



NUOVI BERSAGLI ONCOLOGICI: PARP

LA RICERCA ONCOLOGICA A NERVIANO MEDICAL SCIENCES (NMS) AFFRONTA IL TEMA DELL'INIBIZIONE DEI MECCANISMI DI RIPARO DEL DNA E DELLA LETALITÀ SINTETICA, CON L'OBIETTIVO DI INDIVIDUARE E SVILUPPARE ARMI SEMPRE PIÙ SOFISTICATE PER COMBATTERE IL CANCRO

La "Targeted Therapy" (in italiano, terapia mirata) si basa sulla possibilità di colpire in modo selettivo la cellula tumorale mediante l'inibizione di effettori biologici (targets) necessari per il suo sviluppo e la sua crescita. Questo approccio non solo mira ad una maggiore efficacia curativa, ma anche ad una riduzione degli effetti collaterali tipici delle terapie antineoplastiche convenzionali. Tra

i target di natura proteica, la cui inibizione è ritenuta attraente da un punto di vista farmacologico, vanno annoverati quelli coinvolti nei meccanismi di riparo del DNA, una volta che questo è stato danneggiato. L'instabilità del materiale genetico della cellula tumorale, infatti, richiede un intervento continuo delle officine enzimatiche deputate al suo aggiustamento. Colpendo queste

officine si ostacola la capacità del tumore di porre rimedio ai danni che si creano nel suo DNA, danni che derivano sia dalla "naturale" instabilità del suo genoma, sia dall'azione dei tradizionali farmaci citotossici o della radioterapia.

Capostipite di quest'approccio terapeutico è la poli-ADP-ribosio polimerasi-1 (PARP-1), una delle proteine deputate a riparare il DNA più studiate. Scoperta oltre mezzo secolo fa¹, PARP-1 è una proteina ubiquitaria, costituita da 1.014 amminoacidi e localizzata nel nucleo cellulare. Dei 6 moduli che la compongono, i più importanti (Fig. 1A) sono il dominio N-terminale, responsabile del legame al DNA, un dominio centrale detto di automodificazione, che regola l'attività enzimatica, e il dominio catalitico posto all'estremità C-terminale della proteina. All'interno di quest'ultimo modulo, il sito attivo della proteina è costituito da una sequenza di amminoacidi conservata in tutti i 17 membri della famiglia di enzimi, denominata ADP-ribosiltransferasi, di cui PARP-1 è il capostipite. Questo enzima è coinvolto in molte funzioni biologiche, quali, ad esempio, la regolazione dell'espressione dei geni e la proliferazione, omeostasi e apoptosi cellulare. Interviene inoltre nei processi infiammatori e nel metabolismo della nicotinamide adenina dinucleotide (NAD⁺). Proprio sfruttando il NAD⁺ come substrato, PARP-1 svolge il suo ruolo principale di segnalatore dei danni al

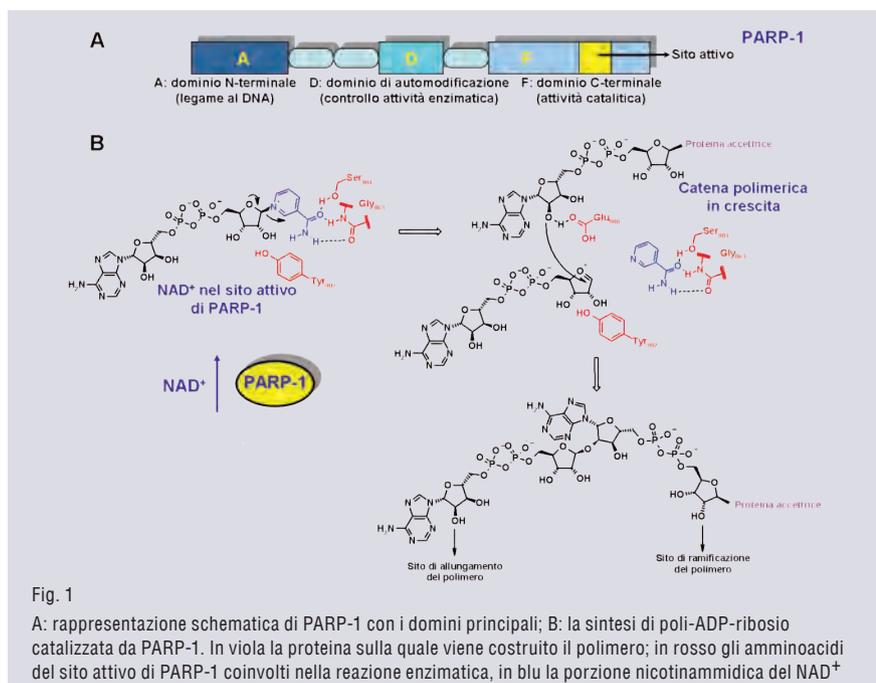
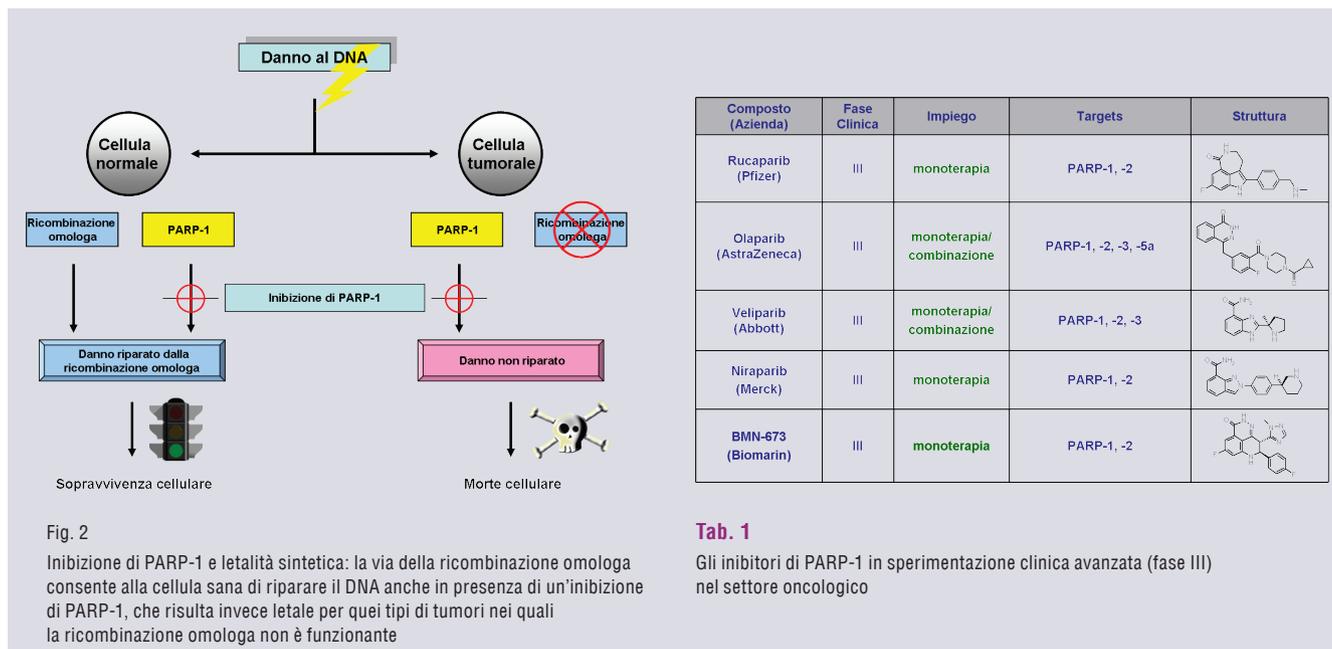


Fig. 1

A: rappresentazione schematica di PARP-1 con i domini principali; B: la sintesi di poli-ADP-ribosio catalizzata da PARP-1. In viola la proteina sulla quale viene costruito il polimero; in rosso gli amminoacidi del sito attivo di PARP-1 coinvolti nella reazione enzimatica, in blu la porzione nicotinammidica del NAD⁺



Composto (Azienda)	Fase Clinica	Impiego	Targets	Struttura
Rucaparib (Pfizer)	III	monoterapia	PARP-1, -2	
Olaparib (AstraZeneca)	III	monoterapia/ combinazione	PARP-1, -2, -3, -5a	
Veliparib (Abbott)	III	monoterapia/ combinazione	PARP-1, -2, -3	
Niraparib (Merck)	III	monoterapia	PARP-1, -2	
BMN-673 (Biomarin)	III	monoterapia	PARP-1, -2	

Tab. 1

Gli inibitori di PARP-1 in sperimentazione clinica avanzata (fase III) nel settore oncologico

DNA e di reclutamento degli enzimi deputati al riparo del materiale genetico, mediante la costruzione, su opportune proteine (istoni, topoisomerasi ecc.), di polimeri di ADP-ribosio (PAR). La poli-ADP-ribosilazione modifica le proprietà chimico-fisiche di queste proteine, innescando la cascata di eventi che porta alla riparazione del DNA. Il meccanismo della polimerizzazione catalizzata da PARP-1 prevede lo sgancio della nicotinammide dal NAD^+ , con la creazione dell'unità monomeric di ADP-ribosio elettrofila, che reagisce con opportuni amminoacidi, aventi catene laterali nucleofile (acido aspartico, acido glutammico, lisina) presenti nelle proteine substrato. La reiterazione del processo, utilizzando come nucleofilo un gruppo ossidrilico di un'unità di ribosio del polimero in crescita, porta alla costruzione del poli-ADP-ribosio, che può essere lineare o ramificato a seconda del gruppo OH coinvolto (Fig. 1B).

La scoperta del ruolo di "angelo custode" del DNA esercitato da PARP-1 è stata da subito considerata un'opportunità terapeutica in ambito oncologico, in quanto la sua inibizione avrebbe dovuto potenziare l'efficacia della radioterapia e di quei farmaci antitumorali il cui meccanismo prevede il danneggiamento del DNA. PARP-1 è più concentrato ed enzimaticamente più attivo in alcuni tipi di cellule tumorali rispetto a quelle sane e, grazie alla sua azione di riparo del DNA, è ritenuto

responsabile della resistenza che i tumori sviluppano verso certi chemioterapici. La nicotinammide e la 3-amminobenzammide, le prime molecole riportate possedere un'attività inibitoria di PARP-1, hanno consentito di confermare questo sinergismo con gli agenti antineoplastici a livello cellulare, dando l'avvio ad una serie di programmi di ricerca industriale volti all'individuazione di inibitori di PARP-1, innovativi e più potenti, da usarsi in combinazione. Nati e inizialmente sviluppati come potenziali farmaci coadiuvanti le terapie antitumorali standard, questi inibitori, grazie alla scoperta da parte di due gruppi di ricerca indipendenti², sono attualmente in corso di sperimentazione clinica anche come monoterapia per il trattamento di alcuni tipi di neoplasie. Vi sono, infatti, tumori (prevalentemente dell'ovaio e della mammella) nei quali una delle vie di riparo del DNA, la ricombinazione omologa, non è più funzionante. Ciò avviene a causa di mutazioni in una delle sue componenti principali (ad esempio le proteine BRCA1 o BRCA2). In questi casi, il danno al DNA, originato dall'instabilità genetica del tumore, non può essere riparato né da PARP-1, inibito dal farmaco, né dalla via alternativa della ricombinazione omologa, la cui funzionalità in questi tipi di tumore è intrinsecamente compromessa. Questa strategia terapeutica sfrutta il concetto della letalità sintetica: la

mutazione (o inibizione) simultanea di una coppia di geni o vie biochimiche, a differenza della mutazione (o inibizione) di una sola delle due, causa la morte cellulare. L'approccio è concettualmente molto prossimo a quello della pallottola magica di Ehrlich, in quanto l'inibizione di PARP-1, in una cellula sana nella quale la ricombinazione omologa è funzionante, non provoca alcun effetto collaterale (Fig. 2).

Gli inibitori di PARP-1 in corso di sperimentazione clinica avanzata (fase III) come farmaci antitumorali³, utilizzati sia in combinazione sia in monoterapia, sono riportati in Tab. 1. Si tratta di composti estremamente potenti, in grado di inibire l'attività enzimatica di PARP-1 a concentrazioni molto basse. Come si può notare, la maggior parte di essi sono stati sviluppati dalle Big Pharma, a testimonianza dell'interesse suscitato dal target e dall'approccio innovativo di cura del cancro mediante "letalità sintetica".

Tutti gli inibitori conosciuti di PARP-1 in fase di studio preclinico e clinico sono stati progettati per mimare la porzione nicotinammidica del NAD^+ , il substrato che si lega nel sito attivo dell'enzima. Essi contengono gruppi lattamici (ad esempio rucaparib, olaparib, BMN-673) o ammidi primarie conformazionalmente vincolate mediante un legame a idrogeno intramolecolare (ad esempio veliparib,

niraparib). Dato che il NAD^+ è il substrato di tutti i membri cataliticamente attivi della famiglia delle ADP-ribosiltransferasi, è logico attendersi da questi inibitori una mancanza di selettività⁴. Queste molecole, infatti, oltre a PARP-1, inibiscono in modo equipotente PARP-2, enzima che, oltre al riparo del DNA, è stato dimostrato essere coinvolto in altre funzioni fisiologiche quali la spermatogenesi, la timopoiesi etc. Attività inibitorie comparabili sono state riportate in alcuni casi anche per la proteina PARP-3 (vedi Tab. 1).

La mancanza di selettività dei composti più avanzati ha stimolato il nostro gruppo ad intraprendere un progetto di ricerca innovativo volto all'individuazione di un inibitore in grado di agire in modo specifico su PARP-1, al fine di ridurre i potenziali effetti indesiderati derivanti dall'inibizione "off-target" di proteine diverse dal bersaglio. Il primo obiettivo è stato quello di implementare un saggio biochimico omogeneo e robusto, in grado di quantificare in modo accurato la selettività dei composti testati. Il saggio più idoneo allo scopo si è dimostrato quello di spiazzamento, che ha previsto la sintesi di sonde molecolari fluorescenti strutturalmente derivate dalla nicotinammide. Queste sonde si legano in modo specifico nel sito attivo delle ADP-ribosiltransferasi utilizzate (PARP-1, -2, -3, -5a [TNKS-1]) e sono spiazzate dagli inibitori⁵. Utilizzando la tecnica della polarizzazione di fluorescenza (FP), è possibile misurare la potenza di un inibitore valutando

la variazione di fluorescenza, proporzionale al rapporto tra sonda legata alla proteina e sonda spiazzata dall'inibitore (Fig. 3).

Questo saggio è stato utilizzato per testare la collezione di piccole molecole proprietarie, consentendo di individuare la classe chimica degli isoindolinoni come inibitori di PARP-1. Pur non essendo selettivi verso gli altri membri della famiglia delle ADP-ribosiltransferasi su cui sono stati testati, gli "hits" emersi appartenenti a questa classe possiedono capacità di inibire il target sia a livello biochimico sia cellulare molto interessanti. Il rapido sviluppo della classe chimica, che ha permesso di individuare inibitori di PARP-1 selettivi verso PARP-2, -3 e -5a (TNKS-1), è da attribuirsi al sinergismo tra il gruppo di Strutturistica e quello di Chimica Medicinale. Il primo gruppo ha analizzato le strutture co-cristallografiche delle molecole nel sito attivo dell'enzima, guidando l'espansione della classe, mentre il secondo ha sviluppato una sintesi elegante che, sfruttando una reazione di cicloadizione [4+2] di Diels-Alder intramolecolare seguita da una disidratazione, consente di costruire velocemente il gruppo biciclico isoindolinonico. Gli elementi di diversificazione dello "scaffold" base sono introdotti all'inizio e alla fine del processo sintetico (Fig. 4).

In questa serie chimica il farmacoforo, il gruppo che mima la nicotinammide e rende i composti in grado di inibire PARP-1, è rappresentato da un'ammine primaria che forma un legame a

idrogeno con l'ossigeno del carbonile vicinale. Gli inibitori selettivi di PARP-1 individuati sono stati successivamente testati in saggi cellulari, utilizzando cellule tumorali dotate di una ridotta capacità di riparare i danni al DNA (BRCA mutate) e quindi sensibili all'inibizione di PARP-1. Questi esperimenti generano, per il ricercatore, una miniera di informazioni. Consentono, infatti, di valutare se la molecola supera la membrana cellulare, di stimarne la potenza mediante la determinazione della concentrazione di composto in grado di inibire del 50% la crescita cellulare (IC_{50}) e di studiare il meccanismo d'azione dell'inibitore (Fig. 5).

I composti che si sono dimostrati promettenti a livello cellulare (permeabili, potenti e con meccanismo d'azione confermato) sono stati sottoposti ad una serie di test che permettono di valutare le proprietà di assorbimento, distribuzione, metabolismo ed escrezione (ADME) delle molecole mediante saggi *in vitro* specifici. I composti più interessanti, dopo questi test, sono stati sottoposti a valutazione del loro profilo farmacocinetico nell'animale da esperimento. I parametri che si misurano (la clearance, il tempo di emivita, il volume di distribuzione, l'esposizione e la biodisponibilità orale) consentono di apprezzare il comportamento del candidato farmaco all'interno dell'organismo e a proseguirne o interromperne lo sviluppo in base ai dati emersi. I parametri farmacocinetici consentono anche di pianificare al meglio

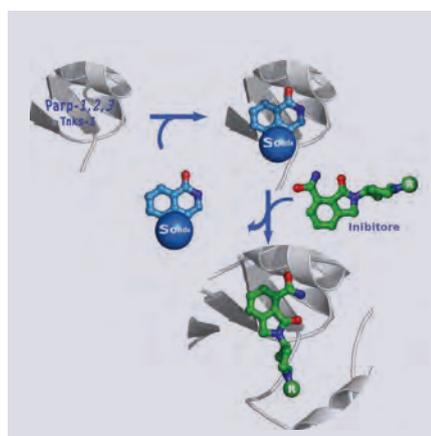


Fig. 3

Il saggio biochimico di spiazzamento di una sonda molecolare fluorescente sviluppato per individuare inibitori selettivi di PARP-1

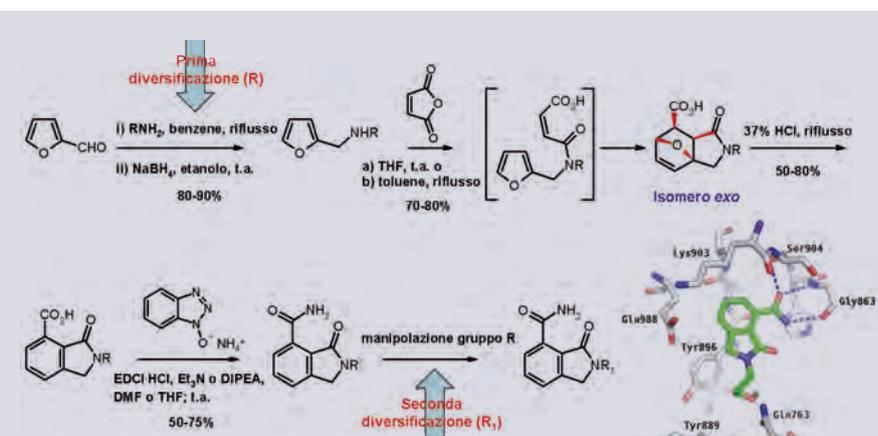
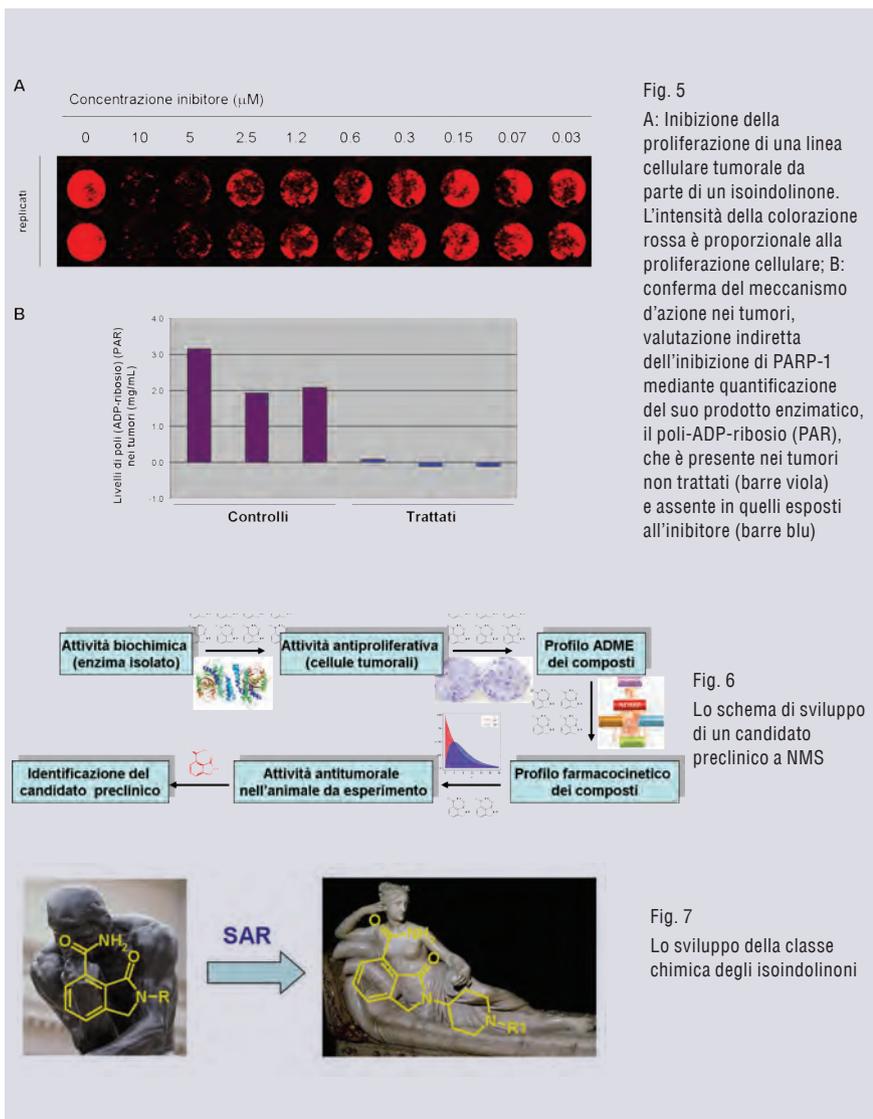


Fig. 4

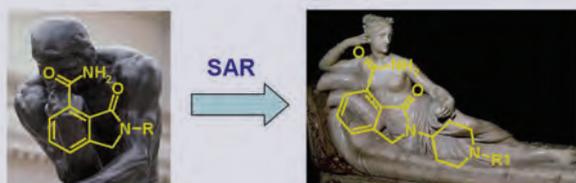
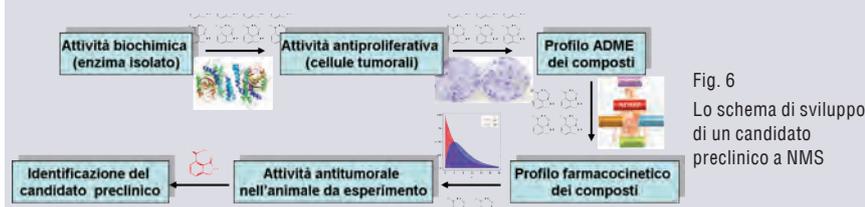
La sintesi degli isoindolinoni tramite reazione di Diels-Alder e un esempio di struttura co-cristallografica di un inibitore nel sito attivo di PARP-1



all'individuazione di inibitori selettivi di PARP-1. Alcune di queste molecole, inoltre, hanno mostrato di possedere i requisiti di attività cellulare, proprietà ADME, farmacocinetiche e antitumorali idonee per un potenziale sviluppo preclinico.

BIBLIOGRAFIA

- ¹P. Chambon *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1963, **11**, 39.
- ²a) H.E. Bryant *et al.*, *Nature*, 2005, **434**, 913; b) H. Farmer *et al.*, *Nature*, 2005, **434**, 917.
- ³B. Lupo, L. Trusolino, *Biochim. Biophys. Acta*, 2014, **1846**, 201.
- a) P. Liscio *et al.*, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2013, **13**, 2939; b) G. Papeo *et al.*, *Expert Opin. Ther. Pat.*, 2013, **23**, 503.
- ⁵G. Papeo *et al.*, *J. Biomol. Screen.*, 2014, **19**, 1212.
- ⁶G. Papeo, Proc. of the XXI National Meeting on Medicinal Chemistry, Palermo (Italy), 2012, 35.



New Oncology Targets: PARP

Oncology research at Nerviano Medical Sciences (NMS) enters the arena of DNA repair mechanisms and synthetic lethality, with the aim at finding and developing more precise and accurate weapons to fight cancer.

gli esperimenti di efficacia volti, in ambito oncologico, a dimostrare l'attività antitumorale del farmaco candidato nell'animale da esperimento (Fig. 6).

Ad esempio, uno dei composti più avanzati della classe, NMS-P828, inibitore selettivo di PARP-1, somministrato per via orale in combinazione con un farmaco alchilante, ha portato ad una riduzione del 91% della crescita del tumore in un modello di adenocarcinoma del pancreas senza causare effetti indesiderati. Questi dati preliminari⁶ confermano che l'approccio terapeutico mirato ad inibire selettivamente PARP-1 è molto promettente nella cura di questi tipi di tumore.

In conclusione, grazie all'ideazione di un

saggio biochimico di spiazzamento basato sull'uso di una sonda molecolare fluorescente, è stata condotta a NMS una campagna di screening che ha permesso di individuare la classe chimica degli isoindolinoni come inibitori selettivi di PARP-1.

Lo studio delle relazioni struttura-attività biologica (SAR) di questa classe chimica, che può essere immaginato come un processo scultoreo a livello molecolare (Fig. 7), ha richiesto la messa a punto di una sintesi in grado di fornire in breve tempo un numero elevato di derivati, ed è stato guidato dalle indicazioni provenienti dall'analisi strutturale dei composti co-cristallizzati con la proteina. Questo sinergismo di competenze ha portato

GIANLUCA PAPEO^a, DANIELE DONATI^a,
ALESSIA MONTAGNOLI^b

^aDIPARTIMENTO DI CHIMICA MEDICINALE

^bDIPARTIMENTO DI BIOLOGIA CELLULARE
NERVIANO MEDICAL SCIENCES SRL

GIANLUCA.PAPEO@NERVIANOMS.COM