



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE**

CORSO DI LAUREA IN CHIMICA

Olaparib come PARP-inibitore per la cura del tumore ovarico

Relatore: Prof. Fernando Formaggio

Laureanda: Linda Chiarotto

Matricola: 1194908

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

A tutte le pizze che ho fatto per raggiungere questo traguardo

INDICE

1. Introduzione	
1.1 Cancro dell'ovaio	5
1.2 Tipologie di tumore ovarico	5
1.3 Cura del tumore	5
1.4 Obbiettivi della tesi	6
2. Design degli inibitori di PARP	7
2.1 Descrizione della molecola di Olaparib	7
3. Sintesi della molecola	9
3.1 Via di sintesi alternativa	9
3.2 Retrosintesi	10
3.3 Sintesi proposta	11
3.4 Confronto tra le due reazioni	12
4. Interazione tra PARP e inibitore	13
4.1 Vie di riparazione del DNA	13
4.2 Descrizione di PARP	13
4.3 Caratterizzazione dei PARP-inibitori	14
4.4 Meccanismo di inibizione	15
5. Effetti del farmaco sulle pazienti	20
5.1 Sviluppi futuri	20
6. Conclusioni	22
Bibliografia	23

1. INTRODUZIONE

1.1 Cancro dell'ovaio

Il cancro ovarico deriva da una proliferazione incontrollata delle cellule ovariche, principalmente quelle epiteliali (non le cellule che producono gli ovuli). In Italia, questo tipo di cancro colpisce circa 5.200 donne ogni anno, posizionandosi al decimo posto tra i tumori più diffusi.

I fattori di rischio per il cancro ovarico sono molteplici e comprendono anche mutazioni ereditarie nei geni BRCA1 e BRCA2. Queste mutazioni aumentano il rischio di sviluppare sia il cancro ovarico che il cancro al seno, che possono manifestarsi contemporaneamente o in tempi diversi.

Come affermato dall'AIRC^[1], esistono tre tipi principali di tumore ovarico:

- Tumori epiteliali: originano dalle cellule che rivestono la superficie delle ovaie e costituiscono più del 90% delle neoplasie ovariche maligne.
- Tumori germinali: originano dalle cellule germinali, che danno origine agli ovuli, e rappresentano circa il 5% delle neoplasie ovariche maligne.
- Tumori stromali: originano dal tessuto stromale dell'ovaio, responsabile della produzione di ormoni femminili, e rappresentano circa l'1% di tutti i tumori ovarici. Più della metà di questi tumori si manifesta in donne di età superiore ai cinquant'anni.

1.3 Cura del tumore

La rimozione chirurgica del tumore è il metodo usato più spesso per trattare il tumore dell'ovaio. All'intervento di citoriduzione segue poi un ciclo di chemioterapia al platino di 6/8 sedute a seconda delle necessità. Nonostante un intervento chirurgico ottimale e una chemioterapia di prima linea appropriata, l'80% dei pazienti con carcinoma ovarico epiteliale svilupperà una recidiva in momenti diversi. La probabilità di recidiva dipende da molti fattori, tra cui la distribuzione della malattia alla presentazione iniziale, il successo della citoriduzione chirurgica iniziale (cioè la presenza di qualsiasi malattia residua), la rapidità della risoluzione del CA125 e la risposta al trattamento dopo la terapia primaria. La recidiva può essere rilevata biochimicamente (tramite aumento del CA125), clinicamente o radiologicamente.^[11]

Poiché la chemioterapia presenta limitazioni nel trattamento del tumore ovarico e può causare effetti tossici dopo un certo numero di dosi, sono stati esplorati altri approcci per il mantenimento o la prevenzione della malattia. Tra questi, si annoverano farmaci mirati come l'anticorpo monoclonale

Bevacizumab, che ostacola la formazione di nuovi vasi sanguigni nel tumore (angiogenesi), e gli inibitori di PARP (Poli-ADP Ribosio Polimerasi) come Olaparib, Niraparib e Rucaparib. Gli inibitori di PARP, utilizzati come terapia di mantenimento, dimostrano particolare efficacia nei tumori con mutazioni nei geni oncosoppressori BRCA (BRCA1 o BRCA2), ma risultano efficaci anche in assenza di tali mutazioni.

1.4 Obiettivo della tesi

L'obiettivo di questa tesi è analizzare gli aspetti chimici principali di un PARP-inibitore, l'Olaparib. In un primo momento l'elaborato si concentrerà sulla descrizione della molecola e la sintesi comunemente adottata. Si descriverà poi un metodo di sintesi alternativo in linea con i principi della chimica verde e infine si analizzeranno i siti di attacco e gli effetti sul fisico delle pazienti in cura. Nell'ultima parte della trattazione si vedranno le possibili applicazioni future del farmaco.

La struttura della molecola di Olaparib è rappresentata in figura 1.



Figura 1: Olaparib ^[2]

2. DESIGN DEGLI INIBITORI

Il design degli inibitori del PARP si ispira all'interazione ligando-proteina della porzione di nicotinammide (figura 2) del NAD⁺ con il PARP e quindi le caratteristiche comuni a tutti gli inibitori sono l'anello aromatico e una porzione di nicotinammide, che possono formare legami idrogeno e interazioni π nel dominio catalitico del PARP.^[2]

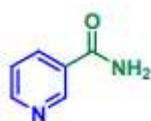


Figura 2: Nicotinammide

Il gruppo ammidico della nicotinammide è libero di ruotare ma si è visto che bloccandone la rotazione migliorava l'affinità di legame tra PARP e inibitore. Il blocco del gruppo ammidico può essere ottenuto inserendo sull'anello aromatico eteroatomi o gruppi capaci di formare un legame idrogeno intramolecolare con l'NH dell'ammide, oppure racchiudendo il gruppo ammidico in un sistema biciclico.

In particolare, nella progettazione delle molecole di PARP-inibitori sono state attuate le seguenti modifiche alla nicotinammide: un anello eteroaromatico è stato utilizzato per imitare la nicotinammide, un gruppo lattamico è stato usato per bloccare l'NH ammidico nella conformazione richiesta (atomi di colore blu e verde in figura 1) ed infine è stata annessa un'appendice ausiliaria con una catena più corta o più lunga collegata al nucleo policiclico.

2.1 Descrizione della molecola di Olaparib

Gli inibitori del PARP sono risultati molto efficaci nella cura del cancro alle ovaie, soprattutto grazie al fatto che hanno un ridotto impatto tossico sull'organismo. Olaparib, il primo inibitore di PARP introdotto nella pratica clinica, è stato utilizzato sia per il trattamento che per il mantenimento dei tumori ovarici. Commercializzato da AstraZeneca con il nome di Lynparza, è stato approvato per la prima volta dalla FDA (Food and Drug Administration) nel dicembre 2014 come monoterapia per il trattamento dei tumori ovarici nelle pazienti con mutazione germinale del BRCA (gBRCAm, una mutazione di tumore al seno) che avevano già ricevuto precedentemente almeno tre dosi di chemioterapia. Nel 2017, la monoterapia con Olaparib è stata approvata dalla FDA come terapia di mantenimento dei tumori ovarici recidivi sensibili al platino, indipendentemente dalla presenza o

dall'assenza di mutazioni BRCA. Nel 2018 la FDA ha approvato la monoterapia con Olaparib come terapia di primo ordine per i pazienti con tumori ovarici avanzati di alto grado sensibili al platino.

Olaparib, originariamente sviluppato dalla KuDOS Pharmaceuticals, ha prolungato la sopravvivenza alle pazienti affette da cancro ovarico seroso ricorrente sensibile al platino. Attualmente, Olaparib si trova in fase di indagine per il trattamento del cancro al seno, gastrico, alla prostata, al pancreas e al polmone. [3]

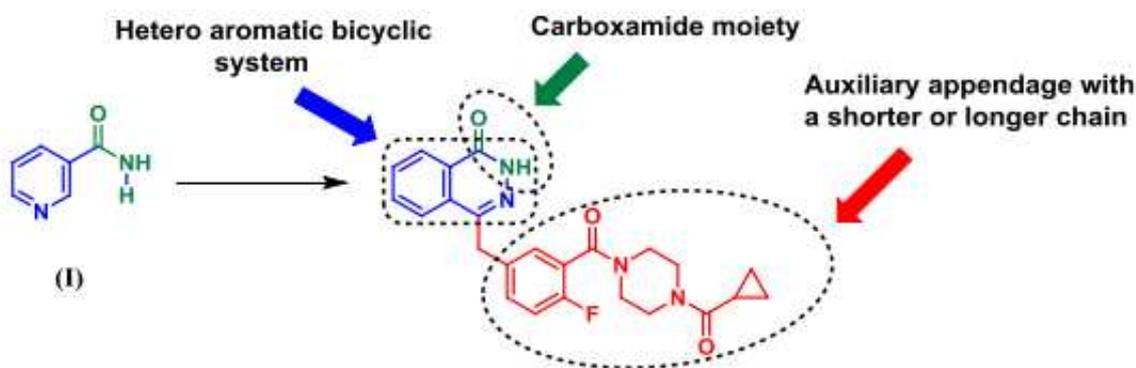


Figura 3: descrizione della molecola di Olaparib [2]

Nota anche col nome chimico di 4-[3-(4-ciclopropilcarbamilpiperazin-1-carbamil) -4-fluorobenzil] -2H-ftalazin-1-one, l'olaparib (figura 3), un ftalazinone, ha una struttura nucleare composta da un lattame biciclico planare con il gruppo ammidico bloccato in una conformazione anti tramite una connessione ad anello. [4]

L'atomo di fluoro svolge un ruolo importante nell'influenzare la conformazione molecolare. Dal punto di vista degli effetti sterici, l'influenza del fluoro sembra marginale, poiché è un atomo piccolo con un raggio di van der Waals di 1,47 Å, che è vicino al raggio di 1,20 Å dell'idrogeno. Si è però osservato che l'alta elettronegatività del fluoro porta a legami C-F altamente polarizzati e a nuove potenziali interazioni a idrogeno tra l'atomo di fluoro e i bersagli dei PARP. Il fluoro inoltre è un potente strumento per modulare la pKa dei gruppi funzionali prossimali e le densità elettroniche degli anelli eteroaromatici/aromatici: la pKa di un centro ionizzabile in una molecola di interesse farmacologico determina il profilo lipofilo, che a sua volta influenza la solubilità, la permeabilità e il legame con le proteine. Le variazioni della pKa possono manifestarsi come cambiamenti nella potenza, selettività, tossicità e proprietà farmacocinetiche (PK), comprese assorbimento, distribuzione, metabolismo ed escrezione (ADME).

Infine è stato notato come il frammento di ftalazina sia essenziale al fine del legame con il bersaglio e che il segmento di piperazina è flessibile, caratteristica ottimale al fine di supportare la potenza dell'inibizione di PARP. [5]

3. SINTESI DELLA MOLECOLA

La via di sintesi principale^[6] per Olaparib è illustrata in figura 4.

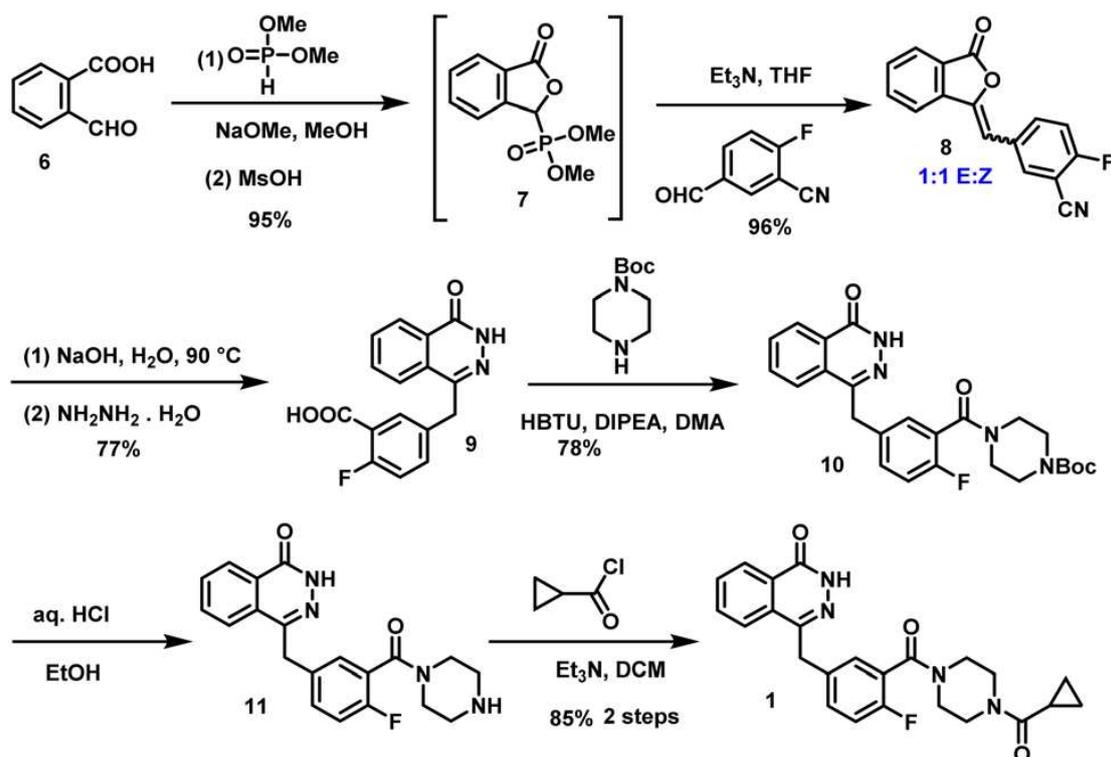


Figura 4: sintesi di Olaparib ^[6]

Inizialmente, l'acido 2-formilbenzoico (6) reagisce con il dimetilfosfato per produrre il fosfonato (7) che partecipa poi alla reazione di Horner-Wadsworth-Emmons producendo l'olefina (8) in rapporto E: Z = 1:1.

Il composto 8 viene idrolizzato in condizioni alcaline e segue una ciclizzazione utilizzando l'idrato di idrazina che produce un composto acido contenente un anello fthalazinone (9).

La piperazina protetta con Boc reagisce con il derivato acido (9) producendo l'acido fthalazinone contenente piperazina (10).

Infine, l'Olaparib è stato ottenuto mediante deprotezione del gruppo Boc seguita da una reazione di sostituzione con ciclopropilcarbonil cloruro. La resa complessiva di questa sintesi dell'Olaparib è pari al 34%.

3.1 Via di sintesi alternativa

La maggior parte dei metodi impiegati per la sintesi dell'Olaparib coinvolge la reazione di olefinazione di Horner-Wadsworth-Emmons, che richiede la sintesi di un precursore fosfonato. Oltre a questo, l'uso dell'idrazina nell'ultimo passaggio costituisce un'ulteriore campanello d'allarme in quanto è stato dimostrato negli studi sugli animali che l'idrazina induce la crescita tumorale ed è classificata come un probabile cancerogeno per l'uomo dall'Agenzia per la Protezione Ambientale degli Stati Uniti.

Per tali ragioni recentemente è stata proposta una via di sintesi alternativa che coinvolge solo quattro passaggi, non prevede l'uso di catalizzatori metallici o sostanze pericolose, utilizza solventi ecologici ed ha una resa complessiva del 51%.^[6]

3.2 Retrosintesi

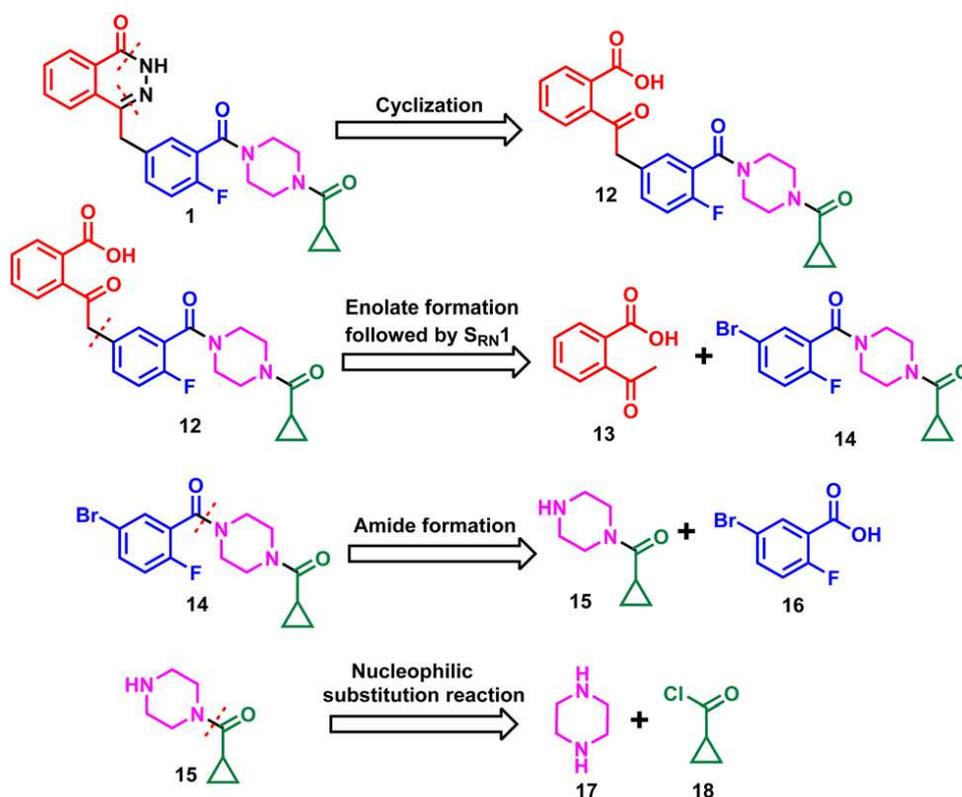


Figura 5: retrosintesi alternativa di Olaparib^[6]

L'Olaparib (1) potrebbe essere preparato dall'acido benzoico 2-(2-(3-(4-(ciclopropanecarbonyl)piperazine-1-carbonyl)-4-fluorofenil) acetil) (12) attraverso la costruzione dell'anello ftalazinone utilizzando l'idrato di idrazina.

Questo derivato dell'acido (12) potrebbe essere sintetizzato dall'acido 2-acetilbenzoico (13) reperibile commercialmente e dal (4-(5-bromo-2-fluorobenzoil) piperazin-1-il)(ciclopropil)metanone (14) tramite la formazione di enolato seguita dal processo $S_{RN}1$ (Sostituzione Radicalica Nucleofila Unimolecolare).

Il composto 14 potrebbe essere costruito mediante la reazione di accoppiamento acido-ammina tra l'acido 5-bromo-2-fluorobenzoico (16) reperibile commercialmente e il ciclopropil(piperazin-1-ile)metanone (15), che potrebbe essere sintetizzato da due precursori, piperazina (17) e ciclopropilcarbonil cloruro (18).

3.3 Sintesi proposta

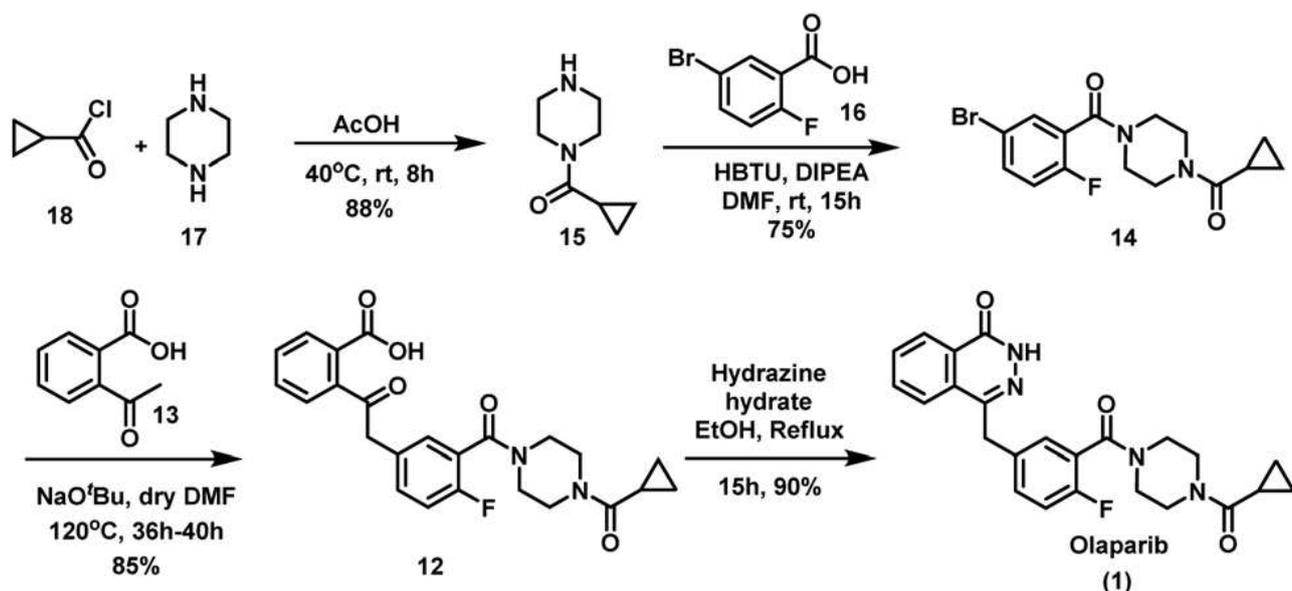


Figura 6: sintesi alternativa di Olaparib ^[6]

Questa sintesi ha inizio dai precursori piperazina (17) e ciclopropilcarbonil cloruro (18), che reagiscono in presenza di AcOH a 40 °C per produrre ciclopropil(piperazin-1-il)metanone (15). Il composto 15 è formato attraverso l'addizione nucleofila verso il derivato del cloruro acido.

Il composto risultante viene successivamente accoppiato con acido 5-bromo-2-fluorobenzoico (16) tramite il processo di accoppiamento acido-ammide per fornire (4-(5-bromobenzoil) piperazin-1-il)ciclopropil)metanone (14). La reazione è eseguita utilizzando HBTU (Hexafluorophosphate Benzotriazole Tetramethyl Uronium) come reagente di coupling in presenza di DIPEA (Di-IsoPropil-Etil Ammina) e DMF come solvente a 25 °C.

Il derivato bromoarilico contenente ciclopropanopiperazina (14) reagisce quindi con l'acido 2-acetilbenzoico (13) per formare l'intermedio 2-(2-(3-(4-(ciclopropanecarbonil)piperazin-1-carbonil)-4-fluorofenil)acetil)benzoico (12) tramite formazione di enolato seguita dal processo $S_{RN}1$, che è la reazione cruciale per la costruzione del prodotto desiderato Olaparib (1).

Dal composto 12 si arriva alla sintesi di Olaparib (1) tramite la costruzione dell'anello ftalazinone. Questa reazione di ciclizzazione è stata condotta utilizzando idrazina idrata ed etanolo come solvente in condizioni di riflusso.

3.3 Confronto tra le due reazioni

Il percorso riportato in figura 4 è sconveniente in quanto coinvolge un gran numero di passaggi, si osserva la formazione di ossido di fosfina come sottoprodotto, necessita dell'uso di tecniche di protezione e deprotezione di Boc, come solventi reattivi prevede solventi clorurati e THF e viene prodotta una grande quantità di rifiuti durante l'intero processo. La maggior parte dei parametri di reazione coinvolti non soddisfa i dodici principi della chimica verde come ad esempio *atom economy* (efficienza atomica), PMI (*Process Mass Intensity*), fattore ambientale, produttività di massa e RME (*Reaction Mass Efficiency*).

Il secondo processo (figura 6) ha un meccanismo di reazione più semplice e rese chimiche elevate in linea con i principi della chimica verde. Nella tabella riportata di seguito (figura 7) è mostrato il confronto tra la reazione correntemente utilizzata e la nuova proposta, in termini di parametri della chimica verde.

Parameters	Our method	Literature-reported method
No. of steps	4	6
Atom economy	35.9%	26.0%
Overall yield	51.0%	46.0%
Atom efficiency	18.3%	12.0%
Process mass intensity (PMI)	18.2 g/g	51.8 g/g
Mass productivity	5.5%	1.9%
<i>E</i> -Factor	17.2 g/g	50.8 g/g
Effective mass yield	5.8%	2.0%
Reaction mass efficiency (RME)	12.6%	7.5%

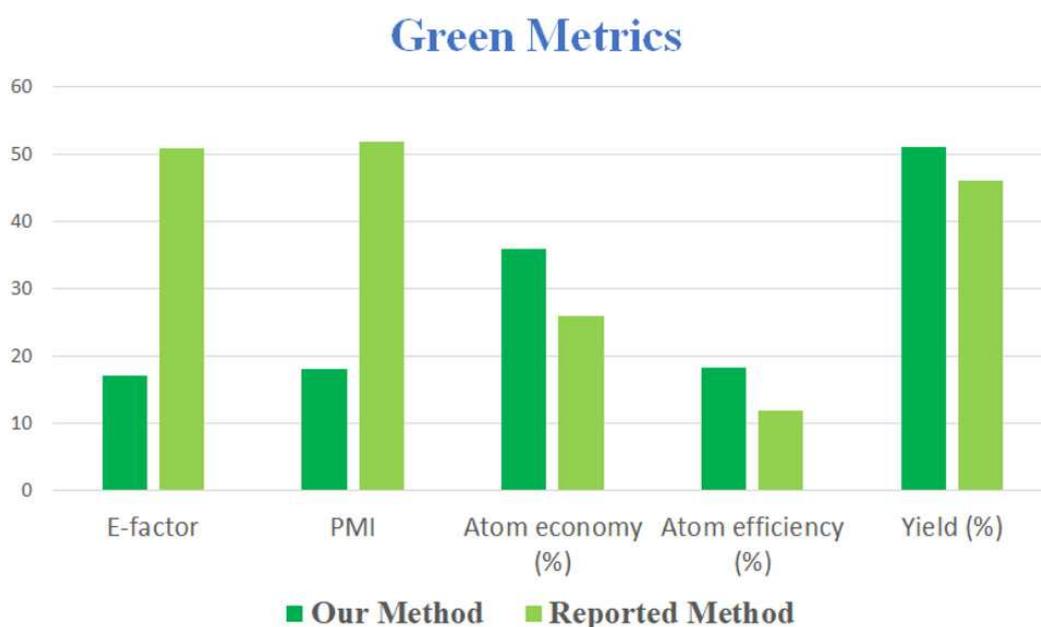


Figura 7: confronto tra le reazioni ^[6]

4. INTERAZIONE TRA PARP E INIBITORI

4.1 Vie di riparazione del DNA

La cellula vivente, comprese le sue proteine e DNA, affronta varie aggressioni a struttura e sequenza durante tutto il suo ciclo vitale. Il danneggiamento del DNA è frequente durante il ciclo di vita di una cellula e può portare a due tipi di rottura nella struttura: rottura del singolo filamento (single-strand break, SSB) o rottura del doppio filamento (double-strand break, DSB), che, se non riparate correttamente, possono causare instabilità del genoma e morte cellulare. Le cellule umane procedono alla ricostruzione del DNA attraverso cinque vie principali di ricostruzione, che fungono da sonda e identificano i difetti per proteggere il genoma: riparazione per escissione di base (BER), riparazione per escissione nucleotidica (NER), riparazione di abbinamento errato (MMR), ricombinazione omologa (HR) e giunzione non omologa di estremità (NHEJ).^[3] Disfunzione, riduzione o assenza di proteine impegnate in queste vie possono portare a gravi conseguenze cellulari, causando mutagenesi e tossicità. Le proteine BRCA 1 e BRCA 2 svolgono il ruolo importante di regolatori trascrizionali attraverso l'attivazione di specifici processi di riparazione del DNA in risposta ai danni cellulari. Entrambe le proteine BRCA 1 e BRCA 2 sono spesso trovate in interazione stabile, suggerendo la co-funzione di queste proteine nei percorsi di soppressione tumorale. ^[7]

4.2 Descrizione di PARP

I PARP sono la famiglia di enzimi che condividono la capacità di catalizzare il trasferimento di ADP-ribosio alle proteine bersaglio (poli-ADP-ribosilazione).^[7] La poli (ADP)-ribosilazione è una modifica post-traduzionale immediata in risposta al danno al DNA di istoni e altre proteine nucleari che contribuiscono alla sopravvivenza delle cellule proliferanti danneggiate. Ci sono almeno diciotto membri della famiglia PARP che sono codificati da geni diversi e condividono omologia in un dominio catalitico conservato. Due isoforme di PARP, PARP-1 e PARP-2, sono meglio conosciute per il loro coinvolgimento nel processo di riparazione del DNA e perché giocano un ruolo importante in diversi processi cellulari, compresa la proliferazione e la morte cellulare. PARP-1 e PARP-2, quando attivati dal danno al DNA, facilitano la riparazione del DNA nei percorsi che coinvolgono rotture a singolo filamento e BER.

PARP-1 è composto da tre domini principali: un dominio N-terminale con funzione di rilevamento e legame del danno al DNA contenente tre estremità di zinco, un dominio di auto modificazione e un dominio catalitico C-terminale. L'estremità due di zinco ha maggiore affinità per le rotture del DNA rispetto alle altre due, mentre l'estremità uno di zinco è responsabile dell'attivazione di PARP-1 da parte del DNA, in cui l'estremità tre di zinco co-partecipa.

Il dominio catalitico di PARP-2 ha una forte somiglianza con PARP-1 e mira alle lacune del DNA e non ai tagli. Dopo la scoperta di PARP-1 e PARP-2, è stata identificata una famiglia di diciotto proteine con somiglianza strutturale al dominio catalitico di PARP-1.

4.3 Caratterizzazione dei PARP-inibitori

La poli (ADP)-ribosilazione è coinvolta nella regolazione dei processi cellulari quali la riparazione del DNA, la trascrizione genica, la progressione del ciclo cellulare, la morte cellulare, le funzioni della cromatina e la stabilità genomica. Tra i diciotto analoghi PARP identificati finora, PARP-1 e PARP-2 sono le uniche proteine che vengono stimulate dalle rotture del filamento del DNA e che sono coinvolte nella riparazione del danno al DNA. Pertanto, queste molecole sono state identificate come potenziali bersagli per lo sviluppo di strategie farmacologiche per aumentare l'efficacia antitumorale degli agenti chemioterapici, che inducono danni al DNA.

Insieme a PARP, BRCA 1 e BRCA 2 hanno un duplice ruolo nella protezione del genoma umano, agendo nella riparazione HR e nella protezione delle forche di replicazione bloccate. Tramite la riparazione HR, una cellula può effettuare in modo efficiente la riparazione senza errori di una DSB.

BRCA 1 ha la funzione di promuovere la resezione 5' a 3' della DSB, lasciando dietro di sé un'estremità libera 3'. Successivamente, BRCA 2 carica l'estremità libera con la proteina RAD51, creando un nucleo-filamento adatto per l'invasione di un modello di cromatide sorella attraverso il processo di formazione del "loop D".

Diversi tipi di tumori umani, tra cui tumori ovarici, mammari, prostatici e pancreatici, presentano difetti nella riparazione HR. Tali difetti in HGSOC (cancro ovarico seroso di alto grado) derivano da mutazioni germinative o somatiche di uno o più geni BRCA. L'inibizione dell'attività di PARP aumenta la suscettibilità delle cellule agli agenti danneggiatori del DNA ed evita il riunirsi dei frammenti rotti del filamento. Oltre ad altri percorsi, le vie di riparazione come l'HR possono correggere le lesioni al DNA indotte dall'inibizione di PARP. Pertanto, l'inibizione di PARP non è letale da sola. Tuttavia, nei pazienti con mutazioni BRCA 1 o BRCA 2, la ricostruzione HR è difettosa e quindi le lesioni al DNA causate dall'inibizione di PARP non possono essere riparate ed evolvono in DSB con citotossicità tumorale, sfruttando così il principio della letalità sintetica. Pertanto, gli inibitori di PARP vengono proposti come terapia tumorale specifica definitiva per i tumori con mutazioni BRCA, mirando solo alle cellule tumorali senza influenzare le cellule normali. [7]

4.4 Meccanismo d'inibizione

Gli inibitori di PARP agiscono principalmente attraverso due vie: l'inibizione catalitica di PARP-1 (cioè prevenendo la PARilazione) e il blocco (o "intrappolamento") di PARP-1 sul DNA danneggiato. I meccanismi esatti di intrappolamento di PARP-1 sono ancora poco chiari; tuttavia, sono stati proposti due meccanismi: (i) gli inibitori di PARP impediscono il rilascio di PARP-1 dal DNA mediante l'inibizione dell'autoPARilazione, oppure (ii) il legame degli inibitori di PARP al sito catalitico causa cambiamenti allosterici nella struttura di PARP-1, aumentando l'avidità per il DNA.

In entrambi i casi, il PARP-1 intrappolato arresta il progresso delle forche di replicazione. Nelle cellule normali, queste forche di replicazione bloccate verrebbero riparate dall'HR. Nelle cellule tumorali che mancano di una delle proteine chiave dell'HR, come BRCA 1, BRCA 2, PALB 2 o RAD51, un meccanismo alternativo di riparazione cerca di riparare le lesioni al DNA causate dall'inibizione di PARP, principalmente attraverso NHEJ. Invece di ripristinare la sequenza danneggiata del DNA alla sua forma nativa, l'utilizzo di vie di riparazione prone agli errori porta alla frammentazione del genoma che alla fine uccide la cellula.

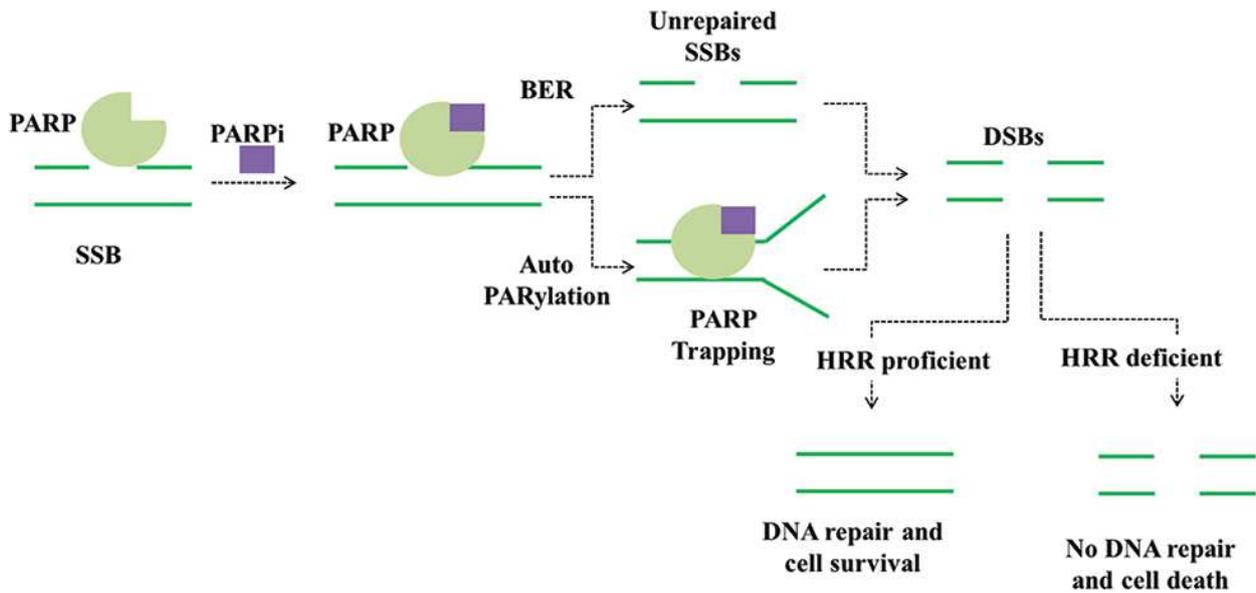


Figura 8: meccanismo d'azione degli inibitori del PARP [7]

In presenza di SSB, il dominio di legame al DNA di PARP si lega al sito SSB del DNA. Successivamente all'attivazione di NAD⁺ nel dominio catalitico, PARP avvia la sintesi di una catena polimerica di adenosina difosfato-ribosio (Polimeri ADP-ribosio o PAR) che svolge un ruolo essenziale nel reclutare gli enzimi riparatori per il percorso di riparazione del DNA. Dopo la riparazione della SSB, le catene PAR vengono degradate tramite la poli (ADP-ribosio) glico-idrolasi (PARG). Alla fine, i PARP e i complessi riparatori si dissociano dal DNA per tornare in ciclo. [3]

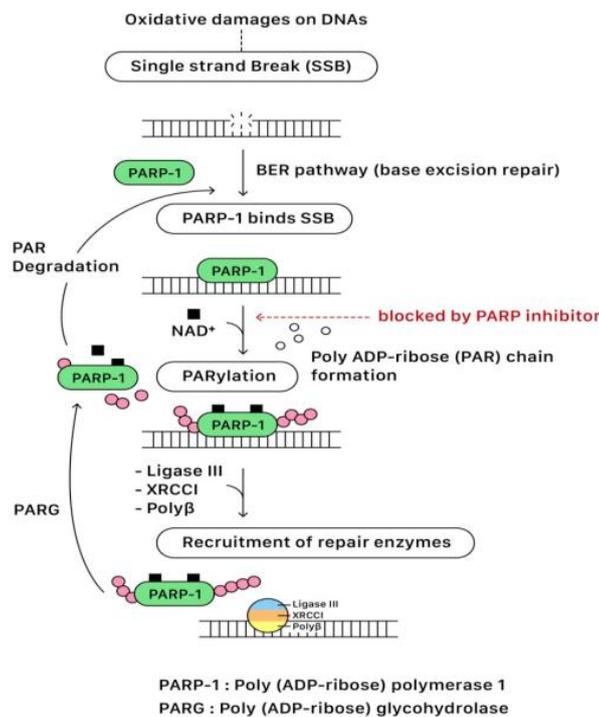


Figura 9: Il percorso di riparazione tramite BER del PARP per riparare le SSB [3]

Il dominio catalitico (CAT) della proteina PARP-1 è il modulo centrale per la poli ADP-ribosilazione del substrato. Il dominio CAT contiene due sottodomini: un dominio elicoidale (HD) e un dominio trasferasi dell'ADP-ribosile (ART) che contiene il sito attivo. Il sito attivo del dominio CAT di PARP-1 è aromatico, contiene un certo numero di residui di aminoacidi aromatici nell'area o intorno al sito. Questi residui aromatici dovrebbero svolgere un ruolo critico nell'indirizzamento del substrato e nel legame degli inibitori attraverso interazioni π -stacking.

Il sito attivo della molecola di PARP (figura 10) è una fessura lunga e stretta che si trova nel sottodominio ART, vicino al sottodominio HD.^[8] I ligandi inibitori si distribuiscono secondo una conformazione estesa lungo la fessura per formare un pattern compatto contro il PARP-1. Possiamo osservare una varietà di residui di aminoacidi aromatici; essi sono potenziali candidati per definire interazioni di π -stacking con le porzioni aromatiche dei ligandi inibitori. Secondo ricerche cristallografiche, la distanza delle interazioni π -stacking nei sistemi biologici è generalmente non più di 6 Å, e per la maggior parte <5 Å. In questo contesto la regione di PARP-1 entro 5 Å dai ligandi inibitori viene considerata come primo strato e la regione tra 5 e 6 Å come secondo strato. Gli aminoacidi aromatici sia nel primo che nel secondo strato possono formare interazioni π -stacking con i ligandi inibitori.

In questo modo, sono stati identificati sei residui del primo strato Tyr689, Tyr710, His862, Tyr889, Tyr896 e Tyr907 e sei residui del secondo strato Trp861, Phe891, Phe897, His909, Tyr986 e Tyr989; la maggior parte di questi residui aromatici si trova nel sottodominio CAT, mentre solo pochi nel sottodominio HD. Essi definiscono il contesto aromatico locale dei ligandi inibitori nel sito attivo di PARP-1. Questi residui aromatici sono distribuiti attorno ai ligandi inibitori per fornire un ambiente ricco di elettroni π , formando così una rete di interazioni π -stacking tra PARP-1 e inibitori. Inoltre, la maggior parte dei residui aromatici del primo strato può interagire direttamente con questi ligandi, mentre i residui aromatici del secondo strato sembrano generalmente formare interazioni a medio o lungo raggio con i ligandi.

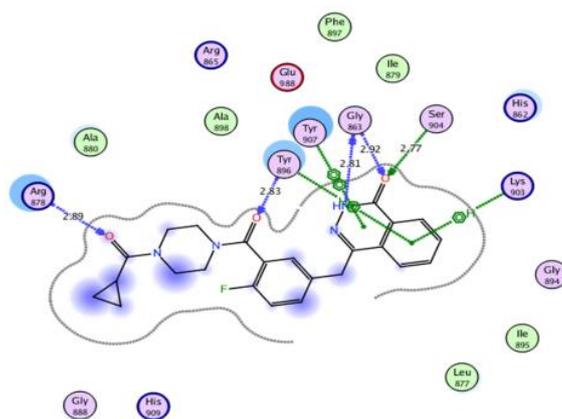


Figura 10: Ci sono tre cruciali interazioni date da legami idrogeno tra il gruppo carbossilico e due residui critici di amminoacidi nel sito attivo del PARP, Gly863 (NH verso Gly C=O e C=O verso Gly NH) e Ser904 (C=O verso Ser OH). Inoltre, il gruppo fenilico di Tyr907 interagisce per legame π - π con la nicotinamide del NAD⁺ [2]

I residui del primo strato sono più importanti dei residui del secondo strato nell'interazione con gli inibitori, tranne i due residui del primo strato Tyr689 e Tyr710 nel sottodominio HD che sono spazialmente vicini ad alcuni ligandi inibitori ma non possono formare un'efficace interazione π -stacking con le porzioni aromatiche degli inibitori a causa di una configurazione geometrica impropria, mostrando quindi solo un'interazione debole con la maggior parte degli inibitori.

I quattro residui del primo strato His862, Tyr889, Tyr896 e Tyr907 sono stati raggruppati nel gruppo I, che è favorevole per il legame con gli inibitori e, in particolare, il residuo Tyr907 sembra aderire alla maggior parte degli inibitori.

I quattro residui del secondo strato Trp861, Phe897, His909 e Tyr989 sono raggruppati nel gruppo II che ha potenza di interazione variabile con diversi inibitori in termini di modalità conformazionale e legame dei ligandi inibitori nel sito attivo di PARP-1.

I due residui del primo strato Tyr689 e Tyr710, così come i due residui del secondo strato Phe891 e Tyr986, sono raggruppati nel gruppo III e in generale hanno una debole interazione con i ligandi inibitori a causa di una configurazione impropria o di una grande distanza.

Inoltre, il residuo del secondo strato His909 non è incluso nei tre gruppi, contribuendo anche in modo variabile con diversi inibitori ma con un pattern diverso rispetto a quelli del gruppo II.

La struttura del dominio CAT di PARP-1 con Olaparib è riportata nella figura 11.

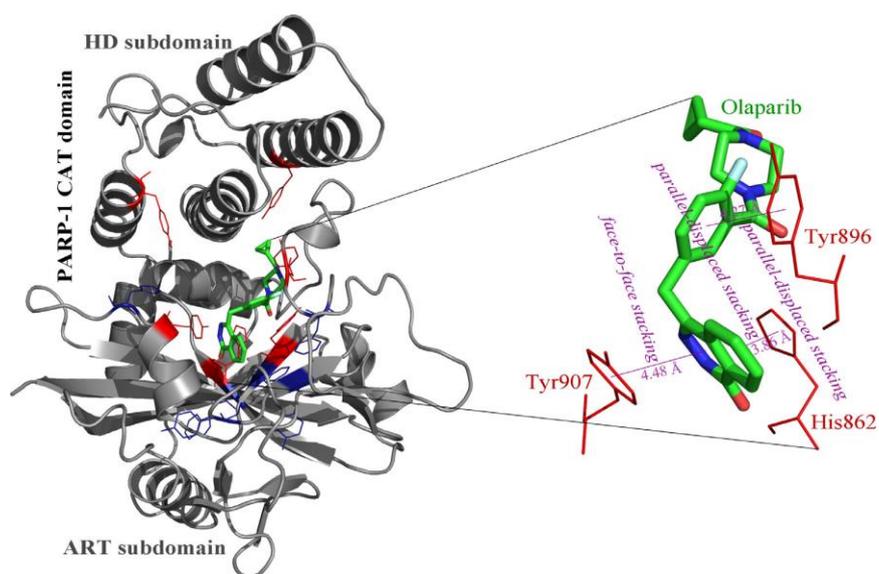


Figura 11: interazione PARP-Olaparib [8]

L'Olaparib è radicato nella fessura del sito attivo di PARP-1 e mostra una conformazione estesa e distorta, che è in gran parte all'interno del sottodominio ART, mentre è parzialmente separata dal sottodominio HD. Pertanto, i due residui HD Tyr689 e Tyr710 danno solo un contributo limitato nell'interazione con l'inibitore, anche se appartengono al primo strato.

Come previsto, tutti i sei residui del secondo strato non entrano direttamente in contatto con il ligando Olaparib; sono tutti situati nel sottodominio ART e approssimativamente concentrati su un lato del sito attivo.

Gli altri quattro residui del primo strato His862, Tyr889, Tyr896 e Tyr907, sono principalmente responsabili del legame dell'inibitore con PARP-1, mostrando energie di interazione moderate o elevate con Olaparib.

Il Tyr907 può formare uno stacking faccia-a-faccia con la porzione ftalazinica di Olaparib in modo geometricamente soddisfacente, conferendo quindi un'energia di interazione elevata ($\Delta E_i = -10.35$ kcal/mol). I residui His862 e il Tyr896 possono definire due stackings paralleli con le porzioni ftalazinica e fluobenzene di Olaparib in modo geometricamente distorto, mostrando solo energie di interazione moderatamente elevate ($\Delta E_i = -6.35$ e -8.67 kcal/mol, rispettivamente). Inoltre, il residuo Tyr889 non forma uno stacking π tipico con la porzione aromatica di Olaparib, ma potrebbe formare interazioni elettroniche π atipiche e quindi fornire un'energia di interazione apprezzabile ($\Delta E_i = -6.52$ kcal/mol).

5. EFFETTI DEL FARMACO SULLE PAZIENTI

Olaparib è disponibile in capsule o pastiglie per somministrazione orale. Sulla base delle valutazioni di sicurezza, la dose massima tollerata di Olaparib è 400 mg due volte al giorno. Globalmente il profilo di tollerabilità degli inibitori di PARP è sostanzialmente buono. Gli effetti collaterali principalmente riportati sono anemia, trombocitopenia, neutropenia, disturbi gastrointestinali (principalmente nausea e vomito) e stanchezza. ^[9]

Non tutti i pazienti con deficienza nella riparazione del DNA rispondono alla cura con Olaparib. Ci sono diversi meccanismi di resistenza, ma al momento non è ancora chiaro quali meccanismi contribuiscano alla resistenza all'inibizione di PARP nel carcinoma. Sia gli studi in corso che quelli futuri potrebbero individuare mutazioni secondarie associate alla resistenza a Olaparib.

Olaparib rappresenta una buona terapia, considerando che ha un profilo di tossicità generalmente più favorevole rispetto alla chemioterapia citotossica. Tuttavia, i dati sull'impatto di Olaparib sulla qualità della vita sono molto limitati e sono necessarie ulteriori indagini.

Il beneficio sulla sopravvivenza potrebbe essere considerato come un indice di miglioramento della qualità della vita, evitando ai pazienti i sintomi della malattia progressiva e terapie aggiuntive con le relative tossicità, prevenendo il carico psicologico e l'incertezza che derivano dall'avanzamento della malattia. ^[9]

5.1 Sviluppi futuri

Attualmente, Olaparib si trova in fase di indagine per il trattamento del cancro al seno, gastrico, alla prostata, al pancreas e al polmone. I risultati degli studi clinici hanno dimostrato che i pazienti affetti da cancro alla prostata con mutazione BRCA1/2 sono probabili candidati a rispondere potenzialmente agli inibitori di PARP. ^[9]

Dato l'esito soddisfacente della terapia con Olaparib, sono in corso diversi studi per sviluppare derivati del farmaco ottenuti modificando principalmente due siti di interesse della molecola (figura 12) per poi arrivare allo sviluppo dei due nuovi composti di interesse chimico mostrati in figura 13.

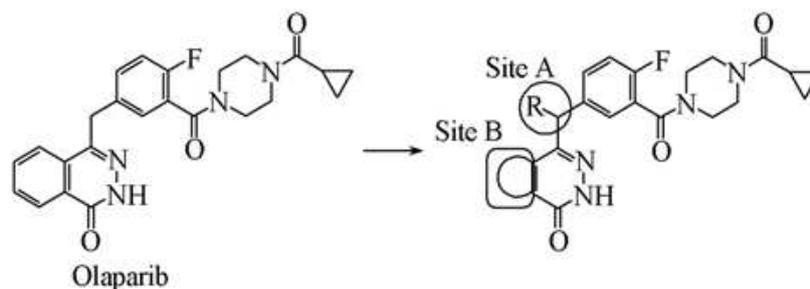


Figura 12: Siti di modifica A e B della molecola ^[10]

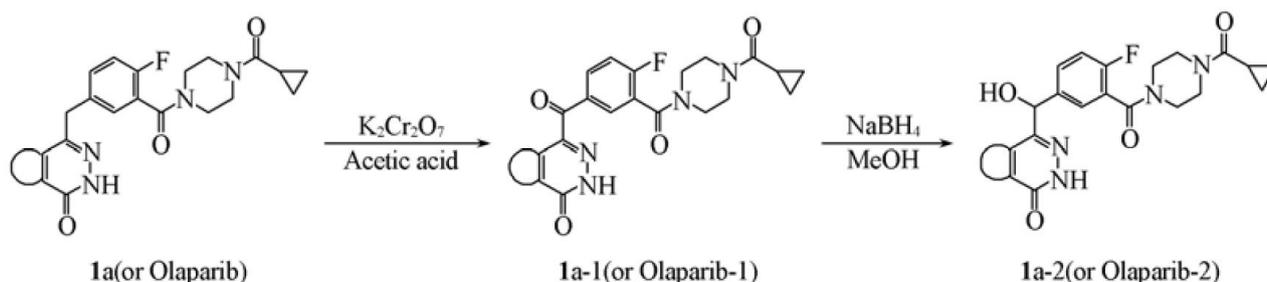


Figura 13: derivati di Olaparib ^[10]

Analisi *in vitro* hanno rivelato che le attività antitumorali di Olaparib-1/2 sono migliori rispetto al controllo positivo Olaparib. L'indagine su questi nuovi composti attivi fornisce un potente incentivo per ulteriori ricerche sulle modifiche chimiche e sulle relazioni struttura-attività di Olaparib e dei suoi derivati. ^[10]

Un altro studio^[2] propone un design basato sulla sostituzione dell'anello ftalazina con un nucleo isosterico piridinico e l'aggiunta di vari frammenti chimici alla sua catena laterale benzilica. Questo studio propone l'introduzione di un nuovo sistema ad anello (piridopiridazinone) nel campo degli inibitori di PARP-1 simili al NAD (figura 14).

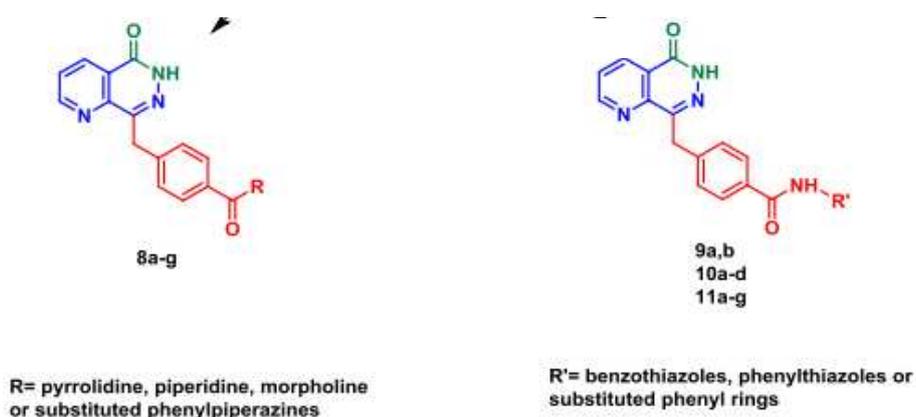


Figura 14: altri derivati di Olaparib ^[2]

6. CONCLUSIONI

Il cancro alle ovaie colpisce 5.200 donne ogni anno e costituisce il 3% delle diagnosi di tumore. Ci sono tre tipologie di tumori ovarici, il cancro stromale, quello geminale e quello epiteliale (quest'ultimo costituisce il novanta per cento delle neoplasie ovariche maligne). Il tumore ovarico viene curato principalmente tramite un intervento di citoreduzione e un successivo ciclo di chemioterapia. Tuttavia la maggior parte delle pazienti va incontro a ricaduta ed è necessario un trattamento addizionale oltre alla terapia iniziale che viene effettuato tramite farmaci inibitori del PARP, un enzima responsabile della ricostruzione del DNA.

Il design degli inibitori del PARP si ispira all'interazione ligando-proteina della porzione di nicotinammide del NAD⁺ con il PARP e quindi le caratteristiche comuni a tutti gli inibitori sono l'anello aromatico e una porzione di nicotinammide.

Olaparib è il primo inibitore di PARP introdotto nella pratica clinica. È stato utilizzato dal 2018 sia per il trattamento che per il mantenimento dei tumori ovarici, come terapia di primo ordine per le pazienti con tumori avanzati sensibili al platino.

Le vie di sintesi di questa molecola sono in continua evoluzione al fine di trovare alternative più ecosostenibili, che riducano quindi l'uso di reagenti tossici e l'impatto ambientale del processo.

Gli inibitori di PARP mimano strutturalmente la nicotinamide e agiscono principalmente attraverso due vie: l'inibizione catalitica di PARP-1 (cioè prevenendo la PARilazione) e il blocco (o "intrappolamento") di PARP-1 sul DNA danneggiato. In presenza di SSB, il dominio di legame al DNA di PARP si lega al sito SSB del DNA. Successivamente all'attivazione di NAD⁺ nel dominio catalitico, PARP avvia la sintesi di una catena polimerica di adenosina difosfato-ribosio (Polimeri ADP-ribosio o PAR) che svolge un ruolo essenziale nel reclutare gli enzimi riparatori per il percorso di riparazione del DNA. Dopo la riparazione della SSB, le catene PAR vengono degradate tramite la poli (ADP-ribosio) glico-idrolasi (PARG). Alla fine, i PARP e i complessi riparatori si dissociano dal DNA per tornare in ciclo.

Olaparib rappresenta una buona terapia, considerando che ha un profilo di tossicità generalmente più favorevole rispetto alla chemioterapia tradizionale. Dato l'esito soddisfacente della terapia con Olaparib si stanno sviluppando derivati del farmaco utili anche per il trattamento del cancro al seno, gastrico, alla prostata, al pancreas e al polmone.

BIBLIOGRAFIA

1. <https://www.airc.it/cancro/informazioni-tumori/guida-ai-tumori/tumore-delle-ovaie>, accesso in rete 15/03/2024
2. G. F. Elmasry; E.E. Aly; F.M. Awadallah; S.M. El-Moghazy, *Bioorganic Chemistry*, **2019**, *87*, 655-666
3. C. Lau; K. Seow; and K. Chen, *International Journal of Molecular Sciences*, **2022**, *23*, 8125
4. G. Griguolo; M. V. Dieci; F. Miglietta; V. Guarneri; P. F. Conte, *Future Oncology*, 2020, *16*(12), 717–732
5. W. Chen; S. Song; M. Qi; X. Huan; Y. Wang; H. Jiang; J. Ding; G. Ren; Z. Miao; J. Li, *Acta Pharmacologica Sinica* **2017**, *38*, 1521–1532
6. I. Chatterjee; D. Roy; G. Panda, *Green Chemistry*, **2023**, *25*, 9097
7. C. Desai; A. Pathak; S. Limaye; V. Maniar; A. Joshi, *Indian Journal of Cancer*, **2022**, *59*, 119-29.
8. C. Pan; L. Chen; X. Zhang; D. Zhang; Q. Song; J. Peng; Q. Li, *Journal of the Chinese Chemical Society*, **2022**, *69*, 775–785
9. F. De Felice; V. Tombolini; F. Marampon; A. Musella; Claudia Marchetti, *Drug Design, Development and Therapy*, **2017**, *11*, 547–552
10. X. Lou; X. Yang; Y. Ding; J. Wang; Q. Yan; X. Huang; Y. Guo; X. Wang; W. Xiang, *Chemical Research in Chinese University*, **2013**, *29*(2), 231—235
11. S. Pignata ; S. C. Cecere ; A. Du Bois ; P. Harter; F. Heitz; *Annals of Oncology* , 2017, *28* (Supplement 8), viii51–viii56