

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN FARMACIA

TESI DI LAUREA

**IL FRAGMENT-BASED DRUG DISCOVERY COME STRATEGIA
PER SVILUPPARE FARMACI SU NUOVI BERSAGLI
TERAPEUTICI: L'ESEMPIO DEL PEXIDARTINIB**

RELATORE: PROF. STURLESE MATTIA

LAUREANDO: CHIAPPETTA GIACOMO

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

SOMMARIO

ABSTRACT	5
INTRODUZIONE AL FRAGMENT-BASED DRUG DISCOVERY (FBDD).....	5
LIBRERIA DI FRAMMENTI	6
METODI DI SCREENING DEI FRAMMENTI	7
FLUORIMETRIA A SCANSIONE DIFFERENZIALE (DSF)	8
CALORIMETRIA ISOTERMICA DI TITOLAZIONE (ITC)	9
RISONANZA PLASMONICA DI SUPERFICIE (SPR)	10
SPETTROSCOPIA RISONANZA MAGNETICA NUCLEARE (NMR)	11
CRISTALLOGRAFIA A RAGGI-X	12
METODI COMPUTAZIONALI	13
ALTRI METODI	13
OTTIMIZZAZIONE DEI FRAMMENTI.....	14
ACCRESCIMENTO DEI FRAMMENTI.....	14
FUSIONE DI FRAMMENTI	16
LEGAME FRA FRAMMENTI	17
BERSAGLI PER IL FBDD	19
BERSAGLI CON IDROFOBICHE (“DRUGGABLE”) O IDROFILICHE (“UNDRUGGABLE”).....	19
TECNICHE PER SVILUPPARE FARMACI SU BERSAGLI CON TASCHE IDROFILICHE (“UNDRUGGABLE”)	20
TUMORE TENOSINOVIALE DELLE CELLULE GIGANTI (TGCT)	21
EPIDEMIOLOGIA DEL TGCT.....	22
PRESENTAZIONE CLINICA DEL TGCT.....	23
DIAGNOSI DEL TGCT	23
PATOGENESI DEL TGCT	24
ISTOPATOLOGIA DEL TGCT.....	26
TRATTAMENTI GOLD-STANDARD ATTUALI PER IL TGCT	27
MODELLI DI LINEE CELLULARI DI PAZIENTI AFFETTI DA TGCT.....	28
POTENZIALI BERSAGLI TERAPETICI.....	28

BERSAGLI TERAPEUTICI DELLE CELLULE TUMORALI IN PAZIENTI AFFETTI DA TGCT	29
FATTORE 1 STIMOLANTE LE COLONIE (CSF1).....	29
JANUS-CHINASI-2 (JAK2)	29
INIBITORE CELLULARE DELL'APOPTOSI 2 (cIAP2).....	30
BETA-ARRESTINA 2 (ARR-beta-2)	30
RECETTORE GAMMA (PPAR-gamma).....	30
FATTORE-ALFA DELLA NECROSI TUMORALE (TNF-alfa).....	31
FATTORE DI CRESCITA ENDOTELIALE VASCOLARE (VEGF)	31
LIGANDO KAPPA-B FATTORE NUCLEARE DELL'ATTIVATORE DEL RECETTORE (RANKL)....	31
LIGANDO 1 CHE PROGRAMMA LA MORTE CELLULARE (PD-L1).....	32
CADERINA-11	32
MIGLIORI TERAPIE PER IL TRATTAMENTO DI PAZIENTI AFFETTI DA TGCT	33
SVILUPPO DI PEXIDARTINIB (PLX647)	34
PEXIDARTINIB	35
PEXIDARTINIB: FARMACOLOGIA CLINICA	37
FARMACOCINETICA: ASSORBIMENTO, DISTRIBUZIONE, METABOLISMO ED ELIMINAZIONE (ADME)	37
ASSORBIMENTO	37
DISTRIBUZIONE	38
METABOLISMO.....	38
ELIMINAZIONE.....	38
SOMMINISTRAZIONE, DOSAGGIO E POSOLOGIA.....	39
INTERAZIONI FARMACOLOGICHE	40
CONTROINDICAZIONI	41
EFFETTI AVVERSI	41
POSSIBILI EFFETTI SULLA FERTILITA' MASCHILE E FEMMINILE	41
ALLATTAMENTO	41
DANNI RENALI	42
DANNI EPATICI	42
POPOLAZIONE GERIATRICA.....	43

POPOLAZIONE PEDIATRICA.....	43
STUDI CLINICI DI FASE I E DI FASE II	44
STUDIO CLINICO DI FASE I: EFFETTI DI PEXIDARTINIB SU TUMORI SOLIDI	45
STUDIO CLINICO DI FASE II: EFFETTI DI PEXIDARTINIB SUL GLIOBLASTOMA.....	45
ENLIVEN, STUDIO CLINICO DI FASE III: EFFETTI DI PEXIDARTINIB SUL TGCT	46
STUDI CLINICI ATTUALMENTE IN CONTINUAZIONE.....	50
CONSIDERAZIONI SULL'UTILIZZO DI PEXIDARTINIB	50
BIBLIOGRAFIA.....	52

ABSTRACT

Il Fragment-Based Drug Discovery (FBDD) è un metodo innovativo grazie al quale, partendo da piccoli frammenti che si legano debolmente al bersaglio, è possibile ottenere una molecola che ha un'affinità di legame con il bersaglio molto maggiore dei singoli frammenti che la compongono.

Per poter applicare al meglio il FBDD è importante avere a disposizione una libreria di frammenti, utilizzare dei metodi per il riconoscimento dei frammenti che legano il bersaglio e accrescere i frammenti identificati in modo tale da sviluppare una molecola con la capacità di legare un bersaglio specifico con un'alta affinità.

Il FBDD è diventata una strategia molto usata nella realizzazione di farmaci con lo scopo di andare a inibire il bersaglio.

Un esempio è il Pexidartinib, inibitore delle tirosin-chinasi (TKI) approvato nell'Agosto del 2019 dal FDA per pazienti adulti affetti da tumore tenosinoviale delle cellule giganti (TGCT).

L'efficacia del Pexidartinib è stata studiata sia come monoterapia che in associazione ad altre molecole per la risoluzione del TGCT.

Nonostante Pexidartinib sia stato approvato solo per questo tipo di tumore, potrebbe essere una molecola importante per la risoluzione di altri tumori o malattie neurodegenerative.

INTRODUZIONE AL FRAGMENT-BASED DRUG DISCOVERY (FBDD)

Il Fragment-Based Drug Discovery (FBDD) è un metodo abbastanza recente utilizzato per sviluppare composti molto potenti e con un'elevata affinità di legame con il bersaglio, partendo da piccoli frammenti.

Di solito il FBDD parte da piccole molecole che hanno una bassa affinità di legame con il bersaglio, una struttura chimica non particolarmente complessa e un peso molecolare molto basso, intorno ai 300 Dalton (Da).(1)

Questi piccoli frammenti con le caratteristiche appena elencate vengono chiamati "Hit" e vengono scelti e utilizzati a partire da una libreria di composti, sfruttando metodi biofisici molto sensibili.

I frammenti identificati vengono poi fatti accrescere in composti con un peso molecolare maggiore e con un'elevata affinità di legame con il bersaglio attraverso diverse strategie.

Il FBDD ha sicuramente degli svantaggi, ma presenta anche numerosi vantaggi.

Lo svantaggio maggiore del FBDD è il fatto che non può rimpiazzare l'high-throughput screening (HTS o screening ad alta capacità), metodo molto utile per la scoperta di nuovi farmaci o molecole.

Nonostante ciò, il FBDD è una strategia molto utilizzata in quanto riduce i costi sperimentali, trova e accresce gli "Hits", cioè i frammenti, per la formazione di nuovi composti.

Molti studiosi e ricercatori, proprio per i vantaggi che offre questa strategia, hanno cominciato a utilizzarla soprattutto per sviluppare potenti molecole inibitorie contro diversi tipi di bersagli.

Il FBDD è stato molto utilizzato e sviluppato negli ultimi anni anche grazie allo sviluppo delle tecniche di screening, tanto che al giorno d'oggi ha un ruolo molto importante nel

target-based drug discovery.

Infatti a partire dal FBDD sempre più farmaci sono stati sviluppati e sono tutt'ora studiati negli studi preclinici e clinici di fase I, II e III.

Molti farmaci sviluppati a partire da questa nuova strategia sono anche stati approvati e sono, quindi, entrati in commercio.

Ne è un esempio il Pexidartinib, inibitore delle tirosin-chinasi (TKI) approvato nell'Agosto del 2019 dal FDA per pazienti adulti affetti da tumore tenosinoviale delle cellule giganti (TGCT).

Per poter utilizzare il FBDD bisogna, innanzitutto, avere una libreria di frammenti di riferimento, poi è necessario riuscire a identificare i frammenti desiderati grazie a varie tecniche di screening dei frammenti che forniscono molte indicazioni per poter effettivamente individuare il frammento (hit) voluto.

Successivamente si determina la struttura formata dal legame tra il frammento e il bersaglio, si analizza la relazione struttura-affinità (SAR) e infine si utilizzano delle strategie per accrescere il frammento o i frammenti individuati in molecole più potenti in modo tale da poter legare ed inibire selettivamente il bersaglio (Figura 1).(2)

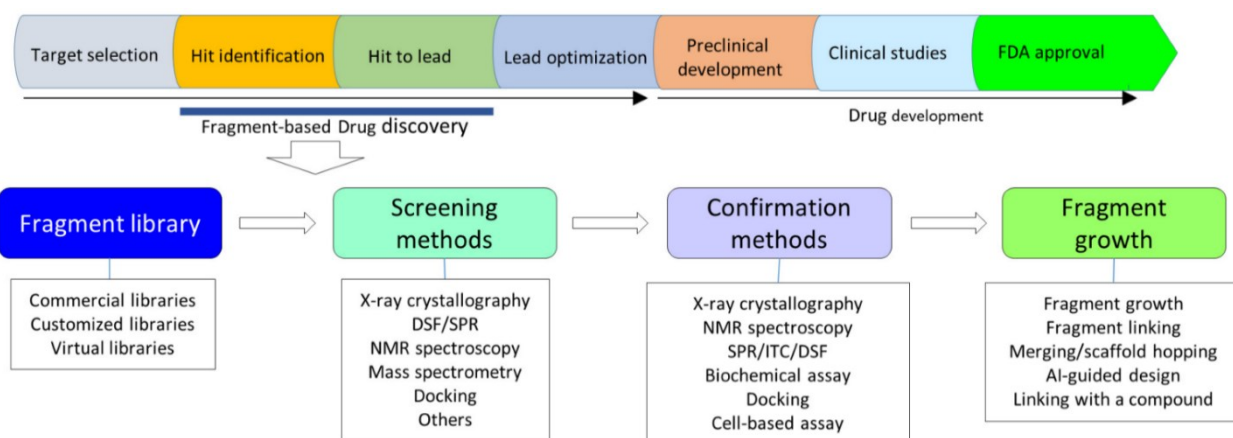


Figura 1 (2)

LIBRERIA DI FRAMMENTI

Non sono state individuate regole precise per quanto riguarda il numero, la struttura molecolare o il peso molecolare dei composti che devono essere presenti nella libreria di frammenti.

Già il termine frammento fa capire che si tratta di molecole molto piccole, quindi, con una struttura chimica non molto complessa e un peso molecolare ridotto.

Grazie alla libreria di frammenti è possibile individuare un certo numero di molecole (hits) che si legano al bersaglio prescelto e selezionare quella con un'affinità di legame maggiore per poterla poi ottimizzare, accrescere e sviluppare in un farmaco che andrà ad inibire il bersaglio.

Anche se non ci sono regole ben precise sulla libreria di frammenti, sono spesso consigliate la regola del tre o la regola del cinque.

Secondo la regola del tre, i frammenti presenti nella libreria devono avere un peso molecolare inferiore ai 300 Da, un coefficiente di ripartizione (ClogP) minore di tre e meno di tre idrogeni accettori e donatori.

Invece per quanto riguarda la regola del cinque, come si può ben immaginare, i frammenti presenti nella libreria devono avere un peso molecolare inferiore a 500 Da, un coefficiente di ripartizione (ClogP) inferiore a cinque e meno di cinque idrogeni donatori e accettori.

Recenti studi hanno dimostrato che non bisogna obbligatoriamente seguire le regole appena descritte, in quanto i frammenti presenti nelle librerie sono piccole molecole organiche individuabili grazie agli screening e che possono essere successivamente modificate in modo efficiente a seconda della necessità.(3)

Infatti, molti ricercatori hanno la propria libreria di frammenti nella quale i composti presenti possono avere un peso molecolare anche superare i 300 Da, senza quindi seguire la regola del tre.

Nello screening virtuale, la libreria di frammenti può essere incrementata anche di molto per quanto riguarda il numero e la diversità dei frammenti presenti, in quanto lo screening può essere effettuato in tempi brevi.

Infatti, il numero di composti all'interno di una libreria non è affatto un fattore limitante visto che esistono tecniche di screening molto rapide per poter individuare il frammento desiderato.

Inoltre avere una libreria con più frammenti all'interno risulta vantaggioso anche perché si possono individuare un numero maggiore di frammenti che possono essere utilizzati per lo sviluppo di un nuovo farmaco.

Potenzialmente anche con una libreria di pochi frammenti (800 frammenti) si può sviluppare un farmaco molto potente, ma è evidente che utilizzare una libreria con molti più frammenti (20000 frammenti) è molto vantaggioso in quanto ho una maggiore possibilità di trovare frammenti con un'affinità di legame migliore con il bersaglio e sviluppare un nuovo composto.

Molte librerie di frammenti sono reperibili in commercio, invece, altri ricercatori hanno creato la loro libreria in base alle loro esperienze.

Spesso le librerie di frammenti non contengono composti che legano con un'affinità molto elevata il bersaglio, che formano legami covalenti con la proteina o che formano aggregati, ma contengono frammenti che legano debolmente il bersaglio e che mi serviranno come molecole di partenza per sviluppare farmaci molto potenti.

Riassumendo, la libreria di frammenti è molto vantaggiosa perché, avendo un elevato numero di frammenti, consente utilizzare il FBDD per sviluppare composti diversi in base al bersaglio scelto.(2)

METODI DI SCREENING DEI FRAMMENTI

L'affinità di legame tra i frammenti e i loro bersagli solitamente è molto bassa, è una concentrazione che varia dal micromolare al millimolare, quindi difficilmente individuabile.

Esistono varie tecniche per identificare una molecola desiderata, ma non tutte sono effettivamente efficaci quando si tratta di individuare dei frammenti, in quanto questi

non solo sono di dimensione ridotta, ma tendono ad avere una bassa affinità di legame con il bersaglio.

Infatti tramite metodi biochimici, quali saggi di spettrofotometria e di fluorescenza, è difficile riuscire ad individuare il frammento e l'interazione di legame dello stesso con la proteina bersaglio.

Quindi è necessario utilizzare metodi alternativi, più sensibili e più efficaci per l'identificazione dei frammenti e della loro bassa affinità di legame con il bersaglio.

Alcuni di questi possibili approcci biofisici sono: la fluorimetria a scansione differenziale (DSF), la calorimetria isoterma di titolazione (ITC), la risonanza magnetica nucleare (NMR), la risonanza plasmonica di superficie (SPR) e la cristallografia a raggi-X.

Sono tutte strategie ampiamente usate nel campo della ricerca per la determinazione dei frammenti nel FBDD.(2)

FLUORIMETRIA A SCANSIONE DIFFERENZIALE (DSF)

La fluorimetria a scansione differenziale (DSF) è un metodo che serve per misurare la denaturazione di una proteina, indotta dal calore, in presenza di un colorante fluorescente come il Sypro Orange, che si lega nelle regioni idrofobiche di una proteina. Questo approccio si basa sul fatto che le proteine tendono a perdere stabilità e quindi a denaturarsi in presenza di temperature elevate.

La temperatura alla quale la quantità di proteina stabile e la quantità di proteina denaturata si equivalgono è detta temperatura di fusione, anche se comunemente ci si riferisce con il termine in lingua inglese temperatura di melting TM.

Quando un frammento o un composto si lega alla proteina normalmente ne aumenta la stabilità grazie all'instaurarsi di nuove interazioni molecolari, in questo modo ne aumenta la temperatura di melting, così si riesce ad identificare il frammento desiderato che viene denominato "positive hit".

La fluorimetria a scansione differenziale (DSF) è un metodo molto sensibile grazie al quale si possono analizzare e individuare centinaia o anche migliaia di frammenti al giorno in laboratorio.

Questo è uno dei vantaggi principali di questo metodo che lo rende anche uno dei metodi più attrattivi nello screening dei frammenti.

Un altro vantaggio è che nella miscela di analisi la concentrazione di proteina è molto bassa e richiede solo piccole quantità di frammenti, cosa molto utile soprattutto per quelle proteine che possono essere instabili ad alte concentrazioni.

Di solito, la concentrazione di proteina nella miscela è micromolare, mentre la concentrazione dei frammenti è millimolare.

Una differenza così elevata di concentrazioni porta ad un aumento della temperatura della proteina, ed è stato osservato, in molti casi, che l'aumento della temperatura è proporzionale alla concentrazione dei frammenti e alla loro affinità di legame con la proteina.

Bisogna, però, fare attenzione a non voler identificare subito il frammento in base all'aumento di temperatura della proteina perché questa correlazione non sempre è veritiera.

Quindi bisogna affidarsi ad altri metodi per avere delle informazioni più precise sul

frammento in esame. (Figura 2).

Infatti, è stato osservato che l'aumento di temperatura della proteina può essere dato, non solo dall'affinità di legame del frammento con la stessa, ma anche da altri fattori come il cambiamento strutturale della proteina quando questa si trova legata ad un ligando.(4) Inoltre i cambiamenti di temperatura della proteina non sono sempre positivi, cioè quando un frammento lega la proteina, non sempre abbiamo un aumento di temperatura, ma possiamo osservare anche una diminuzione della stessa e quindi avremo un cambiamento negativo.

Nonostante la fluorimetria a scansione differenziale (DSF) sia un metodo molto utile e sensibile per l'individuazione dei frammenti e del loro legame con la proteina, questo approccio presenta comunque delle limitazioni come una bassa accuratezza per quanto riguarda il cambiamento della temperatura della proteina che può essere positivo o negativo.(2)

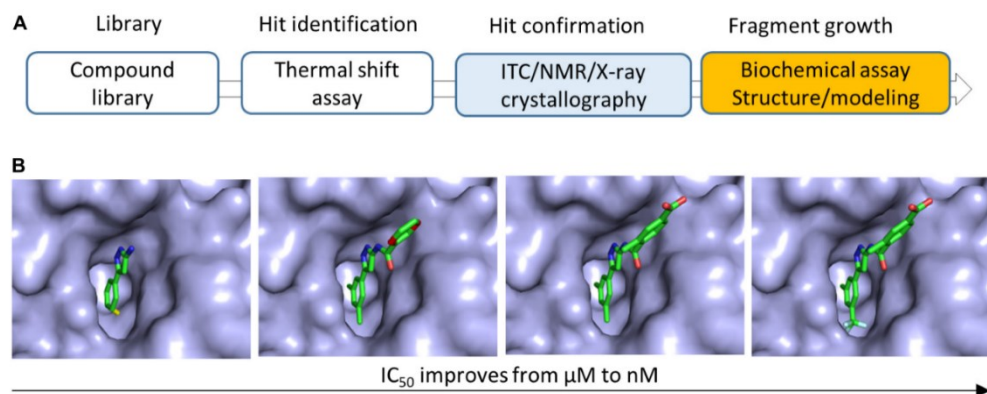


Figura 2 (2)

CALORIMETRIA ISOTERMICA DI TITOLAZIONE (ITC)

La calorimetria isoterma di titolazione (ITC) è un metodo molto potente che permette di misurare l'affinità di legame, il legame stechiometrico e i cambiamenti di entalpia del legame del frammento con la proteina nella soluzione in esame.(5)

La calorimetria isoterma di titolazione (ITC) segue diversi passaggi.

Il primo passaggio è quello di andare a tritare una molecola, in questo caso il frammento desiderato, e aggiungerlo ad una soluzione contenente la proteina bersaglio. Il secondo passaggio è quello di misurare il cambiamento di temperatura della soluzione. Infine, l'ultimo passaggio è quello di analizzare i dati ottenuti e identificare il frammento desiderato.

Quindi, la calorimetria isoterma di titolazione (ITC) è un approccio utilizzato soprattutto per determinare l'affinità di legame del frammento con la proteina bersaglio, andando a valutare il cambiamento di temperatura nella soluzione causato proprio dal legame tra il frammento e la proteina.

Questo metodo è molto utilizzato per determinare i frammenti (hit), ma è anche utile nei passaggi di "hit to lead" e "hit optimization" dove, una volta identificato il frammento, si cerca di ottimizzarlo e svilupparlo in una molecola più potente.

La calorimetria isoterma di titolazione (ITC) è una tecnica usata per caratterizzare dei frammenti e la loro interazione con il bersaglio, ma ha delle limitazioni che riducono la sua applicazione nella scoperta di nuovi farmaci.

Innanzitutto, frammenti con una affinità di legame particolarmente bassa potrebbero non essere rilevati con questo metodo.

Inoltre, è una tecnica che richiede molto tempo ed anche una grande quantità di proteina, a differenza invece del DSF.

Infine, non tutte le proteine possono essere studiate tramite questo approccio, in quanto alcune proteine possono aggregarsi, andando così a modificare i risultati che si otterrebbero.

Comunque, la calorimetria isoterma di titolazione (ITC) è una tecnica utile che può fornire buone informazioni sui frammenti testati.(2)

RISONANZA PLASMONICA DI SUPERFICIE (SPR)

La risonanza plasmonica di superficie (SPR) è una tecnica molto utilizzata nel verificare il legame tra proteina e proteina, tra proteina e ligando, tra proteina e DNA/RNA.

Con la risonanza plasmonica di superficie (SPR), non solo si riesce a misurare la specificità di legame, l'affinità di legame e i parametri termodinamici dell'interazione tra il ligando (frammento) e la proteina, ma si riescono a misurare anche le costanti di associazione o di dissociazione, le quali forniscono maggiori informazioni per quanto riguarda il legame tra la proteina e il ligando.

Tramite questa tecnica si può capire meglio la relazione tra l'affinità di legame del ligando con la proteina e la sua attività, infatti è un approccio molto usato sia per l'identificazione dei frammenti (hit) che nella loro ottimizzazione (lead optimization). Conoscere le costanti di associazione e di dissociazione delle molecole fornisce un enorme aiuto nel capire meglio la relazione struttura-attività (SAR).

Per effettuare la misurazione ed ottenere così tutti i dati desiderati, bisogna immobilizzare il campione in un "biosensor chip" adatto.

Infatti, esistono vari "chip" per immobilizzare le proteine o i campioni voluti.

Alcuni esempi su come avviene l'immobilizzazione del campione sul chip sono i seguenti: si può immobilizzare il campione sulla superficie del "chip" tramite legami covalenti, oppure il campione si può legare al "chip" tramite legami non covalenti, ma utilizzando una molecola con un'alta affinità di legame.(6)

Uno dei vantaggi della risonanza plasmonica di superficie (SPR) è che, per immobilizzare il campione sul "chip", è richiesta solo una piccola quantità di quel campione.

Inoltre, i campioni immobilizzati sul "chip" possono essere anche riutilizzati, quindi questo metodo è applicabile anche a proteine con un basso rendimento.

Si è osservato che la risonanza plasmonica di superficie (SPR) si è rivelata una tecnica molto importante nello screening (identificazione) dei frammenti.

Infatti, degli studi hanno dimostrato che questo metodo può essere applicato anche in sistemi molto complessi nei quali sono presenti molte proteine.

La risonanza plasmonica di superficie (SPR) presenta diversi vantaggi rispetto alle altre tecniche biofisiche per quanto riguarda l'individuazione dei frammenti, in quanto richiede una quantità veramente bassa di campione, che può anche essere riutilizzato,

fornendo informazioni anche sulla cinetica e termodinamica dell'interazione tra il ligando e la proteina. (2)

SPETTROSCOPIA RISONANZA MAGNETICA NUCLEARE (NMR)

La spettroscopia risonanza magnetica nucleare (NMR) è una tecnica molto potente per la scoperta di nuovi farmaci, in particolare è importante per il FBDD.

Questa tecnica è così sensibile che riesce ad identificare anche frammenti con affinità di legame molto diverse e basse, infatti può rilevare frammenti con una concentrazione compresa tra millimolare e il nanomolare.

L'identificazione di frammenti con la spettroscopia risonanza magnetica nucleare (NMR), in confronto con le altre tecniche, presenta meno falsi positivi e può essere utilizzata anche su una miscela contenete più frammenti.

Molti studi, nel FBDD, hanno utilizzato la risonanza magnetica nucleare (NMR) per identificare dei frammenti che legassero il bersaglio.

Nell'identificazione di frammenti tramite la risonanza magnetica nucleare (NMR) si possono individuare sostanzialmente due strategie.

Nella prima, si controllano eventuali cambiamenti nel segnale dei ligandi (frammenti), nella seconda, invece, si controllano eventuali cambiamenti nel segnale del bersaglio (proteina).

Infatti, è una strategia molto rapida quella di controllare i cambiamenti dei segnali dei ligandi in presenza o assenza del bersaglio.

Questo metodo non presenta alcuna limitazione per quanto riguarda la grandezza della proteina bersaglio.

Inoltre, si possono identificare più frammenti contemporaneamente, dal momento che si può utilizzare una miscela formata da più frammenti, ma bisogna prestare attenzione a quali frammenti selezionare e inserire nella miscela, visto che possono dare sovrapposizione dei segnali, impedendo così la loro identificazione.

La risonanza magnetica nucleare (NMR) gioca un ruolo molto importante anche nel valutare le diverse affinità di legame dei frammenti individuati con il bersaglio e nel determinare quale frammento sia effettivamente migliore per il legame.(7)

La risonanza magnetica nucleare con un atomo di fluoro (^{19}F -NMR) è un'altra strategia molto efficiente per l'identificazione dei frammenti.

Infatti, l'atomo di fluoro non è presente nelle molecole biologiche ed è invece molto usato nella scoperta di nuove molecole e farmaci, dal momento che migliora le caratteristiche degli stessi.

Lo scopo di utilizzare ^{19}F -NMR è che non dà luogo a segnali che potrebbero derivare da molecole biologiche, quindi presenta solo segnali molto chiari.

I nuclei di ^{19}F possono essere misurati facilmente con NMR, visto che in natura hanno un'abbondanza percentuale del 100%.

^{19}F -NMR è una strategia molto utilizzata per la scoperta di nuovi farmaci e per l'identificazione dei ligandi, inoltre richiede solo piccole quantità di campione per ottenere le misurazioni.

Grazie ai segnali molto chiari del ^{19}F , è possibile identificare più frammenti presenti in una miscela, il che aiuta a risparmiare molto tempo.

^{19}F -NMR è un metodo molto potente, nel FBDD, soprattutto grazie alla possibilità di utilizzare librerie di composti fluorurati (19F-compounds). Inoltre, è una strategia molto attrattiva perché consente di identificare molti frammenti (hit) presenti nella miscela e, quindi, di scegliere quello più adatto. L' ^1H - ^{15}N -HSQC (Hetero-Nuclear Single Quantum coherence spectroscopy) è un altro metodo molto usato nella spettroscopia NMR di molecole organiche e di proteine per verificare l'interazione tra la proteina bersaglio e il ligando. Questo metodo consiste nel monitorare i cambiamenti chimici degli aminoacidi delle proteine in presenza o assenza del ligando, determinando la presenza o meno dell'interazione tra le due molecole, la loro affinità di legame e il sito di legame del ligando. Infatti, il complesso proteina bersaglio-ligando può essere ottenuto tramite il cambiamento chimico e conformazionale della proteina, indotto dal legame con il ligando. Questo metodo è particolarmente utile quando si lavora con proteine che non possono essere cristallizzate o la cui cristallizzazione risulterebbe molto difficile da ottenere. Tutti questi approcci fanno comprendere che è possibile ridurre il costo di produzione delle proteine utilizzando metodi molto sensibili per i quali è richiesta una quantità molto bassa di campione che potrebbe anche essere riutilizzato o scegliendo approcci che diano risultati in tempi più brevi e che possano analizzare più frammenti presenti in una sola miscela.(2)

CRISTALLOGRAFIA A RAGGI-X

La cristallografia a raggi-X è un metodo molto usato per ottenere strutture di proteine o di complessi di proteine legati ai ligandi con un'alta risoluzione. Ha un ruolo centrale nella scoperta di nuovi farmaci basandosi sulla struttura delle molecole. Infatti molti farmaci, potenti inibitori di proteine, sono stati sviluppati proprio a partire dalla conoscenza della loro struttura, ottenuta tramite cristallografia a raggi-X. La conoscenza della struttura di una molecola è un'informazione fondamentale in quanto, da questa, si può risalire alla relazione struttura-attività (SAR) e al meccanismo d'azione (MoA) dei composti che si andranno a sviluppare. Inoltre, le strutture ottenute tramite cristallografia a raggi-X possono fornire informazioni per comprendere come avvengono i legami degli inibitori che si legano in modo specifico al sito attivo della proteina bersaglio o che si legano al sito allosterico della proteina formando un legame covalente con il bersaglio. La cristallografia a raggi-X è utile nel FBDD perché permette di identificare i frammenti (hit) e selezionare quelli più adatti ad essere ottimizzati (hit optimization).(8) Infatti, con questo metodo si può immergere un frammento nella struttura cristallina di una proteina e determinare la capacità di legame del ligando con la stessa. La tattica migliore nel FBDD, ma anche semplicemente nella scoperta di nuovi farmaci, sta nell'utilizzare la cristallografia a raggi-X in combinazione con altri metodi biofisici per ottenere più informazioni possibili sulla proteina bersaglio, sul ligando e sulla loro interazione, in modo tale da poter successivamente sviluppare una molecola che possa

inibire in modo selettivo ed efficace il bersaglio.

Purtroppo, in alcuni studi, si è notato che non tutte le proteine sono adatte ad essere cristallizzate e, quindi, non è sempre possibile avere informazioni sulla loro struttura. (2)

METODI COMPUTAZIONALI

Lo screening virtuale è un metodo computazionale utilizzato nello screening dei frammenti che fornisce informazioni molto utili sulla struttura chimica dei ligandi analizzati.

Questa strategia è vantaggiosa soprattutto per il fatto che, per effettuare lo screening dei frammenti, si possono utilizzare numerose librerie di frammenti.(9)

Lo screening virtuale si applica tramite vari passaggi quali: la determinazione della struttura del bersaglio (proteina), del legame tra il ligando (frammento) e il bersaglio stesso, infine, la conferma del ligando scelto (hit confirmation) tramite una simulazione MD (dinamica molecolare) virtuale dell'interazione delle due molecole.

Infatti, la simulazione MD (dinamica molecolare) virtuale è un insieme di tecniche computazionali di simulazione, dove si possono studiare l'evoluzione e la dinamica di un sistema fisico o chimico anche a livello molecolare.

Quindi tramite lo screening virtuale, che permette di analizzare un numero molto elevato di librerie di frammenti, si possono individuare una grande quantità di frammenti che legano la proteina bersaglio (hit) e, partendo da questi, sviluppare una nuova molecola.

Inoltre, i metodi computazionali possono fornire indicazioni importanti anche nell'ottimizzazione dei frammenti (hit optimization e hit-to-lead).(2)

ALTRI METODI

Sebbene i metodi sopra descritti siano molto utili nel FBDD per l'individuazione e la determinazione dei frammenti e del loro legame con il bersaglio, esistono anche altri metodi che possono essere utilizzati a tale fine.

Infatti, sono stati sviluppati altri metodi per formare inibitori di proteasi.

Un esempio è l'elettroforesi per capillarità (CE), un insieme di tecniche di separazione elettrocinetica in capillari di dimensioni minori del millimetro.

Le sostanze da analizzare, in questo caso i frammenti sotto l'azione di un campo elettrico, migrano attraverso una soluzione di elettroliti più o meno velocemente in base alla loro carica.

L'elettroforesi per capillarità (CE) è risultata una tecnica utile nel FBDD per l'individuazione di frammenti che si legano alla proteina bersaglio.

Un altro metodo sviluppato nel FBDD per l'individuazione di frammenti è la cromatografia a bassa affinità.

Questa tecnica consente di determinare le interazioni, anche deboli, tra una proteina ed il rispettivo ligando.

Il procedimento consiste di tre fasi.

La prima fase consiste nel formare una miscela contenente l'analita (ligando) e aggiungerla a quella contenente il bersaglio, formando il complesso bersaglio-ligando.

In questa prima fase è evidente come conoscere le caratteristiche chimico-fisiche delle sostanze sia molto importante.

Nella seconda fase si aggiunge una soluzione di lavaggio alla miscela per allontanare tutte le altre molecole indesiderate.

Nella terza fase, invece, si utilizza un eluente, che permette di separare il legame tra il ligando e il bersaglio, ottenendo il frammento desiderato in soluzione.

Nel FBDD, la cromatografia a bassa affinità, come suggerisce il nome, è utile soprattutto per la determinazione di frammenti che si legano debolmente al bersaglio.

La spettroscopia di massa è un altro metodo che si può utilizzare nel FBDD per l'identificazione di frammenti che formano legami covalenti con il bersaglio.

Quindi, è una tecnica che permette di rilevare solo frammenti con un'elevata affinità di legame con il bersaglio, meno utile di altre tecniche già viste, dal momento che, spesso, l'affinità di legame tra il frammento e la proteina è molto debole.(10)

In generale, qualsiasi approccio di screening che verifichi il legame tra il ligando e il bersaglio, potenzialmente, può essere utilizzato nel FBDD per l'identificazione dei frammenti, anche se ovviamente è meglio adoperare un metodo che consenta di risparmiare i costi e i tempi di ottenimento dei risultati.

Tra tutti i metodi visti precedentemente uno dei migliori da utilizzare, quando possibile, è la cristallografia a raggi-X, visto che fornisce informazioni molto utili e precise sia per l'identificazione che per l'accrescimento dei frammenti.

Invece, lo screening virtuale e l'NMR sono dei metodi che possono essere utilizzati per l'identificazione dei frammenti solo quando è possibile purificare la proteina bersaglio e quindi conoscerne la struttura. (Figura 1). (2)

OTTIMIZZAZIONE DEI FRAMMENTI

Nel FBDD si utilizzano dei frammenti che si legano debolmente al bersaglio e, così come sono, non presentano un'attività inibitoria potente sull'attività della proteina.

Per questo motivo è necessario modificare, e quindi ottimizzare, chimicamente i frammenti (hit) in composti che abbiano un'affinità di legame maggiore con il bersaglio grazie al procedimento chiamato "hit-to-lead", dove i frammenti (hit) vengono modificati e diventano composti molto potenti (lead) con la capacità di inibire l'attività del bersaglio.(11)

Nell'ottimizzazione dei frammenti si utilizzano 3 strategie: l'accrescimento dei frammenti (fragment growing), la fusione dei frammenti (Fragment merging o fragment hopping) ed, infine, il legame fra frammenti (fragment linking). (2)

ACCRESIMENTO DEI FRAMMENTI

L'accrescimento di frammenti è la strategia più utilizzata per modificare un frammento (hit) in un composto che, nonostante presenti un peso molecolare maggiore rispetto al frammento di partenza, dimostra un'elevata affinità di legame con il bersaglio, andando a inibire fortemente la sua attività.

Per modificare ed accrescere il frammento, possono essere utilizzati vari gruppi chimici che vengono aggiunti allo stesso, aumentandone l'efficacia e la potenza.(12)

Nell'accrescimento di frammenti è molto importante avere informazioni sulla struttura del frammento, sulla struttura del bersaglio e sul complesso frammento-bersaglio, ottenute tramite la cristallografia a raggi-X che fornisce, appunto, le strutture cristalline dei composti appena citati.

Anche se, è stato notato da altri ricercatori che, anche in assenza della conoscenza della struttura del complesso frammento-bersaglio, è possibile ottimizzare un frammento (hit) in un composto molto potente (lead).

Altre tecniche biofisiche e biochimiche giocano un ruolo importante per conoscere la relazione struttura-attività (SAR) del ligando con il bersaglio, grazie alla quale è possibile accrescere un frammento (hit) in un composto molto potente (lead) con più facilità, avendo più informazioni a disposizione.

L'accrescimento di frammenti si è rivelata una strategia molto utile per lo sviluppo di molti farmaci inibitori contro i relativi bersagli. (figura 2)(Table 2)

Ne sono un esempio i seguenti farmaci: Pexidartinib, Vemurafenib, Ventolax ed Erdafitinib.

Tutti questi medicinali sono stati sviluppati grazie al FBDD, in particolare utilizzando la strategia dell'accrescimento dei frammenti appena descritta.

Come si può notare nel caso del Pexidartinib e del Vemurafenib, per lo sviluppo di questi medicinali, si è partiti dallo stesso frammento, il 7-azaindolo, che successivamente è stato modificato aggiungendo gruppi chimici e molecole differenti fino ad arrivare a sviluppare due farmaci inibitori molto potenti contro due diversi bersagli.

In particolare, Pexidartinib è un farmaco inibitore delle tirosin-chinasi (TKI) molto potente e nello specifico è selettivo contro il CSF1R, la cui interazione con CSF1 promuove il TGCT.

Questo dimostra come il FBDD, e in particolare l'utilizzo della strategia di accrescimento dei frammenti, sia una tecnica molto utile e innovativa, visto che anche partendo dallo stesso frammento si riesce, in base a come viene modificato, a sviluppare farmaci molto efficaci e potenti che agiscono su bersagli diversi. (Figura 3). (2)

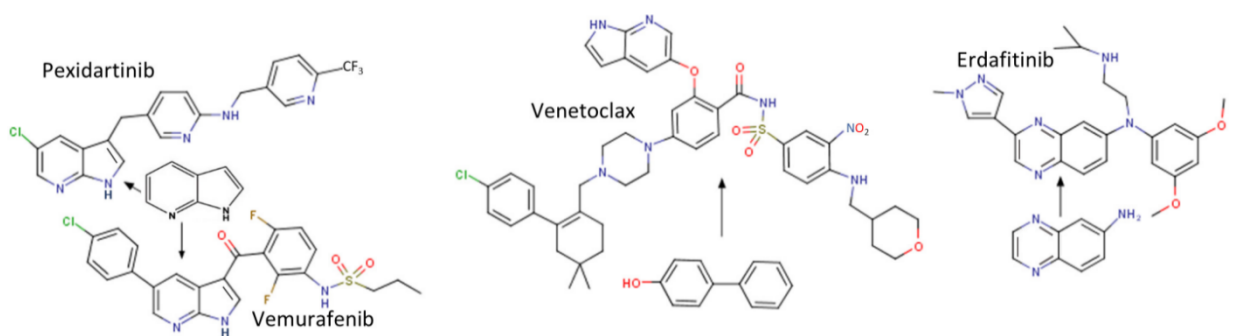


Figura 3 (2)

TABLE 2 | List of some targets with inhibitors designed using FBDD*.

Targets	Methods	References
KRAS	NMR and microscale thermophoresis	Kessler et al., 2019
PYCR1	Biochemical assay	Milne et al., 2019
Colony-stimulating factor 1	Computational approach	Machiraju et al., 2019
Bruton's Tyrosine Kinase	Mass spectrometry	Hopkins et al., 2019
The atypical protein kinase C-iota	Thermal shift assay	Kwiatkowski et al., 2018, 2019
Latency-associated nuclear antigen	SPR, DSF	Kirsch et al., 2019
Monoamine oxidase	X-ray crystallography	Cheng et al., 2019
Myeloid cell leukemia 1	NMR	Murray J.B. et al., 2019; Szlávik et al., 2019
β -ketoacyl-ACP synthases	X-ray crystallography	Patterson et al., 2020
VEGFR-2	Computational design	Zhang et al., 2019
West Nile viral protease	STD-NMR	Schöne et al., 2017
Transcriptional repressor EthR2	TSA and X-ray	Prevet et al., 2019
Programmed death ligand 1 (PD-L1)	NMR and X-ray	Perry et al., 2019
Estrogen Receptor α and 14-3-3 (PPI)	MS and X-ray	Sijbesma et al., 2019
The RNA-dependent RNA polymerase	X-ray	Riccio et al., 2019
Apical membrane antigen 1	PRE, NMR	Akter et al., 2019
Glyoxalase 1	Computational approach	Perez et al., 2019
Focal Adhesion Kinase	SPR and NMR	Alvarado et al., 2019
<i>E. coli</i> DsbA	NMR/X-ray	Duncan et al., 2019
PDE δ -RAS (PPI)	STD, CMPG-NMR	Chen et al., 2019

*This table lists some studies using FBDD. Only a few studies published in 2019 were listed for elucidating the application of FBDD to multiple targets. There are over two hundred publications in 2019 and over one hundred publications as of June 2020 when fragment-based drug discovery is searched as a keyword in pubmed (<http://www.pubmed.gov>).

Table 2 (2)

FUSIONE DI FRAMMENTI

La fusione dei frammenti (Fragment merging o fragment hopping) è un'altra strategia utilizzata per modificare i frammenti e svilupparli in composti molto potenti che legano il bersaglio con un'elevata affinità.

Questa strategia è basata sulla fusione dei frammenti, ma per poterli fondere è necessario che, i frammenti selezionati, presentino il sito di legame con il bersaglio sovrapposto.

Tramite questa strategia, si possono sviluppare composti molto potenti grazie alla fusione dei gruppi chimici o delle strutture chimiche di due o anche di più frammenti. Per poter utilizzare la fusione dei frammenti è necessario anche conoscere il sito di legame del frammento e come questo si lega al bersaglio.

Queste informazioni vengono fornite tramite la cristallografia a raggi-X e la spettroscopia NMR.

La strategia di fondere i frammenti risulta utile per rimpiazzare le strutture molecolari non utili per lo sviluppo del farmaco con strutture fondamentali per aumentare l'affinità di legame con il bersaglio della nuova molecola ottenuta.(13)

A differenza dell'accrescimento dei frammenti, però, per poter applicare la fusione dei frammenti, bisogna determinare quale sia effettivamente la parte del frammento fondamentale per il legame con il bersaglio e come questo legame avvenga.

Anche questa strategia, comunque, ha portato ad ottimi risultati visto che con essa si sono potuti sviluppare molti farmaci inibitori contro bersagli diversi. (2)

LEGAME FRA FRAMMENTI

Il legame fra frammenti (fragment linking) è considerato uno dei metodi più potenti ed efficaci, grazie al quale, partendo dai frammenti, si riescono a sviluppare molecole inibitorie molto potenti (lead) contro il bersaglio.

Questo metodo consente di sviluppare un composto molto potente, partendo dal legame tra due o anche più frammenti.

Non a caso questa strategia viene considerata una delle migliori, infatti, si possono sviluppare composti con un'affinità di legame con il bersaglio enormemente più alta rispetto a quella di partenza e, spesso, anche rispetto ai composti sviluppati a partire dagli altri metodi prima descritti.

Basti pensare che, considerando l'energia libera di legame, partendo dal legare due frammenti con un'affinità di legame intorno ad una concentrazione millimolare (10^{-3} mM), si riesce a sviluppare un composto con un'affinità di legame ad una concentrazione nanomolare (10^{-9} nM).

Abbiamo una differenza di concentrazione di 10^6 volte, il che significa che il nuovo composto, così ottenuto, è in grado di legare il bersaglio ad una concentrazione inferiore di 10^6 volte rispetto ai singoli frammenti che lo compongono, il che fa capire quanto sia enormemente maggiore la sua affinità di legame con il bersaglio.

La difficoltà nell'applicare questa strategia di legare fra loro i frammenti, sta nell'identificare due o più frammenti che si legano in siti del bersaglio molto vicini fra loro e successivamente aggiungere un linker opportuno che vada a legare i frammenti fra loro, senza andare ad inibire, però, la loro attività.

In modo particolare, sarebbe opportuno e più semplice scegliere un bersaglio che abbia delle tasche, per i siti di legame, relativamente grandi, e ovviamente vicine, per permettere una migliore identificazione dei frammenti che appunto si legano in queste tasche.

Come conseguenza evidente, anche questa strategia, a differenza dell'accrescimento dei frammenti, necessita di conoscere in modo molto dettagliato la struttura chimica dei frammenti, del bersaglio e del complesso che si viene a formare dalla loro interazione. Secondo alcuni ricercatori, questa tecnica, idealmente, può essere utilizzata quando la tasca del bersaglio contiene due siti di legame diversi con diverse affinità di legame con i ligandi (frammenti).

In modo particolare, il primo sito di legame della tasca aiuta ad identificare i frammenti che hanno un'affinità di legame maggiore con il bersaglio, invece per poter identificare i frammenti presenti nella seconda tasca, bisogna necessariamente bloccare il primo sito

di legame usando composti adeguati.

Infatti, per bloccare il primo sito di legame si possono utilizzare dei frammenti che hanno intrinsecamente un'elevata affinità con questo sito, ma è raro; oppure si può sviluppare un frammento, facendolo diventare un composto con un'elevata affinità per il primo sito di legame della tasca; infine, si può inserire un residuo di cisteina nel primo sito, in modo che formi un legame covalente con il frammento.

Successivamente, la tasca del bersaglio con il primo sito occupato può essere utilizzata per studiare l'affinità di altri frammenti con il secondo sito di legame.

Per identificare selettivamente diversi frammenti e la loro affinità di legame con siti diversi della tasca del bersaglio, si possono utilizzare delle molecole spia, caratterizzate ed elaborate sfruttando diversi metodi.(14)

La molecola spia viene legata dai frammenti con affinità diversa in base ai frammenti utilizzati, così si riesce, non solo a determinare quali frammenti si legano alla molecola spia, ma anche con quanta affinità.

Inoltre, per identificare i frammenti che si legano in siti diversi della stessa tasca del bersaglio, si possono utilizzare altre tecniche come ^{19}F -NMR e ^1H - ^{15}N -HSQC, che valutano proprio l'interazione tra il ligando e il bersaglio, fornendo informazioni molto utili nel FBDD. (figura 4).

Successivamente, legando con un linker i frammenti così identificati, si ottiene un composto inibitore molto potente contro il bersaglio studiato.

Per ottenere composti migliori si possono legare insieme due frammenti, identificati precedentemente, che abbiano un'affinità di legame con il bersaglio più alta possibile. Come si è potuto osservare con il FBDD, si possono formare composti potenti partendo da semplici frammenti che si legano debolmente al bersaglio tramite l'utilizzo di diverse strategie.

Si può decidere di usare una strategia invece che un'altra in base: all'efficacia della strategia stessa, in base alle informazioni a disposizione per quanto riguarda le tecniche usate per l'identificazione dei frammenti, alla struttura chimica dei frammenti, del bersaglio, del complesso ligando-bersaglio, alla loro affinità di legame e alla relazione struttura attività (SAR).

L'utilizzo di metodi computazionali aumenta enormemente la possibilità di sviluppare nuove molecole, se affiancato agli approcci di sviluppo nel FBDD sopra descritti. (2)

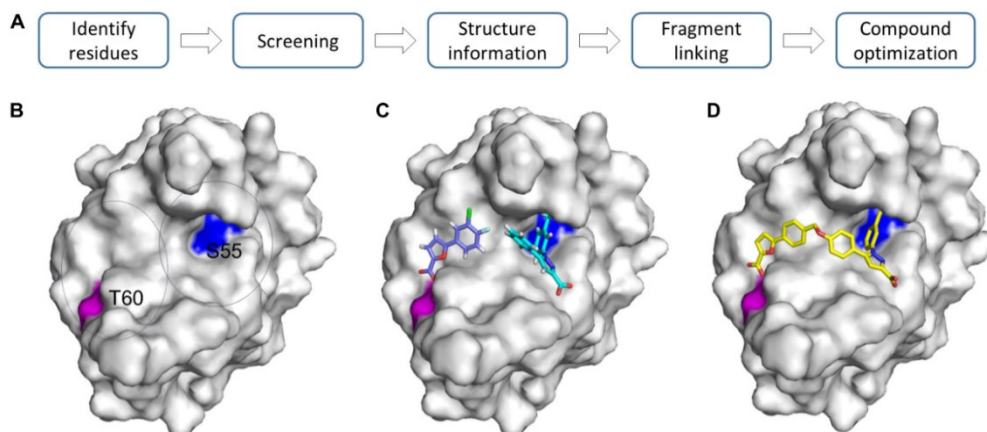


Figura 4 (2)

BERSAGLI PER IL FBDD

Il FBDD è un metodo innovativo e molto utile soprattutto nel campo della scoperta di nuovi farmaci che legano bersagli specifici con un'elevata affinità di legame.

Nella scoperta di nuovi farmaci si cerca di identificare la struttura del bersaglio, in modo particolare della tasca responsabile dei legami con il ligando, e, in base a queste informazioni, si cerca di identificare una molecola che riesca ad interagire con la proteina bersaglio e successivamente la si modifica, in modo tale da sviluppare un nuovo composto con un'aumentata affinità.(15)

Quindi, sono di particolare interesse scientifico i bersagli che possono essere legati più facilmente dai frammenti ("druggable" targets) perché è più facile e più probabile, in questi casi, trovare o sviluppare composti potenti ed efficaci che vanno ad inibire la proteina bersaglio.

Il vantaggio del FBDD è che, nonostante si preferisca utilizzarlo su bersagli che possano legare più facilmente il ligando, si può utilizzare anche su altri bersagli, per i quali non sempre è facile trovare un ligando adeguato o che comunque non si lega in modo tradizionale ("undruggable" targets). (Table 2).(2)

BERSAGLI CON IDROFOBICHE ("DRUGGABLE") O IDROFILICHE ("UNDRUGGABLE")

Un bersaglio "druggable" è un bersaglio che può essere legato facilmente dal ligando, il quale va ad inibire o comunque a modificare le funzioni biologiche della proteina.

Esistono diversi metodi per determinare quando un bersaglio è "druggable" o quando, invece, è "undruggable", cosa molto importante soprattutto nel campo della ricerca e sperimentazione per nuovi farmaci e molecole che devono agire su questi bersagli.

Uno di questi metodi consiste nello sfruttare il FBDD per identificare i frammenti che si legano con il bersaglio.

Infatti se si riescono ad identificare i frammenti, tramite varie tecniche di screening che verificano l'interazione tra ligando e bersaglio, significa che questi si sono effettivamente legati al bersaglio e dunque quest'ultimo risulterà "druggable".

Al contrario, se non si riescono ad identificare i frammenti significa che questi non si sono legati al bersaglio e, dunque, quest'ultimo risulterà "undruggable".(16)I bersagli "druggable" e "undruggable" presentano notevoli differenze, non solo per quanto riguarda la facilità di essere legati dai ligandi, ma anche per quanto concerne la struttura e l'idrofilia della tasca del bersaglio stesso.

Infatti, i bersagli "druggable" contengono una tasca idrofobica, quindi favoriscono il legame con ligandi (composti o frammenti) idrofobici o comunque con una certa idrofobia.

Quasi tutte le strategie, tra cui il FBDD si concentrano, prevalentemente, nello sviluppare nuovi farmaci che agiscono su questo tipo di bersagli, essendo questi i più facili da poter legare tramite i ligandi.

Invece, i bersagli "undruggable" sono diversi in quanto possono non contenere una tasca o, qualora la contenessero, questa si presenta come fortemente idrofila e non ben strutturata.

Tra i bersagli "undruggable" sono presenti moltissime proteine non ben definite e

strutturate, fondamentali nel controllo e nella regolazione di molte patologie, soprattutto tumorali.

Il problema sta proprio nel fatto che i bersagli “undruggable” sono quelli meno facilmente legabili dai ligandi, quindi per questi bersagli è spesso difficile trovare una terapia adeguata ed efficace.

Il FBDD è una strategia che si differenzia dalle altre per numerosi vantaggi: può sviluppare composti molto potenti partendo da molecole molto piccole e con bassa affinità di legame, è un metodo veloce ed economico, fornisce molte indicazioni sulla struttura chimica, sul legame, sulla SAR e sul complesso bersaglio-ligando.

Inoltre, a differenza di altre tecniche, può essere utilizzata non solo per sviluppare nuovi farmaci che agiscono su bersagli “druggable”, ma anche su bersagli “undruggable”, cosa che la rende una strategia molto attrattiva.(2)

TECNICHE PER SVILUPPARE FARMACI SU BERSAGLI CON TASCHE IDROFILICHE (“UNDRUGGABLE”)

Come si è potuto constatare, i bersagli “undruggable” non favoriscono l’interazione con il ligando, rendendo quindi difficile un approccio farmaceutico.

Per questo motivo, nel campo della ricerca, non si sono spesi molto tempo e risorse per questi tipi di bersagli, ci si è concentrati, invece, sui bersagli “druggable”, più facili da legare tramite un ligando.

Il problema è che i bersagli “undruggable” sono quelli più difficili da colpire, ma anche quelli che più comunemente portano allo sviluppo, alla crescita e proliferazione di cellule tumorali, quindi sono molto importanti nella possibile risoluzione di tumori.

Alcuni di questi bersagli “undruggable” sono: fattori di trascrizione, proteine Ras, fosfatasi e altre ancora.(17)

Anche se è vero che è difficile identificare il frammento per lo sviluppo di un nuovo farmaco che agisca su questi bersagli, dal momento che si fa fatica a trovare un ligando adeguato, è pur vero che si stanno sviluppando nuove strategie per riuscire a sviluppare dei farmaci che riescano ad inibire i bersagli “undruggable”.

Una strategia è quella di sviluppare inibitori allosterici, piccole molecole che legano il bersaglio in un sito diverso dal sito catalitico, riuscendo ad inibirlo.

Per esempio, tramite il FBDD si è riusciti a sviluppare un farmaco che andasse ad inibire le proteine Kras, responsabili della proliferazione e differenziazione cellulare in molti tumori.

Le proteine Kras sono considerate bersagli “undruggable”, dal momento che non possiedono una tasca utile per l’interazione con un ligando, invece, tramite l’applicazione del FBDD, si è riusciti a sviluppare una molecola inibitoria nei confronti di questi bersagli.

Ciò dimostra come il FBDD possa risultare una tecnica molto utile anche nello sviluppo di nuovi composti contro proteine bersaglio considerate estremamente difficili da inibire.

(2)

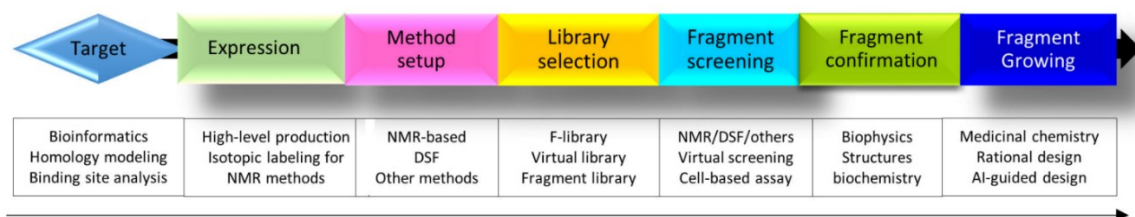


FIGURE 6 | A flowchart of FBDD. The steps required in FBDD are listed. Structural information of the target with a fragment is always helpful for fragment growth. X-ray, DSF, and NMR are commonly used methods in fragment screening.

Figura 6 (2)

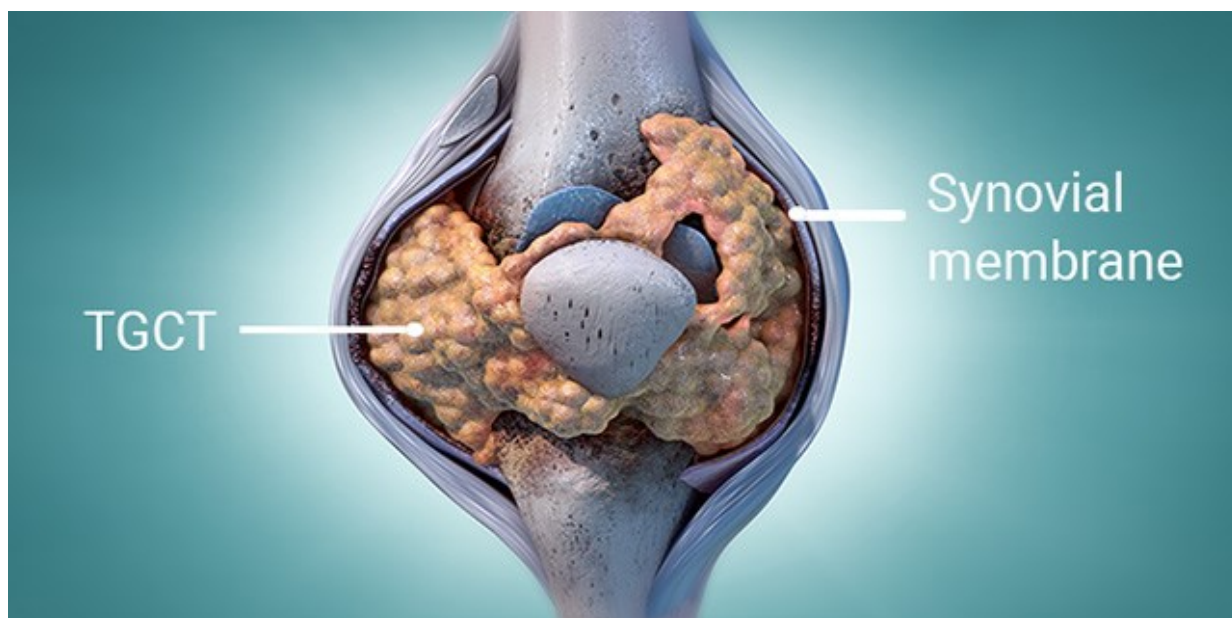
TUMORE TENOSINOVIALE DELLE CELLULE GIGANTI (TGCT)

Pexidartinib è un farmaco sviluppato tramite il FBDD ed è l'unico farmaco, approvato dal FDA, per il trattamento del tumore tenosinoviale delle cellule giganti (TGCT), qualora questo tipo di tumore non fosse removibile tramite operazione chirurgica.

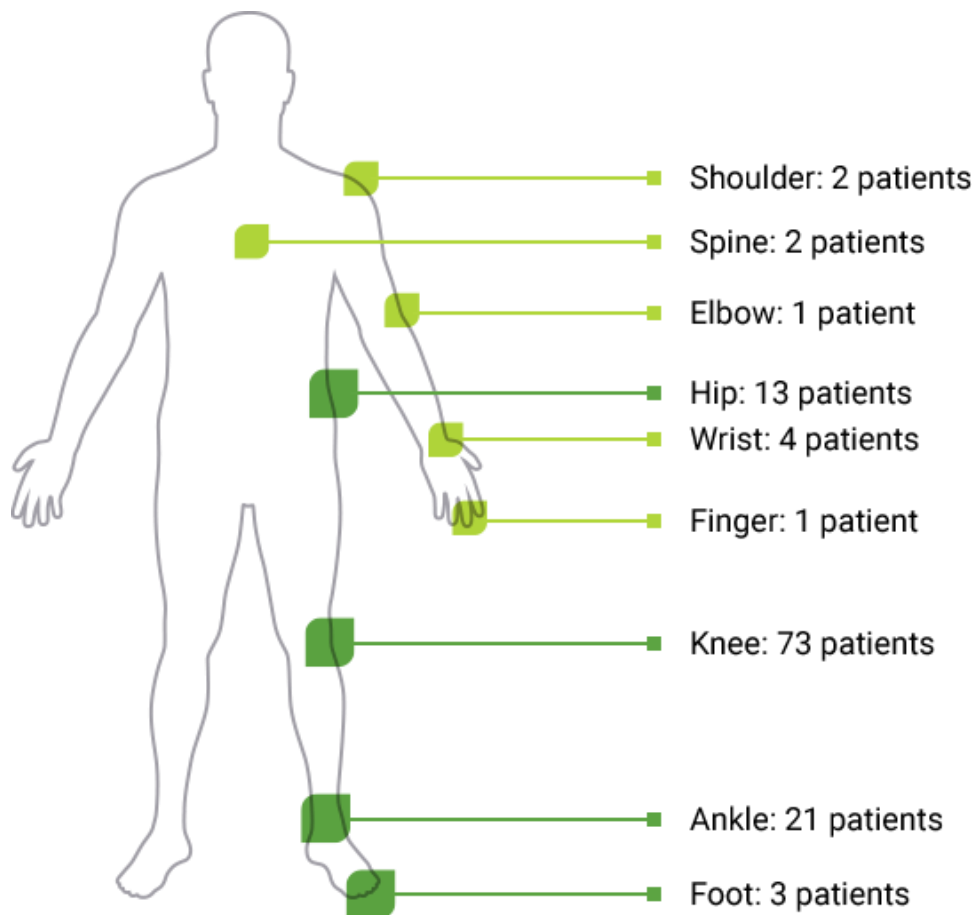
Il tumore tenosinoviale delle cellule giganti (TGCT) è un tumore che colpisce generalmente un solo arto, può essere benigno o aggressivo localmente e molto spesso debilitante se non trattato in tempo (18).

Il TGCT cresce all'interno della membrana sinoviale della giuntura o delle guaine tendinee in cui è localizzato, dando origine ad un rigonfiamento anomalo. (Figura 5) Questo tumore si presenta con delle ferite o rigonfiamenti, che progressivamente aumentano nel tempo, localizzati intorno alle giunture. (Figura 7).

Esistono due sottotipi principali di TGCT: TGCT localizzato (L-TGCT) e TGCT diffuso (D-TGCT).(19)



(19) Figura 5



(19) Figura 7

EPIDEMIOLOGIA DEL TGCT

Il TGCT viene considerato una malattia orfana, cioè una patologia che non è ancora stata studiata in modo approfondito o per la quale non esiste un trattamento specifico.

L-TGCT ha un'incidenza di cinque persone su un milione all'anno, mentre il D-TGCT ha un'incidenza di otto persone su un milione all'anno.

Quindi il D-TGCT, oltre ad essere la forma più grave della malattia, presenta anche un'incidenza maggiore.

Inoltre il rapporto di incidenza del TGCT tra genere maschile e femminile è 1:1.5, quindi, ne risulta che il genere femminile ha una predisposizione maggiore nell'incorrere in questa patologia.(20) Il TGCT colpisce una popolazione relativamente giovane, infatti, viene diagnosticato in persone tra i quaranta e i sessant'anni, che, però, probabilmente lo hanno sviluppato molto prima, visto che il paziente spesso, alla comparsa dei sintomi che inizialmente sono lievi, non ritiene di farsi visitare e pensa che si risolveranno col tempo.

Nonostante ciò il TGCT può colpire anche persone più giovani, anche i bambini.

Il L-TGCT è localizzato nell'85% dei casi sulle dita delle mani e dei piedi, mentre il D-TGCT è localizzato soprattutto su giunture più grandi, come quella del ginocchio.(21)

PRESENTAZIONE CLINICA DEL TGCT

I sintomi più comuni riportati in persone affette da TGCT sono: dolore, infiammazione, rigonfiamento, rigidità e limitatezza dei movimenti.

Ci sono, poi, segni più importanti a cui bisogna prestare particolare attenzione, come l'instabilità dovuta al mal funzionamento o al blocco totale dell'articolazione.(22)

Infatti, la curanza di questi sintomi, la loro comparsa in modo lieve o comunque la comparsa di sintomi non specifici, porta molto spesso a un ritardo nel controllo e nella diagnosi del TGCT.

Il TGCT porta con sé delle conseguenze che influenzano molto la quotidianità di una persona.

Il soggetto affetto da questa patologia riscontra difficoltà nell'effettuare attività quotidiane, portando alla perdita del posto di lavoro e alla necessità di richiedere aiuti domestici.

L'aspetto negativo della persona affetta dal TGCT è che presenta una bassa qualità di vita, non solo a causa dei motivi sopracitati, ma soprattutto perché dovrà sottoporsi ad un'operazione chirurgica per la rimozione del tumore, che, in molti casi, rende il paziente invalido.

Queste considerazioni sulla qualità della vita del paziente fanno notare la necessità di scoprire nuovi farmaci e nuovi approcci terapeutici contro questo tipo di tumore.(21)

DIAGNOSI DEL TGCT

Per diagnosticare il TGCT si utilizza la tecnica dell'immagine data dalla risonanza magnetica (MRI), la quale mostra la presenza o meno del tumore, la sua estensione, la sua possibile diffusione in altre zone o giunture e altri effetti degenerativi causati dalla patologia.

L-TGCT e D-TGCT, anche se derivano dallo stesso tipo di tumore, si comportano diversamente l'uno dall'altro e presentano differenze sostanziali, per questo vengono classificati come patologie differenti.

L-TGCT presenta una ferita ben rimarcata e localizzata in un solo punto, mentre il D-TGCT presenta più lesioni nella stessa giuntura che portano ad un rigonfiamento all'interno della membrana sinoviale e a depositi di emosiderina(23).

L'emosiderina è una proteina di deposito del ferro ed, in base ai valori che presenta nei tessuti, è possibile diagnosticare diverse patologie tra cui il TGCT.

Inoltre il D-TGCT può essere presente sia a livello intra-articolare che extra-articolare, può portare ad una progressiva erosione dell'osso, alla continua perdita di cartilagine e alla formazione di osteofiti, rigonfiamenti che si formano a causa dell'erosione delle ossa.

Il D-TGCT, negli stadi più avanzati, può portare allo sviluppo di osteoartriti e osteoporosi. La presenza della patologia è confermata sulla base di biopsie effettuate sui tessuti delle articolazioni.

Anche utilizzando diverse tecniche è difficile determinare se si tratti di L-TGCT o D-TGCT dal momento che, a livello istologico, si presentano molto simili, quindi per differenziare i due tipi si fa riferimento principalmente alla massa e alla distribuzione del tumore nelle giunture, oltre che alle caratteristiche cliniche sopra citate.(21)

PATOGENESI DEL TGCT

Studi citogenetici hanno dimostrato che il TGCT è un tumore che deriva da alterazioni cromosomiche, le quali portano, successivamente, ad un processo neoplastico.

In particolare, nel 2006, West ha dimostrato l'effettiva presenza di traslocazioni, errati scambi di materiale genetico tra cromosomi non omologhi, in pazienti affetti da TGCT. Queste traslocazioni riguardano la regione 1p-11-13, nella quale è localizzato il gene che trascrive per il fattore 1 stimolante le colonie (CSF1)(24).

CSF1 è anche conosciuto con il nome di fattore stimolante le colonie di macrofagi (M-CSF) in quanto, legandosi al suo recettore (R-CSF1), è fondamentale per regolare l'attività, la proliferazione e la differenziazione dei macrofagi.

Molte cellule sane, non tumorali, del nostro organismo esprimono il recettore per CSF1 (R-CSF1), mentre solo poche cellule, tra il 2% e il 16%, producono CSF1.

Le cellule tumorali che originano il TGCT, invece, a causa della traslocazione cromosomica, presentano un elevato livello di CSF1 che porta ad un aumento nella proliferazione e differenziazione dei macrofagi e ad un'alterazione nella loro regolazione.

Il risultato è un aumento delle cellule neoplastiche tramite un processo autocrino, un processo in cui la sostanza (CSF1) prodotta dalla cellula agisce sul recettore della cellula stessa, andando a modificarne il comportamento, e un processo paracrino, tramite il quale c'è un accumulo di macrofagi e di cellule non tumorali che esprimono il recettore per CSF1, che interagisce con il ligando prodotto dalle cellule tumorali.

Inoltre, sembra che elevati livelli di CSF1, prodotti dalla cellula tumorale, portino anche ad un'aumentata proliferazione dei sinoviociti simili a fibroblasti FLS, i quali possono essere stimolati dalla caderina a produrre citochine pro-infiammatorie e VEGF che portano rispettivamente all'infiammazione e alla neo-angiogenesi.

Sempre grazie all'azione di CSF1, i macrofagi possono differenziarsi in cellule giganti simili ad osteoclasti ed in cellule schiumose che si depositano nel tessuto adiposo e nei vasi sanguigni.

I macrofagi possono, inoltre, produrre citochine che potenziano l'azione di VEGF.

Invece i monociti, a causa di CSF1, producono prima di tutto VEGF, il fattore di crescita endoteliale e vascolare, che promuove la formazione di nuovi vasi sanguigni, portando all'accrescimento della massa tumorale e, in secondo luogo, producono PD-L1, che attenua la risposta dei linfociti e del sistema immunitario contro il tumore.

Alcune proteine aumentano lo sviluppo del tumore tra cui: cIAP2, che inibisce l'apoptosi, favorendo la crescita della cellula tumorale; ARRB2, che promuove la sintesi di caderina, che, a sua volta, aumenta la produzione di citochine infiammatorie e di VEGF da parte di FLS; ed infine PPAR gamma, che aumenta la produzione di citochine pro-infiammatorie. (Figura 8).

Alcuni studi hanno evidenziato come la traslocazione avvenga tra il cromosoma della regione 1p-11-13 e il cromosoma della regione 2p-37, portando alla formazione di cromosomi anomali come p13-p37.

Altri studi hanno evidenziato, invece, che questa traslocazione è presente solo in alcuni casi in persone affette da TGCT, ma non in tutte(25).

In ogni caso, rimane il fatto che il TGCT derivi da traslocazioni o alterazioni

cromosomiche e che potrebbero esserci traslocazioni diverse che portano comunque a una sovra espressione di CSF1 e allo sviluppo del TGCT.

In particolare, altre alterazioni cromosomiche sono: la delezione dell'esone 9 del gene che trascrive per CSF1, una regolazione negativa del gene che trascrive per CSF1 e la rimozione della regione 3'-UTR che porta ad una sovra espressione di CSF1.

Inoltre, in circa un terzo dei pazienti affetti da TGCT è presente una mutazione di CBL (sequenza trasformante Cas-Br-Murine), il quale normalmente blocca lo sviluppo di cellule tumorali, ma, se mutata, ne favorisce la crescita.

Infatti, CBL mutata è una proteina multifunzionale che interagisce con i recettori delle tirosin-chinasi e porta alla formazione e al successivo sviluppo del tumore, a volte anche in assenza di traslocazioni genica a carico del gene che trascrive per CSF1.

Sarebbe un bel passo in avanti riuscire a determinare con precisione, anche a livello genetico, quale sia la causa della comparsa del tumore, per poter elaborare una strategia migliore o nuovi composti che riescano a bloccarne la crescita in modo più efficace.

I geni sovra espressi da cellule tumorali del TGCT sono resistenti all'apoptosi, provocano infiammazione, rigonfiamento, degradazione della matrice, hanno una proliferazione elevata e portano alla presenza di ferite nelle giunture.

Questi geni sovra espressi sono CD35, MPP1, MPP9.

Invece i geni che andrebbero a sopprimere il tumore, come il TP53, sono poco espressi nelle cellule tumorali.(21)

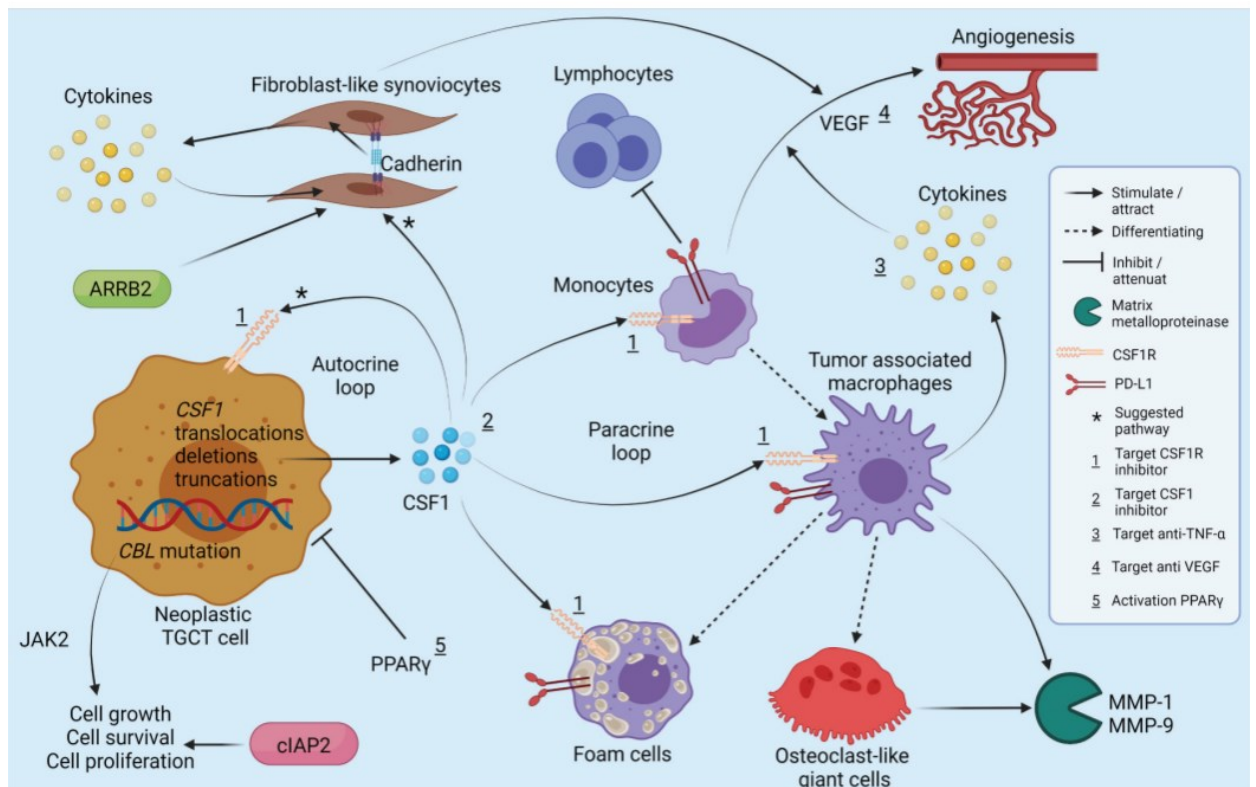


Figura 8 (21)

ISTOPATOLOGIA DEL TGCT

Il TGCT è classificato come tumore fibro-istocitario, cioè un sarcoma dei tessuti molli che deriva appunto dalla trasformazione maligna delle cellule dei tessuti molli, in questo caso dei tessuti connettivi, nervi e legamenti.

Il microambiente del tumore contiene molte popolazioni cellulari diverse, presenta infatti: cellule mononucleate, cellule giganti multinucleate simili ad osteoclasti (prevalenti nel TGCT) cellule infiammatorie, xantomati (depositi di macrofagi infarciti di grasso che formano placche o noduli giallastri), siderofagi (macrofagi contenenti emosiderina) e ialinizzazione stromale (trasformazione dei tessuti connettivi che assumono un aspetto macroscopico e molto denso). (Figura 9).

In modo più approfondito, tra le cellule mononucleate si possono distinguere due categorie di cellule.

La prima categoria, che è anche quella prevalente, è rappresentata da piccole cellule con nuclei ovali simili ad istiociti, cioè cellule mesenchimali indifferenziate, che differenziandosi possono generare tessuto connettivo e che nel processo infiammatorio svolgono un ruolo fagocitario.

La seconda categoria è rappresentata da cellule epiteliodi, una categoria di macrofagi che compare negli stati infiammatori che spesso comportano la comparsa di tumori, con nuclei più grandi e citoplasma più abbondante. (Figura 9).

Anche se si è riusciti a identificare tutti questi tipi cellulari all'interno del TGCT, rimane ancora sconosciuta da quale linea cellulare siano derivati.

Le cellule mononucleate più grandi (cellule epiteliodi) producono: la clusterina, una proteina fondamentale nell'aiuto del ripiegamento di alte proteine, nella regolazione eventi pro ed anti apoptotici, portando allo sviluppo tumorale; la podoplanina, un recettore transmembrana glicoproteico che, se sovra espresso, può portare allo sviluppo di tumore; la desmina, una proteina che si trova vicino alla linea Z nei sarcomeri e serve a mantenere parallele le miofibrille muscolari.

Le cellule mononucleate più piccole (istiociti), invece, risultano positive per: l'antigene CD45, una proteina (enzima) tirosina fosfatasi responsabile di segnalazioni nei processi cellulari tra cui la crescita, differenziazione, proliferazione e trasformazione oncogena; CD68, una glicoproteina transmembrana presente soprattutto nei macrofagi e responsabile dello sviluppo di tumori; CD163, una proteina di membrana prodotta da macrofagi che, in presenza di infiammazioni, viene scissa e diventa solubile, è un buon marker per determinare la quantità di macrofagi presenti e la gravità dell'infiammazione.

In pazienti affetti da TGCT, nel liquido sinoviale, presente all'interno della membrana sinoviale allo scopo di ridurre l'usura della cartilagine, sono presenti molti fattori infiammatori come l'interleuchina-1beta e il fattore-alfa della necrosi tumorale (TNF-alfa), i quali indicano un'importante infiammazione a livello delle articolazioni.

Tra L-TGCT e il D-TGCT, il secondo ha un'incidenza maggiore del primo, in quanto è più difficile accorgersi della problematicità della situazione, il che porta a un ritardo nel ricorrere ad un controllo medico, facilitando la crescita tumorale, la proliferazione e la metastasi, che spesso avviene a livello polmonare o nei linfonodi.(26)

Si pensa che il D-TGCT derivi soprattutto dalla presenza nel microambiente infiammatorio di cellule mononucleate più grandi (cellule epiteliodi) che esprimono la

clusterina, anche se come si sviluppi questo tumore nello specifico non sia ancora ben chiaro.(21)

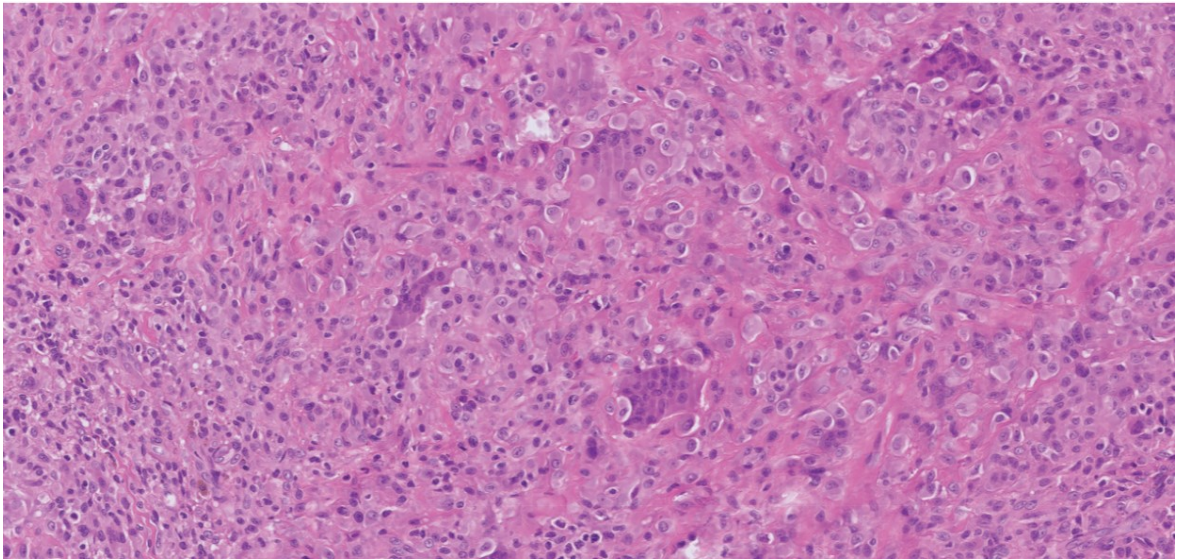


Figura 9 (21)

TRATTAMENTI GOLD-STANDARD ATTUALI PER IL TGCT

Il trattamento di prima scelta per pazienti affetti da TGCT rimane la rimozione chirurgica del tumore nell'articolazione nella quale è situato, con il rischio di abbassare notevolmente la qualità della vita del paziente stesso.

Inoltre, anche una volta rimosso il tumore, è sempre possibile una ricaduta dello stesso, anche se con percentuali relativamente basse.

L-TGCT, il tumore localizzato, è spesso rimovibile con facilità tramite interventi chirurgici con una possibile ricaduta del 10%.

Alcuni specialisti affermano che l'intervento chirurgico rimane il trattamento di prima scelta perché offre un accesso e risultati migliori, specialmente se si trattano ferite diffuse.

L'intervento chirurgico, però, ha anche lati negativi, non solo per quanto riguarda la riduzione della qualità della vita del paziente, ma anche perché i pazienti trattati tendono ad avere una morbilità iatrogena (causata da effetti avversi ai farmaci) maggiore di quelli non operati, soprattutto se hanno avuto una ricaduta della malattia.(27)

Il D-TGCT ha una ricaduta più elevata del L-TGCT, il che sottolinea la necessità di trovare nuove strategie per combattere questo tipo di tumore.

Una di queste strategie è la radiosinoviotesi, che letteralmente significa restaurare (ortesi) la membrana sinoviale con radiofarmaci.

Questa è una terapia radiometabolica che consiste nell'iniettare, in un'articolazione, dei radiocolloidi marcati con isotopi radioattivi che emettono particelle beta meno per trattare stati infiammatori cronici delle articolazioni.

La radiosinoviotesi ha lo scopo di iniettare un'elevata dose di particelle emittenti radiazioni a livello locale per distruggere il tessuto sinoviale ipertrofico ed infiammato, portando ad una diminuzione della massa tumorale e del dolore.

Adoperando questa strategia, però, si può incorrere in diverse reazioni avverse tra cui la necrosi della pelle.

Inoltre, non sono stati effettuati molti studi su questa radioterapia e comunque, in molti di questi, l'evidenza di un miglioramento è bassa.

Secondo una metanalisi effettuata da Mollos, l'uso combinato dell'intervento chirurgico e della radiosinovioresi porterebbe ad una diminuzione della possibilità di ricaduta della malattia nei pazienti trattati.

È importante attendere e studiare i risultati degli effetti della radioterapia, visto che in tempi lunghi potrebbe portare alla comparsa di nuove cellule tumorali indotte da radiazioni, soprattutto in popolazioni più giovani.

Nel 2008 Blay ha studiato gli effetti di un nuovo farmaco, l'imatinib, su pazienti affetti da TGCT che non potevano essere operati chirurgicamente, riportandone i risultati.(28)

È stato osservato che i pazienti trattati con questo medicinale hanno avuto una remissione completa della patologia, il che ha portato molti ricercatori a cercare nuove molecole, nuovi farmaci e nuovi approcci per poter contrastare il TGCT, specialmente per pazienti che non possono essere operati chirurgicamente.(21)

MODELLI DI LINEE CELLULARI DI PAZIENTI AFFETTI DA TGCT

Prelevare e studiare le linee cellulari di pazienti affetti da TGCT è fondamentale per poter capire la patogenesi della patologia, il suo funzionamento e mettere in atto nuove strategie terapeutiche per poterla contrastare.

Si possono utilizzare anche linee cellulari coltivate "in vitro" per ottenere maggiori informazioni ed aumentare l'affidabilità dell'individuazione dei farmaci adatti.(29)

Inoltre, sono state utilizzate cellule tumorali derivate da pazienti affetti da TGCT nei modelli xenografts per lo studio della patologia e la validazione di farmaci in modelli "ex vivo".

I modelli xenografts sono degli studi sul tumore fatto sui topi, nei quali si va a trapiantare cellule tumorali umane, coltivate in vitro, su topi immuno-deficienti.

Questi ultimi vengono resi immuno-depressi tramite la rimozione del timo, fondamentale per la produzione di cellule del sistema immunitario in particolare delle cellule linfoidi T, quindi l'organismo dei topi non riconosce le cellule tumorali umane come estranee e non le attaccano o rigettano, permettendone la crescita e lo studio.(21)

POTENZIALI BERSAGLI TERAPETICI

Per poter contrastare il TGCT si sta pensando a nuovi possibili bersagli terapeutici da poter attaccare tramite l'utilizzo di nuovi farmaci o strategie come, per esempio, il FBDD. Per il trattamento di pazienti affetti da TGCT, che non sono operabili chirurgicamente, si possono utilizzare terapie sistemiche, considerati, ad oggi, l'ultima risorsa disponibile.

Il tumore è stato studiato in modo approfondito, anche se ci sono ancora delle incertezze da risolvere, esplorando nuove vie molecolari da poter sfruttare per contrastare il tumore.(21)

BERSAGLI TERAPEUTICI DELLE CELLULE TUMORALI IN PAZIENTI AFFETTI DA TGCT

I bersagli terapeutici che si possono sfruttare contro il tumore sono: il fattore 1 stimolante le colonie (CSF1), la janus-chinasi-2 (JAK2), l'inibitore cellulare dell'apoptosi 2 (cIAP2), la beta-arrestina 2 (ARR-beta-2) e il recettore gamma (PPAR-gamma).

Altri possibili bersagli sono: il fattore-alfa della necrosi tumorale (TNF-alfa), il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF), il ligando kappa-B fattore nucleare dell'attivatore del recettore (RANKL), il ligando 1 che programma la morte cellulare (PD-L1) e la caderina-11.

Inoltre si possono utilizzare anche terapie sistemiche per contrastare TGCT come: le terapie che bersagliano l'asse CSF1 e CSF1R tramite Imatinib, Nilotinib, Pexidartinib, Vimseltinib, Emactuzumab, Lacnotuzumab e Cabiralizumab.

Sono possibili anche altre terapie alternative: il blocco del fattore-alfa della necrosi tumorale (TNF-alfa), Bevacizumab e Zaltoprofen.(21)

FATTORE 1 STIMOLANTE LE COLONIE (CSF1)

Bersagliare l'asse CSF1 e CSF1R è stata la strategia più utilizzata e che ha portato maggiori risultati fin da quando è stato scoperto che le cellule neoplastiche dei pazienti affetti da TGCT sovra esprimono CSF1.

In molti pazienti la sovra espressione di CSF1 nelle cellule tumorali è dovuta ad un'alterazione genetica, ma in alcuni pazienti la causa di questa sovra espressione non è ancora ben chiara.

Comunque, bersagliare l'asse CSF1 e CSF1R, bloccando l'interazione tra ligando e recettore, rimane una strategia difficile da applicare a causa della localizzazione del tumore che può trovarsi sia all'interno che all'esterno dell'articolazione e anche per il fatto che non risulta molto chiaro il confine tra le cellule tumorali e quelle sane.(30)

Inoltre, il D-TGCT presenta spesso ricadute che poi richiederebbero un secondo intervento chirurgico o farmacologico.

Uno studio ha determinato che il tasso di sopravvivenza libero da ricadute è del 40% in 10 anni.

La soluzione migliore risulta essere la combinazione tra l'intervento chirurgico e l'utilizzo di farmaci che bloccano l'interazione tra CSF1 e il suo recettore, portando ad un effetto antitumorale e ad una minore probabilità di ricaduta della patologia.

Per bloccare il legame tra CSF1 e CSF1R sono stati studiati vari approcci, tra cui l'utilizzo di anticorpi monoclonali e di inibitori delle tirosin-chinasi (TKI).(21)

JANUS-CHINASI-2 (JAK2)

In uno studio si è determinato che le mutazioni di CBL, presenti nelle cellule tumorali in pazienti affetti da TGCT, comportavano una fosforilazione prolungata della janus-chinasi-2 (JAK2), che portava ad un aumento della proliferazione cellulare.

Inoltre, si è scoperto che le mutazioni di CBL portano ad un'augmentata espressione di JAK2 con un conseguente effetto proliferativo ancora maggiore che risulta in

problematiche ancora più gravi per il paziente.(30)

Quindi, si può logicamente supporre che JAK2 possa essere un bersaglio utile nel ridurre la proliferazione delle cellule neoplastiche, contrastando il tumore.

Le strategie migliori rimangono in ogni caso, non l'utilizzo di un solo approccio, ma la combinazione di più approcci diversi in modo tale da contrastare la crescita tumorale, attaccando più bersagli.(21)

INIBITORE CELLULARE DELL'APOPTOSI 2 (cIAP2)

L'inibitore cellulare dell'apoptosi 2 (cIAP2) è una proteina anti-apoptotica, che, nelle cellule neoplastiche di pazienti affetti da TGCT, viene sovra espressa in modo tale da consentire al tumore di svilupparsi, evitando l'apoptosi.

È stato notato che i livelli di cIAP2 sono molto più alti in pazienti affetti da D-TGCT rispetto ai pazienti affetti da L-TGCT.

Questo dimostra che il tumore diffuso è anche quello più difficile da contrastare, in quanto è più resistente ad eventi apoptotici.(31)

Inoltre, la quantità di cIAP2 è legata all'erosione dell'osso, alle condizioni della cartilagine e del legamento e alla ricomparsa del tumore, quindi è possibile sfruttare il gene che codifica per cIAP2 per prevedere sia una possibile comparsa del TGCT nei pazienti, sia se questi sono più predisposti a sviluppare la patologia.

La proteina cIAP2 rimane comunque un possibile bersaglio da poter sfruttare contro il TGCT.(21)

BETA-ARRESTINA 2 (ARR-beta-2)

La beta-arrestina 2 (ARR-beta-2) regola la sopravvivenza cellulare, eventi apoptotici, e la proliferazione in molte cellule tumorali.

Infatti, la ARR-beta-2 è sovra espressa anche nelle cellule di pazienti affetti da TGCT, portando ad una riduzione di eventi apoptotici e ad una proliferazione maggiore delle cellule sinoviali simili a fibroblasti (FSL) che rilasciano citochine pro-infiammatorie a livello dell'articolazione, dove è situato il tumore.

Il blocco della ARR-beta-2 porta ad un aumento di eventi apoptotici e ad una ridotta proliferazione cellulare delle cellule sinoviali simili a fibroblasti (FSL).

ARR-beta-2 è un possibile bersaglio molecolare nel trattamento del TGCT.(21)

RECETTORE GAMMA (PPAR-gamma)

Il recettore gamma (PPARgamma) è un recettore nucleare per i fattori di trascrizione ed è sovra espresso in adipociti e macrofagi derivati dai monociti.

Questo recettore regola la differenziazione degli adipociti e dei macrofagi.

Quando il ligando interagisce con il recettore PPAR-gamma nei macrofagi, viene inibita la produzione e il rilascio di citochine ed altri mediatori pro-infiammatori.

Infatti questo recettore è presente in molte cellule tumorali, tra cui cellule neoplastiche di pazienti affetti da TGCT.(32)

Una possibile strategia è quella di sfruttare PPAR-gamma, facendolo interagire con un ligando.

Questa interazione, infatti, porterebbe ad un'inibizione della crescita tumorale e ad un aumento di eventi apoptotici.(21)

FATTORE-ALFA DELLA NECROSI TUMORALE (TNF-alfa)

TNF-alfa è una citochina pro-infiammatoria ed è presente a livelli elevati, in pazienti affetti da TGCT, insieme a macrofagi e ad altre citochine pro-infiammatorie.

Le citochine, liberate in grande quantità, provocano un'infiammazione che porta alla distruzione dell'articolazione dove è situato il tumore.

Inoltre, l'effetto paracrino combinato di CSF1 e TNF-alfa sui macrofagi, monociti e osteoclasti porta alla loro differenziazione, proliferazione e all'espressione di RANKL, causando lo sviluppo e la crescita della massa tumorale.(33)

Un possibile approccio contro il TGCT è quello di bloccare il TNF-alfa, riducendo il processo infiammatorio, la differenziazione e proliferazione dei macrofagi.(21)

FATTORE DI CRESCITA ENDOTELIALE VASCOLARE (VEGF)

Il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) promuove la proliferazione di cellule endoteliali e la neo-angiogenesi, cioè la formazione di nuovi vasi sanguigni fondamentali per lo sviluppo della massa tumorale.

Oltre al VEGF, anche CSF1 può attivare segnali intracellulari che portano alla produzione di ulteriore VEGF, con il conseguente sviluppo di nuovi vasi sanguigni, favorendo nuovamente lo sviluppo del tumore.

VEGF quindi è un altro possibile bersaglio da studiare e su cui lavorare per ridurre la neo-angiogenesi e impedire, quindi, al tumore di crescere e portare alla metastasi.(21)

LIGANDO KAPPA-B FATTORE NUCLEARE DELL'ATTIVATORE DEL RECETTORE (RANKL)

Il ligando kappa-B fattore nucleare dell'attivatore del recettore (RANKL) è una citochina che controlla l'attivazione e la differenziazione degli osteoclasti, cellule deputate al riassorbimento dell'osso, erodendolo.

Gli osteoclasti attivi e differenziati a causa di RANKL sono prevalenti rispetto agli osteoblasti, dunque, l'osso viene lentamente eroso senza essere riparato.(34)

Alcuni farmaci come il denosumab, anticorpo monoclonale, inibisce RANKL in molte patologie tumorali, così facendo si impedisce l'attivazione e proliferazione degli osteoclasti e l'erosione dell'osso.

Inoltre, l'espressione di RANKL può essere indotta da interleuchine e citochine pro-infiammatorie come TNF-alfa.

I livelli di RANKL sono elevati in molti tumori, ma nel TGCT non sono così elevati.

Si potrebbe, tuttavia, tentare un approccio terapeutico per bloccare RANKL, riducendo l'erosione ossea.

Potrebbe essere, però, che le cellule multinucleate, come le cellule giganti simili agli osteoclasti, nel TGCT, siano diverse da altre cellule multinucleate viste in altri tumori e che, quindi, il blocco di RANKL non sia così efficace e non dia i risultati sperati. In ogni caso il blocco di RANKL è un approccio non ancora studiato a sufficienza e potrebbe rivelarsi comunque un metodo efficace se usato in combinazione con altri approcci terapeutici come l'inibizione dell'asse CSF1 e CSF1R.(21)

LIGANDO 1 CHE PROGRAMMA LA MORTE CELLULARE (PD-L1)

Il ligando 1 che programma la morte cellulare (PD-L1) controlla la risposta del sistema immunitario, riducendo l'attivazione dei linfociti e stimolando la crescita tumorale.

Il PD-L1 è risultato presente nel 53% delle cellule tumorali di pazienti affetti da TGCT, espresso in cellule mononucleate, multinucleate e in macrofagi differenziati.

Inoltre è stata determinata una correlazione positiva tra la quantità di PD-L1 presente e il volume della massa tumorale, quindi più alti sono i livelli di PD-L1 e più grande è anche la massa tumorale.

Tuttavia l'espressione di PD-L1 può variare da persona a persona in base al sistema immunitario, quindi l'utilizzo di terapie contro questo bersaglio saranno più o meno efficaci in base alla risposta individuale del paziente.(35)

PD-L1 rimane comunque un bersaglio per contrastare lo sviluppo del TGCT, perché bloccando PD-L1 si aumenta la risposta del sistema immunitario con l'attivazione dei linfociti contro il tumore; questa strategia non è da intendere come monoterapia perché non sarebbe molto efficace singolarmente, ma potrebbe dare risultati efficaci se utilizzata in combinazione con altre strategie terapeutiche.(21)

CADERINA-11

La caderina-11 è una proteina che va a mediare l'adesione tra le cellule sinoviali simili a fibroblasti (FSL), favorendo la formazione di uno strato sinoviale.

Ma la caderina-11 può anche stimolare FSL a produrre citochine pro-infiammatorie, mentre altre citochine infiammatorie, come TNF-alfa, possono aumentare l'espressione della caderina-11 ed eventualmente anche la sua proliferazione, la migrazione e l'invasione nelle FSL.

Il risultato di questi processi porta all'iniziale infiammazione e successiva distruzione dell'articolazione, nella quale è situato il tumore.

Inoltre, può portare alla metastasi e alla ricomparsa del tumore stesso in caso di rimozione chirurgica.(36)

La caderina-11, viste le complicanze che può causare, viene utilizzata come marcatore per determinare la predisposizione, la presenza e lo sviluppo del D-TGCT.

Questa proteina potrebbe rivelarsi un ottimo bersaglio per contrastare il tumore, in modo particolare bloccando la caderina-11 si andrebbe a diminuire la migrazione e l'invasione di FSL in altri tessuti, evitando la metastasi e quindi evitando che L-TGCT diventi D-TGCT.(21)

MIGLIORI TERAPIE PER IL TRATTAMENTO DI PAZIENTI AFFETTI DA TGCT

Al giorno d'oggi, il trattamento di prima scelta rimane l'intervento chirurgico con l'asportazione del tumore a livello delle articolazioni in pazienti affetti da L-TGCT (tumore localizzato).

Questo tipo di intervento, anche se efficace, presenta degli svantaggi quali: l'eventuale ricaduta della malattia e la possibile diminuzione della qualità della vita del paziente stesso; aspetti non trascurabili per quanto riguarda il trattamento della patologia. È necessario quindi trovare nuove strategie terapeutiche oltre all'intervento chirurgico, non solo per riuscire a trattare tutti quei pazienti che non potrebbero essere sottoposti all'intervento chirurgico, ma anche per salvaguardare il più possibile la qualità di vita dei pazienti.

Inoltre, dopo la rimozione chirurgica del tumore, solitamente, si esegue la radioterapia adiuvante per rimuovere tutte le possibili cellule tumorali rimanenti, avendo quindi una certa sicurezza per quanto riguarda la rimozione completa del tumore, evitandone la ricrescita nel tessuto sano.

Il problema principale di questa terapia, però, consiste nel fatto che può causare effetti indesiderati a lungo termine.

Per questo motivo è fondamentale trovare altre strategie terapeutiche, oltre a quelle già viste, soprattutto per il trattamento di pazienti affetti da D-TGCT.

Una strategia alternativa potrebbe essere l'utilizzo di terapie sistemiche, con farmaci in grado di bloccare alcuni meccanismi fondamentali delle cellule tumorali, arrestandone la crescita e la proliferazione e portando, quindi, alla morte delle cellule tumorali.

Infatti, conoscendo meglio lo sviluppo e le caratteristiche del tumore TGCT, si sono potuti sviluppare e studiare nuovi farmaci in grado di contrastarlo, anche se al momento l'unico farmaco effettivamente approvato dall'FDA (Food and Drug Administration) per il trattamento del TGCT è Pexidartinib.

Invece, l'EMA (Agenzia Europea dei Medicinali) non ha approvato l'A.I.C. di questo medicinale a causa degli effetti avversi epatotossici troppo rischiosi, quindi ha valutato il rapporto rischio/beneficio troppo a favore del rischio.

Attualmente la terapia sistemica migliore è Pexidartinib, nonostante i suoi effetti collaterali, ma si sta cercando di sviluppare altri farmaci inibitori di tirosin-chinasi (TKI) che potrebbero avere un'efficacia migliore.

Si sta studiando anche l'effetto di Pexidartinib, somministrato tramite un'iniezione intra-articolare, nella speranza che dia gli stessi effetti terapeutici in tempi più brevi e che si riducano invece gli effetti collaterali.

Infine, si stanno prendendo in considerazione altri bersagli terapeutici, oltre all'asse CSF1-CSF1R, per fermare il TGCT.(21)

SVILUPPO DI PEXIDARTINIB (PLX647)

Lo sviluppo di Pexidartinib è cominciato dallo studio effettuato da Daiichi Sankyo ed altri sperimentatori, nel quale partendo da un frammento, il 7-azaindolo, e sviluppandolo tramite l'accrescimento dei frammenti visto nel FBDD, sono riusciti a produrre PLX647, ovvero Pexidartinib.

In particolare, il 7-azaindolo è stato identificato come il frammento (hit) di base inibitorio delle chinasi tramite un metodo di identificazione dei frammenti che ha rilevato il legame debole tra il 7-azaindolo e l'enzima bersaglio, una chinasi, in una miscela contenente ben 20000 frammenti.

Questo fa capire quanto siano importanti, efficaci e rapidi i metodi di individuazione del frammento desiderato, nonostante abbia una bassa affinità di legame con il bersaglio.

Successivamente, sono stati cristallizzati: la struttura del frammento preso singolarmente, la struttura della chinasi bersaglio, una tirosin-chinasi, e la struttura del complesso frammento-bersaglio.

Una volta individuato e caratterizzato il frammento e il bersaglio, gli sperimentatori hanno provato a sviluppare il 7-azaindolo in un composto più affine al bersaglio inserendo dei sostituenti adatti a tale fine.

Inizialmente, hanno aggiunto al 7-azaindolo, in posizione 3, il 3-metossifenilmetile, sviluppando il composto PLX070, precursore di Pexidartinib e di altri composti.

PLX070 è stato co-cristallizzato con il recettore 1 del fattore di crescita dei fibroblasti (FGFR1) ed è stata individuata un'interazione chiave tra l'ossigeno del sostituente nel PLX070 ed NH del residuo di aspartato del motivo Asp-Phe-Gly di FGFR1.

Successivamente, PLX070 è stato sviluppato in più composti inibitori: contro BRAF (proteina oncogenica), KIT (tirosin-chinasi) ed FMS (glicoproteina transmembrana con attività tirosin-chinasica).

Nello sviluppo di composti inibitori di BRAF, PLX4720, partendo da PLX070, i ricercatori hanno sostituito il gruppo metossilico con una coda alchil-sulfonamidica per avere un accesso e un'affinità di legame migliore con la tasca interna della proteina mutata BRAF. Per fare in modo che l'azoto del gruppo sulfonamidico fosse accettore di idrogeni, è stato aggiunto un anello fenilico nel mezzo del composto ed è stato sostituito con 2 atomi di fluoro in posizione 2 e 6 per renderlo elettrone-deficiente.

Inoltre, nel PLX4720, è stato sostituito anche il linker metilenico con un chetone, riuscendo così a mantenere la stessa geometria del PXL070.

Invece, per quanto riguarda lo sviluppo di PLX647, ovvero Pexidartinib, si è partiti da PLX070, dove al linker metilenico in posizione 3, è stato aggiunto una piridina come anello centrale, il cui azoto funge da accettore di idrogeni per il legame con il bersaglio. E' stato osservato che PLX647 ha un effetto inibitorio molto potente contro FMS e KIT ed è molto selettivo verso queste chinasi rispetto ad altre (Figura 17).

Infatti in saggi enzimatici effettuati in vitro, è stato determinato che, PLX647, inibisce FMS con una $IC_{50} = 0.028 \mu M$, mentre KIT con $IC_{50} = 0.016 \mu M$.

PLX647, quindi, inibisce in modo più affine KIT visto che è richiesta una concentrazione minore di principio attivo per il legame con il bersaglio.

Oltre a PLX647, è stato formulato un composto analogo, il 5-metossil-Pexidartinib (PLX647-OMe), cioè la forma metossilata, in posizione 5, di Pexidartinib.

Hanno studiato l'affinità di legame e la struttura derivata dal legame di questo composto con il recettore FMS, tramite co-cristallizzazione.

Dallo studio è emerso che PLX647-OMe ha un'affinità di legame minore con FMS ($IC_{50} = 0.062 \mu M$) rispetto a Pexidartinib, ma per la cristallizzazione è stato utilizzato questo composto perché ha una migliore solubilità in acqua e, quindi, è più semplice da cristallizzare, ottenendo così dati migliori.

Infine, Pexidartinib lega il recettore tirosin-chinasico (KIT), in particolare lega il Trp557 del dominio juxtamembrana, nella regione tra l'elica transmembrana e il dominio citoplasmatico della chinasi, che collegherebbe il recettore ai suoi trasduttori, impedendo così l'attivazione del recettore.(37)

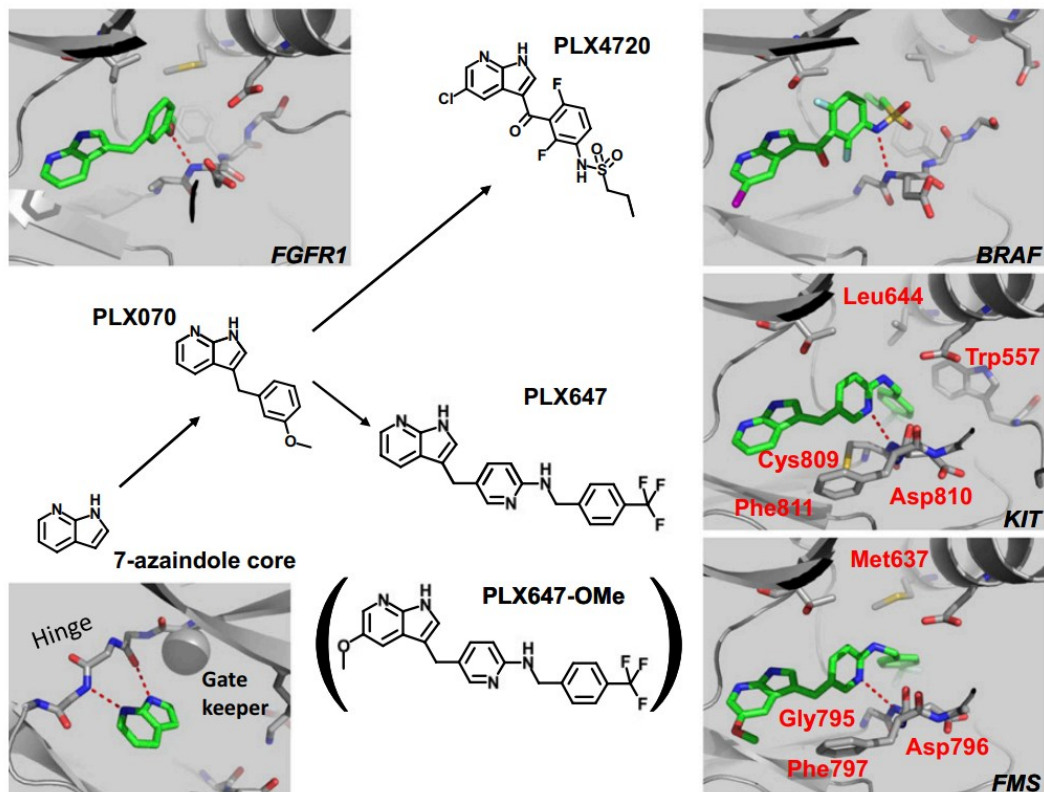


Figura 17 (37)

PEXIDARTINIB

Pexidartinib 200 mg in capsule è stato sviluppato tramite il FBDD da Daiichi Sankyo ed è il primo ed unico farmaco sistemico approvato dall'FDA nel 2019 per il trattamento sintomatico di pazienti affetti dal TGCT associato a limitazioni nei movimenti, con una severa morbidità.(38) (Figura 10).

Vien utilizzato soprattutto per quei pazienti che non possono essere sottoposti ad un intervento chirurgico o che comunque non otterrebbero miglioramenti dopo la rimozione del tumore.(39)

Pexidartinib è un inibitore di tirosin-chinasi (TKI) selettivo per il recettore del fattore 1 stimolante le colonie (CSF1R), cioè lega in modo specifico quel recettore inibendolo, in pratica impedisce al fattore 1 stimolante le colonie di legare il recettore e di scatenare

l'effetto che porterebbe allo sviluppo e alla crescita della massa tumorale. In uno studio in particolare, ENLIVEN, è stato osservato un miglioramento statisticamente significativo per quanto riguarda la risposta dei pazienti al farmaco e la riduzione della massa tumorale. (Figura 11).

Infatti la overall response rate (ORR) è stata del 39% rispetto al placebo.

Questo significa che il 39% dei pazienti hanno sperimentato una risposta completa o parziale alla terapia, dove la risposta completa (CR) significa che tutto il tumore è scomparso e quindi il paziente è guarito completamente, invece la risposta parziale significa che la massa tumorale si è ridotta dopo il trattamento.(19)

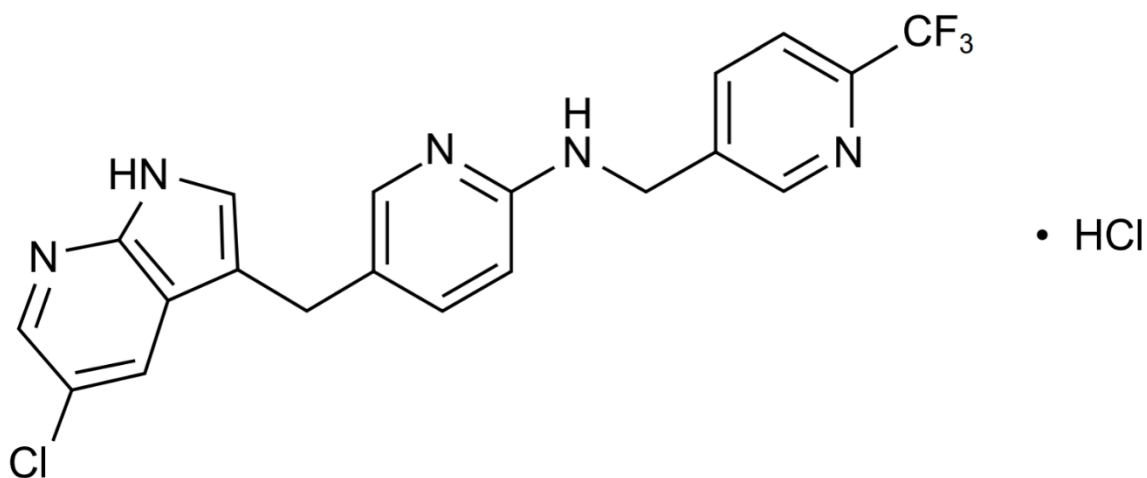


Figura 10, struttura chimica di Pexidartinib (38)

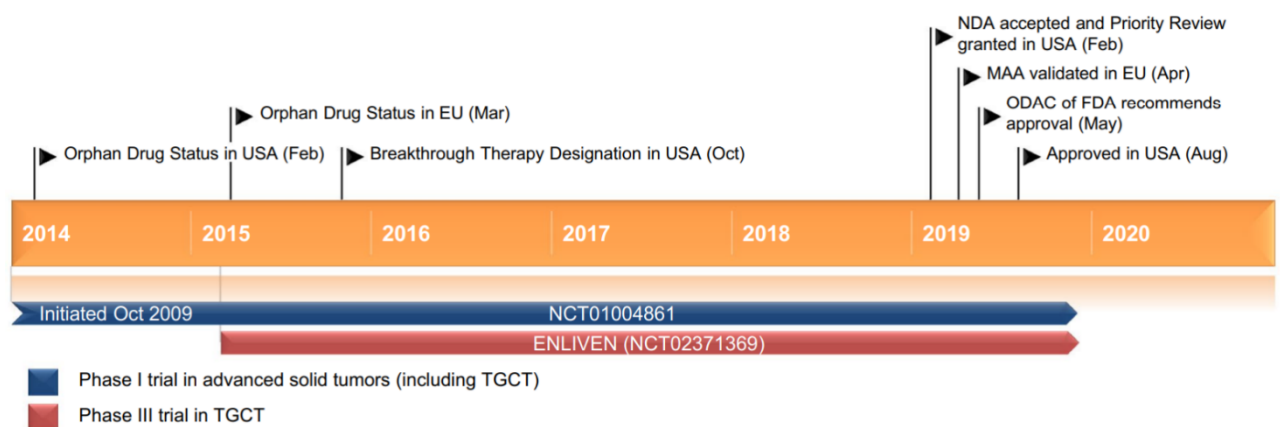


Figura 11 (38)

PEXIDARTINIB: FARMACOLOGIA CLINICA

FARMACODINAMICA: MECCANISMO D'AZIONE

Pexidartinib è un inibitore di tirosin-chinasi (TKI) che può legare ed inibire diversi recettori tirosin-chinasici come ad esempio: il recettore tirosin-chinasico proto-oncogene (KIT), il recettore del fattore 1 stimolante le colonie (CSF1R), la tirosin-chinasi 3 simile a FMS (FLT3).

La concentrazione del farmaco (TKI) che inibisce il 50% del bersaglio è: $IC_{50} = 0.02 \mu\text{mol/L}$.⁽³⁸⁾ L'effetto principale è dato dall'inibizione del CSF1R, impedendo al CSF1 di interagire con il suo recettore, evitando così lo sviluppo e la crescita della massa tumorale.⁽¹⁹⁾ Infatti, CSF1 viene sovra espresso in molti tipi di cellule tumorali e consente una più rapida differenziazione dei monociti in macrofagi associati al tumore (TAMs), nonché la loro sopravvivenza all'interno del microambiente tumorale.⁽¹⁹⁾ I macrofagi associati al tumore (TAMs) sopprimono la risposta del sistema immunitario, permettendo la crescita della massa tumorale e una possibile metastasi.

Pexidartinib si è rivelato essere un farmaco molto più potente rispetto ad altri farmaci inibitori di tirosin-chinasi, come l'imatinib, per il trattamento di pazienti affetti da TGCT. Inoltre, anche in vari studi preclinici effettuati sui topi, dove sono state effettuate analisi immuno-istologiche, si è potuto osservare che Pexidartinib ha ridotto di molto il numero dei macrofagi associati al tumore (TAMs) nella massa tumorale ($p < 0.0001$ vs. control).⁽⁴⁰⁾ In altri studi preclinici si è notato anche che Pexidartinib porta ad un cambiamento di polarizzazione dei macrofagi associati al tumore (TAMs) e sembrerebbe che questo cambiamento contribuisca all'azione inibitoria di Pexidartinib sullo sviluppo e sulla crescita tumorale.

Infatti Pexidartinib, in questi studi preclinici, ha ridotto, se non del tutto soppresso, la massa tumorale dei topi in modo statisticamente significativo ($p < 0.05$).

C'è stato anche un aumento significativo della sopravvivenza dei topi, trattati con Pexidartinib, che senza il trattamento era di 8 settimane, mentre con il trattamento era di 11,3 settimane ($p = 0.026$).⁽³⁸⁾

FARMACOCINETICA: ASSORBIMENTO, DISTRIBUZIONE, METABOLISMO ED ELIMINAZIONE (ADME)

ASSORBIMENTO

Dopo l'assunzione orale del medicinale a stomaco vuoto, il picco della concentrazione plasmatica del farmaco si ha dopo circa 2 ore e 30 minuti ($T_{max} = 2,5 \text{ h}$).

Invece l'assunzione orale del medicinale dopo un pasto di circa 1000 Kcal aumenta di molto il tempo in cui si raggiunge il picco della concentrazione plasmatica del farmaco, infatti il tempo per raggiungere il picco di concentrazione plasmatica aumenta di 2.5 h.

In totale, quindi, se si assume il medicinale dopo un pasto il tempo necessario a raggiungere il picco di concentrazione plasmatica di farmaco è di 5 ore ($T_{max} = 5 \text{ h}$).⁽⁴¹⁾

Inoltre, assumendo il medicinale per via orale dopo aver consumato un pasto particolarmente ricco di grassi (almeno 500 Kcal di grassi), aumenta di molto la

concentrazione plasmatica del farmaco (Cmax) e l'area sottesa alla curva (AUC), in particolare aumentano del 100%.

Un aumento così elevato da un lato può essere un aspetto positivo, in quanto si può decidere se far assumere al paziente il medicinale prima o dopo il pasto in base all'effetto che voglio ottenere.

Infatti, se il paziente assume il medicinale dopo i pasti, avremo un aumento netto dell'effetto e della durata dell'effetto del farmaco, il che di solito è positivo.

Purtroppo, bisogna considerare anche un lato negativo: il medicinale assunto dopo il pasto, anche se è vero che porta ad un miglioramento dell'assorbimento e quindi dell'effetto, porta ad un rischio molto più elevato di incorrere in effetti collaterali di gravità anche maggiore.

Visto che gli effetti avversi del medicinale, come sopra descritto, non sono solo lievi, ma possono comportare anche problematiche gravi come l'epatotossicità, è consigliato non assumere il medicinale dopo i pasti, dal momento che gli effetti collaterali, già gravi, potrebbero peggiorare.(19) Inoltre, i pazienti sottoposti al trattamento con Pexidartinib che soffrivano di lieve (CLcr 60–89 mL/min), moderato (CLcr 30–59 mL/min) o grave (CLcr 15–29 mL/min) danno renale sono stati esposti ad una dose più alta di medicinale, circa il 30% in più, visto che non riuscivano ad eliminarlo sufficientemente.

Quindi nei pazienti che presentano danni renali è opportuno ridurre la dose del farmaco.(38)

DISTRIBUZIONE

Per quanto riguarda la distribuzione del Pexidartinib, una volta assunto per via orale ed assorbito, si lega all'albumina presente nel sangue fino al 99% o alla glicoproteina acida alfa-1 fino all'89,9%.

Inoltre il volume apparente di distribuzione è di 187 L (27% del totale).(19)

METABOLISMO

La principale via per il metabolismo del Pexidartinib è l'ossidazione effettuata dal citocromo P450-3A4 (CYP3A4 o enzima CYP3A4) a livello epatico.

Pexidartinib viene metabolizzato anche da altri enzimi, in particolare viene glucoronato da parte del glucoronosiltrasferasi UDP-1A4 (UGT1A4) che forma l'N-glucoronide inattivo (circa il 10%).(19)

ELIMINAZIONE

La clearance apparente del Pexidartinib è di 5,1 L/h.

L'emivita (t1/2) è di 26,6 h.(42)

Il 65% del Pexidartinib viene secreto tramite le feci, di cui il 44% viene secreto non modificato.

Il 27% del Pexidartinib, invece, viene secreto tramite le vie urinarie ed il metabolita presente in maggiore quantità è l'N-glucoronide (più del 10%).(19)

SOMMINISTRAZIONE, DOSAGGIO E POSOLOGIA

La somministrazione del Pexidartinib è per via orale ed è raccomandata una dose di 400 mg per due volte al giorno a stomaco vuoto, 1 ora prima dei pasti o 2 ore dopo i pasti. Pexidartinib dovrebbe essere somministrato fino alla scomparsa completa della patologia o fino a che non si presentino effetti collaterali talmente gravi da costringere il paziente ad interrompere la terapia a causa della troppo elevata tossicità. Il medicinale contiene il Pexidartinib sotto forma di capsule, che devono essere ingoiate intere, non devono essere aperte, rotte o masticate.(42) Inoltre è possibile, nonché raccomandato, da parte del medico cambiare il dosaggio e adeguarlo alla risposta del singolo paziente, soprattutto nel caso si presentino effetti collaterali gravi o interazioni con altri medicinali.(19)

Features and properties of pexidartinib	
Alternative names	Pexidartinib hydrochloride; Plexxikon 3397; PLX-3397; TURALIO
Class	2 ring heterocyclic compounds; anti-dementias; anti-neoplastics; fluorine compounds; pyridines; pyrroles; small molecules
Mechanism of action	Fms-like tyrosine kinase 3 inhibitors; macrophage colony stimulating factor receptor antagonists; proto oncogene protein c-kit inhibitors
Route of administration	Oral
Pharmacodynamics	Inhibits colony-stimulating factor 1 (CSF1) receptor, KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase (KIT) and FMS-like tyrosine kinase 3 internal tandem duplication mutation (FLT3-ITD); depletes (or shifts polarization of) tumor-associated macrophages and inhibits tumor growth in mouse models
Pharmacokinetics	Generally dose-proportional pharmacokinetics; increased drug exposure if administered with food; drug exposure increased in patients with renal impairment; potential to interact with various other drugs if used concomitantly
Adverse events (occurring in ≥ 15% of pexidartinib recipients)	Hair color changes (depigmentation), fatigue, increased aspartate aminotransferase, increased alanine aminotransferase, dysgeusia, vomiting, periorbital edema, abdominal pain, decreased appetite, pruritus, hypertension and increased alkaline phosphatase
ATC codes	
WHO ATC code	LO1X-E (protein kinase inhibitors); LO4A-A (selective immunosuppressants); MO1 (anti-inflammatory and anti-rheumatic products); NO6D-X (other anti-dementia drugs)
EphMRA ATC code	L1H (protein kinase inhibitor anti-neoplastics); L4X (other immunosuppressants); M1 (anti-inflammatory and anti-rheumatic products); N6D (nootropics)
Chemical name	5-[(5-chloro-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-3-yl)methyl]-N-[[6-(trifluoromethyl)pyridin-3-yl]methyl]pyridin-2-amine monohydrochloride

Figura 12 (38)

INTERAZIONI FARMACOLOGICHE

Pexidartinib, come già sopra descritto, è un medicinale che può causare gravi effetti collaterali, tra cui tossicità al fegato, quindi non bisognerebbe assumere tale medicinale in concomitanza con altri farmaci che possono dare effetti collaterali epatotossici.

Inoltre, è stato osservato che la prima via di metabolizzazione del Pexidartinib è l'ossidazione a carico del citocromo P450 3A4 (CYP3A4) e la glucoronazione a carico del citocromo UGT1A4, quindi si dovrebbe evitare la co-assunzione del succo di pompelmo e di medicinali che sono forti inibitori di CYP3A4 e di UGT1A4, visto che porterebbero ad un mancato metabolismo e ad una mancata eliminazione di Pexidartinib da parte di questi enzimi, e, quindi, si avrebbero livelli plasmatici troppo elevati di principio attivo che porterebbero ad un aumento degli effetti collaterali epatotossici.

Si dovrebbero evitare anche gli induttori di tali citocromi, come l'alcol e l'erba di San Giovanni, visto che, inducendoli, si avrebbe una maggiore metabolizzazione ed eliminazione del Pexidartinib con una riduzione della sua concentrazione, che si tradurrebbe in una riduzione dell'effetto terapeutico, portando al fallimento del trattamento.

Se non è possibile evitare l'uso di medicinali inibitori del CYP3A4 e di UGT1A4, bisognerebbe quanto meno diminuire il dosaggio del Pexidartinib per evitare, o almeno ridurre, gli effetti collaterali che deriverebbero da una troppo elevata concentrazione di principio attivo non metabolizzato.(41)(Table 2).

Inoltre, si è osservato che gli agenti antiacidi, assunti in concomitanza con Pexidartinib, provocano una diminuzione del picco di concentrazione plasmatica (C_{max}) del 55% e una diminuzione dell'area sottesa alla curva (AUC) del 50%, quindi bisogna evitare anche l'assunzione contemporanea di Pexidartinib con farmaci antiacidi o con inibitori di pompa protonica (PPI).

Oppure, come alternativa, si può assumere Pexidartinib un'ora prima o due ore dopo a partire dall'assunzione dell'antiacido.

Inoltre, è consigliato assumere Pexidartinib almeno due ore prima o dieci ore dopo l'assunzione di un'antistaminico anti-H₂, farmaci utilizzati per bloccare l'azione dell'istamina sui recettori H₂ delle cellule parietali dello stomaco, impedendo a queste ultime di secernere sostanze acide (acido cloridrico).(19)

Table 2 Dose modification for CYP3A and UGT drug interactions

Planned total daily dose	Modified total daily dose	Modified total daily dose administration
800 mg	400 mg	200 mg twice daily
600 mg ^a		
400 mg ^a	200 mg	200 mg once daily

^aPlanned total daily dose refers to dose reductions for pexidartinib as recommended for adverse reactions

Table 2(19)

CONTROINDICAZIONI

Nel caso di Pexidartinib, non ci sono particolari controindicazioni.(19)

EFFETTI AVVERSI

Nei pazienti trattati con Pexidartinib sono stati osservati svariati effetti collaterali, alcuni più gravi di altri, ma l'effetto avverso più grave che si è osservato è stata un'epatotossicità tale che, in alcuni casi i pazienti, hanno dovuto addirittura abbandonare la terapia.(43)In questi pazienti, si è osservato, infatti, un aumento di aspartato aminotransferasi (AST), di alanina aminotransferasi (ALT) e un aumento di transaminasi, che indicano appunto un problema epatico.

Gli effetti collaterali si presentavano maggiormente in pazienti esposti a più elevate dosi di Pexidartinib.(19)

Inoltre, il medicinale, potrebbe causare anche gravi danni a livello renale, motivo per cui, nel caso in cui si presenti questo effetto avverso è importante che il medico diminuisca il dosaggio del farmaco o addirittura che ne interrompa l'assunzione da parte del paziente. Nel complesso, però, l'assunzione di Pexidartinib, sia come monoterapia che in associazione con altri principi attivi, non ha causato effetti collaterali troppo gravi per la maggior parte dei pazienti trattati.(38)

POSSIBILI EFFETTI SULLA FERTILITA' MASCHILE E FEMMINILE

Tramite studi preclinici svolti sugli animali è stato osservato che Pexidartinib potrebbe compromettere la fertilità sia nel genere maschile che femminile.

Se Pexidartinib fosse somministrato ad una donna in gravidanza potrebbe provocare anche danni al feto, quindi è evidente che prima di somministrare Pexidartinib bisogna assicurarsi che la paziente non sia incinta.

Inoltre, è importante che la paziente assuma dei contraccettivi durante tutto il periodo di trattamento con Pexidartinib fino ad un mese dopo la fine del trattamento stesso.

Allo stesso modo, anche ai pazienti, di genere maschile, va ricordato che durante tutto il periodo di trattamento con Pexidartinib fino anche ad un mese dopo l'interruzione del trattamento stesso, devono usare contraccettivi efficaci durante i rapporti con donne che potenzialmente potrebbero rimanere incinte.(19)

ALLATTAMENTO

Attualmente, non ci sono dati né per quanto riguarda la presenza di Pexidartinib nel latte umano, né nel latte animale.

Non ci sono dati neanche riguardo gli effetti sull'allattamento di un neonato da parte di un paziente in trattamento con Pexidartinib.

Inoltre, non sono chiari neppure gli effetti di Pexidartinib sulla produzione di latte materno in pazienti in trattamento con tale medicinale.

Nonostante la mancanza di dati è comunque consigliato evitare, durante tutto il periodo di trattamento fino ad una settimana dopo la fine dello stesso, l'allattamento per i

pazienti in trattamento con Pexidartinib a causa dei possibili effetti collaterali che potrebbero ripercuotersi nel neonato che viene allattato.(19)

DANNI RENALI

Per i pazienti in trattamento con Pexidartinib, che hanno presentato danni renali medi o gravi, è consigliato un adeguamento del dosaggio.

Infatti, per cercare di ridurre l'effetto collaterale di Pexidartinib è necessario aggiustare la dose di principio attivo somministrato da 400 mg al mattino e 400 mg alla sera, a 200 mg al mattino e 400 mg alla sera, quindi si dimezza la dose mattutina di farmaco.(19)

DANNI EPATICI

Per i pazienti in trattamento con Pexidartinib che hanno presentato danni epatici di lieve entità, purtroppo, non ci sono aggiustamenti del dosaggio di principio attivo che possono essere attuati per ridurre gli effetti collaterali.

Non sono stati raccomandati diversi dosaggi neanche per i pazienti in trattamento con Pexidartinib che presentano un danno epatico di media o grave entità.

Semplicemente, non si modifica il dosaggio, invece, si cerca di prevenire, prevedere e controllare, il più possibile, la comparsa di questi effetti avversi nei pazienti. (43)

Infatti, non viene raccomandata l'assunzione di Pexidartinib per tutti quei pazienti che presentano elevati livelli plasmatici di transaminasi, bilirubina, ALP o una malattia al fegato o al tratto biliare.

Inoltre, a causa dei rischi di epatotossicità che Pexidartinib può causare, la prescrizione di tale medicinale fatta dal medico, la dispensazione fatta dal farmacista e l'assunzione di tale medicinale da parte del paziente, viene autorizzata solo dopo un'attenta valutazione del rischio tramite un programma denominato REMS (risk evaluation and mitigation strategies).

Questo programma prevede che i medici siano informati e certificati per la prescrizione di tale medicinale, che la farmacia abbia accettato di far parte del programma e quindi che sia stata informata sulle modalità di dispensazione del medicinale e che i pazienti siano inclusi in un registro dei pazienti idonei al trattamento.(19)

Table 1 Recommended dose modification for pexidartinib adverse effects

Adverse effect	Recommendation	Lab monitoring	Dose modification
Elevated ALT and/or AST > 3–5×ULN	Hold doses of pexidartinib	Perform liver tests weekly	If AST and ALT are ≤3×ULN within, resume at reduced dose If AST or ALT is not ≤3×ULN in 4 weeks, permanently discontinue pexidartinib
> 5–10×ULN	Hold doses of pexidartinib	Perform liver tests twice weekly	If AST and ALT ≤3×ULN within 4 weeks, resume at reduced dose If AST or ALT is not ≤3×ULN in 4 weeks, permanently discontinue pexidartinib
> 10×ULN	Discontinue pexidartinib	Perform liver tests twice weekly until AST or ALT ≤5×ULN, then weekly until ≤3×ULN	Permanently discontinue pexidartinib
Increased ALP and GGT ALP ≥ULN to ≤2×ULN	Discontinue pexidartinib	Monitor liver tests 2× weekly until ALP is ≤5×ULN, then weekly until ≤2×ULN	Permanently discontinue pexidartinib
Increased bilirubin TB ≥ULN to ≤2×ULN or DB >ULN and <1.5×ULN	Hold doses of pexidartinib	Monitor liver tests 2× weekly	If an alternate cause for increased bilirubin is confirmed and bilirubin is <ULN within 4 weeks, resume at reduced dose If bilirubin is not <ULN in 4 weeks, permanently discontinue pexidartinib
TB ≥2×ULN or DB ≥1.5×ULN	Discontinue pexidartinib	Monitor liver tests 2× weekly until bilirubin is ≤ULN	Permanently discontinue pexidartinib
Adverse events Any other adverse reactions or other laboratory abnormalities	Hold doses of pexidartinib until improvement or resolution	Not applicable	Resume at a reduced dose upon improvement or resolution

ALP alkaline phosphatase, ALT alanine aminotransferase, AST aspartate aminotransferase, DB direct bilirubin, GGT gamma-glutamyl transferase, TB total bilirubin, ULN upper limit of normal

Table 1 (19)

POPOLAZIONE GERIATRICA

Visto che negli studi effettuati su Pexidartinib non sono stati selezionati pazienti anziani, sopra i 65 anni, a causa dei criteri di esclusione, non ci sono dati sufficienti per determinare gli effetti del farmaco sulla popolazione in questa fascia d'età.(19)

POPOLAZIONE PEDIATRICA

Anche in questo caso non è possibile determinare gli effetti dati dall'assunzione di Pexidartinib in pazienti pediatriche a causa dei criteri di esclusione degli studi clinici, dove appunto non si possono reclutare pazienti con un'età inferiore ai 18 anni o sopra ai 65, come visto precedentemente.(19,42)

STUDI CLINICI DI FASE I E DI FASE II

L'efficacia di Pexidartinib è stata investigata in studi clinici di fase I e di fase II, sia come monoterapia che in associazione con altri farmaci, per il trattamento di vari tipi di tumore.

Alcuni dei tumori per i quali è stato studiato Pexidartinib sono: il glioblastoma, un tumore generato dai macrofagi associati al tumore (TAMs), che possono arrivare a rappresentare fino al 30% della massa tumorale e accelerano la crescita del tumore; il melanoma e il tumore al seno.(38)

Clinical trials of pexidartinib						
Drug(s)	Indication	Phase	Status	Location(s)	Identifier	Sponsor
Pexidartinib, placebo	Symptomatic TGCT	III	Active, not recruiting	Multinational	NCT02371369; ENLIVEN; PLX108-10; 2014-000148-14	Daiichi Sankyo
Pexidartinib	Recurrent glioblastoma	II	Completed	USA	NCT01349036; PLX108-04	Plexxikon
Pexidartinib	KIT-mutated advanced acral and mucosal melanoma	II	Active, not recruiting	UK	NCT02071940; PIANO; 11_DOG12_56	The Christie NHS Foundation Trust
Pexidartinib	Advanced castration-resistant prostate cancer	II	Completed	USA	NCT01499043; PLX108-06	Plexxikon
Pexidartinib, radiation therapy, temozolomide	Newly diagnosed glioblastoma	I/II	Active, not recruiting	USA	NCT01790503	Plexxikon
Pexidartinib, pembrolizumab	Advanced melanoma and other solid tumours	I/II	Completed	USA	NCT02452424	Plexxikon
Pexidartinib	Refractory leukemias and refractory solid tumors including NF1 PN	I/II	Recruiting	USA	NCT02390752	National Cancer Institute
Pexidartinib, eribulin	Metastatic breast cancer	I/II	Active, not recruiting	USA	NCT01596751	Hope Rugo
Pexidartinib, sirolimus	Sarcoma (phase I) and MPNST (phase II)	I/II	Active, not recruiting	USA	NCT02584647	Gulam Manji
Pexidartinib, PLX9486, sunitinib	Advanced solid tumors	I/II	Active, not recruiting	USA	NCT02401815	Plexxikon
Pexidartinib	Relapsed or refractory acute myeloid leukemia	I/II	Completed	USA	NCT01349049	Plexxikon
Pexidartinib	Advanced solid tumors	I	Active, not recruiting	USA	NCT01004861	Plexxikon
Pexidartinib, paclitaxel	Advanced solid tumors	I	Completed	USA	NCT01525602	Plexxikon
Pexidartinib, durvalumab	Metastatic/advanced pancreatic or colorectal cancers	I	Active, not recruiting	France	NCT02777710	Centre Leon Berard
Pexidartinib, binimetinib	Advanced gastrointestinal stromal tumor	I	Active, not recruiting	USA	NCT03158103	Memorial Sloan Kettering Cancer Center
Pexidartinib	Advanced solid tumors	I	Active, not recruiting	Taiwan	NCT02734433	Daiichi Sankyo

NF1 PN neurofibromatosis type 1 related plexiform neurofibromas, *NHS* National Health Service, *MPNST* malignant peripheral nerve sheath tumor, *TGCT* tenosynovial giant cell tumor, *UK* United Kingdom

Figura 13 (38)

STUDIO CLINICO DI FASE I: EFFETTI DI PEXIDARTINIB SU TUMORI SOLIDI

In uno studio clinico di fase I sono stati investigati gli effetti di Pexidartinib, da solo come monoterapia e in associazione con altri farmaci, in pazienti affetti da tumori solidi.

Sono stati reclutati 38 pazienti, affetti da tumore solido, secondo criteri di inclusione e di esclusione ben precisi: in base all'età, alle eventuali patologie, allo stato di gravidanza e alle eventuali terapie concomitanti in corso.

In questo studio è risultata efficace la co-somministrazione di Pexidartinib per via orale con Paclitaxel, che ha portato a risposte sia parziali che totali o alla stabilizzazione del tumore in più del 50% dei pazienti trattati.(44)

Un paziente con carcinoma peritoneale ha avuto una risposta completa alla terapia, mentre altri cinque pazienti con tumori al seno, al retto, alla vescica alle ovaie hanno avuto una risposta parziale al trattamento.

Inoltre, Pexidartinib da solo, usato come monoterapia, assunto insieme a Binimetinib o Pexidartinib insieme a Durvalumab, hanno dimostrato tutti effetti antitumorali importanti contro tumori solidi, soprattutto in pazienti affetti da TGCT, tumore per il quale è stato approvato l'utilizzo di Pexidartinib appunto.

Queste associazioni sono state efficaci anche contro altri tipi di tumori, come ad esempio contro il tumore stromale gastrointestinale avanzato (GIST).

Inoltre, Pexidartinib è stato efficace, anche come monoterapia, in pazienti affetti da tumori solidi.(38)

STUDIO CLINICO DI FASE II: EFFETTI DI PEXIDARTINIB SUL GLIOBLASTOMA

Uno studio clinico open-label multicentrico di fase II ha investigato l'effetto di Pexidartinib su pazienti affetti da glioblastoma.

In questo studio sono stati selezionati 37 pazienti affetti da glioblastoma, secondo criteri di inclusione e di esclusione ben precisi: in base all'età, alle eventuali patologie, allo stato di gravidanza e alle eventuali terapie concomitanti in corso.

L'età media dei pazienti trattati era di 58,5 anni e sono stati seguiti per 9,4 mesi, durante i quali hanno assunto Pexidartinib capsule 1000mg una volta al giorno.(45)

Purtroppo in questo studio, a differenza di ENLIVEN, Pexidartinib non ha dimostrato efficacia in pazienti affetti da glioblastoma, un tumore cerebrale ancora oggi molto difficile da curare.

I pazienti che assumevano Pexidartinib hanno avuto una sopravvivenza di circa sei mesi rispetto ai sette mesi dei pazienti del gruppo di controllo.

Inoltre, non ci sono state risposte totali, né parziali da parte dei pazienti in trattamento con il medicinale.(38)

ENLIVEN, STUDIO CLINICO DI FASE III: EFFETTI DI PEXIDARTINIB SUL TGCT

L'efficacia del Pexidartinib è stata determinata in molti studi clinici, in particolare è stato importante uno studio clinico di fase III randomizzato, diviso in due parti.

Lo studio in particolare si chiama ENLIVEN e determina l'efficacia del Pexidartinib contro il placebo per il trattamento del tumore tenosinoviale delle cellule giganti (TGCT).

La prima parte di questo studio è stata fatta in doppio cieco, dove né i pazienti, né gli sperimentatori sapevano effettivamente se stessero somministrando al paziente il medicinale o il placebo; mentre la seconda parte dello studio non è stata fatta in doppio cieco, ma era open-label, dove a tutti i pazienti veniva somministrato Pexidartinib.

I pazienti sono stati selezionati in base a criteri di inclusione ben precisi: dovevano avere almeno 18 anni di età, essere affetti da TGCT avanzato in modo tale che l'operazione chirurgica non potesse essere più praticata in quanto avrebbe potuto peggiorare le condizioni del paziente, soffrire di un dolore cronico con un punteggio di almeno 4 su 10, avere una massa tumorale di dimensione minima di 2 cm ed essere in un regime stabile di prescrizione di analgesici per almeno 2 settimane prima dell'inizio dello studio clinico. Altri pazienti, invece, non sono stati selezionati per far parte dello studio in base a criteri di esclusione specifici, quali: essere minorenni, in gravidanza, avere un'altra patologia o tumore differente dal TGCT, essere troppo anziani e quindi con difese immunitarie abbassate, essere già stati in trattamento con Pexidartinib precedentemente o essere in trattamento con qualsiasi altro medicinale che bersagli l'asse CSF1-CSF1R.

Tutti i pazienti selezionati per lo studio sono stati presi da aree geografiche simili e l'età media era di 44 anni.

Del totale dei pazienti inclusi nello studio, il 53% aveva subito un intervento chirurgico precedentemente l'inizio dello studio clinico, l'88% era affetto da D-TGCT e il 9% era stato trattato con terapie sistemiche che non bersagliavano l'asse CSF1-CSF1R.

La prima parte dello studio, realizzata in doppio cieco, includeva 120 pazienti che erano stati assegnati in modo casuale in rapporto 1:1 per ricevere Pexidartinib (61 pazienti) o il placebo (59 pazienti) per 24 settimane, con la venticinquesima settimana di assestamento (senza terapie), per poi riprendere la seconda fase dello studio.

In questa prima fase dello studio, per le prime due settimane, i pazienti hanno ricevuto in tutto 1000 mg di Pexidartinib (o placebo) somministrato due volte al giorno in due dosaggi diversi: la prima dose conteneva 400 mg di Pexidartinib, mentre la seconda ne conteneva 600 mg.

Successivamente i pazienti hanno ricevuto Pexidartinib sempre due volte al giorno, ma in due dosaggi uguali di 400 mg per le successive 22 settimane.

Nella prima parte dello studio il trattamento è continuato senza interruzione fino alla progressione della terapia o fino alla comparsa di effetti avversi inaccettabili, quali l'epatotossicità grave.

Al raggiungimento della venticinquesima settimana, cioè alla fine della prima parte dello studio, l'obiettivo primario fissato (primary end point) era l'Overall Response Ratio (ORR), basato sulle immagini della risonanza magnetica (MRI) e sulla Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST).

Mentre gli obiettivi secondari (secondary end point) erano: l'eventuale miglioramento per quanto riguarda la capacità di movimento e l'ampiezza del movimento che i pazienti

riuscivano ad effettuare con la giuntura affetta dal tumore; l'eventuale rigidità dell'articolazione o della giuntura; il cambiamento del volume della massa tumorale dopo il trattamento, basata su RECIST, un metodo utilizzato appunto per calcolare il volume della massa tumorale come percentuale della cavità sinoviale.

In tutto hanno completato la prima parte dello studio 61 pazienti trattati con Pexidartinib e 30 trattati con il placebo.

Alla venticinquesima settimana la percentuale di pazienti trattati che hanno avuto una risposta totale (overall response) secondo il RECIST sono stati il 39%, cioè 24 su 61 pazienti trattati con Pexidartinib contro lo 0%, cioè 0 su 30 pazienti trattati con il placebo.

La differenza dei risultati ottenuti, come si può ben notare, è statisticamente significativa con una differenza del 39% [95% CI 27–53] ($p < 0.0001$).

Oltre alla risposta totale dei pazienti, differenze statisticamente significative, tra i pazienti trattati con Pexidartinib e pazienti trattati con il placebo, sono state osservate anche in altre analisi effettuate.

Infatti, ci sono differenze statisticamente significative tra i due gruppi, sempre a favore del gruppo trattato con Pexidartinib, per quanto riguarda: l'ampiezza del movimento 8,9% ($p = 0.0043$), la funzionalità fisica con una differenza di punteggio di 5,0 ($p = 0.0019$), e la differenza di punteggio della rigidità di $-2,2$ ($p < 0.0001$).

Inoltre, la risposta al dolore era più alta nei pazienti trattati con Pexidartinib (19 [95% CI 21–44]) rispetto a quelli trattati con il placebo (9 [95% CI 8–27]), con una differenza assoluta del 15,9% [95% CI 1–30], anche se il dato, in questo caso, non è statisticamente significativo ($p = 0.052$).

Le percentuali di pazienti che hanno avuto una risposta totale per quanto riguarda la riduzione del volume della massa tumorale alla venticinquesima settimana sono state: 56%, cioè 34 su 61 dei pazienti trattati con Pexidartinib contro lo 0%, cioè 0 su 30 dei pazienti trattati con il placebo; il dato riportato è statisticamente significativo ($p < 0.0001$).

I pazienti che hanno completato la prima parte dello studio, in doppio cieco, sono stati selezionati per continuare lo studio nella seconda parte dello studio open-label.

È importante evidenziare che gli sperimentatori, dopo aver determinato chi stava effettivamente assumendo il medicinale e chi il placebo, hanno permesso a pazienti con una progressione tumorale avanzata di entrare a far parte della seconda fase dello studio, solo se questi erano stati sottoposti al trattamento con il placebo, prima degli altri pazienti, per evitare peggioramenti delle condizioni di salute del paziente stesso.

La seconda parte dello studio era open-label, dove sia i pazienti che gli sperimentatori sapevano cosa stava assumendo o somministrando rispettivamente.

Come per la prima parte dello studio, anche la seconda parte dello studio è stata condotta per un periodo di 24 settimane, con la venticinquesima settimana di assestamento e alla settimana successiva è stata effettuata l'analisi dei dati.

Ai pazienti che, nella prima fase erano sotto trattamento con Pexidartinib, è stato dato lo stesso dosaggio di principio attivo per altre 24 settimane; mentre ai pazienti, che nella prima fase erano in trattamento con il placebo, è stato somministrato Pexidartinib con un dosaggio di 400 mg per due volte al giorno.

In tutto i pazienti entrati nella fase due dello studio sono 61, per quanto riguarda i pazienti che nella fase uno erano stati trattati con Pexidartinib, e 30 per quanto riguarda

i pazienti che nella prima fase erano stati trattati con il placebo.

Dei 30 pazienti del precedente gruppo trattato con il placebo, il 30%, cioè 9 su 30 pazienti hanno avuto una risposta totale o parziale secondo il RECIST; il 57%, cioè 17 su 30 pazienti hanno avuto una diminuzione del volume della massa tumorale; il 13%, cioè 4 su 30 pazienti hanno avuto un notevole miglioramento per quanto riguarda l'ampiezza del movimento; la rigidità di tutti e 30 i pazienti trattati aveva un punteggio di -3,0 e la risposta al dolore era di -2,6 alla venticinquesima settimana.

Tutti dati statisticamente significativi, se confrontati con i risultati ottenuti dal trattamento con il placebo.

Questo fa capire molto l'importanza che ha avuto la somministrazione del Pexidartinib in questi pazienti per bloccare o rallentare la crescita tumorale.

Comunque, ci sono stati molti effetti avversi sia di gravità minore, che di gravità maggiore a causa del trattamento con Pexidartinib.

Infatti, ben il 98%, cioè 60 su 61 dei pazienti, che nella fase uno erano stati trattati con Pexidartinib, hanno sperimentato effetti collaterali; mentre il 93% cioè 28 su 30 dei pazienti, che nella prima fase erano in trattamento con il placebo, hanno sperimentato effetti avversi al farmaco.

Gli effetti collaterali di grado 3 o 4, si sono presentati maggiormente nei pazienti che nella prima fase erano in trattamento con Pexidartinib (44%) rispetto ai pazienti che erano in trattamento con il placebo (12%), probabilmente a causa della maggior quantità di principio attivo a cui sono stati sottoposti per un periodo più prolungato.(46)

Tra gli effetti collaterali di grado 3 o 4 sono compresi: livelli più alti nel sangue di transaminasi; livelli aumentati di AST nel 10% dei pazienti trattati con Pexidartinib contro lo 0% dei pazienti trattati con il placebo; livelli più elevati di ALT nel 10% dei pazienti trattati con Pexidartinib contro il 2% dei pazienti trattati con il placebo; alcalinofosfatasi (ALP) nel 7% dei pazienti trattati con Pexidartinib contro lo 0% dei pazienti trattati con il placebo; e una maggiore pressione sanguigna nel 5% dei pazienti trattati con Pexidartinib contro lo 0% dei pazienti trattati con il placebo.

Tra gli effetti collaterali di gravità minore sono stati osservati: la depigmentazione dei capelli nel 67% dei pazienti che nella prima fase dello studio erano stati trattati con Pexidartinib contro il 3% dei pazienti che erano stati trattati con il placebo; la fatica nel 54% dei pazienti trattati con Pexidartinib contro il 36% dei pazienti trattati con il placebo; aumentati livelli di AST nel 39% dei pazienti trattati con Pexidartinib contro lo 0% dei pazienti trattati con il placebo; aumentati livelli di ALT nel 28% dei pazienti trattati con Pexidartinib contro il 2% dei pazienti trattati con il placebo; sensazione di nausea e vomito nel 20% dei pazienti trattati con Pexidartinib contro il 5% dei pazienti trattati con il placebo; dolore addominale nel 16% dei pazienti trattati con Pexidartinib contro il 10% dei pazienti trattati con il placebo; diminuzione dell'appetito nel 16% dei pazienti trattati con Pexidartinib contro il 10% dei pazienti trattati con il placebo; prurito nel 16% dei pazienti trattati con Pexidartinib contro il 3% dei pazienti trattati con il placebo; ipertensione nel 15% dei pazienti trattati con Pexidartinib contro lo 0% dei pazienti trattati con il placebo; aumentati livelli di ALP nel 15% dei pazienti trattati con Pexidartinib contro lo 0% dei pazienti trattati con il placebo.(38) (Table 1).

Anche gli effetti collaterali che hanno portato poi i pazienti ad interrompere la terapia o, comunque, ad abbassare il dosaggio sono maggiori nei pazienti che nella prima fase dello studio erano in trattamento con Pexidartinib (38%) rispetto invece a quelli che

erano in trattamento con il placebo (10%).

Queste interruzioni dal trattamento o riduzioni di dosaggio erano dovute ad elevati livelli nel sangue di AST, ALT o epatotossicità, causate dall'assunzione del medicinale.

Infatti, il 13%, cioè 8 su 61 dei pazienti trattati hanno dovuto interrompere il trattamento a causa degli effetti collaterali che questo comportava e 7 di questi 8 erano dovuti ad epatotossicità. (19)

Who took part in this study?

120 people participated in ENLIVEN and met all these criteria:


Symptoms of TGCT, pain or stiffness measured by numeric rating scale (NRS) as having a score of at least 4		18 years or older with tissue-confirmed (histologically confirmed) TGCT diagnosis
No previous pexidartinib or similar medicine or active cancers needing treatment		Advanced disease (surgery not an option) and measurable by a radiologist

Figura 14 (47)

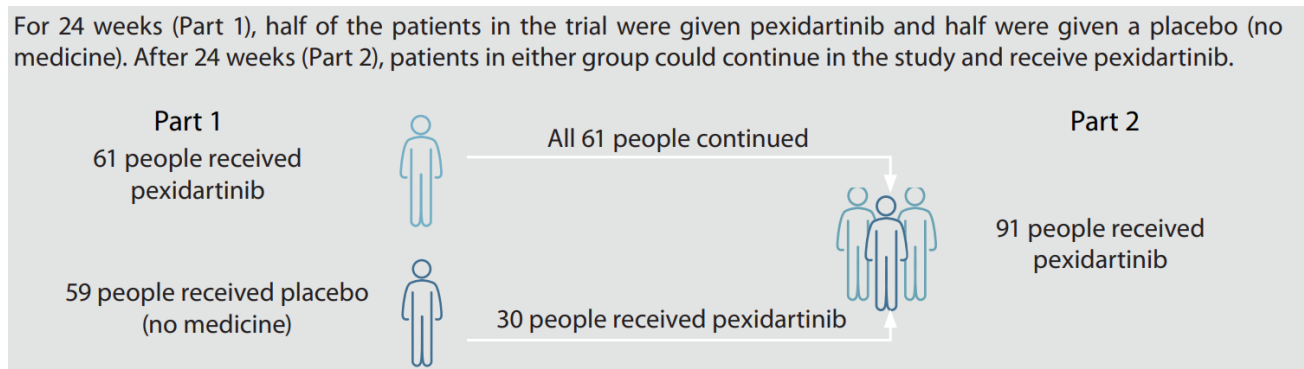


Figura 15 (47)

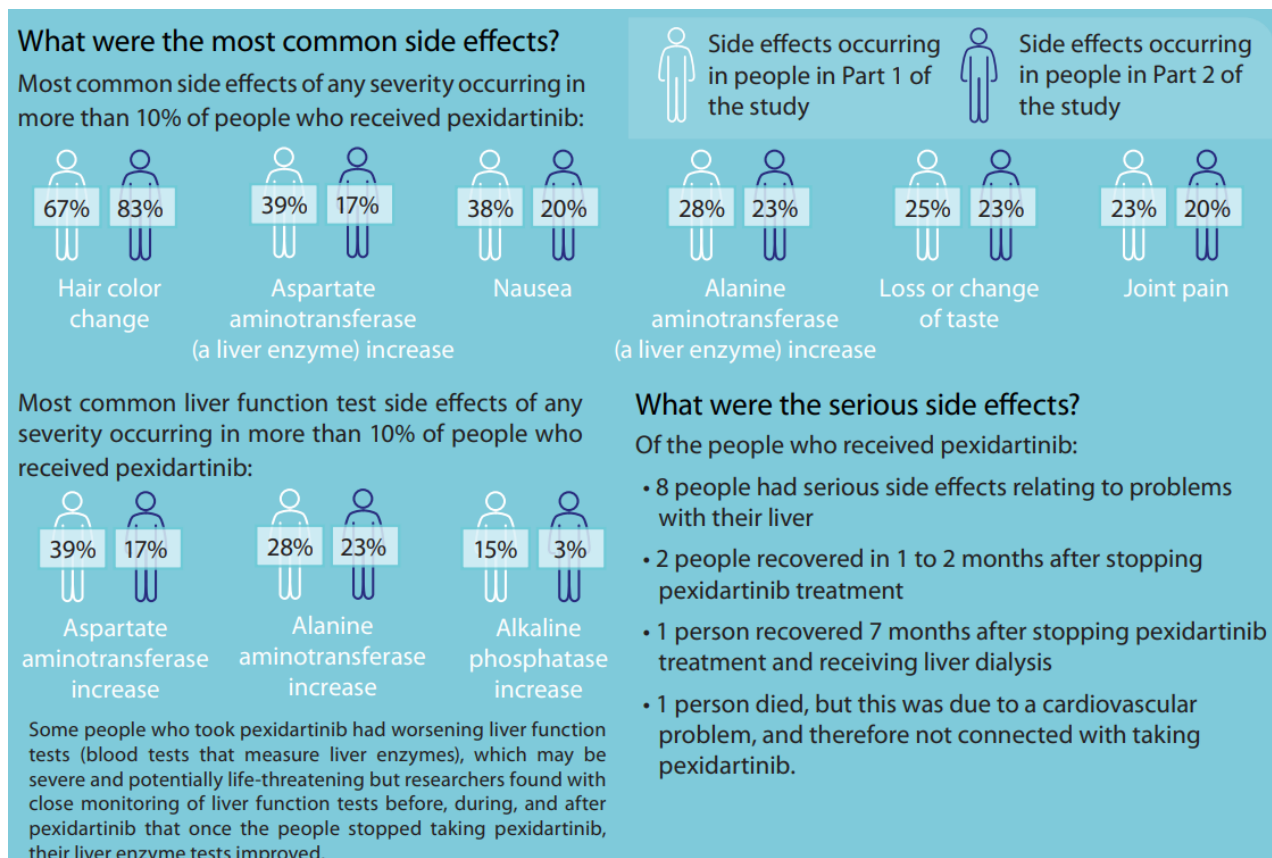


Figura 16 (47)

STUDI CLINICI ATTUALMENTE IN CONTINUAZIONE

Negli Stati Uniti, in Francia e in altri paesi, ci sono ancora molti studi clinici, da terminare, sia di fase I che di fase II, sugli effetti di Pexidartinib, utilizzato sia da solo come monoterapia che in associazione con altri principi attivi, in pazienti affetti da vari tipi di tumore.

Una volta che questi studi saranno terminati, avremo a disposizione molti più dati e chiarimenti per quanto riguarda tutti gli aspetti che, negli altri studi, non sono stati valutati o che non hanno portato risultati soddisfacenti sull'utilizzo di Pexidartinib.(38)

CONSIDERAZIONI SULL'UTILIZZO DI PEXIDARTINIB

Il trattamento di prima scelta da adottare sui pazienti affetti da TGCT rimane l'intervento chirurgico, con la rimozione della massa tumorale nella giunzione in cui è situato, ma in alcuni pazienti, questo, può comportare un peggioramento della funzionalità della giuntura e un possibile peggioramento della patologia.

In questi casi è opportuno, invece dell'intervento chirurgico, adottare la terapia sistemica, basata sulla somministrazione per via orale di Pexidartinib.

Infatti, l'assunzione di Pexidartinib rappresenta, per i pazienti, una valida alternativa, non chirurgica, che consente di avere una buona risposta e miglioramento della

patologia per quanto riguarda l'ampiezza del movimento, la funzionalità della giunzione, la risposta totale (overall response), volume della massa tumorale e rigidità. Pexidartinib viene utilizzato soprattutto per pazienti affetti da L-TGCT e D-TGCT che non otterrebbero miglioramenti dall'operazione chirurgica, ma visto che il farmaco non ha un'indicazione terapeutica ben precisa, potrebbe essere utilizzato anche per il trattamento di altre patologie dove potrebbe risultare utile bloccare l'asse CSF1-CSF1R. Alcuni dei sintomi per i quali potrebbe essere indicato l'utilizzo di Pexidartinib sono: il dolore, la rigidità, la poca ampiezza dei movimenti e la qualità della vita. Invece, non ci sono alcuni criteri che possano escludere l'utilizzo di Pexidartinib nelle letterature, quindi deve essere il medico chirurgo a decidere se adoperarlo o meno. Inoltre, mancano anche le strumentazioni per poter misurare in modo preciso alcuni effetti, dati dall'assunzione di Pexidartinib, come il miglioramento della qualità della vita, la funzionalità della giunzione o la diminuzione del dolore. Tutto questo comporta difficoltà nel determinare i criteri necessari per l'utilizzo del farmaco.(19)

BIBLIOGRAFIA

1. Mohanty B, Williams ML, Doak BC, Vazirani M, Ilyichova O, Wang G, et al. Determination of ligand binding modes in weak protein-ligand complexes using sparse NMR data. *J Biomol NMR*. 2016 Nov;66(3):195–208.
2. Li Q. Application of Fragment-Based Drug Discovery to Versatile Targets. *Front Mol Biosci*. 2020 Aug 5;7:180.
3. Jhoti H, Williams G, Rees DC, Murray CW. The “rule of three” for fragment-based drug discovery: where are we now? *Nat Rev Drug Discov*. 2013 Aug;12(8):644–5.
4. Hassaan E, Hohn C, Ehrmann FR, Goetzke FW, Movsisyan L, Hübner-Wulsdorf T, et al. Fragment Screening Hit Draws Attention to a Novel Transient Pocket Adjacent to the Recognition Site of the tRNA-Modifying Enzyme TGT. *J Med Chem*. 2020 Jul 9;63(13):6802–20.
5. Du X, Li Y, Xia Y-L, Ai S-M, Liang J, Sang P, et al. Insights into Protein-Ligand Interactions: Mechanisms, Models, and Methods. *Int J Mol Sci*. 2016 Jan 26;17(2).
6. Arslan Yildiz A, Kang C, Sinner E-K. Biomimetic membrane platform containing hERG potassium channel and its application to drug screening. *Analyst*. 2013 Apr 7;138(7):2007–12.
7. Aretz J, Rademacher C. Ranking Hits From Saturation Transfer Difference Nuclear Magnetic Resonance-Based Fragment Screening. *Front Chem*. 2019 Apr 12;7:215.
8. Schiebel J, Krimmer SG, Röwer K, Knörlein A, Wang X, Park AY, et al. High-Throughput Crystallography: Reliable and Efficient Identification of Fragment Hits. *Structure*. 2016 Aug 2;24(8):1398–409.
9. de Souza Neto LR, Moreira-Filho JT, Neves BJ, Maidana RLBR, Guimarães ACR, Furnham N, et al. In silico Strategies to Support Fragment-to-Lead Optimization in Drug Discovery. *Front Chem*. 2020 Feb 18;8:93.
10. Pedro L, Quinn RJ. Native Mass Spectrometry in Fragment-Based Drug Discovery. *Molecules*. 2016 Jul 28;21(8).
11. Lamoree B, Hubbard RE. Current perspectives in fragment-based lead discovery (FBLD). *Essays Biochem*. 2017 Nov 8;61(5):453–64.
12. Mondal M, Radeva N, Fanlo-Virgós H, Otto S, Klebe G, Hirsch AKH. Fragment Linking and Optimization of Inhibitors of the Aspartic Protease Endothiapepsin: Fragment-Based Drug Design Facilitated by Dynamic Combinatorial Chemistry. *Angew Chem Int Ed*. 2016 Aug 1;55(32):9422–6.

13. Harner MJ, Frank AO, Fesik SW. Fragment-based drug discovery using NMR spectroscopy. *J Biomol NMR*. 2013 Jun;56(2):65–75.
14. Skora L, Jahnke W. ¹⁹F-NMR-Based Dual-Site Reporter Assay for the Discovery and Distinction of Catalytic and Allosteric Kinase Inhibitors. *ACS Med Chem Lett*. 2017 Jun 8;8(6):632–5.
15. Aretz J, Kondoh Y, Honda K, Anumala UR, Nazaré M, Watanabe N, et al. Chemical fragment arrays for rapid druggability assessment. *Chem Commun*. 2016 Jul 12;52(58):9067–70.
16. Cheng AC, Coleman RG, Smyth KT, Cao Q, Soulard P, Caffrey DR, et al. Structure-based maximal affinity model predicts small-molecule druggability. *Nat Biotechnol*. 2007 Jan;25(1):71–5.
17. Arkin MR, Tang Y, Wells JA. Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: progressing toward the reality. *Chem Biol*. 2014 Sep 18;21(9):1102–14.
18. Anderson WJ, Doyle LA. Updates from the 2020 World Health Organization Classification of Soft Tissue and Bone Tumours. *Histopathology*. 2021 Apr;78(5):644–57.
19. Monestime S, Lazaridis D. Pexidartinib (TURALIO™): The First FDA-Indicated Systemic Treatment for Tenosynovial Giant Cell Tumor. *Drugs R D*. 2020 Sep;20(3):189–95.
20. Mastboom MJL, Verspoor FGM, Verschoor AJ, Uittenbogaard D, Nemeth B, Mastboom WJB, et al. Higher incidence rates than previously known in tenosynovial giant cell tumors. *Acta Orthop*. 2017 Dec;88(6):688–94.
21. Spierenburg G, van der Heijden L, van Langevelde K, Szuhai K, Bovée JVGM, van de Sande MAJ, et al. Tenosynovial giant cell tumors (TGCT): molecular biology, drug targets and non-surgical pharmacological approaches. *Expert Opin Ther Targets*. 2022 Apr 27;26(4):333–45.
22. Gelhorn HL, Tong S, McQuarrie K, Vernon C, Hanlon J, Maclaine G, et al. Patient-reported Symptoms of Tenosynovial Giant Cell Tumors. *Clin Ther*. 2016 Apr 1;38(4):778–93.
23. Murphey MD, Rhee JH, Lewis RB, Fanburg-Smith JC, Flemming DJ, Walker EA. Pigmented villonodular synovitis: radiologic-pathologic correlation. *Radiographics*. 2008 Oct;28(5):1493–518.
24. West RB, Rubin BP, Miller MA, Subramanian S, Kaygusuz G, Montgomery K, et al. A landscape effect in tenosynovial giant-cell tumor from activation of CSF1 expression by a translocation in a minority of tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006 Jan 17;103(3):690–5.
25. Möller E, Mandahl N, Mertens F, Panagopoulos I. Molecular identification of COL6A3-CSF1 fusion transcripts in tenosynovial giant cell tumors. *Genes Chromosomes Cancer*. 2008 Jan;47(1):21–5.

26. Li C-F, Wang J-W, Huang W-W, Hou C-C, Chou S-C, Eng H-L, et al. Malignant diffuse-type tenosynovial giant cell tumors: a series of 7 cases comparing with 24 benign lesions with review of the literature. *Am J Surg Pathol*. 2008 Apr;32(4):587–99.
27. Staals EL, Ferrari S, Donati DM, Palmerini E. Diffuse-type tenosynovial giant cell tumour: Current treatment concepts and future perspectives. *Eur J Cancer*. 2016 Aug;63:34–40.
28. Blay JY, El Sayadi H, Thiesse P, Garret J, Ray-Coquard I. Complete response to imatinib in relapsing pigmented villonodular synovitis/tenosynovial giant cell tumor (PVNS/TGCT). *Ann Oncol*. 2008 Apr;19(4):821–2.
29. Noguchi R, Yoshimatsu Y, Ono T, Sei A, Hirabayashi K, Ozawa I, et al. Establishment and characterization of a novel cell line, NCC-TGCT1-C1, derived from a patient with tenosynovial giant cell tumor. *Hum Cell*. 2021 Jan;34(1):254–9.
30. Tsuda Y, Hirata M, Katayama K, Motoi T, Matsubara D, Oda Y, et al. Massively parallel sequencing of tenosynovial giant cell tumors reveals novel CSF1 fusion transcripts and novel somatic CBL mutations. *Int J Cancer*. 2019 Dec 15;145(12):3276–84.
31. Ding Z, Bai Z, Zhang M, Sun B, He Y. cIAP2 expression and clinical significance in pigmented villonodular synovitis. *J Mol Histol*. 2021 Apr;52(2):397–406.
32. Rosen ED, Hsu C-H, Wang X, Sakai S, Freeman MW, Gonzalez FJ, et al. C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. *Genes Dev*. 2002 Jan 1;16(1):22–6.
33. Beyzadeoğlu T, Çirci E. Locked hip joint: an uncommon presentation of localized pigmented villonodular synovitis. *Acta Orthop Traumatol Turc*. 2016;50(3):379–81.
34. Yamagishi T, Kawashima H, Ogose A, Ariizumi T, Oike N, Sasaki T, et al. Expression Profiling of Receptor-Activator of Nuclear Factor-Kappa B Ligand in Soft Tissue Tumors. *Tohoku J Exp Med*. 2019 Jun;248(2):87–97.
35. Zheng B, Yu L, Hu J, Xu H, Wang J, Shi Y, et al. Expression of PD-L1 in mononuclear cells, multinucleated cells, and foam cells in tenosynovial giant cell tumors. *Int J Clin Exp Pathol*. 2019 Mar 1;12(3):876–84.
36. Takeuchi A, Yamamoto N, Nishida H, Kimura H, Ikeda H, Tsuchiya H. Complete necrosis of a giant cell tumor with high expression of PPARγ: a case report. *Anticancer Res*. 2013 May;33(5):2169–74.
37. Zhang C, Ibrahim PN, Zhang J, Burton EA, Habets G, Zhang Y, et al. Design and pharmacology of a highly specific dual FMS and KIT kinase inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013 Apr 2;110(14):5689–94.
38. Lamb YN. Pexidartinib: First Approval. *Drugs*. 2019 Nov;79(16):1805–12.

39. Shetty S, Hegde U, Agarwal G, Sreeshyla HS. Chondroid tenosynovial giant cell tumor of temporomandibular joint. *Ann Maxillofac Surg*. 2018;8(2):327.
40. Mok S, Koya RC, Tsui C, Xu J, Robert L, Wu L, et al. Inhibition of CSF-1 receptor improves the antitumor efficacy of adoptive cell transfer immunotherapy. *Cancer Res*. 2014 Jan 1;74(1):153–61.
41. Zahir H, Greenberg J, Hsu C, Watanabe K, Makino C, He L, et al. Pharmacokinetics of the Multi-kinase Inhibitor Pexidartinib: Mass Balance and Dose Proportionality. *Clin Pharmacol Drug Dev*. 2022 Nov 11;
42. Dharmani C, Wang E, Salas M, McCabe C, Diggs A, Choi Y, et al. Turalio risk evaluation and mitigation strategy for treatment of tenosynovial giant cell tumor: framework and experience. *Future Oncol*. 2022 Apr;18(13):1595–607.
43. Hittson L, Glod J, Amaya M, Derdak J, Widemann BC, Kaplan RN. Phase I study of pexidartinib (PLX3397) in children with refractory leukemias and solid tumors including neurofibromatosis type I (NF1) related plexiform neurofibromas (PN). *JCO*. 2017 May 20;35(15_suppl):10546–10546.
44. Wesolowski R, Sharma N, Reebel L, Rodal MB, Peck A, West BL, et al. Phase Ib study of the combination of pexidartinib (PLX3397), a CSF-1R inhibitor, and paclitaxel in patients with advanced solid tumors. *Ther Adv Med Oncol*. 2019 Jun 21;11:1758835919854238.
45. Butowski N, Colman H, De Groot JF, Omuro AM, Nayak L, Wen PY, et al. Orally administered colony stimulating factor 1 receptor inhibitor PLX3397 in recurrent glioblastoma: an Ivy Foundation Early Phase Clinical Trials Consortium phase II study. *Neuro Oncol*. 2016 Apr;18(4):557–64.
46. Tap WD, Gelderblom H, Palmerini E, Desai J, Bauer S, Blay J-Y, et al. Pexidartinib versus placebo for advanced tenosynovial giant cell tumour (ENLIVEN): a randomised phase 3 trial. *Lancet*. 2019 Aug 10;394(10197):478–87.
47. Tap W. ENLIVEN study: Pexidartinib for tenosynovial giant cell tumor (TGCT). *Future Oncol*. 2020 Sep;16(25):1875–8.

RINGRAZIAMENTI

Alla fine di questa trattazione, vorrei ringraziare tutti coloro che mi sono stati vicini in questo percorso di crescita personale e professionale.

In primis, vorrei ringraziare il mio relatore, il prof. Sturlese, per la sua immensa pazienza, competenza e per i suoi utilissimi consigli per la stesura dell'elaborato.

Ringrazio infinitamente i miei genitori e i miei fratelli che mi hanno sempre sostenuto, appoggiando ogni mia decisione, fin dalla scelta del mio percorso di studi.

Un grazie di cuore alla mia fidanzata, Eugenia Boccanera, che mi è stata vicina e mi ha supportato nei momenti più difficili. Senza la sua presenza e il suo sostegno non ce l'avrei fatta.

Infine, *dulcis in fundo*, vorrei ringraziare sinceramente Alvise Renier, il mio più caro amico, che nonostante la lontananza fisica, mi è sempre stato vicino, mi ha supportato ed incoraggiato non solo nel mio percorso universitario, ma anche nel mio percorso di vita.