



EDUARD R. FELDER  
NERVIANO MEDICAL SCIENCES  
NERVIANO (MI)  
PRESENT ADDRESS:  
DIMSARO SRL, MENDRISIO (CH)  
EDUARD.FELDER@GMAIL.COM

# ANTITUMORALI VIA SONDE FARMACOLOGICHE

*Con l'uso sistematico di agenti antitumorali altamente profilati (principi attivi di farmaci, molecole guida di precedenti progetti di ricerca oncologica) si possono sondare i contesti di sensibilità di cellule tumorali e valutare, fin dalle prime fasi di ricerca, le opportunità e necessità di colpire combinazioni di bersagli farmacologici per agire al meglio su patologie complesse e resistenti.*

## La sfidante complessità dei meccanismi multifattoriali delle patologie oncologiche

Il cancro rappresenta una sfida formidabile per la salute pubblica nella società moderna. Il progresso verso terapie farmacologiche risolutive è macchinoso, frammentato e più lento delle aspettative. Essendo il cancro una condizione patologica di proliferazione cellulare incontrollata che insorge nelle più svariate forme e modalità, non stupisce che solo farmaci drasticamente citotossici abbiano effetti ad ampio spettro. Ne consegue un'elevata tossicità anche a livello sistemico che limita fortemente il numero di trattamenti e le possibilità di eradicare con alti dosaggi cellule tumorali residue. D'altro lato, la buona tollerabilità di farmaci mirati ad un unico bersaglio si paga con un raggio d'azione più ridotto, efficace su poche forme tumorali.

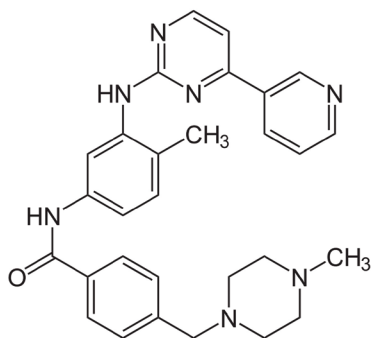
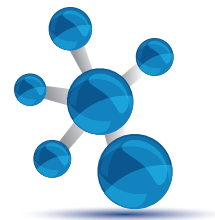
Inevitabilmente la ricerca oncologica deve porsi l'obiettivo di sviluppare farmaci su misura per ogni contesto tumorale, frammentando le risorse e sfidando la sfavorevole economicità degli approcci. La complessità del problema risiede non solo nella molteplicità delle patologie oncologiche, ma anche nel fatto che spesso il meccanismo cancerogeno è multifattoriale e irrobustito da vie alternative in grado di sopperire all'eventuale cancellazione specifica di un singolo fattore di proliferazione. Sono una minoranza i tumori in cui esiste un bersaglio molecolare chiave da cui il tumore dipende in modo totale e duraturo. Comprensibilmente, quelli sono i

contesti che l'industria farmaceutica ha dapprima puntato a risolvere con farmaci mirati, ottenendo successi incoraggianti. Alcuni tumori ematologici possono in effetti derivare da una singola mutazione, ma purtroppo la maggior parte delle neoplasie maligne partono da alterazioni plurime.

## Trovato il primo bersaglio, si cercano aperture su ulteriori fronti

Un pioniere degli antitumorali mirati è l'inibitore della Bcr-Abl tirosin chinasi Imatinib (Gleevec®), frutto della ricerca farmaceutica industriale di Novartis, farmaco d'elezione per la cura della leucemia mieloide cronica (CML) e della leucemia linfoblastica acuta (ALL). Queste forme di tumore hanno origine da un'alterazione genetica denominata *Philadelphia positive* (Ph+). Con un interscambio di sequenze fra due cromosomi si forma un gene ibrido BCR-ABL che codifica una tirosin chinasi che, oltre ad essere un marcatore specifico della malattia, è un elemento determinante del meccanismo patofisiologico. Imatinib è un derivato amminopirimidinico ottimizzato razionalmente avvalendosi di librerie chimiche e analisi cristallografiche di complessi proteina-legante. La molecola blocca l'attività enzimatica e i suoi deleteri effetti proliferativi e antiapoptotici che si producono a valle su diversi pathway.

Da un lato lo sviluppo di Imatinib è un classico esempio di approccio vincente basato su design razionale applicato ad un preciso target biologi-



La molecola dell'Imatinib

co. D'altra parte, lo stesso farmaco, arricchito di ulteriori dati acquisiti nel corso della pratica clinica, documenta quanto possano contribuire allo spettro di indicazioni ed efficacia ulteriori attività farmacologiche opportunisticamente presenti, seppur inizialmente non incluse nel concetto di disegno razionale. Le attività residue di inibizione di PDGFR e Kit, non rimosse durante l'ottimizzazione della selettività, sono determinanti per rendere la molecola efficace in un secondo ambito (in malattie mieloproliferative croniche) e in una terza indicazione (nei tumori stromali gastrointestinali GIST). Un altro aspetto negativo di profili squisitamente selettivi è il rischio di selezionare in corso di trattamento mutazioni che preservano l'attività patogena dell'unico bersaglio nel mirino e che al contempo ne distruggono l'affinità di legame al farmaco. In effetti, con l'insorgere di forme di CML resistenti, la ricerca si è concentrata sullo sviluppo di inibitori capaci di legare il target nonostante le mutazioni che impediscono l'azione di Imatinib.

Le esperienze in oncologia clinica hanno dunque evidenziato sia le problematiche di agenti che colpiscono molti bersagli ad ampio spettro, efficaci ma tossici, che quelle di composti molto selettivi, efficaci in particolari patologie con meccanismo specifico, ma prони alla perdita di attività di fronte a mutazioni del bersaglio e di fronte a patologie capaci di regolare e adattare alla pressione selettiva i meccanismi di proliferazione tumorale. Ciò non toglie che per ogni molecola caratterizzata per meccanismo di azione, sia essa un farmaco approvato oppure un composto di sviluppo, è ipo-

tizzabile un utilizzo come sonda farmacologica per studiare e validare i ruoli di nuovi bersagli molecolari in contesti oncologici complessi. Gli aspetti più recenti di questo concetto riguardano la sistematicità dei metodi e l'accesso ad ampi volumi di dati, generati in proprio o recuperati da letteratura, preziosi per contestualizzare il ruolo di un target nei modelli di malattia e generare ipotesi terapeutiche. Questa aumentata attenzione ai composti sonda si spiega inoltre con la comprovata fragilità delle analisi meccanicistiche basate unicamente su correlazioni dirette tra il knockdown RNAi di un gene e l'identificazione di un potenziale target farmacologico. L'effetto della maggior parte dei farmaci non può essere replicato da un RNA inibitorio, dato che spesso il farmaco interferisce con bersagli multipli o inibisce un singolo dominio di una proteina multidominio.

#### Oltre a grandi collezioni da screening, curate selezioni di sonde farmacologiche

Le tipiche attività iniziali di progetti alla ricerca di nuovi principi attivi si rivolgono allo screening di ampie collezioni di composti, sia di origine interna all'organizzazione (campionature di archivi), sia di origine esterna (da cataloghi o da accesso privilegiato in partnership). Lo screening fornisce le prime indicazioni di molecole attive evidenziando chemotipi privilegiati, aiutando a definire farmacofori rilevanti su cui costruire programmi di ottimizzazione e innovazione.

In oncologia, l'apertura verso approcci meno lineari si è resa necessaria per i limiti di efficacia e di prospettiva clinica dei composti più selettivi rispetto a trattamenti combinati o con composti a doppia o tripla attività intrinseca [1].

Il presente articolo illustra alcuni principi di studio sistematico con composti sonda, mettendo in evidenza sviluppi coordinati in partnership di condivisione di dati ed esemplificando due progettualità che vedono un forte coinvolgimento di Nerviano Medical Sciences, realtà industriale che ha radici nella tradizione italiana della ricerca contro il cancro, alla quale si devono farmaci di valore assoluto, quali la doxorubicina (Adriamicina) e l'exemestane (Aromasin).

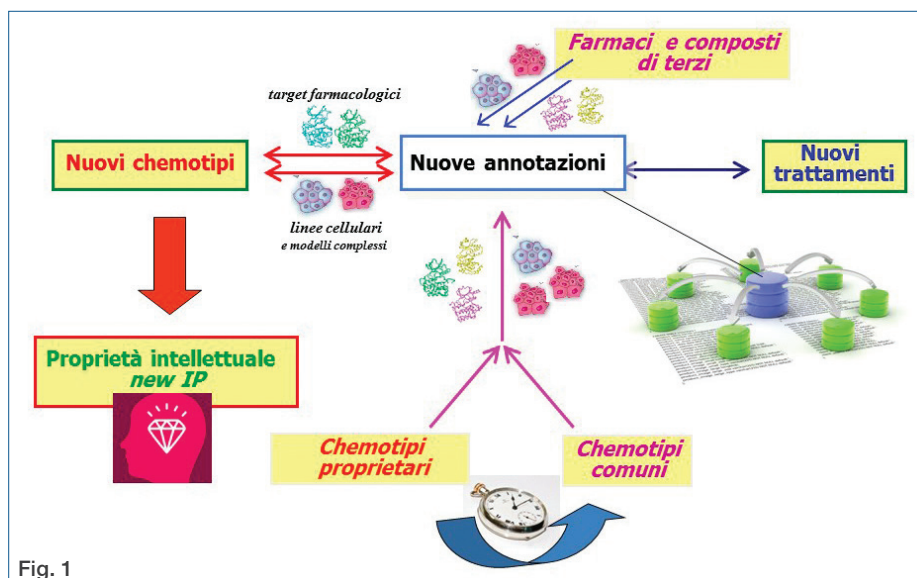


Fig. 1

## Collezioni di composti aperte a pubblica condivisione in fase pre-competitiva

Oggigiorno composti altamente selettivi sono viepiù sfruttati come sonde farmacologiche. Tra questi vi sono farmaci già approvati, ma anche composti di ricerca che non hanno completato l'intero sviluppo clinico. Sono collocati all'interno di collezioni assemblate per lo screening e sono tanto più utili per la dissezione di meccanismi tumorali della cellula, quanto più ricchi di dati pregressi misurati su vari target farmacologici. Nello studio dei meccanismi di una patologia, più che la numerosità delle sonde è importante la qualità, la diversità e la numerosità dei dati. Perfino l'originalità dei composti e la proprietà intellettuale sono fattori inizialmente non imprescindibili. Allo stato dell'arte, un'unità di ricerca farmaceutica ha i mezzi per trasformare "hits" (le molecole attive di primo impatto in un progetto) in nuove serie di molecole diverse, proprietarie e ottimizzabili. Avvalendosi di tecniche, quali la sostituzione di farmacofori con introduzione di gruppi bioisosteri, la sintesi di molecole chimere, la sostituzione di scaffold con ritenzione dell'orientamento dei farmacofori, diventano realizzabili nuove entità chimiche brevettabili (Fig. 1), adatte a lanciare un programma di *drug discovery*.

Risale all'anno 2005 il lancio da parte del NIH (National Health Institute, USA) di un pionieristico programma di pubblico accesso alla capacità di screening su larga scala di centinaia di migliaia di molecole con proprietà chimico-fisiche tipiche di

composti farmacologicamente attivi (MLP, Molecular Libraries Program), gestite con logistica centralizzata dal Molecular Libraries Small Molecule Repository, MLSMR. Da allora il MLPCN (Molecular Libraries Probe Production Centres Network) è parte integrante del MLP e consiste in un consorzio nazionale di laboratori che produce composti sonda da aggiungere alla collezione e da utilizzare nelle Life Sciences. Coincide con l'inizio di questo ambizioso programma la pubblicazione dell'autorevole editoriale di R. Morphy che sottolinea il valore di saper gestire e modulare le attività collaterali di composti a molteplice azione (polifarmacologia), optando per ottimizzazioni di "design in" oppure "design out" per rinforzare o indebolire tali attività a dipendenza delle proprietà di base delle molecole guida [2].

In Europa è stato creato analogamente il JECL (Joint European Compound Library) con un nucleo di oltre 321.000 composti provenienti dagli archivi di sette società farmaceutiche. Il JECL è una componente principale della ELF (European Lead Factory), la quale ha avviato nel 2015 uno sforzo collaborativo quadriennale di estensione con ulteriori 200.000 composti (Public Compound Collection PCC). Con un consorzio di dieci gruppi accademici e sei PMI l'espansione a circa 500.000 composti sarà raggiunta entro il 2019.

Per quanto riguarda la grande famiglia delle chinasi, enzimi regolatori di ogni trasformazione tumorale e rilevanti anche in altre aree terapeutiche, costruire una collezione di centinaia di sonde altamente selettive richiede anni di sforzi e una programmazione coordinata. L'azienda GlaxoSmithKline ha fatto da apripista con PKIS (Published Kinase Inhibitor Set), un insieme di 367 inibitori di chinasi distribuito a collaboratori accademici come strumento di pubblico accesso. È stato utilizzato per identificare i punti di partenza dello sviluppo di sonde per le chinasi orfane e studiarne il ruolo in saggi fenotipici. I dati di annotazione del PKIS in oltre 200 saggi sono stati messi in rete su ChEMBL [3]. Aziende quali



Pfizer e Takeda hanno sposato questo concetto di condivisione pre-competitiva contribuendo a loro volta con composti e dati [4]. Il prossimo obiettivo, con l'aiuto dell'intera comunità scientifica, è l'espansione a mille inibitori di chinasi per coprire ogni componente dell'intero chinoma, formando un set chemogenomico completo (KCGS). I composti avranno il profilo più selettivo possibile e saranno a disposizione per interrogare la biologia che governa i processi patologici di interesse farmaceutico e comprendere quali chinasi inibire per quale indicazione. La chemogenomica si integra con altri approcci, quali le inibizioni di espressione con RNAi o per manipolazione CRISPR-Cas9 mediata [5].

### La ricerca di target dominanti per la proliferazione di cellule tumorali

Storicamente, gran parte dei farmaci furono scoperti con l'osservazione di attività in cellule o in animali. In mancanza di metodologie moderne di biologia molecolare, il loro meccanismo d'azione talvolta rimaneva incompreso o si chiariva a distanza di anni. Con l'avvento delle tecniche di screening biochimico ad alta portata, a partire dagli anni Novanta il flusso di lavoro della *drug discovery* ha posto in capo al processo la comprensione dettagliata dell'interazione molecolare tra il potenziale farmaco e il bersaglio farmacologico (enzima, recettore, messaggero) in un contesto *in vitro* "indisturbato" da altri fattori. Il protocollo prevede che i leganti più performanti siano poi sottoposti a conferme di bioattività in sistemi di crescente complessità, dal test cellulare alla misurazione di stabilità e biodisponibilità, fino alle prove di efficacia in modelli *in vivo*. Nell'ultimo decennio, a questa mappa di percorso si affianca e si integra lo screening basato sul fenotipo. Con uno screening cellulare di media complessità che misura effetti biologici di più alto profilo, si pone fin

dall'inizio l'attenzione su molteplici proprietà che una molecola candidata deve possedere, in compatibilità con l'intero contesto cellulare di barriere fisiche, di vie metaboliche e di trasduzione. Questo approccio punta ad una veloce analisi delle potenzialità farmacologiche dei composti e si affida alle tecnologie più recenti per chiarire il meccanismo d'azione dei composti più interessanti. Lo screening basato sul fenotipo è particolarmente apprezzato in oncologia e in genere si applica su molteplici linee cellulari per avere maggiori garanzie di ricapitolare le caratteristiche di un tipo di tumore riscontrato nei pazienti e aumentare la capacità predittiva rispetto a futuri risultati in clinica.

Tra i numerosi metodi a supporto della ricerca di nuovi target farmacologici validati, qui scegliamo di soffermarci sulla sequenza operativa a valle dello screening fenotipico, delineata in Fig. 2, secondo uno schema applicato presso Nerviano Medical Sciences.

Si parte con lo screening di una linea cellulare in formato piastrato, utilizzando linee "annotate", di cui già si ha un quadro dei livelli di espressione di diversi target e delle vie di trasduzione attivate. I composti utilizzati sono una selezione di potenti e specifici inibitori di chinasi, di agenti di alto profilo e di farmaci noti che nell'insieme coprono oltre 400 target e servono a sondare la sensibilità delle linee cellulari. Il saggio identifica hits, la cui potenza antiproliferativa è quantificata con valori di IC50.

I migliori inibitori sono quindi scelti per ulteriori caratterizzazioni biochimiche e cellulari. In primo luogo, si studia il profilo di selettività di inibizione

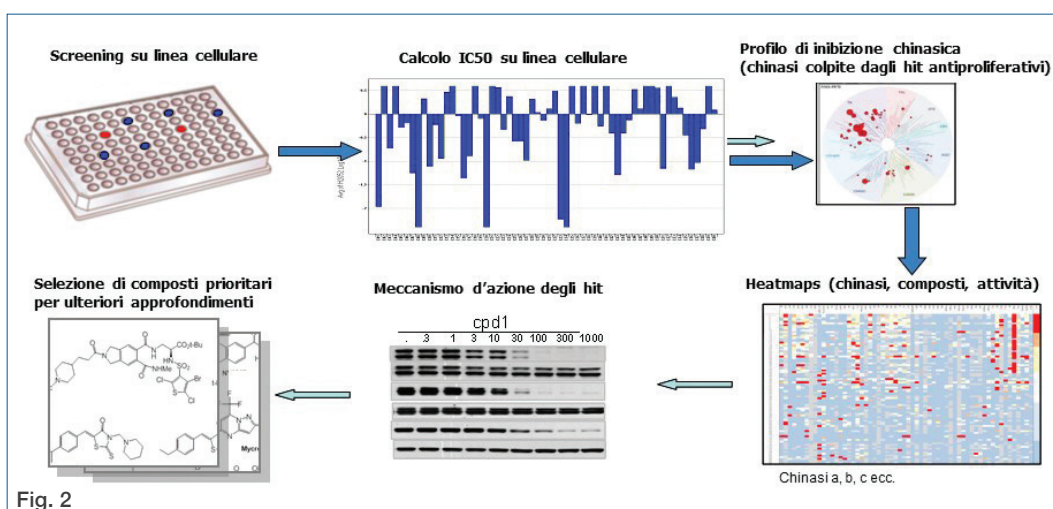
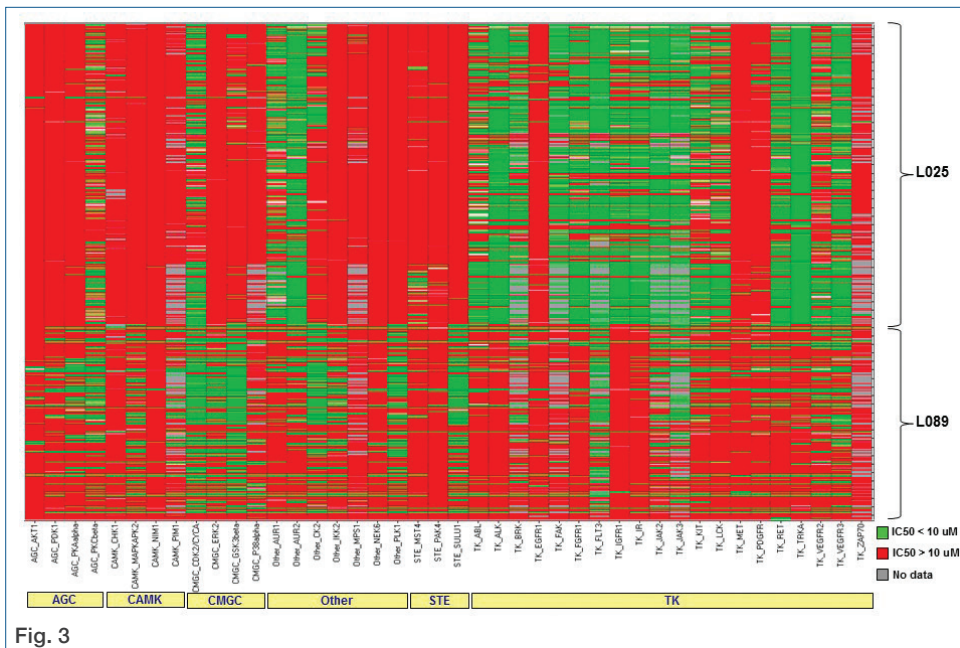


Fig. 2





chemotipo (libreria) o somiglianza strutturale. L'attività biologica è codificata per colore (Fig. 3). Ogni colonna rappresenta una singola chinasi e ogni riga un singolo composto. I valori della mappa spaziano da  $IC_{50} < 10 \mu M$  (verde, attivo) a  $IC_{50} > 10 \mu M$  (rosso, non attivo). Si distingue con facilità, la notevole affinità della libreria L025 per i target tirosin chinasi (TK). Anche le chinasi Aurora, collocate nelle prime due colonne del gruppo "Other", rispondono molto bene a questo chemotipo.

Fig. 3

testandole nel pannello che include un centinaio di chinasi rappresentative. Ove indicato, si espande la valutazione su un pannello di massima dimensione fornito da servizi specializzati. I dati biochimici sono poi incrociati con i risultati dell'attività inibitoria cellulare e con dati pubblici per ottenere le informazioni che servono a formulare ipotesi di target coinvolti. Si eseguono inoltre caratterizzazioni genomiche a livello di DNA/RNA per identificare bersagli sovraespressi o attivati.

Interpretando l'insieme dei dati, includendo la lettura di rapporti tra strutture e attività dei leganti, si selezionano alcuni composti guida da sottoporre a studi di meccanismo d'azione (Western blot) e ai programmi di espansione chimica alla base di ogni ottimizzazione e costruzione di posizioni brevettuali.

Un'operazione chiave di questo processo consiste nella compilazione di *heatmaps*, rappresentazioni multifattoriali in cui si raggruppano i target (le chinasi) per famiglia e sottofamiglia. Gli identificativi dei composti sono allineati per

## Sonde e bersagli del tumore cordoma

I cordomi sono tumori ossei rari per i quali ancora manca una terapia farmacologica efficace. Esprimono diversi recettori di tirosin chinasi attivati. I risultati clinici con inibitori sono però rimasti modesti e, di conseguenza, si ipotizzano meccanismi tumorali più complessi. Con l'obiettivo di identificare target farmacologici adatti allo sviluppo di un trattamento clinico, nell'ambito di una collabo-

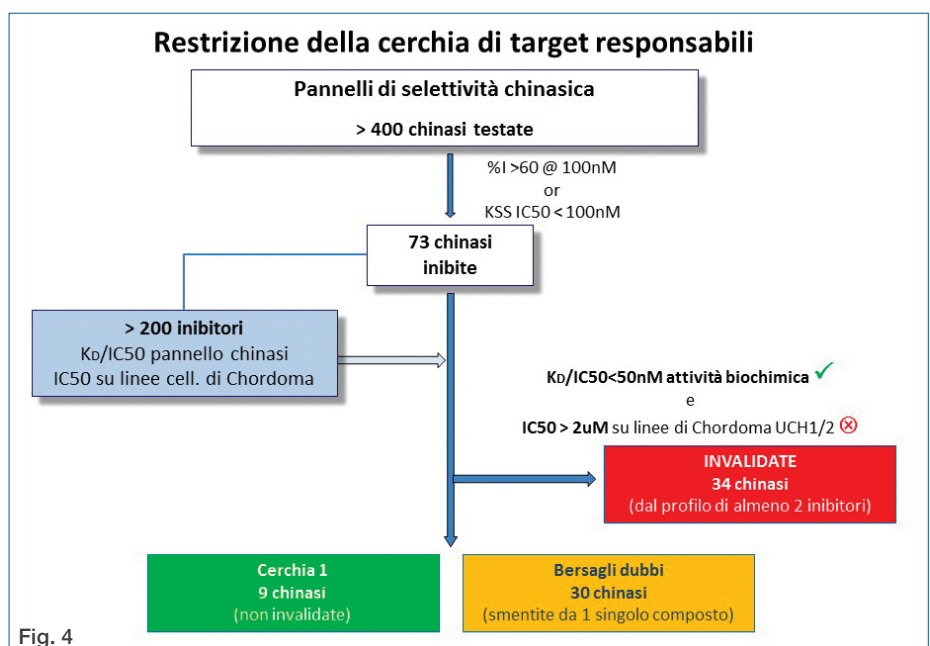


Fig. 4



razione tra aziende la Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori e la Chordoma Foundation, Nerviano Medical Sciences hanno contribuito anche con un approccio chemogenomico. I risultati salienti della collaborazione, riportati recentemente [6, 7], hanno ricevuto l'attenzione dei clinici e portato a primi studi su pazienti affetti da cordoma in stadio avanzato e metastatico. Uno screening cellulare, condotto a Nerviano, aveva identificato il farmaco Afatinib, già approvato per uso clinico in pazienti con tumore al polmone, come l'unico inibitore di EGFR attivo sulle principali linee cellulari di cordoma, e l'unico in grado di degradare EGFR e "brachyury", un fattore di trascrizione embrionale fondamentale per la crescita dei cordomi. Qui illustriamo il procedimento chemogenomico applicato nella parte iniziale del progetto, mirato a restringere la cerchia dei target responsabili della crescita tumorale (Fig. 4).

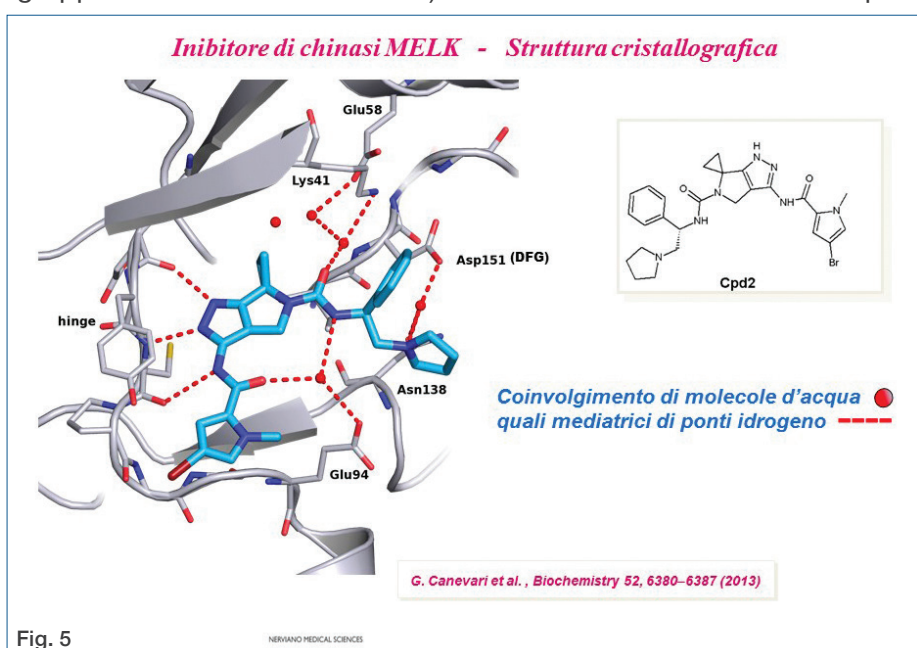
I dati di attività anti-proliferativa sulle linee di cordoma UCH-1 e UCH-2 sono stati incrociati con i dati di inibizione enzimatica di chinasi. L'analisi ha permesso di invalidare l'importanza di chinasi inibite da composti sonda fortemente attivi sulle cellule, ma al contempo anche inibite da altri composti sonda risultati inattivi sulle linee di cordoma. Da una prima cerchia di 73 chinasi inibite, emerse dai pannelli comprendenti oltre 400 chinasi, è stato quindi possibile escludere un gruppo di 34 chinasi, per ciascuna delle quali esistono almeno due inibitori di riferimento molto potenti, ma poco o per nulla attivi sulle linee di cordoma (con soglia  $IC_{50} > 2 \mu M$ ). Possiamo ipotizzare che se una chinasi è inibita potentemente da un composto che ha attività marginale sulle linee di cordoma, tale chinasi non abbia un ruolo rilevante sull'attività proliferativa delle stesse. Tra le rimanenti è stato quindi identificato un gruppo di 30 chinasi dubbie, smentite dai dati di un solo inibitore. Questo gruppo non può essere escluso con la stessa confidenza del primo,

vista la mancanza di una conferma del razionale tramite un secondo composto.

Con il cerchio ristretto a nove chinasi, per le quali non esistono dati contraddittori tra l'attività di inibizione sull'enzima e l'attività antiproliferativa, nella fase successiva sono seguite le necessarie analisi di qPCR su RNA da linee di cordoma per quantificare l'espressione ed eliminare le chinasi non espresse dai modelli di meccanismo.

### Un atlante di azioni farmacologiche antitumorali

La diffusione di strutture di molecole organiche, di dati di attività biologica, di azioni farmacologiche e di tutto ciò che produce annotazioni di interesse per la *drug discovery* sta assumendo dimensioni vastissime. Particolare riguardo deve però essere dedicato alla qualità delle informazioni, non solo per quel che attiene ai valori misurati, ma anche alla scelta dei modelli e alla verificabilità. Una panoramica di banche dati, agevolmente consultabile online, si trova sul sito di [DrugBank \[8\]](#). DrugBank contiene informazioni su farmaci e bersagli farmacologici. Essendo sia una risorsa bioinformatica che chemoinformatica, DrugBank combina dati chimici, farmacologici e farmaceutici dei principi attivi con informazioni complete sui relativi target (sequenza, struttura, ruoli e collocazione nelle vie di trasduzione). Nell'ambito delle chinasi è stato pub-



blicato recentemente un lavoro multicentrico coordinato dal Politecnico di Monaco di Baviera con partecipazione di Nerviano Medical Sciences. In questo studio Klaeger *et al.* hanno eseguito, usando una tecnologia chimico-proteomica innovativa basata sulla spettrometria di massa, un'analisi completa di 243 inibitori di chinasi già approvati per uso terapeutico o in studi clinici [9]. Invece di testarli usando enzimi prodotti e modificati geneticamente, gli scienziati hanno lavorato su prelievi di pazienti, analizzando l'intero contenuto cellulare di leucemie e di tumori solidi in risposta agli inibitori, così preservando la presenza del contesto patofisiologico della cellula. In questo modo è stato mappato sistematicamente lo spettro dei partner di legame molecolare di ogni farmaco, rimanendo al contempo molto più vicini alla biologia del tumore rispetto ad analisi biochimiche o di linee cellulari. I dati hanno un potenziale di lettura e interpretazione molto vasto che ricercatori e oncologi clinici possono utilizzare in libero accesso per sviluppare ipotesi di nuove applicazioni di farmaci già esistenti o di nuovi farmaci con profili d'azione integrativi, non coperti dall'attuale offerta a disposizione del medico. Un esempio evidenziato in questo studio riporta che in un'analisi retrospettiva di sopravvivenza di una coorte di 375 pazienti la chinasi MELK è stata identificata quale biomarcatore di prognosi infausta in alcuni tipi di carcinoma polmonare. I ricercatori di Nerviano Medical Sciences hanno determinato la struttura molecolare precisa di diversi complessi di inibitori di MELK, creando la base di future ottimizzazioni (Fig. 5) e stimolando rinnovato interesse per un target parzialmente screditato da infruttuosi tentativi precedenti di trovare un contesto in cui agisse da unico "driver" (fattore trainante) di carcinogenesi.

## Conclusioni

Scoprire i meccanismi contorti di patologie complesse, comprendere a fondo la biologia del cancro, evitare le trappole di interpretazioni semplicistiche nella lettura dei dati, sono tutti obiettivi il cui inseguimento è gratificante lungo tutto il percorso, a partire dalle prime ipotesi del ruolo di nuovi target fino a definirne la concreta rilevanza clinica.

La cura dei pazienti con nuovi farmaci più efficaci e tollerabili non può tuttavia attendere una visione

completa dei mezzi e dei modi con cui funziona il cancro. È quindi stato necessario includere nella sfida un cambio di passo. Le aree critiche riguardano la continuità di efficacia, l'ampiezza di indicazioni sensibili e la selezione di pazienti guidata dalla diagnostica con biomarcatori. Oltre ai programmi di ricerca si complicano lo sviluppo farmaceutico e clinico. Le combinazioni con terapie a base di anticorpi e con modulatori della risposta immunitaria sono approcci già inseriti nelle moderne strategie antitumorali.

Nonostante le sfide all'orizzonte possano intimorire per la mancanza di soluzioni semplici e rapide, fa ben sperare la risposta del mondo della ricerca, che si sta organizzando adeguatamente ad affrontarle puntando maggiormente sulle tecnologie, la condivisione dei dati e le collaborazioni multicentriche.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] A. Zachary *et al.*, *Nature Reviews Cancer*, 2010, **10**, 130.
- [2] R. Morphy, Z. Rankovic, *J. Med. Chem.*, 2005, **48**, 6523.
- [3] D.H. Drewry *et al.*, *Curr Top Med Chem.*, 2014, **14**, 340.
- [4] D.H. Drewry *et al.*, *PLOS ONE*, 2017, **12**, 8.
- [5] F.M. Behan *et al.*, *Nature*, 2019, Apr, 10, doi: [10.1038/s41586-019-1103-9](https://doi.org/10.1038/s41586-019-1103-9), [Epub ahead of print].
- [6] P. Magnaghi *et al.*, 5<sup>th</sup> Int. Chordoma Res. Workshop, 2016.
- [7] P. Magnaghi *et al.*, *Mol. Cancer Ther.* 2018, **17**, 603.
- [8] D.S. Wishart *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 2017, Nov. 8, doi: [10.1093/nar/gkx1037](https://doi.org/10.1093/nar/gkx1037).
- [9] S. Kläger *et al.*, *Science*, 2017, **358**, 1148.

### Antitumorals via Pharmacological Probes

With the systematic use of highly profiled antitumor agents (active ingredients of drugs, lead molecules of oncological research projects) it is possible to probe the sensitivity context of tumor cells and to evaluate early on the opportunities and necessity of hitting combinations of drug targets in order to treat complex and resistant diseases effectively.