



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Farmacologia ed Anestesiologia "E. Meneghetti"

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN : Scienze Farmacologiche
INDIRIZZO: Farmacologia Molecolare e Cellulare
CICLO XXII

SINTESI E VALUTAZIONE BIOLOGICA DI NUOVI AGENTI POTENZIALMENTE UTILI NELLA TERAPIA DEL MELANOMA MALIGNO

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Rosa Maria Gaion

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Pietro Giusti

Supervisore: Ch.mo Prof. Maura Floreani

Dottorando : Dott. ALBERTO NASSI

INDICE

| | |
|--|----|
| RIASSUNTO..... | 3 |
| ABSTRACT | 5 |
| 1. INTRODUZIONE | 7 |
| 1.1. Il melanoma | 7 |
| 1.1.1. Fattori di rischio..... | 7 |
| 1.1.2. La terapia del melanoma: stato dell'arte..... | 8 |
| 1.1.3. Nuovi possibili approcci nel trattamento del melanoma | 11 |
| SCOPO DEL LAVORO | 19 |
| 2. MATERIALI E METODI | 21 |
| 2.1. Sintesi e valutazione biologica del coniugato peptidico del paclitaxel | 21 |
| 2.1.1. Reagenti chimici e solventi..... | 21 |
| 2.1.2. Strumentazione utilizzata | 21 |
| 2.1.3. Sintesi del coniugato peptidico del paclitaxel | 22 |
| Sintesi del peptide D-Phe-Lys-Arg(Pbf)-Gly-Asp(OtBu) (RGD)..... | 23 |
| Ciclizzazione del peptide RGD | 25 |
| Sintesi del peptide acido succinico(Suc)-Gly-Arg-Arg-Phe-Ala-Eda-H | 27 |
| Sintesi del peptide c(D-Phe-Lys-Arg-Gly-Asp) | |
| | |
| Suc-Gly-Arg-Arg-Phe-Ala-Eda-H | 27 |
| Attivazione del paclitaxel | 29 |
| Condensazione del paclitaxel attivato con la parte peptidica del coniugato | 31 |
| 2.1.4. Saggi biologici..... | 34 |
| Suscettibilità del profarmaco al taglio proteolitico da parte della catepsina B | 34 |
| Isolamento della frazione lisosomiale di fegato di ratto..... | 34 |
| Effetto dei lisosomi di fegato di ratto sul coniugato peptidico del paclitaxel | 35 |
| Preparazione del plasma di uomo, ratto e topo..... | 35 |
| Stabilità del coniugato peptidico del paclitaxel in plasma | 36 |
| Analisi HPLC dei campioni..... | 36 |
| Saggi di adesione cellulare | 36 |
| Saggi di citotossicità..... | 37 |
| 2.2. Valutazione biologica di derivati del 4-mercaptofenolo quali potenziali agenti bifunzionali | 38 |
| 2.2.1. Reagenti chimici e solventi..... | 38 |
| 2.2.2. Esperimenti biochimici..... | 40 |
| Ossidazione tirosinasi-mediata dei composti | 40 |
| Studi cinetici dell'ossidazione tirosinasi-mediata dei composti in esame..... | 40 |
| Calcolo del coefficiente di estinzione molare | 41 |
| Isolamento della frazione citosolica di fegato di ratto..... | 41 |
| Reattività dei composti nei confronti del GSH in assenza e in presenza di GST..... | 42 |
| Analisi HPLC | 43 |
| Acquisizione degli spettri di massa | 44 |
| 2.2.3. Saggi di citotossicità | 44 |
| Reagenti..... | 44 |
| Colture cellulari | 44 |

| | |
|---|----|
| Valutazione in vitro della citotossicità dei composti | 45 |
| 2.3 Valutazione biologica di inibitori dell'enzima GSTP1-1 | 46 |
| 2.3.1. Reagenti chimici e solventi | 46 |
| 2.3.2. Valutazione dell'attività glutatione-S-transferasi | 47 |
| Determinazione dell'attività glutatione-S-transferasi nella frazione citosolica di | |
| fegato di ratto | 47 |
| <i>Isolamento della frazione citosolica di fegato di ratto</i> | 47 |
| <i>Condizioni di incubazione per la valutazione della attività glutatione-S-</i> | |
| <i>transferasica di frazioni di citosol di fegato di ratto</i> | 48 |
| Determinazione dell'attività glutatione-S-transferasica della GSTP1-1 isolata da | |
| placenta umana..... | 49 |
| <i>Preparazione della soluzione di GSTP1-1 isolata da placenta umana</i> | 49 |
| <i>Condizioni di incubazione utilizzate per la valutazione della attività della</i> | |
| <i>GSTP1-1 isolata da placenta umana</i> | 49 |
| Determinazione mediante HPLC della formazione di GS-DNB nelle miscele di | |
| reazione | 49 |
| <i>Sintesi chimica dell'S-glutathionil-2,4 dinitrobenzene (GS-DNB)</i> | 49 |
| <i>Analisi RP-HPLC per la rilevazione del GS-DNB</i> | 50 |
| 2.3.3. Valutazione dell'effetto di alizarina, alcannina, 1'-acetil alcannina e 5,8,1'-triacetil | |
| alcannina sull'attività della GSTP1-1 | 51 |
| Condizioni di incubazione | 51 |
| Valutazione della reattività dell'alcannina nei confronti del GSH | 52 |
| 2.3.4. Analisi di spettrometria di massa con ionizzazione ad elettrospray (ESI-MS)..... | 52 |
| 2.3.5. Analisi dei dati | 52 |
| 2.3.6. Saggi di citotossicità | 53 |
| 3. RISULTATI E DISCUSSIONE..... | 55 |
| 3.1. Coniugato peptidico del paclitaxel..... | 55 |
| 3.1.1. Valutazione del legame del profarmaco all'integrina $\alpha V\beta 3$ | 56 |
| 3.1.2. Citotossicità del profarmaco verso cellule di melanoma umano | 57 |
| 3.1.3. Suscettibilità del profarmaco al taglio proteolitico da parte della catepsina B e di | |
| enzimi lisosomiali | 58 |
| 3.1.4. Valutazione della stabilità del coniugato peptidico del paclitaxel in plasma umano | |
| 59 | |
| 3.2. Derivati del 4-mercaptofenolo quali agenti bifunzionali | 61 |
| 3.2.1. Studi cinetici dell'ossidazione tirosinasi-mediata..... | 61 |
| 3.2.2. Reattività dei composti nei confronti del GSH | 63 |
| 3.2.3. Studi di citotossicità in vitro | 69 |
| 3.3. Inibitori dell'enzima glutatione-S-transferasi (GST) P1-1 | 72 |
| 3.3.1. Valutazione dell'attività GST nella frazione solubile (citosol) di fegato di ratto | 72 |
| 3.3.2. Valutazione dell'attività enzimatica della GST isolata da placenta (GSTP1-1)..... | 74 |
| 3.3.3. Effetto di alcannina, 1'-acetil alcannina e 5,8,1'-triacetil alcannina sull'attività | |
| GSTP1-1 | 76 |
| 3.3.4. Valutazione della reattività dell'alcannina nei confronti del GSH | 78 |
| 3.3.5. Valutazione dell'attività inibitoria della glutatione-alcannina nei confronti della | |
| GSTP1-1 umana..... | 81 |
| 3.3.6. Studi di citotossicità in vitro | 82 |
| BIBLIOGRAFIA | 85 |

RIASSUNTO

Il melanoma maligno è un tumore molto aggressivo, la cui incidenza è in costante aumento, che origina dalla trasformazione di cellule chiamate melanociti. La terapia del melanoma metastatico continua ad essere una difficile sfida, in quanto, indipendentemente dall'approccio terapeutico utilizzato (chemioterapia, immunoterapia o immunochimioterapia), i soggetti affetti raramente presentano una sopravvivenza a lungo termine. Per migliorare l'efficacia dei farmaci antitumorali attualmente disponibili e per diminuirne la tossicità sistemica, oltre a sfruttare alcune caratteristiche biochimiche relativamente specifiche delle cellule tumorali, e del melanoma in particolare, un approccio utile potrebbe anche essere quello di indirizzare verso le cellule tumorali dei profarmaci, che rilascino il farmaco attivo direttamente all'interno della massa tumorale e/o nel loro intorno extracellulare.

I risultati riportati in questa tesi si riferiscono alla sintesi e alla valutazione biologica di tre nuovi tipi di composti progettati in questa ottica verso le cellule di melanoma.

Il primo composto studiato è stato un coniugato peptidico del paclitaxel contenente tre domini funzionali: un dominio di "indirizzamento", una sequenza di "attivazione" e il paclitaxel, appunto, quale agente citotossico. Il dominio di "indirizzamento", la cui funzione era quella di dirigere il coniugato verso la massa tumorale, era rappresentato da un peptide ciclico contenente la sequenza RGD, in grado di legarsi selettivamente e con alta affinità all'integrina $\alpha_v\beta_3$, una molecola di superficie sovra-espressa sia dalle cellule di melanoma che dalle cellule endoteliali dei nuovi vasi tumorali. La sequenza di "attivazione", che avrebbe dovuto consentire un rilascio selettivo del paclitaxel all'interno della massa tumorale, era rappresentata da una sequenza peptidica substrato della catepsina B, una proteasi a localizzazione lisosomiale e associata a membrana, altamente sovraespressa in molti tumori, compreso il melanoma. Il terzo dominio funzionale era costituito dal farmaco antitumorale vero e proprio, cioè dal paclitaxel, il cui legame con il peptide - nelle aspettative - avrebbe dovuto causarne la momentanea inattivazione fino al momento della sua effettiva liberazione in sede tumorale.

Il secondo profarmaco testato è stato un derivato del 4-mercaptofenolo contenente una catena laterale butenonica, il 4-[(4-idrossifenil)sulfanil]-3-buten-2-one, ottenuto nei suoi due isomeri geometrici *E* e *Z*. Questo composto è stato progettato considerando che: a) la parte derivata dal 4-mercaptofenolo avrebbe dovuto essere un buon substrato per l'enzima tirosinasi (TYRase), un enzima espresso ad alti livelli nelle cellule di melanoma, perchè coinvolto nel processo di biosintesi della melanina, e in grado di ossidare una varietà di fenoli naturali e di sintesi, dando luogo a forme alchilanti e citotossiche come gli *o*-chinoni; b) la catena laterale

butenonica (α,β insatura), essendo dotata di elevata reattività nei confronti del GSH, presente in concentrazioni relativamente elevate nelle cellule di melanoma, avrebbe dovuto sottrarre GSH alla cellula stessa, indebolendone di fatto le difese antiossidanti nei confronti dei radicali liberi dell'ossigeno (ROS) che si generano, come sottoprodotti, durante la sintesi di melanina sia in cellule normali che tumorali. Nelle aspettative, il profarmaco così progettato si sarebbe dovuto comportare come un agente bifunzionale in grado di formare *o*-chinoni citotossici in seguito alla sua ossidazione da parte della tirosinasi e in grado di ridurre al tempo stesso i livelli di GSH.

Infine, un terzo approccio ha riguardato lo studio dell'alcannina (colorante naturale a struttura naftochinonica) e di due suoi derivati acetilati, quali possibili inibitori dell'enzima umano glutatione-S-transferasi (GST) di tipo P1-1, enzima espresso ad alti livelli in molti tumori tra cui appunto il melanoma. GSTP1-1 è un enzima coinvolto nel metabolismo di fase II degli xenobiotici, in quanto catalizza la coniugazione del GSH ad una vasta gamma di composti nucleofili, ma esso è anche ritenuto uno dei fattori promuoventi la farmacoresistenza del tumore. Un inibitore specifico di questo enzima potrebbe essere quindi estremamente utile in una terapia antitumorale, rendendo le cellule tumorali più sensibili agli agenti chemioterapici.

ABSTRACT

Malignant melanoma is an extremely aggressive tumour, which originates from the neoplastic transformation of melanocytes. The therapy of metastatic melanoma, whose incidence is dramatically increasing, continues to be a challenge since, regardless of the treatment approach used (chemotherapy, immunotherapy or immuno-chemotherapy), a long-term survival is quite uncommon.

In an attempt to improve the effectiveness of the anticancer drugs currently available and to decrease their systemic toxicity, in addition to exploit some biochemical characteristics rather specific of the melanoma cells, a useful approach might be also the use of prodrugs, targeted to the tumor cells, that would release the active drug directly into the tumor mass and/or their surrounding extracellular environment.

Aim of my Ph.D. work was the synthesis and the biological evaluation of three types of new compounds, designed as possible agents useful in an anti-melanoma therapy.

The first compound, which we synthesized and tested, was a peptide-paclitaxel conjugate containing three functional domains: a “targeting domain”, an “activation sequence” and the cytotoxic agent paclitaxel. The “targeting domain”, whose function was to direct the conjugate to the tumour mass, was represented by a cyclic peptide containing the RGD sequence that can bind selectively the $\alpha_v\beta_3$ integrin, a surface molecule overexpressed by both metastatic human melanoma cells and endothelial cells of tumour vessels. The “activation sequence”, which should allow a selective release of paclitaxel within the tumour mass, was represented by a short peptide, substrate of cathepsin B (a lysosomal and pericellular protease highly up-regulated in malignant tumours, including human melanomas). The third functional domain consisted of the anticancer drug paclitaxel.

The second type of prodrug, which we designed and tested, was a 4-mercaptophenol derivative, containing a butenone moiety, the 4-[(4-hydroxyphenyl)sulfanyl]-3-buten-2-one, obtained in its *E* and *Z* geometric isomers. This compound has been designed considering that: a) the 4-mercaptophenol moiety would be a good substrate for tyrosinase, an enzyme expressed at high levels in melanoma cells, where it is involved in the biosynthesis of melanin, and able to oxidize a variety of natural and synthetic phenols, giving rise to alkylating and cytotoxic o-quinones; b) an α,β unsaturated side chain, reactive towards GSH (present in relatively high concentrations in melanoma cells) would decrease cellular antioxidant defense against the oxygen free radicals (ROS) generated as by-products during melanin synthesis, in normal as well in tumor cells. Therefore, our prodrug should act as a

bifunctional agent, capable of generating cytotoxic *o*-quinone species (following its oxidation by tyrosinase) and reducing GSH levels.

A third part of the present work has focused on the study of the naftoquinone alkannin and its two acetylated derivatives (1'-acetyl alkannin and 5,8,1'-triacetyl alkannin), as potential inhibitors of the human glutathione-S-transferase (GST) P1-1. This enzyme, which catalyzes the conjugation of GSH to a wide range of nucleophilic compounds, is expressed at high levels in many tumor cells, including melanoma cells, and is considered one of the factors responsible of tumor resistance towards anti-cancer agents. Therefore, a specific inhibitor of this enzyme could be useful in cancer therapy, making the tumor cells more sensitive to chemotherapeutic agents.

1. INTRODUZIONE

1.1. Il melanoma

Il melanoma è una neoplasia maligna estremamente aggressiva che origina da cellule, chiamate melanociti, derivanti dalla cresta neurale e localizzate principalmente a livello della cute, del bulbo pilifero, dell'occhio, della mucosa gastrointestinale e delle meningi (Chin et al. 2006). La funzione principale dei melanociti è la sintesi, a partire dall'amminoacido tirosina, di un pigmento fotoprotettivo di colore bruno, chiamato melanina, immagazzinato in organelli citoplasmatici specializzati detti melanosomi (Riley 2003).

L'incidenza di questo tumore, che origina generalmente dalla trasformazione neoplastica di melanociti cutanei, è in continuo e sempre più veloce aumento. Dal 1950 al 2000 l'aumento dei casi è stato del 697% (Carlson et al. 2009) e, attualmente, il tasso annuo di incidenza è pari al 4-7% (Sabatino et al. 2009), con una leggera prevalenza nel sesso maschile rispetto a quello femminile (Carlson, et al. 2009). Nonostante colpisca principalmente soggetti adulti di età compresa fra i 30 e i 70 anni, il melanoma può comunque manifestarsi a qualunque età, evidenziando come, probabilmente, l'origine della malattia sia multifattoriale (Doben et al. 2009).

Sebbene rappresenti solo il 4-5% del totale dei tumori della pelle (Arora et al. 2009), il melanoma presenta un altissimo tasso di mortalità. Esso è, infatti, responsabile di circa l'80% dei decessi riconducibili a neoplasie della cute. Va fatto notare inoltre come nel melanoma metastatico, si osservi una sopravvivenza a 5 anni solo nel 5-10% dei pazienti (Carlson et al. 2009). Ciò a causa della scarsa responsività di tale neoplasia alle terapie attualmente in uso. Questi dati, nel loro complesso, fanno ben capire come, negli ultimi decenni, il melanoma sia diventato un problema di grande rilevanza, non solo dal punto di vista clinico, ma anche sociale.

1.1.1. *Fattori di rischio*

Come per la maggior parte delle malattie, anche per le neoplasie esistono talune condizioni ambientali o caratteristiche intrinseche dell'organismo che ne possono favorire l'insorgenza. Per quanto riguarda il melanoma, i maggiori fattori di rischio per un individuo di sviluppare questa malattia sono:

- una precedente storia familiare di melanoma;

- la presenza di un grande numero di nevi benigni, la presenza di nevi dai bordi irregolari o di nevi di grandi dimensioni (>20 cm) (Arora et al. 2009);
- una carnagione molto chiara (Doben et al. 2009), capelli biondi o rossi e/o occhi chiari;
- la prolungata esposizione al sole, soprattutto se seguita da gravi scottature (un numero pari a 5 o più episodi di importanti ustioni solari in giovane età raddoppiano il rischio di sviluppare un caso di melanoma in età avanzata (Arora et al. 2009);
- l'esposizione ai raggi UV (soprattutto con l'utilizzo di lampade e lettini abbronzanti);
- precedenti casi personali di melanoma.

La predisposizione genetica e i possibili stress chimico-ambientali a cui una persona può essere sottoposta possono essere alla base dell'insorgenza del melanoma; i fattori sopra elencati hanno semplicemente la capacità di aumentare la possibilità che questo evento avvenga (Miller et al. 2006).

1.1.2. La terapia del melanoma: stato dell'arte

Le strategie potenzialmente utili nel trattamento curativo o palliativo di una neoplasia sono la chirurgia, la radioterapia, la chemioterapia e l'immunoterapia. Mentre la chirurgia e la radioterapia possono permettere un controllo locale della malattia, la chemioterapia e l'immunoterapia sono approcci utilizzati soprattutto nei casi in cui la malattia venga ad interessare diverse sedi, con la presenza di metastasi, definite come crescite neoplastiche secondarie, originatesi dalla lesione primitiva, che crescono in un punto diverso e distante all'interno dell'organismo.

Con il termine "chemioterapia" si intendono quelle forme di terapia attuate generalmente a livello sistemico, mediante l'utilizzo di composti naturali, semisintetici o di sintesi, in grado di uccidere le cellule tumorali (citotossici) o arrestarne la proliferazione (citostatici), cercando di preservare, nel limite del possibile, le cellule normali (Clementi, Fumagalli 2004). In genere, i farmaci antitumorali oggi disponibili, non hanno la capacità di distinguere le cellule neoplastiche da quelle normali, danneggiando anche alcuni tessuti normali, in particolar modo quelli caratterizzati dalla presenza di cellule ad elevato tasso di proliferazione, come, ad esempio, il midollo emopoietico, la mucosa intestinale e i bulbi piliferi. Il danno provocato a carico dei tessuti sani rende conto dei numerosi effetti indesiderati osservati frequentemente nei pazienti trattati con chemoterapici antineoplastici.

Anche il melanoma, che, come precedentemente descritto, si presenta come una neoplasia molto aggressiva e con un alto tasso di mortalità, deve la sua difficile risoluzione alla mancanza di una terapia mirata in maniera specifica verso le cellule melanocitiche neoplastiche. Infatti, nonostante i numerosi sforzi indirizzati alla messa a punto di nuovi protocolli di trattamento basati su approcci di chemioterapia e/o immunoterapia, la sopravvivenza media dei pazienti con melanoma metastatico avanzato non supera i 6-10 mesi (Azzabi et al. 2005). L'efficacia della terapia, inoltre, è fortemente influenzata dallo stato di crescita del melanoma nel momento in cui esso viene diagnosticato e dal fatto che siano presenti, o meno, metastasi all'interno dell'organismo.

Il fattore più importante per una valida cura del melanoma è la diagnosi precoce, in modo tale da poterlo trattare in quegli stadi di progressione nei quali la cura possa risultare efficace (Thompson et al. 2005). L'avanzamento della crescita della neoplasia viene misurato mediante il cosiddetto "modello di Clark" (Miller et al. 2006), il quale valuta il livello di invasione nel derma da parte della lesione e descrive i cambiamenti istologici che accompagnano la progressione della neoplasia attraverso i vari passaggi di crescita.

Si possono individuare e distinguere 5 stadi di progressione (Schattton et al. 2008):

1. **nevi benigni**: assenza di variazioni di tipo displastico;
2. **nevi displastici**: si ha una proliferazione di cellule melanocitiche, le quali formano nuovi nevi sulla pelle sana o modificano la forma ed il colore di nevi già esistenti;
3. **fase di crescita radiale** (*Radial Growth Phase*, **RGP**): i melanociti crescono orizzontalmente confinati nello strato epidermico e si dimostrano incapaci di dare origine a metastasi;
4. **fase di crescita verticale** (*Vertical Growth Phase*, **VGP**): i melanociti sono raggruppati in noduli capaci di espandersi verso gli strati più profondi del derma e dimostrano di essere altamente metastatici;
5. **melanoma metastatico**: dal tumore primitivo si staccano cellule che, attraverso il torrente circolatorio o linfatico, possono migrare e insediarsi in altri siti dell'organismo (es. cute, polmone, fegato, cervello), dando così vita a nuove masse neoplastiche (metastasi) (Miller et al. 2006).

La strategia da adottare viene quindi decisa in base allo stadio di crescita raggiunto dalla massa tumorale al momento della diagnosi.

Il melanoma, se diagnosticato durante i primi stadi di crescita, quelli cioè in cui non si ha la penetrazione cellulare verso gli strati più profondi della pelle (stadi di progressione 1-3), può essere curato mediante la sola asportazione chirurgica, eliminando completamente l'area

di epidermide interessata dalla lesione, compresi un certo margine di pelle sana nell'intorno della stessa lesione e una parte del grasso sottocutaneo (Arora et al. 2009). In questo caso, nel 95% dei casi si ha una totale scomparsa della malattia (cura) (Schatton et al. 2008) e solo nel 2-5% dei pazienti si osserva una ricomparsa della lesione (Buzzell et al. 1996), evento probabilmente dovuto alla non totale eliminazione delle cellule della lesione primaria. Oltre all'asportazione della lesione, l'unica terapia adiuvante approvata dalla *Food and Drug Administration* (FDA) per l'inibizione della comparsa di recidive è la somministrazione ad alte dosi di interferone alfa (Thompson et al. 2005), ciò nonostante la sua utilità sia tuttora oggetto di discussione anche a causa della sua manifesta tossicità (Kirkwood et al. 2002).

Nel momento in cui, invece, il tumore riesca a raggiungere lo stadio della crescita "verticale" e, a maggior ragione, nel caso in cui ci siano metastasi, la terapia chirurgica diventa di difficile realizzazione, a causa dell'elevata massa della lesione o dell'elevata disseminazione delle metastasi.

La terapia convenzionale attualmente in uso per i melanomi in fase avanzata, prevede, in ogni caso, la rimozione completa delle lesioni primarie mediante chirurgia, la rimozione dei linfonodi risultati positivi alla presenza di metastasi, seguita poi da un trattamento chemioterapico mono- o poli-farmacologico ad azione sistemica, il cui utilizzo, però, si dimostra essere comunque di scarsa efficacia. Infatti, molti approcci chemioterapici basati sull'impiego di farmaci citotossici, come ad esempio le nitrosuree (carmustina, semustina, fotemustina), i taxani (paclitaxel, docetaxel), alcaloidi della vinca (vinblastina), derivati del platino (cisplatino, carboplatino), inibitori delle topoisomerasi o antracicline hanno dato risultati nulli o molto scarsi nel caso del trattamento del melanoma metastatico (Mouawad et al. 2009).

Gli unici agenti terapeutici che hanno mostrato una certa attività contro questo tipo di neoplasia sono la dacarbazina (un profarmaco trasformato per metabolismo via citocromo P450, prevalentemente a livello epatico, in un agente alchilante gli acidi nucleici) e il temolozomide (anch'esso in grado di generare, ma per decomposizione spontanea, un metabolita ad azione alchilante gli acidi nucleici). La dacarbazina è ancora oggi considerato il farmaco di riferimento per la cura del melanoma metastatico, in quanto risulta essere l'unico agente terapeutico approvato dalla FDA (Soengas et al. 2003).

Purtroppo, in questi casi, la prognosi risulta in ogni caso molto sfavorevole. L'efficacia clinica di questi farmaci, infatti, si è dimostrata notevolmente limitata sia per quanto riguarda la risposta dei pazienti (in media si ha una risposta terapeutica in meno del 15-25% dei casi

trattati), sia per quanto riguarda la durata del beneficio che, ove riscontrabile, si manifesta per non più di 5/6 mesi (Mouawad et al. 2009).

L'immunoterapia ha come principio di base quello di incrementare il numero delle cellule effettrici e/o la produzione di uno o più mediatori solubili al fine di aumentare la risposta immunitaria del paziente nei confronti delle cellule tumorali.

Anche con un approccio immunoterapico i risultati ottenuti non sono molto confortanti. Le sostanze più studiate e utilizzate nella immunoterapia del melanoma sono le citochine interleuchina-2 e, come già accennato prima, l'interferone-alfa.

L'interleuchina-2 è un prodotto secreto dalle cellule CD4⁺ che interviene in innumerevoli processi immunologici attivando diversi tipi cellulari (linfociti B, cellule Natural Killer, macrofagi) e stimolando la produzione di altre citochine. Impiegata nella terapia del melanoma ha mostrato una risposta terapeutica nel 15-20% dei casi, manifestando però un'importante tossicità (Mouawad et al. 2009).

Anche l'interferone-alfa, utilizzato come agente terapeutico per la cura del melanoma metastatico non ha offerto miglioramenti significativi nella risposta dei pazienti rispetto alla chemioterapia o alla terapia con interleuchina-2. Con una percentuale di risposta del 15% si pone sullo stesso piano delle altre sostanze descritte (Mouawad et al. 2009).

In base a questi dati risulta abbastanza chiaro come risulti urgente e pressante la necessità di individuare nuove strategie terapeutiche in grado di aumentare la selettività e l'efficacia dei farmaci attualmente in uso.

1.1.3. Nuovi possibili approcci nel trattamento del melanoma

Al fine di migliorare la risposta di una neoplasia al trattamento con farmaci, potrebbe rivelarsi utile l'impiego di precursori inattivi (profarmaci) che siano in grado di indirizzare e liberare il farmaco antineoplastico nel contesto della massa tumorale. In particolare, il direzionamento del farmaco può avvenire con l'inserimento nel profarmaco di domini che siano in grado di riconoscere, in maniera specifica e con alta affinità, molecole di superficie espresse in maniera preferenziale, se non esclusiva, dalle cellule neoplastiche e/o dai vasi e dallo stroma tumorale. Il rilascio del farmaco, analogamente, può avvenire grazie alla presenza di una sequenza peptidica riconosciuta e idrolizzata da specifici enzimi proteolitici, espressi in modo preferenziale, se non esclusivo, dal tessuto neoplastico, ma non dalla maggior parte dei tessuti normali.

Dati di letteratura dimostrano come le cellule di melanoma esprimano ad alti livelli la proteina di membrana integrina $\alpha_v\beta_3$ (Neto et al. 2007) e l'enzima proteolitico lisosomiale catepsina B (Roshy et al. 2003).

L'integrina $\alpha_v\beta_3$ è una glicoproteina di membrana, il cui dominio extracellulare media interazioni cellula-cellula e cellula-proteine della matrice extracellulare, tra le quali la vitronectina, la fibronectina e il collagene (Cooper et al. 2002). Essa inoltre svolge un ruolo molto importante per la progressione tumorale, in quanto è direttamente coinvolta nel processo di angiogenesi (Neto et al. 2007). È stato dimostrato che l'integrina $\alpha_v\beta_3$ è espressa ad alti livelli sia da cellule neoplastiche, in particolare nel carcinoma prostatico e nel melanoma, sia da cellule endoteliali dei nuovi vasi tumorali, dove la sua espressione permette a queste cellule di interagire con le proteine della matrice extracellulare e invadere così i tessuti circostanti (Cooper et al. 2002). Per contro, essa non è espressa a livelli significativi dai tessuti normali (Hofmeister et al. 2008). L'integrina $\alpha_v\beta_3$ lega con alta affinità e selettività la sequenza peptidica Arg-Gly-Asp (RGD) (Hofmeister et al. 2008), presente in molte proteine della matrice extracellulare, tra cui la vitronectina e la fibronectina. L'affinità (cioè la capacità di legame) dell'integrina $\alpha_v\beta_3$ per i peptidi, inoltre, aumenta nel momento in cui la sequenza RGD viene a trovarsi all'interno di una struttura ciclica (Temming et al. 2005). L'integrina $\alpha_v\beta_3$ può rappresentare quindi un vero e proprio bersaglio verso cui indirizzare in maniera specifica adeguati profarmaci che, contenendo la sequenza RGD, potrebbero accumularsi preferenzialmente nel contesto del tumore.

La catepsina B è un'enzima proteolitico localizzato prevalentemente nel comparto lisosomiale, dove interviene nel normale processo di *turnover* delle proteine cellulari. Studi recenti indicano che circa il 5% della catepsina B sintetizzata viene secreto nei fluidi extracellulari o risulta associato alla membrana cellulare, dove si ipotizza possa svolgere funzioni di degradazione nei confronti delle proteine della matrice extracellulare, favorendo così l'invasione da parte delle cellule neoplastiche dei tessuti circostanti (Roshy et al. 2003). A riprova di questo fatto è stato dimostrato come in molti tumori, tra cui anche il melanoma, questa proteina sia sovraespressa, concorrendo, assieme ad altre proteasi, a conferire al tumore la capacità di infiltrare i tessuti circostanti e di dare origine a metastasi (Roshy et al. 2003). In base a queste premesse e nella speranza di ottenere nuovi agenti potenzialmente utili nel trattamento del melanoma metastatico è stato disegnato e sintetizzato un profarmaco del paclitaxel caratterizzato dalla presenza sia di un dominio di "riconoscimento", costituito da una sequenza peptidica contenente il motivo RGD, sia di un dominio di "attivazione"

costituito da una sequenza peptidica degradata con elevata efficienza dalla proteasi catepsina B (Ruzza et al. 2006) (Fig. I).

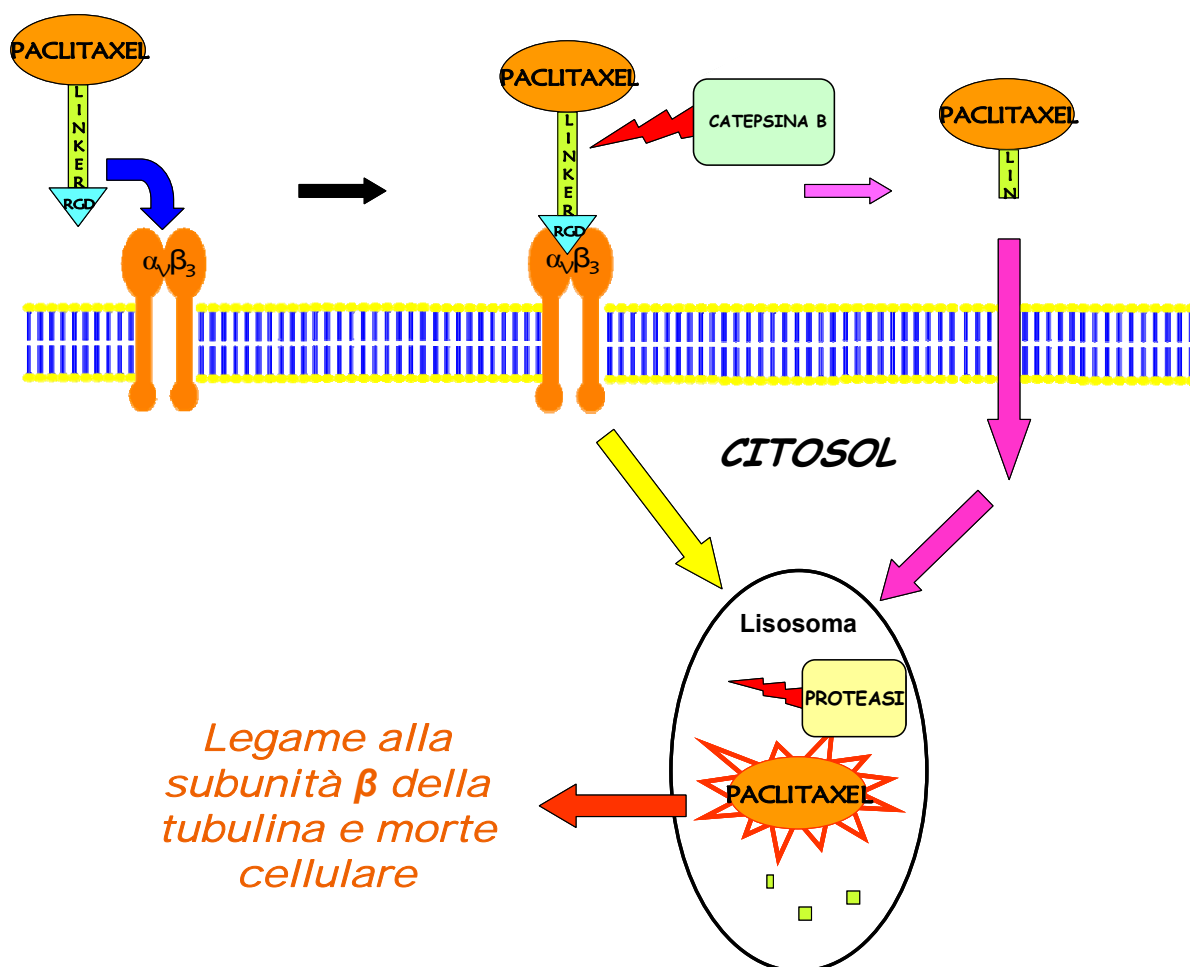


Figura I: Meccanismo proposto di direccionamento e taglio proteolitico del coniugato peptidico del paclitaxel: il direccionamento avviene tramite il legame della sequenza RGD all'integrina $\alpha_v\beta_3$, mentre la liberazione del paclitaxel può avvenire nell'ambiente peritumorale o all'interno dei lisosomi per azione della catepsina B. Il paclitaxel così liberato può diffondere nel citosol e legarsi alla subunità β della tubulina inducendo morte cellulare.

Il paclitaxel è un composto citotossico naturale (Wani et al. 1971), attualmente utilizzato in clinica per la cura di diverse neoplasie quali il tumore della mammella e dell'ovaio (Niethammer et al. 2001). La citotossicità del paclitaxel sembra dovuta principalmente alla sua capacità di legarsi alla subunità β della tubulina, stabilizzando in questo modo i microtubuli (Azzabi et al. 2005). È da tener presente che l'utilizzo di questo farmaco in forma libera è limitato da una scarsa risposta terapeutica (18-20% nella caso della terapia del melanoma maligno (Azzabi et al. 2005), da gravi effetti indesiderati (in quanto incapace di distinguere i tessuti neoplastici da quelli normali) e da una scarsissima solubilità in acqua (Niethammer et al. 2001). L'incorporazione del paclitaxel in un profarmaco con le caratteristiche sopra descritte potrebbe risultare una buona soluzione sia alla scarsa efficacia del farmaco, in quanto esso verrebbe direzionato alle cellule tumorali, sia alla sua insolubilità,

dato che la presenza della parte peptidica a cui verrebbe legato ne aumenterebbe la solubilità in soluzioni acquose.

Un'altra strategia potenzialmente utile nel trattamento del melanoma metastatico sfrutta l'espressione da parte di molti melanomi del sistema enzimatico che consente la sintesi della melanina e, in particolare, dell'enzima tirosinasi (monofenolo ossigenasi) che catalizza la prima reazione della melanogenesi (ossidazione della tirosina a DOPA chinone, **Fig. II**) (Riley 2003).

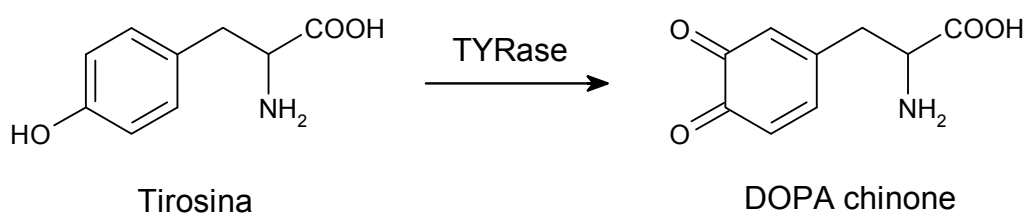


Figura II: Conversione tirosinasi-mediata della tirosina nel corrispondente *o*-chinone, il DOPA chinone.

La tirosinasi è in grado di catalizzare la trasformazione di numerosi analoghi della tirosina (fenoli sostituiti in posizione *para*-) in *o*-chinoni, sostanze potenzialmente citotossiche a causa della loro capacità di formare legami covalenti con gruppi nucleofili presenti in proteine ed acidi nucleici, ed in particolare con i gruppi tiolici (-SH) della cisteina. Si ritiene che la loro tossicità sia dovuta all'inattivazione di alcuni enzimi essenziali ai fini della vitalità cellulare.

Numerosi fenoli *para*-sostituiti sono stati studiati quali potenziali farmaci anti-melanoma, ma nessuno di essi è stato tuttavia introdotto sul mercato in quanto scarsamente efficaci e/o dotati di una significativa tossicità verso il paziente. Un esempio è dato dal 4-idrossianisolo (4-HA, **Fig. III**), una molecola che è stata valutata a livello clinico negli anni '70, ma che non è mai entrata nella pratica medica a causa della forte tossicità epatica e renale (Moridani et al. 2003).

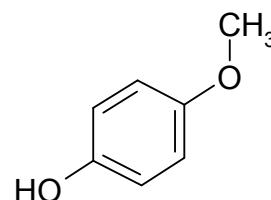


Figura III: Struttura chimica del 4-HA.

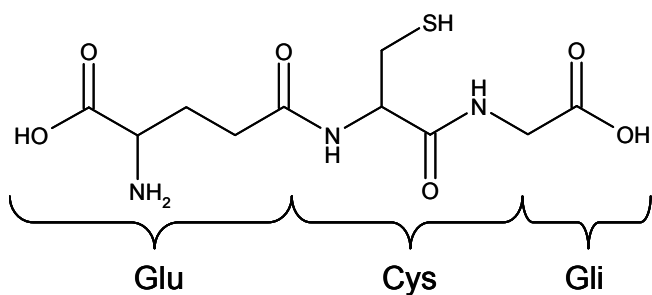


Figura IV: Struttura chimica del GSH.

La scarsa efficacia antitumorale dei fenoli *para*-sostituiti, sino ad oggi studiati, è probabilmente dovuta alla rapida inattivazione dei relativi *o*-chinoni citotossici per coniugazione con il tripeptide glutatione (GSH, **Fig. IV**), sostanza presente in elevate

concentrazioni (nell'ordine delle millimoli/L, (Riley 2003) sia nei melanociti normali, sia in quelli neoplastici. La coniugazione degli *o*-chinoni al GSH non ne permetterebbe il legame (e quindi l'inibizione dell'attività) ad enzimi la cui attività è critica ai fini della vitalità cellulare. Il GSH, inoltre, sembra svolgere nelle cellule melanogeniche, un ruolo particolarmente importante di protezione dalla tossicità da perossido di idrogeno (H₂O₂), prodotto in elevate quantità durante la melanogenesi ed inattivato grazie all'intervento della glutatione-perossidasi (Meyskens et al. 2001).

Sulla base di tali conoscenze una parte del lavoro di tesi ha riguardato quindi il disegno e la valutazione biologica di potenziali farmaci anti-melanoma in grado sia di generare un *o*-chinone citotossico grazie all'intervento dell'enzima tirosinasi, sia in grado di abbassare i livelli cellulari di GSH grazie alla presenza di un gruppo carbonilico α,β -insaturo in catena laterale, esponendo così la cellula neoplastica all'azione dell'*o*-chinone e alle specie reattive dell'ossigeno derivanti dall'H₂O₂ prodotta nel corso della melanogenesi.

Un altro potenziale approccio per la terapia mirata del melanoma potrebbe essere l'utilizzo di inibitori dell'enzima glutatione-S-transferasi (GST) in particolare della GSTP1-1, frequentemente sovraespressa in tumori umani. Le GST sono una superfamiglia di proteine dimeriche che catalizzano reazioni di coniugazione o sostituzione a carico di una grande varietà di composti elettrofili, endogeni ed esogeni, col tripeptide GSH (**Fig. V**). Vengono suddivise in 3 diverse famiglie in base alla loro collocazione all'interno della cellula: esistono GST microsomiali, mitocondriali e citosoliche. In particolare, le GST citosoliche si suddividono in sette diverse classi, in base a criteri quali la similarità di

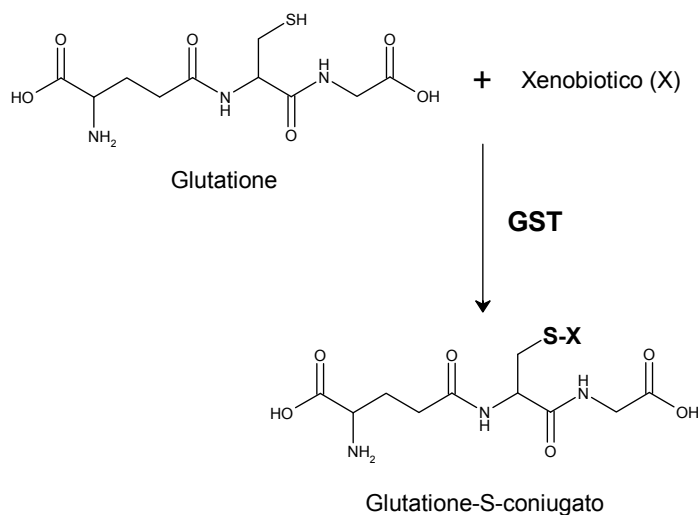


Figura V: Schema di reazione della coniugazione di un elettrofilo col GSH.

sequenza o la specificità di substrato, individuate con una diversa lettera dell'alfabeto greco: Alpha, Mu, Omega, Pi, Sigma, Theta e Zeta (abbreviate rispettivamente in: A, M, O, P, S, T e Z). Ogni singolo enzima è poi identificato in base ai tipi di subunità che lo compongono: ad esempio, il nome GSTP1-1 indica l'enzima GST citosolica di classe P composta da due

subunità identiche di tipo 1 (Ruzza et al. 2009). GSTP1-1 risulta essere sovraespressa dalle cellule del melanoma e, inoltre, una serie di esperimenti descritti in letteratura sembrano indicare come un'inibizione specifica di questo enzima renda le cellule neoplastiche maggiormente suscettibili agli agenti chemioterapici (Depeille et al. 2005). Una giustificazione di questo effetto protettivo può essere data anche sulla base delle sue funzioni all'interno della cellula che sono:

- ✓ una funzione catalitica: è noto da molti anni che le GST catalizzano reazioni di coniugazione o sostituzione nucleofila col tripeptide GSH. Alcuni farmaci utilizzati in chemioterapia (o loro eventuali metaboliti attivi) possono essere detossificati in quanto riconosciuti come xenobiotici, venire coniugati col GSH perdendo così la loro attività citotossica;
- ✓ una funzione non catalitica, cioè il legame e la formazione di complessi reversibili con la proteina c-jun N-terminal chinasi 1 (JNK1), una proteina della famiglia delle Ser/Thr facente parte della cascata delle MAP-chinasi (mitogen-activated protein kinases), coinvolta nella regolazione del processo apoptotico. In condizioni normali, GSTP1-1 si lega a JNK1 inattivandola, inibendo di conseguenza l'apoptosi; in condizioni di stress cellulare, invece, questo legame si scinde e la JNK1, nella sua

forma libera, è in grado di essere fosforilata da una MAP chinasi, attivando a sua volta una cascata fosforilativa che sfocia nell'evento apoptotico (Ruzza et al. 2009), come schematizzato in Fig. VI.

Ne consegue che in presenza di elevate concentrazioni di GSTP1-1, nonostante l'attivazione del

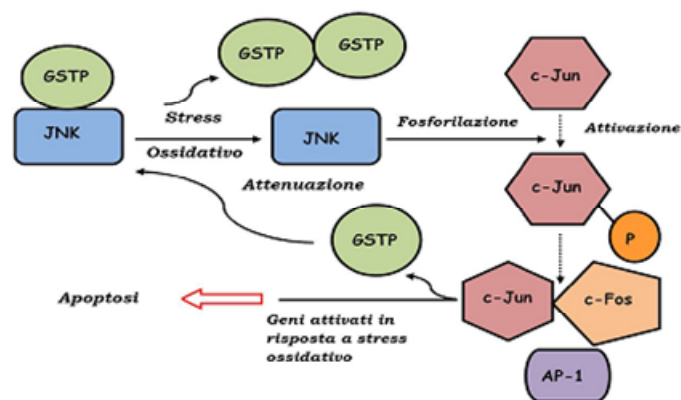


Figura VI: Ruolo della proteina GSTP nella regolazione della funzione della proteina JNK (modificata da Henderson et al. 2005).

processo apoptotico, non sarebbe possibile la liberazione di JNK1 e quindi la fosforilazione di proteine bersaglio.

Sia la coniugazione dei chemioterapici col GSH sia la regolazione della cascata apoptotica rendono la GSTP1-1 un possibile bersaglio per la terapia anti-melanoma, grazie all'individuazione di sostanze che, operando come specifici inibitori, possano agire da

sostanze chemio-sensibilizzatrici, in grado di aumentare di conseguenza la risposta chemioterapica.

Prendendo spunto da un vecchio lavoro pubblicato nel 1986 (Das et al. 1986) che riportava l'effetto inibitorio di una sostanza a nucleo antrachinonico, estratta dalle radici della *Rubia tinctorum*, l'alizarina, usata fin dall'antichità come colorante rosso per i tessuti e, avendo a disposizione una sostanza a nucleo abbastanza simile, seppur naftochinonico (**Fig. VII**), si è pensato di testare l'attività di quest'ultima sostanza sull'attività glutatione-S-transferasi.

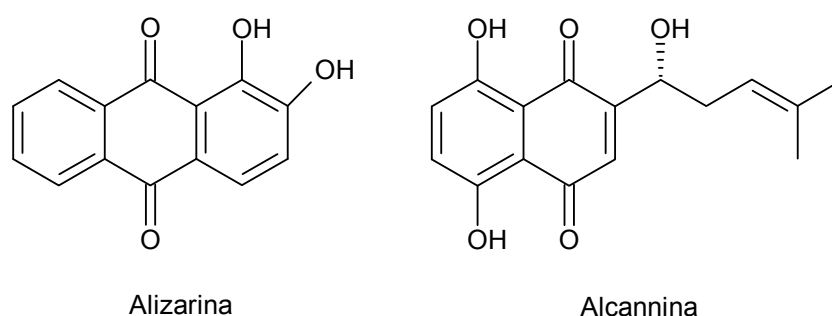


Fig. VII: Struttura chimica del composto antrachinonico alizarina e del composto naftochinonico alcannina.

Parte del lavoro ha quindi riguardato lo studio degli effetti dell'alcannina e di suoi due derivati acetilati la 1'-acetil alcannina e la 5,8,1'-triacetil alcannina (**Fig. VIII**) sull'attività della GST, valutata come formazione del S-glutationil-2,4-dinitrobenzene (GS-DNB), a partire dai substrati 1-cloro-2,4-dinitrobenzene CDNB e GSH (Habig et al. 1974).

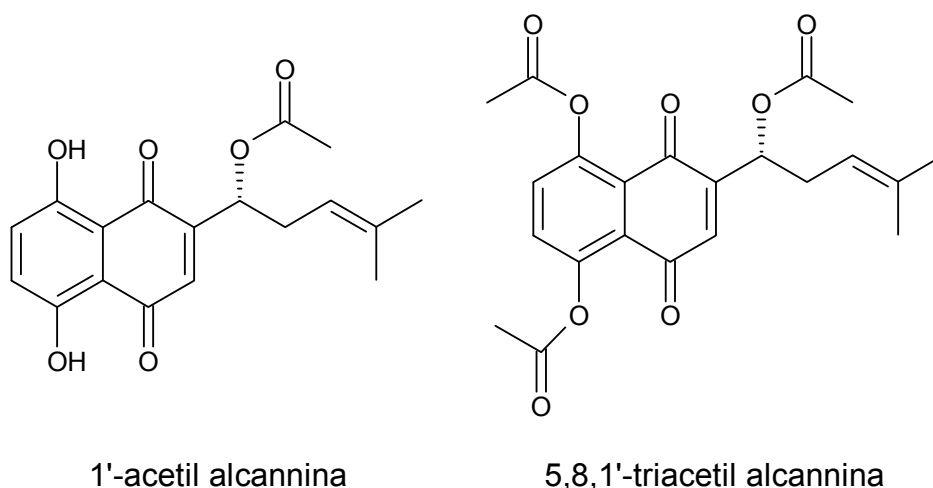


Fig. VIII: Strutture chimiche della 1'-acetil alcannina e della 5,8,1'-triacetil alcannina.

SCOPO DEL LAVORO

Poiché, come riportato nell'Introduzione, alcune delle caratteristiche salienti della cellula di melanoma risultano essere:

- 1) la sovraespressione dell'integrina $\alpha_V\beta_3$ e dell'enzima catepsina B;
- 2) la presenza dell'enzima tirosinasi quale enzima fondamentale per la sintesi della melanina;
- 3) la presenza di un'elevata concentrazione di GSH;
- 4) la sovraespressione di enzimi della famiglia delle glutatione-S-transferasi (GST);

in questo lavoro di tesi sono stati disegnati, e talora sintetizzati, e valutati *in vitro* dal punto di vista biologico 3 tipi di nuove sostanze dirette verso target biochimici relativamente specifici della cellula di melanoma, alla ricerca di sostanze che potessero risultare utili come anti-tumorali o come adiuvanti nella chemioterapia con antitumorali classici.

Un primo possibile profarmaco antitumorale progettato è stato un coniugato peptidico del paclitaxel, progettato in maniera tale da sfruttare la presenza dell'integrina $\alpha_V\beta_3$ e dell'enzima catepsina B, grazie ad una sequenza di "indirizzamento" e una sequenza di "attivazione", legate al paclitaxel quale agente citotossico.

Un secondo possibile agente antitumorale è stato il 4-[(4-idrossifenil)sulfanil]-3-buten-2-one che racchiudeva in sé le caratteristiche di essere substrato della tirosinasi e, al contempo, di essere una sostanza reattiva nei confronti del GSH, sottraendolo in questo modo alle cellule stesse.

Infine, come possibili adiuvanti nella pratica chemioterapica con antitumorali classici, sono stati testati una sostanza naturale a nucleo naftochinonico, l'alcannina, e due suoi derivati acetilati, valutati per il loro possibile effetto inibitorio sull'enzima GSTP1-1, presente a livello delle cellule tumorali.

2. MATERIALI E METODI

2.1. Sintesi e valutazione biologica del coniugato peptidico del paclitaxel

2.1.1. Reagenti chimici e solventi

Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-D-Phe-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Lys(ivDde)-OH, N-idrossibenzotriazolo (HOBT), Fmoc-Asp(OtBu)-OH e H-Gly-2-Cl-Trt-Resina sono stati ottenuti dalla Novabiochem-Calbiochem AG (Laüfelfingen, Svizzera);

Acido trifluoroacetico (TFA), difenildifosforilazide (DPPA), anisolo, triisopropilsilano (TIPS), H-idrossisuccinimide (HOSu), L-cisteina, e acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) sono stati ottenuti dalla Fluka (Buchs, Svizzera).

Anidride fosforica (P₂O₅) e piridina sono stati ottenuti dalla J. T. Baker (Deventer, Olanda).

Diisopropiletilammina (DIEA) e piperidina sono stati ottenuti dalla Biosolve LTD (Valkenswaard, Olanda).

2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio tetrafluoroborato (TBTU) è stato ottenuto dalla Applied Biosystem (Foster City, CA, U.S.A.).

Etere etilico (Et₂O), diclorometano (DCM), dimetilformammide (DMF), potassio fosfato monobasico (KH₂PO₄), etile acetato (AcOEt), etere di petrolio e acetonitrile (CH₃CN) per HPLC sono stati ottenuti dalla Carlo Erba Reagenti (Milano, Italia).

L'enzima catepsina B e il 4-nitrofenilcloroformiato sono stati ottenuti dalla Sigma-Aldrich S.r.l. (Milano, Italia).

Il paclitaxel è stato gentilmente donato dalla ditta Indena (Milano, Italia).

L'acqua ultra-pura è stata ottenuta mediante un apparecchio PureLab Option-Q (Elga LabWater, High Wycombe, UK).

2.1.2. Strumentazione utilizzata

Per la cromatografia liquida ad elevate prestazione in fase inversa (RP-HPLC) preparativa è stato utilizzato uno strumento Shimadzu (Kyoto, Japan) costituito da due pompe LC-8A, provvisto di un degasatore ERMA (Tokyo, Japan) modello ERC-3562, da un *controller* SCL-8A e da un rivelatore spettrofotometrico Shimadzu, modello SPD-6A.

Per la cromatografia liquida a medie pressioni (MPLC) è stato utilizzato un sistema C-615 della Büchi (Flawil, Svizzera), costituito da due pompe C-605 e collegato ad un rivelatore LKB-Bromma (Markham, ON, Canada) modello UVCORD 2158.

La RP-HPLC analitica è stata effettuata con un apparecchio Shimadzu costituito da pompe LC-10AD, *controller* SCL-10A, rivelatore SPD-10A e degasatore Gastorr 154 (Tokyo, Japan); lo strumento era composto inoltre da un campionatore automatico Shimadzu SIL-9A. I dati sono stati acquisiti tramite il software Starlet ChromStar, Bruker (Bremen, Germany).

Gli spettri di massa sono stati registrati con uno spettrometro di massa PerSeptive Biosystem (Farmingham, MA). La taratura è stata effettuata usando uno standard esterno costituito da una soluzione 1 pmol/ μ L dei seguenti tre peptidi: angiotensina I, bradichinina e neurotensina, in acqua/acetonitrile 1:1 (v/v) in presenza di 1% acido acetico (AcOH). I campioni sono stati preparati sciogliendo quantità ponderate di peptide nelle medesime soluzioni.

Gli studi conformazionali effettuati mediante risonanza magnetica nucleare (NMR) mono- e bi-dimensionale (spettrometro AVANCE DMX600 operante a 600, 1 MHz per il protone utilizzando un probe di 5 mm per ^1H , ^{13}C , ^{15}N con gradienti) sono state condotti a 25°C sia in ambiente acquoso in presenza di acetonitrile deuterato (CD_3CN), al fine di aumentare la solubilità del composto stesso, sia in un ambiente membrano-mimetico in presenza di micelle di SDS deuterato (SDS-d₂₅ 205,5 mM).

2.1.3. Sintesi del coniugato peptidico del paclitaxel

Il coniugato è stato preparato mediante condensazione dei suoi tre gruppi funzionali caratteristici, i quali sono stati sintetizzati separatamente. L'intera procedura di sintesi del composto può essere così schematizzata:

- ♦ Sintesi del peptide RGD;
- ♦ Ciclizzazione del peptide RGD;
- ♦ Sintesi del peptide catepsina B-sensibile;
- ♦ Condensazione del peptide RGD ciclico con il peptide catepsina B-sensibile;
- ♦ Attivazione del paclitaxel;
- ♦ Condensazione del paclitaxel attivato alla parte peptidica.

Tutti i peptidi presenti nel composto sono stati sintetizzati mediante sintesi manuale su fase solida, utilizzando tubi per estrazioni su fase solida (Supelco, Bellefonte, PA, USA) e seguendo il protocollo che utilizza il gruppo 9-fluorenilmetossicarbonile (Fmoc) come

protettore del gruppo α -amminico e come attivatore il 2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio tetrafluoroborato (TBTU), in presenza di N-idrossibenzotriazolo (HOBt).

Il protocollo completo prevedeva i seguenti passaggi:

1. Rigonfiamento della resina con N,N-dimetilformammide (DMF);
2. *Coupling* dell'amminoacido con TBTU/HOBt 0.5 M in DMF;
3. Lavaggio della resina con DMF;
4. Deprotezione del gruppo Fmoc con piperidina 20% in DMF;
5. Lavaggio della resina con DMF;
6. Lavaggio finale della resina con diclorometano (DCM).

La sintesi iniziava con il rigonfiamento della resina super-acidolabile, commercializzata con il primo amminoacido già ancorato alla resina e non protetto al gruppo amminico (passaggio 1); i passaggi 2, 3, 4 e 5 erano ripetuti ciclicamente per ogni amminoacido da aggiungere, fino alla condensazione dell'ultimo amminoacido previsto. La sintesi, quindi, terminava con la deprotezione del gruppo Fmoc sull'ultimo amminoacido aggiunto e con il lavaggio della resina con DCM (passaggio 6). La resina veniva quindi essicata sottovuoto.

Il distacco della catena peptidica dalla resina si otteneva mediante trattamento a temperatura ambiente con una soluzione di acido trifluoroacetico (TFA) all'1% in DCM (10 mL x 15 minuti). Questo procedimento permetteva il distacco dalla resina super-acidolabile senza però rimuovere i gruppi protettori presenti nelle catene laterali degli amminoacidi. Il trattamento acido era effettuato per 5 volte e, ad ogni passaggio, la soluzione era filtrata e neutralizzata con piridina. Le varie soluzioni erano quindi riunite e concentrate a piccolo volume, il peptide precipitato per aggiunta di *tert*-butilmetil etere, separato per filtrazione, lavato con *tert*-butilmetil etere ed essiccato sottovuoto.

Sintesi del peptide D-Phe-Lys-Arg(Pbf)-Gly-Asp(OtBu) (RGD)

Il peptide lineare H-Asp(OtBu)-D-Phe-Lys(ivDde)-Arg(Pbf)-Gly-OH è stato sintetizzato mediante sintesi su fase solida, secondo la procedura sopra descritta, a partire da 0.4 mmoli di H-Gly-2Cl-Trt-resina. Il peptide così ottenuto è stato purificato mediante RP-HPLC analitica utilizzando una colonna Vydac C18 10 μ m, 4.6x250 mm. La fase mobile utilizzata era costituita da 0.05% TFA in acqua (H₂O) (solvente A) e da 0.05% TFA in acetonitrile (CH₃CN)/H₂O 9:1 (v/v) (solvente B). Il programma di eluizione adottato prevedeva una fase di eluizione isocratica per 3 min al 30% di B, un gradiente lineare dal 30% al 90% di B in 30 min, un'eluizione isocratica per 1 min al 90% di B e un gradiente lineare dal 90% al 30% di B in 1 min; flusso 1 mL/min. Il rivelatore UV-visibile era impostato alla lunghezza d'onda di 216 nm. La frazione corrispondente al composto puro è stata raccolta, liofilizzata e, al fine di

determinarne il peso molecolare, sottoposta ad un'analisi di spettrometria di massa con ionizzazione ad elettrospray (ESI-MS), analisi che è stata effettuata dal Dott. D. Dalzoppo (Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Padova). Da tale analisi è stato ottenuto un valore di 1135.60 Dalton (Da).

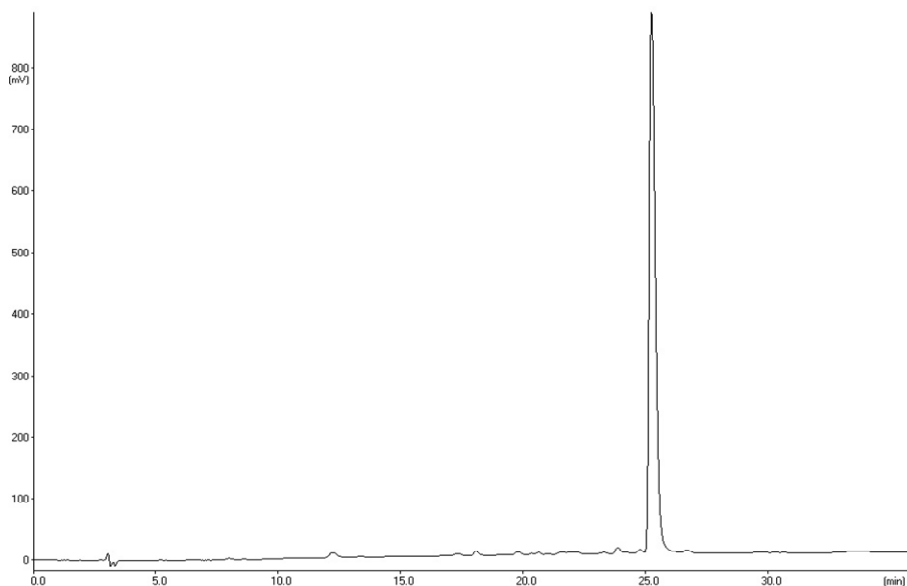


Figura 1: Cromatogramma relativo alla purificazione mediante RP-HPLC analitica del peptide lineare H-Asp(OtBu)-D-Phe-Lys(ivDde)-Arg(Pbf)-Gly-OH.

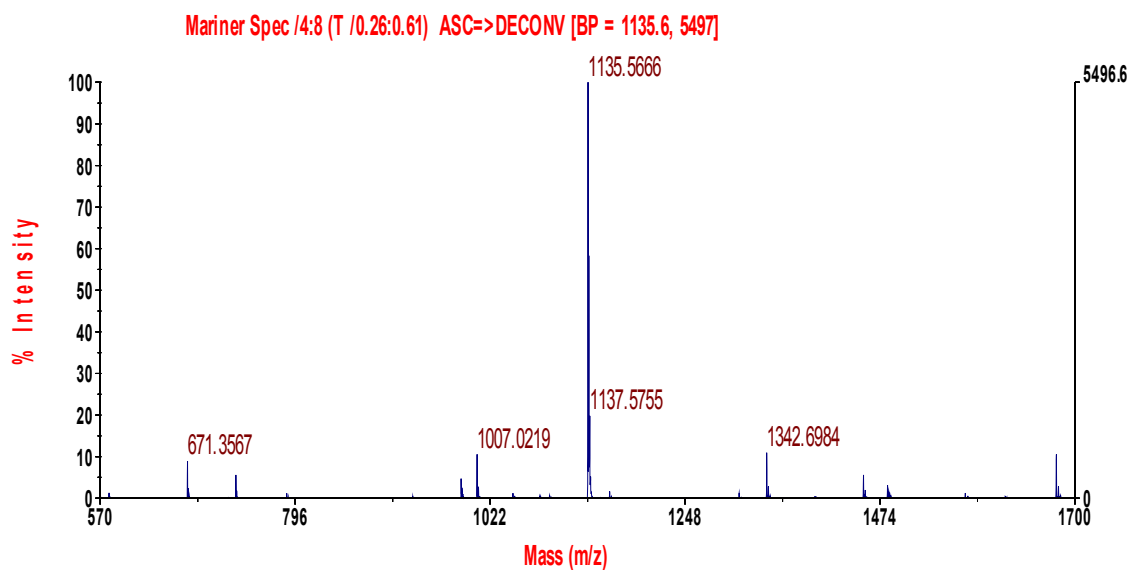


Figura 2: Spettro ESI massa del peptide lineare H-Asp(OtBu)-D-Phe-Lys(ivDde)-Arg(Pbf)-Gly-OH.

Ciclizzazione del peptide RGD

0.36 mmoli di peptide lineare, protetto in catena laterale, sono state disciolte in DMF anidra. Alla soluzione, tenuta in atmosfera di azoto e raffreddata a 0°C, sono stati aggiunte 1.2 mmoli di difenildifosforilazide (DPPA), 2 mmoli di potassio fosfato monobasico (K₂HPO₄) e 0.4 mmoli di N-idrossi-succinimide (HOSu). La reazione è stata fatta procedere a temperatura ambiente per 3 giorni e quindi sono stati aggiunti ulteriori 0.6 mmoli di DPPA. Dopo 24 h la miscela di reazione è stata concentrata a piccolo volume mediante evaporatore rotante (Rotavapor EL 131, Büchi, Flawil, Svizzera) ed il prodotto grezzo è stato precipitato mediante aggiunta di acqua. Il peptide è stato purificato mediante RP-HPLC analitica utilizzando una colonna Vydac C18 10 µm, 4.6x250 mm. La fase mobile utilizzata era costituita da 0.05% TFA in H₂O (solvente A) e da 0.05% TFA in CH₃CN/H₂O 9:1 (v/v) (solvente B). Il programma di eluizione adottato prevedeva una fase di eluizione isocratica per 3 min al 30% di B, un gradiente lineare dal 30% al 90% di B in 30 min, un'eluizione isocratica per 1 min al 90% di B e un gradiente lineare dal 90% al 30% di B in 1 min; flusso 1 mL/min. Il rivelatore UV-visibile era impostato alla lunghezza d'onda di 216 nm.

Il solido ottenuto è stato trattato per 45 min con 10 mL di una soluzione al 2% di idrazina idrata in DMF al fine di ottenere la deprotezione della funzione amminica in catena laterale del residuo di lisina. Il peptide ciclico così deprotezzato è stato quindi precipitato mediante aggiunta di H₂O ed essiccato sotto vuoto in presenza di anidride fosforica (P₂O₅). Il peptide in esame è stato sottoposto ad un'analisi ESI-MS dalla quale si è ricavato un peso molecolare di 911.46 Da.

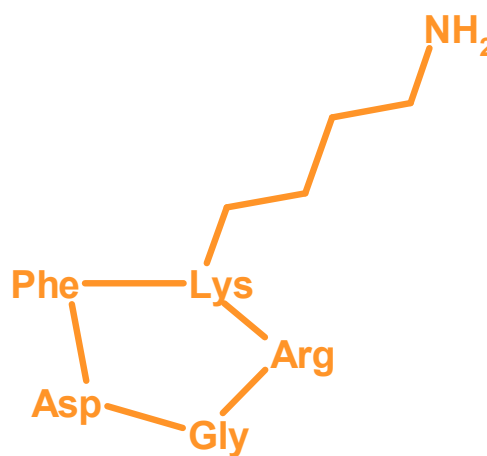


Figura 3: Struttura del peptide RGD ciclico.

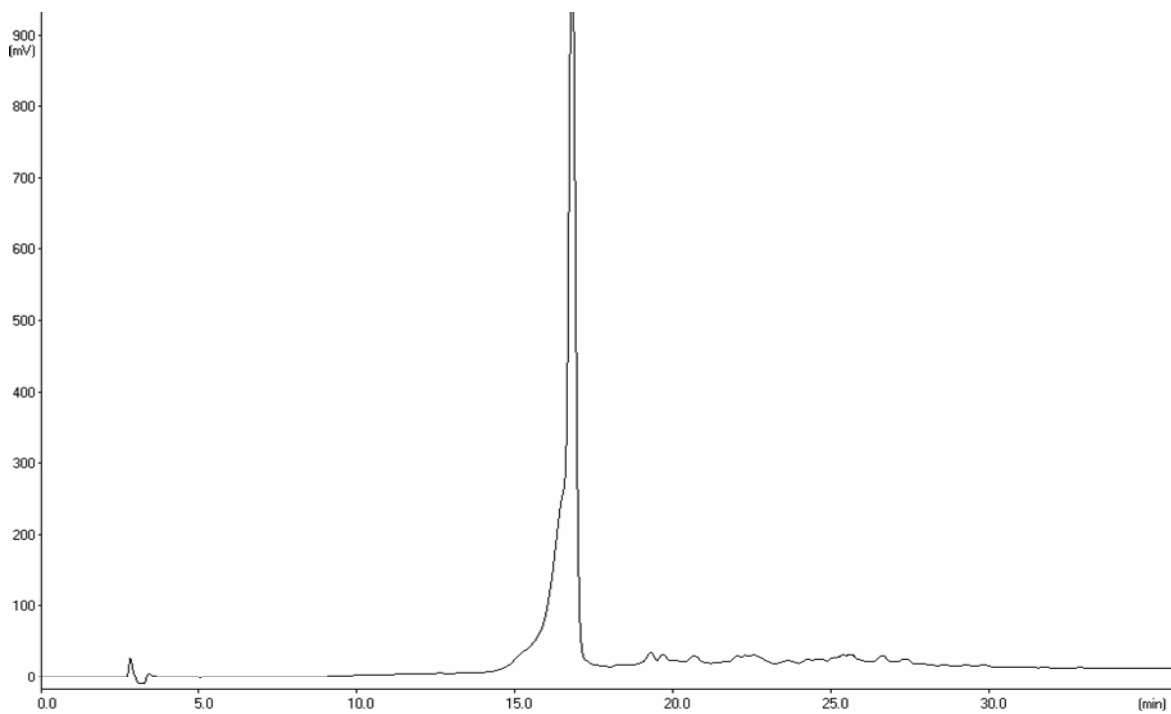


Figura 4: Cromatogramma relativo alla purificazione mediante RP-HPLC analitica del peptide c[D-Phe-Lys-Arg(Pbf)-Gly-Asp(OtBu)].

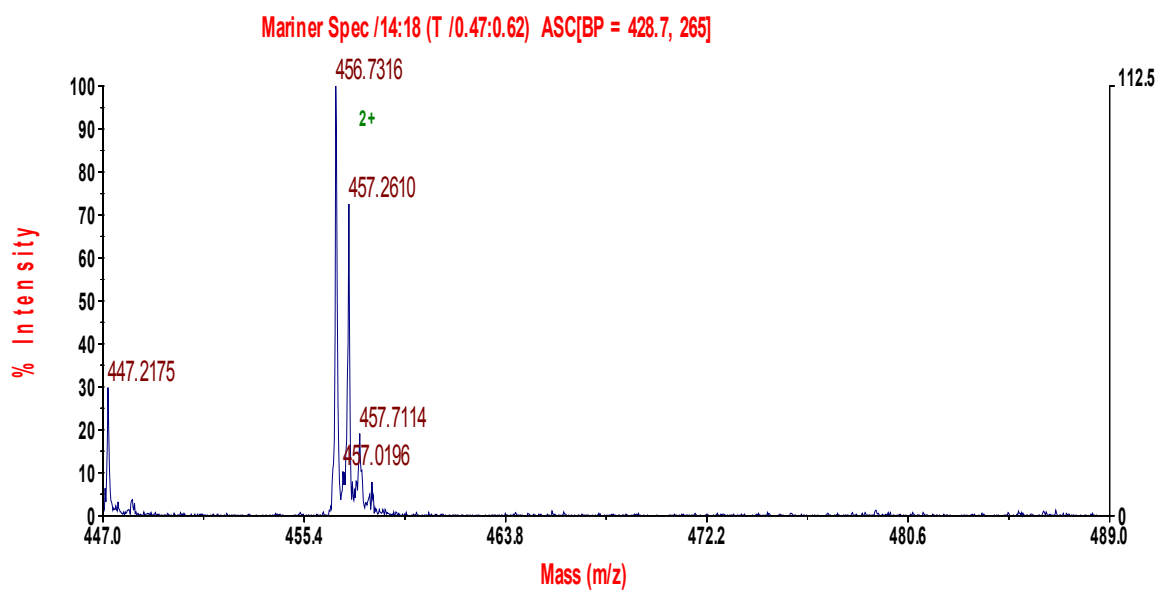


Figura 5: Spettro ESI massa del peptide c[Asp(OtBu)-D-Phe-Lys-Arg(Pbf)-Gly].

Sintesi del peptide acido succinico(Suc)-Gly-Arg-Arg-Phe-Ala-Eda-H

Il peptide lineare H-Gly-Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-Phe-Ala-Eda-H, introdotto nel composto finale quale substrato della catepsina B, è stato sintetizzato sempre mediante sintesi su fase solida a partire da 0.1 mmoli di H-Eda-Trt-resina. Il peptide, ancorato alla resina, è stato risospeso in DMF anidra e trattato con 4 equivalenti di anidride succinica in presenza di 8 equivalenti di diisopropilettilammina (DIEA). La miscela di reazione è stata lasciata in agitazione per 3 h a temperatura ambiente, al termine delle quali si è proceduto all'eliminazione dell'eccesso dei reattivi per filtrazione e al successivo lavaggio della resina con DMF e poi con DCM. Il prodotto ottenuto è stato sottoposto ad un'analisi ESI-MS dalla quale si è ricavato un peso molecolare di 748,42 Da.

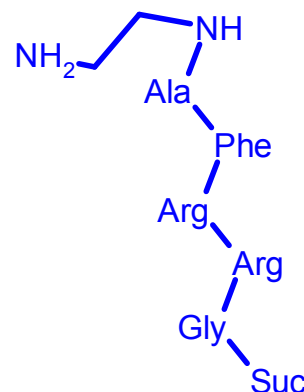


Figura 6: Struttura chimica del peptide substrato della catepsina B.

Sintesi del peptide c(D-Phe-Lys-Arg-Gly-Asp)

/ Suc-Gly-Arg-Arg-Phe-Ala-Eda-H

Un equivalente (eq.) del peptide così ottenuto (OH-Suc-Gly-Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-Phe-Ala-Eda-Trt-resina), è stato condensato con 0.06 mmoli di peptide RGD ciclico (c[(D-Phe-Lys-Arg(Pbf)-Gly-Asp(OtBu))] precedentemente sintetizzato, in presenza di 1 eq. di TBTU, 1 eq. di HOBT e 2 eq. di DIEA in DMF anidra. La reazione di condensazione è stata fatta procedere per 3 h a temperatura ambiente. La miscela di reazione è stata allontanata per filtrazione e la resina lavata con DMF e DCM, ottenendo così il peptide ancora legato alla resina. La resina e le protezioni ai gruppi funzionali presenti in catena laterale sono state rimosse per trattamento con una soluzione di TFA al 95%, in presenza di 2% triisopropilsilano (TIPS), 2% anisolo e 1% H₂O. La reazione di sblocco è stata condotta a temperatura ambiente per 45 min, la resina è stata poi separata per filtrazione ed il prodotto grezzo precipitato per aggiunta di etere etilico (Et₂O). Il complesso



Figura 7: Struttura chimica della parte peptidica del coniugato.

peptidico è stato purificato mediante RP-HPLC analitica utilizzando una colonna Vydac C18 10 μm , 4.6x250 mm. La fase mobile utilizzata era costituita da 0.05% TFA in H_2O (solvente A) e da 0.05% TFA in $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 9:1 (v/v) (solvente B). Il programma di eluizione adottato prevedeva una fase di eluizione isocratica per 5 min al 5% di B, un gradiente lineare dal 5% al 45% di B in 40 min, un gradiente lineare dal 45% al 90% di B in 1 min, un'eluizione isocratica per 1 min al 90% di B e un gradiente lineare dal 90% al 5% di B in 1 min; flusso 1 mL/min. Il rivelatore UV-visibile era impostato alla lunghezza d'onda di 216 nm.

La frazione corrispondente al composto puro è stata raccolta, liofilizzata e sottoposta ad un'analisi ESI-MS dalla quale si è ricavato un peso molecolare di 1333.72 Da.

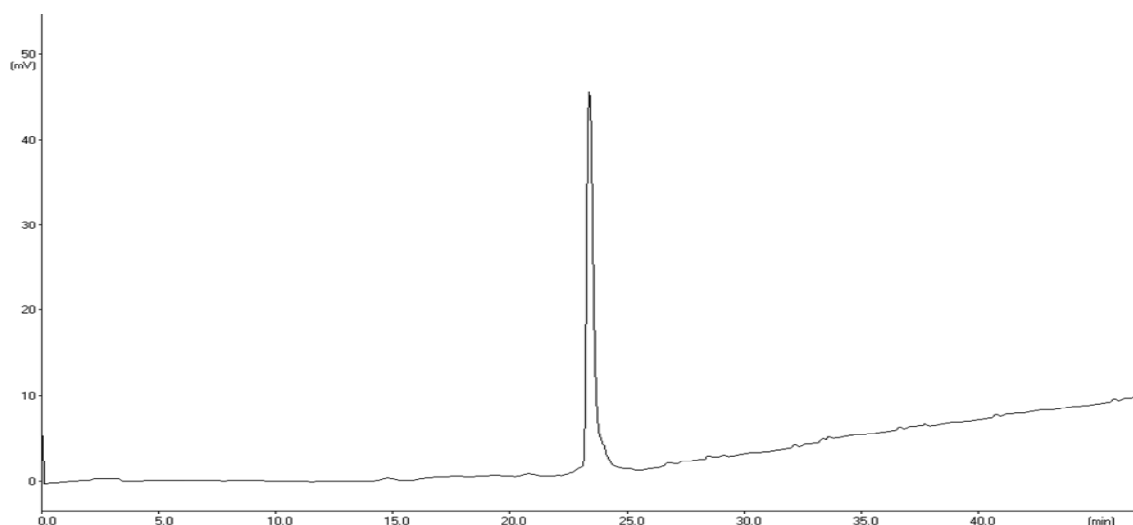


Figura 8: Cromatogramma relativo alla purificazione mediante RP-HPLC analitica del peptide c(D-Phe-Lys-Arg-Gly-Asp)- Suc-Gly-Arg-Arg-Phe-Ala-Eda-H.

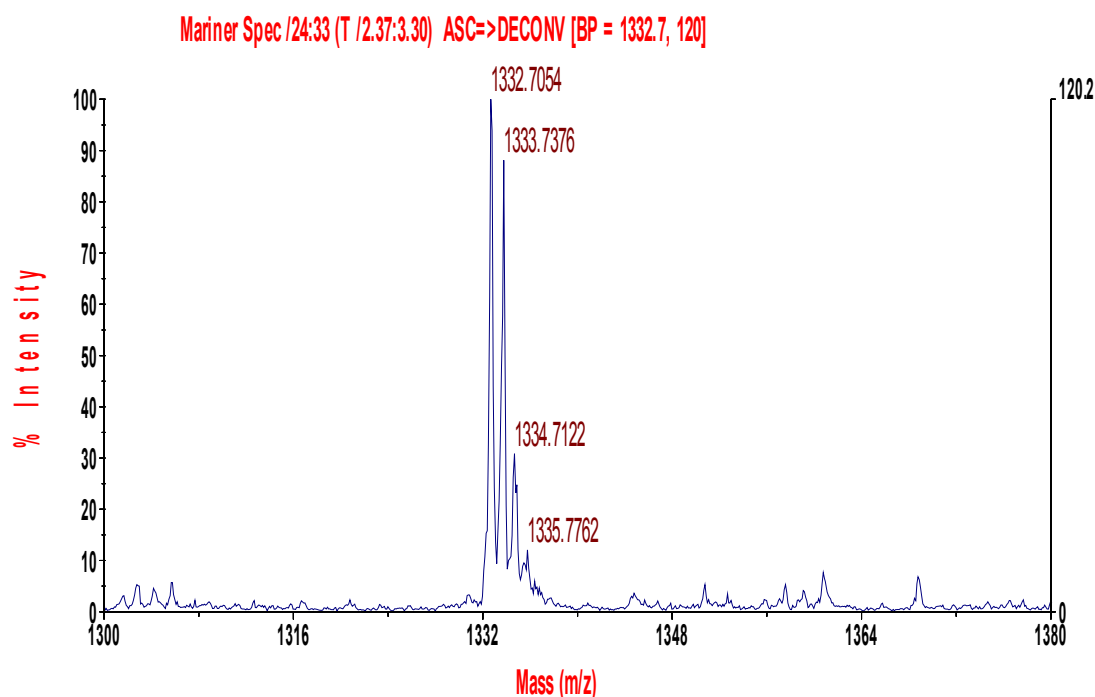


Figura 9: Spettro ESI-MS del peptide c(D-Phe-Lys-Arg-Gly-Asp)- Suc-Gly-Arg-Arg-Phe-Ala-Eda-H.

Attivazione del paclitaxel

Come precedentemente descritto da de Groot et al.(2000), prima di poter essere condensato al complesso peptidico, il paclitaxel deve essere attivato a livello degli ossidrilici (vedi **Fig. 10**); vale a dire che al gruppo -OH presente nella posizione di attacco del gruppo peptidico, deve essere prima legato il gruppo attivatore 4-nitrofenil-carbonato, derivante dal 4-nitrofenilcloroformiato.

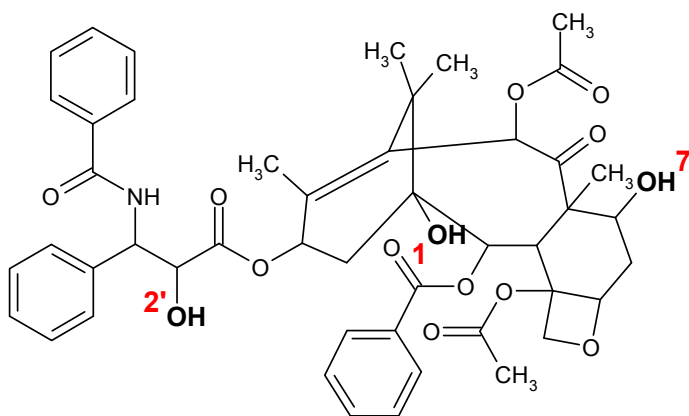


Figura 10: Struttura chimica del paclitaxel.

A questo scopo 0.07 mmoli di paclitaxel sono state sciolte in 1 mL di DCM. La soluzione, in atmosfera di argon, è stata mantenuta per tutta la durata della reazione a -50°C . Alla soluzione sono stati aggiunti 6 eq. di piridina e 6 eq. di 4-nitrofenilcloroformiato, precedentemente sciolto in 1 mL di DCM. La miscela di reazione è stata lasciata in agitazione per 4 h, dopo le quali sono stati aggiunti altri 4,2 eq. di 4-nitrofenilcloroformiato, continuando a mantenere per un'altra ora la reazione in agitazione sempre a -50°C . Al termine, la soluzione è stata portata a temperatura ambiente e sono stati aggiunti 2 ml di soluzione di bisolfato di potassio (KHSO_4) al 2%, è stata anidrificata su solfato di sodio (Na_2SO_4) con la formazione di una fase organica, contenente il prodotto di interesse, la quale è stata separata dalla restante fase acquosa. Il solvente è stato allontanato mediante flusso di azoto.

Il grezzo di reazione è stato purificato mediante MPLC su colonna di silice (40-63 μm , 12x150 mm). Gli eluenti utilizzati sono stati: etere di petrolio (solvente A), acetato di etile (AcOEt) (solvente B). Il programma di eluizione adottato prevedeva una fase di eluizione isocratica per 5 min al 10% di B, un gradiente lineare dal 10% al 60% di B in 50 min, un'eluizione isocratica al 60% di B per 5 min, un gradiente lineare dal 60% al 10% di B in 8 min; flusso 10 mL/min. Il rivelatore UV-

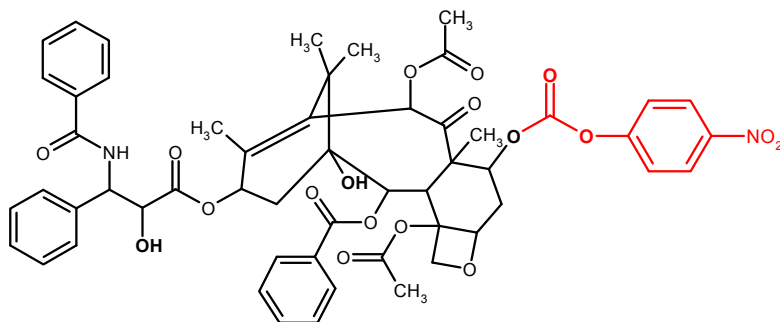


Figura 11: Struttura chimica del paclitaxel attivato in posizione 7.

visibile era impostato alla lunghezza d'onda di 254 nm.

I cromatogrammi ottenuti rivelavano la presenza di 3 picchi corrispondenti ad altrettanti isomeri del paclitaxel attivato (**Fig.12**).

Le singole frazioni sono state raccolte e analizzate tramite cromatografia su strato sottile (TLC); quelle con il maggior grado di purezza sono state riunite, concentrate a secco e analizzate mediante ESI-MS e NMR. L'analisi NMR è stata eseguita dal Prof. S. Mammi (Dipartimento di Scienze Chimiche, Università di Padova).

Delle tre frazioni ottenute, sono state utilizzate solo quelle due presenti in maggior quantità, che dall'analisi NMR risultavano essere il paclitaxel attivato in posizione 2' e il paclitaxel attivato in posizione 7. Quest'ultimo composto è stato quello scelto per il completamento della sintesi, in quanto risultava il prodotto quantitativamente più rilevante. Ciò contrariamente a quanto riportato in letteratura da de Groot et al. (2000), i quali descrivono come prodotto principale il paclitaxel attivato in posizione 2'.

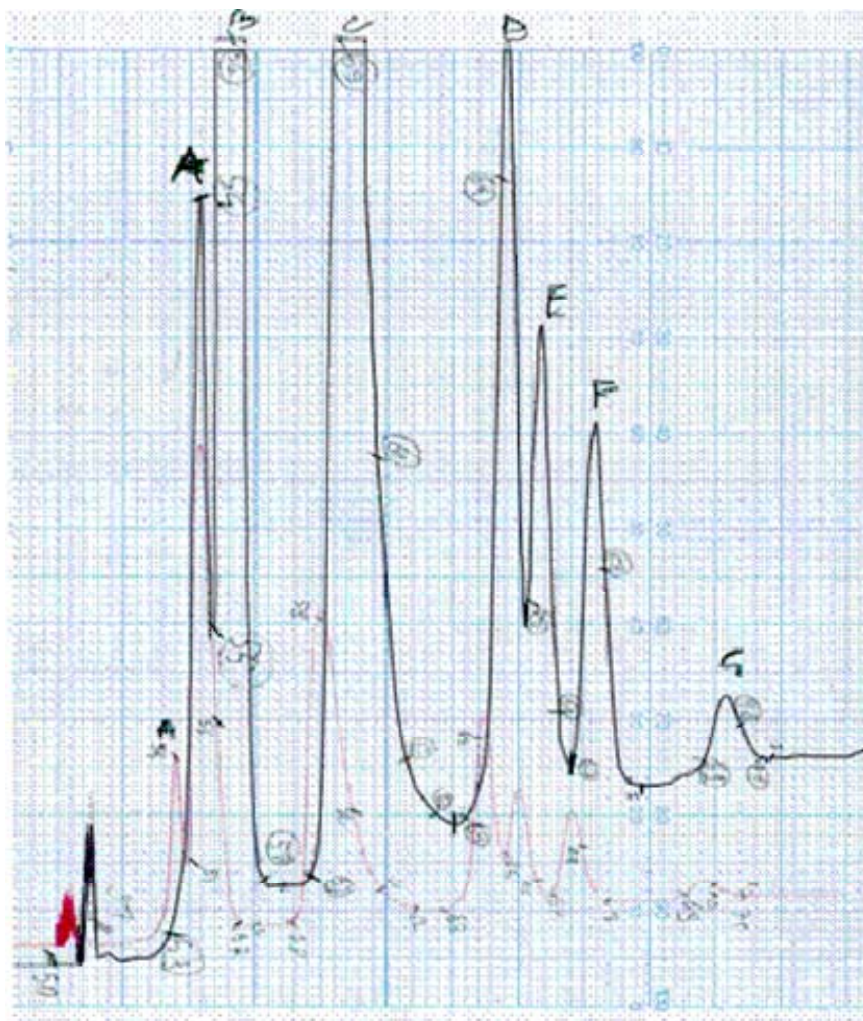


Figura 12: Cromatogramma relativo alla purificazione del paclitaxel attivato.

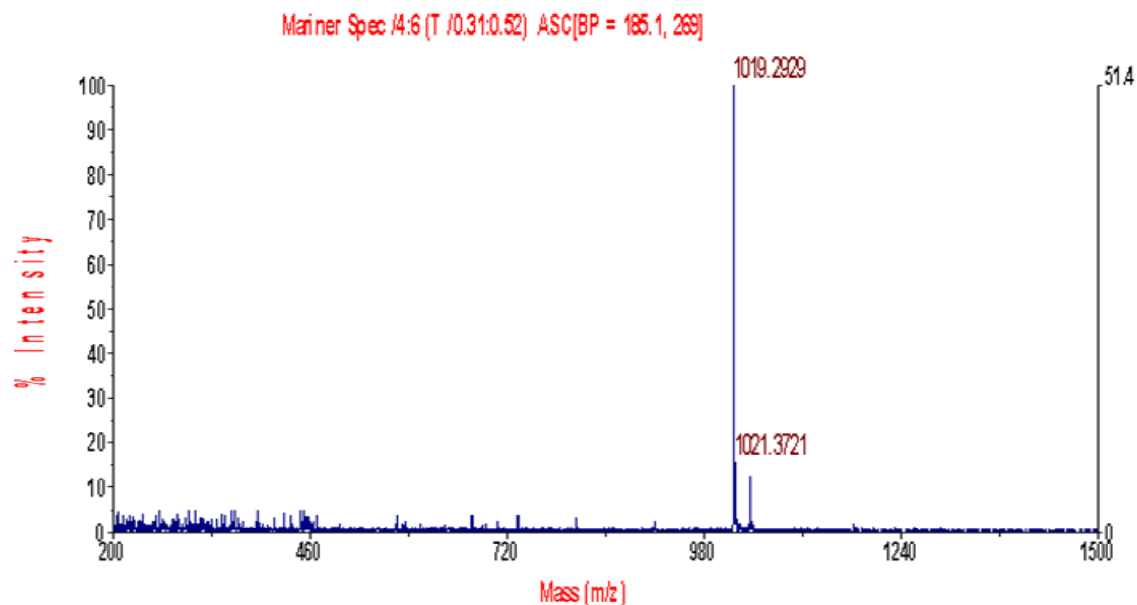


Figura 13: Spettro ESI massa del paclitaxel attivato.

Condensazione del paclitaxel attivato con la parte peptidica del coniugato

0.01 mmoli dell'isomero 7-(4-nitrofenil)carbonato-paclitaxel sono stati disciolti in DMF con 1 eq. del peptide [c(RGDfK)]-Suc-GRRFA-Eda-H e 3 eq. di trietilammina (TEA). La miscela di reazione è stata posta in agitazione e la reazione è stata fatta procedere per 24 h a temperatura ambiente. La soluzione, quindi, è stata concentrata a piccolo volume e il prodotto grezzo è stato purificato tramite RP-HPLC preparativa utilizzando una colonna Vydac C18, 10 μm , 22x250 mm. Gli eluenti utilizzati sono stati: 0.05% di TFA in H_2O (solvente A), 0.05% di TFA in $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 9:1 (v/v) (solvente B). Il gradiente utilizzato prevedeva 5 min di eluizione isocratica al 35% di B, un gradiente lineare dal 35% di B al 50% di B in 50 min, un gradiente lineare dal 50% al 90% di B in 2 min, un'eluizione isocratica al 90% di B per 1 min e un gradiente lineare dal 90% al 35% di B in 1 min; flusso 12 mL/min. Il rivelatore UV-visibile era impostato alla lunghezza d'onda di 216 nm.

Le frazioni corrispondenti al picco del coniugato sono state ulteriormente purificate tramite RP-HPLC analitica utilizzando una colonna Vydac C18 10 μm , 4.6x250 mm. Gli eluenti utilizzati sono stati: 0.05% di TFA in H_2O (solvente A), 0.05% di TFA in $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 9:1 (v/v) (solvente B). Il gradiente utilizzato prevedeva 3 min di eluizione isocratica al 35% di B, un gradiente lineare dal 35% di B al 50% di B in 30 min, un gradiente lineare dal 50% al 90% di B in 1 min e un gradiente lineare dal 90% al 35% di B in 1 min; flusso 1 mL/min. Il rivelatore UV-visibile era impostato alla lunghezza d'onda di 216 nm. Il composto così

purificato è stato sottoposto ad un'analisi ESI-MS dalla quale si è ricavato un peso molecolare di 2212.03 Da. Inoltre è stata effettuata anche un'analisi NMR mono e bi-dimensionale, la quale ha messo in evidenza che la molecola del profarmaco, in entrambi i casi, assumeva una conformazione estesa, cioè che non vi erano interazioni tra le due parti terminali della molecola, garantendo in questo modo che le due estremità della molecola (paclitaxel da un lato, peptide RGD dall'altro) (**Fig. 14**) erano entrambe in grado di interagire con il loro target cellulare.

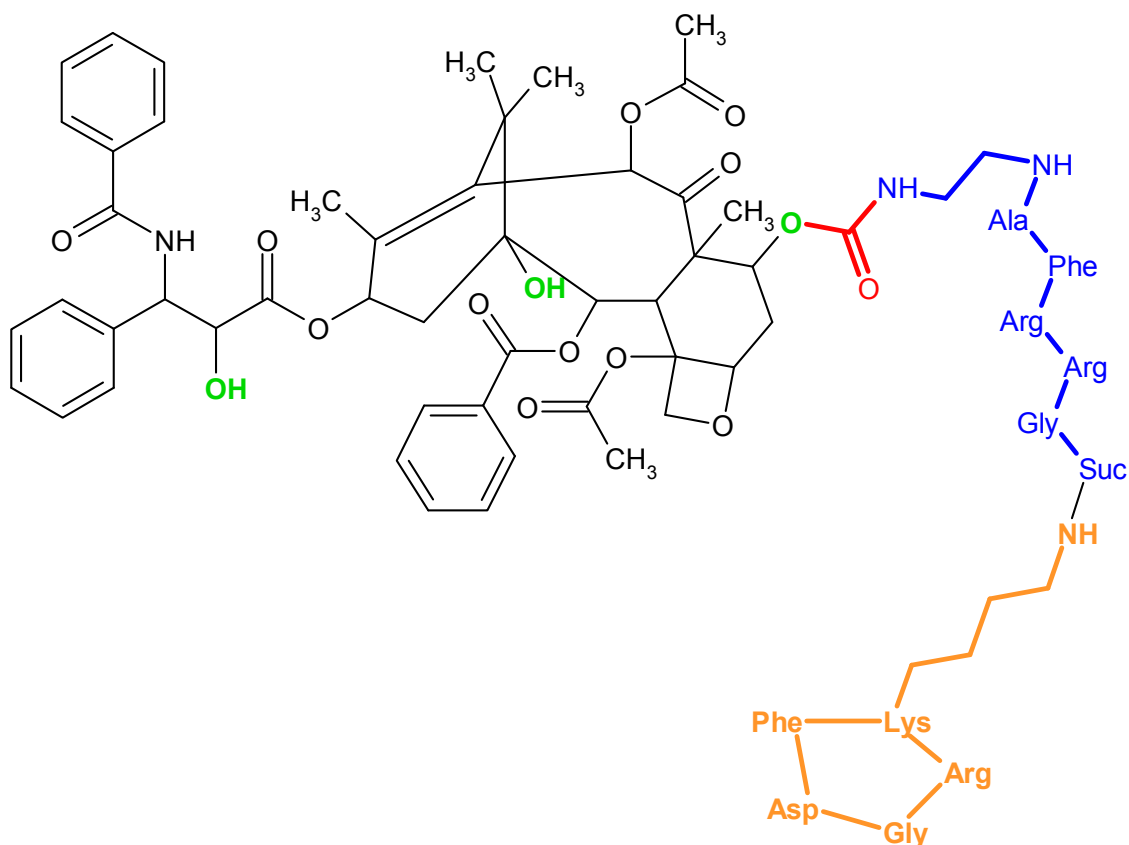


Figura 14: Struttura chimica del coniugato peptidico del paclitaxel: in colore arancione è evidenziato il dominio di indirizzamento (cRGD), in colore blu il dominio di taglio proteolitico e in colore nero il paclitaxel.

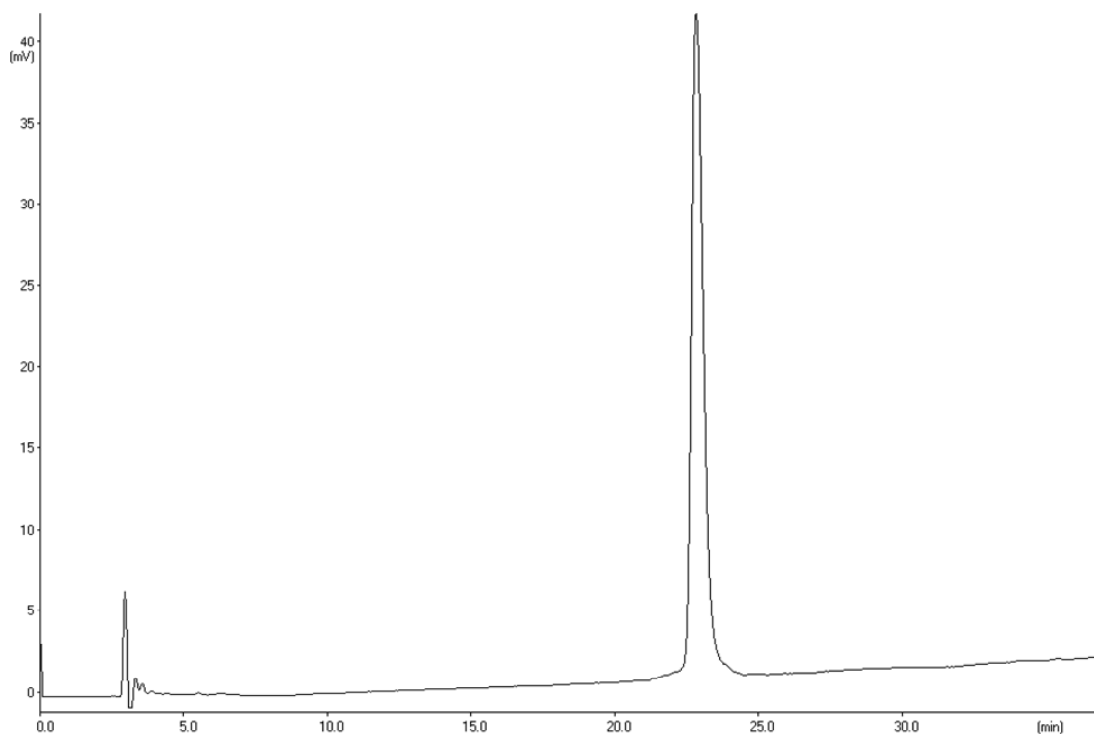


Figura 15: Cromatogramma relativo alla purificazione del coniugato peptidico finale del paclitaxel.

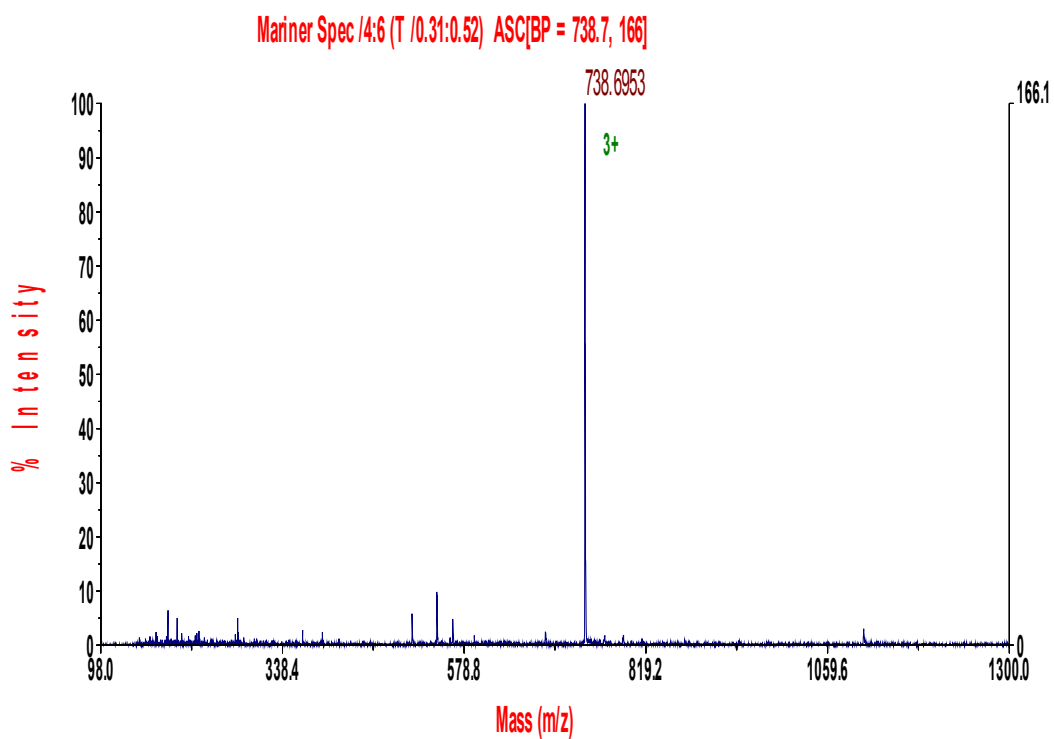


Figura 16: Spettro ESI-MS del coniugato peptidico del paclitaxel.

2.1.4. Saggi biologici

Suscettibilità del profarmaco al taglio proteolitico da parte della catepsina B

Una soluzione del coniugato peptidico del paclitaxel (concentrazione finale: 200 μ M) in DMSO è stata diluita in tampone fosfato 20 mM pH 7.4, Cisteina 20 mM, acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) 10 mM. Alla soluzione è stata aggiunta una soluzione di catepsina B alla concentrazione finale di 0.85 μ M. Aliquote della miscela di reazione sono state prelevate a determinati intervalli di tempo (5, 10 e 20 min), diluite con una soluzione di acido fosforico (H_3PO_4) al 5% in H_2O e quindi analizzate tramite RP-HPLC analitica. La separazione cromatografica è stata condotta utilizzando una colonna Vydac C18 10 μ m, 4.6x250 mm. La fase mobile utilizzata era costituita da 0.05% TFA in H_2O (solvente A) e da 0.05% TFA in CH_3CN/H_2O 9:1 (v/v) (solvente B). Il programma di eluizione adottato prevedeva una fase di eluizione isocratica per 5 min al 35% di B, un gradiente lineare dal 35% al 50% di B in 30 min, un gradiente lineare dal 50% al 90% in 1 min, un'eluizione isocratica per 1 min al 90% e un gradiente lineare dal 90% al 35% di B in 1 min; flusso 1 mL/min. Il rivelatore UV-visibile era impostato alla lunghezza d'onda di 227 nm.

Per controllo, è stata verificata l'azione della catepsina B anche nei confronti del peptide RGD ciclico, secondo le stesse modalità sopra descritte.

Isolamento della frazione lisosomiale di fegato di ratto

Le frazioni lisosomiali sono state preparate mediante centrifugazione differenziale a partire dal fegato prelevato da un ratto maschio adulto del ceppo Wistar (Charles River Italia S.p.A., Calco, LC) seguendo il protocollo di Schroter et al. (1999).

Tutti gli utensili e le soluzioni utilizzate per l'omogeneizzazione dei tessuti e per l'isolamento della frazione lisosomiale sono stati mantenuti in ghiaccio. Una volta prelevato, il fegato è stato lavato abbondantemente con un tampone acquoso TRIS (10 mM)/Saccarosio (250 mM) a pH 7 per allontanare completamente il sangue in esso contenuto. Il fegato è stato quindi tagliato in piccoli frammenti e omogeneizzato utilizzando un omogeneizzatore per tessuti tipo Potter-Elvehjem, in un volume di tampone pari ad 1 mL per ogni grammo di tessuto.

L'omogenato è stato centrifugato a 2000g per 2 minuti. Il supernatante è stato recuperato e trasferito in un nuovo tubo, il precipitato ottenuto, invece è stato risospeso in pari volume di tampone e centrifugato nuovamente a 2000g per 2 minuti. Il supernatante così ottenuto è stato

recuperato e aggiunto a quello precedentemente conservato. I supernatanti riuniti sono stati centrifugati a 4000g per 2 minuti. Il supernatante è stato recuperato e trasferito in un nuovo tubo, il precipitato ottenuto, invece è stato risospeso in pari volume di tampone e centrifugato nuovamente a 4000g per 2 minuti. Il supernatante così ottenuto è stato recuperato e aggiunto a quello precedentemente conservato. Successivamente il supernatante è stato centrifugato a 100.000g per 2 minuti. Il supernatante ottenuto è stato eliminato, mentre il precipitato, contenente mitocondri e lisosomi/endosomi, è stato risospeso in 5 volumi di H₂O e lasciato riposare in ghiaccio per 10 min, prima di effettuare una nuova centrifugazione a 100.000g per 2 minuti. Questa centrifugazione ha permesso di ottenere un supernatante (frazione lisosomiale) sul quale è stato dosato il contenuto totale di proteine mediante il metodo dell'acido bicinconinico (Smith et al. 1985), utilizzando, quale *standard* per la costruzione della relativa curva di calibrazione, dell'albumina bovina.

Effetto dei lisosomi di fegato di ratto sul coniugato peptidico del paclitaxel

Il coniugato peptidico del paclitaxel (concentrazione finale 100 µM) è stato incubato in un tampone costituito da acetato di sodio (50 mM finale)/cisteina (5 mM finale)/EDTA (1 mM finale) in assenza (controllo) o in presenza della frazione lisosomiale di fegato di ratto (0,45 mg/mL). Aliquote dell'incubato (60 µL) sono state raccolte a diversi intervalli di tempo (1, 2, 4, e 6 ore) e sono state aggiunte a 120 µL di 0.05% TFA in CH₃CN.

I campioni sono stati quindi centrifugati a 17000g per 5 min e i supernatanti ulteriormente purificati mediante centrifugazione (3000g per 4 min) su filtri di cellulosa rigenerata da 0.45 µm (Grace Division, Deerfield, IL, U.S.A.). I campioni così ottenuti sono stati analizzati mediante RP-HPLC analitica (vedi sotto).

Preparazione del plasma di uomo, ratto e topo

Il plasma di ratto, di topo e umano è stato ottenuto mediante centrifugazione a partire da sangue fresco eparinizzato. Ciascun campione è stato centrifugato a 1300g per 10 minuti a 4°C. Il plasma così ottenuto è stato conservato a -20°C fino al momento dell'utilizzo.

Prima dell'effettivo utilizzo nel corso degli esperimenti, il plasma è stato ulteriormente processato con una centrifugazione a 3000g per 2 minuti. Il supernatante ottenuto è stato diluito 1:2 con tampone fosfato PBS e mescolato per inversione della provetta al fine di evitare la formazione di schiuma.

Stabilità del coniugato peptidico del paclitaxel in plasma

Il coniugato del paclitaxel (concentrazione finale 100 μM) è stato incubato in plasma di ratto, di topo e umano diluiti 1:2 in PBS. Aliquote dell'incubato (60 μL) sono state raccolte a determinati intervalli di tempo (1, 2, 4 e 6 h) e sono state aggiunte a 120 μL di 0.05% TFA in CH_3CN . Campioni di controllo sono stati ottenuti incubando il coniugato del paclitaxel in solo PBS.

I campioni sono stati quindi centrifugati a 17000g per 5 min e i supernatanti ulteriormente purificati mediante centrifugazione (3000g per 4 min) su filtri di cellulosa rigenerata da 0,45 μm (Grace Division, Deerfield, LI, U.S.A.). I campioni così ottenuti sono stati analizzati mediante RP-HPLC analitica (v.sotto).

Analisi HPLC dei campioni

L'apparecchiatura utilizzata consisteva in un sistema per cromatografia in fase liquida ad elevate prestazioni HP1100 (Hewlett Packard, USA) costituito da una pompa quaternaria, un sistema di degasaggio dei solventi, un campionatore automatico, un comparto colonna termostato, un rivelatore spettrofotometrico UV-visibile a lunghezza d'onda variabile ed un Personal Computer interfacciato che permetteva, con l'ausilio di un software apposito (ChemStation for LC, Hewlett-Packard, USA), sia il controllo della strumentazione sia l'acquisizione e l'elaborazione dei segnali. La separazione cromatografica è stata condotta utilizzando una colonna Agilent Zorbax C18 (5 μm , 4,6 x 250 mm; Agilent Technologies; Palo Alto, CA, USA). La fase mobile utilizzata era costituita da 0.05% TFA in H_2O (solvente A) e da 0.05% TFA in $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 9:1 (v/v) (solvente B). Il programma di eluizione adottato prevedeva una fase di eluizione isocratica per 3 min al 35% di B, un gradiente lineare dal 35% al 50% di B in 30 minuti e un gradiente dal 50% al 90% di B in 5 minuti, post run di 8 min; flusso 0,8 mL/min. L'eluizione è stata condotta alla temperatura costante di 30°. Il rivelatore UV-visibile era impostato alla lunghezza d'onda di 227 nm. In queste condizioni cromatografiche i tempi di ritenzione per il coniugato e per il paclitaxel erano rispettivamente di 25.5 e 38.6 minuti.

Tutte le frazioni corrispondenti ai nuovi picchi che si presentavano nei cromatogrammi sono state raccolte, liofilizzate e analizzate mediante spettrometria di massa.

Saggi di adesione cellulare

Piastre per colture cellulari da 96 pozzetti sono state rivestite con 0.5 μg /pozzetto di vitronectina a 4°C in PBS per una notte. I pozzetti sono stati successivamente bloccati con una soluzione di albumina bovina all'1% per 2 ore a 37°C e lavati con PBS per 2 volte.

Cellule di melanoma umano A375 sono state incubate in un terreno privo di siero in assenza (controllo) o in presenza di diverse concentrazioni (0.9-30 μM) di cRGDFK, di paclitaxel o di coniugato del paclitaxel per 15 min. Le cellule così trattate sono state quindi seminate (100.000 cellule/pozzetto) nei pozzetti precedentemente rivestiti con vitronectina (volume finale: 100 μL /pozzetto), come descritto sopra, e incubate per 1 ora a 37°C in atmosfera composta da 95% aria e 5% CO_2 . Al termine dell'incubazione le cellule non adese sono state rimosse mediante lavaggio dei pozzetti con PBS. Il numero di cellule adese alla vitronectina, è stato valutato attraverso il saggio dell'MTT con opportune modifiche (volume finale: 200 μL /pozzetto) (Quintieri et al. 2000). L'assorbanza a 540 nm è stata misurata entro un'ora dal termine dell'incubazione, tramite un lettore di piastre del tipo VICTORTM3 (Perkin Elmer, Waltham, MA). La percentuale di cellule sopravvissute è stata calcolata dai valori di assorbanza usando la seguente formula:

$$\frac{A_{\text{tested}} - A_{\text{blank}}}{A_{\text{untreated}} - A_{\text{blank}}} \times 100$$

dove A_{blank} si riferisce all'assorbanza dei pozzetti contenenti il solo terreno con MTT. Tutti i dati raccolti sono stati ottenuti da 3 esperimenti diversi eseguiti in duplicato.

Saggi di citotossicità

Cellule di melanoma umano A375 sono state seminate in piastre da 96 pozzetti (8.000 cellule/pozzetto) e incubate in assenza (controllo) o in presenza di diverse concentrazioni (0.6 nM-60 μM) di paclitaxel o di coniugato peptidico del paclitaxel per 72 ore (volume finale: 200 μL). La vitalità delle cellule è stata valutata mediante il saggio dell'MTT (volume finale: 200 μL /pozzetto) (Quintieri et al. 2000). L'assorbanza a 540 nm è stata misurata tramite un lettore di piastre del tipo VICTORTM3 (Perkin Elmer, Waltham, MA). La percentuale di cellule sopravvissute è stata calcolata dai valori di assorbanza usando la seguente formula:

$$\frac{A_{\text{tested}} - A_{\text{blank}}}{A_{\text{untreated}} - A_{\text{blank}}} \times 100$$

dove A_{blank} si riferisce all'assorbanza dei pozzetti contenenti il solo terreno con MTT. Tutti i dati raccolti sono stati ottenuti da 3 esperimenti diversi eseguiti in duplicato.

2.2. Valutazione biologica di derivati del 4-mercaptofenolo quali potenziali agenti bifunzionali

2.2.1. Reagenti chimici e solventi

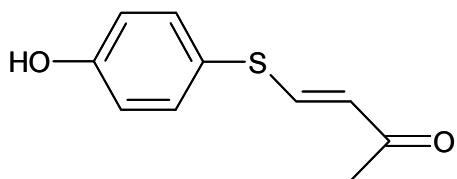
I prodotti utilizzati per questo studio costituiti dagli isomeri *E* (trans) e *Z* (cis) del 4-[(4-idrossifenil)-sulfanil]-3-buten-2-one (composti **1** e **2**), dall'acido 3-[(4-idrossifenil)sulfanil]-propanoico, dall'acido 3-[(4-idrossifenil)sulfanil]-acetico, dall'acido 3-[(4-idrossifenil)sulfanil]-metil acetato (composti **3-5**, rispettivamente) e dal 4,4'-diidrossidifenildisulfide (composto **6**) (**Fig. 17**) sono stati sintetizzati e purificati nel laboratorio del Dott. P. Ruzza (C.N.R., Istituto di Chimica Biomolecolare, sezione di Padova).

Il 4-idrossianisolo (4-HA), composto di riferimento per questi studi, è stato acquistato dalla Sigma Aldrich S.r.l. (Milano, Italia).

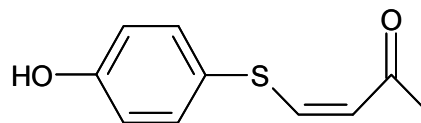
Di tutti i composti sono state preparate soluzioni in CH₃CN conservate a -20°C e al riparo dalla luce fino al momento dell'utilizzo.

Tutti gli altri reagenti sono stati ottenuti dalla Sigma-Aldrich S.r.l. (Milano, Italia).

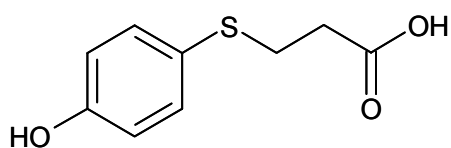
L'acqua ultra-pura è stata ottenuta mediante un apparecchio PureLab Option-Q (Elga LabWater, High Wycombe, UK).



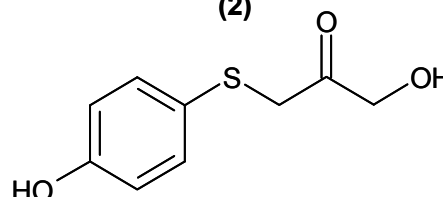
(3E)-4-[(4-idrossifenil)-sulfanil]-3-buten-2-one
(1)



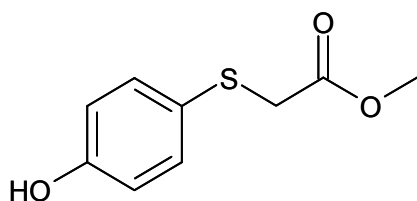
(3Z)-4-[(4-idrossifenil)-sulfanil]-3-buten-2-one
(2)



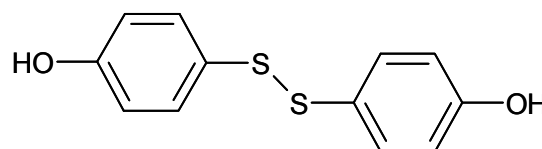
Acido 3-[(4-idrossifenil)sulfanil]-propanoico
(3)



Acido 3-[(4-idrossifenil)sulfanil]-acetico
(4)



Acido 3-[(4-idrossifenil)sulfanil]-metil acetato
(5)



4,4'-diidrossidifenildisulfide
(6)

Figura 17: Strutture chimiche dei nuovi composti studiati quali agenti bifunzionali.

2.2.2. Esperimenti biochimici

Ossidazione tirosinasi-mediata dei composti

L'ossidazione dei composti da parte dell'enzima tirosinasi (tirosinasi di fungo, Sigma Aldrich) è stata valutata mediante spettroscopia usando uno spettrofotometro UV-visibile Shimadzu UV-2501 e delle cuvette per analisi UV a doppia camera (2 x 4,375 mm, Helma, Mülheim, Germany). Le due camere della cuvetta erano riempite rispettivamente con 1 mL di una soluzione di tirosinasi in tampone fosfato 50 mM a pH 6.8 (concentrazione finale: 206 Unità/mL) e con 1 mL di tampone fosfato 50 mM a pH 6.8 contenente una soluzione del composto da testare (concentrazione finale del composto: 100 μ M) sciolto in dimetilsolfossido (DMSO; concentrazione finale 1%).

Un primo spettro di base da 500 nm a 200 nm è stato acquisito prima del mescolamento per inversione dei vari componenti, poi, successivamente al mescolamento del contenuto delle due camere della cuvetta, sono stati acquisiti diversi spettri della reazione a diversi intervalli di tempo (da 5 a 50 min). In queste condizioni si è osservata la comparsa di una caratteristica banda a 460 nm o a 490 nm nel caso del 4.4'-diidrossidifenildisulfide, caratteristica della formazione dell'*o*-chinone.

Studi cinetici dell'ossidazione tirosinasi-mediata dei composti in esame

Gli studi cinetici per la formazione tirosinasi-mediata del corrispondente *o*-chinone a partire dai composti in esame sono stati effettuati mediante metodo spettrofotometrico valutando la formazione e l'aumento dell'intensità della banda corrispondente all'*o*-chinone a 460 nm o 490 nm (vedi sopra). In questi esperimenti, l'enzima, sciolto in un tampone fosfato 50 mM a pH 6.8, è stato aggiunto in concentrazione finale costante di 154 nM a soluzioni contenenti concentrazioni crescenti (da 10 μ M a 60 μ M, n=6) dei vari composti da testare. Le variazioni di assorbanza delle miscele di reazione sono state monitorate per 20 minuti a temperatura ambiente e si è visto come l'andamento dell'assorbanza mostrava un'iniziale "lag-phase" seguita da un rapido aumento dell'assorbanza. Quindi, al fine di valutare la velocità iniziale della reazione tirosinasi-mediata, sono state considerate solo le parti lineari delle curve. I valori di Δ_{Abs}/min sono stati trasformati in concentrazione di substrato ossidato utilizzando i coefficienti di estinzione molare calcolati per ciascun composto (vedi paragrafo: "Calcolo del coefficiente di estinzione molare"). La concentrazione dell'enzima è stata determinata usando il metodo spettrofotometrico di Bradford (1976).

I dati di velocità iniziale sono stati analizzati utilizzando le equazioni di Michaelis-Menten a uno e a due siti (eq. 1 e eq. 2, rispettivamente):

$$v=V_{\max}[S]/(K_m+[S]) \quad (1)$$

$$v=V_{\max 1}[S]/(K_{m1}+[S]) + V_{\max 2}[S]/(K_{m2}+[S]) \quad (2)$$

La scelta dell'equazione più adatta da impiegare è stata effettuata mediante l'utilizzo del modello statistico F test.

I parametri cinetici calcolati sono stati: il valore di V_{\max} (velocità massima di reazione), il valore di K_m (concentrazione alla quale la velocità risulta pari a $V_{\max}/2$), il rapporto $V_{\max}/[\text{enzima}]$ (definito come k_{cat}) e il rapporto k_{cat}/K_m (definito come efficienza catalitica).

Tutti i parametri sono stati determinati mediante analisi di regressione non lineare utilizzando il software GraphPad Prism 3.03 (GraphPad Inc., San Diego, CA, USA).

Calcolo del coefficiente di estinzione molare

Per calcolare il coefficiente di estinzione molare (ϵ) dei prodotti di ossidazione, per ogni composto da testare è stata preparato un campione contenente il composto ad una concentrazione finale di 25 μM e la tirosinasi ad una concentrazione finale di 103 Unità/mL in tampone fosfato 50 mM a pH 6.8.

Per ogni substrato, è stata condotta un'analisi spettrofotometrica UV-Vis e un'analisi mediante RP-HPLC della soluzione prima e dopo il mescolamento dei reagenti. Integrando i picchi cromatografici si è potuta ricavare la quantità di substrato che era stata ossidata ad *o*-chinone, mentre dagli spettri UV-Vis si è ottenuto il valore di assorbanza della miscela di reazione alla lunghezza d'onda del massimo di assorbimento dei diversi *o*-chinoni. Presumendo che tutto il substrato scomparso si fosse trasformato nel corrispondente *o*-chinone e conoscendo l'assorbanza alla λ_{\max} del chinone, oltre alla quantità di reagente consumato, tramite la legge di Lambert-Beer ($A = \epsilon l C$) è stato possibile calcolare il valore di ϵ , che è stato poi utilizzato per calcolare i parametri cinetici della reazione.

Isolamento della frazione citosolica di fegato di ratto

Le frazioni citosoliche sono state preparate mediante centrifugazione differenziale a partire dal fegato prelevato da un ratto maschio adulto del ceppo Wistar (Charles River Italia S.p.A., Calco, LC) seguendo il protocollo descritto da Pearce et al (1996).

Tutti gli utensili e le soluzioni utilizzate per l'omogeneizzazione del tessuto e l'isolamento della frazione citosolica sono stati mantenuti in ghiaccio. Una volta prelevato, il fegato è stato lavato abbondantemente con una soluzione acquosa di KCl (150 mM)/EDTA (2 mM)/TRIS (50 mM) a pH 7.4 per allontanare completamente il sangue in esso contenuto. Una porzione è stata sminuzzata, aggiunta di due volumi (p/v) di KCl (150 mM) / EDTA (2 mM) / TRIS (50 mM, pH 7.4) ed omogeneizzata utilizzando un omogeneizzatore per tessuti tipo Potter-

Elvehjem. L'omogenato è stato successivamente centrifugato a 12000g per 20 minuti a 4°C ed il relativo precipitato eliminato; il supernatante è stato centrifugato per 60 minuti a 105000g (4°C). Questa centrifugazione ha permesso di ottenere un supernatante (frazione citosolica) il quale è stato successivamente caratterizzato per il contenuto totale di proteine mediante il metodo dell'acido bicinconinico (Smith et al. 1985), utilizzando, quale *standard* per la costruzione della relativa curva di calibrazione, dell'albumina bovina (Sigma Aldrich). La frazione citosolica ottenuta (denominata "citosol" di fegato) è stata quindi diluita con KCl (150 mM) / EDTA (2 mM) / TRIS (50mM, pH 7.4) fino ad una concentrazione finale di 10 mg proteine/ml e conservata a -80°C sino al momento dell'uso.

Reattività dei composti nei confronti del GSH in assenza e in presenza di GST

La reazione spontanea del GSH con i composti in esame è stata valutata incubando i composti stessi (concentrazione finale 50 µM) in KH₂PO₄ 0.1 M a diversi pH (pH 6.0, 7.4 e 8.0) per diversi intervalli di tempo (0, 10, 20, 40, 60, 120 minuti) in presenza di GSH (concentrazione finale: 1 mM). La reazione è stata condotta in un volume finale di 200 µL, in condizioni aerobiche, in bagno termostato a 37°C, e bloccata al tempo opportuno aggiungendo 20 µL di una soluzione acquosa di TFA al 10% a 4°C. I campioni definiti come "tempo 0" sono stati ottenuti aggiungendo il composto da studiare alla miscela di reazione già contenente TFA 10%.

La reazione GST-mediata del GSH con i due isomeri 4-[(4-idrossifenil)-sulfanil]-3-buten-2-one e del 4,4'-diidrossidifenildisulfide, invece, è stata valutata incubando i composti (concentrazione finale 100 µM) in KH₂PO₄ 0,1 M a pH 7.4 per diversi intervalli di tempo (0, 10, 20, 40, 60, 120 minuti) con GSH (concentrazione finale: 100 µM) in assenza e in presenza di citosol di fegato (1 mg proteina/mL) quale sorgente di GST. La reazione è stata condotta in un volume finale di 200 µL, in condizioni aerobiche, in bagno termostato a 37°C e bloccata al tempo opportuno aggiungendo 20 µL di una soluzione acquosa di TFA al 10% a 4°C. I campioni definiti come "tempo 0" sono stati ottenuti aggiungendo il composto da studiare alla miscela di reazione già contenente TFA 10%. Incubazioni di campioni di controllo sono state condotte con i composti da testare in assenza o in presenza di GSH e della frazione citosolica precedentemente bollita per 3 minuti al fine di denaturare le proteine mediante calore.

I campioni contenenti frazione citosolica di fegato di ratto sono stati quindi agitati mediante Vortex e centrifugati a 17000g per 5 minuti per allontanare la parte proteica denaturata. L'operazione di centrifugazione non si è resa necessaria nel caso dei campioni non

contenenti proteine citosoliche i quali sono stati direttamente analizzati dopo l'aggiunta del TFA 10%.

Aliquote (100 μ L) dei supernatanti di tutti i composti sopra descritti sono state, quindi, analizzate mediante cromatografia liquida ad elevate prestazioni (HPLC). L'interazione dei composti con il GSH è stata valutata, per ogni tempo di incubazione, mediante l'acquisizione del valore di area del picco del composto in esame e il confronto col valore di area del picco del composto stesso al "tempo 0". L'interazione, quindi, è stata espressa come percentuale dell'area del picco del composto rimasta al tempo analizzato (% dell'area del picco al "tempo 0").

Analisi HPLC

L'analisi dei supernatanti di incubazione è stata condotta mediante HPLC in fase inversa con rivelazione spettrofotometrica. L'apparecchiatura utilizzata consisteva in un sistema per cromatografia in fase liquida ad elevate prestazioni HP 1050 (Hewlett Packard, USA) costituito da una pompa quaternaria, un sistema di degasaggio dei solventi, un campionatore automatico, un comparto colonna termostato, un rivelatore spettrofotometrico UV-visibile a lunghezza d'onda variabile ed un Personal Computer interfacciato che permetteva, con l'ausilio di un *software* apposito (ChemStation for LC, Hewlett-Packard, USA), sia il controllo della strumentazione sia l'acquisizione e l'elaborazione dei segnali. La separazione cromatografica è stata condotta utilizzando una colonna Agilent Eclipse XDB-C8 (4,6 x 150 mm, 5 μ m; Agilent Technologies; Palo Alto, CA, USA). La fase mobile utilizzata era costituita da acqua (solvente A) e metanolo (solvente B). Il programma di eluizione adottato prevedeva una fase di eluizione isocratica con 35% del solvente B nei primi due minuti di corsa, seguita da un'eluizione in gradiente lineare dal 35% al 60% del solvente B nel corso dei successivi 13 minuti e da una successiva eluizione isocratica con 60% del solvente B per ulteriori 10 minuti. L'eluizione è stata condotta alla temperatura costante di 30°C e al flusso costante di 1 mL/min. Il rivelatore UV-visibile era impostato alla lunghezza d'onda di 310 nm.

I due isomeri del 4-[(4-idrossifenil)-sulfanil]-3-buten-2-one ed il 4,4'-diidrossidifenildisulfide sono stati inizialmente identificati nei campioni analizzati mediante il confronto con il tempo di ritenzione dei picchi osservati nei cromatogrammi ottenuti in seguito all'iniezione di soluzioni dei singoli composti puri in KH_2PO_4 0,1 M (pH 7,4). Nelle condizioni cromatografiche adottate i tempi di ritenzione dell'isomero Z, dell'isomero E e del 4,4'-diidrossidifenildisulfide erano rispettivamente 10.0, 13.2 e 23.0 minuti. L'identità dei picchi cromatografici è stata successivamente confermata grazie alla raccolta manuale delle

single frazioni cromatografiche e all'acquisizione dei rispettivi spettri di massa (vedi "acquisizione degli spettri di massa"). L'analisi HPLC delle miscele di incubazione degli isomeri con GSH ha evidenziato la presenza di un ulteriore picco con tempo di ritenzione pari a 1.9 minuti, anch'esso raccolto ed analizzato mediante spettrometria di massa.

Acquisizione degli spettri di massa

Le frazioni cromatografiche relative ai picchi con tempo di ritenzione 1.9, 13.2 e 23.0 minuti raccolte (n=5), sono state riunite e portate a secco con l'ausilio di un evaporatore rotante. I residui così ottenuti sono stati conservati a -80°C e successivamente solubilizzati in H₂O/CH₃CN (50:50) contenente l'1% di acido formico immediatamente prima dell'acquisizione degli spettri di massa.

Le analisi sono state eseguite dal Dott. D. Dalzoppo (Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Padova). Gli spettri di massa ESI-TOF (*Electrospray Ionization-Time of Fly*) sono stati registrati con uno spettrometro Mariner (PerSeptive Biosystem, USA), la cui taratura è stata effettuata usando uno *standard* esterno costituito da una soluzione 10 pmol/μL dei seguenti tre peptidi: angiotensina I, bradichinina e neurotensina in H₂O/CH₃CN (50:50) contenente l'1% di acido formico.

2.2.3. Saggi di citossicità

Reagenti

Le cellule di melanoma murino B16-F1 sono state ottenute dall'American Type Culture Collection.

I reagenti per le colture sono stati ottenuti dalla Gibco BRL (Paisley, Scotland) e l'enzima tripsina dalla Irvine Scientific (Santa Ana, CA, U.S.A.). Tutti gli altri reagenti sono stati ottenuti dalla Sigma-Aldrich S.r.l. (Milano).

I composti sono stati sciolti in una quantità di DMSO tale che la concentrazione finale del solvente nel terreno di incubazione non risultasse mai superiore all'1%.

Colture cellulari

Cellule di melanoma murino B16-F1 sono state fatte crescere in fiasche da 25 o 75 cm² (Falcon, Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ, U.S.A.) in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium phenol-red free*) con l'aggiunta di 5% siero bovino fetale inattivato, 2mM glutammina, 150 Unità/mL di streptomycina e 200 Unità/ml di penicillina ("terreno

completo”). Le cellule sono state mantenute a 37°C in atmosfera composta da 95% aria e 5% CO₂.

Valutazione in vitro della citotossicità dei composti

Le cellule sono state raccolte per tripsinizzazione con tripsina 0.25% in soluzione di Hank contenente 1 mM EDTA, contate con un emocitometro, sospese nel “terreno completo” e seminate (10⁴ cellule per pozzetto/100µL) in piastre da 96 pozzetti. Ventiquattro ore dopo la semina, sono stati aggiunti 100 µL di “terreno completo” contenenti concentrazioni crescenti dei composti testati e di 4-HA come sostanza di riferimento. Le cellule sono state quindi incubate per altre 48 ore. In alcuni esperimenti, le cellule sono state pre-incubate per 10 minuti in presenza di 5 mM N-acetilcisteina (NAC) o 200 µM 1-fenil-tiourea (PTU), prima dell’aggiunta del terreno contenente i composti. Al termine delle 48 ore di incubazione, la sopravvivenza cellulare è stata valutata attraverso il saggio dell’MTT con opportune modifiche come descritto in Quintieri et al (2000). L’assorbanza a 540 nm è stata misurata entro un’ora dal termine dell’incubazione tramite un lettore di piastre del tipo VICTORTM3 (Perkin Elmer, Waltham, MA). La percentuale di cellule sopravvissuta è stata calcolata dai valori di assorbanza usando la seguente formula:

$$\frac{A_{\text{tested}} - A_{\text{blank}}}{A_{\text{untreated}} - A_{\text{blank}}} \times 100$$

dove A_{blank} si riferisce all’assorbanza dei pozzetti contenenti il solo terreno con MTT.

Tutti i dati raccolti sono stati ottenuti da 3 esperimenti diversi eseguiti in duplicato. Il valore di IC₅₀ è stato calcolato tramite un’analisi di regressione non lineare della curva dose-risposta ottenuta, usando un modello di decadimento esponenziale a una fase mediante il software GraphPad Prism 3.03 (GraphPad Inc., San Diego, CA, USA).

2.3 Valutazione biologica di inibitori dell'enzima GSTP1-1

2.3.1. Reagenti chimici e solventi

Acetonitrile (CH_3CN), acido formico (HCOOH), acido perclorico (HClO_4), ammonio bicarbonato (NH_4HCO_3), bicarbonato di potassio (KHCO_3), cloruro di potassio (KCl), dimetilformamide (DMF), dimetilsulfossido (DMSO), etanolo (EtOH), metanolo (MeOH) e potassio fosfato monobasico (KH_2PO_4), tutti di grado ultra-puro per cromatografia liquida ad alte prestazioni in fase inversa (RP-HPLC), sono stati acquistati dalla Carlo Erba Reagenti (Milano, Italia).

L'acido etilendiamminotetraacetico (EDTA), l'albumina bovina, l'1-cloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), l'1-fluoro-2,4-dinitrobenzene (FDNB), il glutatione (GSH) e il TRIS sono stati ottenuti dalla Sigma-Aldrich S.r.l. (Milano, Italia).

L'enzima GSTP1-1, isolato da placenta umana, è stato acquistato dalla Sigma-Aldrich S.r.l. (Milano, Italia).

L'acqua ultra-pura è stata ottenuta mediante un apparecchio PureLab Option-Q (Elga LabWater, High Wycombe, UK).

I coloranti alizarina, alcannina e i suoi derivati acetilati (**Fig. 18**), sono stati gentilmente forniti dal Prof. G. Zagotto (Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Padova).

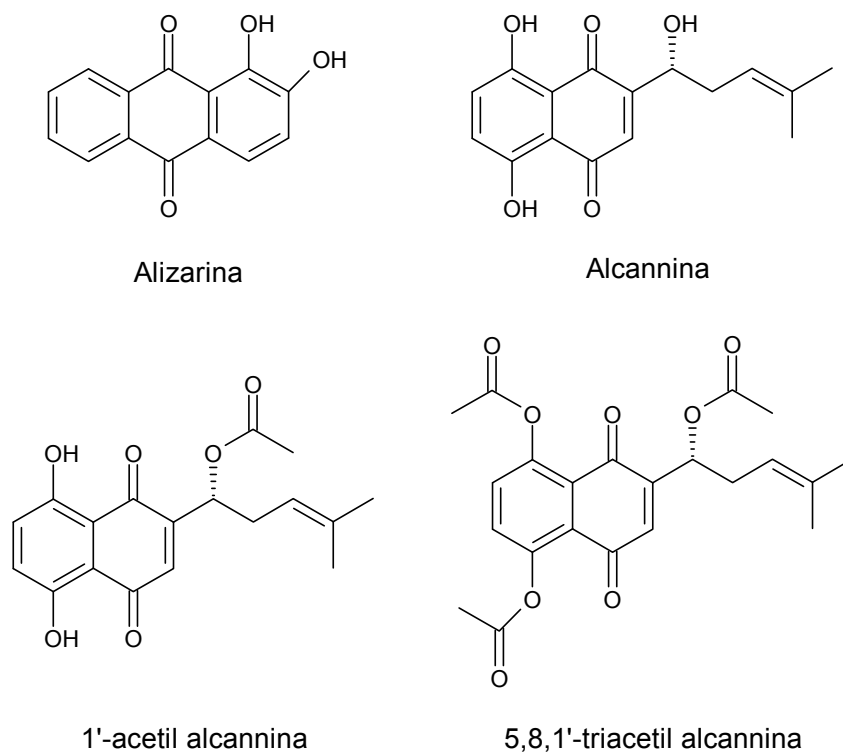


Figura 18: Struttura chimica dell'alizarina, dell'alcannina e dei suoi derivati acetilati.

2.3.2. Valutazione dell'attività glutatione-S-transferasi

L'attività glutatione-S-transferasica è stata determinata valutando la formazione di S-glutationil-2,4-dinitrobenzene (GS-DNB) a partire dai substrati 1-cloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) e GSH (Fig. 19) come descritto da Habig et al. (1974).

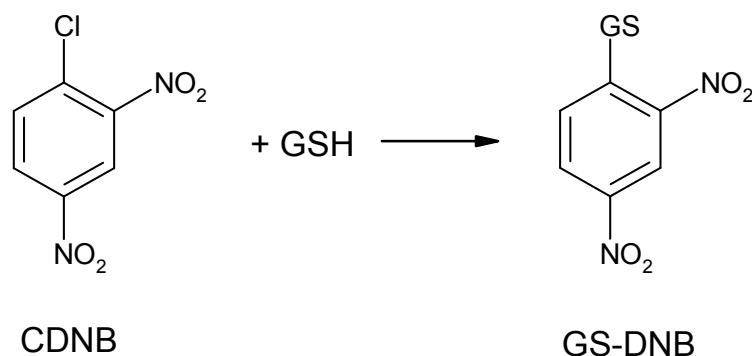


Figura 19: Schema della reazione di formazione di S-glutationil-2,4-dinitrobenzene (GS-DNB).

Determinazione dell'attività glutatione-S-transferasi nella frazione citosolica di fegato di ratto

In una prima serie di esperimenti, effettuati al fine di trovare le giuste condizioni di incubazione e separazione dei metaboliti della reazione, è stata utilizzata, quale sorgente di glutatione-S-transferasi (GST), una frazione citosolica isolata da fegato di ratto.

Isolamento della frazione citosolica di fegato di ratto

La frazione citosolica di fegato di ratto è stata preparata mediante centrifugazione differenziale a partire dal fegato prelevato da un ratto maschio adulto del ceppo Wistar (Charles River Italia S.p.A., Calco, LC) seguendo il protocollo descritto da Pearce et al (1996).

Tutti gli utensili e le soluzioni utilizzate per l'omogeneizzazione del tessuto e l'isolamento della frazione citosolica sono stati mantenuti in ghiaccio. Una volta prelevato, il fegato è stato lavato abbondantemente con una soluzione acquosa di KCl (150 mM) / EDTA (2 mM) / TRIS (50 mM) a pH 7.4 per allontanare completamente il sangue in esso contenuto. Una porzione è stata sminuzzata, aggiunta di due volumi (p/v) di KCl (150 mM) / EDTA (2 mM) / TRIS (50 mM, pH 7.4) ed omogeneizzata utilizzando un omogeneizzatore per tessuti tipo Potter-Elvehjem. L'omogenato è stato successivamente centrifugato a 12000g per 20 minuti a 4°C ed il relativo precipitato eliminato; il supernatante è stato centrifugato per 60 minuti a 105000g (4°C). Questa centrifugazione ha permesso di ottenere un supernatante (frazione

citosolica) sul quale è stato dosato il contenuto totale di proteine mediante il metodo dell'acido bicinconinico (Smith et al. 1985), utilizzando, quale *standard* per la costruzione della relativa curva di calibrazione, dell'albumina bovina. La frazione citosolica ottenuta è stata diluita con KCl (150 mM) / EDTA (2 mM) / TRIS (50mM, pH 7.4) fino ad una concentrazione finale di 10 mg proteine/ml e conservata a -80°C sino al momento dell'uso.

Condizioni di incubazione per la valutazione della attività glutatione-S-transferasica di frazioni di citosol di fegato di ratto

In una prima serie di esperimenti, i campioni contenenti il substrato CDNB (concentrazione finale: 1 mM) sono stati incubati a 37°C e in condizioni aerobiche, in un mezzo (200 μL finali) costituito da 0.1 M KH_2PO_4 a pH 6.5 e 1 mM GSH, in assenza e in presenza di diverse concentrazioni di proteine di citosol di fegato di ratto (concentrazioni finali: 0.01 mg/mL o 0.05 mg/mL o 0.1 mg/mL). A diversi intervalli di tempo (1, 2, 5 e 10 min) la reazione, fatta partire mediante l'aggiunta del GSH, è stata bloccata con l'aggiunta di 10 μL di una soluzione al 20% HClO_4 . I campioni sono stati quindi centrifugati per 10 minuti a 20000g a 4°C . I supernatanti così ottenuti sono stati analizzati mediante RP-HPLC, per determinare nelle miscele di incubazione la formazione del coniugato GS-DNB.

Per valutare la cinetica di formazione del GS-DNB in funzione della concentrazione di CDNB, campioni contenenti concentrazioni crescenti di CDNB (da 0.025 a 0.5 mM, $n=5$) sono stati incubati per 5 minuti a 37°C in un mezzo (200 μL finali) costituito da 0.1 M KH_2PO_4 a pH 6.5 e 1 mM GSH in assenza e in presenza di 0.01 mg/ml di proteine di citosol di fegato di ratto. Tutti i campioni sono stati processati come descritto sopra.

Infine, in un'altra serie di esperimenti, è stato valutato l'effetto di alcuni solventi organici sull'attività glutatione-S-transferasica della frazione citosolica di fegato di ratto. In questi esperimenti, il CDNB (0.05 mM) è stato incubato nello stesso mezzo di incubazione descritto sopra per 5 minuti a 37°C in presenza di 0.01 mg/mL di proteine, in assenza e in presenza di dimetilsolfossido o dimetilformammide o acetonitrile o metanolo o etanolo ad una concentrazione finale pari all'1%. Tutti i campioni sono stati quindi processati come descritto sopra.

Determinazione dell'attività glutatione-S-transferasica della GSTP1-1 isolata da placenta umana

Preparazione della soluzione di GSTP1-1 isolata da placenta umana

La GSTP1-1 isolata e purificata da placenta umana era fornita dalla ditta sotto forma di prodotto liofilizzato contenente 0.69 mg di proteina pari a 48 Unità (una Unità di GST è definita come la quantità di enzima in grado di coniugare con il GSH 1 μ mole di CDNB/min a pH 6.5 a 25°C). Al liofilizzato sono stati aggiunti 4.8 mL di una soluzione tampone costituita da 0.1 M KH_2PO_4 / 1 mM EDTA e 1 mM GSH (pH 6.5) in modo da ottenere una soluzione con una concentrazione finale di 10 Unità/mL (pari a 0.143 mg di proteina/mL). L'enzima è stato conservato a -20°C sino al momento dell'uso.

Condizioni di incubazione utilizzate per la valutazione della attività della GSTP1-1 isolata da placenta umana

In una prima serie di esperimenti, allo scopo di trovare le condizioni ottimali di incubazione sia per quanto riguardava il tempo di incubazione che la quantità di proteine da utilizzare nelle prove, campioni contenenti il CDNB (concentrazione finale: 1 mM) sono stati incubati a 37°C e in condizioni aerobiche in 200 μL finali del mezzo precedentemente descritto, in assenza e in presenza di GSTP1-1 ad una concentrazione finale di 0.01 o 0.1 Unità/mL (pari a 0.000143 mg/mL o 0.00143 mg/mL). A diversi intervalli di tempo (1, 2, 5 e 10 min) la reazione, fatta partire mediante l'aggiunta del GSH, è stata bloccata con l'aggiunta di 10 μL di una soluzione di HClO_4 al 20%. I campioni sono stati quindi processati come descritto sopra.

Una volta trovate le condizioni di linearità per la formazione del GS-DNB, è stata determinata la cinetica di formazione del metabolita da parte della GSTP1-1 umana in funzione della concentrazione di CDNB, utilizzando concentrazioni crescenti di CDNB (da 0.125 a 3 mM, $n=7$) che sono state incubate per 2 minuti a 37°C secondo le procedure sopra descritte. Tutti i campioni sono stati quindi processati come sopra descritto.

Determinazione mediante HPLC della formazione di GS-DNB nelle miscele di reazione

Sintesi chimica dell'S-glutationil-2,4 dinitrobenzene (GS-DNB)

Il GS-DNB è stato sintetizzato seguendo il protocollo descritto da Hinchman et al. (1991), con piccole modifiche. Pertanto, 3 mmoli di GSH sono state sciolte in una soluzione 1 N

KHCO_3 . In questo modo si favoriva la formazione dell'anione tiolato (GS^-) che nelle reazioni di coniugazione è la specie reattiva del GSH. A questa soluzione, mantenuta in agitazione, è stata aggiunta lentamente una quantità equimolare (cioè 3 mmoli) di 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene (FDNB) diluito in metanolo. La reazione è stata fatta procedere in agitazione e a temperatura ambiente per 10 minuti, dopo di che è stata acidificata fino a $\text{pH} \sim 2$ mediante aggiunte di acido cloridrico diluito. Il precipitato amorfo giallo formatosi è stato raccolto per filtrazione sotto vuoto e poi purificato per ri-cristallizzazione da H_2O bollente. Quest'ultima fase della sintesi, così come l'analisi elementare del prodotto, è stata eseguita presso il laboratorio del prof. G. Zagotto (Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Padova). Per valutare se le caratteristiche del prodotto da noi sintetizzato corrispondevano a quelle del composto sintetizzato precedentemente da Hinchman et al. (1991) è stata preparata una soluzione 1 mM in H_2O del coniugato GS-DNB, da cui, con successive diluizioni scalari, sono state preparate soluzioni a diversa concentrazione. Le soluzioni di coniugato GS-DNB alle concentrazioni finali di 0.05 mM e 0.025 mM sono state utilizzate per la valutazione del coefficiente di estinzione molare (ϵ). Le soluzioni sono state poste in cuvette di quarzo (con un cammino ottico di 1 cm) e la loro assorbanza è stata letta a 340 nm. In base alla legge di Lambert e Beer ($A = \epsilon l C$), dai valori di assorbanza ottenuti (che sono stati, rispettivamente, di 0.5462 e 0.2736 per le soluzioni 0.05 e 0.025 mM) è stato possibile calcolare un ϵ di $10.92 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e un ϵ di $10.94 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ rispettivamente per le due soluzioni. Tale valore è risultato effettivamente molto simile al valore di $10.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ riportato da Hinchman et al. (1991), confermando che il prodotto da noi sintetizzato era effettivamente il coniugato GS-DNB.

Di queste soluzioni è stato inoltre eseguito lo spettro di assorbimento a lunghezze d'onda variabili tra 200 e 800 nm in modo da determinare con esattezza la lunghezza d'onda del picco di massimo assorbimento della luce: tali spettri mostravano che il massimo di assorbimento del GS-DNB si colloca a 333 nm.

Analisi RP-HPLC per la rilevazione del GS-DNB

L'apparecchiatura utilizzata consisteva in un sistema per cromatografia in fase liquida ad elevate prestazioni HP 1050 (Hewlett Packard, USA) costituito da una pompa quaternaria, un sistema di degasaggio dei solventi, un campionatore automatico, un comparto colonna termostato, un rivelatore spettrofotometrico UV-visibile a lunghezza d'onda variabile ed un Personal Computer interfacciato che permetteva, con l'ausilio di un *software* apposito (ChemStation for LC, Hewlett-Packard, USA), sia il controllo della strumentazione sia

l'acquisizione e l'elaborazione dei segnali. La separazione cromatografica è stata condotta utilizzando una colonna Agilent Zorbax Rx-C18 (4,6x250 mm, Agilent Technologies; Palo Alto, CA, USA). La fase mobile utilizzata era costituita da 0,1% acido formico (HCOOH) in acqua/CH₃CN 80:20 (v/v) (solvente A) e CH₃CN (solvente B). Il programma di eluizione adottato prevedeva una fase di eluizione isocratica con 100% del solvente A nei primi due minuti di corsa, seguita da un'eluizione in gradiente lineare da 0% a 60% del solvente B nel corso dei successivi 8 minuti e da una successiva eluizione isocratica con 60% del solvente B fino a fine corsa. L'eluizione è stata condotta alla temperatura costante di 30°C e al flusso costante di 1 mL/min. Il rivelatore UV-visibile era impostato alla lunghezza d'onda di 333 nm. In queste condizioni cromatografiche i tempi di ritenzione per il coniugato GS-DNB e per il CDNB erano rispettivamente di 5.6 minuti e 11.2 minuti, mentre il GSH, data la sua elevata polarità, eluiva con il fronte del solvente.

La determinazione quantitativa del GS-DNB nei campioni analizzati è stata fatta integrando l'area del picco relativo al metabolita di interesse e risalendo alla sua concentrazione in base a rette di taratura ottenute preparando degli "standards" di calibrazione a concentrazioni note (0.2 - 0.5 - 1 - 2.5 e 5 nmoli GS-DNB) in un volume finale di 200 µL di un mezzo costituito da 0.1M KH₂PO₄ (pH 6.5) contenente 10 µL di 20% HClO₄. La **Fig. 20** sotto riportata è un esempio di retta di taratura così ottenuta.

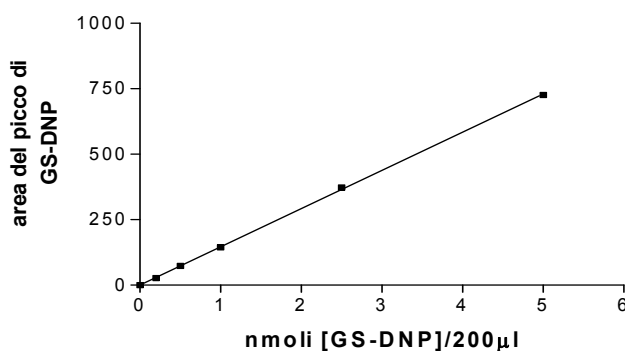


Figura 20: Esempio di retta di calibrazione per la quantificazione del GS-DNB ottenuta con concentrazioni note (0.2-5 nmoli/200 µL) del coniugato sintetizzato.

2.3.3. Valutazione dell'effetto di alizarina, alcannina, 1'-acetil alcannina e 5,8,1'-triacetil alcannina sull'attività della GSTP1-1

Condizioni di incubazione

Il CDNB (concentrazione finale: 0.5 mM) è stato incubato per 2 min a 37°C e in condizioni aerobiche, in un mezzo (200 µL finali) costituito da 0.1 M KH₂PO₄ (pH=6.5), 1 mM

EDTA, 1 mM GSH e 0.00143 mg/mL di GSTP1-1 isolata da placenta umana, in assenza (controllo) e in presenza di concentrazioni crescenti (1-100 μ M, n=6) di alizarina, di alcannina, di 1'-acetil alcannina o di 5,8,1'-triacetil alcannina. Il mezzo di reazione conteneva l'1% di DMSO, solvente scelto per la dissoluzione dei tre composti. La reazione è stata bloccata con l'aggiunta di 10 μ L di una soluzione di HClO₄ al 20%. I campioni sono stati quindi processati come descritto sopra e analizzati mediante RP-HPLC.

Valutazione della reattività dell'alcannina nei confronti del GSH

A campioni del volume di 100 μ L contenenti 0.5 mM di alcannina in MeOH è stato aggiunto un pari volume di una soluzione di GSH 5 mM in ammonio bicarbonato (NH₄HCO₃) 0.1M (pH=7.7). Ciascun campione è stato incubato a 37°C per 1, 2, 5 e 10 min sotto agitazione e successivamente analizzato mediante RP-HPLC secondo il metodo descritto al punto sopra previa acidificazione con 10 μ L di HCOOH.

Il picco corrispondente al coniugato alcannina-GSH è stato raccolto, liofilizzato e analizzato mediante spettrometria di massa.

2.3.4. Analisi di spettrometria di massa con ionizzazione ad elettrospray (ESI-MS)

Gli spettri di massa sono stati registrati con uno spettrometro di massa PerSeptive Biosystem (Farmingham, MA). La taratura è stata effettuata usando uno standard esterno costituito da una soluzione 1 pmol/ μ L dei seguenti tre peptidi: angiotensina I, bradichinina e neurotensina, in 1:1 v/v acqua/acetonitrile in presenza di 1% di acido acetico (AcOH). L'analisi è stata effettuata dal Dott. D. Dalzoppo (Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Padova).

2.3.5. Analisi dei dati

Tutti i dati sono stati analizzati mediante il software GraphPad Prism, versione 3.03 (GraphPad Software INC., San Diego, CA, USA).

I dati della velocità di formazione del prodotto GS-DNB, da parte della frazione citosolica di fegato di ratto e da parte della GSTP1-1 di placenta umana, sono stati analizzati utilizzando l'equazione di Michaelis-Menten a un sito:

$$v = V_{\max}[S] / (K_m + [S])$$

I parametri cinetici ottenuti sono stati la V_{\max} , cioè la velocità massima della reazione, e la K_m , cioè la concentrazione di substrato a cui la velocità è uguale a $V_{\max}/2$.

2.3.6. Saggi di citotossicità

Cellule di melanoma umano A375 sono state seminate in piastre da 96 pozzetti (8,000 cellule/pozzetto) e incubate in assenza (controllo) o in presenza di diverse concentrazioni (0,03 nM-100 μ M) di alcannina o di 1'-acetil alcannina o di 5,8,1'-triacetil alcannina per 72 ore (volume finale: 200 μ L). La vitalità delle cellule è stata valutata mediante il saggio dell'MTT (Quintieri et al 2000). L'assorbanza a 540 nm è stata misurata tramite un lettore di piastre del tipo VICTOR™3 (Perkin Elmer, Waltham, MA). La percentuale di cellule sopravvissute è stata calcolata dai valori di assorbanza usando la seguente formula:

$$\frac{A_{\text{tested}} - A_{\text{blank}}}{A_{\text{untreated}} - A_{\text{blank}}} \times 100$$

dove A_{blank} si riferisce all'assorbanza dei pozzetti contenenti il solo terreno con MTT. Tutti i dati raccolti sono stati ottenuti da 3 esperimenti diversi eseguiti in duplicato.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1. Coniugato peptidico del paclitaxel

Una prima parte del mio periodo di tirocinio è stata impegnata nella sintesi del coniugato peptidico del paclitaxel, che è stata descritta nella sezione “Materiali e Metodi” (Fig. 21). Il

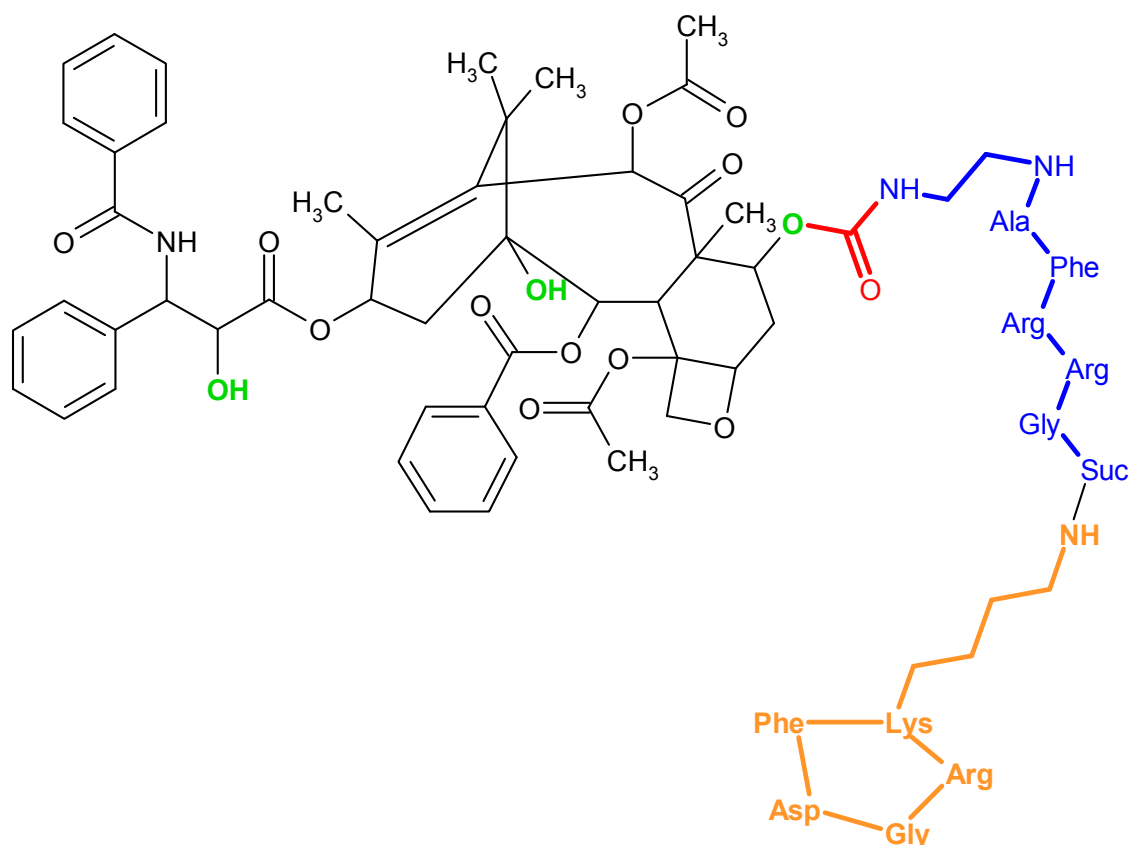


Figura 21: Struttura chimica del coniugato peptidico del paclitaxel: in colore arancione è evidenziato il dominio di indirizzamento (cRGD), in colore blu il dominio di taglio proteolitico e in colore nero il paclitaxel.

coniugato così ottenuto è stato quindi sottoposto ad una serie di valutazioni biologiche al fine di comprendere se fosse effettivamente in grado di rispondere alle esigenze per le quali era stato progettato. In primo luogo ne è stata valutata la capacità di legame all'integrina $\alpha_v\beta_3$, grazie al dominio contenente la sequenza peptidica RGD; ciò era requisito fondamentale per dimostrarne la capacità di indirizzare il profarmaco specificatamente all'interno della massa neoplastica. Successivamente è stata valutata anche la citotossicità del composto *in vitro* verso colture di cellule di melanoma umano, la suscettibilità al taglio proteolitico da parte dell'enzima catepsina B e di enzimi lisosomiali e, infine, la sua stabilità nel plasma umano.

3.1.1. Valutazione del legame del profarmaco all'integrina $\alpha_V\beta_3$

L'integrina $\alpha_V\beta_3$ mostra una specificità di legame verso molte proteine della matrice extracellulare contenenti la sequenza tripeptidica RGD (sequenza per la quale ha un'alta affinità di legame), come ad esempio la vitronectina. Quindi per valutare la capacità del nostro profarmaco di legarsi all'integrina $\alpha_V\beta_3$, cellule di melanoma umano A375 sono state incubate in presenza di concentrazioni crescenti del coniugato peptidico del paclitaxel oppure in presenza di paclitaxel libero o di RGD ciclico libero (privo del farmaco legato) come controlli. Le cellule sono state poi seminate in pozzetti rivestiti di vitronectina umana. Nel caso in cui il nostro profarmaco avesse mantenuto la capacità conferitagli dal dominio RGD ciclico di legarsi alla proteina di superficie integrina $\alpha_V\beta_3$, ci si aspettava che le cellule avrebbero perso la capacità di legarsi alla vitronectina, in quanto avrebbero presentato il sito di legame già occupato. I risultati ottenuti, graficati in **Fig. 22**, dimostrano come il profarmaco sia in grado di inibire completamente, e in maniera concentrazione-dipendente, l'adesione delle cellule neoplastiche alla vitronectina, in modo assolutamente sovrapponibile a quanto fatto dal solo RGD ciclico libero. Il paclitaxel libero, invece, come atteso, non si mostra in nessun modo in grado di interferire nell'adesione tra la vitronectina e le cellule di melanoma. Questi risultati dimostrano che: 1) la coniugazione del paclitaxel all'RGD ciclico non modifica in alcuna maniera l'affinità dell'RGD stesso per l'integrina; 2) il profarmaco è potenzialmente capace di raggiungere specificatamente la massa neoplastica, in quanto in grado di legarsi all'integrina $\alpha_V\beta_3$.

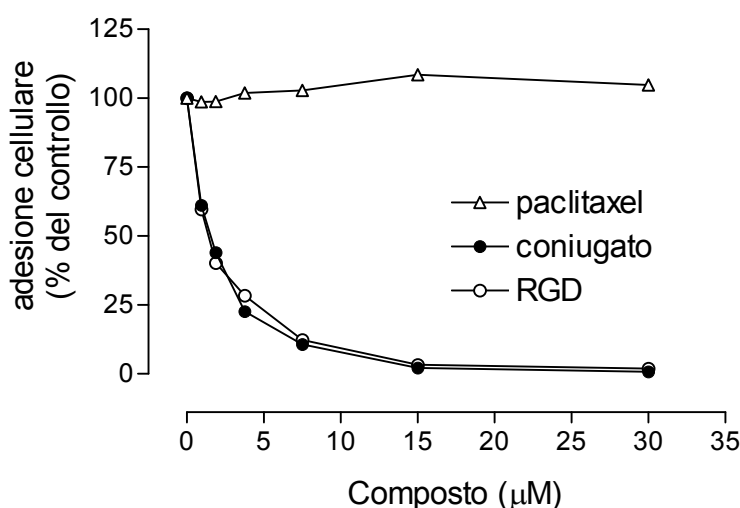


Figura 22: Effetto del profarmaco sulla capacità di adesione delle cellule di melanoma umano A375 alla vitronectina Cellule di melanoma umano A375 sono state pre-incubate per 15 minuti in presenza del paclitaxel, coniugato peptidico del paclitaxel o del peptide RGD ciclico, poi sono state seminate in pozzetti rivestiti di vitronectina umana. Dopo 1 ora di incubazione le cellule legate alla vitronectina sono state quantificate mediante saggio dell'MTT. I risultati sono la media di due esperimenti svolti in duplicato. Dettagli sperimentali riportati nella sezione "Materiali e Metodi".

3.1.2. Citotossicità del profarmaco verso cellule di melanoma umano

La citotossicità del profarmaco è stata confrontata con quella del paclitaxel libero incubando cellule di melanoma umano A375 per 72 ore in presenza di concentrazioni crescenti del coniugato o del solo paclitaxel.

I risultati mostrati in **Fig. 23** indicano come il coniugato risulti completamente inattivo fino alla concentrazione di 6 μM e come, solo alla più alta concentrazione testata (100 μM), induca

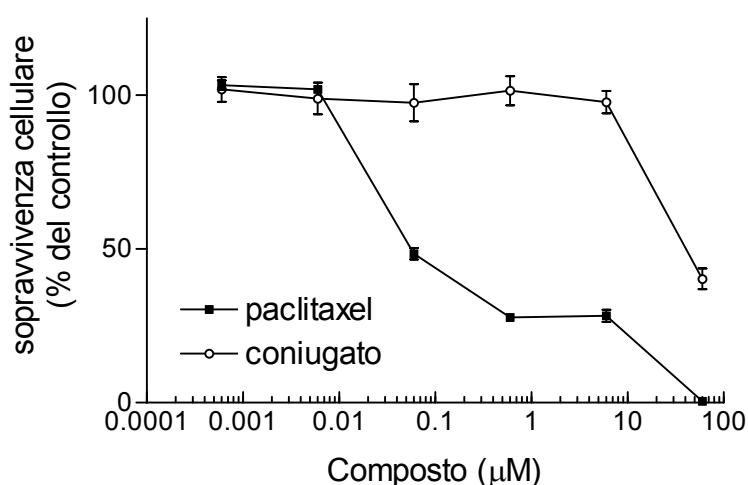


Figura 23: Effetto citotossico del coniugato peptidico del paclitaxel su cellule di melanoma umano A375 comparato con la citotossicità del paclitaxel libero. Cellule di melanoma umano A375 sono state incubate per 72 ore in presenza di concentrazioni crescenti (0.6 nM–60 μM) di paclitaxel libero o di coniugato peptidico del paclitaxel. La percentuale di cellule sopravvissute è stata valutata mediante saggio dell'MTT. I risultati sono medie \pm E.S. di tre esperimenti in duplicato.

una mortalità di circa il 60%. Il paclitaxel, invece, è molto più potente del farmaco coniugato in quanto una concentrazione circa mille volte inferiore (0,06 μM) è in grado di determinare una mortalità pari a circa il 60%. Le ipotesi che si possono fare per spiegare questi risultati potrebbero essere molteplici. Ma le più plausibili sembrano una scarsa penetrazione del coniugato all'interno delle cellule o, forse più verosimilmente, uno scarso rilascio del paclitaxel dal coniugato a seguito dell'eventuale taglio enzimatico da parte della catepsina B o di altre proteasi presenti a livello lisosomiale. Allo scopo di valutare quindi queste ipotesi, sono stati eseguiti esperimenti volti a determinare la suscettibilità del coniugato peptidico del paclitaxel al taglio proteolitico da parte della catepsina B.

3.1.3. Suscettibilità del profarmaco al taglio proteolitico da parte della catepsina B e di enzimi lisosomiali

Il profarmaco è stato incubato in presenza dell'enzima catepsina B e la soluzione di incubazione è stata analizzata a diversi intervalli di tempo mediante HPLC. Come mostrato in Fig. 24, la quantità di profarmaco presente nella miscela di reazione (valutata in base all'area del picco relativo al profarmaco, iniettato al "tempo 0") è andata via via

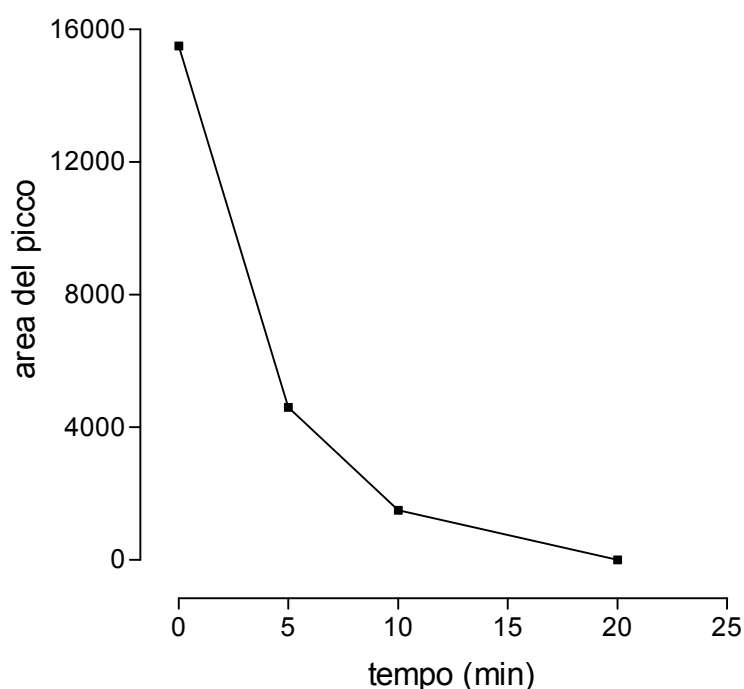


Figura 24: Sensibilità del profarmaco all'azione della catepsina B. Una soluzione di coniugato peptidico del paclitaxel (concentrazione finale 200 μM) è stata incubata in presenza di catepsina B (0,85 μM). A diversi intervalli di tempo (5, 10 e 20 min) è stata quantificata l'area relativo al picco del coniugato mediante analisi HPLC. I risultati sono la media di due esperimenti svolti in duplicato.

diminuendo col tempo, fino a scomparire totalmente dopo 20 minuti, indice del taglio operato dalla catepsina B.

Analogamente è stata valutata la liberazione del paclitaxel dal profarmaco da parte di enzimi ad azione proteolitica presenti in una frazione lisosomiale di fegato di ratto. Una soluzione del coniugato peptidico del paclitaxel è stata incubata a 37°C in presenza della frazione lisosomiale; dopo diversi tempi di incubazione, la miscela di reazione è stata analizzata mediante HPLC per valutare se il profarmaco fosse sensibile all'azione degli enzimi contenuti nella frazione lisosomiale. La diminuzione dell'area del picco relativo al coniugato e l'eventuale liberazione di paclitaxel libero erano indice di avvenuta liberazione del paclitaxel dal profarmaco stesso.

I risultati mostrati in **Fig. 25** evidenziano come il valore dell'area del picco corrispondente al coniugato diminuisca nel tempo, indice di un'attiva degradazione del profarmaco da parte degli enzimi lisosomiali. Tuttavia nemmeno dopo un lungo tempo di incubazione (>6 ore) è mai stata osservata la comparsa nei supernatanti delle miscele di reazione del picco corrispondente al paclitaxel libero. Tali risultati confermano quindi che lo scarso effetto citotossico del coniugato osservato sulle cellule di melanoma era dovuto molto probabilmente al mancato rilascio del farmaco attivo dal coniugato.

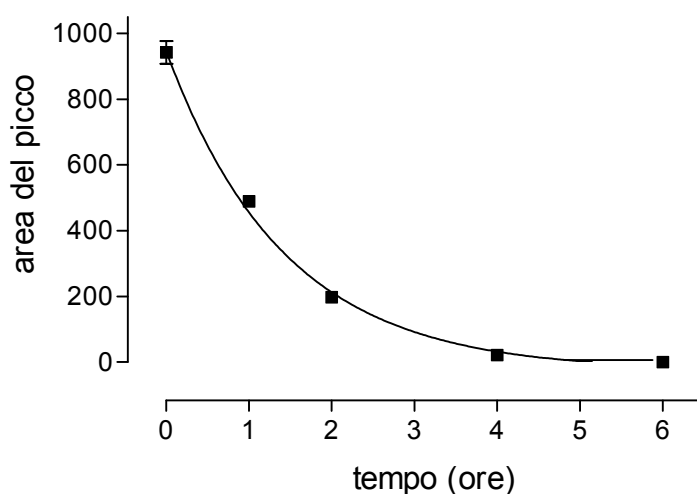


Figura 25: Sensibilità del profarmaco all'azione degli enzimi contenuti nella frazione lisosomiale di fegato di ratto. Una soluzione di coniugato peptidico del paclitaxel (concentrazione finale 100 μ M) è stata incubata in presenza di frazione lisosomiale di fegato di ratto (0,45 mg/mL). A diversi intervalli di tempo (1, 2, 4 e 6 ore) è stata quantificata l'area del picco del coniugato mediante analisi HPLC. I risultati sono la media di due esperimenti svolti in duplicato.

3.1.4. Valutazione della stabilità del coniugato peptidico del paclitaxel in plasma umano

Dopo aver dimostrato come il profarmaco era potenzialmente in grado di direzionarsi preferenzialmente verso le cellule tumorali, anche se dimostrava una minore tossicità rispetto al farmaco libero nei confronti delle cellule di melanoma, è stato necessario valutarne anche la stabilità nel plasma. Un profarmaco che risulti stabile e arrivi integro alla massa neoplastica può effettivamente offrire il vantaggio, rispetto al farmaco antitumorale, di una minore tossicità sistemica.

I risultati ottenuti incubando il coniugato peptidico del paclitaxel in plasma umano diluito 1:2 in PBS (**Fig. 26**), mostrano come dopo 6 ore di incubazione il 35% del profarmaco fosse stato idrolizzato. Sono state effettuate prova di stabilità anche in plasma di ratto e topo. Nel caso del plasma di ratto i risultati ottenuti erano molto simili a quelli osservati con il plasma

umano, viceversa, utilizzando plasma di topo l'idrolisi è risultata molto più marcata e più veloce (dati non mostrati).

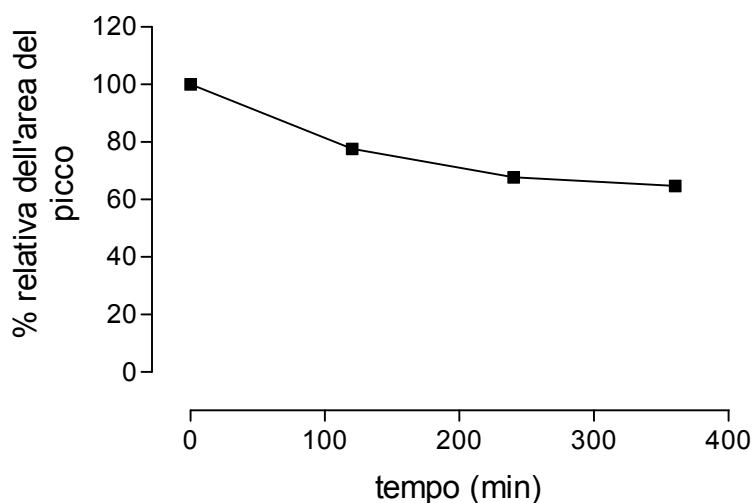


Figura 26: Valutazione della stabilità del coniugato peptidico del paclitaxel in plasma umano. Una soluzione di coniugato peptidico del paclitaxel (concentrazione finale 100 μ M) è stata incubata in plasma diluito 1:2 con PBS. A diversi intervalli di tempo (60, 120, 240 e 360 min) è stata quantificata mediante HPLC l'area del picco relativo al coniugato. I risultati sono la media di due esperimenti svolti in duplicato.

L'insieme dei risultati ottenuti ha indicato come il profarmaco progettato e sintetizzato, se da un lato era in grado di legare l'integrina $\alpha_v\beta_3$, dall'altro era poco stabile nel plasma e quindi inutilizzabile per un eventuale direzionamento del farmaco *in vivo* verso le cellule di melanoma. Oltre a ciò, i dati ottenuti dall'incubazione con catepsina B e/o con la frazione lisosomiale, supportati anche dagli studi *in vitro* sulle cellule, che hanno mostrato una scarsa citotossicità del composto, suggeriscono che il profarmaco necessita di alcune modifiche strutturali al fine di migliorare la possibilità che il paclitaxel venga da esso liberato una volta giunto a contatto con la cellula tumorale. Una prima modifica per migliorare la disponibilità del paclitaxel in sede tumorale, potrebbe essere rappresentata dalla costruzione di un nuovo profarmaco in cui il paclitaxel sia legato tramite uno spaziatore rappresentato dall'acido glutarico, o dall'acido succinico, alla catena laterale di un residuo di lisina facente parte della sequenza peptidica sensibile all'enzima catepsina B.

3.2. Derivati del 4-mercaptofenolo quali agenti bifunzionali

Come riportato nell'Introduzione, l'idea alla base dello sviluppo di questi agenti bifunzionali è la possibilità che essi agiscano da substrati per l'enzima tirosinasi con concomitante produzione di specie reattive per la cellula (*o*-chinoni) e che nel contempo, per la presenza di un gruppo altamente reattivo nei confronti del GSH (gruppo α,β insaturo), possano sottrarre GSH alla cellula, aumentando la possibilità di danno ossidativo svolto dagli *o*-chinoni. In una prima serie di esperimenti è stata quindi saggiata la capacità di 5 nuovi composti (cfr. **Fig. 17**) di fungere da substrati della tirosinasi.

3.2.1. Studi cinetici dell'ossidazione tirosinasi-mediata

Mediante spettroscopia UV-vis, è stata valutata nel tempo l'ossidazione tirosina-mediata dei nuovi composti (**1-5**) e del 4-HA che, come precedentemente riportato è substrato prototipo per la tirosinasi (Moridani et al. 2003), allo scopo di verificare la loro bontà come substrati dell'enzima. Per ogni composto è stato pertanto registrato uno spettro di assorbanza nell'intervallo di lunghezza d'onda 200-500 nm, in assenza e in presenza dell'enzima tirosinasi, a diversi intervalli di tempo. In **Fig. 27** sono mostrati, a titolo di esempio, gli spettri ottenuti per il composto **1**. In assenza dell'enzima, per tutti i composti, si è osservato un massimo di assorbimento nella zona compresa fra 250 e 320 nm, mentre, in presenza dell'enzima, per i composti **1-4** e per il 4-HA si è osservata la comparsa di un picco di assorbimento a 460 nm. Tale picco era indicativo della formazione del corrispettivo *o*-chinone quale prodotto di reazione (Moridani 2006). Il composto **5**, invece, non ha mostrato nessuna modifica nel tempo dello spettro di assorbimento, suggerendo come la presenza del gruppo metilico in catena laterale non gli permetta di essere substrato dell'enzima tirosinasi. Confrontando gli spettri in **Fig. 27** e in **Fig. 28**, si può osservare come, nel caso del composto **3** (**Fig. 28**), l'assorbanza a 460 nm continui ad aumentare nel tempo. Un comportamento del tutto simile si poteva evidenziare anche nel caso del composto **4** (dati non mostrati). Al contrario, nel caso del composto **1** (**Fig. 27**) e, analogamente anche nel caso del suo isomero, il composto **2** (dato non mostrato), l'assorbanza aumentava fino ai 10 min,

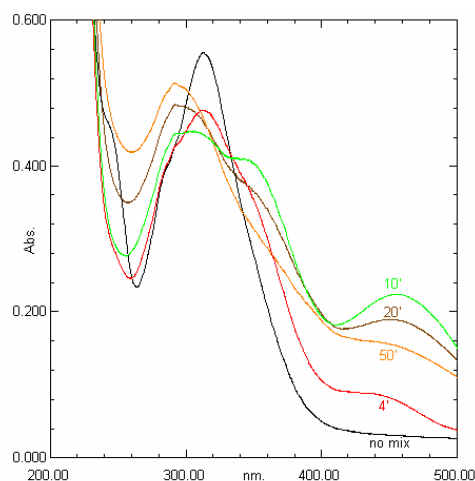


Figura 27: Spettro Uv-vis del composto 1 ottenuto in assenza dell'enzima tirosinasi di fungo (linea nera) e a differenti tempi di incubazione con l'enzima.

per poi iniziare a decrescere. Tale risultato si può spiegare con la forte reattività degli *o*-

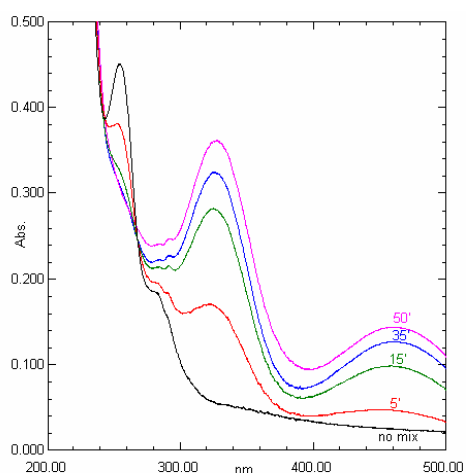


Figura 28: Spettro Uv-vis del composto **3** ottenuto in assenza dell'enzima tirosinasi di fungo (linea nera) e a differenti tempi di incubazione con l'enzima.

chinoni formati nei confronti dei gruppi nucleofili presenti nella miscela di reazione. Tra i gruppi reattivi si può ipotizzare vi siano i gruppi tiolici (-SH) dell'enzima stesso. Quindi questo legame potrebbe essere responsabile di un'inibizione concentrazione e tempo-dipendente della stessa reazione tirosinasi. Per quanto riguarda gli altri composti, per i quali non si è osservato un calo dell'assorbanza del picco relativo alla formazione dell'*o*-chinone, si può ipotizzare che la quantità degli *o*-chinoni formati non fosse sufficiente ad inibire l'enzima.

In una seconda serie di esperimenti, per tutti i composti in esame, compreso il composto di riferimento **4-HA**, sono stati effettuati degli studi cinetici misurando (a 460 nm) la velocità di formazione dell'*o*-chinone in funzione di concentrazioni crescenti di substrato. La **Tabella 1** riassume tutti i dati ottenuti.

| Composto | V_{max} ($\mu\text{M}/\text{sec}$) | K_m (10^{-6}M) | k_{cat} (sec^{-1}) | Efficienza (k_{cat}/K_m) |
|-----------------------------|--|-----------------------------|---------------------------------|------------------------------|
| 4-HA | 0.037 ± 0.005 | 46.76 ± 9.67 | 0.240 | 5.139 |
| 1 (<i>E</i>) <i>trans</i> | 0.472 ± 0.057 | 19.83 ± 5.51 | 3.070 | 155.05 |
| 2 (<i>Z</i>) <i>cis</i> | 0.537 ± 0.051 | 36.29 ± 6.076 | 3.490 | 96.409 |
| 3 <i>propanoico</i> | 0.149 ± 0.025 | 31.46 ± 10.09 | 0.972 | 30.955 |
| 4 <i>acetico</i> | 0.071 ± 0.008 | 22.41 ± 5.63 | 0.461 | 20.580 |
| 5 <i>acetato</i> | n.d. | n.d. | - | - |

Tabella 1: Parametri cinetici dell'ossidazione tirosinasi-mediata dei composti **1-5** e del **4-HA**. Le condizioni sperimentali sono riportate in dettaglio nella sezione "Materiali e Metodi".

I valori dei parametri cinetici confermano come il composto **5** non sia in grado di interagire con l'enzima tirosinasi, a differenza di tutti gli altri composti che, invece, hanno dimostrato un'affinità simile verso l'enzima. Da notare come tutti i composti (**1-4**) abbiano presentato un

valore di K_m più basso rispetto a quello del **4-HA**, indicando una maggiore affinità per l'enzima tirosinasi di quella del **4-HA** stesso, ritenuto il prototipo dei substrati di questo enzima. Dai dati di V_{max} , k_{cat} e dal valore di efficienza catalitica si è potuto notare come i due isomeri del 4-[(4-idrossifenil)-sulfanil]-3-buten-2-one (composti **1** e **2**) risultino essere i migliori substrati per la tirosinasi fra tutti quelli qui testati. Questo dato supporta l'ipotesi precedentemente illustrata di una diversa velocità di produzione dei relativi *o*-chinoni, osservata seguendo nel tempo gli spettri di assorbimento dei composti in presenza dell'enzima.

3.2.2. Reattività dei composti nei confronti del GSH

I nuovi composti qui considerati, oltre che come substrati della tirosinasi in grado di formare il rispettivo *o*-chinone citotossico, sono stati progettati anche con una catena laterale alifatica α,β insatura in grado di reagire col tripeptide GSH.

Le incubazioni dei composti in esame sono state condotte a diversi valori di pH (6, 7.4 e 8), in quanto è noto che la velocità dell'attacco nucleofilo da parte del GSH sul carbonio β -insaturo è pH-dipendente (Gunnarsdottir et al. 1999). Le miscele di reazione sono state quindi analizzate mediante HPLC e la reattività verso il GSH è stata valutata come diminuzione dell'area del picco cromatografico corrispondente al composto in esame. La reattività verso il GSH è stata valutata per tutti i composti (**1-5** e **4-HA**), ma, come ci si poteva aspettare, solo i composti **1** e **2** hanno mostrato la capacità di coniugarsi col GSH. I composti **3-5** e il **4-HA**, mancando della catena laterale col gruppo α,β insaturo, non sono stati in grado di interagire col GSH (dati non mostrati). Dai grafici riportati in **Fig. 29** appare chiaro come la reazione tra il GSH e i composti **1** e **2** dipenda fortemente dal valore di pH utilizzato.

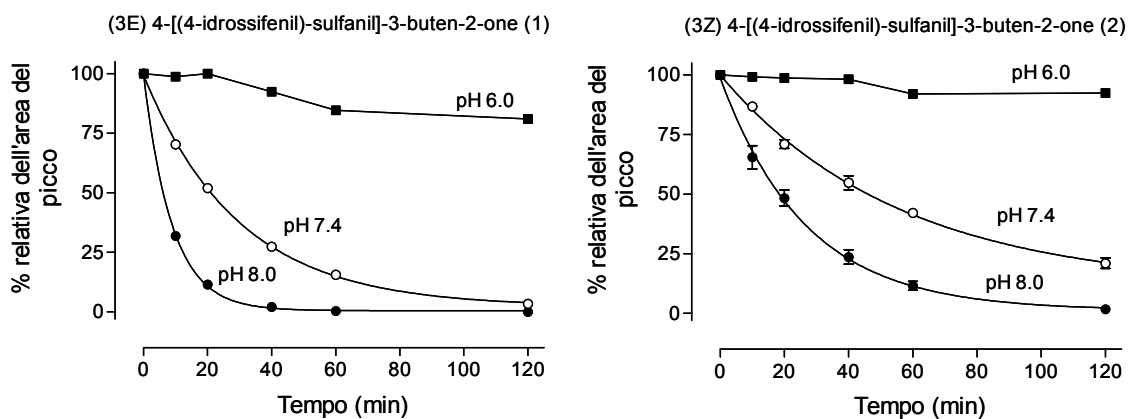


Figura 29: Reattività tempo-dipendente dei composti 1 (grafico a sinistra) e 2 (grafico a destra) con il GSH: valutazione dell'effetto del pH. Una soluzione 50 μ M del composto 1 e del composto 2 è stata incubata per tempi diversi con una soluzione 1 mM di GSH. I dati sono espressi come percentuale dell'area dell'area del picco al tempo 0 (100%). I risultati sono medie \pm E.S. di tre esperimenti svolti in duplicato.

A pH 6 la reattività dei composti verso il GSH è risultata quasi irrilevante, con una diminuzione dell'area del picco dopo 120 min di incubazione rispettivamente del 19% e 8% per il composto **1** e **2**. Al contrario, ai valori di pH 7.4 e 8, la reattività dei composti è aumentata notevolmente, in particolar modo per il composto **1**. Analizzando i dati mediante regressione non lineare, le variazioni percentuali nel tempo dei valori di area del picco si adattavano ad un decadimento esponenziale di primo ordine, indicando come l'interazione tra i composti **1** e **2** seguiva una cinetica di ordine primo. Dall'analisi cinetica dei dati si sono potuti ricavare valori di $t_{1/2}$ per la diminuzione della quantità di composto **1** in presenza di GSH (grafico a sinistra, **Fig. 29**) pari a 20.5 e 6.1 min rispettivamente a pH 7.4 e 8. Analogamente, per il composto **2** (grafico a destra, **Fig. 29**), sono stati ottenuti valori di $t_{1/2}$ pari a 38.6 e 18.4 rispettivamente a pH 7.4 e 8.

La dipendenza dal valore di pH dimostrata dalla reazione dei composti **1** e **2** col GSH è in accordo con il coinvolgimento dell'anione tiolato (GS^-) come gruppo funzionale della reazione. Poiché il gruppo sulfidrilico, presente nella catena laterale dell'amminoacido cisteina, presenta un valore di pK_a tra 8.7 e 9.3 (Gunnarsdottir et al. 1999), è plausibile che con il progressivo abbassarsi del valore di pH, e quindi la conseguente protonazione del gruppo -SH vi sia una minor reattività del GSH verso i composti.

Come tutte le reazioni coinvolgenti il GSH, anche quella relativa ai composti **1** e **2**, oltre ad avvenire in maniera spontanea, può essere catalizzata dalle GST, enzimi che favoriscono la reazione di addizione del GSH a composti elettrofili. I composti **1** e **2**, quindi, sono stati incubati con una quantità equimolare di GSH a pH 7.4 in presenza e in assenza di una frazione citosolica di fegato di ratto quale sorgente di GST del tipo Alpha e Mu (Raza et al. 1997). In tali esperimenti si è scelto di utilizzare un rapporto equimolare tra i composti e il GSH, in quanto considerando che la reazione sarebbe stata condotta a pH 7.4, l'interazione spontanea dei composti col GSH sarebbe stata troppo rapida (cfr **Fig. 29**) se si fosse mantenuto il rapporto 1:20 tra i composti e il GSH, impedendo così di valutare correttamente l'effetto delle GST epatiche. Dall'analisi dei grafici (**Fig. 30**) si può confermare come il composto **1** (isomero *E*, grafico a sinistra) risulti essere più reattivo nei confronti del GSH rispetto al composto **2** (isomero *Z*, grafico a destra), sia nel caso della reazione spontanea, sia nel caso di quella GST-mediata. La presenza della frazione citosolica, quale sorgente di enzimi GST, aumenta la velocità di reazione, come indicato dalla rapida diminuzione dell'area del picco del composto, in accordo con l'ipotesi che vede come ruolo dell'enzima quello di mantenere il GSH nella sua forma deprotonata, forma che effettivamente interviene nell'attacco nucleofilo. L'analisi cinetica dei dati ottenuti in presenza della frazione citosolica

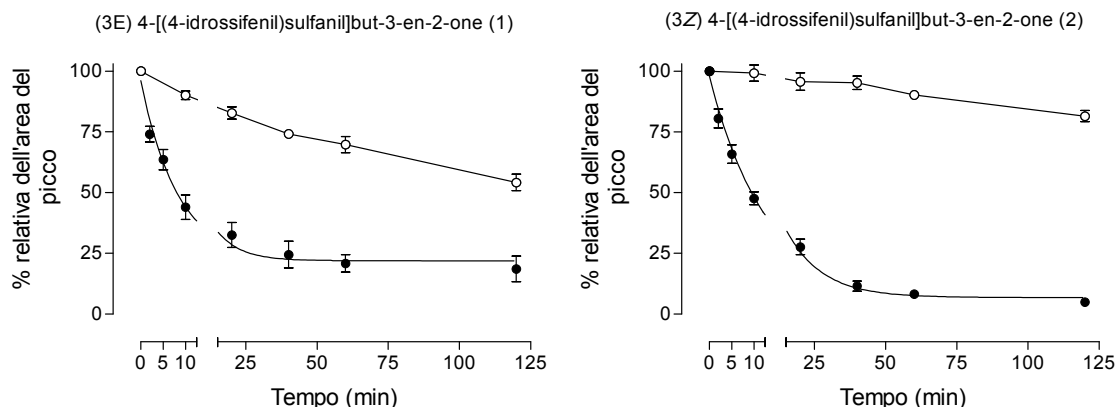
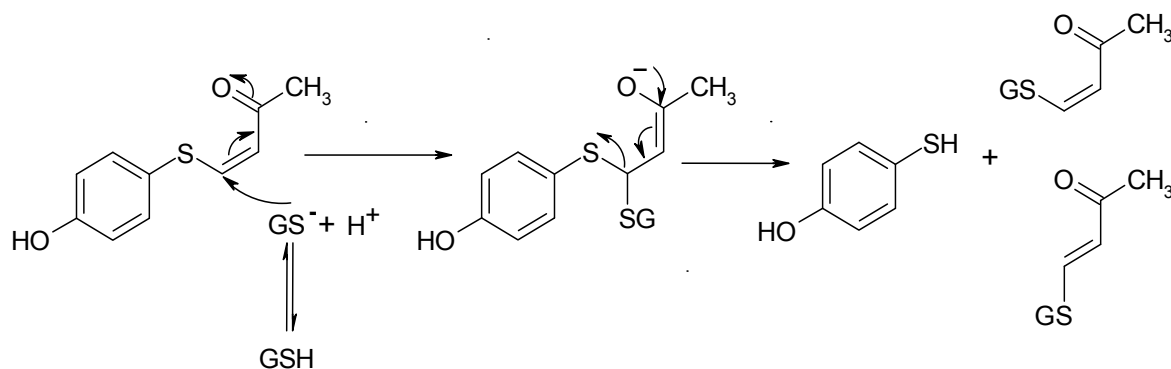


Figura 30: Reattività tempo-dipendente dei composti 1 (grafico a sinistra) e 2 (grafico a destra) con il GSH: valutazione dell'attività della frazione citosolica. Una soluzione equimolare di GSH e del composto 1 e 2 condotta a pH 7.4 in assenza (○) e in presenza (●) di frazione citosolica di fegato di ratto quale sorgente di GST. I dati sono espressi come percentuale dell'area del picco al tempo 0 (100%). I risultati sono medie \pm E.S. di tre esperimenti svolti in duplicato.

di fegato di ratto ha dimostrato che anche in questo caso, come già visto nel caso della reazione spontanea, la diminuzione dell'area del picco relativo ai composti **1** e **2** seguiva una cinetica di ordine primo, con un $t_{1/2}$ di 2.2 e di 7.2 minuti, rispettivamente, per il composto **1** e **2**.

In figura **31** sono riportati i cromatogrammi ottenuti dalla separazione mediante HPLC delle miscele di incubazione, a diversi intervalli di tempo, del composto **2** (isomero *Z*) in presenza di GSH e del citosol di fegato di ratto. Da questi cromatogrammi è possibile osservare la progressiva diminuzione dell'area del composto di partenza e la formazione di 3 nuovi picchi cromatografici. Ogni picco è stato quindi raccolto e analizzato mediante spettrometria di massa ESiMS. Nessuno dei picchi raccolti corrispondeva ad uno dei prodotti attesi, cioè il 4-mercaptofenolo, che avrebbe dovuto formarsi in seguito all'attacco nucleofilo del GSH al composto in esame (**Schema I**); viceversa lo spettro di massa ha evidenziato che il picco denominato P1 corrispondeva all'addotto fra il GSH e la catena



Schema I: Schema ipotizzato del meccanismo di reazione tra i composti 1 e 2 e il GSH. Dall'attacco nucleofilo del GSH alla catena laterale dei profarmaci studiati si dovrebbe avere la formazione del 4-mercaptofenolo e di un addotto della catena laterale col GSH.

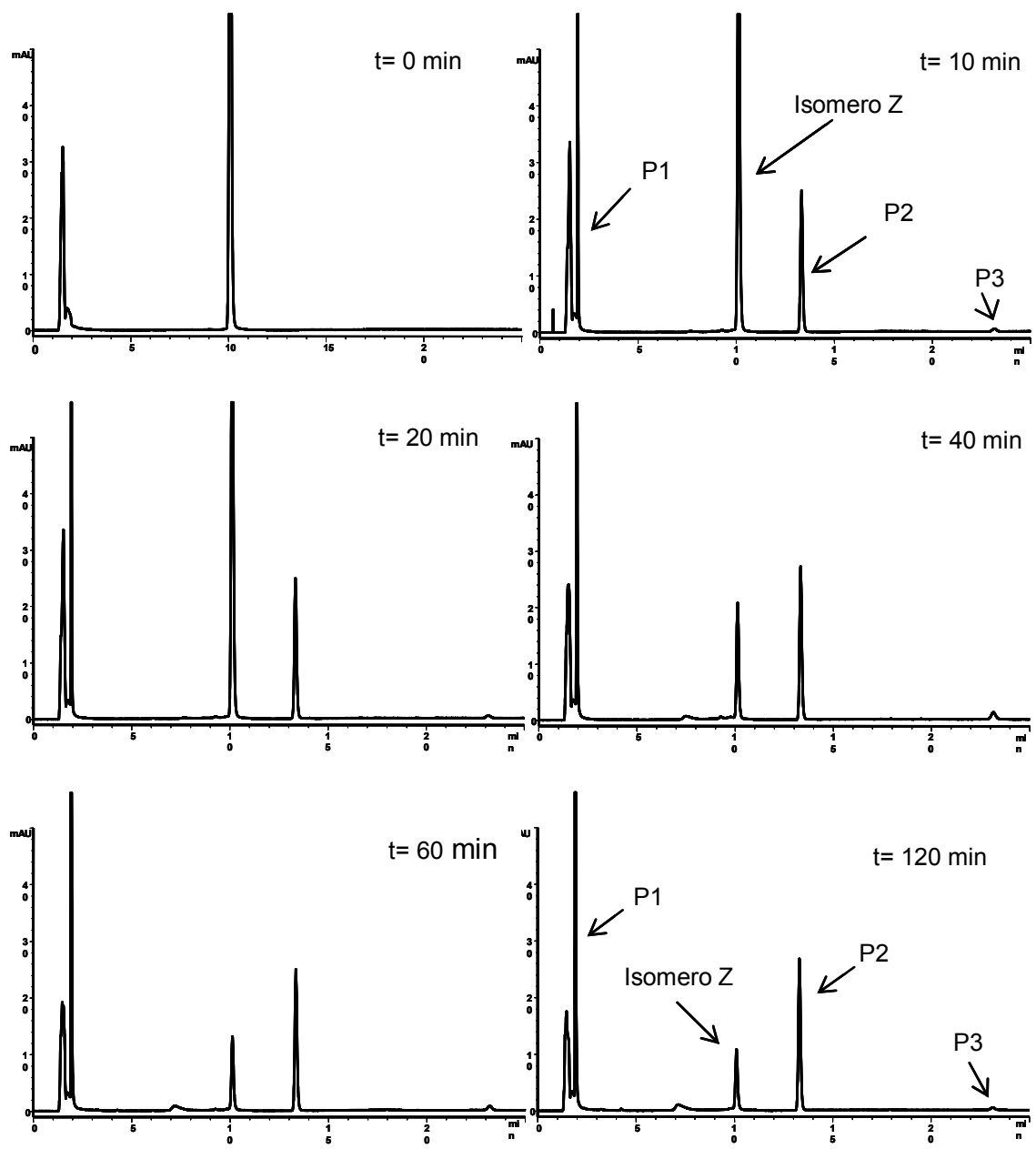
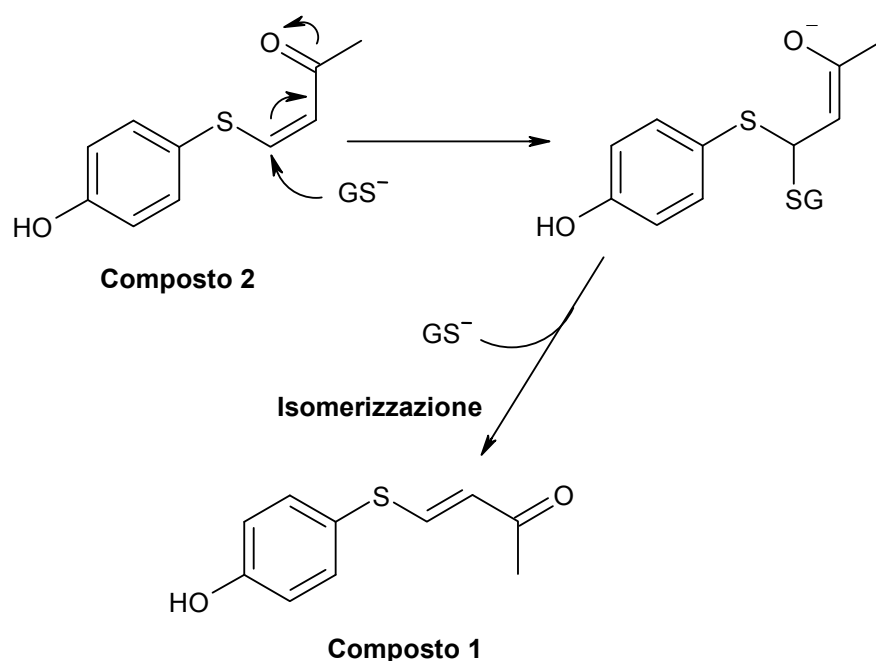


Figura 31: Cromatogrammi ottenuti dall'analisi HPLC del composto 2 (isomero Z) in presenza di GSH e della frazione citosolica di fegato di ratto, a diversi tempi di incubazione.

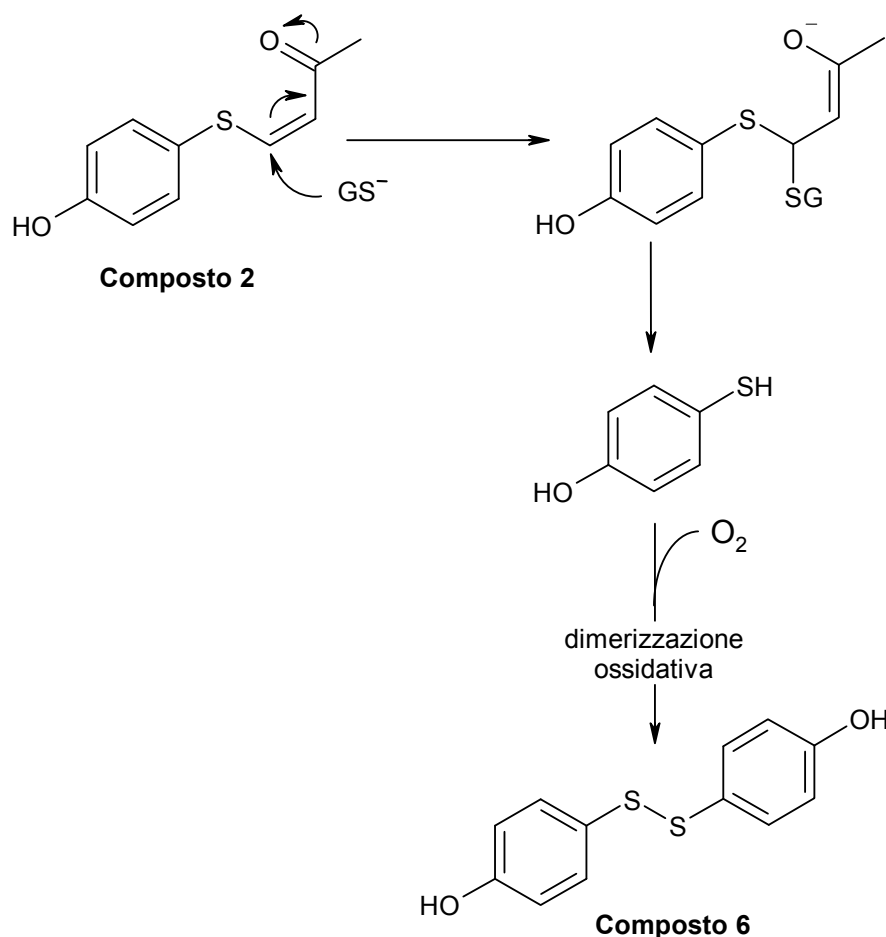
laterale. Il picco denominato P2 nei cromatogrammi presentati in Figura 31 è risultato avere un tempo di ritenzione e un valore di massa identico a quello del composto 1 (isomero *E*).

Analogamente, durante le incubazioni del composto 1 con GSH e la frazione citosolica di fegato di ratto, si è osservata la formazione, anche se con minor velocità, di un picco con un tempo di ritenzione e un valore di massa identico al composto 2 (isomero *Z*). È stata quindi ipotizzata, sia per il composto 1 che 2, una reazione di isomerizzazione *cis-trans* promossa dall'intervento del GSH, attività già conosciuta e riportata in letteratura (Shih et al. 1986). Questa reazione, molto efficiente nel caso di composti contenenti un gruppo α,β insaturo, può essere descritta con il legame del GSH al gruppo chetonico (doppio legame), la formazione di un legame singolo temporaneo, il quale può ruotare attorno a sé stesso e tornare alla forma di doppio legame dopo l'allontanamento del GSH (**Schema II**) (Khojasteh-Bakht et al. 1999).



Schema II: Meccanismo proposto per la reazione di isomerizzazione *cis-trans* promossa dal GSH.

Per quanto riguarda l'analisi del picco P3, il tempo di ritenzione e il valore di massa non corrispondevano assolutamente a quelli attesi per il 4-mercaptofenolo, ma piuttosto a quello di un composto dimerico del 4-mercaptofenolo stesso, possibile risultato di una sua ossidazione spontanea all'interno della miscela di reazione, con formazione del 4,4'-diidrossidifenildisulfide, da noi definito composto 6 (**Schema III**). A questo punto, si è deciso di sintetizzare tale composto e di valutarne le proprietà biologiche ripetendo tutti gli esperimenti già descritti effettuati per gli altri composti, a partire dagli esperimenti di ossidazione tirosinasi-mediata.



Schema III: Meccanismo proposto per la formazione del 4,4'-diidrossidifenildisulfide.

Dai risultati ottenuti il composto **6** è risultato essere un ottimo substrato per l'enzima tirosinasi, in quanto ha presentato un valore di K_m ($16.44 \mu\text{M}$) che è il più basso fra tutti quelli ottenuti durante questo studio (cfr **Tab. 1**).

Analogamente il valore di V_{max} ($0.234 \pm 0.012 \mu\text{M}/\text{sec}$) trovato, sebbene leggermente inferiore a quelli dei composti **1** e **2**, è risultato essere comunque molto più elevato rispetto a quello dei composti **3**, **4** e del **4-HA**. Per quanto riguarda la reattività verso il GSH, come ci si poteva aspettare sulla base della presenza del legame disolfuro, il 4,4'-

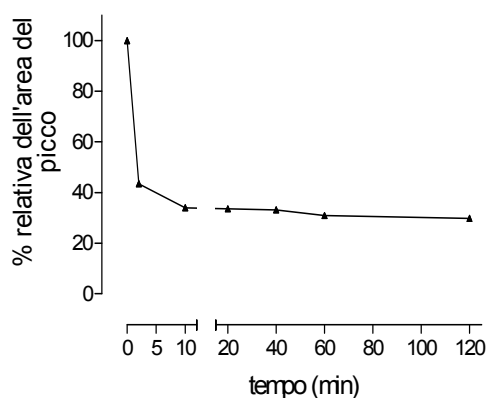


Figura 32: Reattività del composto 6 con il GSH. Soluzioni equimolari del composto 6 e di GSH sono state incubate a pH 7.4 e, a diversi intervalli di tempo, è stata determinata la percentuale di composto rimasta nella miscela di reazione. I risultati sono la media di due esperimenti svolti in triplicato.

diidrossidifenildisulfide é risultato essere estremamente reattivo nei confronti del GSH, sia in assenza che in presenza di frazione citosolica di fegato di ratto. Incubando infatti il composto **6** con GSH a pH 7.4, è stata osservata un reattività verso il tripeptide assai maggiore che con i composti **1** e **2** (cfr **Fig. 30**), ottenendo dopo 120 min di incubazione un'area residua del 30% (**Fig. 32**). In presenza di frazione citosolica di fegato di ratto, è stato calcolato un $t_{1/2}$ inferiore al minuto, a conferma della rapidità dell'interazione del composto **6** col GSH.

3.2.3. Studi di citotossicità in vitro

In un'ultima fase di studio relativo a questi nuovi composti bifunzionali, tutti i nuovi profarmaci sono stati testati per la loro citotossicità in vitro nei confronti di colture di cellule di melanoma murino B16F1. La scelta di questa linea cellulare è stata fatta sulla base della sua caratteristica di esprimere ad alti livelli l'enzima tirosinasi. Dai dati ottenuti, riassunti in **Tabella 2**, si può chiaramente osservare come i composti dotati di maggior tossicità risultino

| | IC ₅₀ (uM) | Sopravvivenza cellulare in presenza di 100 µM dei composti (% del controllo) | | |
|------|-----------------------|--|----------------|--------------|
| | | - | + PTU (0.2 mM) | + NAC (5 mM) |
| 4-HA | 180 ± 15 | 61.3 ± 7.1 | 78.7 ± 5.0 | 60.0 ± 3.5 |
| 1 | 17.4 ± 2.3 | 1.3 ± 1.2 | 0.0 | 41.4 ± 5.2 |
| 2 | 19.2 ± 1.9 | 3.1 ± 1.3 | 0.0 | 43.8 ± 4.5 |
| 3 | n.d. | 77.4 ± 12.5 | | |
| 4 | n.d. | 69.4 ± 9.3 | | |
| 5 | n.d. | 101.4 ± 3.5 | | |
| 6 | 21.2 ± 5.6 | 0.2 ± 0.1 | 0.0 | 22.5 ± 3.0 |

Tabella 2: Effetti citotossici del 4-HA e dei composti 1-6 nei confronti di cellule di melanoma murino B16F1 in assenza e in presenza di N-acetilcisteina (NAC) o 1-fenil-2-tiourea (PTU).

essere il composto **1**, **2** e **6**, per i quali sono stati calcolati valori di IC₅₀ molto simili tra loro e di gran lunga inferiori a quelli del **4-HA**. Al contrario, i composti **3** e **4**, che, come riportato precedentemente, non sono buoni substrati dell'enzima tirosinasi e non reagiscono con il GSH, mostrano una modestissima tossicità. Il composto **5**, che a sua volta non è substrato dell'enzima tirosinasi e non mostra reattività nei confronti del GSH, non svolge alcuna attività citotossica nei confronti delle cellule di melanoma murino B16F1 (**Fig. 33**). L'insieme di questi risultati e, in particolare, il fatto che i composti **3** e **4**, sebbene substrati migliori per la tirosinasi rispetto al **4-HA**, abbiano mostrato una minor tossicità rispetto allo stesso, suggerisce che la caratteristica cruciale che determina gli effetti citotossici mostrati dai

composti **1** e **2**, sia la loro forte reattività nei confronti del gruppo tiolico del GSH e/o dei gruppi -SH delle proteine, piuttosto che la loro capacità di essere buoni substrati per l'enzima tirosinasi.

Allo scopo di confermare questa ipotesi, sono stati effettuati ulteriori esperimenti di citotossicità dei composti **1**, **2**, **6** e **4-HA** verso cellule di melanoma murino B16F1, in presenza di N-acetilcisteina (NAC) o di 1-fenil-2-tiouera (PTU). La presenza nel mezzo di NAC era giustificata dal fatto di valutare se gli effetti citotossici dei nuovi composti fossero dovuti alla formazione degli *o*-chinoni o, piuttosto, alla deplezione cellulare di GSH. La NAC, essendo un

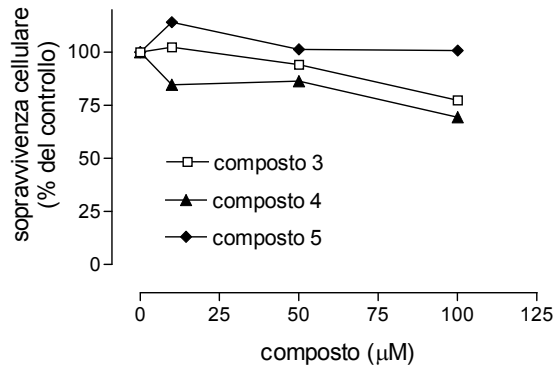


Figura 33: Effetto di concentrazioni crescenti dei composti 3, 4 e 5 sulla vitalità di cellule di melanoma murino B16F1. Cellule di melanoma murino B16F1 sono state incubate per 48 ore in presenza di concentrazioni crescenti del composto 3, 4 e 5. La percentuale di cellule sopravvissute è stata valutata mediante saggio dell'MTT. I risultati sono la media di due esperimenti svolti in duplicato.

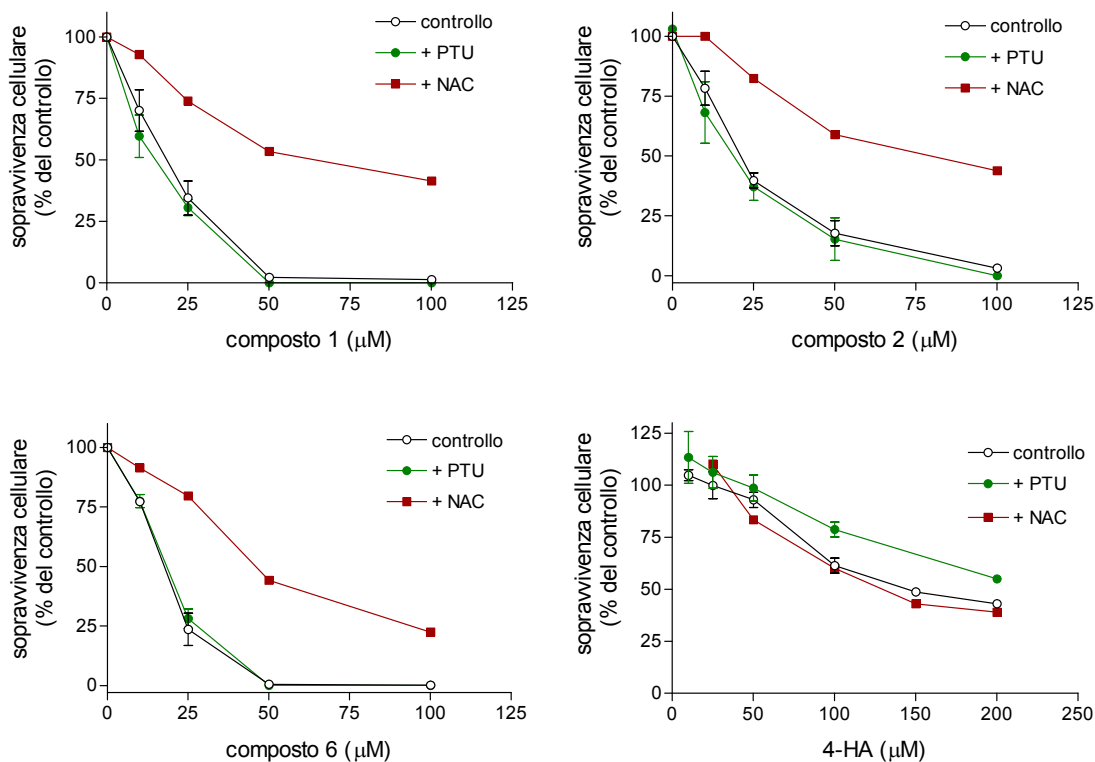


Figura 34: Effetto di NAC (N-acetilcisteina) e PTU (1-fenil-2-tiourea) sulla citotossicità dei nuovi composti. Cellule di melanoma murino B16F1 sono state incubate per 48 ore in presenza di concentrazioni crescenti del composto 1, 2, 6 e di 4-HA, in assenza (○) e in presenza di 1mM NAC (■) o di 200 μM PTU (●). La percentuale di cellule sopravvissute è stata valutata mediante saggio dell'MTT. I risultati sono medie ± E.S. di tre esperimenti svolti in duplicato.

antiossidante (Aruoma et al. 1989), aveva la capacità di reagire col carbonio β -insaturo presente nella catena laterale dei composti **1** e **2** e col legame disolfuro presente nel composto **6**. In tal modo avrebbe potuto svolgere un effetto protettivo per le cellule. Il PTU, invece, è stato utilizzato in quanto, essendo un potente inibitore dell'attività tirosinasi (Morrison et al. 1985), permetteva di valutare l'importanza della formazione degli *o*-chinoni nell'azione citotossica dei diversi composti. I dati ottenuti, riportati in **Tab. 2** e graficati in **Fig. 34**, mostrano che la NAC non ha influenzato in nessun modo la tossicità del **4-HA**, escludendo, com'era prevedibile, un suo coinvolgimento nella deplezione di GSH cellulare. Al contrario, nel caso dei composti **1**, **2** e **6**, si è osservata una significativa diminuzione dell'attività citotossica in presenza di NAC, dimostrando, così, come la reattività verso il GSH manifestata da questi composti risulti cruciale per la loro azione citotossica.

In presenza di PTU, invece, l'unico effetto protettivo, tra l'altro di modesta entità, è stato osservato incubando le cellule con **4-HA**. In presenza dei composti **1**, **2** e **6**, non si sono assolutamente riscontrate variazioni nella percentuale di sopravvivenza cellulare, in presenza di PTU, a conferma del fatto che l'essere ottimi substrati per la tirosinasi non incide sulla loro azione citotossica che rimane legata alla loro forte reattività nei confronti del GSH.

Riassumendo, i dati ottenuti dagli studi cinetici e dagli esperimenti di tossicità in vitro portano a concludere che:

1. il meccanismo d'azione responsabile degli effetti citotossici mostrati dai composti **1**, **2** e **6** è diverso rispetto a quello del **4-HA**;
2. mentre la citotossicità mostrata dal **4-HA** sembra essere dovuta al metabolismo da parte dell'enzima tirosinasi, gli effetti citotossici dei composti **1**, **2** e **6**, invece, sembrano principalmente dovuti alla loro forte reattività verso il GSH;
3. il composto **6**, uno dei possibili prodotti generati dell'interazione tra il GSH e i composti **1** e **2**, dotato di una forte reattività verso il GSH e che presenta un valore di IC_{50} molto simile a quello dei composti di partenza, è probabile che giochi un ruolo cruciale negli effetti biologici osservati per i composti **1** e **2** qui studiati.

Certamente la forte reattività di questi composti nei confronti del GSH, non associata alla necessità di essere metabolizzati dalla tirosinasi per svolgere la loro azione citotossica, potrebbe rivelarsi un loro limite per un futuro sviluppo, data l'ubiquitarità di una loro interazione col GSH e quindi la loro scarsa selettività.

3.3. Inibitori dell'enzima glutatione-S-transferasi (GST) P1-1

L'ultima parte del lavoro di tesi ha riguardato lo studio, per ora ancora preliminare, di composti dotati di possibile attività inibitoria su enzimi GST.

L'attività glutatione-S-transferasi viene tipicamente valutata monitorando, mediante spettrofotometria UV-vis la formazione di S-glutationil-2,4-dinitrobenzene (GS-DNB, $\lambda_{\max}=340$ nm) a partire dai substrati clorodinitrobenzene (CDNB) e GSH (Habig et al. 1974). Nonostante presenti il vantaggio di una notevole rapidità d'analisi, il metodo spettrofotometrico non si presta allo studio di inibitori di GST che presentino un intenso assorbimento attorno ai 340 nm o che diano origine, per reazione col GSH presente nel mezzo di reazione, a coniugati che potrebbero essere responsabili di una possibile attività inibitoria nei confronti dell'enzima stesso.

Sulla base di tali considerazioni, lo studio del potenziale effetto inibitorio dell'alcannina e dei suoi derivati acetilati nei confronti dell'attività GST è stato condotto mediante HPLC, come descritto nella sezione "Materiali e Metodi".

3.3.1. Valutazione dell'attività GST nella frazione solubile (citosol) di fegato di ratto

Un primo gruppo di esperimenti, volto alla messa a punto del protocollo d'analisi HPLC, si è basato sull'impiego, quale sorgente di enzimi GST, della frazione solubile dell'omogenato di fegato di ratto.

Esperimenti eseguiti al fine di determinare le condizioni ottimali di reazione hanno dimostrato come un tempo di incubazione di 5 min e di una concentrazione di proteine nel mezzo pari a 0,01 mg/mL risultassero adeguate al fine di una facile determinazione del prodotto di reazione in condizioni di linearità rispetto al tempo (**Fig. 35**).

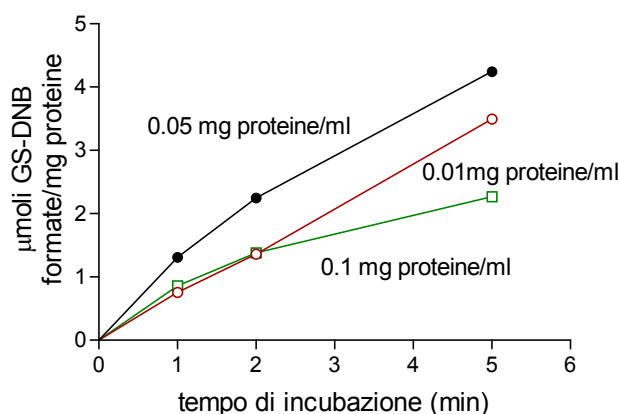


Figura 35: Andamento nel tempo della formazione di GS-DNB catalizzata dalla frazione solubile di fegato di ratto in funzione della quantità di proteina utilizzata. I risultati sono la media di due esperimenti svolti in duplicato.

L'attività GST del citosol di fegato di ratto è stata quindi determinata utilizzando concentrazioni crescenti di CDNB (tra 0.025 e 0.5 mM, n=5) in presenza di GSH 1 mM. I valori della velocità iniziale di formazione di GS-DNB graficati in funzione della concentrazione di substrato si disponevano ($r^2=0.997$) seguendo un andamento iperbolico rettangolare (cinetica di Michaelis-Menten, **Fig. 36**). Poiché negli epatociti normali di ratto,

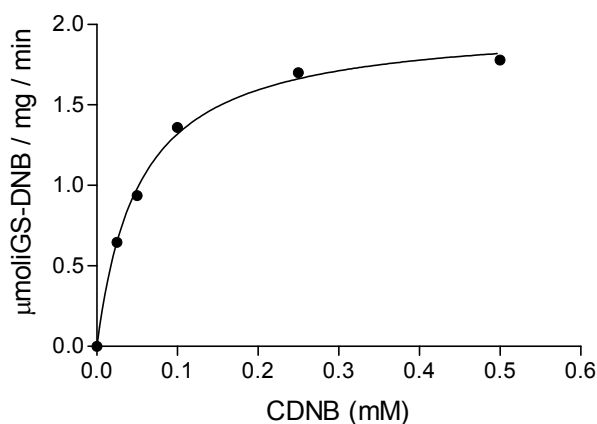


Figura 36: Cinetica di formazione del GS-DNB da parte di 0.01 mg/mL di frazione solubile di fegato di ratto in funzioni di concentrazioni crescenti di substrato. I risultati sono la media di due esperimenti svolti in duplicato.

così come negli umani, è nota la presenza di diverse isoforme di GST quali la Alpha e la Mu, (Raza et al. 1997), il fatto che i nostri risultati sperimentali seguano una cinetica ad un sito suggerisce che nel citosol di fegato di ratto i diversi enzimi GST presenti abbiano tutti un'affinità simile nei confronti del substrato CDNB. Mediante regressione non lineare dei dati, utilizzando l'equazione di Michaelis-Menten, sono stati ottenuti i parametri cinetici K_m e V_{max} della reazione, risultati rispettivamente 0.052 mM e 2.03 $\mu\text{moli}/\text{min}/\text{mg}$ proteina. È interessante notare come il valore di K_m ottenuto fosse sovrapponibile a quello descritto in letteratura da Baars et al. (1978) per la frazione citosolica di fegato di ratto (0.053 mM), valore tuttavia ottenuto utilizzando per la quantificazione del GS-DNB la metodica spettrofotometrica di Habig et al. (1974).

Successivi esperimenti sono stati condotti al fine di valutare eventuali effetti sulla velocità di formazione del GS-DNB di alcuni solventi organici miscibili con l'acqua quali il dimetilsolfossido (DMSO), la dimetilformammide (DMF), l'acetonitrile (CH_3CN), il metanolo (MeOH) e l'etanolo (EtOH). Ciò si è reso necessario in quanto i composti che si intendeva studiare erano insolubili in acqua e necessitavano quindi di un solvente organico per essere portati in soluzione nel mezzo di reazione. Gli esperimenti sopra descritti, per la valutazione dell'attività GST del citosol di fegato di ratto, sono stati quindi ripetuti in presenza di una concentrazione finale di ciascun solvente pari all'1% e una concentrazione di

CDNB pari a 0.05 mM (\approx il valore della K_m). Sulla base dei dati ottenuti e graficati in **Fig. 37**, come solvente da utilizzare per la dissoluzione dell'alcannina e dei suoi derivati è stato scelto il DMSO. Esso è, infatti, risultato il migliore tra quelli utilizzati sulla base del suo minore effetto sull'attività enzimatica studiata.

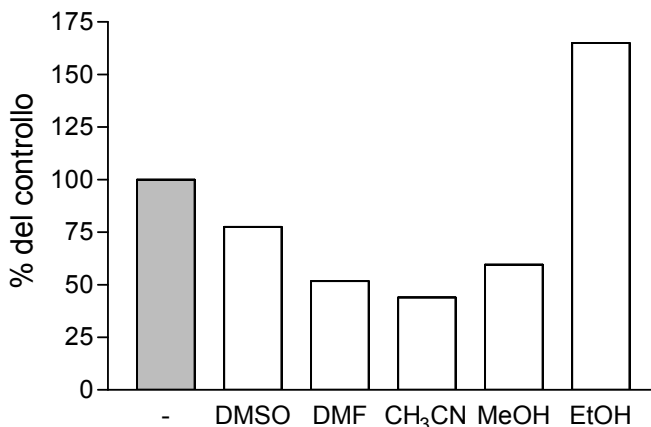


Figura 37: Effetto di diversi solventi organici (concentrazione finale: 1%) sull'attività GST.
I risultati sono la media di due esperimenti svolti in duplicato.

3.3.2. Valutazione dell'attività enzimatica della GST isolata da placenta (GSTP1-1)

Una volta messo a punto nelle linee generali il metodo di valutazione mediante separazione HPLC dell'attività GST e valutato come i risultati relativi ai parametri cinetici da noi riscontrati nel citosol di fegato di ratto fossero del tutto comparabili con quelli riportati da altri autori che avevano utilizzato il metodo spettrofotometrico di Habig (1974) (a conferma della bontà del metodo di rilevazione da noi scelto), abbiamo potuto procedere con la valutazione dell'effetto inibitorio dell'alcannina e dei suoi derivati sull'attività dell'enzima GSTP1-1 isolato da placenta umana. L'enzima GSTP1-1, noto per essere sovraespresso nella quasi totalità dei tumori umani (ove possono costituire fino all'1-2% delle proteine totali del citosol, Turella et al. 2003), rappresenta, infatti, oltre il 90% delle GST espresse dalla placenta umana.

Tuttavia, anche per gli esperimenti eseguiti con la GSTP1-1 è stato necessario trovare le condizioni ottimali di incubazione, sia per quanto riguardava il tempo che la quantità di enzima da utilizzare. La formazione di GS-DNB è stata quindi valutata a tempi diversi di incubazione (tra 1 e 10 min di incubazione) e utilizzando due diverse concentrazioni di GSTP1-1 (0.000143 e 0.00143 mg/mL).

Dai risultati ottenuti e graficati in **Fig. 38**, si può osservare come una concentrazione di proteine finale nel mezzo pari a 0.00143 mg/mL e un tempo di incubazione di 2 min si siano

rivelate ottimali per operare in condizioni di linearità e per ottenere allo stesso tempo un buon segnale cromatografico.

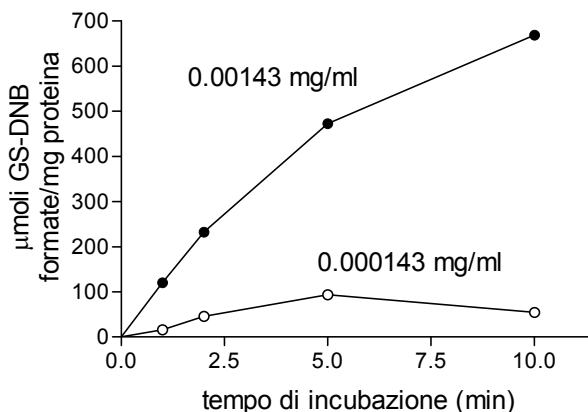


Figura 38: Andamento nel tempo della formazione di GS-DNB catalizzata GSTP1-1 in funzione della quantità di proteina utilizzata. I risultati sono la media di due esperimenti svolti in duplicato.

Confrontando questi risultati con quelli ottenuti utilizzando il citosol di fegato di ratto (cfr. **Fig. 35**) è evidente come la velocità della reazione transferasica catalizzata dall'enzima GST isolato dalla placenta umana sia risultato di molte volte superiore a quella catalizzata dalle proteine presenti nel citosol. Ad esempio, confrontando la quantità di coniugato prodotto in 2 minuti, si può osservare che, nel caso della GST da placenta umana, una concentrazione di proteina circa 70 volte inferiore a quella utilizzata negli esperimenti eseguiti con la frazione citosolica (0.000143 vs. 0.01 mg/mL) è in grado di catalizzare la formazione di una quantità di GS-DNB circa 20 volte superiore (45 µmoli/mg vs. 2.25 µmoli/mg). Ciò tuttavia non permette di dire che l'enzima placentare è dotato di una capacità metabolica maggiore delle GST presenti nel citosol di fegato di ratto. Infatti, di tutte le proteine presenti nella frazione epatica, solo una piccola percentuale (circa l'1%) è rappresentata da enzimi GST, mentre nel caso della GST placentare utilizzata, la quasi totalità della proteina aggiunta era rappresentata da GSTP1-1. Ciò giustifica la maggiore quantità di metabolita prodotta dalla GST placentare, in quanto l'attività enzimatica è espressa per mg di proteina totale.

Per valutare la cinetica di formazione del coniugato GS-DNB catalizzata da GSTP1-1, concentrazioni crescenti di substrato (tra 0.125 e 3 mM, n=7) sono state quindi incubate per 2 min a 37°C con il GSH (1 mM) in assenza e in presenza di 0.00143 mg/mL di GSTP1-1. I valori della velocità iniziale di formazione di GS-DNB graficati in funzione della concentrazione di substrato identificavano un'iperbole rettangolare ($r^2=0.997$) (**Fig. 39**). Come era logico aspettarsi, la reazione di formazione del GS-DNB da parte dell'enzima isolato da placenta umana seguiva quindi una classica cinetica di Michaelis-Menten ad un sito. Anche in questo caso l'analisi mediante regressione non lineare dei dati ha permesso la

determinazione dei parametri cinetici K_m e V_{max} che sono risultati pari rispettivamente a 0.68 mM e a 150 $\mu\text{moli}/\text{min}/\text{mg}$ proteina. Il valore di K_m , in particolare, era molto simile a quello (0.83 mM) descritto in letteratura da Zimniak et al (1994).

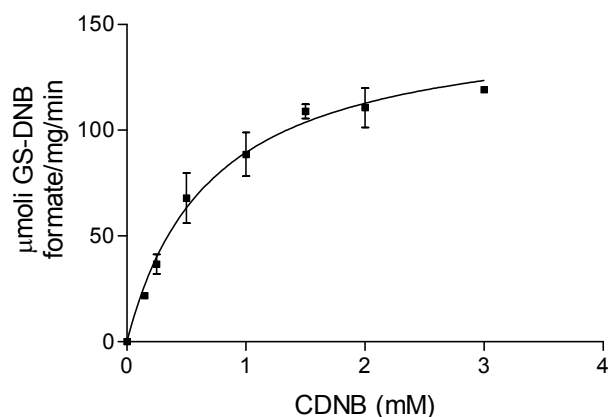


Fig. 39: Cinetica di formazione del GS-DNB da parte di 0.00143 mg/mL di GSTP1-1 in funzione di concentrazioni crescenti di substrato. I risultati sono medi \pm E.S. di tre esperimenti svolti in duplicato.

3.3.3. Effetto di alcannina, 1'-acetil alcannina e 5,8,1'-triacetil alcannina sull'attività GSTP1-1

Una volta individuate le condizioni di reazione ottimali ai fini della valutazione dell'attività della GST isolata da placenta umana, si è proceduto allo studio dell'alcannina e dei suoi derivati acetilati 1'-acetil alcannina e 5,8,1'-triacetil alcannina, quali possibili inibitori di GSTP1-1. Poiché come riportato in Introduzione questa parte della ricerca ha preso spunto da un precedente lavoro riguardante l'azione dell'alizarina sull'attività GST di una non meglio definita GST di placenta umana (Das et al. 1986) si è innanzitutto voluto valutare se l'alcannina presentasse un'attività simile a quella dell'alizarina date alcune

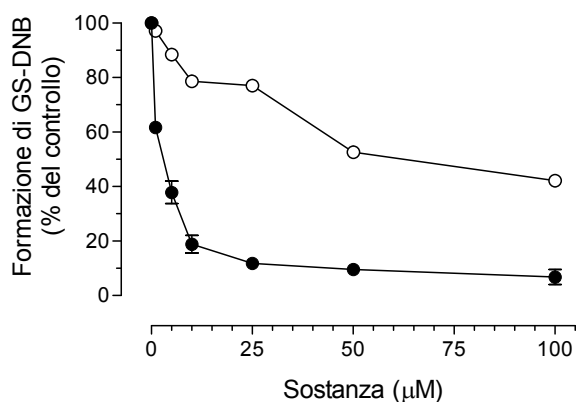


Fig. 40: Effetto inibitorio della alizarina e dell'alcannina sull'attività di GSTP1-1. I risultati sono la media di due esperimenti svolti in duplicato.

somiglianze strutturali tra le due sostanze. In una prima serie di esperimenti, si è voluto valutare l'effetto di concentrazioni crescenti delle due sostanze sull'attività glutatione-S-transferasi della GSTP1-1 determinata ad una concentrazione di substrato CDNB pari a 0.5 mM, concentrazione quindi vicina alla K_m dell'enzima placentare. I risultati riportati in **Fig. 40** mostrano

chiaramente che tra le due sostanze l'alcannina è quella dotata di maggiore effetto inibitorio. Se questo sia indice di una possibile relazione struttura-attività, nel senso che una sostanza a nucleo naftochinonico (alcannina) è dotata di maggiore effetto inibitorio rispetto ad una a nucleo antrachinonico (alizarina), non è al momento dato di sapere. Comunque esperimenti in corso (Quintieri, comunicazione personale) confermano tale ipotesi di lavoro, in quanto un'altra sostanza a nucleo antrachinonico molto simile strutturalmente all'alizarina, la purpurina, si comporta in maniera quantitativamente simile all'alizarina stessa, suggerendo forse l'importanza del nucleo naftochinonico per l'inibizione massiccia sulla GSTP1-1.

A questo punto abbiamo voluto paragonare gli effetti dell'alcannina con quelli dei suoi due derivati acetilati. Gli esperimenti condotti a tal fine sono stati realizzati incubando CDNB (concentrazione finale 0.5 mM) con 1mM GSH e 0.00143 mg/mL di GSTP1-1, in assenza (controllo) e in presenza di concentrazioni crescenti (1-100 μ M, n=6) di alcannina, 1'-acetil alcannina e 5,8,1'-triacetil alcannina. I risultati di tali esperimenti sono riportati in **Fig. 41**.

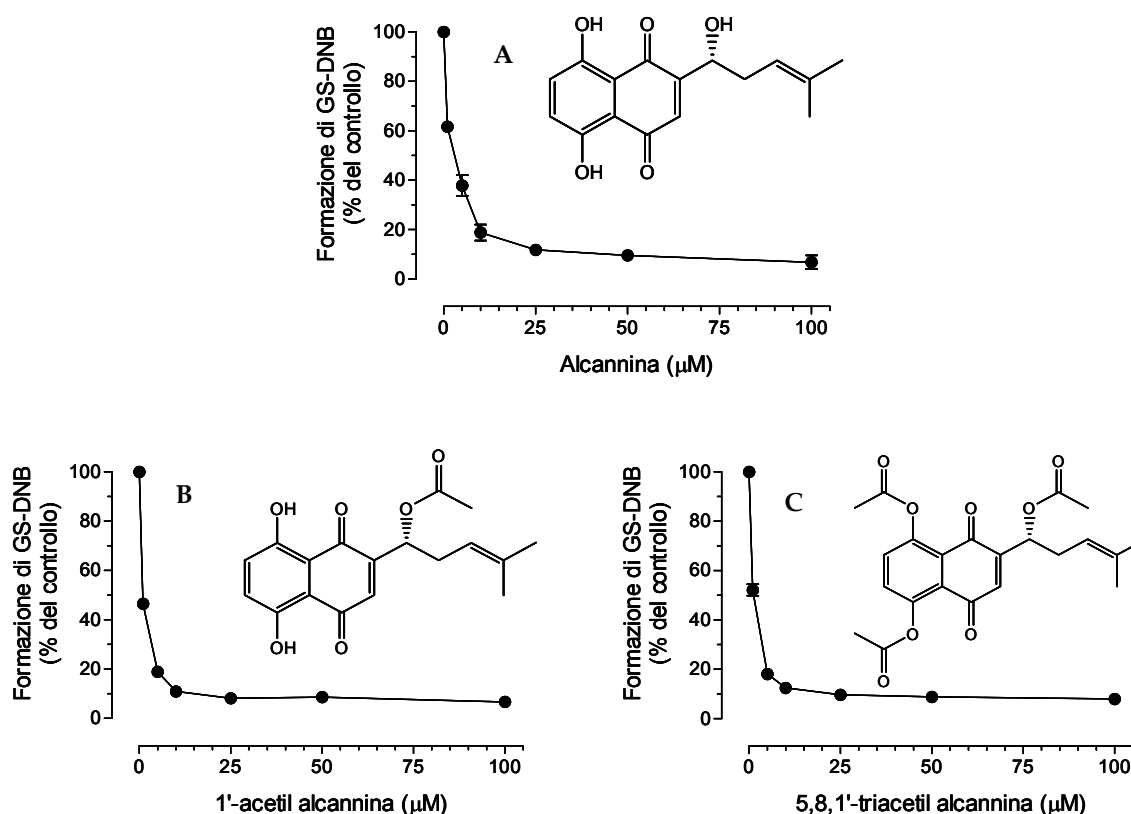


Fig. 41: Effetto inibitorio di alcannina (A), di 1'-acetil alcannina (B) e di 5,8,1'-triacetil alcannina (C) sulla formazione di GS-DNB catalizzata da GSTP1-1 umana. La formazione di GS-DNB è espressa come percentuale dell'area del picco osservato in campioni di controllo. I risultati sono la media di due esperimenti svolti in duplicato.

Tutti e tre i composti studiati si sono dimostrati capaci di inibire in modo concentrazione-dipendente l'attività GSTP1-1. I due composti acetilati risultano addirittura più potenti

(inibizione ~80% dell'attività enzimatica a 5 μ M) dell'alcannina stessa (inibizione ~80% a 10 μ M). Ciò suggerisce che la presenza degli ossidrili liberi, presenti nel contesto della molecola dell'alcannina, non sia essenziale ai fini dell'attività inibitoria e che, anzi, il mascheramento degli ossidrili stessi si traduca in un aumento dell'affinità per l'enzima.

È interessante notare che i cromatogrammi relativi agli studi di inibizione condotti in presenza di alcannina erano caratterizzati dalla presenza, oltre che di un picco con tempo di ritenzione pari a 5.8 min corrispondente al GS-DNB, anche da un picco con un tempo di ritenzione pari a 8.3 min (M1, **Fig. 42**) indicativo della possibile presenza nelle miscele di reazione di un prodotto di reazione tra alcannina e glutatione. Per verificare tale ipotesi di lavoro si è pensato di analizzare la reattività dell'alcannina nei confronti del GSH andando poi a identificare il possibile metabolita M1 mediante raccolta del picco e successiva analisi ESI-MS.

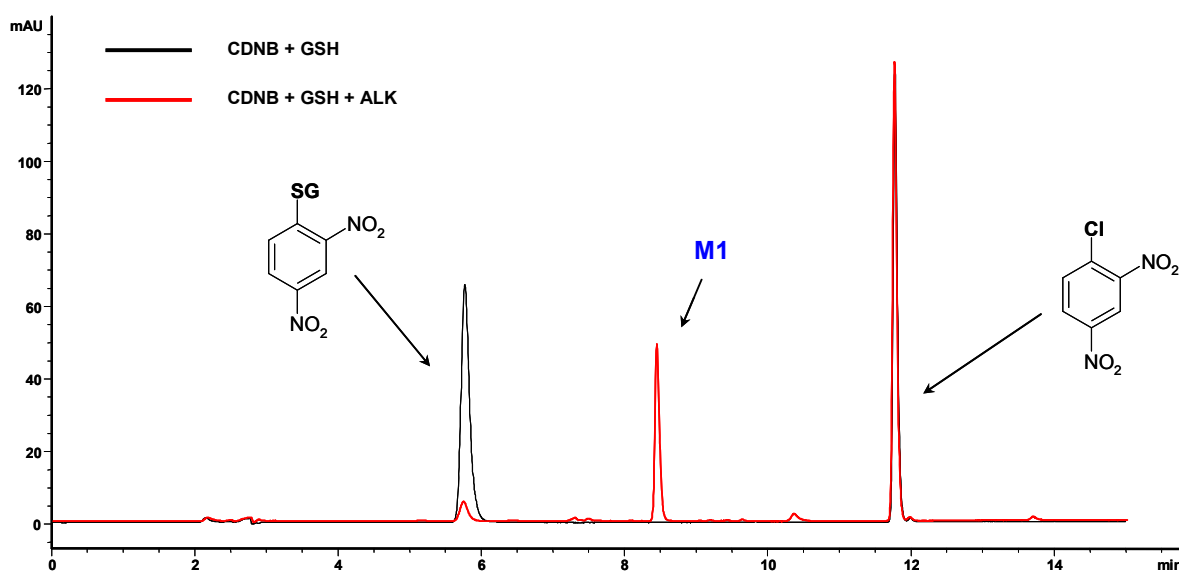


Fig. 42: Cromatogrammi rappresentativi relativi all'analisi HPLC di campioni ottenuti incubando CDNB (0.5 mM) con GSH (1 mM) a 37°C a pH 6.5 per 2 min in presenza dell'enzima GSTP1-1 umano (0.00143 mg/mL) e in assenza o in presenza di alcannina (100 μ M).

3.3.4. Valutazione della reattività dell'alcannina nei confronti del GSH

L'alcannina è stata quindi incubata per 1, 2, 5 e 10 min, in presenza del solo GSH e le miscele di incubazione sono state analizzate mediante HPLC, utilizzando, ovviamente, le medesime condizioni cromatografiche utilizzate per gli studi di inibizione enzimatica. In questo modo è stato possibile seguire nel tempo la comparsa e l'andamento del picco M1. Cromatogrammi rappresentativi relativi a tali esperimenti sono riportati in **Fig. 43**.

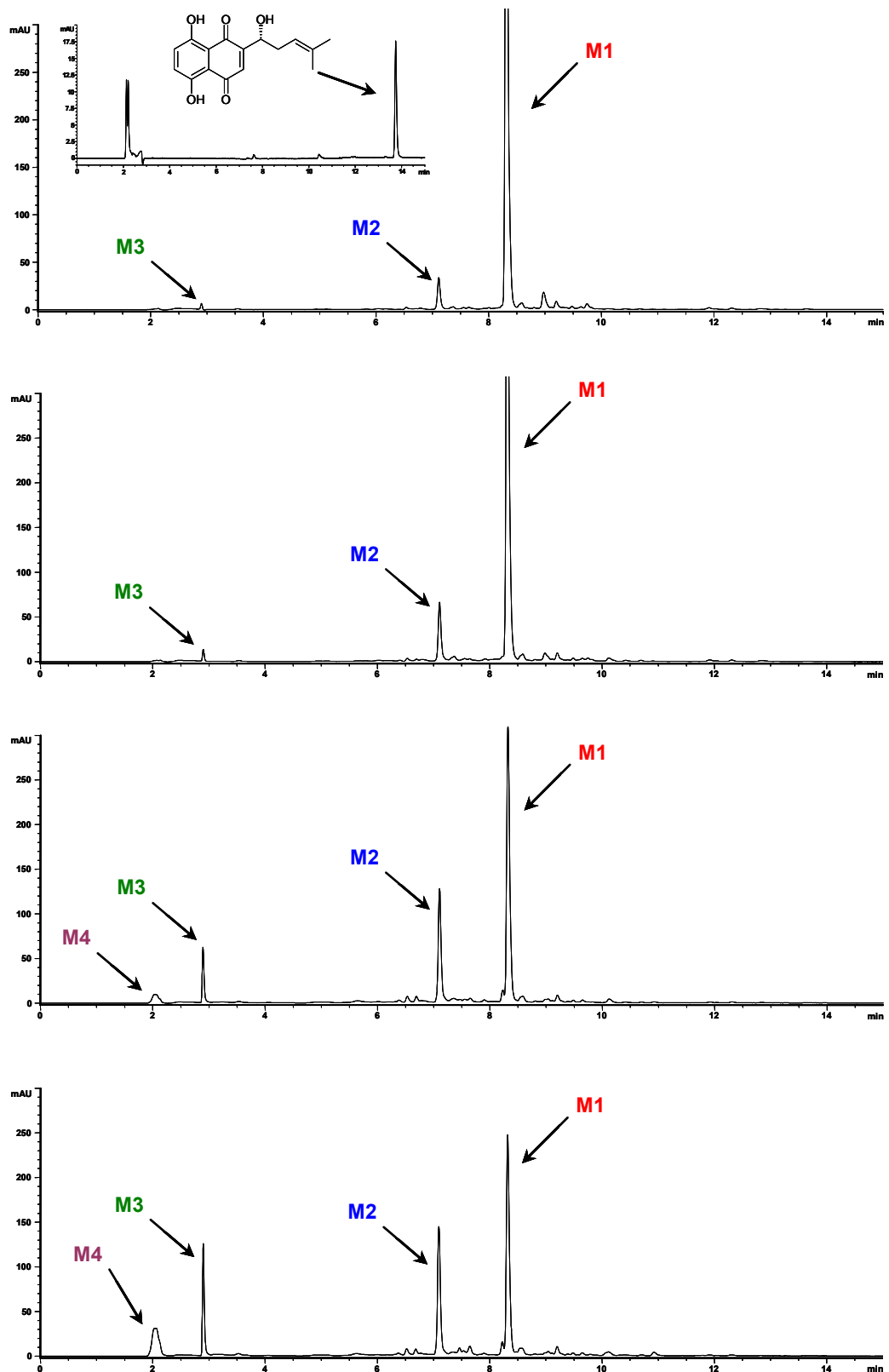


Fig. 43: Cromatogrammi rappresentativi relativi all'analisi HPLC di campioni ottenuti incubando alcaicina (0.5 mM) con GSH (5 mM) in NH_4HCO_3 (0.1 M) a pH 7.7 per diversi intervalli di tempo.

I dati ottenuti indicano chiaramente una progressiva e rapida scomparsa dell'alcannina dal mezzo di incubazione, tanto che già dopo un minuto il picco ad essa corrispondente ($t_r=13.7$ min) non è più visibile, con la formazione, in funzione del tempo, di almeno quattro prodotti di reazione denominati rispettivamente M1, M2, M3 e M4. L'andamento temporale delle altezze/aree dei picchi M2, M3 e M4 suggerisce che questi prodotti possono derivare da M1 la cui area si riduce progressivamente nel tempo.

La frazione cromatografica relativa al picco M1 è stata quindi raccolta e analizzata mediante spettrometria di massa ESI-MS. Il peso molecolare fornito dall'analisi spettrometrica è risultato coerente con quello di un addotto in rapporto 1:1 glutatione:alcannina avente la struttura riportata in **Fig. 44** (PM=593.6).

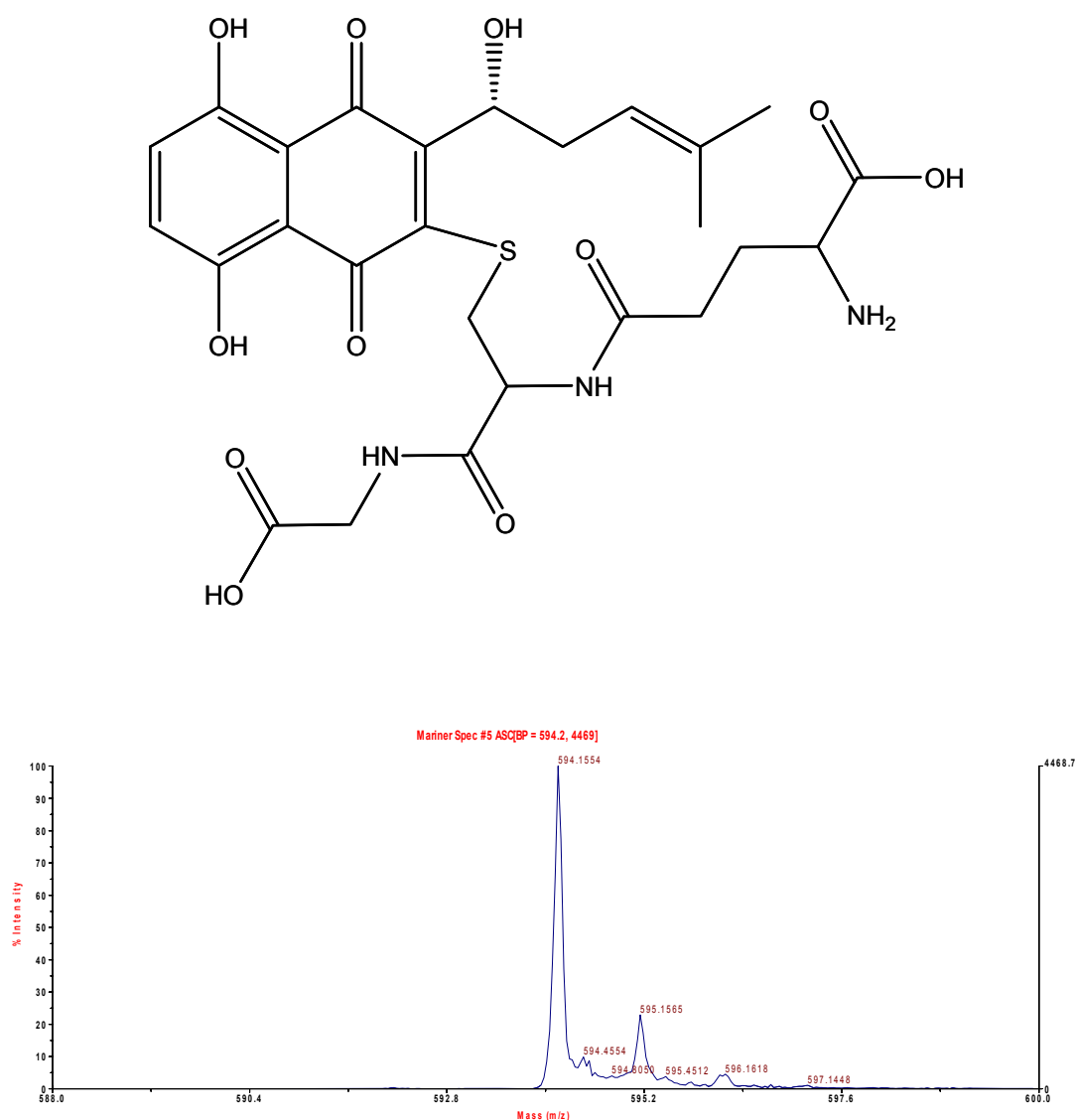


Fig. 44: Struttura chimica e spettro di massa del coniugato alcannina-GSH.

3.3.5. Valutazione dell'attività inibitoria della glutatione-alcannina nei confronti della GSTP1-1 umana

Il passo successivo è stato quello di valutare l'attività inibitoria del coniugato GSH-alcannina (M1) quale possibile inibitore della GSTP1-1. Con questi esperimenti, è stato osservato che, alle concentrazioni più elevate utilizzate (50 μM), se nel caso dell'alcannina e dei rispettivi derivati acetilati si aveva un'inibizione praticamente completa dell'enzima, nel caso del coniugato, l'inibizione era pari a circa il 60%. L'effetto inibitorio del coniugato M1 nei confronti dell'attività GSTP1-1 (Fig. 45). è risultata nettamente inferiore a quella esercitata dall'alcannina stessa da cui deriva (cfr Fig. 41). In particolare, mentre alla concentrazione di 50 μM l'attività enzimatica residua era pari al 10% nel caso dell'alcannina, nel caso del coniugato GSH-alcannina l'attività residua era pari al 40%.

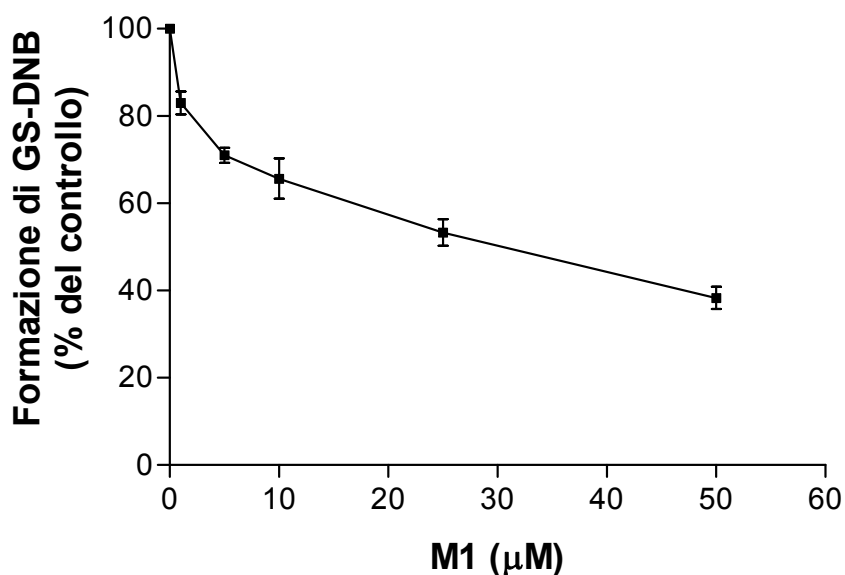


Fig. 45: Effetto inibitorio del coniugato alcannina-GSH sulla formazione di GS-DNB catalizzata da GSTP1-1 umana. La formazione di GS-DNB è espressa come percentuale dell'area del picco osservato in campioni di controllo. I risultati sono medie \pm E.S. di tre esperimenti svolti in duplicato.

Questi risultati, nel loro complesso, suggeriscono che l'effetto inibitorio esercitato dall'alcannina nei confronti di GSTP1-1 possa essere ascritto a due componenti: l'una mediata dal suo coniugato con il GSH (inibizione della GST da prodotto di reazione) e l'altra, vista la forte reattività dimostrata nei confronti del gruppo $-\text{SH}$ presente nel GSH, ad una inibizione enzimatica da parte dell'alcannina come tale, riconducibile, probabilmente, alla formazione di addotti con i gruppi sulfidrilici della proteina.

3.3.6. Studi di citotossicità in vitro

Un'ultima serie di esperimenti preliminari ha riguardato una comparazione della tossicità *in vitro* dell'alcannina e dei suoi derivati acetitati. A questo scopo cellule di melanoma umano A375 sono state incubate per 72 ore in assenza (controllo) e in presenza di concentrazioni crescenti (0.03 nM-100 μ M; n=6) di alcannina, di 1'-acetil alcannina o di 5,8,1'-triacetil alcannina. La sopravvivenza cellulare è stata valutata mediante il saggio di riduzione dell'MTT. I risultati di tali esperimenti (**Fig. 46**) indicano che i tre composti possiedono, nei confronti della linea cellulare bersaglio utilizzata, una citotossicità sovrapponibile (IC_{50} pari a 2.1 μ M, 2.1 μ M e 2.3 μ M rispettivamente per alcannina, 1'-acetil alcannina e 5,8,1'-triacetil alcannina).

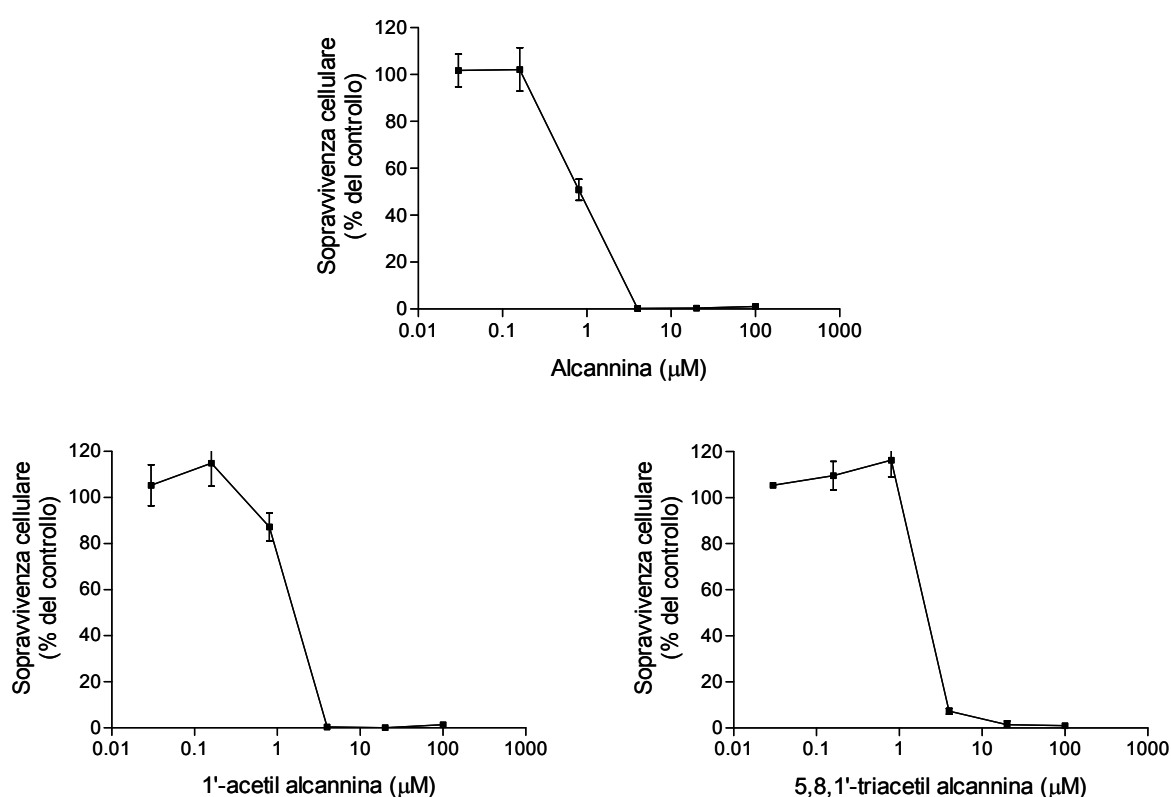


Fig. 46: Effetto citotossico di alcannina, 1'-acetil alcannina, 5,8,1'-triacetil alcannina su cellule di melanoma. Cellule di melanoma umano A375 sono state incubate per 72 ore in assenza (controllo) e in presenza di concentrazioni crescenti (0.03 nM-100 μ M; n=6) di alcannina o di 1'-acetil alcannina o di 5,8,1'-triacetil alcannina. I risultati sono medie di tre esperimenti svolti in duplicato.

alcannina), probabilmente dovuta ad una deplezione, da parte dei tre composti, dei livelli di GSH cellulare. Così come l'alcannina, infatti, anche i suoi derivati acetilati possiedono un sistema carbonilico α,β insaturo che conferisce loro una forte reattività nei confronti del GSH. Sono in programma, a tale scopo, esperimenti per valutare direttamente nelle cellule trattate con alcannina e derivati i livelli di GSH/GGSG.

Concludendo, questi risultati, seppur preliminari, hanno permesso di ottenere importanti informazioni. Innanzi tutto hanno dimostrato la bontà e l'affidabilità del metodo di determinazione dell'attività GST basato sulla separazione mediante HPLC delle miscele di incubazione da noi messo a punto. Infatti, i valori dei parametri cinetici della formazione del coniugato GS-DNB ottenuti nelle condizioni sperimentali descritte erano del tutto sovrapponibili a quelli presenti in letteratura, ottenuti con il classico metodo spettrofotometrico. Per quanto riguarda l'attività inibitoria dell'alcannina e dei suoi derivati acetilati sulla GSTP1-1 i risultati ottenuti indicano che:

- 1) possibili acetilazioni dei gruppi -OH dell'alcannina aumentano l'effetto inibitorio dei composti;
- 2) nell'azione inibitoria dell'alcannina sull'attività GST potrebbero essere coinvolte 2 componenti: un'azione diretta di inibizione dell'enzima dovuta ad un legame con i gruppi sulfidrilici della proteina stessa, data l'elevata reattività dimostrata dall'alcannina nei confronti del GSH, e una possibile azione inibitoria mediata dalla formazione di un prodotto di coniugazione alcannina-GSH.

Seppur preliminari, questi risultati incoraggiano nello studio di eventuali altri derivati dell'alcannina quali inibitori della GSTP1-1, al fine di un loro utilizzo quali adiuvanti in protocolli di chemioterapia antitumorale.

BIBLIOGRAFIA

- Arora, A., and Attwood, J. (2009). Common skin cancers and their precursors. *Surg. Clin. North Am.* 89, 703-712.
- Aruoma, O.I., Halliwell, B., Hoey, B.M., and Butler, J. (1989). The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic. Biol. Med.* 6, 593-597.
- Azzabi, A., Hughes, A.N., Calvert, P.M. et al. (2005). Phase I study of temozolomide plus paclitaxel in patients with advanced malignant melanoma and associated in vitro investigations. *Br. J. Cancer* 92, 1006-1012.
- Baars, A.J., Jansen, M., and Breimer, D.D. (1978). The influence of phenobarbital, 3-methylcholanthrene and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on glutathione S-transferase activity of rat liver cytosol. *Biochem. Pharmacol.* 27, 2487-2497.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Buzzell, R.A., and Zitelli, J.A. (1996). Favorable prognostic factors in recurrent and metastatic melanoma. *J. Am. Acad. Dermatol.* 34, 798-803.
- Carlson, J.A., Ross, J.S., and Slominski, A.J. (2009). New techniques in dermatopathology that help to diagnose and prognosticate melanoma. *Clin. Dermatol.* 27, 75-102.
- Chin, L., Garraway, L.A., and Fisher, D.E. (2006). Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. *Genes Dev.* 20, 2149-2182.
- Clementi, F., and Fumagalli, G. (2004). *Farmacologia generale e molecolare: UTET*.
- Cooper, C.R., Chay, C.H., and Pienta, K.J. (2002). The role of alpha(v)beta(3) in prostate cancer progression. *Neoplasia* 4, 191-194.
- Das, M., Singh, S.V., Mukhtar, H., and Awasthi, Y.C. (1986). Differential inhibition of rat and human glutathione S-transferase isoenzymes by plant phenols. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 141, 1170-1176.
- de Groot, F.M., van Berkom, L.W., and Scheeren, H.W. (2000). Synthesis and biological evaluation of 2'-carbamate-linked and 2'-carbonate-linked prodrugs of paclitaxel: selective activation by the tumor-associated protease plasmin. *J. Med. Chem.* 43, 3093-3102.
- Depeille, P., Cuq, P., Passagne, I., Evrard, A., and Vian, L. (2005). Combined effects of GSTP1 and MRP1 in melanoma drug resistance. *Br. J. Cancer* 93, 216-223.
- Doben, A.R., and MacGillivray, D.C. (2009). Current concepts in cutaneous melanoma: malignant melanoma. *Surg. Clin. North Am.* 89, 713-725.

- Gunnarsdottir, S., and Elfarra, A.A. (1999). Glutathione-dependent metabolism of cis-3-(9H-purin-6-ylthio)acrylic acid to yield the chemotherapeutic drug 6-mercaptopurine: evidence for two distinct mechanisms in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290, 950-957.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., and Jakoby, W.B. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139.
- Hinchman, C.A., Matsumoto, H., Simmons, T.W., and Ballatori, N. (1991). Intrahepatic conversion of a glutathione conjugate to its mercapturic acid. Metabolism of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene in isolated perfused rat and guinea pig livers. *J. Biol. Chem.* 266, 22179-22185.
- Henderson, C.J., and Wolf, C.R. (2005). Disruption of the glutathione transferase pi class genes. *Methods Enzymol.* 401, 116-135.
- Hofmeister, V., Schrama, D., and Becker, J.C. (2008). Anti-cancer therapies targeting the tumor stroma. *Cancer Immunol. Immunother.* 57, 1-17.
- Khojasteh-Bakht, S.C., Nelson, S.D., and Atkins, W.M. (1999). Glutathione S-transferase catalyzes the isomerization of (R)-2-hydroxymenthofuran to mintlactones. *Arch. Biochem. Biophys.* 370, 59-65.
- Kirkwood, J.M., Richards, T., Zarour, H.M., Sosman, J., Ernstoff, M., Whiteside, T.L., Ibrahim, J., Blum, R., Wieand, S., and Mascari, R. (2002). Immunomodulatory effects of high-dose and low-dose interferon alpha2b in patients with high-risk resected melanoma: the E2690 laboratory corollary of intergroup adjuvant trial E1690. *Cancer* 95, 1101-1112.
- Meyskens, F.L., Jr, Farmer, P., and Fruehauf, J.P. (2001). Redox regulation in human melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Res.* 14, 148-154. Miller, A.J., and Mihm, M.C., Jr (2006). Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 355, 51-65.
- Moridani, M.Y. (2006). Biochemical basis of 4-hydroxyanisole induced cell toxicity towards B16-F0 melanoma cells. *Cancer Lett.* 243, 235-245.
- Moridani, M.Y., Cheon, S.S., Khan, S., and O'Brien, P.J. (2003). Metabolic activation of 3-hydroxyanisole by isolated rat hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.* 142, 317-333.
- Morrison, M.E., Yagi, M.J., and Cohen, G. (1985). In vitro studies of 2,4-dihydroxyphenylalanine, a prodrug targeted against malignant melanoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 2960-2964.
- Mouawad, R., Sebert, M., Michels, J., Bloch, J., Spano, J.P., and Khayat, D. (2009). Treatment for metastatic malignant melanoma: Old drugs and new strategies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*
- Neto, D.S., Pantaleao, L., de Sa, B.C., and Landman, G. (2007). Alpha-v-beta3 integrin expression in melanocytic nevi and cutaneous melanoma. *J. Cutan. Pathol.* 34, 851-856.
- Niethammer, A., Gaedicke, G., Lode, H.N., and Wrasidlo, W. (2001). Synthesis and preclinical characterization of a paclitaxel prodrug with improved antitumor activity and water solubility. *Bioconjug. Chem.* 12, 414-420.

- Pearce, R.E., McIntyre, C.J., Madan, A. et al. (1996). Effects of freezing, thawing, and storing human liver microsomes on cytochrome P450 activity. *Arch. Biochem. Biophys.* 331, 145-169.
- Quintieri, L., Rosato, A., Napoli, E., Sola, F., Geroni, C., Floreani, M., and Zanovello, P. (2000). In vivo antitumor activity and host toxicity of methoxymorpholinyl doxorubicin: role of cytochrome P450 3A. *Cancer Res.* 60, 3232-3238.
- Raza, H., Lakhani, M.S., Ahmed, I., John, A., Morgenstern, R., and Montague, W. (1997). Tissue specific expression of glutathione S-transferases, glutathione content and lipid peroxidation in camel tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 118, 829-835.
- Riley, P.A. (2003). Melanogenesis and melanoma. *Pigment Cell Res.* 16, 548-552.
- Roshy, S., Sloane, B.F., and Moin, K. (2003). Pericellular cathepsin B and malignant progression. *Cancer Metastasis Rev.* 22, 271-286.
- Ruzza, P., Quintieri, L., Osler, A., Calderan, A., Biondi, B., Floreani, M., Guiotto, A., and Borin, G. (2006). Fluorescent, internally quenched, peptides for exploring the pH-dependent substrate specificity of cathepsin B. *J. Pept. Sci.* 12, 455-461.
- Ruzza, P., Rosato, A., Rossi, C.R., Floreani, M., and Quintieri, L. (2009). Glutathione transferases as targets for cancer therapy. *Anticancer Agents Med. Chem.* 9, 763-777.
- Sabatino, M., Stroncek, D.F., Klein, H., Marincola, F.M., and Wang, E. (2009). Stem cells in melanoma development. *Cancer Lett.* 279, 119-125.
- Schatton, T., and Frank, M.H. (2008). Cancer stem cells and human malignant melanoma. *Pigment Cell. Melanoma Res.* 21, 39-55.
- Schroter, C.J., Braun, M., Englert, J., Beck, H., Schmid, H., and Kalbacher, H. (1999). A rapid method to separate endosomes from lysosomal contents using differential centrifugation and hypotonic lysis of lysosomes. *J. Immunol. Methods* 227, 161-168.
- Shih, T.W., Shealy, Y.F., Strother, D.L., and Hill, D.L. (1986). Nonenzymatic isomerization of all-trans- and 13-cis-retinoids catalyzed by sulfhydryl groups. *Drug Metab. Dispos.* 14, 698-702.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76-85.
- Soengas, M.S., and Lowe, S.W. (2003). Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene* 22, 3138-3151.
- Temming, K., Schiffelers, R.M., Molema, G., and Kok, R.J. (2005). RGD-based strategies for selective delivery of therapeutics and imaging agents to the tumour vasculature. *Drug Resist Updat* 8, 381-402.
- Thompson, J.F., Scolyer, R.A., and Kefford, R.F. (2005). Cutaneous melanoma. *Lancet* 365, 687-701.

- Turella, P., Pedersen, J.Z., Caccuri, A.M., De Maria, F., Mastroberardino, P., Lo Bello, M., Federici, G., and Ricci, G. (2003). Glutathione transferase superfamily behaves like storage proteins for dinitrosyl-diglutathionyl-iron complex in heterogeneous systems. *J. Biol. Chem.* 278, 42294-42299.
- Wani, M.C., Taylor, H.L., Wall, M.E., Coggon, P., and McPhail, A.T. (1971). Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* 93, 2325-2327.
- Zimniak, P., Nanduri, B., Pikula, S., Bandorowicz-Pikula, J., Singhal, S.S., Srivastava, S.K., Awasthi, S., and Awasthi, Y.C. (1994). Naturally occurring human glutathione S-transferase GSTP1-1 isoforms with isoleucine and valine in position 104 differ in enzymic properties. *Eur. J. Biochem.* 224, 893-899.

Parte dei risultati riportati in questa Tesi di Dottorato di Ricerca sono stati pubblicati in:

- Ruzza P, Rosato A, **Nassi A**, Rondina M, Zorzin M, Rossi CR, Floreani M and Quintieri L. Synthesis and preliminary in vitro biological evaluation of 4-[(4-hydroxyphenyl)sulfanyl]but-3-en-2-one], a 4-mercaptophenol derivative designed as a novel bifunctional antimelanoma agent.

J Med Chem 2009; 52, 4973-6. (I.F: 4.84).

- Ruzza P, **Nassi A**, Marchiani A, Rondina M, Rosato A, Rossi CR, Mammi S, Floreani M, Quintieri L.

Design and synthesis of tripartate paclitaxel prodrug for melanoma therapy. “*Proceedings of 30th European Peptide Symposium, Helsinki.*” pg. 554-555.

Parte dei risultati riportati sono inoltre stati presentati al:

- 30th European Peptide Symposium, Helsinki, 31/08-05/09 2008.

[Ruzza P, **Nassi A**, Marchiani A, Rondina M, Rosato A, Rossi CR, Mammi S, Floreani M, Quintieri L. Design and synthesis of tripartate paclitaxel prodrug for melanoma therapy.

J. Peptide Sci. 2008; suppl. vol.4 (issue 8), 159.]

- al 34° Congresso Nazionale della Società Italiana di Farmacologia, Rimini 14-17 ottobre 2009.

[**Nassi A.**, Ruzza P., Rosato A., Rondina M., Rossi C.R., Floreani M., Quintieri L. Preliminary in vitro biological evaluations of new prodrugs designed as antimelanoma agents.]