
Sintesi e studio enzimatico di taglio proteolitico di quattro sequenze peptidiche per il rilascio intracellulare di Paclitaxel come farmaco anti-tumorale

Giornata delle competenze multidisciplinari dei Chimici e dei Fisici

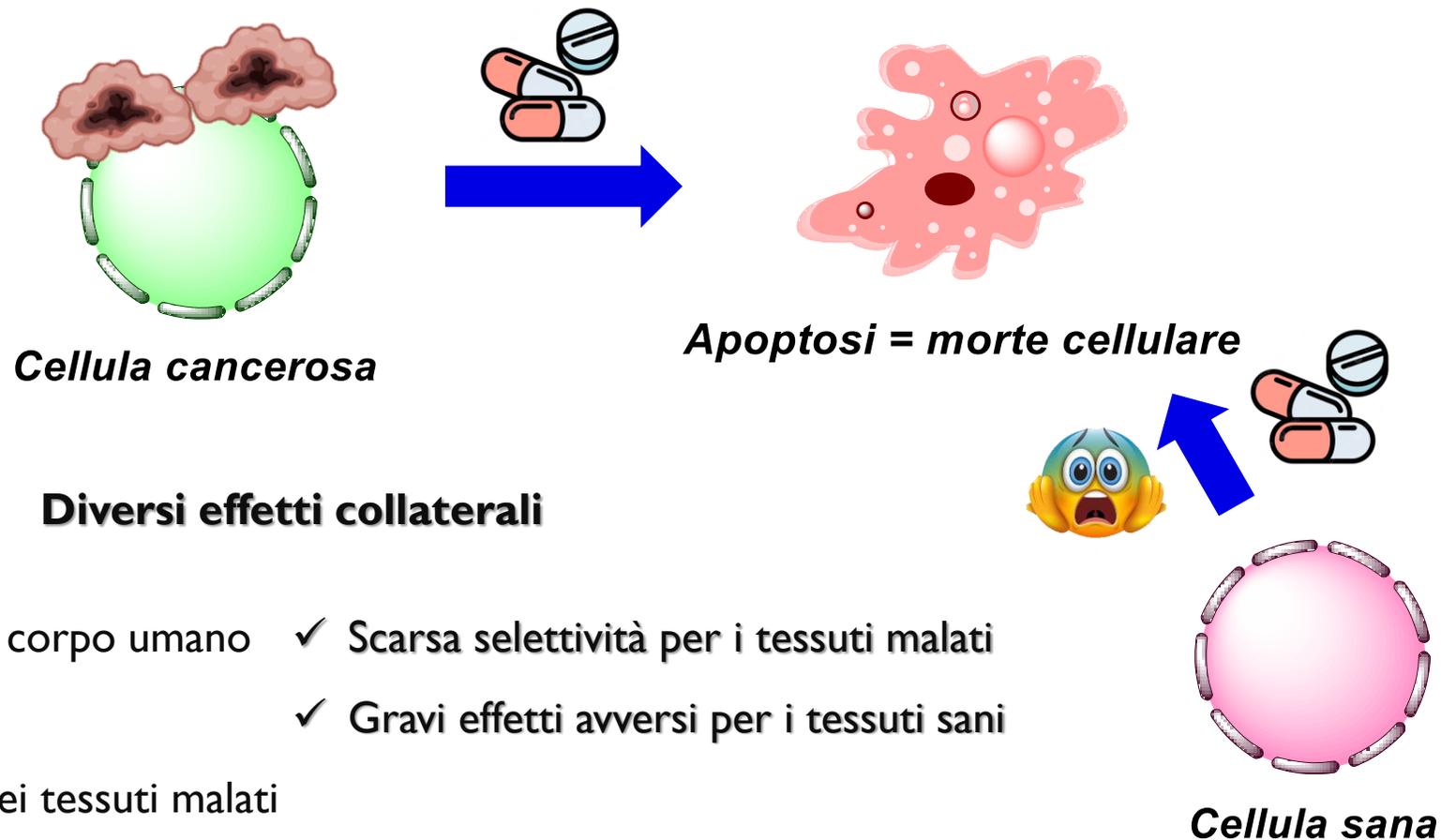
Milano, 29-11-2024

Tesi di Laurea Magistrale, Samuele Bongiolo

Relatrice: Dott.ssa Silvia Gazzola

Chemioterapia

Meccanismo d'azione:

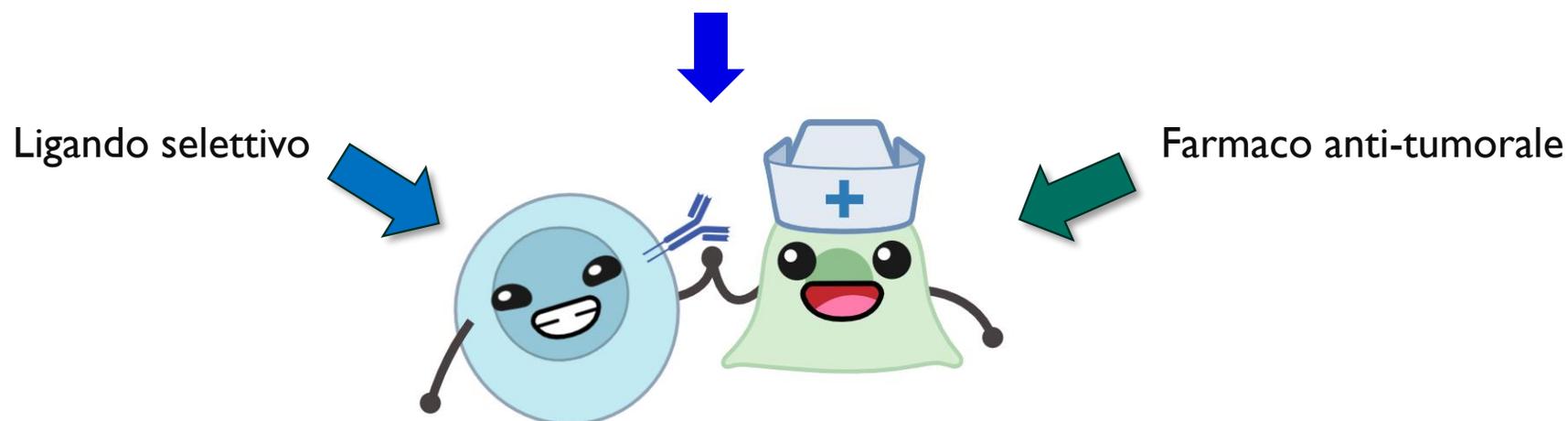


- ✓ Rapida eliminazione dal corpo umano
- ✓ Scarsa bio-disponibilità
- ✓ Scarsa accumulazione nei tessuti malati
- ✓ Resistenza ai farmaci
- ✓ Scarsa selettività per i tessuti malati
- ✓ Gravi effetti avversi per i tessuti sani

La domanda da un milione di dollari

Come possiamo rendere la chemioterapia più selettiva per i tessuti malati?

Terapia mirata

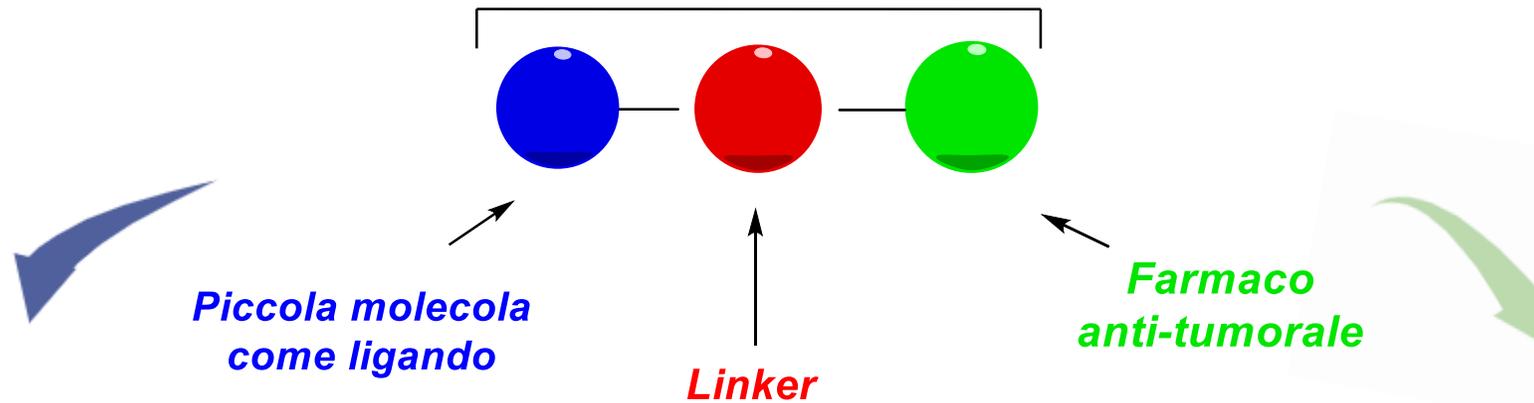


Con lo scopo di:

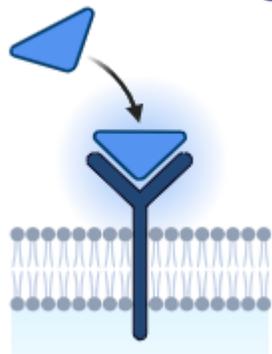
- Distribuire selettivamente diversi farmaci ai loro target farmacologici
- Ridurre gli effetti collaterali indesiderati legati ai classici farmaci anti-tumorali

Coniugati farmaco ligando (SMDCs) – una possibile soluzione

Coniugati farmaco ligando



Piccola molecola come ligando



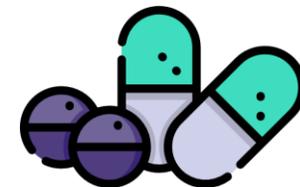
Recettori sovra-
espressi
nelle cellule
danneggiate

Linker chimico



Lega il ligando al farmaco
antitumorale

Farmaco – agente antitumorale



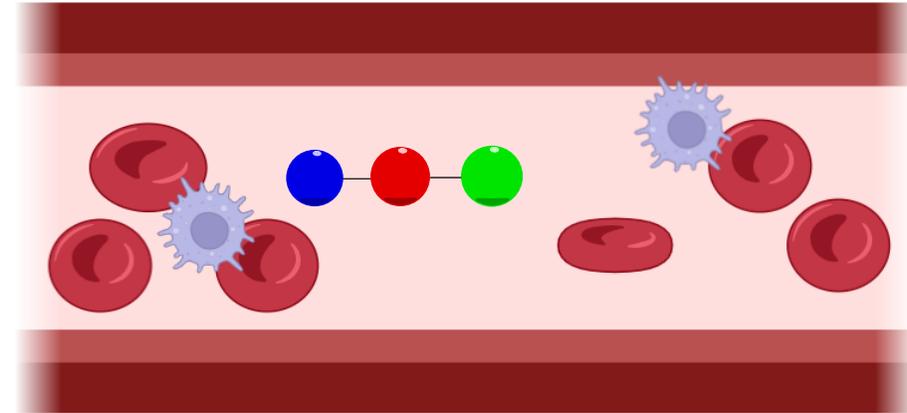
Farmaci citotossici in grado di
uccidere le cellule tumorali

Coniugati farmaco ligando (SMDCs) – una possibile soluzione

Linker chimico



Lega il ligando al farmaco
anti-tumorale



Perfettamente stabile nella circolazione sistemica

Coniugati farmaco ligando (SMDCs) – una possibile soluzione

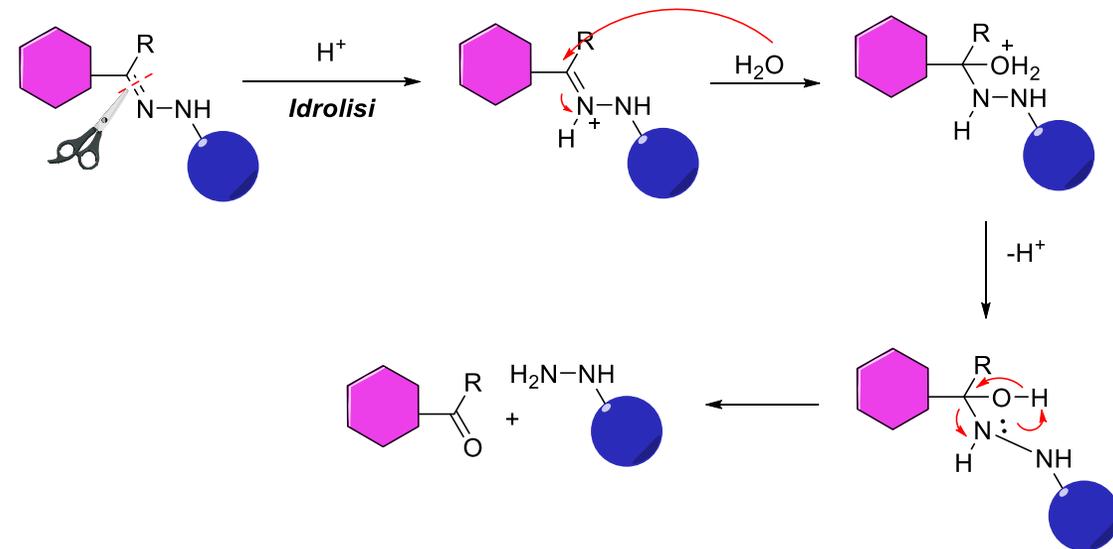
Linker chimico



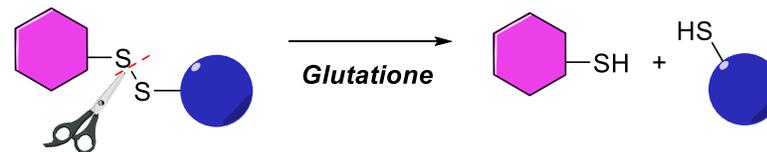
Lega il ligando al farmaco
anti-tumorale

Linker scindibili chimicamente

- Sensibili al pH



- Sensibili a condizioni red-ox



Coniugati farmaco ligando (SMDCs) – una possibile soluzione

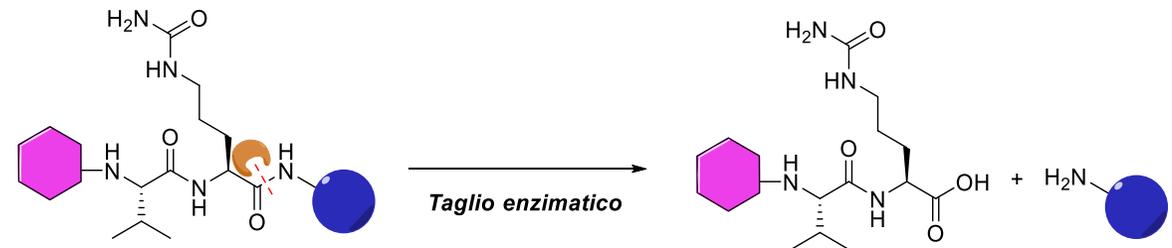
Linker chimico



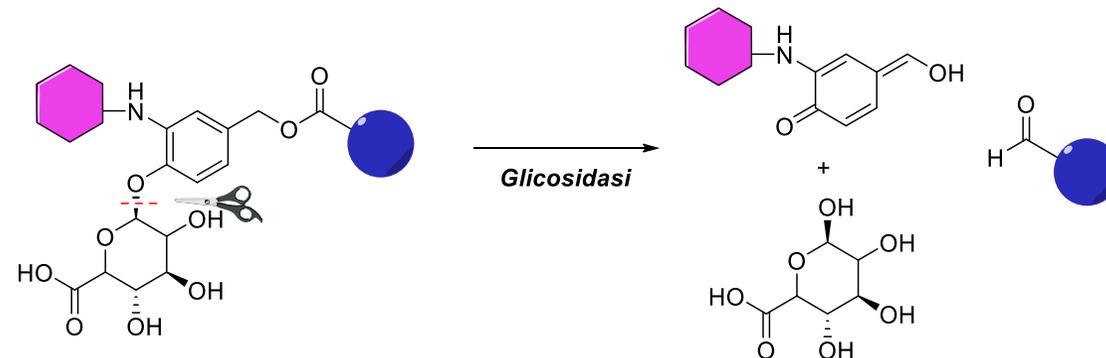
Lega il ligando al farmaco
anti-tumorale

Linker scindibili enzimaticamente

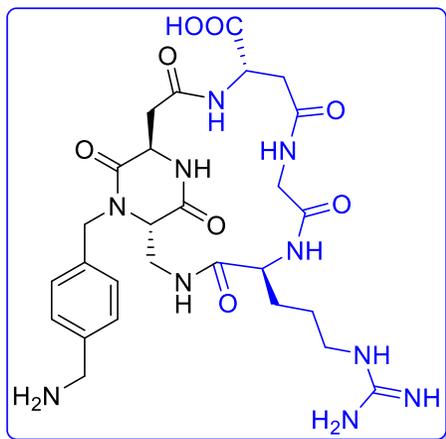
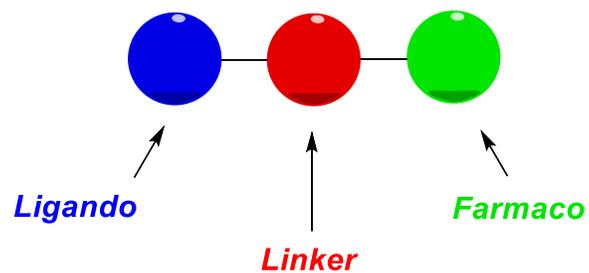
- Sensibili a proteasi



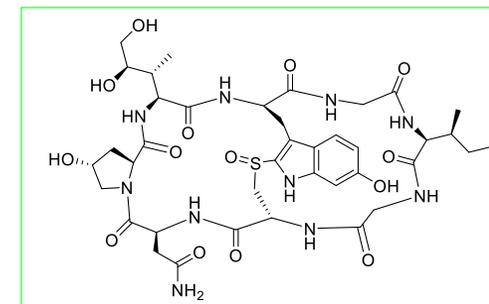
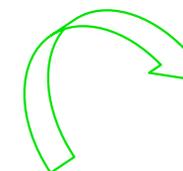
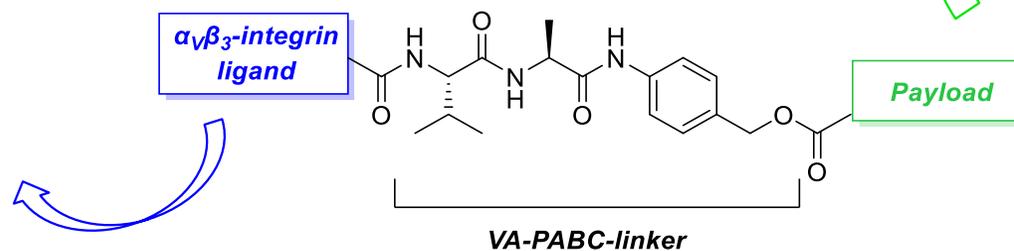
- Sensibili a glicosidasi



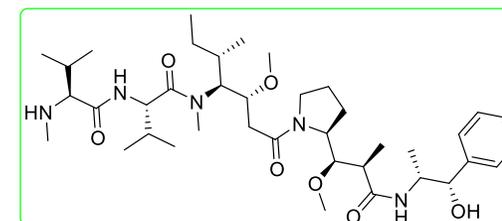
Stato dell'arte del gruppo



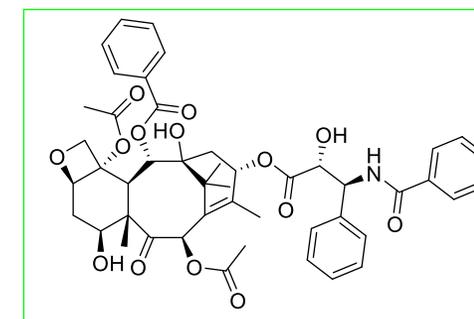
c[DKP- f_3 -isoDGR]



α -amanitin



MMAE



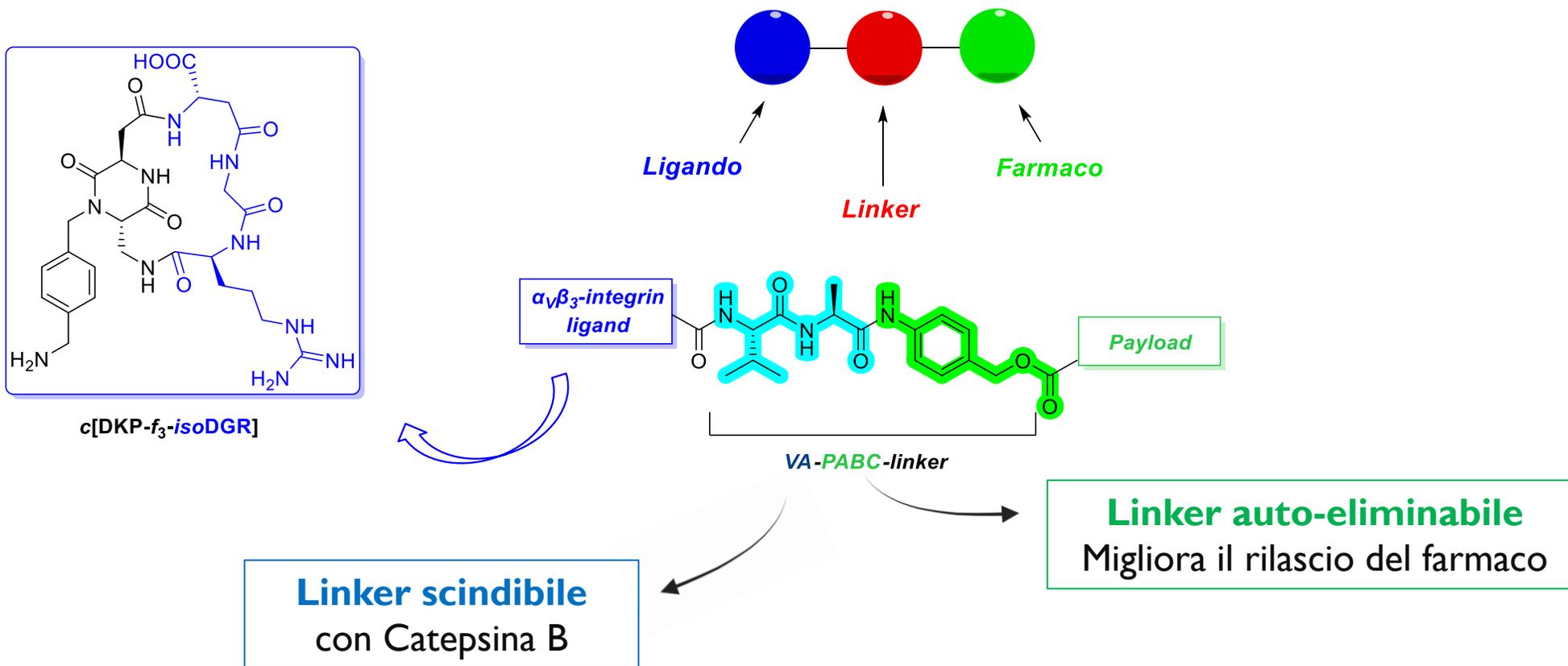
Paclitaxel

Raposo, A et al. *ChemMedChem* **2019**, 14 (9), 938–942.

Bodero, L et al. *Beilstein J. Org. Chem.* **2018**, 14, 407–415.

Bodero, L et al. *European journal of organic chemistry* **2021**, 2021 (17), 2383–2387

Stato dell'arte del gruppo



Selettività eccellente per le cellule malate...

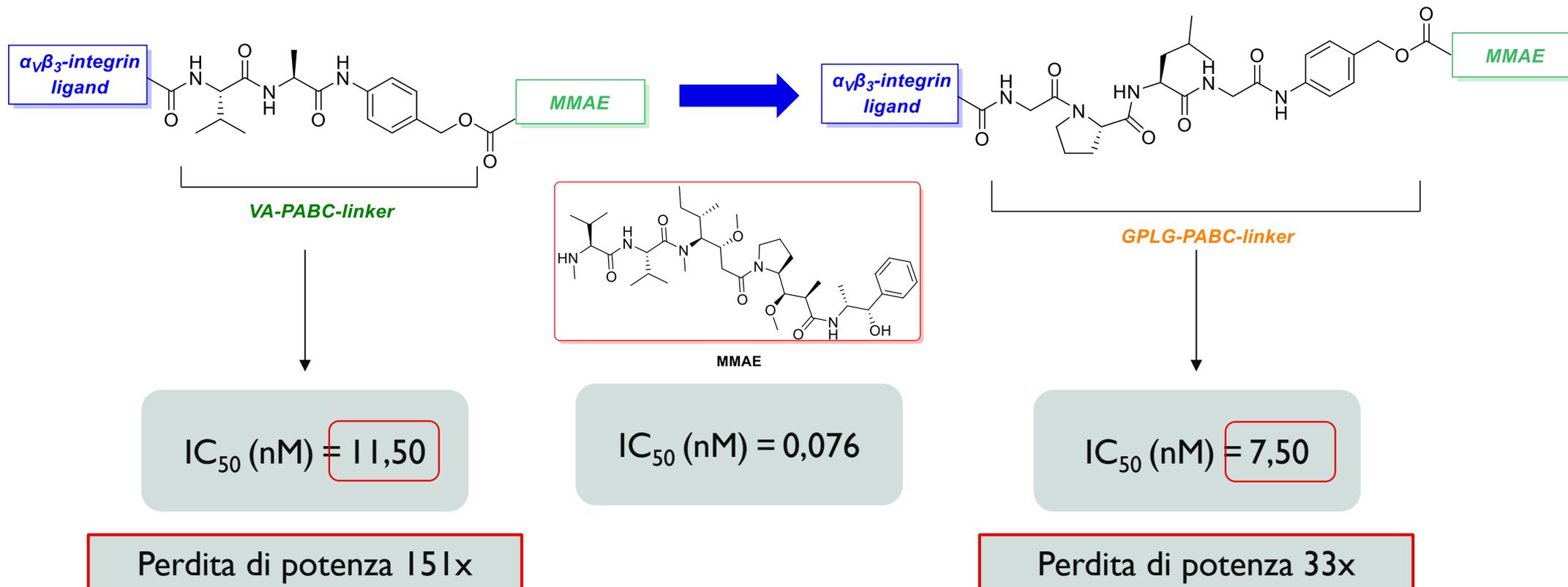
Raposo, A et al. *ChemMedChem* **2019**, 14 (9), 938–942.

Bodero, L et al. *Beilstein J. Org. Chem.* **2018**, 14, 407–415.

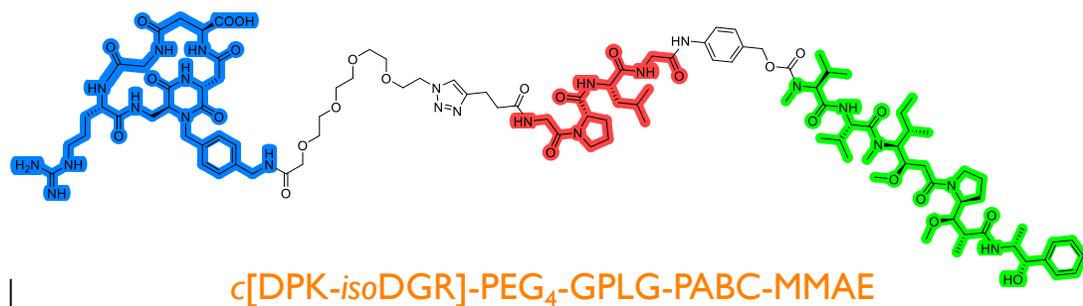
Bodero, L et al. *European journal of organic chemistry* **2021**, 2021 (17), 2383–2387

Stato dell'arte del gruppo

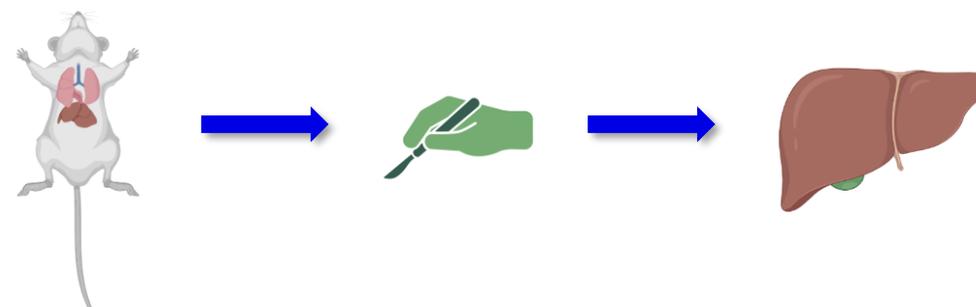
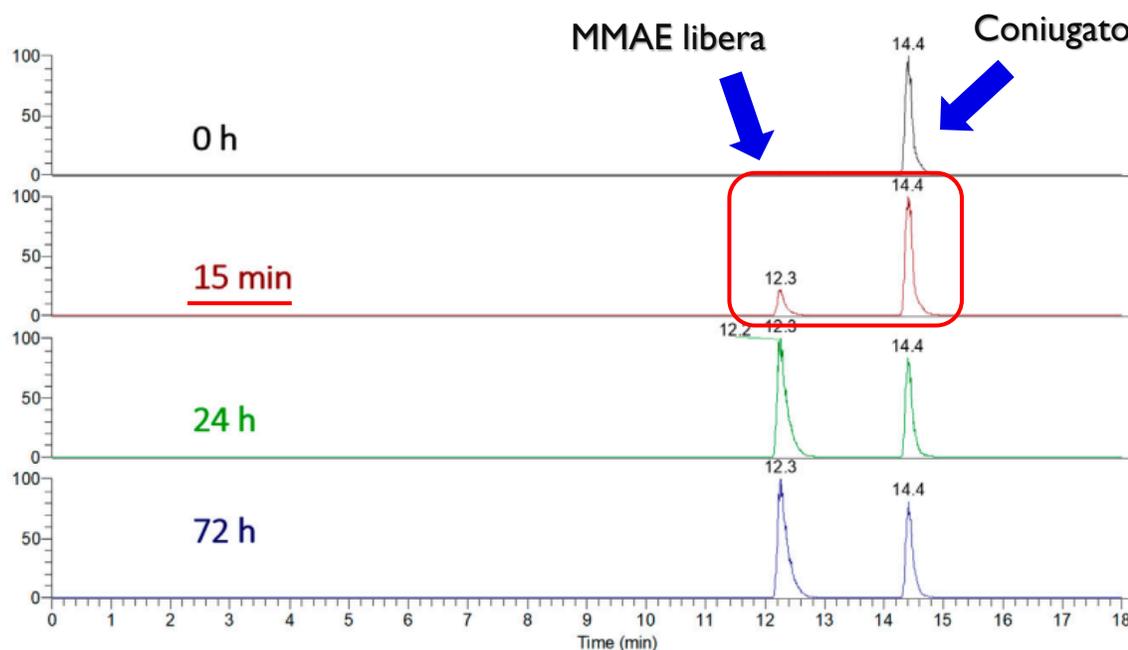
...ma scarsa potenza rispetto al farmaco libero



Stato dell'arte del gruppo



- SMDCs basati su **ligandi iso-DGR** per le integrine $\alpha\beta_3$ e **MMAE** come **farmaco citotossico**
- **Linker chimico** basato sul tetrapeptide **GPLG**
- Taglio del coniugato in un estratto lisosomiale di fegato di ratto.



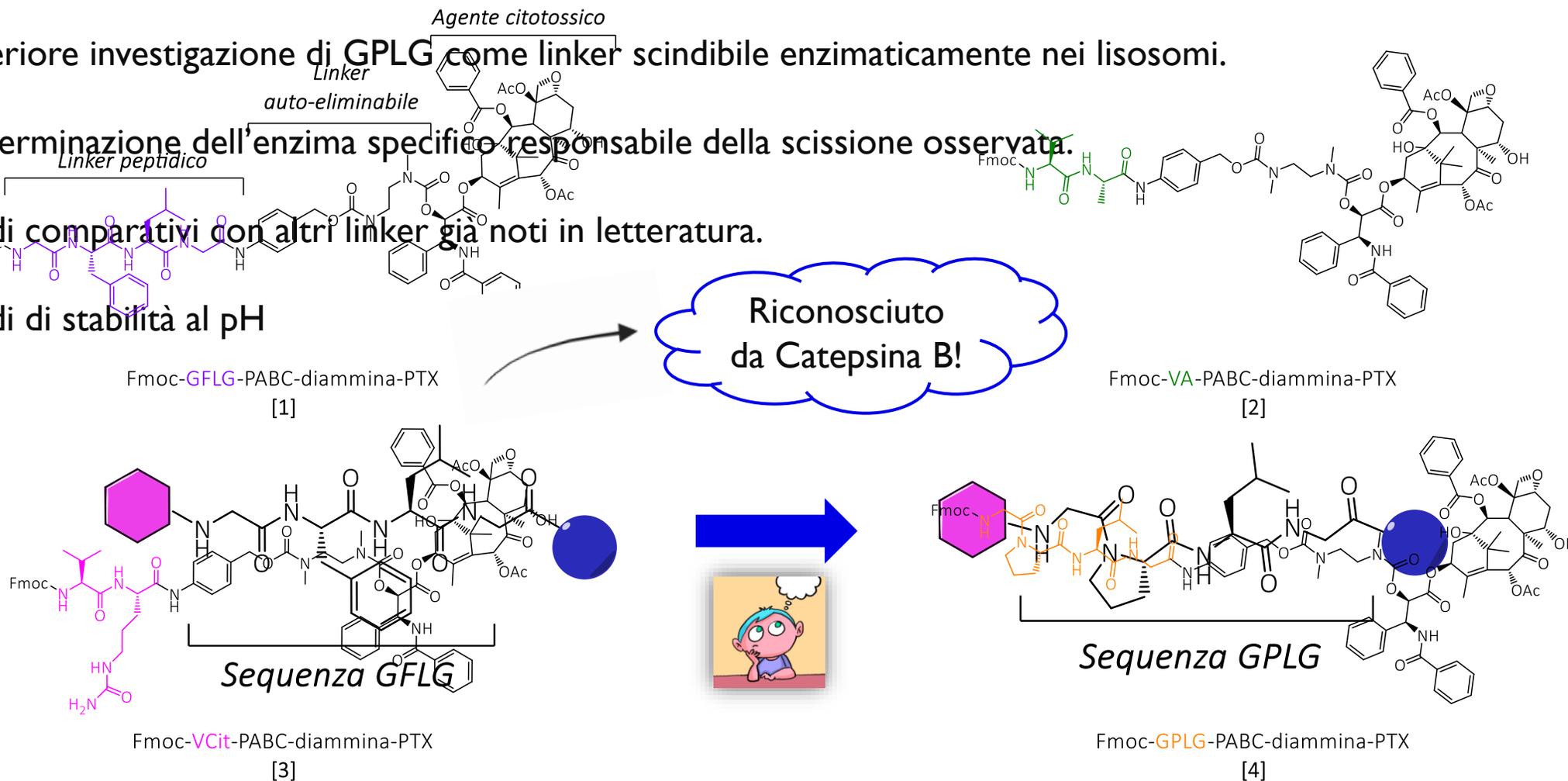
Scopo del progetto

✓ Ulteriore investigazione di **GPLG** come linker scindibile enzimaticamente nei lisosomi.

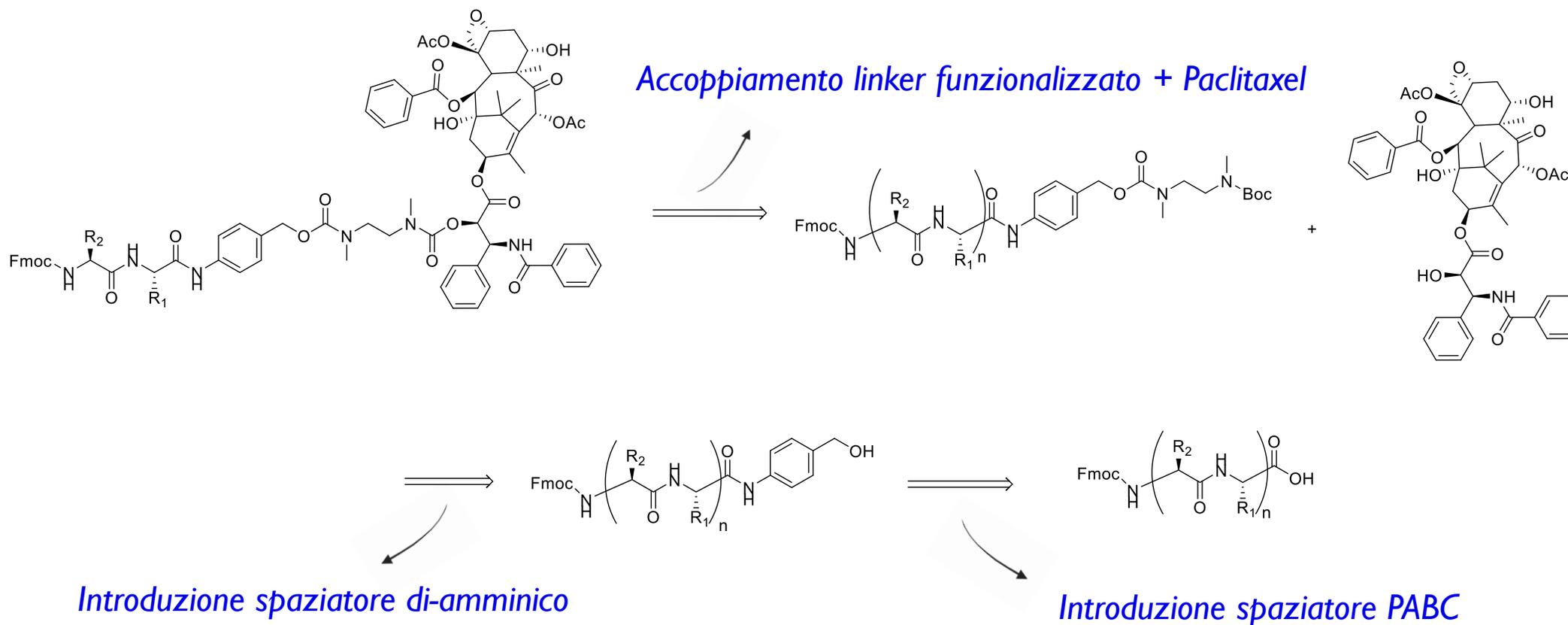
✓ Determinazione dell'enzima specifico responsabile della scissione osservata.

✓ Studi comparativi con altri linker già noti in letteratura.

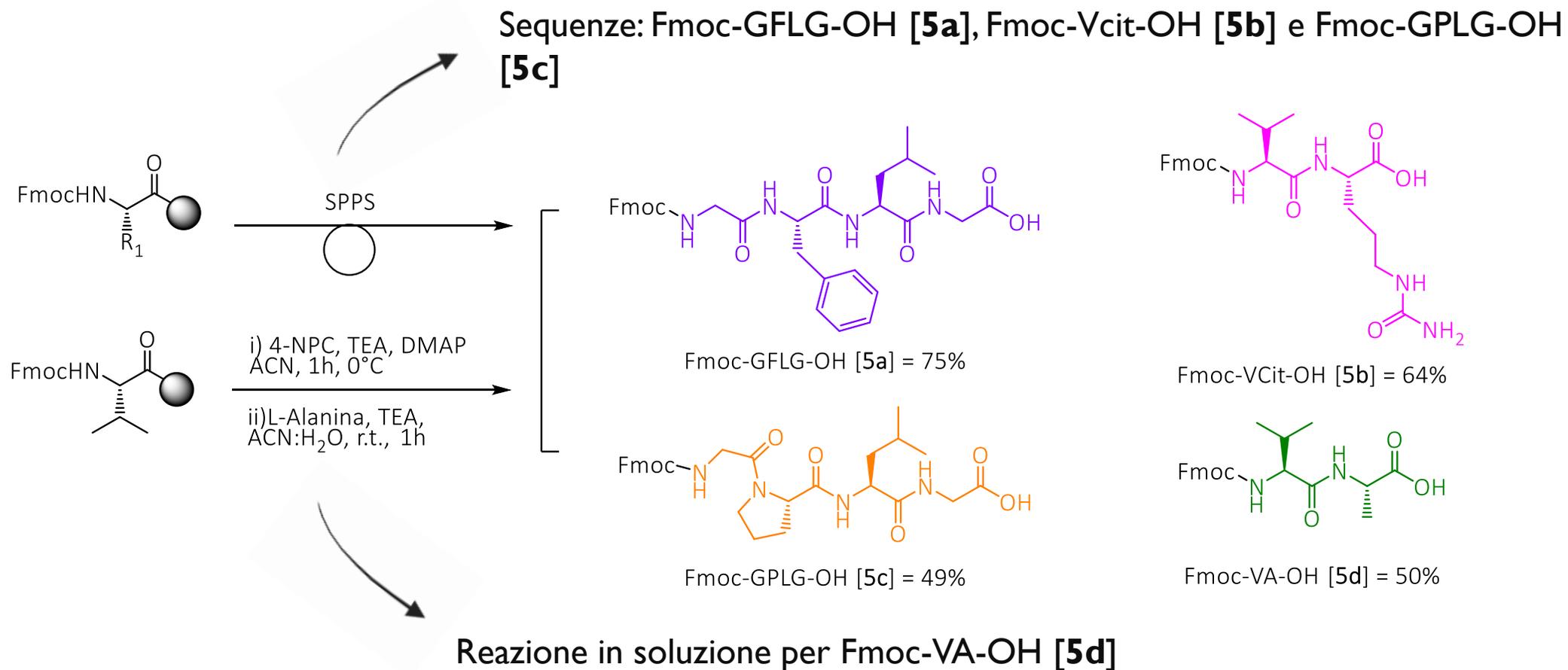
✓ Studi di stabilità al pH



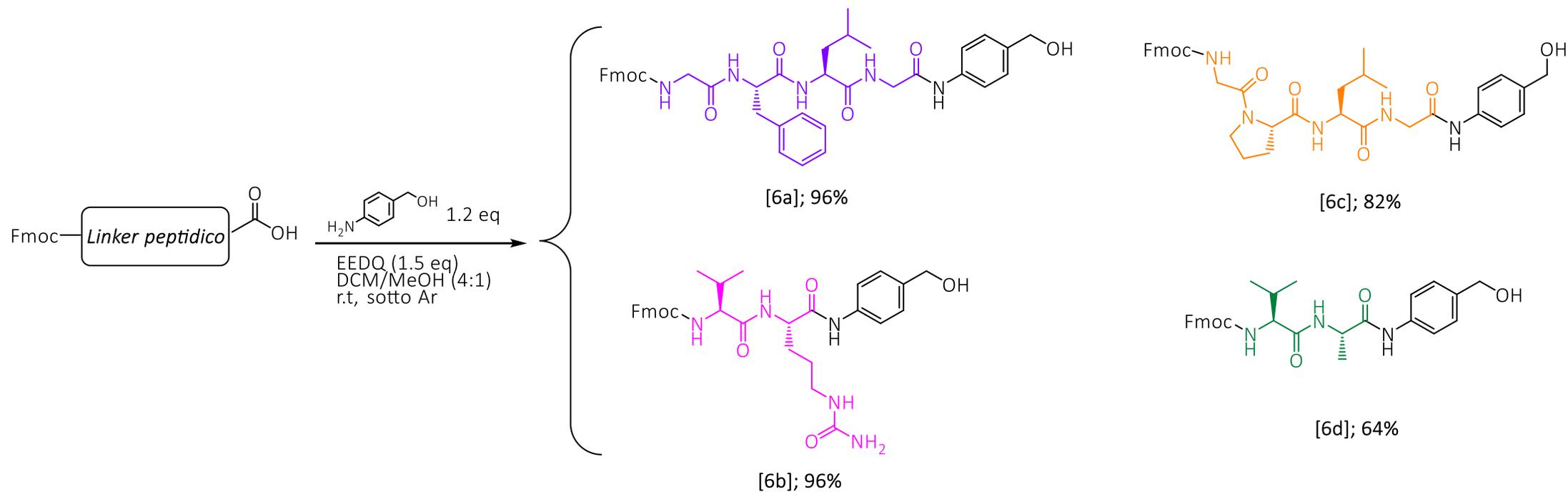
Approccio sintetico generale per la sintesi dei coniugati



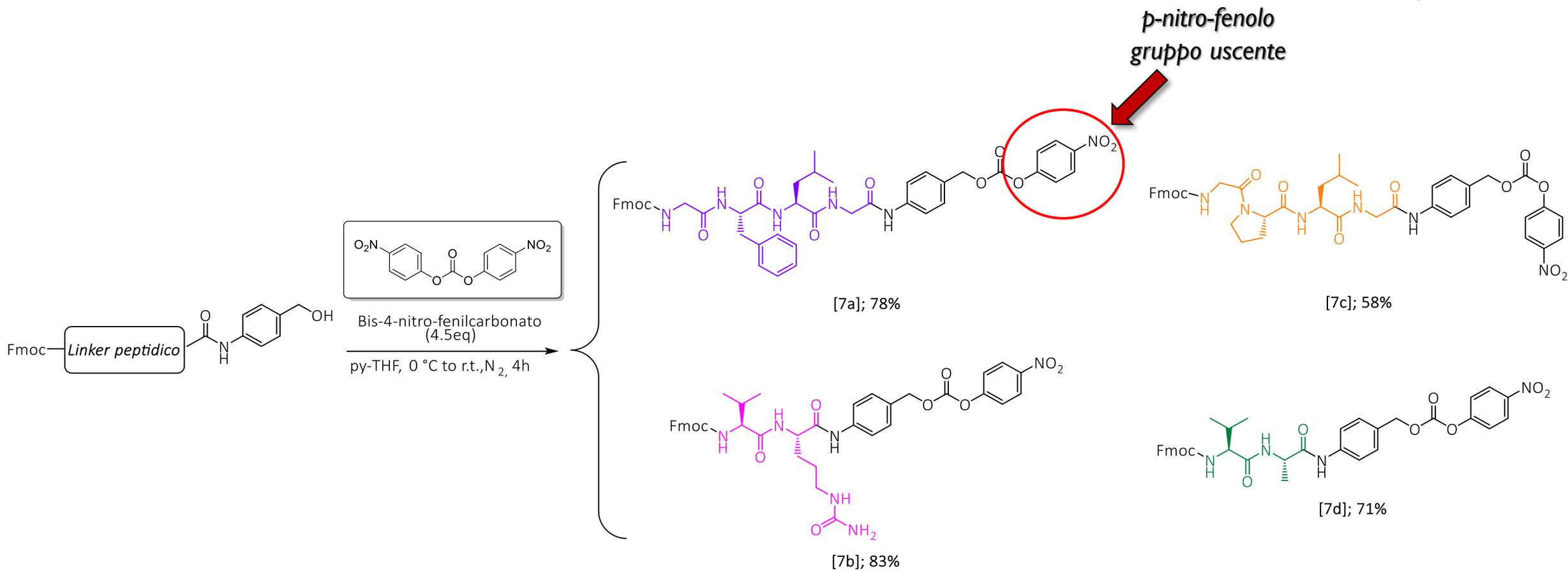
Sintesi delle sequenze peptidiche



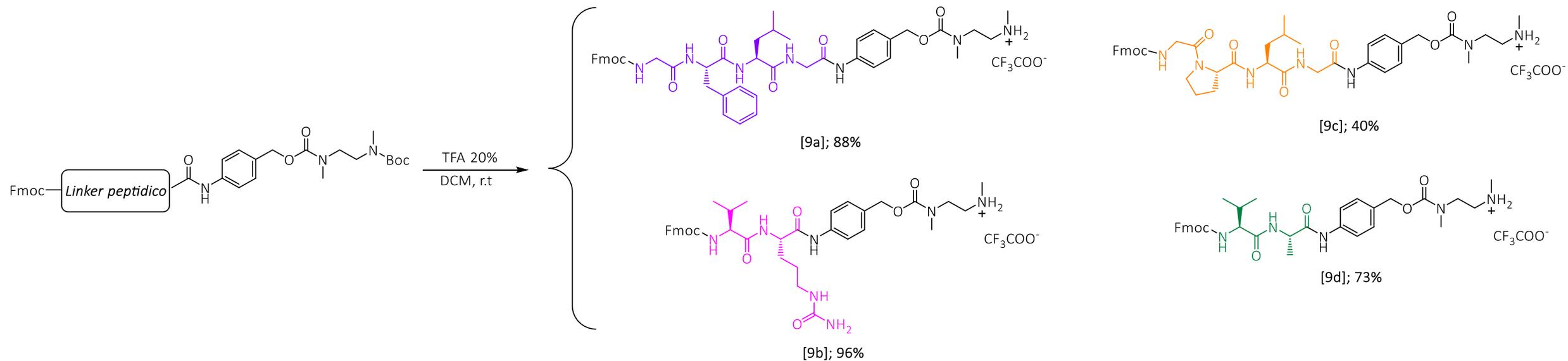
Accoppiamento con PAB-OH



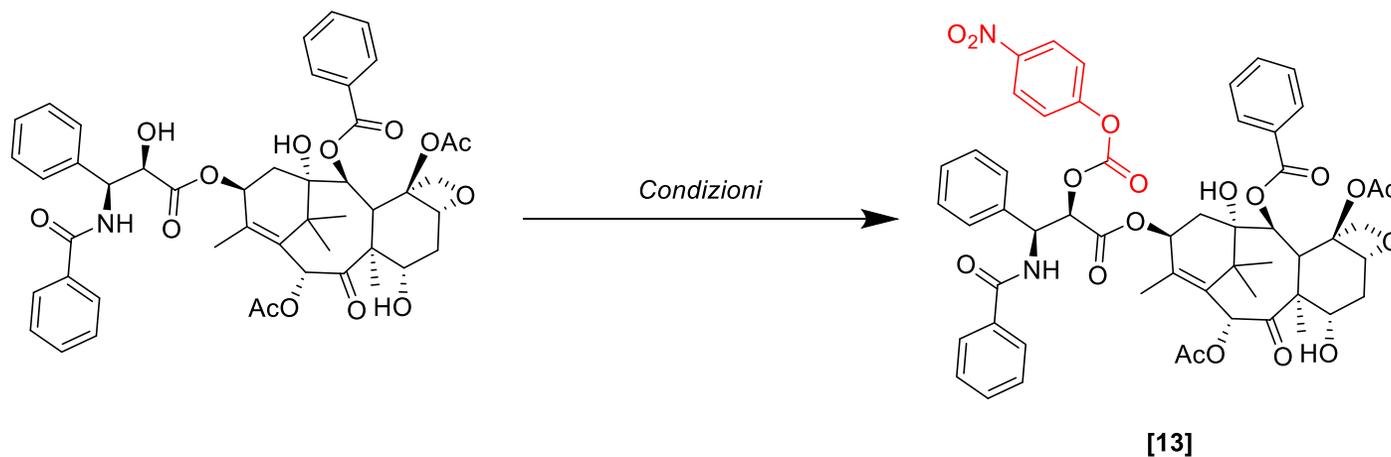
Conversione nei 4-nitro-fenil-carbonati



Deprotezione Boc

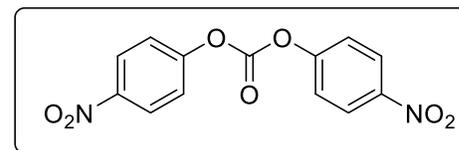


Attivazione di Paclitaxel

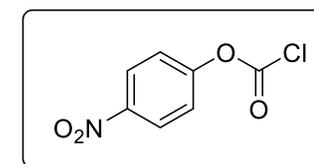


Reazione di attivazione del farmaco anti-tumorale effettuata con:

- Bis-4-nitrofenil-carbonato, resa del 17% con formazione impurezze maggioritarie
- 4-nitrofenil-cloroformiato, resa del 50%



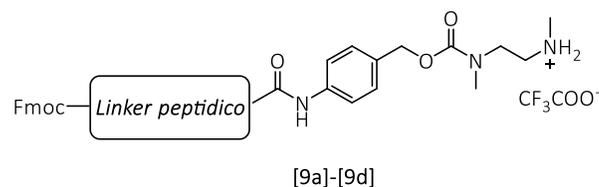
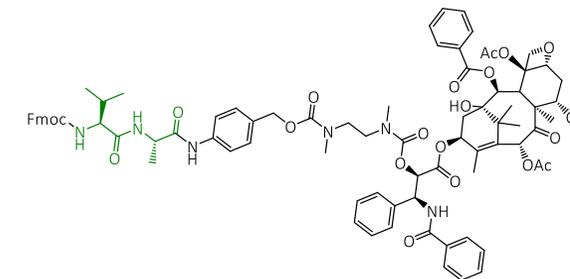
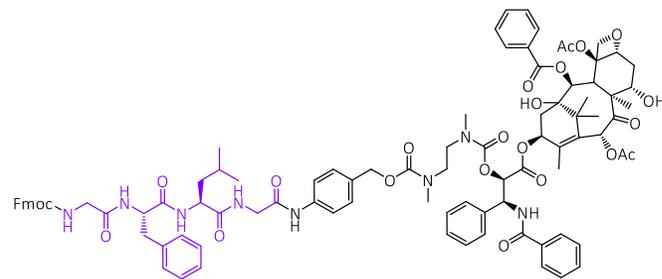
Bis-4-nitrofenil carbonato



4-nitrofenil cloroformiato

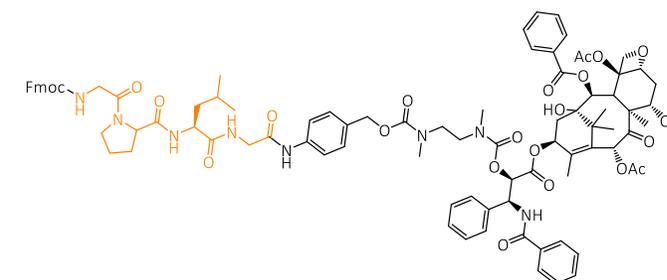
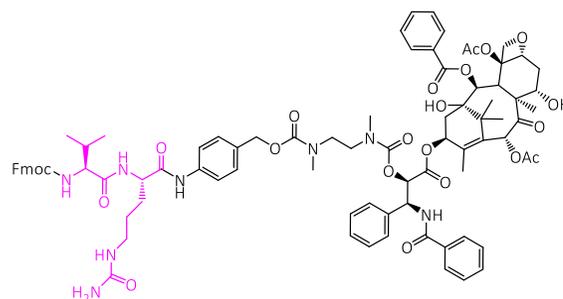
Sensibile ad aria e umidità, usare sempre fresco o ben conservato

Accoppiamento finale



Fmoc-GFLG-PABC-diamine-PTX
[1] - 28%
m/z calcolato: 1713,7287
Sperimentale: 1713,7268
Purezza: 95.01 % (HPLC)

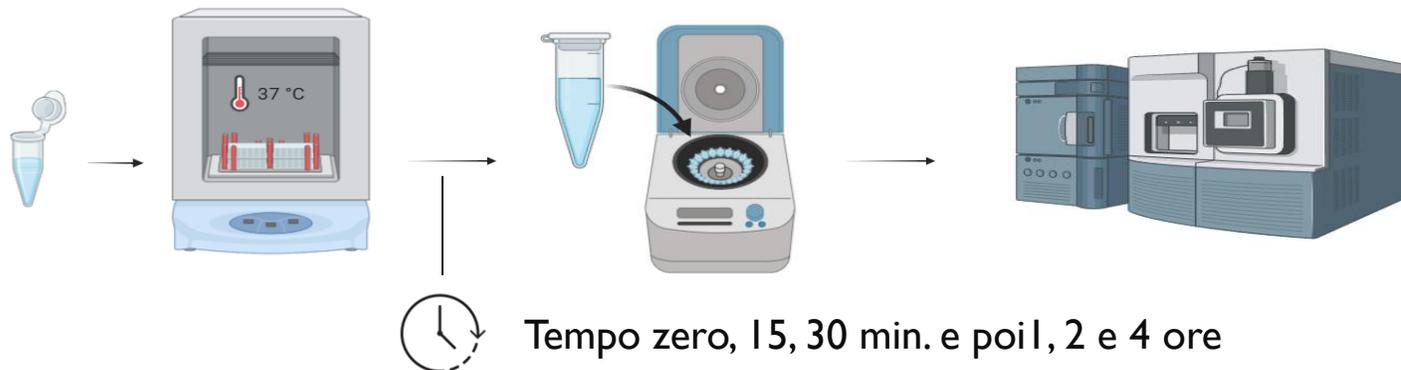
Fmoc-VA-PABC-diamine-PTX
[2] - 73%
m/z calcolato: 1509,63883
Sperimentale: 1509,6388
Purezza: 96.46 % (HPLC)



Fmoc-VCit-PABC-diamine-PTX
[3] - 20%
m/z calcolato: 1595,68684
Sperimentale: 1595,6849
Purezza: 95.90 % (HPLC)

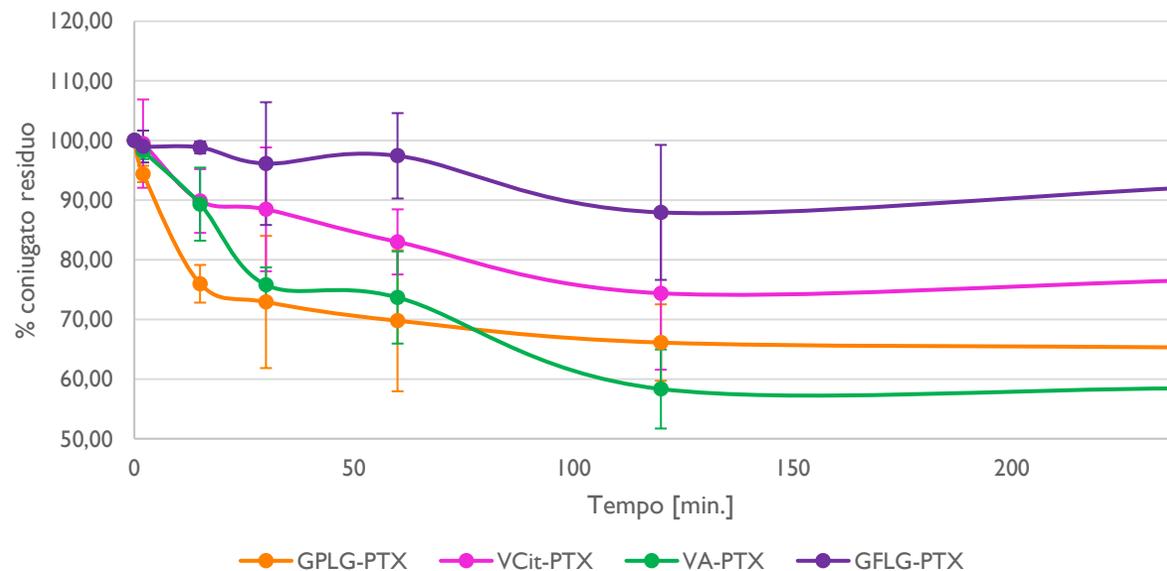
Fmoc-GPLG-PABC-diamine-PTX
[4] - 60%
m/z calcolato: 1663,71306
Sperimentale: 1663,7131
Purezza: 95.64 % (HPLC)

Test *in vitro* con Catepsina B

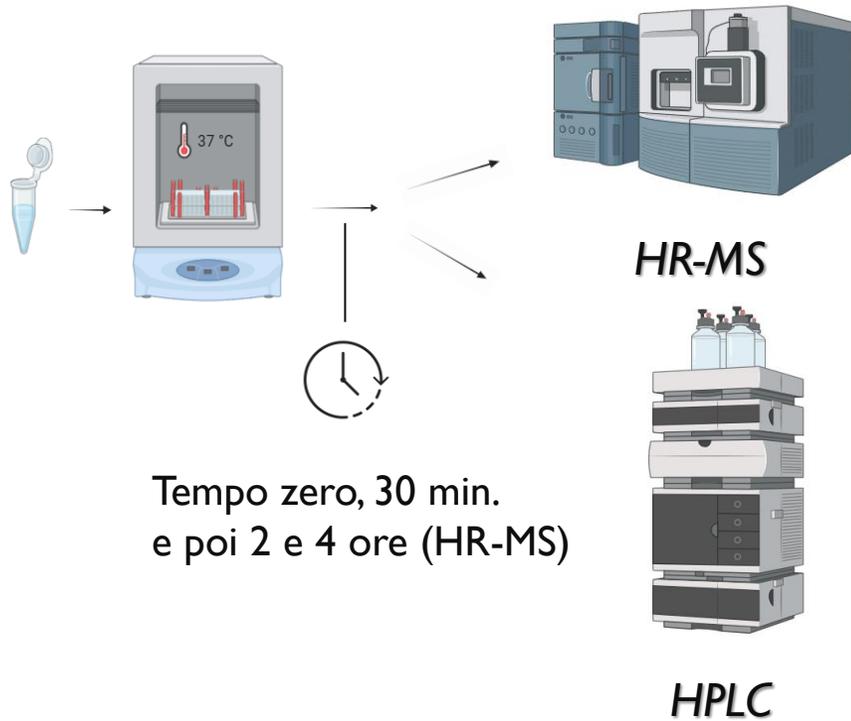


- **Fmoc-VA-PTX** migliore con un valore plateau del 60%
- **Fmoc-GPLG-PTX** più veloce ad essere tagliato nella 1° ora

Cathepsin B cleavage 0-4h



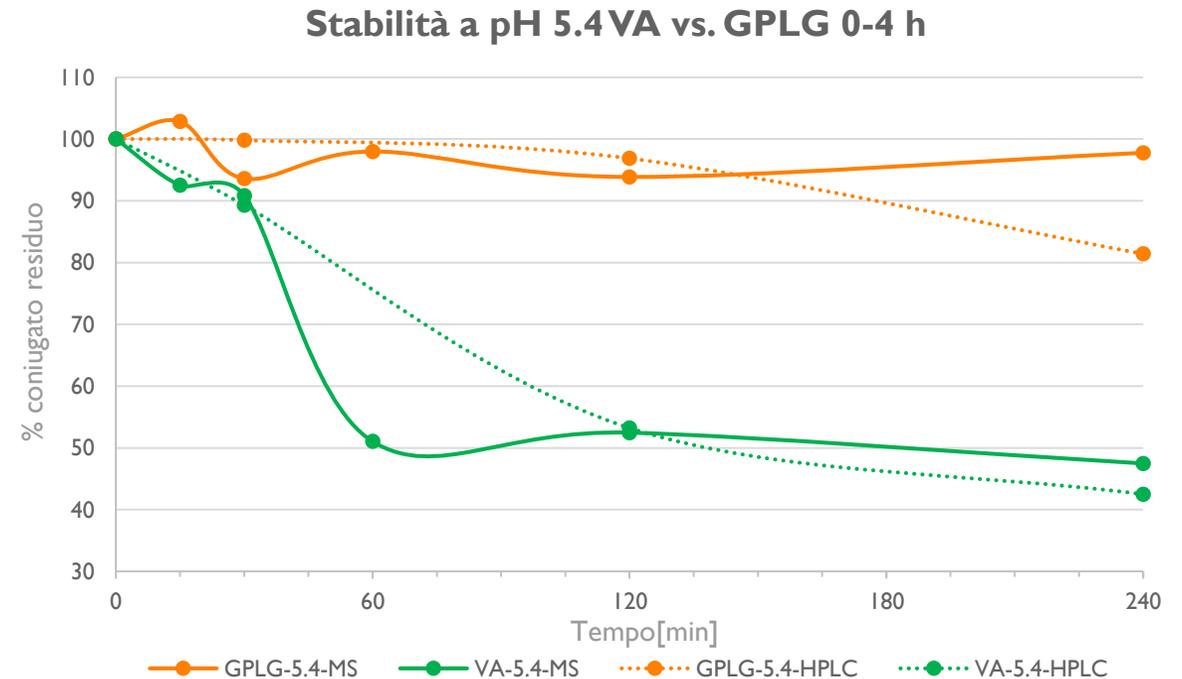
Test di stabilità al pH



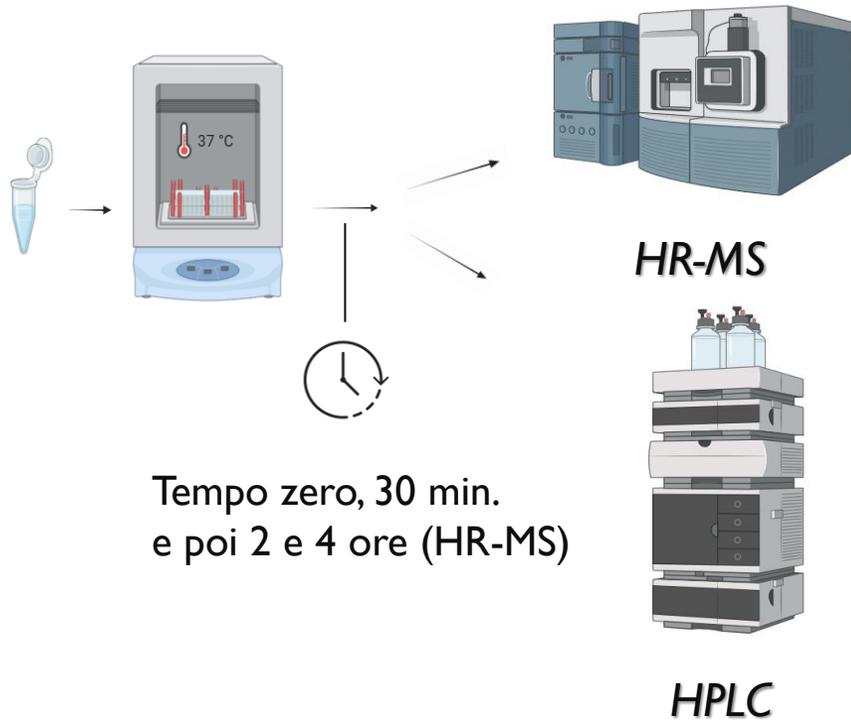
pH 5.4 simula l'ambiente delle cellule tumorali:

- ✓ Fmoc-**GPLG**-PTX è stabile nelle prime 4 ore.
- ✓ Fmoc-**VA**-PTX è parzialmente degradato dopo 1h.

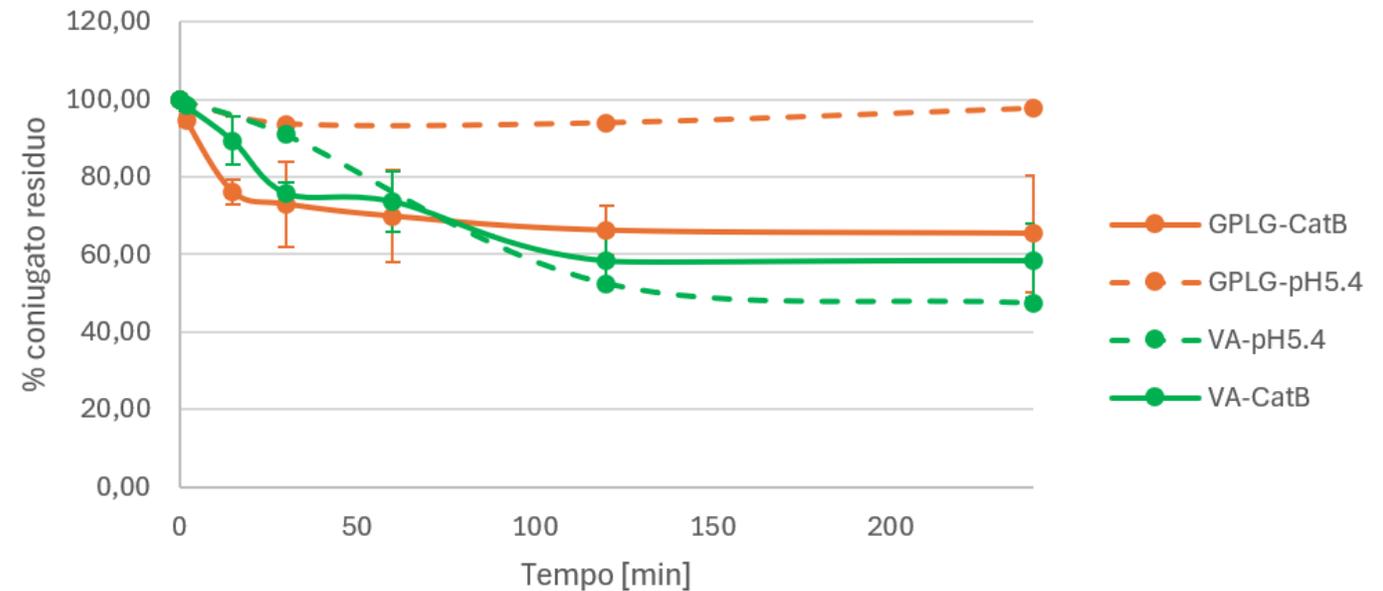
Publicazione scientifica in preparazione



Test di stabilità al pH



Confronto taglio proteolitico - stabilità al pH



pH 5.4 simula l'ambiente delle cellule tumorali:

- ✓ Fmoc-**GPLG**-PTX è stabile nelle prime 4 ore.
- ✓ Fmoc-**VA**-PTX è parzialmente degradato dopo 1h.

Conclusioni e prospettive future



Conclusioni:

- Sintesi dei quattro derivati di Paclitaxel in quantità e purezza sufficienti (>95%) per effettuare test *in vitro*.
- Ottimizzazione di alcune reazioni chiave.
- Sviluppo di un protocollo in grado di dimostrare che Catepsina B riconosce e taglia in maniera efficace la sequenza tetrapeptidica GPLG.
- Studi di stabilità al pH.

Studi in corso:

- Studio della stabilità in plasma umano e di ratto della sequenza GPLG per confronto con le altre sequenze già note in letteratura GFLG, VCit e VA.

Ringraziamenti

- Dott.ssa Silvia Gazzola
- Prof. Umberto Piarulli
- Dott. Marco Zambra
- Gruppo di ricerca Synthmedchemgroup
- Università degli Studi dell'Insubria e DiSAT

**Grazie a tutti
per l'attenzione !!**

Ringraziamenti

Ordine dei Chimici e Fisici della Lombardia e al
Presidente Paolo Giovanni Viola

