatinib;

2012-2015: 15 nuovi inibitori su 28

attualmente disponibili (small molecules);

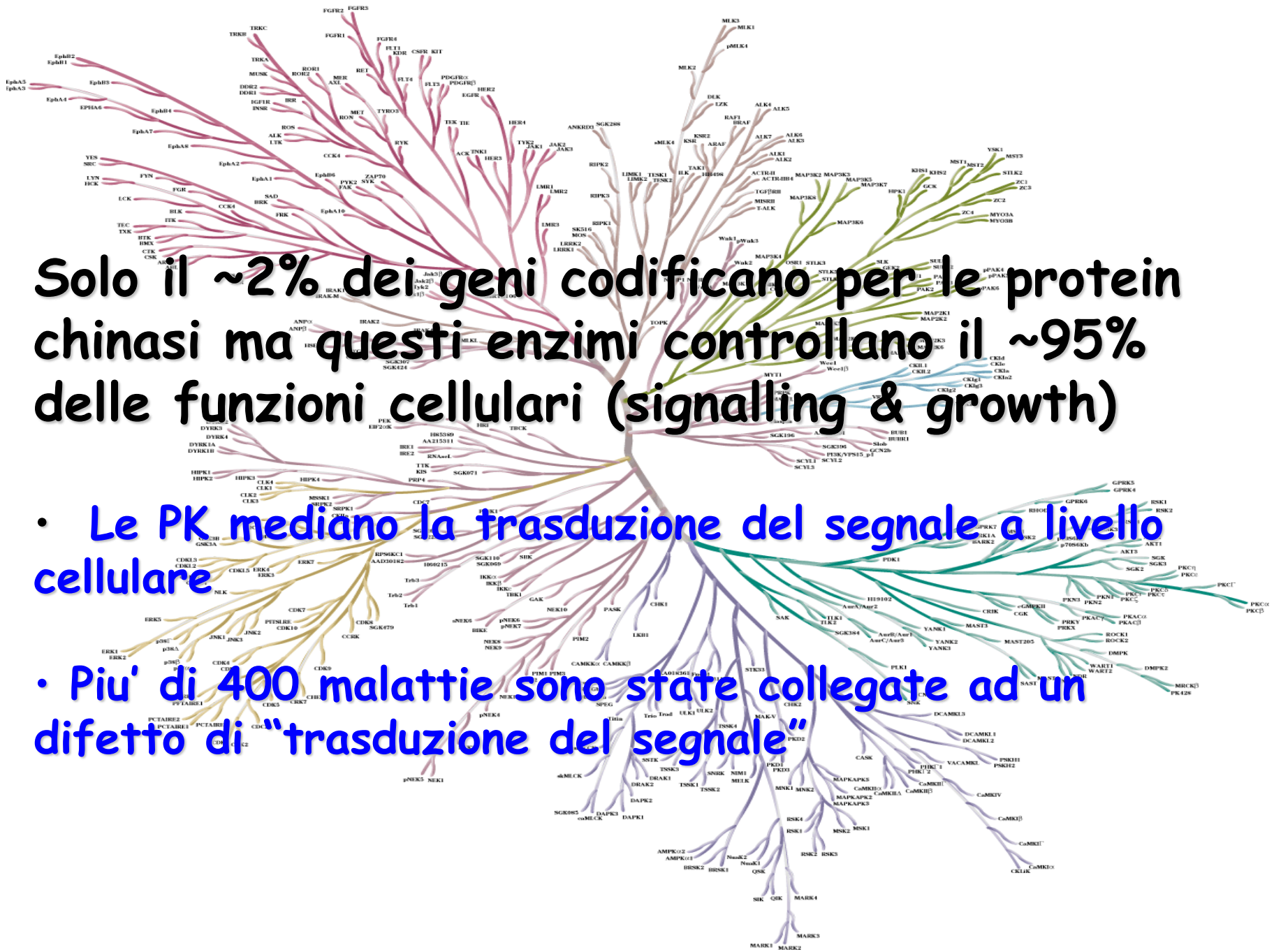
>1000000 pubblicazioni;

> 5000 strutture risolte Rx

~ **520 Protein kinasi,**

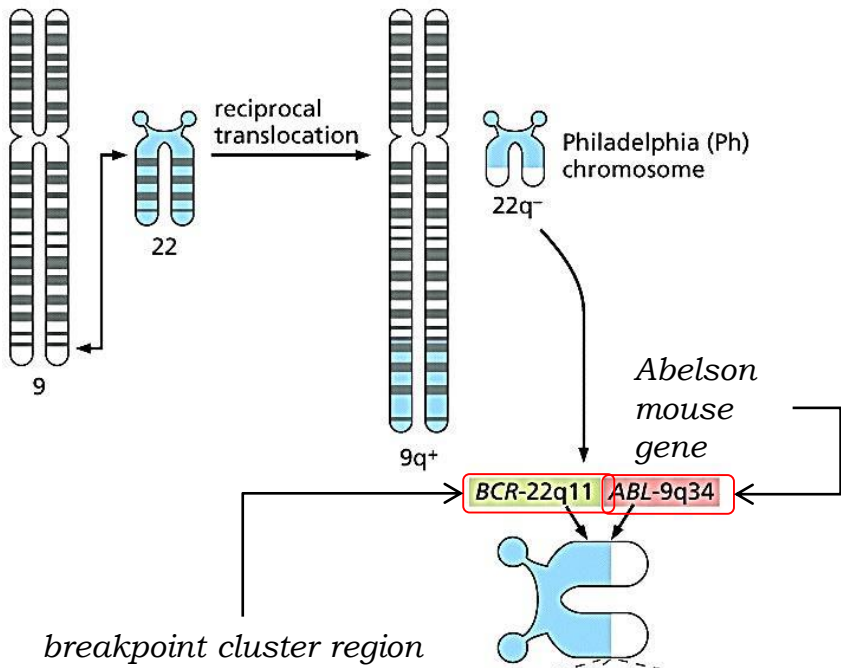
~ **900 geni codificanti kinasi**

<http://www.ebi.ac.uk/QuickGO/GTerm?id=GO:00047>



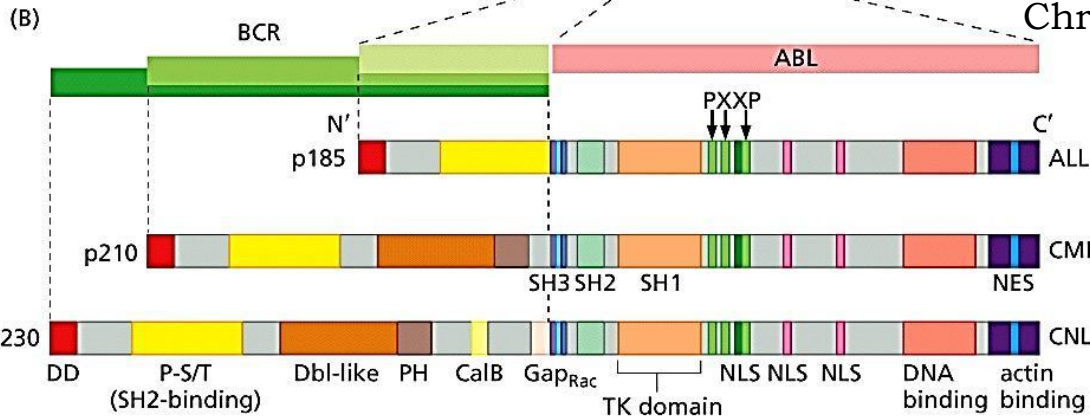
Solo il ~2% dei geni codificano per le protein chinasi ma questi enzimi controllano il ~95% delle funzioni cellulari (signalling & growth)

- Le PK mediano la trasduzione del segnale a livello cellulare
- Piu' di 400 malattie sono state collegate ad un difetto di "trasduzione del segnale"



Walter Sutton (left) and Theodor Boveri (right) independently developed the chromosome theory of inheritance in 1902.

Peter C. Nowell, and David Hungerford, cancer researchers and co-discoverers of the Philadelphia Chromosome.



ALL (Leucemia acuta linfoblastica)

CML (Leucemia cronica mielogena)

CNL (Leucemia cronica neutrofilica)

Gleevec trials (6000)
90% response,
50% no BCR-ABL

Difetto cromosoma vs abnorme prolifer. cellulare

Traslocazione 9-22 (95% CML)

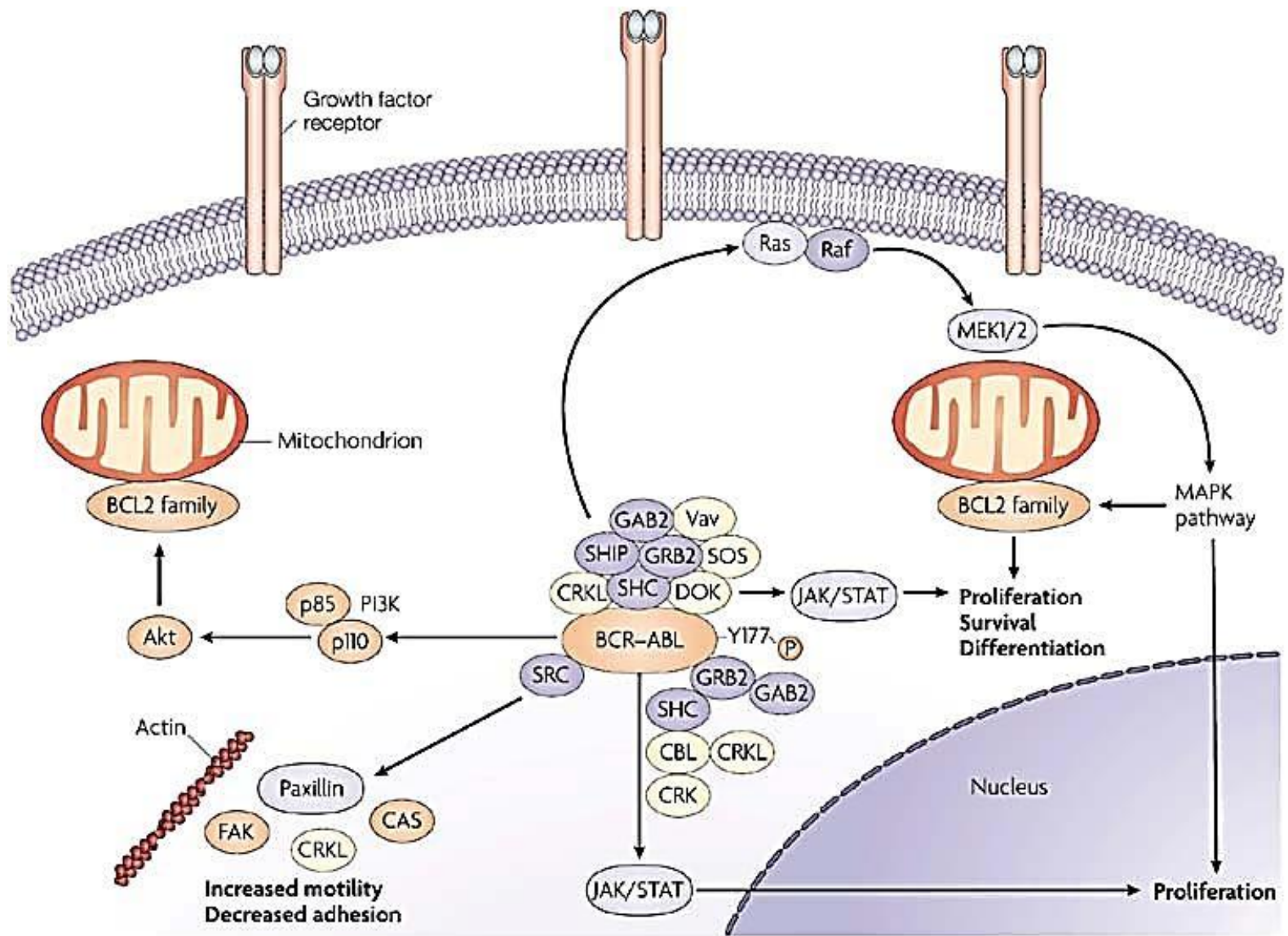
Fusione ABL (anal. cABL topo proto-oncogene) + BCR

BCR-Abl in retrovirus topo leucemico simile CML

Gleevec vitro

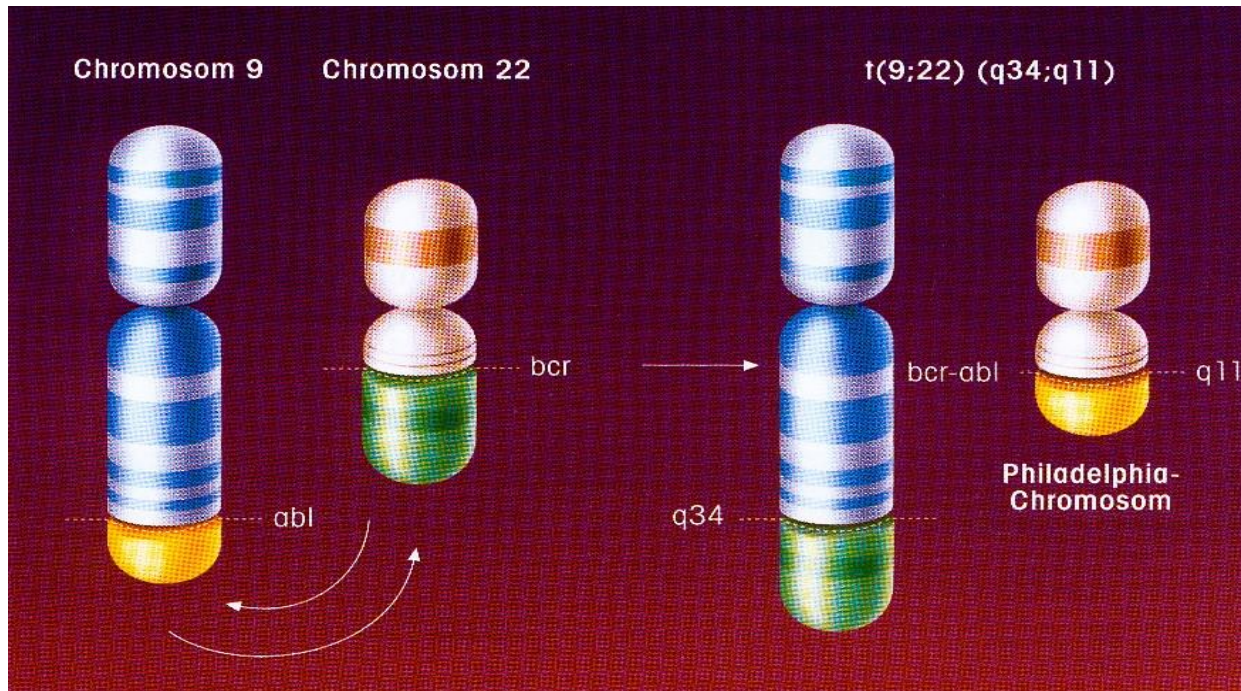
Gleevec trials (31)





1960 (1973): Scoperta del Cromosoma Philadelphia (traslocazione)

- Il Cromosoma Philadelphia (Ph) è il risultato di una traslocazione cromosomiale gene Abelson (ABL) dal cromosoma 9 ad una regione del cromosoma 22 denominata regione di raggruppamento dei punti di rottura, *breakpoint cluster region* (BCR), con la formazione di un gene chimera BCR/ABL nelle cellule staminali ematopoietiche
- Il gene Bcr-Abl esprime una proteina di fusione oncogenica, che ha un'attività tirosino-chinasica



Tale difetto cromosomico è presente in circa il 95% di tutti i pazienti con LMC ma anche nel 30-50% dei pazienti adulti con leucemia linfoblastica acuta (ALL). Nella proteina di fusione risultante dalla traslocazione, parte del prodotto del gene ABL (Abl), è fuso alla porzione amino terminale del prodotto del gene BCR (Bcr).

Il gene Bcr-Abl e la leucemia

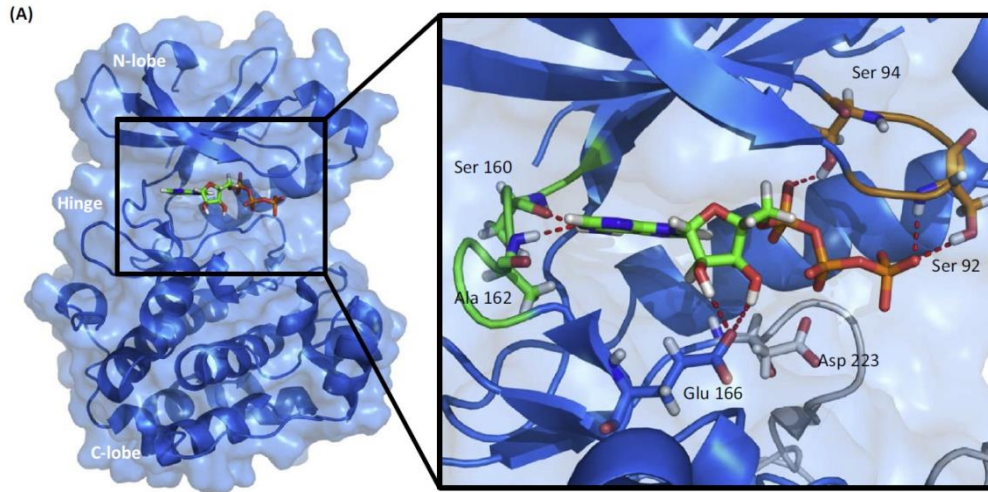
- Nella parte di Abl che partecipa alla fusione è contenuto un dominio ad attività tirosino-chinasica, cioè con capacità di fosforilare residui di tirosine appartenenti a proteine in grado di legarsi ad Abl e per questo detti substrati.
- Il risultato di questa fusione è quello di rendere l'attività chinasica di Bcr/Abl (ereditata da Abl) costitutiva; in altre parole l'attività tirosinico chinasica di Bcr/Abl non è più regolata, a differenza che nella proteina normale Abl.
- Inoltre Bcr/Abl viene anche delocalizzata; mentre Abl normale è una proteina nucleare, Bcr/Abl è esclusivamente localizzata nel citoplasma. La deregolazione e la delocalizzazione dell'attività chinasica di Bcr/Abl portano all'attivazione inappropriata di vie di trasduzione del segnale quali le vie di Ras/Raf, PI3 chinasi/Akt e all'aumento dei livelli di Bcl2; questi fenomeni trasferiscono alla cellula Bcr/Abl+ forti segnali di tipo proliferativo ed antiapoptotico, mentre la differenziazione cellulare non è inizialmente compromessa.
- La proteina Bcr/Abl è stata **una delle prime tirosin chinasi** ad essere chiaramente associata con una neoplasia umana. L'attività chinasica di Bcr/Abl è indispensabile affinché questa possa svolgere un ruolo patogenetico; mutazioni di Bcr/Abl che ne inattivano l'attività chinasica infatti inibiscono anche la crescita neoplastica.

Dominio catalitico conservato (regione che alloggia ATP)

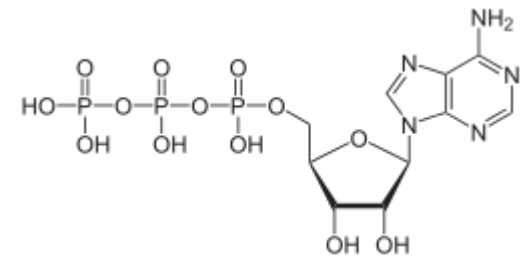
Accesso al sito attivo (Asp-Phe-Gly, DFG);

Inibitori irreversibili (2/28): Cys prossimale sito binding ATP;

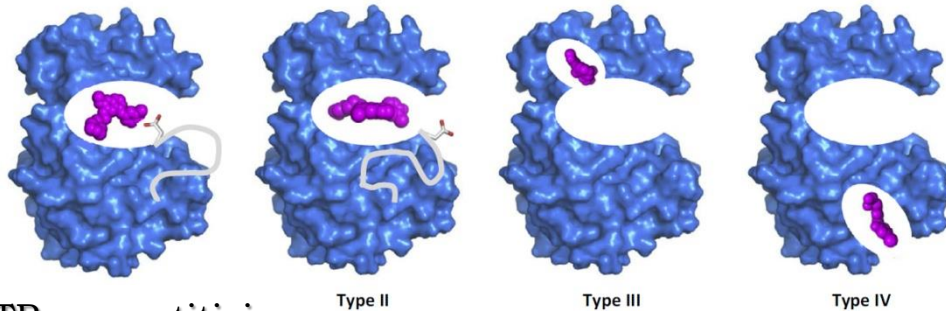
Inibitori reversibili (26/28): 4 tipi → conformazione sito di binding ;



tirosina kinasi >>
serina/treonina kinasi >
lipide kinasi (1)



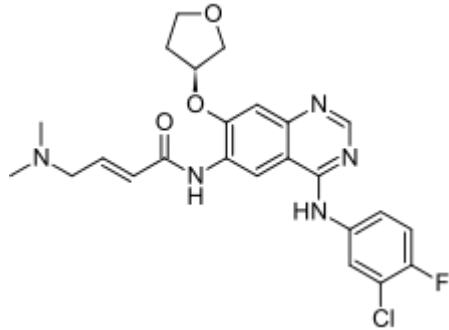
(B) Tipo II: forma inattiva (Asp vs esterno)



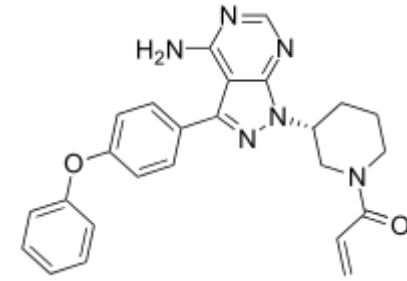
sito allosterico
remoto

Tipo I: ATP-competitivi
(Asp rivolto verso sito
attivo)

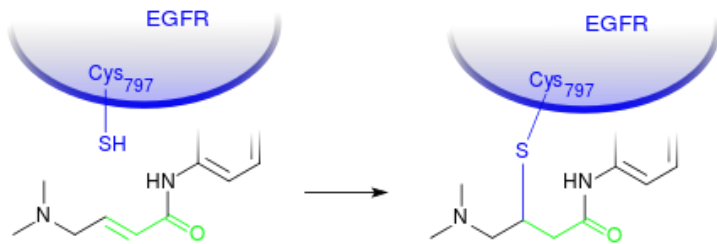
sito allosterico
adiacente



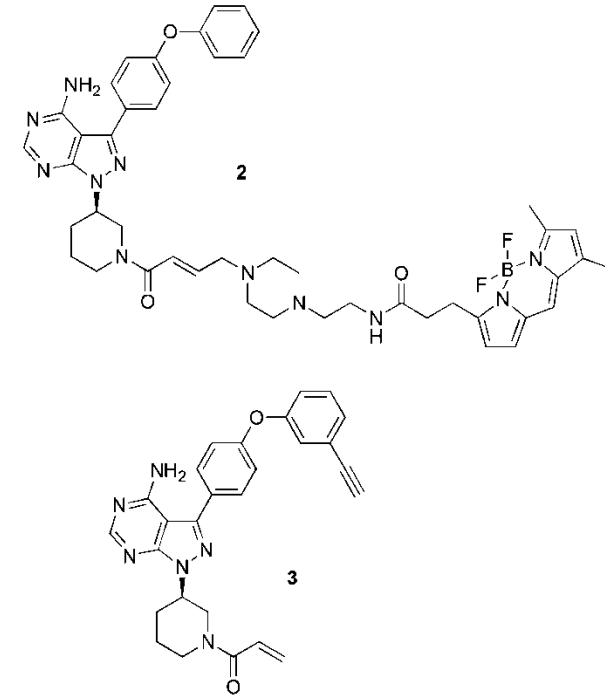
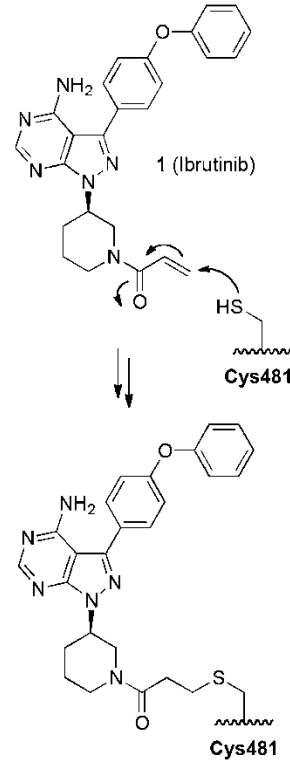
Afatinib



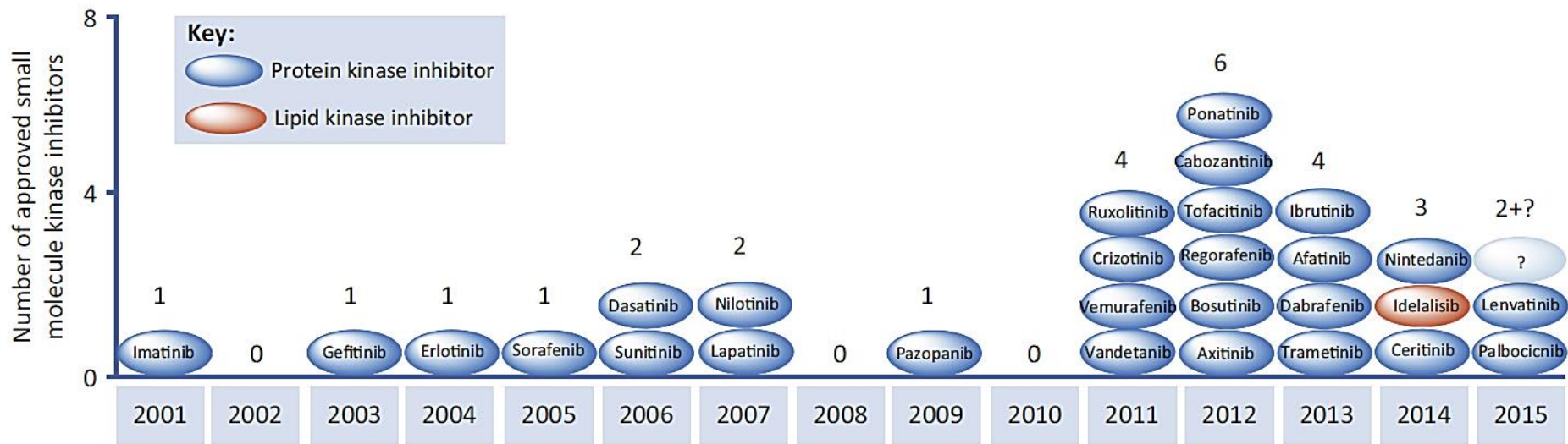
Ibrutinib



Inibitori irreversibili



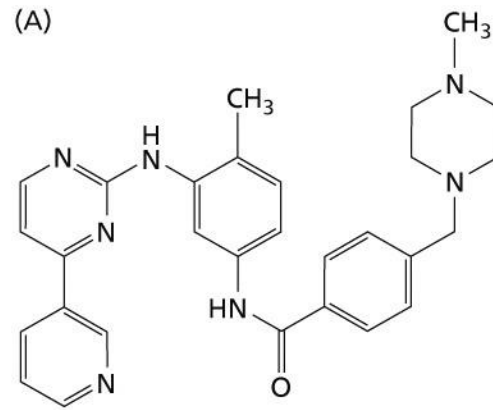
BCR-Abl è stata la prima kinasi verso la quale è stato sviluppato un inibitore (**imatinib**) successivamente approvato per il trattamento della leucemia mieloide cronica (CML).



TRENDS in Pharmacological Sciences

BCR-Abl: 5 inibitori approvati: **imatinib** (*Gleevec*), **dasatinib** (*Sprycel*), **nilotinib** (*Tasigna*), **bosutinib** (*Bosulif*), **ponatinib** (*Iclusig*).

4-[(4-metilpiperazin-1-yl)metil]-N-(4-metil-3-{4-(piridin-3-yl)pirimidin-2-yl}amino}fenil) benzamide



Gleevec®
(imatinib mesylate)

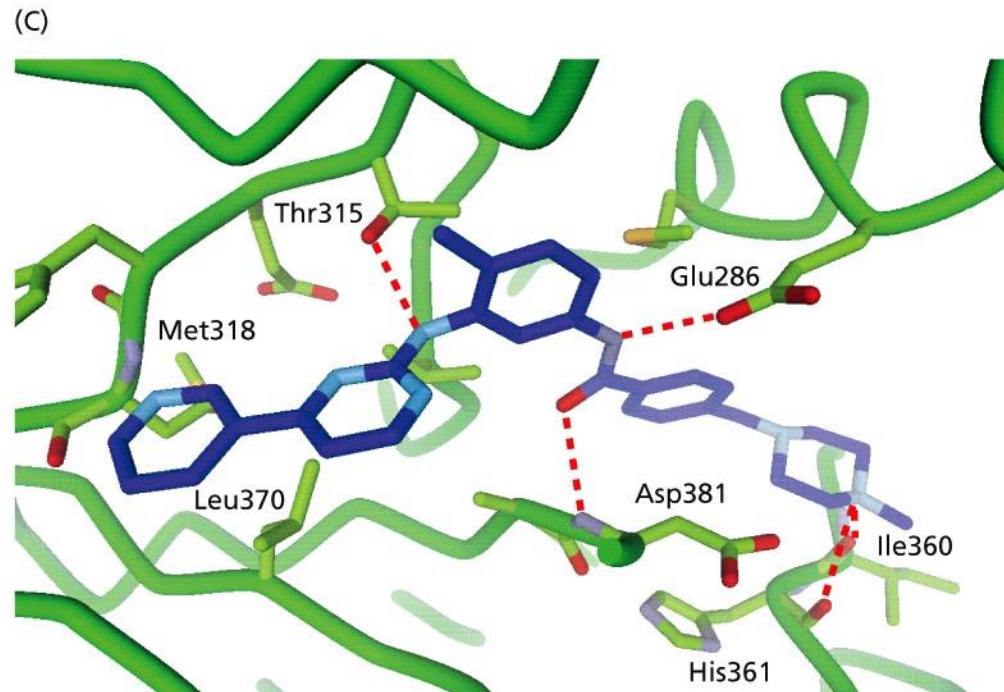
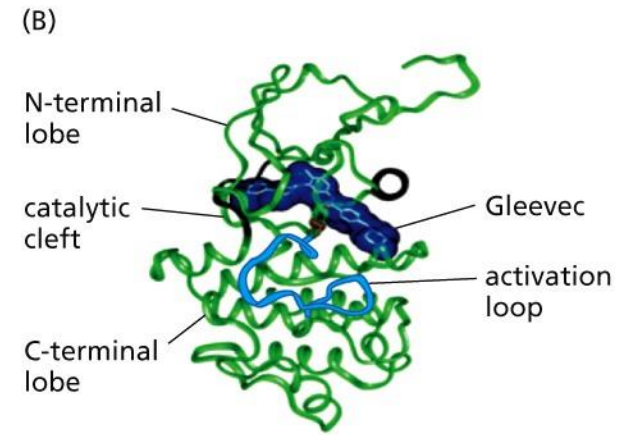
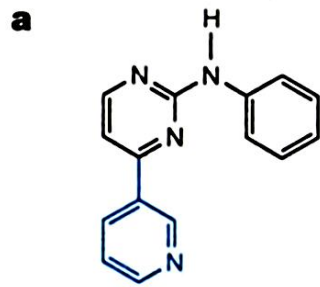
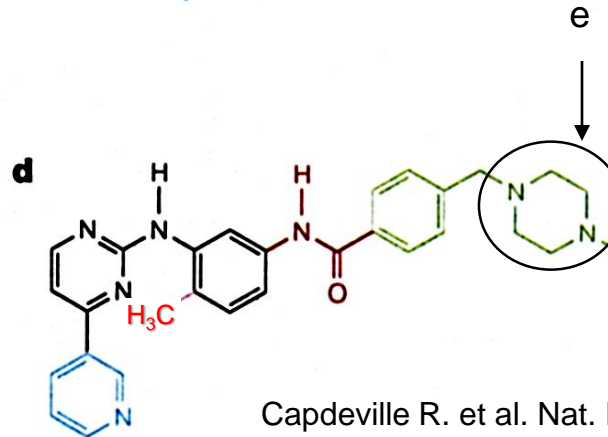
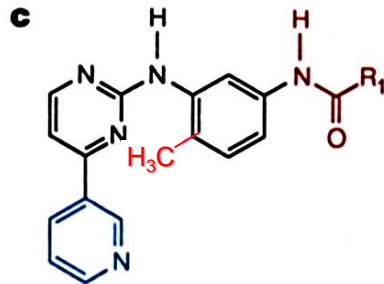
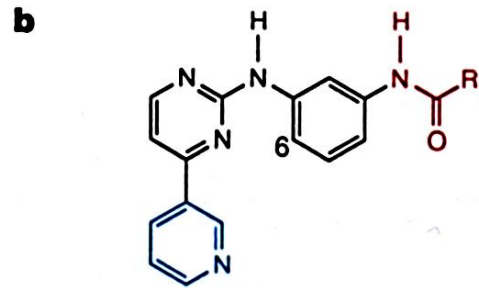


Figure 16.10 The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

SAR Imatinib

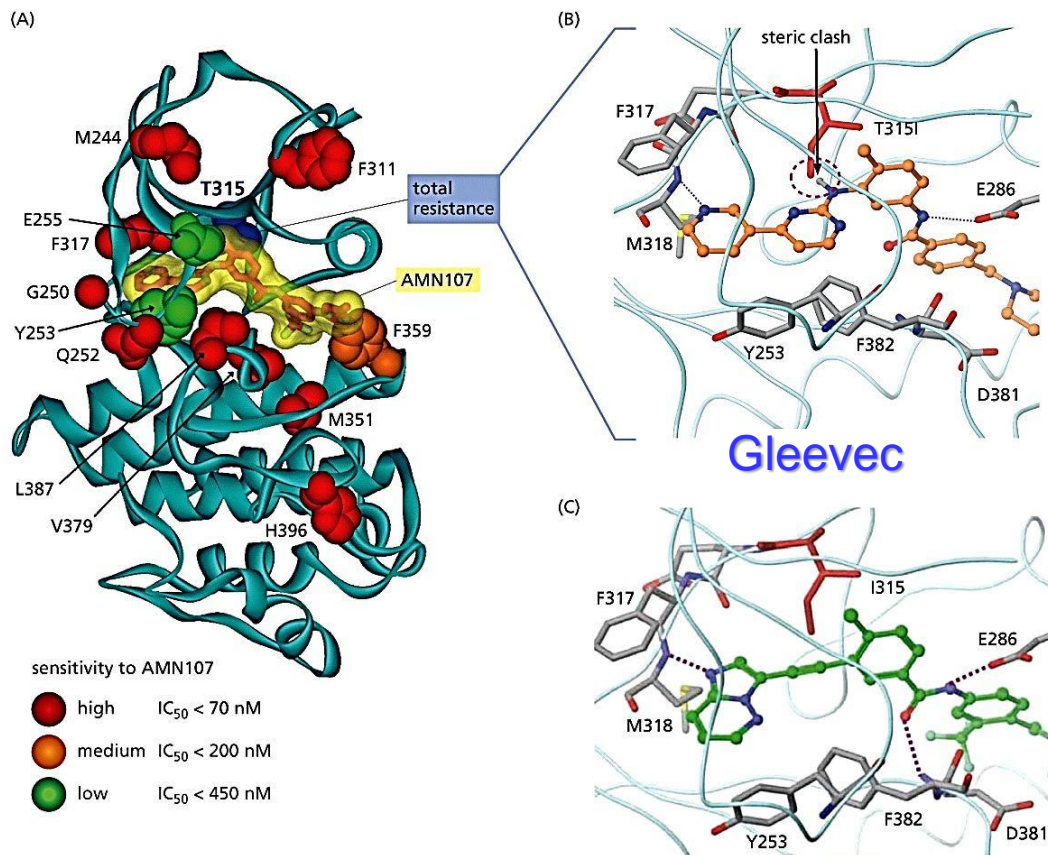


PKC inib.



Capdeville R. et al. Nat. Rev. Drug Disc. 2002 :1:493

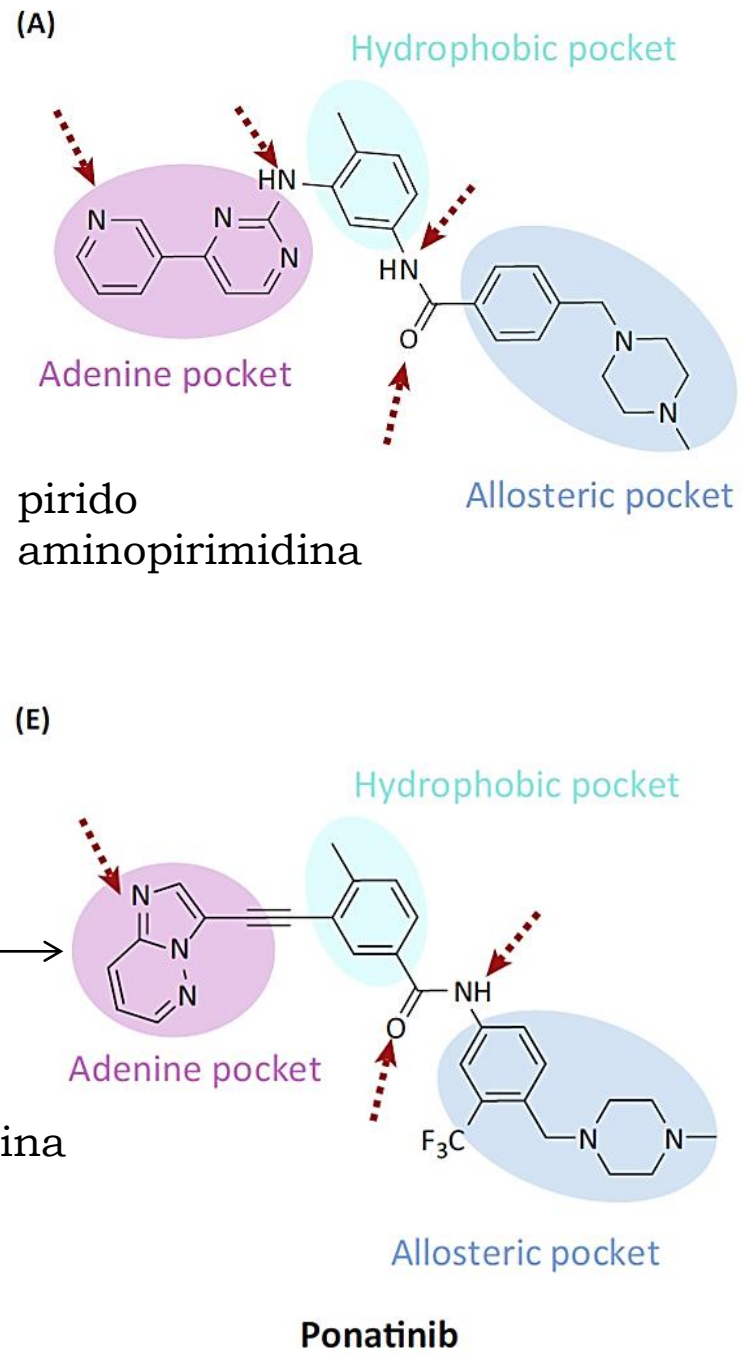
- L'addizione di un gruppo 3'-piridil > attività cellulare
- Il gruppo ammidico conferisce attività verso le tirosin chinasi
- L'addizione di un gruppo metilico > la specificità (inibizione p-kinasi C abolita)
- La *N*-metil piperazina innalza la solubilità e la biodisponibilità orale. Il ponte metilenico potrebbe ridurre la mutagenicità di un derivato anilिनico

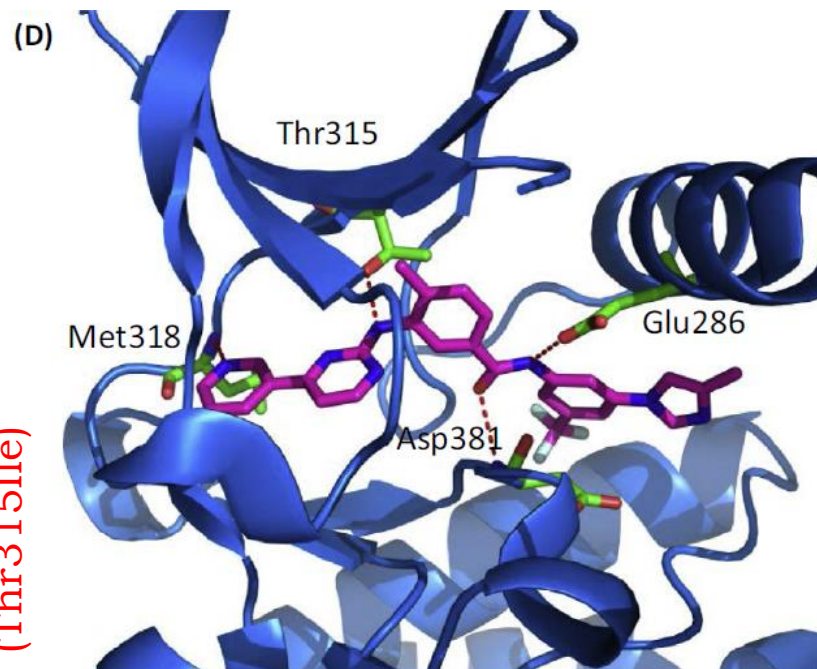
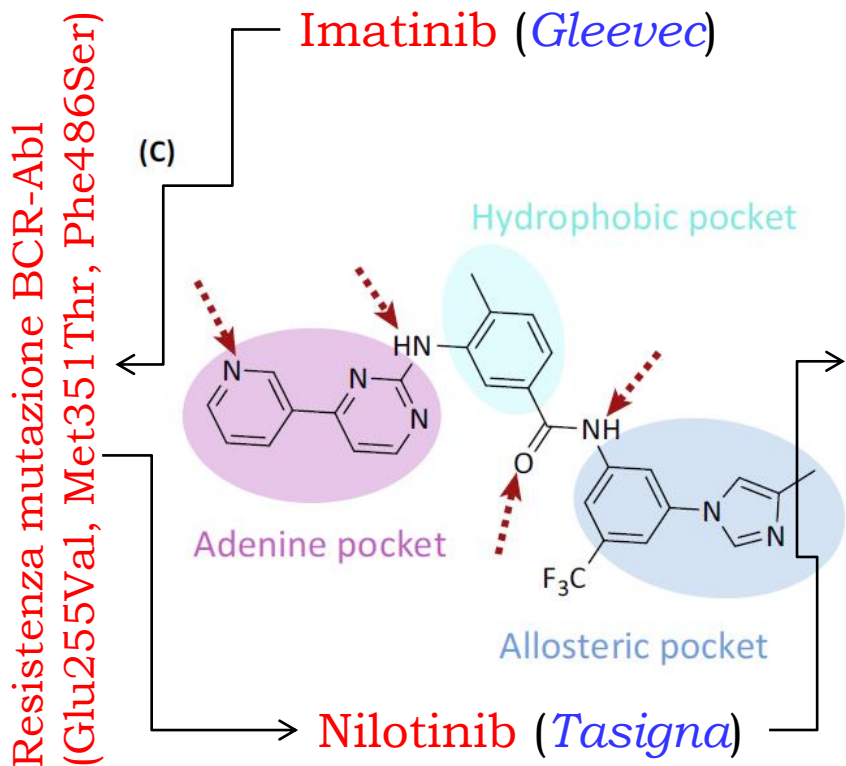
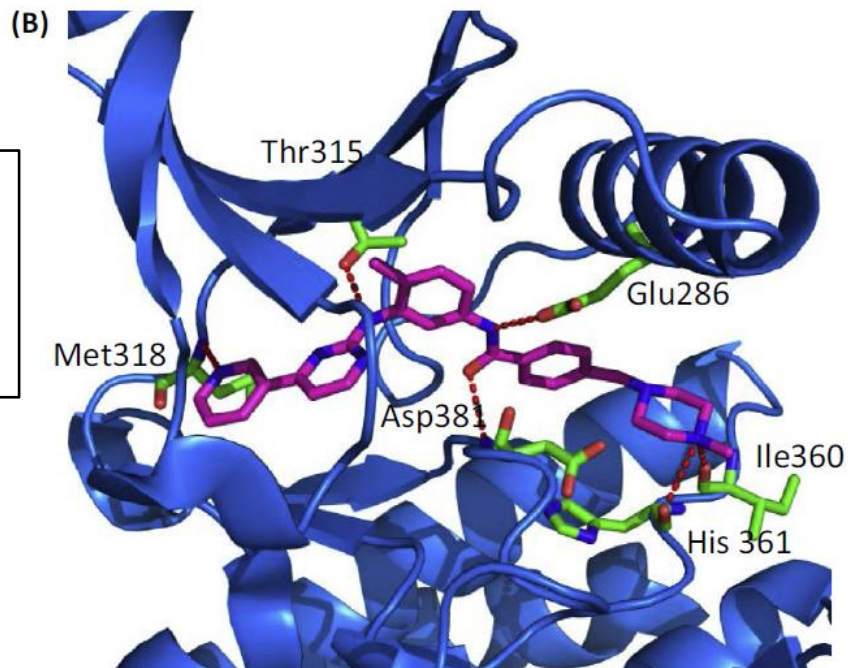
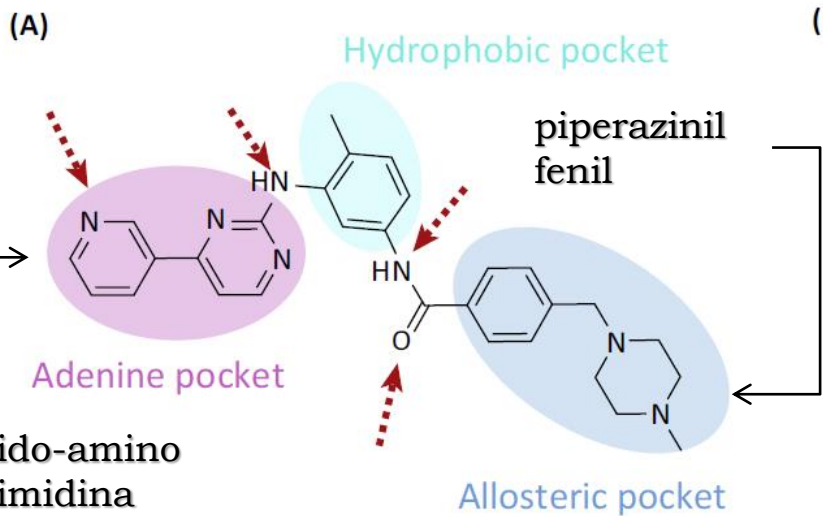


sensitivity to AMN107

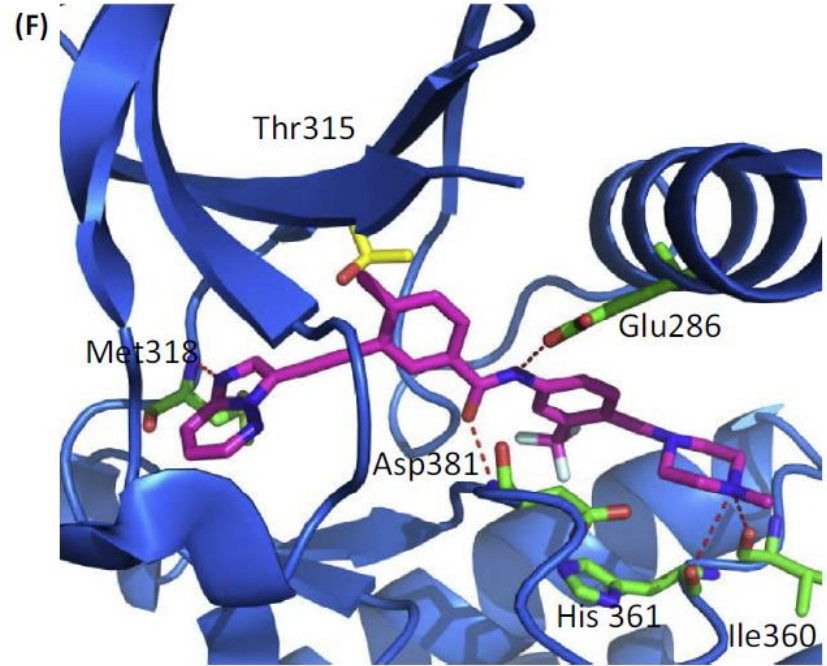
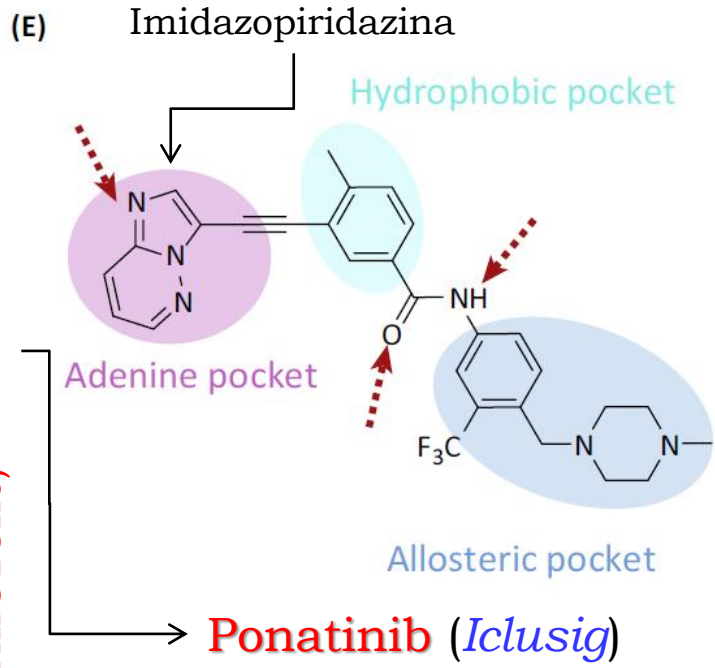
- high $IC_{50} < 70$ nM
- medium $IC_{50} < 200$ nM
- low $IC_{50} < 450$ nM

Figure 16.26 The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

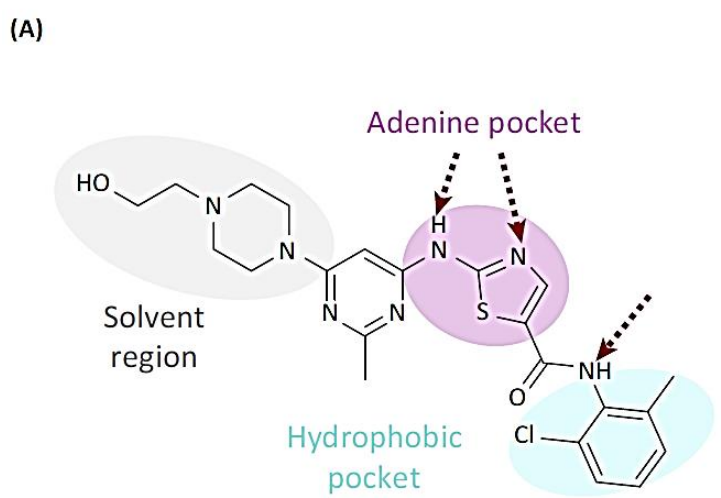




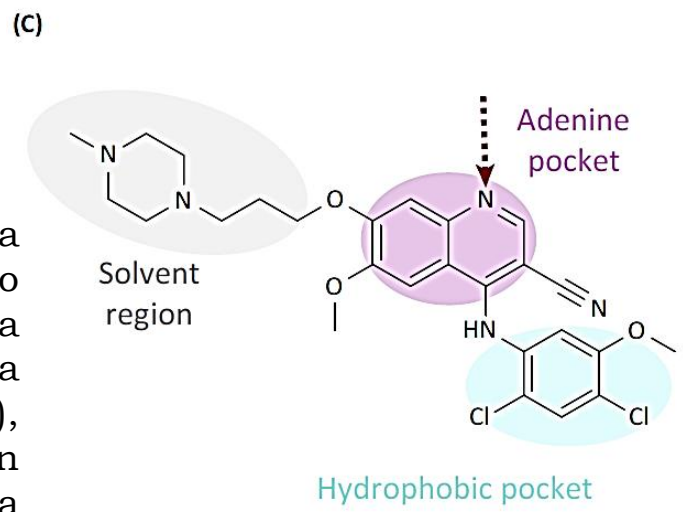
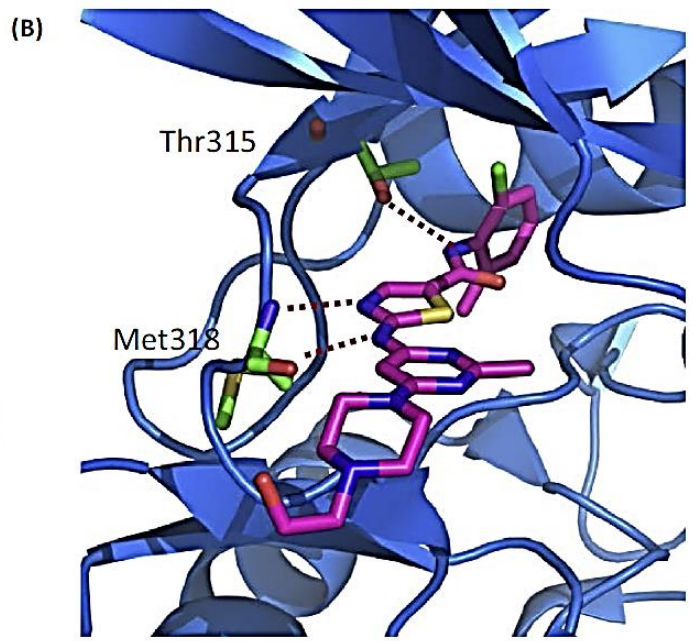
Resistenza mutazione BCR-Abl
(Thr315Ile)



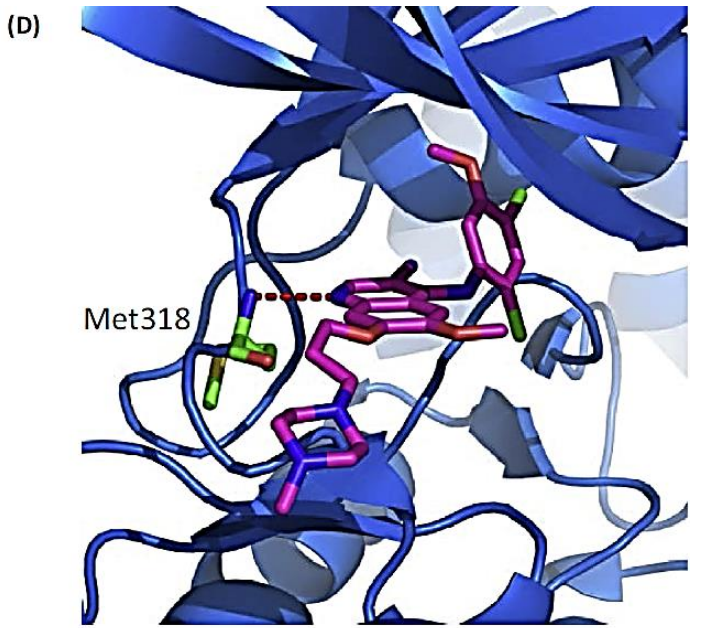
Leucemia Mieloide Cronica (LMC) con Philadelphia positivo (Ph+) in fase cronica, di nuova diagnosi, in fase accelerata o in fase blastica con resistenza o intolleranza ad una precedente terapia comprendente imatinib mesilato.



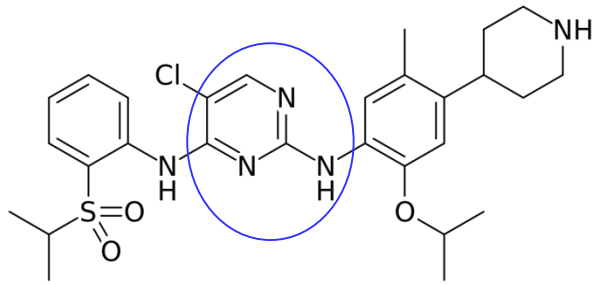
Dasatinib (*Sprycel*)



Bosutinib (*Bosulif*)



Leucemia mieloide cronica con Philadelphia positivo (LMC Ph+), in fase cronica (FC), in fase accelerata (FA) e in fase blastica (FB), trattati in precedenza con uno o più inibitori della tirosin-chinasi

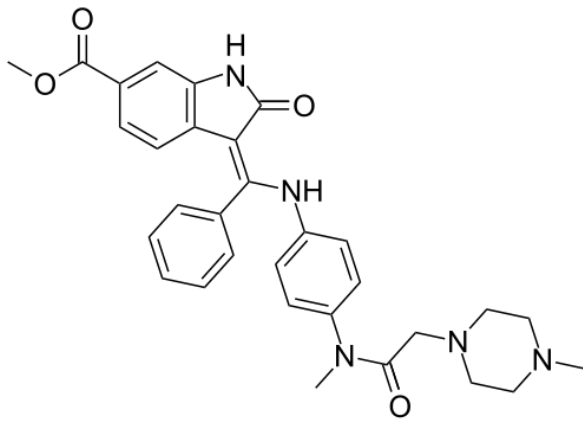


Ceritinib (*Zykadia*)

Potente inibitore ALK (IC_{50} of 0.2 nM) 40-35 volte più selettivo rispetto a IGF-1R e InsR.

(*anaplastic lymphoma kinase, ALK tyrosine kinase receptor, sviluppo cerebrale e neuronale, insulin-like growth factor 1 (IGF-1) receptor,*)

FDA ha approvato, con quattro mesi di anticipo rispetto ai tempi standard (29 Apr 2014), ceritinib per i pazienti con cancro al polmone non a piccole cellule (NSCLC) ALK positivo.

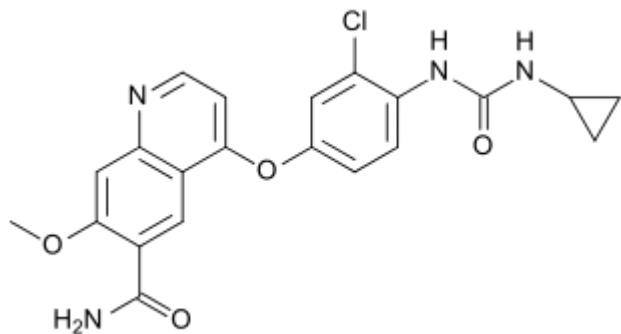


Nintedanib (*Vargatef*)

Potente triplo inibitore di angiokinasi VEGFR1/2/3, FGFR1/2/3 and PDGFR α/β (IC_{50} ordine nM).

(*Vascular endothelial growth factor, vasculogenesi, angiogenesi, permeabilità vascolare, stimolano risposte cellulari tramite binding ai tirosin kinasi recettori (VEGFRs); Fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1), α -type platelet-derived growth factor receptor*)

FDA ha approvato (15 Ott 2014) nintedanib per il trattamento della fibrosi polmonare idiopatica (IPF), condizione in cui i polmoni vengono progressivamente danneggiati nel tempo. I pazienti affetti da IPF sono affetti da insufficienza respiratoria, tosse e difficoltà a partecipare alle attività fisiche quotidiane. Gli attuali trattamenti per IPF comprendono ossigeno-terapia, riabilitazione polmonare e trapianto di polmone.



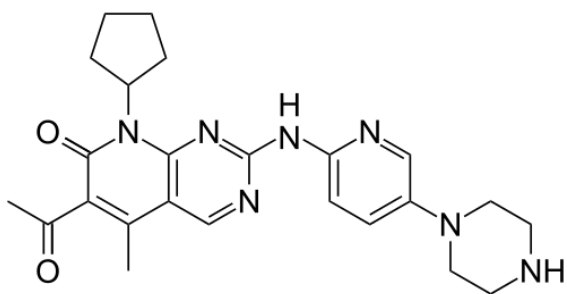
Lenvatinib (*Lenvima*)

Inibitore multi-target VEGFR2(KDR)/
VEGFR3 IC₅₀ of 4 nM/5.2 nM, < VEGFR1.

(*Vascular endothelial growth factor*, vasculogenesi, angiogenesi, permeabilità vascolare, stimolano risposte cellulari tramite binding ai tirosin kinasi recettori (VEGFRs) .

FDA ha approvato (13 Feb 2015) lenvatinib per il trattamento di pazienti con carcinoma della tiroide differenziato progressivo (DTC) refrattario al trattamento con terapia allo iodio radioattivo.

farmaco orfano in quanto destinato al trattamento di una malattia rara.



Palbociclib (*Ibrance*)

Inibitore selettivo di CDK4/6 (IC₅₀ of 11 nM/16 nM);
inattivo vs CDK1/2/5, EGFR, FGFR, PDGFR, InsR,
etc.

(*cell division protein kinase 4*, famiglia kinasi ciclina-dipendente, Ser/Thr kinasi, ruolo nel ciclo cellulare, controllo proliferazione G).

FDA ha approvato (3 Feb 2015) palbociclib per il trattamento del cancro al seno avanzato (metastatico) destinandolo a donne in postmenopausa (ER positivo, HER2 negativo) che non abbiano ancora ricevuto una terapia endocrina. Va usato in combinazione con letrozolo.

19th WHO Model List of Essential Medicines (April 2015)

8.2 Cytotoxic and adjuvant medicines

imatinib

Tablet: 100 mg; 400 mg.

- chronic myeloid leukemia*
- gastrointestinal stromal tumour*

paclitaxel

Powder for injection: 6 mg/ mL.

- epithelial ovarian cancer*
- early stage breast cancer*
- metastatic breast cancer*
- Kaposi sarcoma*
- nasopharyngeal cancer*
- non-small cell lung cancer*
- ovarian germ cell tumour*