

---

# **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

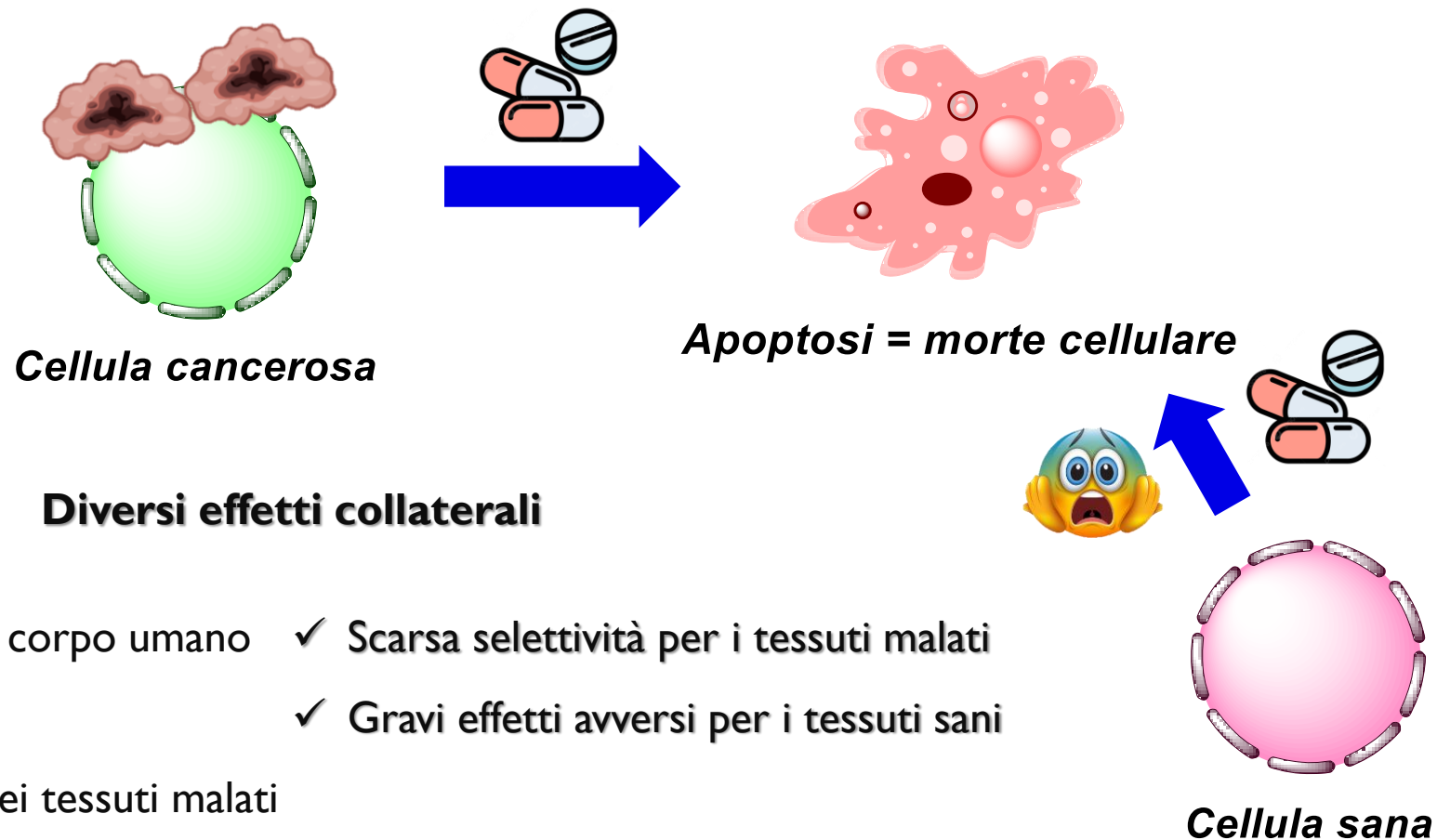
Milano, 29-11-2024

Tesi di Laurea Magistrale, Samuele Bongioiolo

Relatrice: Dott.ssa Silvia Gazzola

# Chemioterapia

Meccanismo d'azione:

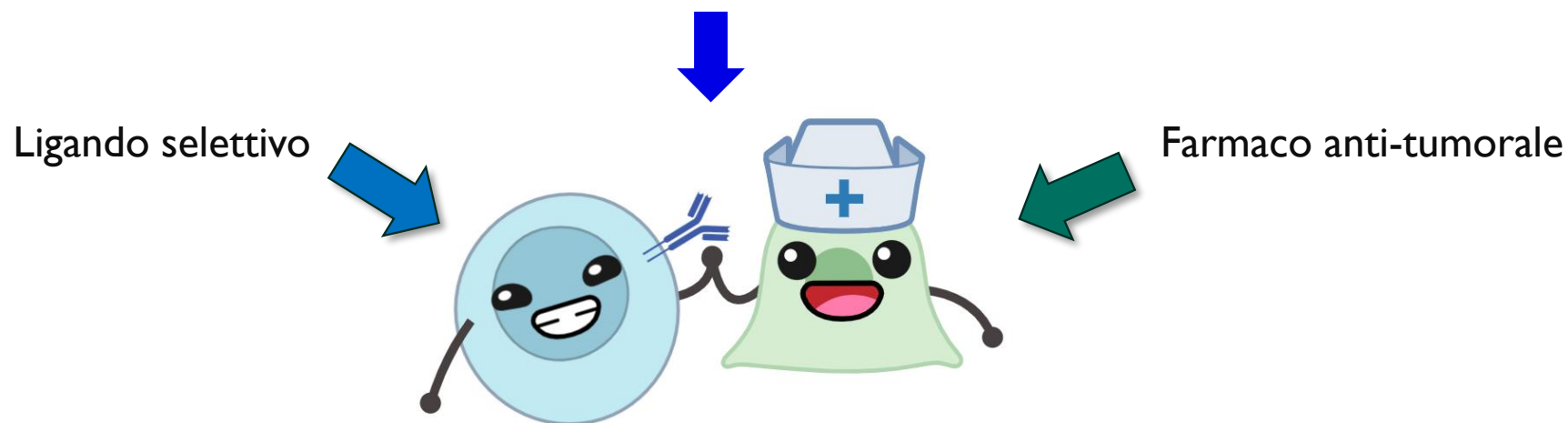


- ✓ Rapida eliminazione dal corpo umano
- ✓ Scarsa bio-disponibilità
- ✓ Scarsa accumulazione nei tessuti malati
- ✓ Resistenza ai farmaci
- ✓ Scarsa selettività per i tessuti malati
- ✓ Gravi effetti avversi per i tessuti sani

# La domanda da un milione di dollari

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

## Terapia mirata

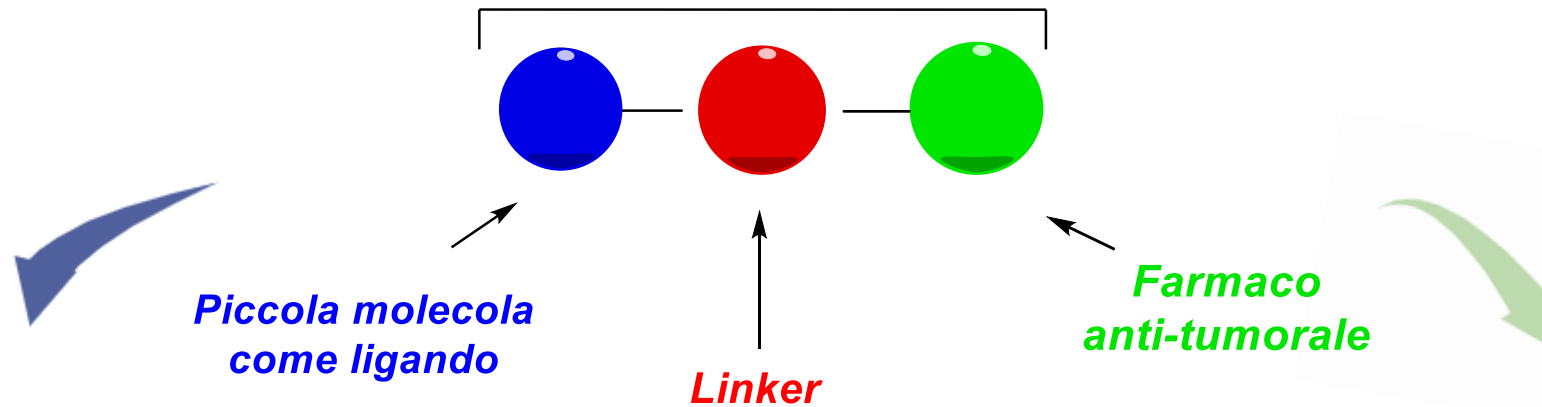


Con lo scopo di:

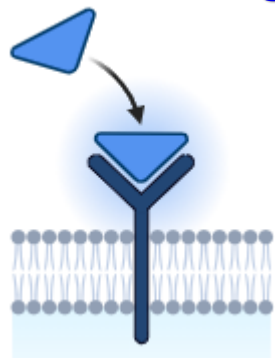
- Distribuire selettivamente diversi farmaci ai loro target farmacologici
- Ridurre gli effetti collaterali indesiderati legati ai classici farmaci anti-tumorali

# Coniugati farmaco ligando (SMDCs) – una possibile soluzione

## Coniugati farmaco ligando



### Piccola molecola come ligando



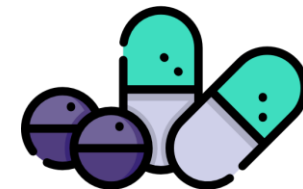
Recettori sovra-  
espressi  
nelle cellule  
danneggiate

### Linker chimico



Lega il ligando al farmaco  
antitumorale

### Farmaco – agente antitumorale



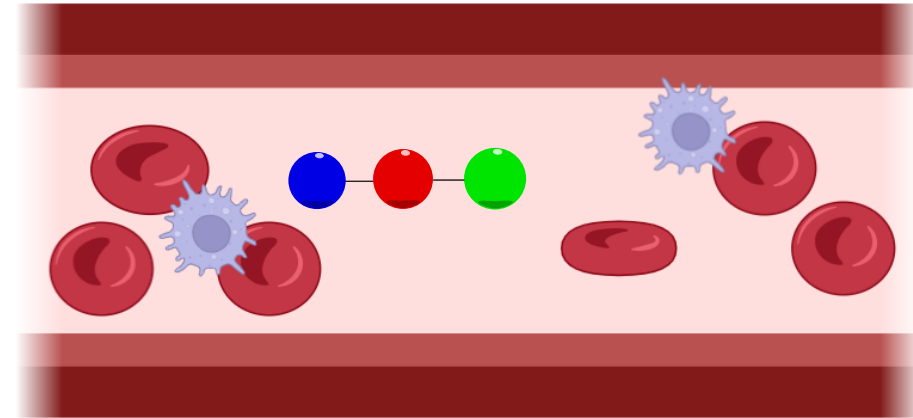
Farmaci citotossici in grado di  
uccidere le cellule tumorali

# 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

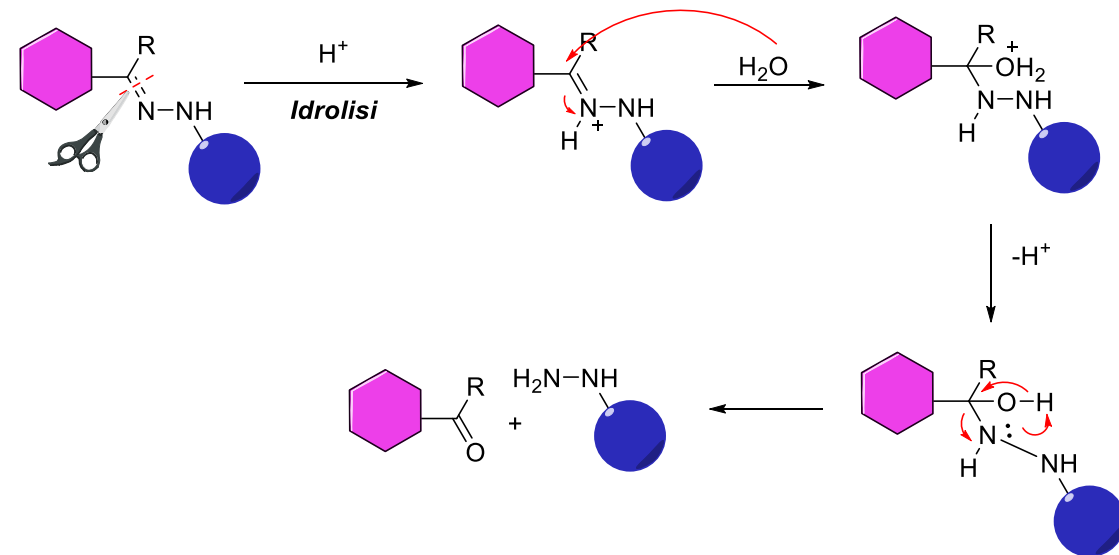
## Linker chimico



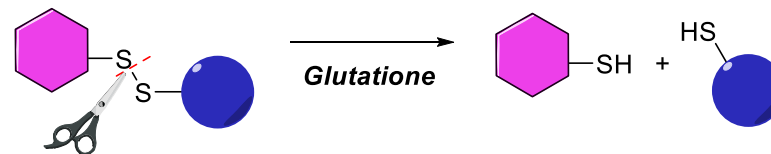
Lega il ligando al farmaco  
anti-tumorale

## Linker scindibili chimicamente

- Sensibili al pH



- Sensibili a condizioni red-ox



# Coniugati farmaco ligando (SMDCs) – una possibile soluzione

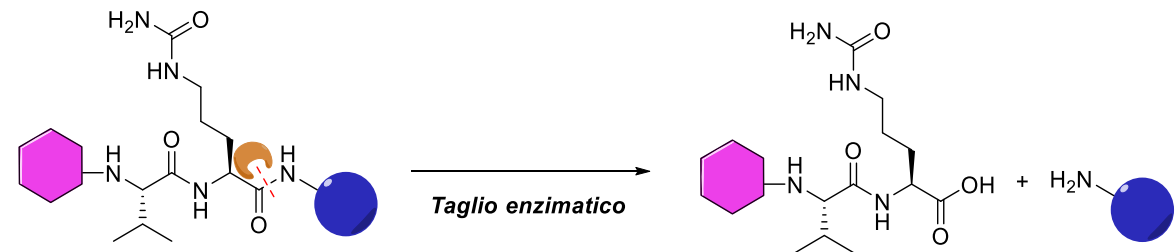
## Linker chimico



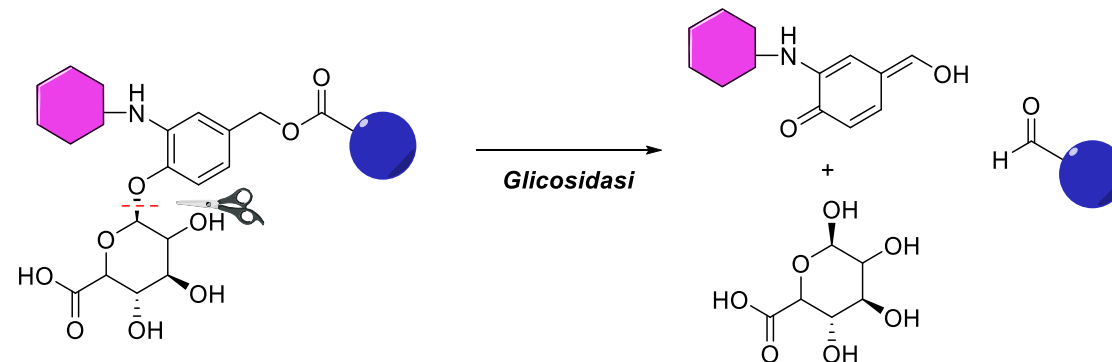
Lega il ligando al farmaco  
anti-tumorale

## Linker scindibili enzimaticamente

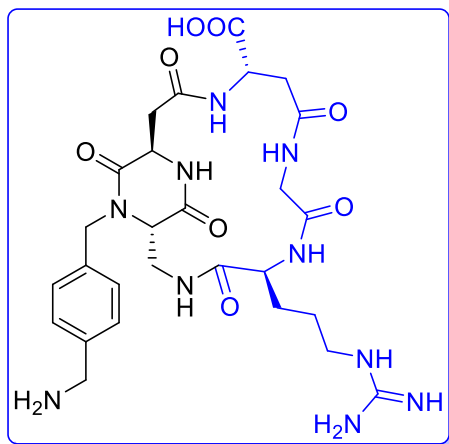
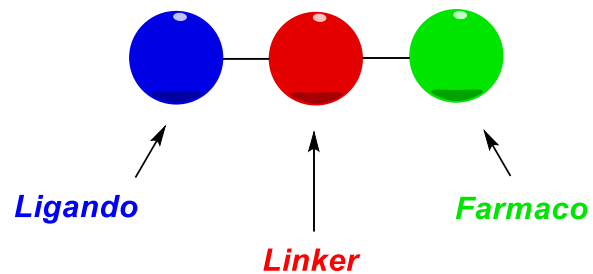
- Sensibili a proteasi



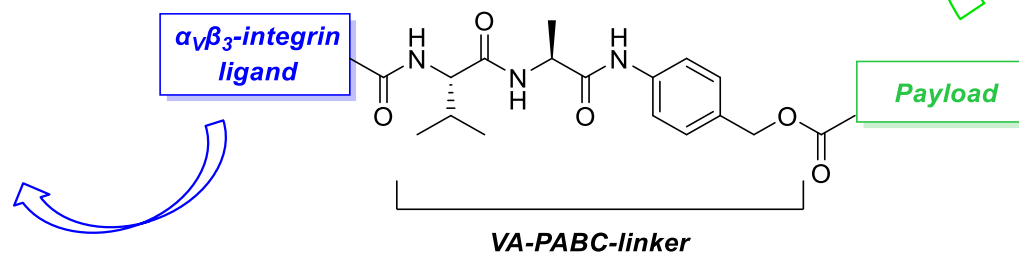
- Sensibili a glicosidasi



# Stato dell'arte del gruppo



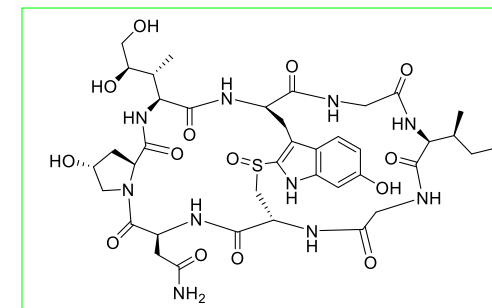
c[DKP- $f_3$ -isoDGR]



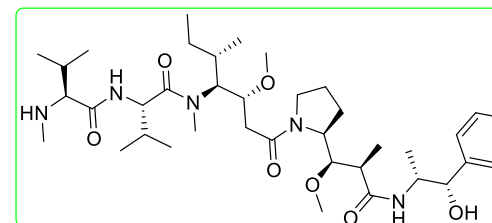
$\alpha_v\beta_3$ -integrin  
ligand

Payload

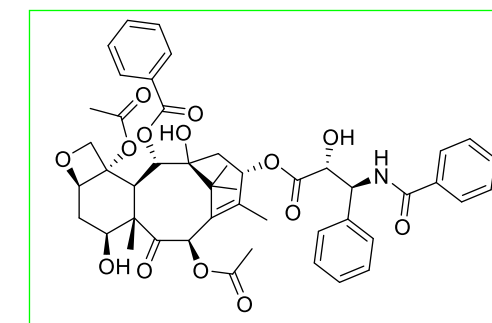
VA-PABC-linker



$\alpha$ -amanitin



MMAE



Paclitaxel

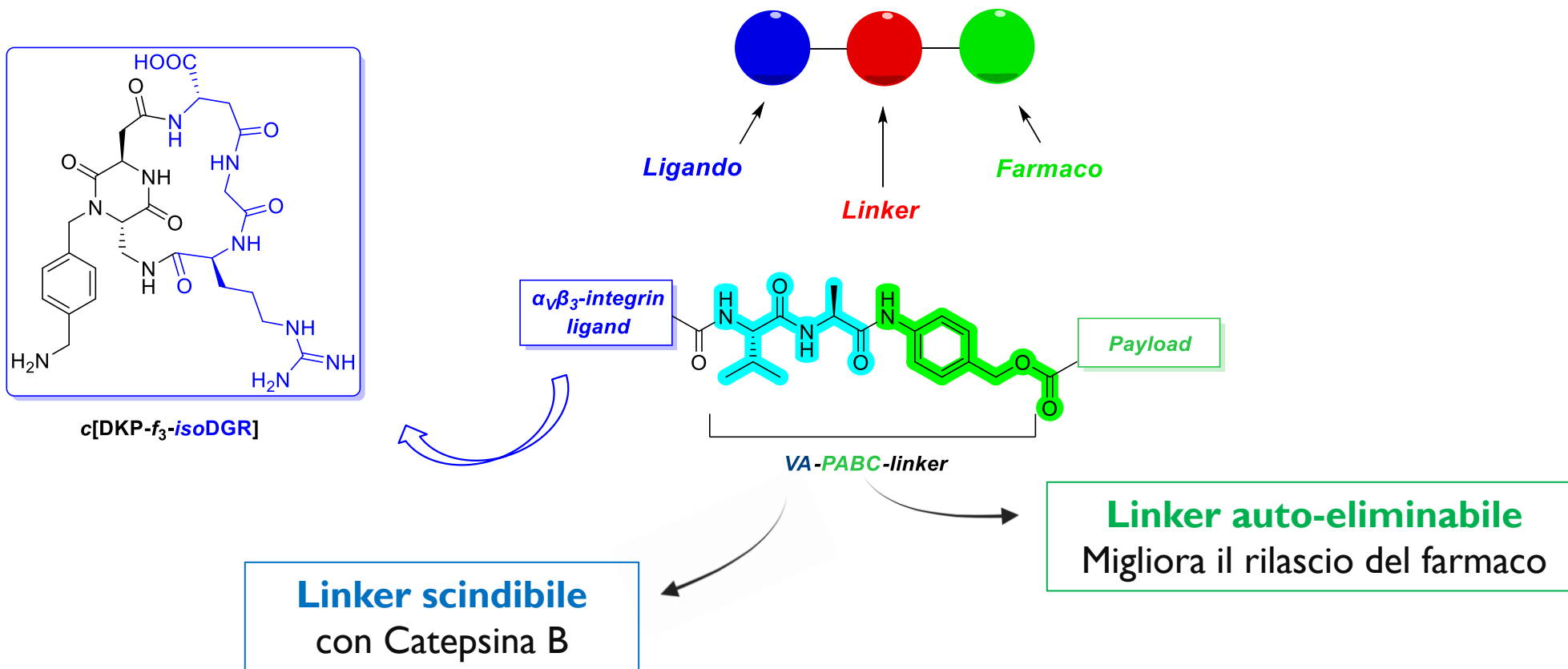
Raposo, A et al. *ChemMedChem* **2019**, 14 (9), 938–942.

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...

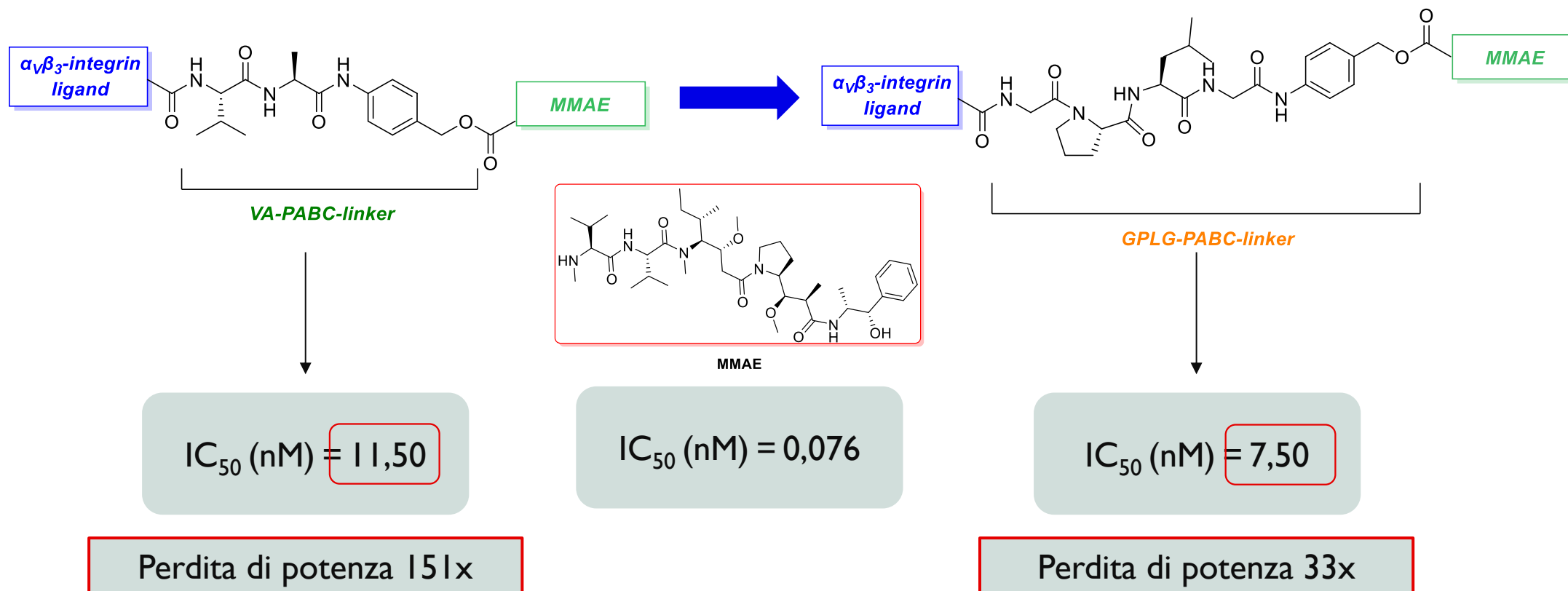
Raposo, A et al. *ChemMedChem* **2019**, 14 (9), 938–942.

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

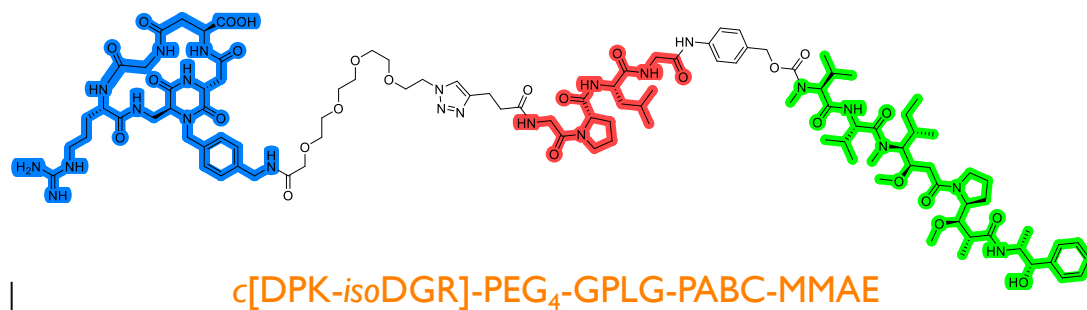
Bodero, L et al. *European journal of organic chemistry* **2021**, 2021 (17), 2383–2387

# Stato dell'arte del gruppo

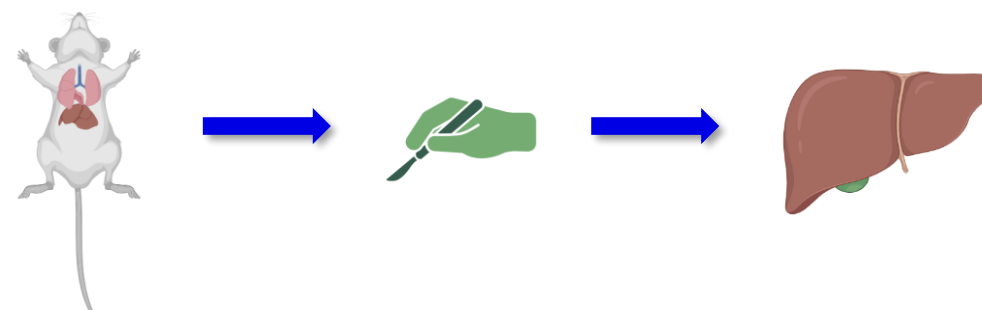
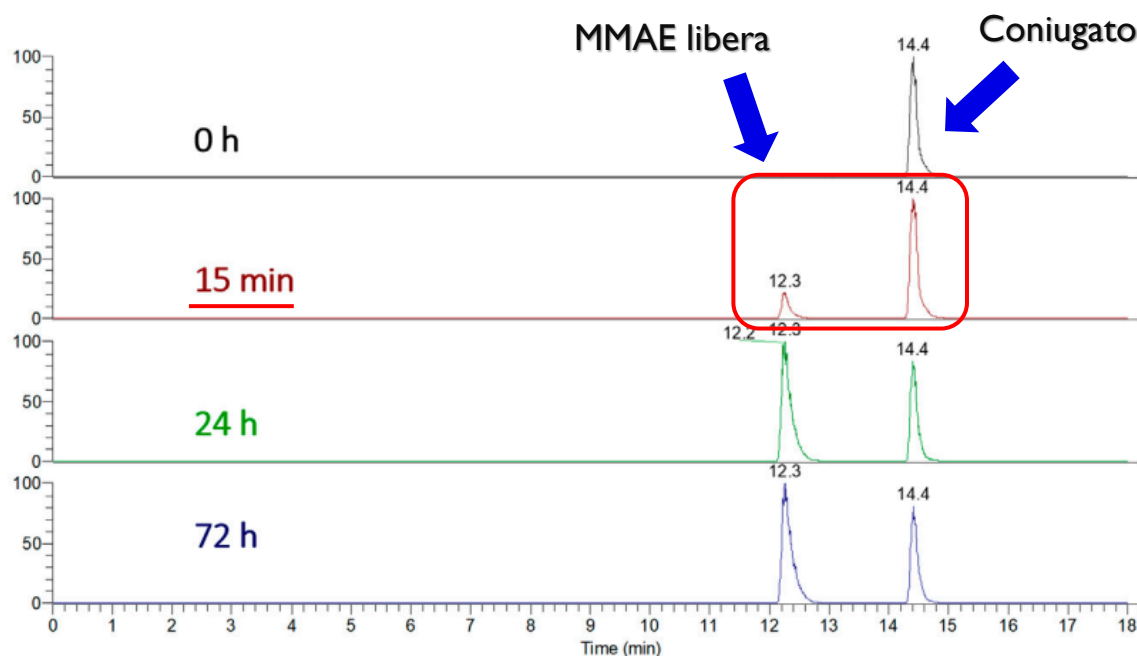
...ma scarsa potenza rispetto al farmaco libero



# 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.



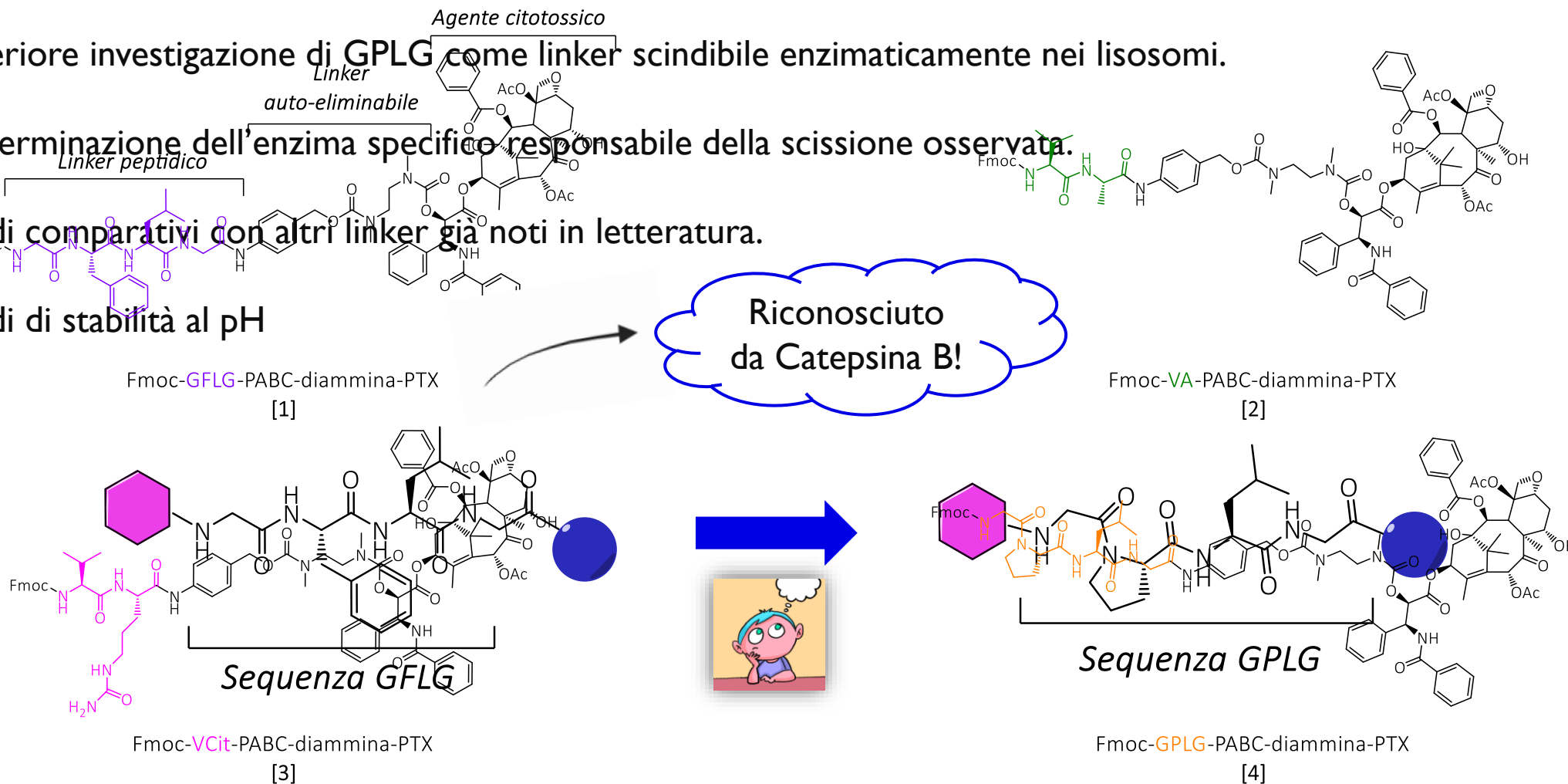
# Scopo del progetto

✓ Ulteriore investigazione di **GPLG** <sup>Agente citotossico</sup> come linker scindibile enzimaticamente nei lisosomi.

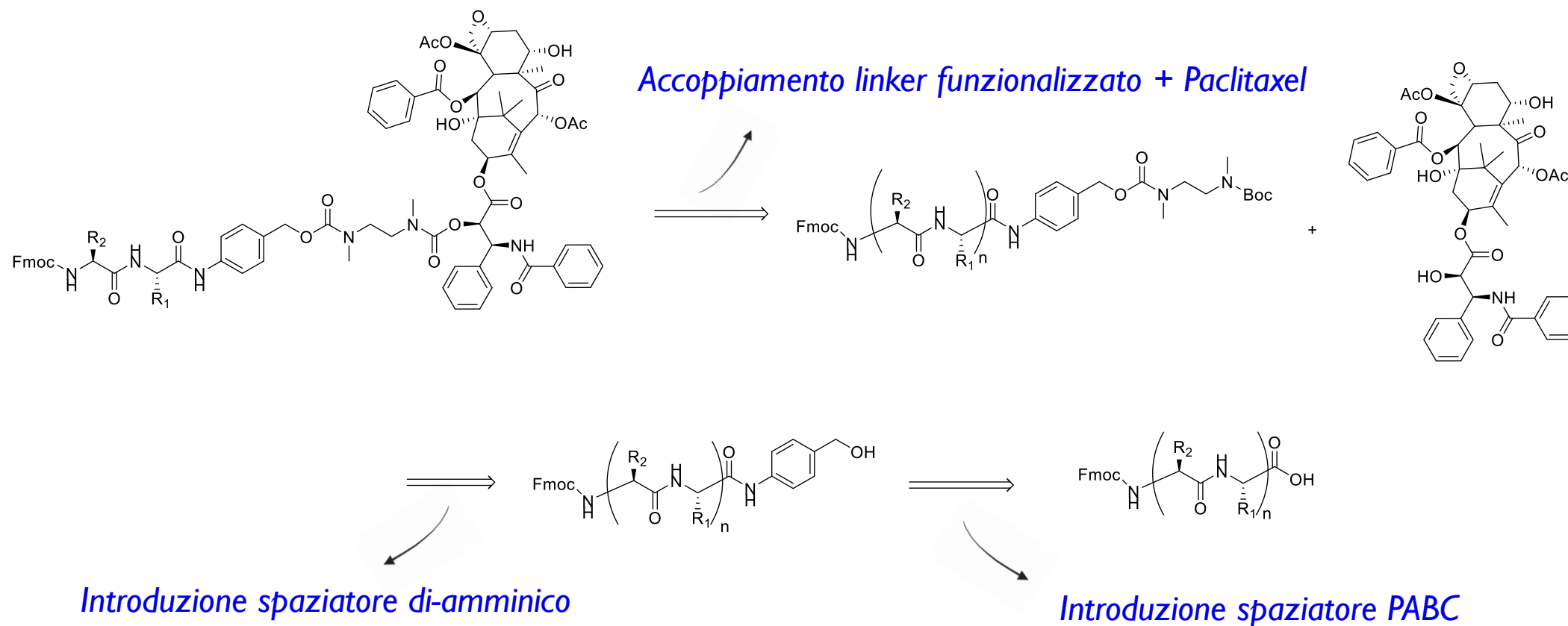
✓ Determinazione dell'enzima specifico responsabile della scissione osservata.

✓ Studi comparativi con altri linker già noti in letteratura.

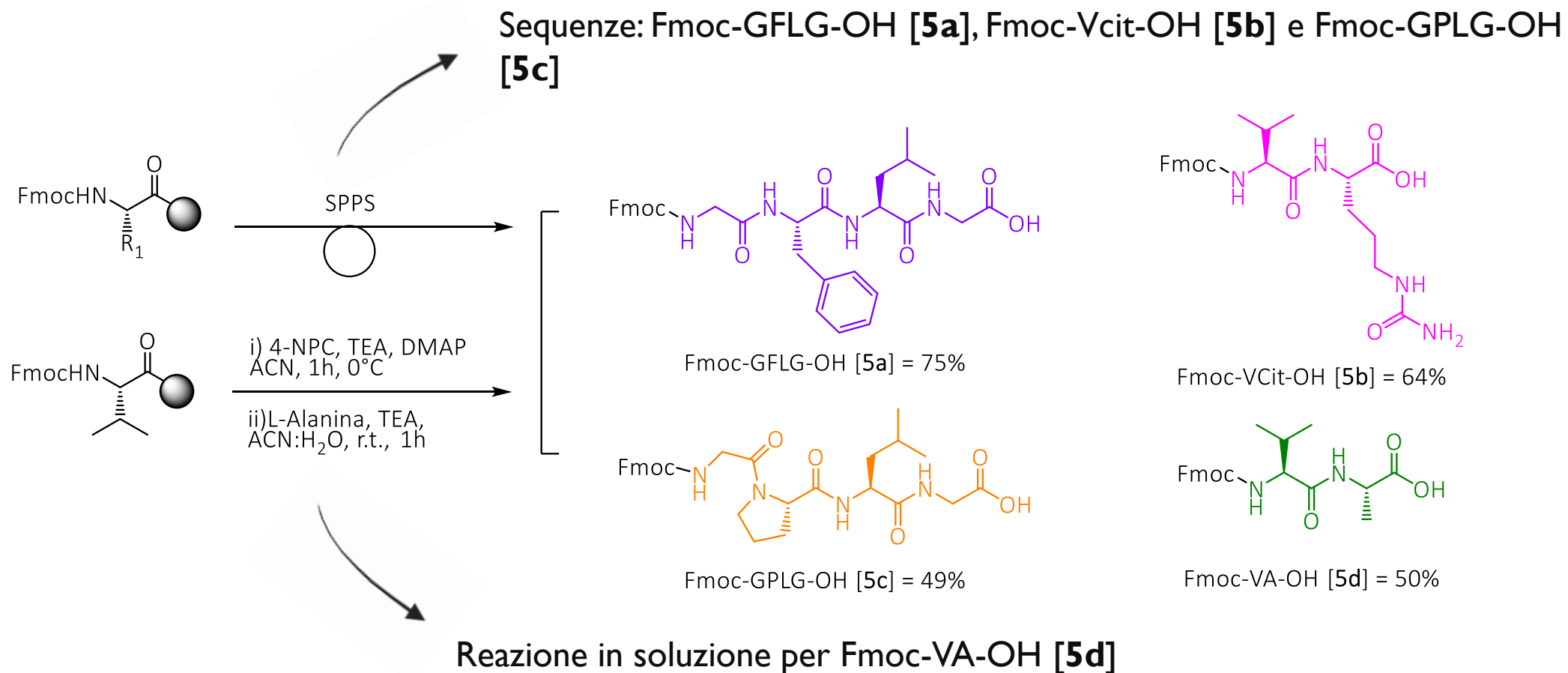
✓ Studi di stabilità al pH



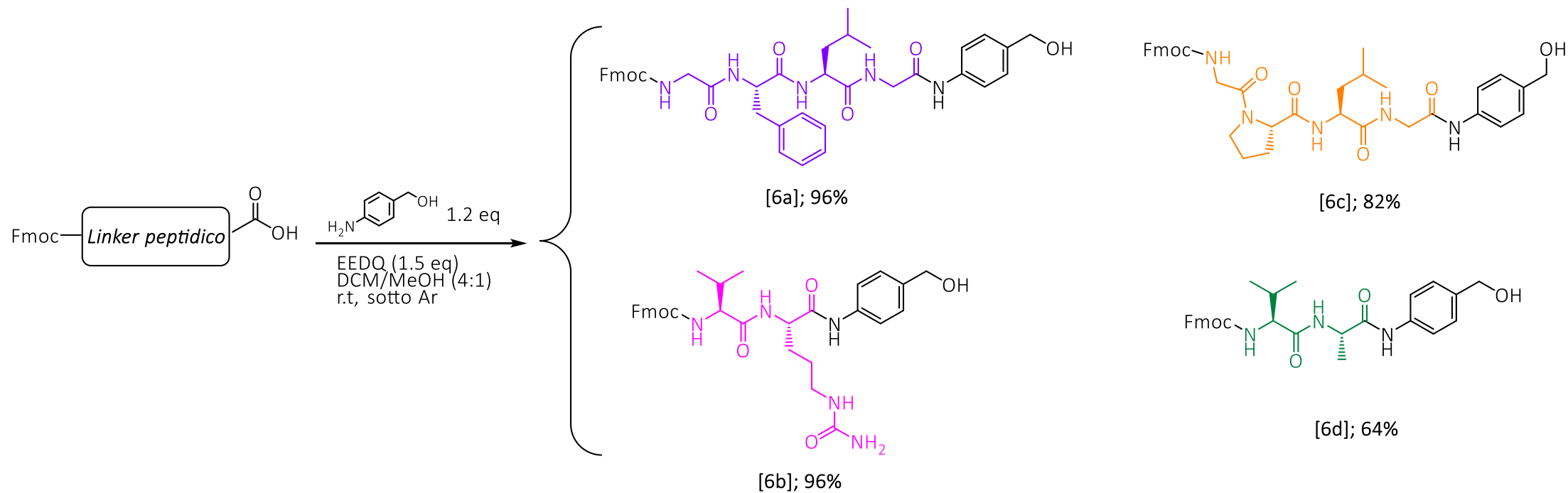
# Approccio sintetico generale per la sintesi dei coniugati



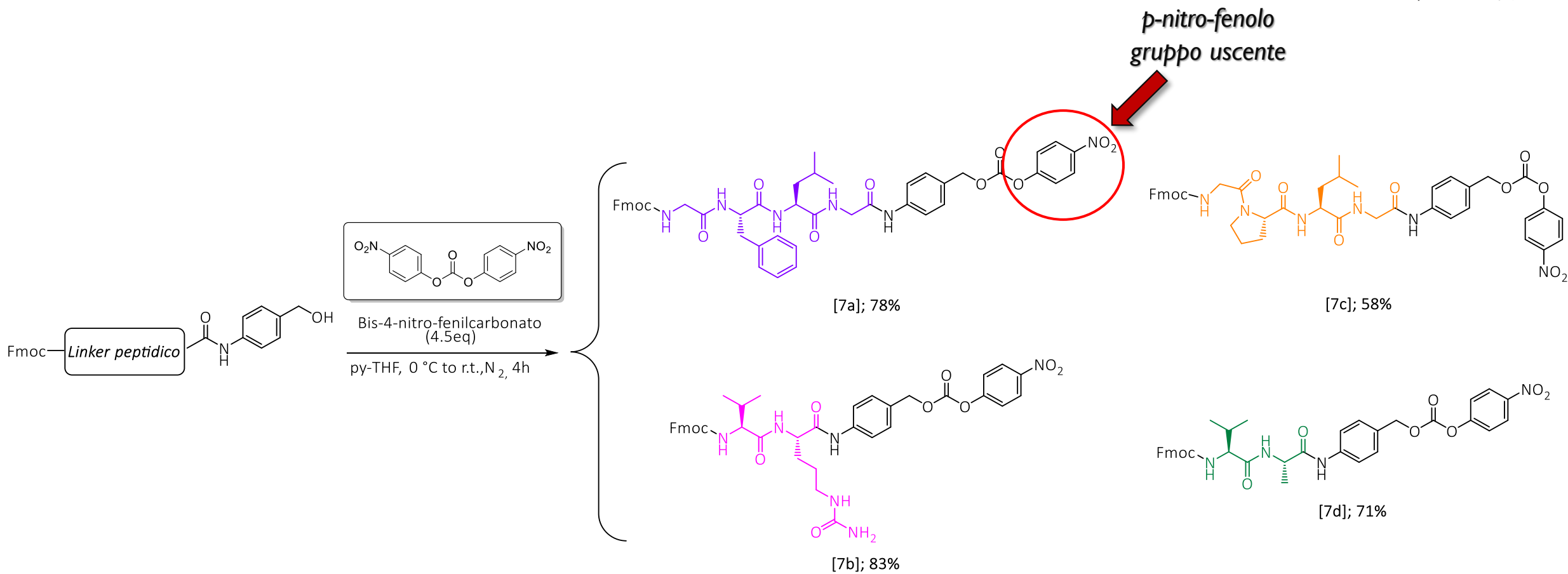
# Sintesi delle sequenze peptidiche



# Accoppiamento con PAB-OH



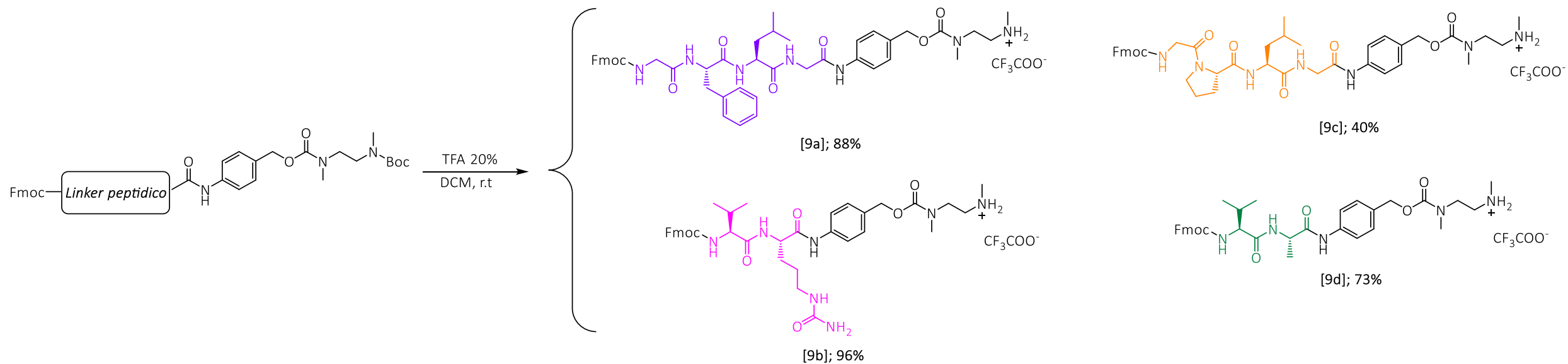
# Conversione nei 4-nitro-fenil-carbonati



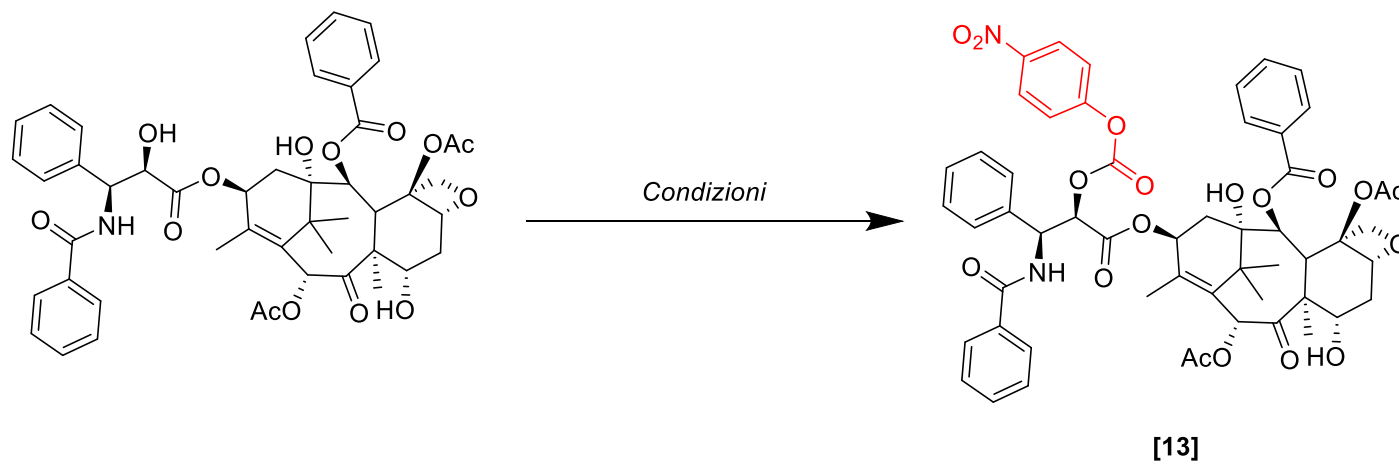




# Deprotezione Boc

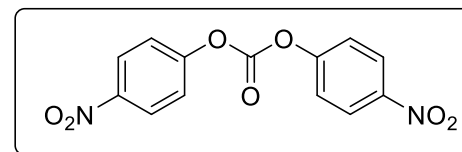


# Attivazione di Paclitaxel

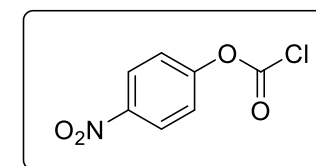


Reazione di attivazione del farmaco anti-tumorale effettuata con:

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



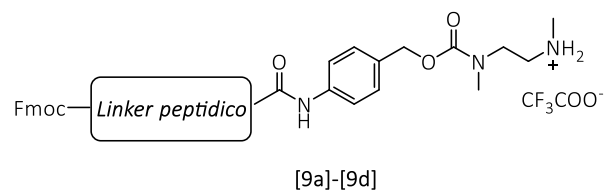
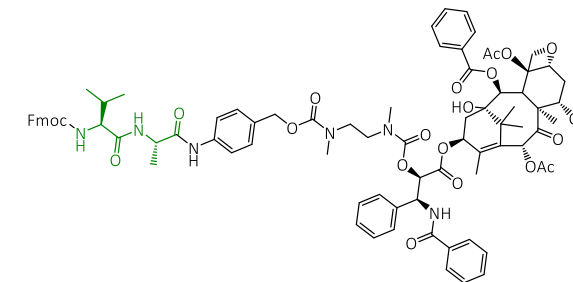
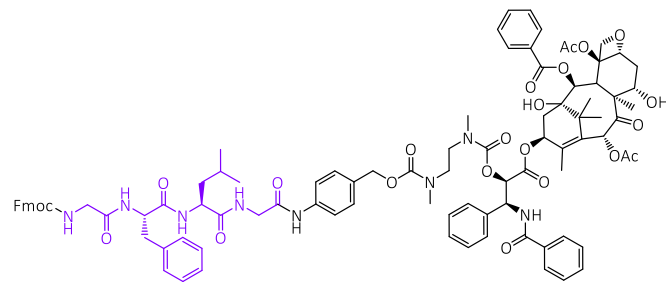
*Bis-4-nitrofenil carbonato*



*4-nitrofenil cloroformiato*

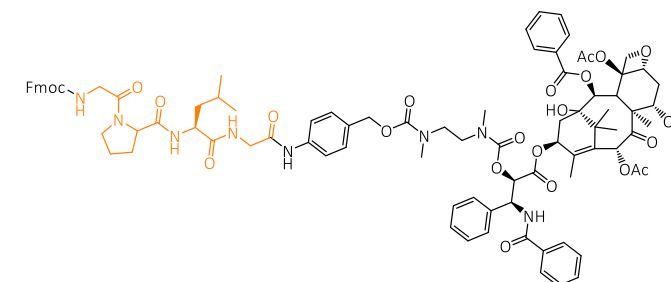
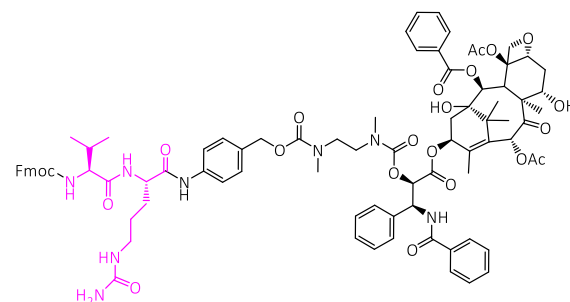
Sensibile ad aria e umidità, usare sempre fresco o ben conservato

# Accoppiamento finale



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

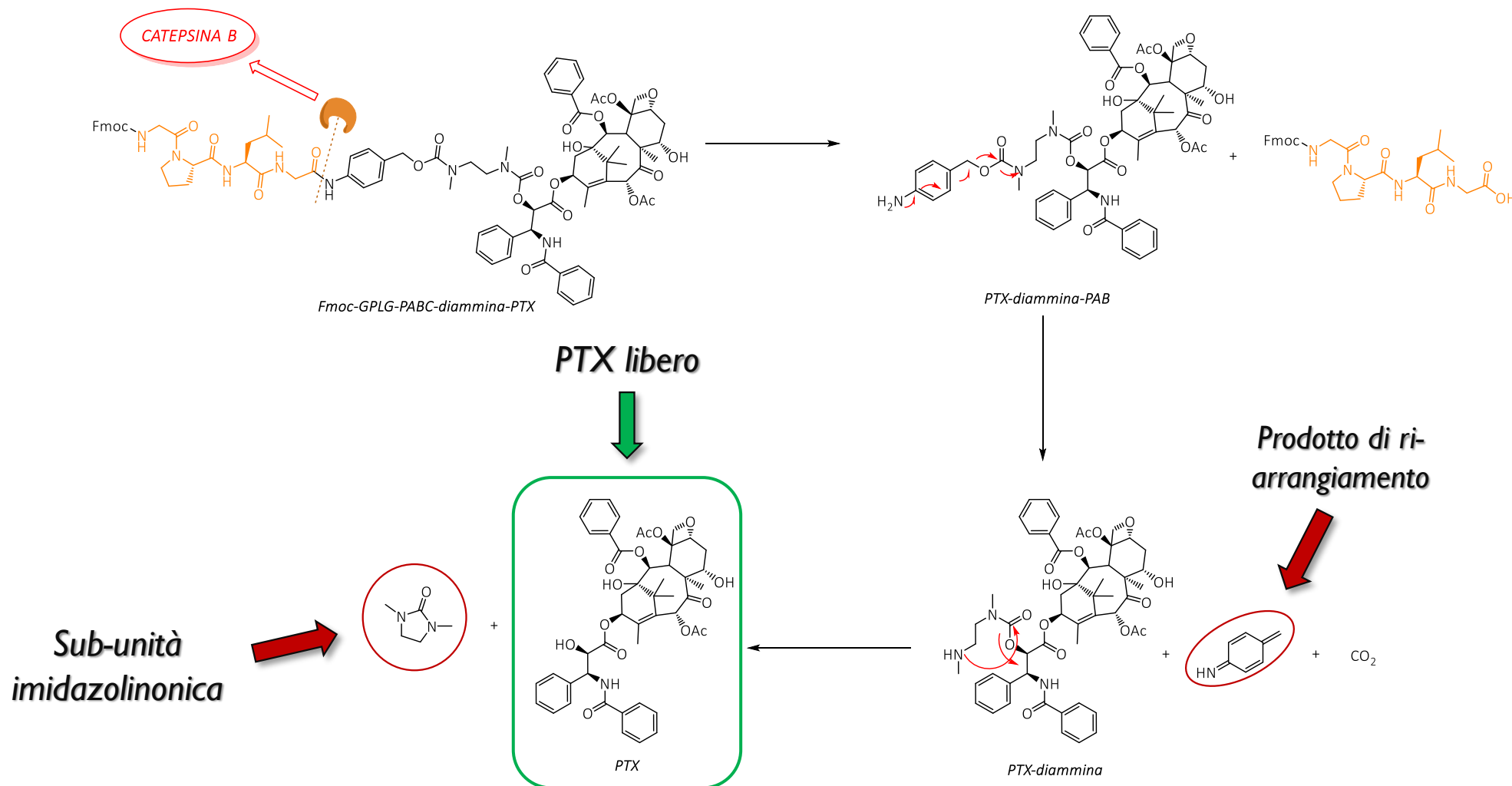
Fmoc-VA-PABC-diamine-PTX  
[2] - 73%  
 $m/z$  calcolato: 1509,63883  
Sperimentale: 1509,6388  
Purezza: 96.46 % (HPLC)



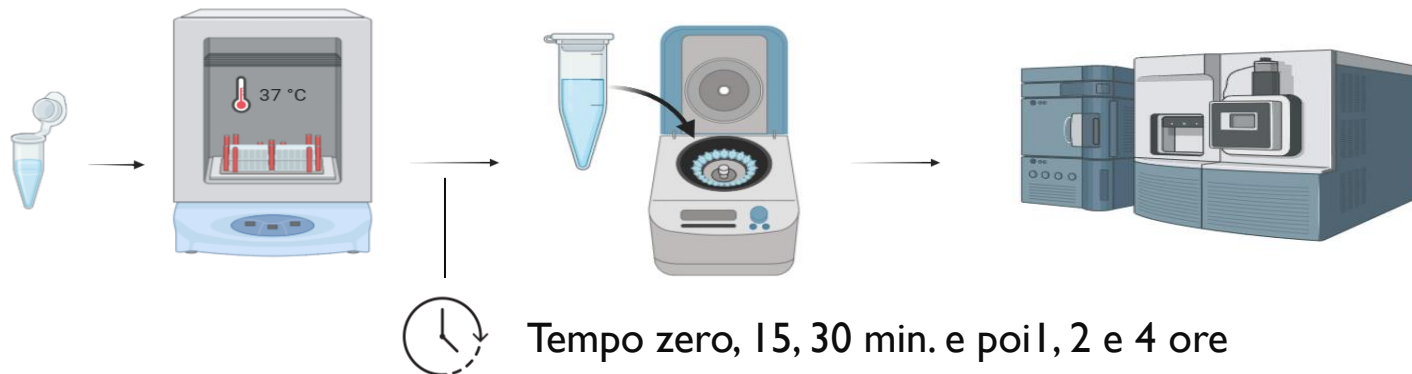
Fmoc-VCit-PABC-diamine-PTX  
[3] - 20%  
 $m/z$  calcolato: 1595,68684  
Sperimentale: 1595,6849  
Purezza: 95.90 % (HPLC)

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

# Taglio proteolitico di Catepsina B

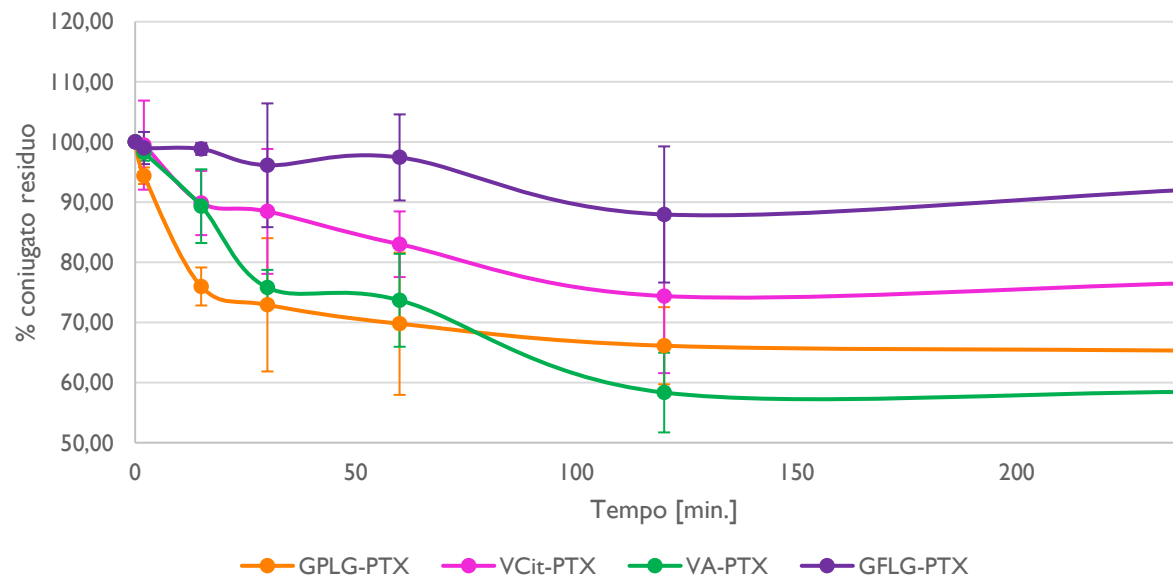


# Test *in vitro* con Catepsina B

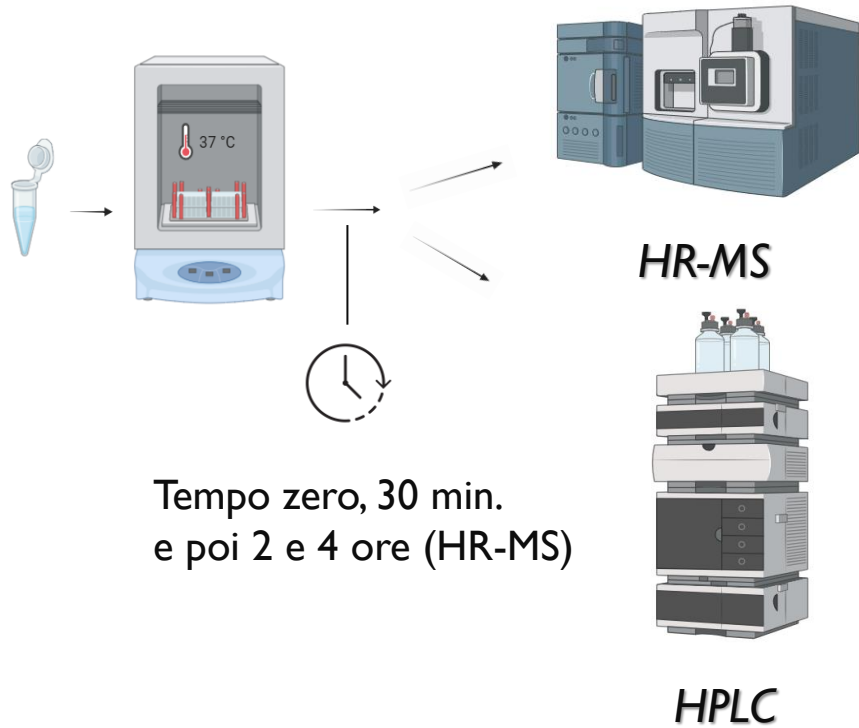


- **Fmoc-VA-PTX** migliore con un valore plateau del 60%
- **Fmoc-GPLG-PTX** più veloce ad essere tagliato nella 1<sup>o</sup> ora

Cathepsin B cleavage 0-4h



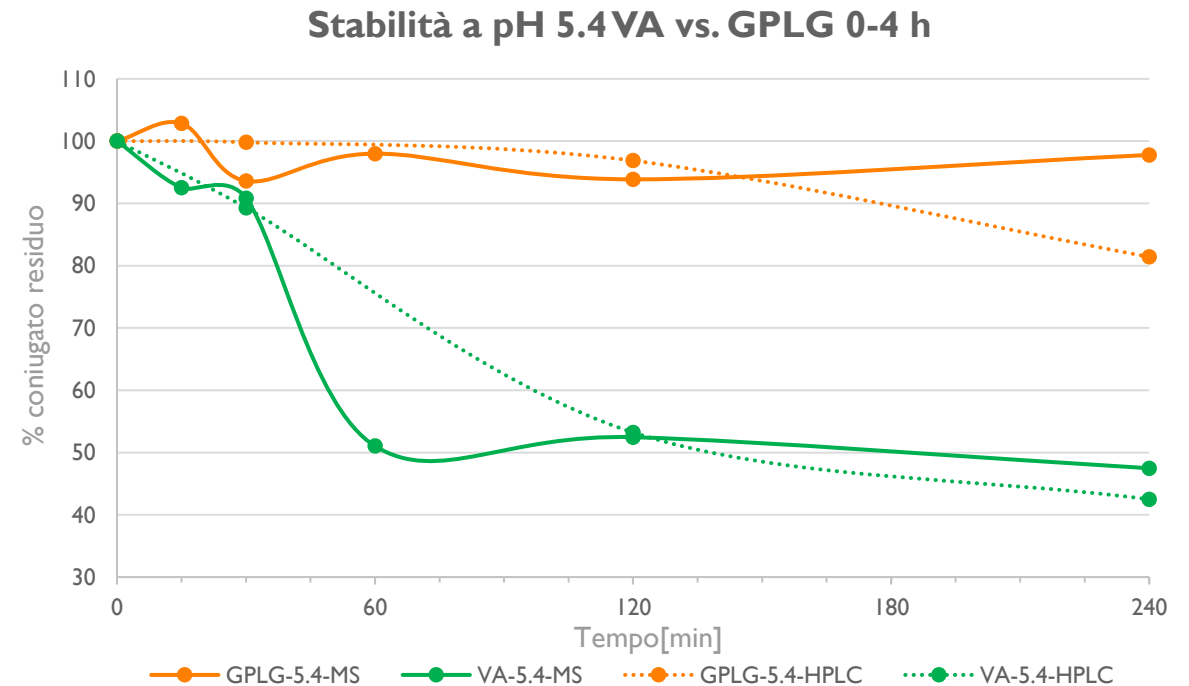
# Test di stabilità al pH



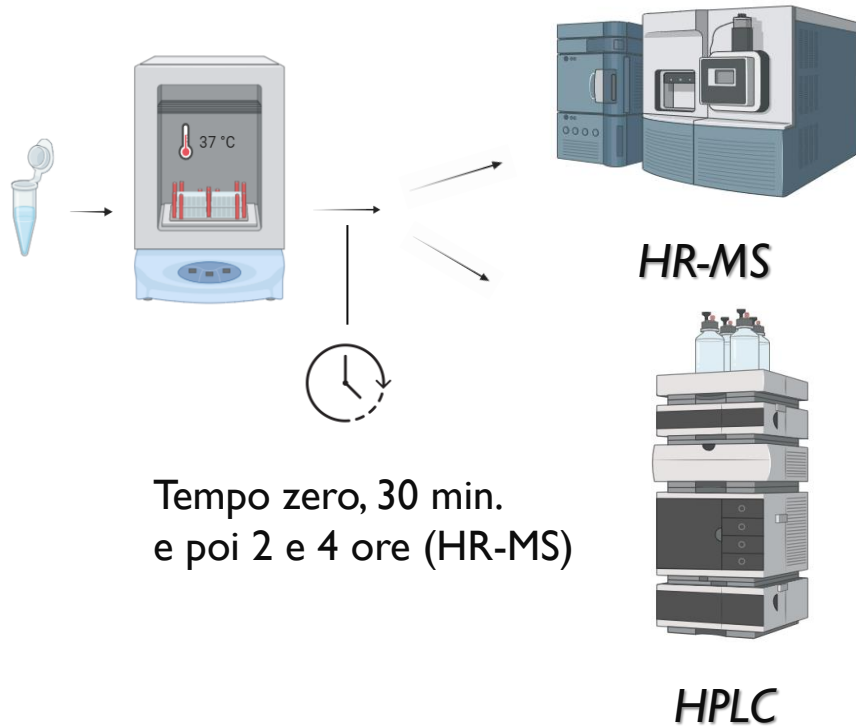
pH 5.4 simula l'ambiente delle cellule tumorali:

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

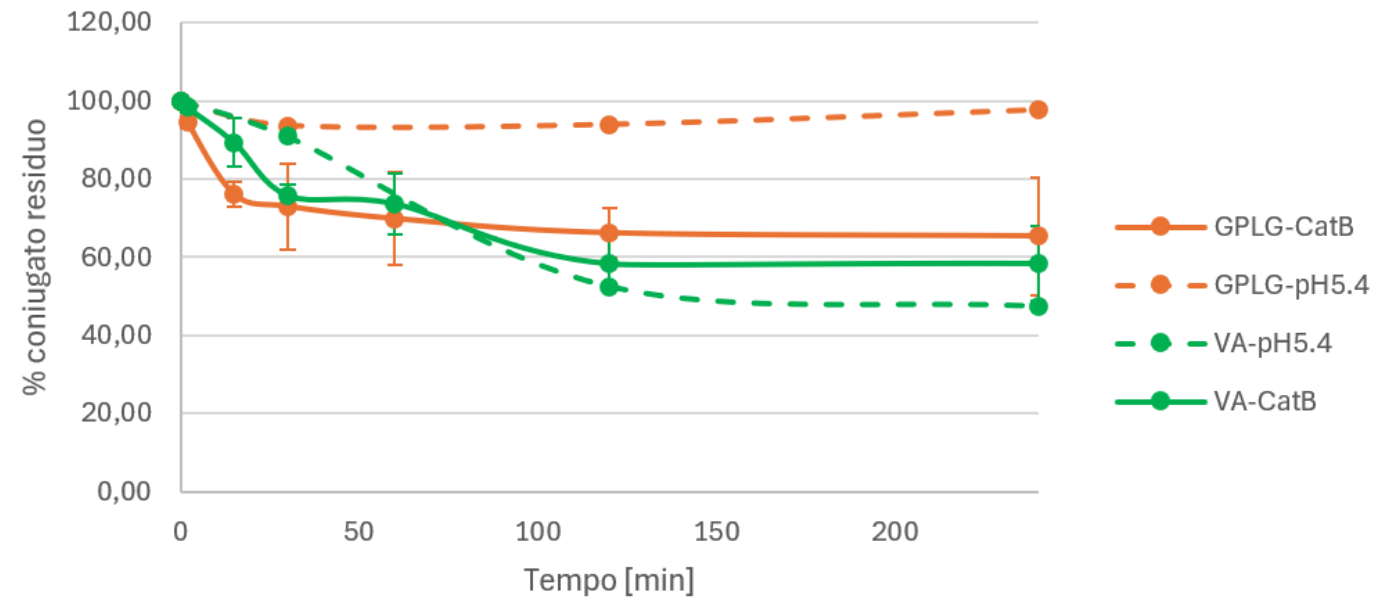
**Publicazione scientifica in preparazione**



# 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

