



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

ACCELERARE LA DECOMPOSIZIONE DI CARBAMMATI CON NUOVI SELF-IMMOLATIVE SPACER

Molte strategie farmaceutiche moderne prevedono la coniugazione covalente di farmaci a veicoli in grado di accumularsi e rilasciare il principio attivo nel sito della patologia. A livello chimico, lo sviluppo di nuovi “self-immolative spacer” permette un controllo sempre più accurato del meccanismo di rottura di queste connessioni covalenti, finalizzato ad un efficace rilascio dei farmaci in forma attiva.

I “self-immolative” (SI) spacer sono costruiti covalenti in grado di decomporsi in maniera spontanea a seguito di un segnale esterno, il quale porta alla conversione di un gruppo funzionale inerte (ad esempio un’ammidio, un gruppo nitro od un estere) in uno attivo (ad esempio un’ammina od un alcol). Questa attivazione del SI spacer innesca una riorganizzazione della struttura molecolare guidata da un generale aumento di entropia e dalla formazione di sottostrutture termodinamicamente più stabili. Questi processi consistono principalmente in cascate elettroniche in strutture aromatiche o sistemi π coniugati, oppure in ciclizzazioni di un gruppo funzionale nucleofilo verso un partner elettrofilo. Il risultato di questi processi spontanei è la trasmissione del segnale chimico (come la rottura di un legame covalente) da una posizione iniziale dello spacer ad una seconda, situata a diversi legami di distanza dal punto di attivazione. Il crescente interesse attorno allo sviluppo di sistemi dinamici e sensibili agli stimoli esterni ha portato ad un notevole sviluppo dei SI spacer, che vengono attualmente impiegati in diversi campi, dalla chimica sintetica a quella dei materiali, dalle sonde molecolari alla chimica farmaceutica [1]. In particolare, i SI spacer sono stati fondamentali per lo sviluppo

di tecnologie per il rilascio di farmaci antitumorali. Ad esempio, i coniugati farmaco-anticorpo (i cosiddetti ADC, ossia “antibody-drug conjugates”, Fig. 1A) consistono nella coniugazione di potenti molecole citotossiche ad anticorpi monoclonali in grado di legare con alta affinità specifiche proteine espresse nel sito del tumore. In seguito alla somministrazione sistemica dell’ADC nei pazienti, il legame covalente fra il farmaco e la struttura proteica dell’anticorpo impedisce il rilascio prematuro del farmaco nella circolazione sanguigna, idealmente minimizzando gli effetti collaterali della terapia. Allo stesso tempo però, la connessione covalente fra veicolo e farmaco deve essere scissa nel sito tumorale, dove si richiede l’azione farmacologica del principio attivo. Proprio per questo motivo, la struttura di connessione tra farmaco e anticorpo (nota come linker) include tipicamente un substrato di specifici enzimi espressi nel sito tumorale, come alcune proteasi, glicosidasi o nitroreduccasi [2]. In questi casi, i SI spacer vengono molto utilizzati non solo per distanziare il farmaco dal linker, riducendo l’ingombro sterico attorno al substrato enzimatico, ma anche per adattare le caratteristiche chimiche del linker allo specifico gruppo di ancoraggio sul farmaco. Diverse strutture di SI spacer presentano

Alberto Dal Corso è risultato vincitore del **Premio Levi 2020** attribuito dal Gruppo Giovani della Società Chimica Italiana. Qui i link al [video](#) e all’[articolo](#).



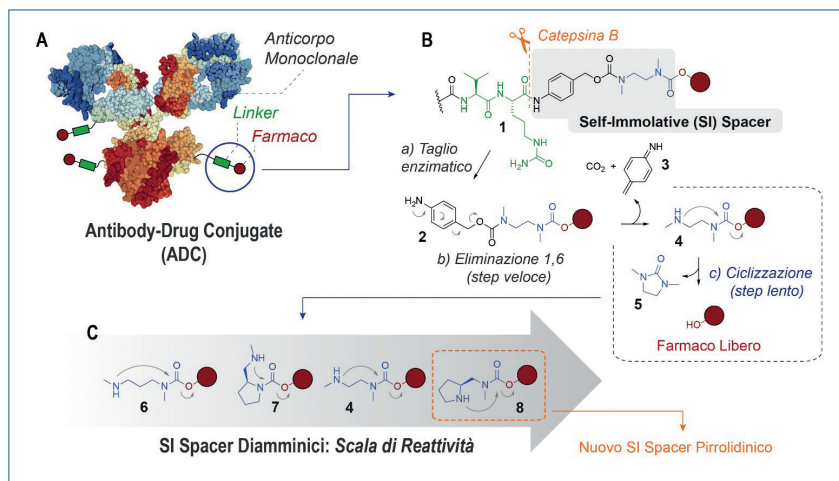


Fig. 1 - Applicazione dei *Self-Immolative (SI) Spacer* per il rilascio di farmaci antitumorali. A) Rappresentazione schematica di un ADC, costituito dalle tre parti fondamentali anticorpo, linker e farmaco. B) Esempio di *SI spacer* per il rilascio di gruppi ossidrilici (alcoli e fenoli): un primo legame carbammato viene decomposto a seguito di un meccanismo di eliminazione 1,6, mentre un secondo carbammato viene convertito ad urea ciclica attraverso attacco nucleofilo intramolecolare dell'ammina secondaria. C) Scala di reattività di un piccolo gruppo di *SI spacer* diamminici, raffigurante lo *spacer* pirrolidinico **8** recentemente sviluppato dal nostro gruppo di ricerca

uno o più gruppi carbammato: in aggiunta alla loro facilità di preparazione, questi gruppi funzionali sono caratterizzati da una forte stabilità all'idrolisi, mentre è possibile pianificarne la degradazione attraverso diversi tipi di reazioni intramolecolari. Queste caratteristiche fanno dei carbammati il gruppo funzionale più usato per la costruzione di *SI spacer*. Ad esempio, quattro ADC fra i dieci attualmente approvati per l'uso clinico presentano linker peptidici (le sequenze valina-citrullina e valina-alanina, substrati della proteasi cathepsina B), collegati al gruppo amminico dell'agente citotossico monometil auristatina E (MMAE) tramite il *SI spacer para*-amminobenzil carbammato. In aggiunta all'uso di farmaci con gruppo funzionale amminico, i carbammati sono stati anche utilizzati per il rilascio dei gruppi ossidrilici, come alcoli e fenoli. In questo caso un sistema di *SI spacer* molto usato presenta due gruppi carbammato (composto **1** in Fig. 1B). Un primo *para*-amminobenzil carbammato si attiva in seguito alla proteolisi del legame peptidico C terminale del *linker* (sequenza valina-citrullina in **1**). Il distacco dell'anilina **2** promuove una rapida eliminazione 1,6 del *SI spacer para*-amminobenzil carbammato, che porta alla formazione dell'aza-chinone metide **3** e al rilascio

di anidride carbonica e dell'ammina secondaria **4**. Quest'ultima è progettata per ciclizzare su un secondo carbammato, generando l'urea ciclica **5** e rilasciando il gruppo ossidrilico libero del farmaco. Rispetto all'eliminazione 1,6 dello *spacer* a cascata elettronica, l'ultimo step di ciclizzazione dell'ammina avviene in tempi molto più lenti. Per esempio, un'analisi pubblicata da Goldenberg e colleghi indica che lo spacer *N,N'*-dimetiletilendiammina (identico a quello nell'intermedio **4**) rilascia il gruppo fenolico dell'agente citotossico 7-idrossi-10-etil-camptotecina (SN38) con un tempo di dimezzamento di circa dieci ore [3]. In alcuni casi, un'attivazione lenta del farmaco potrebbe limitarne l'efficacia terapeutica, in quanto la ciclizzazione

poco efficace mantiene il farmaco in uno stato inattivo, in una fase successiva al suo distacco dal veicolo che ne ha promosso l'accumulo nel tumore. Di conseguenza, un ritardo nell'attivazione del farmaco potrebbe portare alla sua fuoriuscita dal sito terapeutico e alla sua escrezione o, ancora peggio, alla sua rottura e attivazione del farmaco libero in organi sani, con conseguente tossicità.

Con questi presupposti, il nostro gruppo di ricerca nel Dipartimento di Chimica dell'Università degli Studi di Milano ha avviato l'esplorazione di diverse strutture chimiche di *SI spacer* ammino-carbammato (come ad esempio i composti **6-8** in Fig. 1C), con l'obiettivo di accelerare la velocità di ciclizzazione e il rilascio di gruppi ossidrilici. In particolare, abbiamo sintetizzato diversi tipi di composti diamminici e li abbiamo coniugati al gruppo fenolico di SN38 mediante legame carbammato. A seguito del loro isolamento in forma di sale di acido trifluoroacetico, i derivati ammina-SN38 sono stati incubati in tampone acetato a pH 5 ad una temperatura di 37 °C. L'analisi mediante HPLC di aliquote di soluzioni a diversi tempi di incubazione ha permesso la definizione delle velocità di ciclizzazione dei diversi *SI spacer*. In questa occasione, un derivato diamminico dell'amminoacido prolina ha mostrato

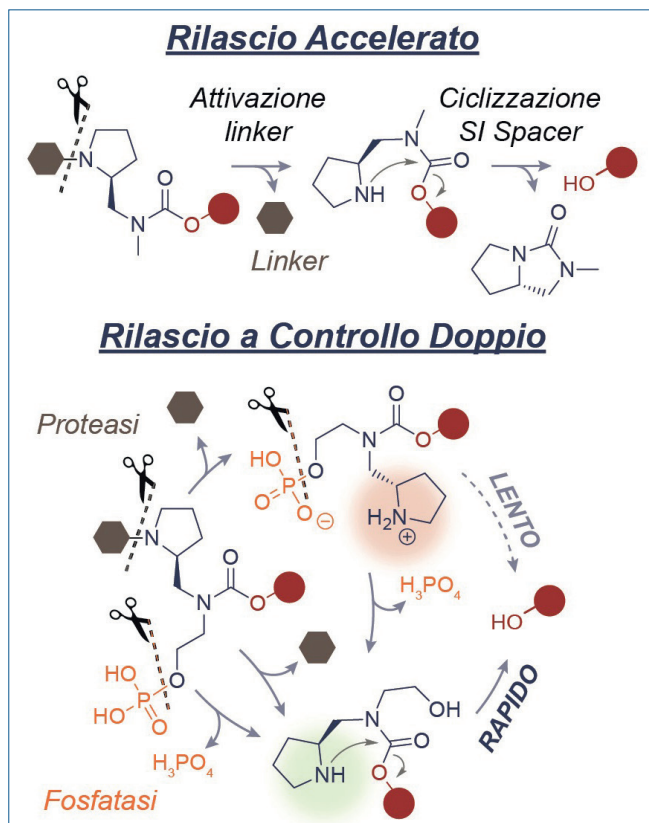


Fig. 2 - Meccanismo di ciclizzazione dello spacer pirrolidinico 8 ("Rilascio Accelerato") e di un suo nuovo derivato ("Rilascio a Controllo Doppio"), in cui un gruppo fosfato rallenta la reazione di ciclizzazione attraverso la formazione di un sale interno con la pirrolidina. L'idrolisi del gruppo fosfato (mediata da un enzima fosfatasi) è indipendente dall'idrolisi del linker peptidico tradizionale (mediata da un enzima proteasi, vedi Fig. 1), ma solo la somma delle due azioni enzimatiche promuove un rilascio del farmaco rapido ed efficace. Questo design rappresenta il primo esempio di SI spacer in grado di liberare un farmaco attraverso l'azione non sequenziale di due enzimi diversi [5]

un'attività molto interessante: mentre la formazione del carbammato con l'azoto endociclico (composto 7) ha portato ad un SI spacer di reattività inferiore rispetto all'etilendiammina tradizionale (composto 4), la coniugazione del farmaco all'azoto esociclico (composto 8) ha portato all'effetto sperato, ossia ad una riduzione dei tempi di rilascio del farmaco rispetto al composto benchmark [4]. In seguito a questo risultato il gruppo ha approfondito lo studio del nuovo SI spacer pirrolidinico, coniugandolo ai gruppi ossidrilici di diversi tipi di farmaci antitumorali e composti fluorescenti, mostrando in tutti i casi una maggiore velocità di ciclizzazione rispetto al benchmark. Inoltre, mediante uno studio in

collaborazione con l'Istituto dei Tumori di Milano, abbiamo dimostrato che un rapido meccanismo di rilascio dello spacer diamminico può portare a evidenti benefici terapeutici. In particolare, la maggior reattività dello spacer pirrolidinico rispetto ad uno etilendiamminico porta ad una maggiore attività antitumorale di profarmaci "completi", ossia dotati di un linker peptidico suscettibile all'azione di proteasi [5]. Questo studio ha dato il via ad ulteriori modifiche strutturali del nuovo spacer pirrolidinico, mirate sia ad aumentarne ulteriormente la reattività, sia alla creazione di sistemi di rilascio più complessi, in cui il meccanismo di attivazione del SI spacer è influenzato dall'attività di due enzimi diversi (Fig. 2) [5]. In conclusione, con questa ricerca il nostro gruppo ha esplorato per la prima volta la reattività di ciclizzazione di SI spacer diamminici mirata a migliorare il meccanismo di attivazione di farmaci e altre molecole. Questo studio ha posto le basi per lo sviluppo di nuovi sistemi di decomposizione spontanea, con potenziale applicazione in diversi ambiti di ricerca.

BIBLIOGRAFIA

- [1] A. Alouane, R. Labruère *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2015, **54**, 7492.
- [2] A. Dal Corso, L. Pignataro *et al.*, *Chem. Eur. J.*, 2019, **25**, 14740.
- [3] S.V. Govindan, T.M. Cardillo *et al.*, *Mol. Cancer Ther.*, 2013, **12**, 968.
- [4] A. Dal Corso, V. Borlandelli *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2020, **59**, 4176.
- [5] A. Dal Corso, S. Arosio *et al.*, *Chem. Commun.*, 2021, **57**, 7778.

Speed up Carbamate Decomposition with New Self-Immolative Spacers

Emerging pharmaceutical strategies consist in the covalent conjugation of drugs to specific vehicles capable of selective accumulation and drug release at the site of disease. From the chemical point of view, the development of novel self-immolative spacers allows a controlled disassembly of these covalent connections, aimed at the release of pharmaceutical ingredients in their active forms.