



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE FARMACEUTICHE

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN

BIOLOGIA E MEDICINA DELLA RIGENERAZIONE

INDIRIZZO INGEGNERIA DEI TESSUTI E DEI TRAPIANTI

CICLO XXII

TESI DI DOTTORATO

**STUDIO DEGLI EFFETTI CITOTOSSICI E ANTIANGIOGENICI
DI DERIVATI 4-AMINOCINAZOLINICI E
FENIL-PIRROLOCHINOLINONICI**

Direttore della Scuola: CH.MO PROF. PIER PAOLO PARNIGOTTO

Coordinatore d'indirizzo: CH.MO PROF. MARIA TERESA CONCONI

Dottorando: DOTT. LUCA URBANI

Abbreviazioni

A431: cellule tumorali di adenocarcinoma squamoso vulvare umano

ABTS: 2',2'-azido-di-(3-tilbenzotiazidino solfato)

AKT: protein chinasi B (o PKB)

Ang2: angiopoietina-2

AP: fosfatasi alcalina

Arg: arginina

Asp: acido aspartico

ATP: adenosin-trifosfato

CAM: membrana corioallantoidea di pollo

CYP: citocromo P450

Cys: cisteina

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindolo

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DNA: acido deossiribonucleico

E1: estrone

E2: estradiolo

EC: cellule endoteliali

ECM: matrice extracellulare

EGF: *Epidermal Growth Factor*

EGFR: recettore per EGF

eNOS: nitrossido sintetasi endoteliale

ERK: *extra-cellular signal-regulated kinases*

FBS: *Fetal Bovine Serum*

FCS: *Fetal Calf Serum*

FGF: *Fibroblast Growth Factor*

FGFR: recettore per FGF ad elevata affinità

Flt-1: *fms-like tyrosine kinase-1*

Gln: glutammina

Glu: acido glutammico

Gly: glicina

GTP: guanositri-fosfato

HB-EGF: *heparin-binding growth factor*

HCl: acido cloridrico
HRP: perossidasi del rafano
HSPG: *heparan sulfate proteoglycans*
HUVEC: cellule endoteliali da vena di cordone ombelicale umano
IAPs: proteine inibitrici dell'apoptosi
IC₅₀: concentrazione che provoca il 50% di inibizione
IGF-I: *Insulin-like Growth Factor*
IL: interleuchina
KDR: *kinase insert domain-containing receptor*
Leu: leucina
MAb: anticorpi monoclonali
MAP: *mitogen-activated-protein*
MAPK: *mitogen-activated protein kinases*
Met: metionina
MMP: metalloproteasi della matrice
MTT: 3-[4,5-dimetiltiazolo-2-il]-2,5-difeniltetrazoliobromuro
NIH3T3: fibroblasti murini embrionali
NO: ossido nitrico
PA: attivatore del plasminogeno
PBS: tampone sodio-fosfato
PI3K: fosfatidilinositolo-3 chinasi
PKC: protein chinasi C
PDGF: *Platelet-derived Growth Factor*
PECAM: *platelet endothelial cell adhesion molecule* (o CD31)
Pz: pozzetto
RNA: acido ribonucleico
RSK: *ribosomal subunit kinase*
STAT: *Signal Transducers and Activator of Transcription*
TA: temperatura ambiente
TdT: deossinucleotidiltransferasi terminale
TGF- β : *Transforming Growth Factor*
Thr: treonina
TIPM: Inibitori tissutali delle metalloproteasi
TKI: inibitori tirosin-chinasici
TNF- α : *Tumor Necrosis Factor*
TSP-1: Trombospondina-1
TUNEL: *TdT mediated dUTP nick end labelling*

VE-caderine: caderine dell'endotelio vascolare

VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*

VEGFR: recettore per VEGF

λ_{ecc} : lunghezza d'onda di eccitazione

λ_{em} : lunghezza d'onda di emissione

RIASSUNTO

Questo lavoro di dottorato si è focalizzato sullo *screening* dell'attività citotossica e antiangiogenica *in vitro* e *in vivo* di due serie di composti di nuova sintesi: derivati 4-aminochinazolinici, inibitori tirosin-chinasici per il recettore EGFR, e derivati fenil-pirrolochinolinonici, agenti antimitotici ad attività antitubulinica.

EGFR risulta sovra-espresso in numerose forme tumorali, nelle quali la sua attivazione risulta priva di controllo, comportando alterazione dei processi di proliferazione e differenziamento cellulari. Tra gli approcci terapeutici basati su composti in grado di inibire EGFR attraverso il *binding* ai suoi diversi domini, appare particolarmente interessante lo sviluppo di inibitori delle tirosin-chinasi, che agiscono legandosi alla porzione intracellulare del recettore. EGFR svolge un ruolo centrale anche nell'angiogenesi tumorale in quanto presente anche sulle cellule endoteliali localizzate all'interno della massa tumorale. Un'alterata espressione o attivazione del recettore di EGF è stata identificata in numerosi tumori solidi e si è visto che bloccando EGFR di cellule epiteliali neoplastiche si ottiene un effetto antiangiogenico dovuto soprattutto alla diminuzione di fattori proangiogenici nell'ambiente tumorale. Utilizzando cellule tumorali A431, sovraesprimenti EGFR, è stata valutata l'attività antitumorale di 18 composti, strutturalmente analoghi di PD153035 e Vandetanib, ed in cui erano stati introdotti un ciclo a 5, 6 o 7 atomi e alcuni sostituenti all'anilina a diversa lipofilia e ingombro sterico. I derivati che presentavano la ciclizzazione dei due ponti metossilici del PD153035, con formazione di un eterociclo a 6 atomi, si sono dimostrati più attivi nell'inibire la vitalità delle A431 anche attraverso l'induzione del processo apoptotico e in misura maggiore rispetto ai TKI di riferimento. I risultati ottenuti hanno inoltre suggerito che i sostituenti all'anello dell'anilina possono modulare l'attività antiproliferativa sia in senso positivo che negativo. In particolare, l'aumento del carattere lipofilo della struttura si traduce nell'induzione di un effetto citotossico paragonabile o maggiore di quello osservabile in presenza di PD153035. E' stato già dimostrato che i TKI interagiscono con il recettore, non solo a livello del suo sito catalitico, ma si inseriscono anche in un'adiacente tasca lipofila. Quindi l'inserimento di gruppi non polari (come un gruppo metilico), o comunque caratterizzati da elevata lipofilia (gruppo trifluorometilico), aumentano l'affinità del composto nei confronti della proteina e possono potenziare l'attività citotossica. Un'ulteriore conferma della maggiore affinità indotta dai

sostituenti non polari è data dai 3 derivati che presentano un gruppo fenilico sull'anilina, i quali hanno dimostrato un effetto antiproliferativo che si è manifestato anche in seguito a rimozione della sostanza dal mezzo di coltura. A conferma delle considerazioni sul rapporto struttura/attività, i composti che presentano l'introduzione dell'eterociclo a 6 atomi e il sostituyente fenilico all'anilina hanno inoltre dimostrato una maggiore attività antiangiogenica, attraverso saggi condotti su cellule endoteliali HUVEC. Questi derivati, infatti, erano in grado di inibire le varie tappe *in vitro* del processo angiogenico, quali proliferazione e migrazione cellulare e formazione di strutture simil-capillari su Matrigel, anche in presenza di citochine proangiogeniche esogene, e l'angiogenesi *in vivo*, in misura maggiore rispetto ai composti di riferimento.

Gli agenti anti-mitotici sono una classe di composti utilizzati in terapia antitumorale per l'elevata attività antiproliferativa. Un esempio di sostanze attive in questo senso sono i flavoni, composti polifenolici presenti in natura in grado di inibire la polimerizzazione della tubulina, componente base dei microtubuli. Interferendo sulla dinamica di assemblaggio-disassemblaggio degli α,β -eterodimeri di tubulina, inducono la morte cellulare senza provocare danni al DNA. Tale meccanismo d'azione è anche alla base dell'attività antiangiogenica, manifestata da alcuni composti di questa classe. I derivati fenil-pirrolochinolinonici presentavano geometria [3,2-*f*] o geometria [2,3-*h*] e diversi sostituenti introdotti alla chinolina. La valutazione della loro attività antiangiogenica ha mostrato la capacità di alcuni composti, di entrambe le categorie, di inibire il processo di neovascolarizzazione sia *in vitro* che *in vivo* a concentrazioni non citotossiche, e di contrastare gli effetti stimolatori di FGF-2, importante citochina coinvolta nella progressione e angiogenesi tumorale.

SUMMARY

This work focused on the evaluation for cytotoxic activity and *in vitro* and *in vivo* anti-angiogenic effects of two new synthetic compound classes: the tyrosine kinase inhibitors (TKIs) 4-anilinoquinazoline, against EGFR, and microtubule-affecting pyrroloazaflavone compounds named phenyl-pyrroloquinolinones.

The epidermal growth factor receptor (EGFR) is a trans-membrane receptor tyrosine kinase that belongs to the ErbB family of receptors. EGFR dimerization results in the induction of intracellular protein-tyrosine kinase activity leading to signal transduction pathways that regulate cell differentiation, growth, migration, and apoptosis. EGFR is constitutively expressed by many cell types, such as epithelial cells. EGFR is often mutated and/or overexpressed in many tumors. EGFR dysregulated signaling leads to abnormal cell proliferation, invasion of surrounding tissues, and increased angiogenesis. Therefore, EGFR represents a valuable target for the design of anticancer agents. Indeed, several strategies have been explored to target EGFR and tyrosine kinase inhibitors (TKIs) seem to be the most promising approaches. TKIs link the ATP-binding pocket of the cytoplasmic domain to inhibit EGFR phosphorylation. The tumor growth depends on vascularization and subsequently it can be inhibited by a strictly control of neo-vessel formation inside the tumor mass. It is known that the pharmacological inhibition of EGFR can decrease VEGF expression and consequently angiogenesis in many tumor types. Thus, several inhibitors of both EGFR and VEGFR have been designed and studied. In this context, anti-proliferative activity of 6,7-ethylene(methylen, propylenen) diossi-N-(3-phenyl)-4-amino quinazolines, bearing various substituents at 3' position of the phenyl group, in analogy of the EGFR-specific TKIs PD153035 and Vandetanib, was assessed on A431 and NIH3T3 cells, overexpressing and not expressing EGFR, respectively. The results obtained showed that ethylenedioxy derivatives were more cytotoxic than the corresponding methylenedioxy and propylenedioxy ones also with a strong increase in the apoptotic rate when compared to not treated cultured. On the other hand, all compounds exert a quite similar effect on EGFR phosphorylation. The presence of non polar groups at 3' position of the phenyl group enhanced the antiproliferative activity. Indeed, compounds bearing methyl or trifluoromethyl groups at 3' position appeared more active than those substituted with 2 halogen atoms. Since the 4-aniline group interacts with a hydrophobic pocket of EGFR, we can suppose that the presence of non polar groups improves the interaction with this site leading to an increase in the

affinity towards EGFR. As a confirmation of these considerations, substituting the bromine atom with functional groups possessing high lipophilia and steric hindrance, like a phenylic group, lead to an anti-proliferative effect that remains also after removal from the culture media. Moreover, the ethylendioxy derivatives with phenylic group at 3' position also shows potent anti-angiogenic effects on *in vitro* assays with human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). Indeed, more than reference compounds, these derivatives affect all the angiogenic process phases, such as cell proliferation and migration and capillary-like tubular formation on Matrigel, also after pro-angiogenic modulators stimulation. Finally, unlike PD153035, ethylendioxy phenylic compounds decrease *in vivo* angiogenesis, blocking capillary formation on Matrigel *plug* assays.

Small molecular drugs that induce extensive necrosis in tumour as a result of vascular collapse, including flavonoids and tubulin polymerizing/binding agents, represent examples of vascular targeting agents. The main mechanism of action of tubulin binding agents is believed to be the selective disruption of the cytoskeleton of proliferating endothelial cells that results in tumor vessel occlusion and extensive necrosis. The aim of the present work is to investigate whether microtubule-affecting pyrroloazaflavone compounds, new tricycle structures, as modified flavones, known naturally occurring biologically active compounds, were able to provoke anti-angiogenic effects in the same way of vinblastine but at not cytotoxic concentrations. Therefore, we evaluated the *in vitro* and *in vivo* effects on angiogenesis induced by some pyrroloazaflavones (7-phenyl-3*H*-pyrrolo[3,2-*f*]quinolinones and 2-phenyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*h*]quinolinones), using vinblastine as reference compound. Our results on HUVECs indicate that some 2-PyQs and 7-PyQs are able, at not cytotoxic concentrations and like vinblastine, to i) exert both *in vitro* and *in vivo* anti-angiogenic activity, and ii) counteract the pro-angiogenic effects of fibroblast growth factor-2 (FGF-2), well-known cytokine involved in tumor growth.

INDICE

ABBREVIAZIONI	Pag.I
RIASSUNTO	Pag.IV
SUMMARY	Pag.VI
INTRODUZIONE	Pag.1
1. Il tumore	Pag.1
2. La terapia anticancro	Pag.3
3. L'angiogenesi	Pag.4
Inizio della risposta angiogenica	Pag.6
Migrazione delle cellule endoteliali e proliferazione	Pag.6
Formazione del capillare e maturazione dei vasi	Pag.7
3.1 Regolazione dell'angiogenesi	Pag.7
3.1.1 Stimolatori endogeni dell'angiogenesi	Pag.8
3.1.2 Inibitori endogeni dell'angiogenesi	Pag.11
3.2 Angiogenesi patologica	Pag.12
3.2.1 Angiogenesi tumorale	Pag.13
3.2.2 Angiogenesi come <i>target</i> antitumorale	Pag.15
4. EGFR nello sviluppo tumorale	Pag.16
4.1 Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)	Pag.16
4.1.1 Attivazione di EGFR	Pag.18
4.1.2 Ruolo di EGF in fisiologia e patologia	Pag.22
4.1.3 EGFR e cancro	Pag.22
4.1.4 Approcci terapeutici	Pag.24

5. Agenti antimitotici nella terapia antitumorale	Pag.32
5.1 Agenti antimitotici	Pag.32
5.2 Flavoni e derivati	Pag.33
SCOPO	Pag.36
MATERIALI E METODI	Pag.38
1. Composti chimici	Pag.38
1.1 Derivati 4-aminochinazolinici	Pag.38
1.2 Derivati fenil-pirrolochinolinonici	Pag.42
2. Colture cellulari	Pag.45
2.1 A431	Pag.45
2.2 NIH3T3	Pag.45
2.3 HUVEC	Pag.45
3. Effetti sulla proliferazione cellulare	Pag.46
4. Valutazione del tasso di apoptosi	Pag.48
4.1 Derivati 4-aminochinazolinici	Pag.48
4.2 Derivati fenil-pirrolochinolinonici	Pag.50
5. Effetti sulla proliferazione cellulare indotta da citochine esogene	Pag.51
5.1 Derivati 4-aminochinazolinici	Pag.51
5.1.1 Modulazione dell'effetto di EGF esogeno	Pag.51
5.2 Derivati fenil-pirrolochinolinonici	Pag.52
5.2.1 Modulazione dell'effetto di FGF-2 esogeno	Pag.52
6. Effetti sulla fosforilazione di EGFR	Pag.53
7. Migrazione cellulare	Pag.54

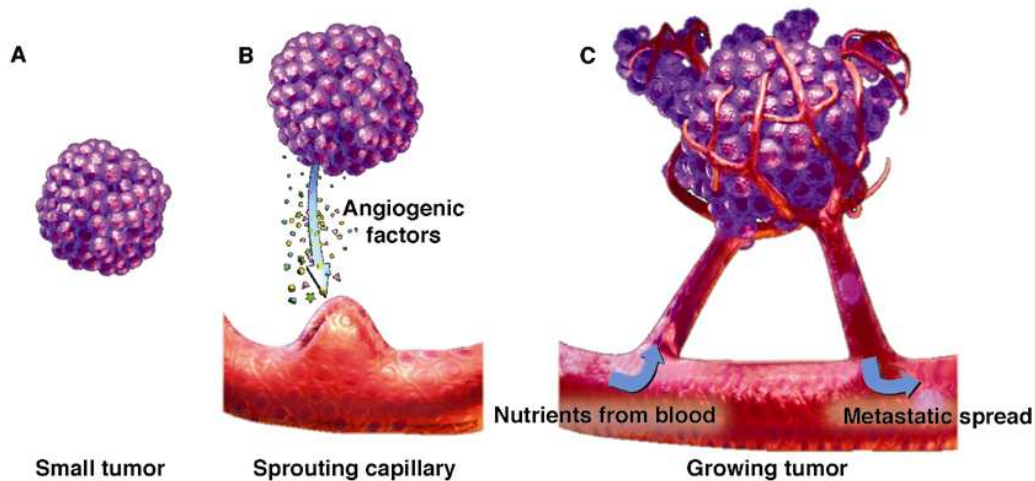
8. Morfogenesi <i>in vitro</i>	Pag.56
8.1 Effetti sulla morfogenesi <i>in vitro</i>	Pag.57
8.2 Effetti sulla morfogenesi <i>in vitro</i> indotta da citochine esogene	Pag.58
9. Determinazione del rilascio di VEGF nel terreno di coltura	Pag.59
10. Determinazione del rilascio di FGF-2 nel terreno di coltura	Pag.60
11. Saggio <i>in vivo</i> con <i>plug</i> di Matrigel	Pag.62
11.1 Impianto dei <i>plug</i> di Matrigel	Pag.63
11.2 Determinazione del contenuto di emoglobina	Pag.63
11.3 Analisi istologica	Pag.64
11.3.1 Inclusione in paraffina	Pag.64
11.3.2 Colorazione	Pag.64
RISULTATI	Pag.66
1. Derivati 4-aminochinazolinici	Pag.66
a) Valutazione <i>in vitro</i> dell'attività citotossica	Pag.66
Effetti sulla proliferazione cellulare	Pag.66
Effetti sulla fosforilazione di EGFR	Pag.73
Effetti sulla proliferazione cellulare indotta da EGF esogeno	Pag.74
b) Valutazione <i>in vitro</i> dell'attività antiangiogenica	Pag.75
Effetti sulla proliferazione cellulare	Pag.75
Effetti sulla fosforilazione di EGFR	Pag.79
Effetti sulla migrazione cellulare	Pag.80
Morfogenesi su Matrigel	Pag.82
Effetti sul rilascio di citochine esogene	Pag.84
Effetti sulla morfogenesi indotta da citochine esogene	Pag.86
c) Valutazione <i>in vivo</i> dell'attività antiangiogenica	Pag.93
2. Derivati fenil-pirrolochinolinonici	Pag.95

Effetti sulla proliferazione cellulare	Pag.95
Effetti sulla migrazione cellulare	Pag.100
Morfogenesi su Matrigel	Pag.102
Effetti sulla proliferazione cellulare indotta da FGF-2 esogeno	Pag.103
Effetti sulla morfogenesi indotta da FGF-2 esogeno	Pag.104
Valutazione <i>in vivo</i> dell'attività antiangiogenica	Pag.106
DISCUSSIONE	Pag.108
1. Derivati 4-aminochinazolinici	Pag.108
2. Derivati fenil-pirrolochinolinonici	Pag.113
BIBLIOGRAFIA	Pag.117

INTRODUZIONE

1. Il tumore

Le cellule cancerose sono caratterizzate da due proprietà ereditabili: 1) si riproducono eludendo le normali limitazioni di crescita e di divisione delle cellule e 2) invadono e colonizzano territori normalmente riservati ad altre cellule. Il cancro deriva da un processo in cui una popolazione iniziale di cellule, discendenti da un singolo antenato mutato, evolve tramite cicli successivi di cambiamenti casuali ereditati seguiti da selezione naturale. Ad ogni stadio una cellula acquisisce una mutazione o una modificazione epigenetica addizionale che le conferisce un vantaggio selettivo sulle cellule circostanti, rendendola più capace di crescere vigorosamente nel suo ambiente. Un ambiente, quello del tumore, che può essere particolarmente sfavorevole, con bassi livelli di ossigeno, scarsità di nutrienti e le barriere naturali alla crescita presentate dai tessuti normali circostanti. I tumori crescono in modo improvviso e irregolare quando avvengono ulteriori modificazioni vantaggiose ereditate e le cellule che le possiedono prosperano. Esistono, infatti, molti sistemi differenti di regolazione che devono essere alterati prima che una cellula possa liberarsi delle normali limitazioni e comportarsi come una cellula cancerosa asociale. Le limitazioni sono di varia natura e le cellule tumorali incontrano nuovi ostacoli all'ulteriore espansione in ogni stadio della loro evoluzione. Richiamando nuovamente l'attenzione sull'ossigeno e i nutrienti, questi elementi non sono limitanti finché il tumore non raggiunge un diametro di uno o due millimetri, quando le cellule della parte più interna del tumore potrebbero non avere un accesso adeguato a queste risorse essenziali. Per raggiungere grandi dimensioni, un tumore deve quindi procurarsi un adeguato rifornimento di sangue che gli assicuri ossigeno e nutrienti sufficienti. Di conseguenza l'angiogenesi, la formazione di nuovi vasi sanguigni, è necessaria affinché il tumore cresca oltre una certa dimensione. I tumori, al pari dei tessuti normali, richiamano l'apporto di sangue secernendo segnali angiogenici che vengono prodotti in risposta all'ipossia. I vasi non solo garantiscono l'apporto di ossigeno e nutrienti al tumore, ma forniscono anche una via di fuga alle sue cellule per formare metastasi. Le metastasi, responsabili del 90% delle morti associate ai tumori, sono l'aspetto più letale – e meno compreso – del cancro.



Sviluppo di nuovi vasi nell'angiogenesi tumorale (Seimann, 2002).

Affinché una cellula cancerosa metastatizzi, questa deve liberarsi dai vincoli che mantengono le cellule normali al loro posto e che impediscono l'invasione dei tessuti circostanti. Prima che possa metastatizzare vantaggiosamente, ovvero stabilire colonie in organi distanti, una cellula deve penetrare in un vaso sanguigno attraversando la lamina basale e l'endotelio che delimita il vaso in modo da entrare nel sangue, uscire dal vaso in qualche altra zona del corpo e crescere in questa nuova sede. Si forma inizialmente un piccolo gruppo di cellule noto come micrometastasi, alcune delle quali produrranno cellule che sopravvivono e proliferano vigorosamente nel nuovo ambiente, un processo noto come colonizzazione. Il basso tasso di colonizzazione riflette la rarità delle cellule che possiedono le speciali caratteristiche necessarie, ovvero sia un carattere di staminalità, che permette di dividersi senza alcun limite, sia una capacità di organizzarsi e sopravvivere in un ambiente estraneo. Le cellule normali dipendono da segnali di sopravvivenza extracellulari che sono relativamente abbondanti nel loro ambiente normale; se private di questi segnali, le cellule attivano il programma di morte cellulare e vanno in apoptosi. Le cellule cancerose, sia del tumore primario che delle micrometastasi, a differenza di quelle sane, sono spesso resistenti all'apoptosi e, per crescere e dividersi, sono dipendenti più dai segnali prodotte da esse stesse che da quelli provenienti dalle altre cellule (Albert *et al.*, V edizione).

2. La terapia anticancro

Le terapie anticancro devono trarre vantaggio da alcune anomalie molecolari delle cellule cancerose che le contraddistinguono da quelle normali. La maggior parte dei farmaci anticancro danneggia il DNA, provocando soprattutto la morte delle cellule cancerose in quanto queste cellule mutanti hanno una capacità ridotta di sopravvivere al danno. Tuttavia, le cellule cancerose variano enormemente nelle loro risposte a tali trattamenti, riflettendo, probabilmente, i tipi particolari di difetti che hanno nella riparazione del DNA, nei punti di controllo del DNA e nel controllo dell'apoptosi. Quest'ultimo processo, in particolare, è spesso la causa principale di morte cellulare indotta dal danneggiamento del DNA, e le cellule tumorali sovente acquisiscono difetti in quei sistemi di controllo che attivano l'apoptosi in risposta a questo danno (Albert *et al.*, V edizione).

La crescente comprensione della biologia delle cellule cancerose e della progressione tumorale sta portando a metodi migliori per trattare la malattia. Dato che le cellule tumorali presentano un'incontrollata proliferazione cellulare, l'espressione o la sovraespressione di alcuni recettori sulla loro membrana plasmatica, ad esempio, rappresenta un ottimo *target* antitumorale, nei casi in cui tali recettori regolino attivamente le diverse fasi del ciclo cellulare. Anche molecole citoplasmatiche coinvolte nel controllo della proliferazione e migrazione cellulare possono costituire ottimi *target* antitumorali, ad esempio gli enzimi attivati nelle varie cascate del segnale, come le chinasi oncogeniche, o le proteine del citoscheletro.

Tuttavia, l'instabilità genetica può rappresentare un ostacolo per la terapia anticancro, in quanto un tasso di mutazioni abnormemente elevato e sregolato, oltre a permettere a molti tipi di cancro di sviluppare resistenza ai farmaci con una frequenza allarmante, tende a rendere eterogenea la popolazione delle cellule cancerose, il che rende difficile uccidere l'intera popolazione con un unico tipo di trattamento. Inoltre il cancro, com'è ovvio pensare, è una patologia complessa e, quindi, multifattoriale. Di conseguenza, alterare l'attività di un singolo prodotto genico può non alterare significativamente il corso della malattia. In quest'ottica, un approccio *multitarget* diretto a inibire più *pathway* di segnale può rivelarsi più efficace di una strategia a *target* singolo, anche nell'eludere la resistenza tumorale bloccando potenziali 'vie di uscita'. Esistono già in fase preclinica e clinica diversi farmaci in grado di colpire, ad esempio, diversi recettori della stessa famiglia, o diversi enzimi di una o più cascate del segnale. Una di queste categorie di farmaci *multitarget* è rappresentata dagli inibitori tirosin-chinasici (TKI),

piccole molecole in grado di inibire uno o diversi enzimi tirosin chinasi, responsabili di molte attività enzimatiche che regolano la proliferazione, la migrazione e la sopravvivenza cellulare.

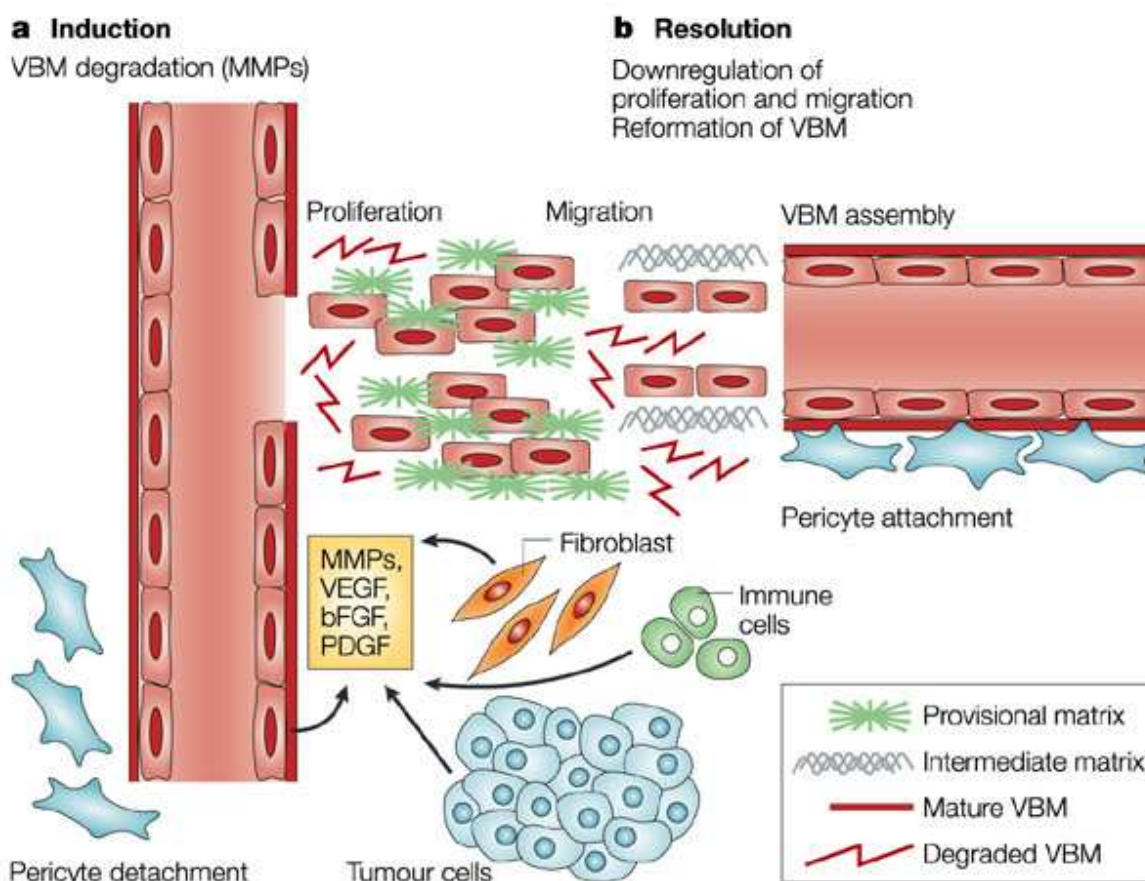
Un altro approccio per distruggere i tumori non ha come bersagli diretti le cellule cancerose, ma i vasi da cui dipendono i grandi tumori, considerando una terapia diretta ad inibire la proliferazione delle cellule tumorali, e contemporaneamente, la neoformazione di vasi primitivi, o alternativamente, una terapia mirata alla distruzione completa della vascolatura tumorale preesistente. Scopo globale della terapia antiangiogenica è pertanto indurre morte cellulare e, conseguentemente, blocco della progressione della crescita neoplastica come conseguenza del mancato apporto del nutrimento assicurato dal flusso ematico.

Lo sviluppo di nuove sostanze antitumorali *multitarget* ad azione sia diretta, su bersagli tipicamente tumorali, che indiretta, come l'inibizione dell'angiogenesi tumorale, rappresenta un importante obiettivo degli studi attuali in campo di strategie terapeutiche antitumorali.

3. L'angiogenesi

La formazione della rete vasale è promossa essenzialmente da due fenomeni. Durante l'embriogenesi, la vasculogenesi implica la formazione di vasi sanguigni *ex novo* dovuta alla differenziazione degli angioblasti (progenitori delle cellule endoteliali) e alla loro fusione in un sistema cardiovascolare primitivo. L'angiogenesi, invece, consiste nella formazione di nuovi vasi sanguigni a partire da quelli preesistenti.

In condizioni fisiologiche i vasi sanguigni sono formati da un monostrato di cellule endoteliali (EC) ancorate su una membrana basale, avvolta da cellule subendoteliali specializzate, quali periciti e cellule muscolari lisce. Il tutto è immerso nella matrice extracellulare (ECM), un complesso di fibroblasti, macrofagi e macromolecole prodotte dalle cellule e secrete nello spazio intercellulare che fornisce un reticolo organizzato all'interno del quale le cellule possono migrare ed interagire tra loro. L'endotelio non ha solamente un ruolo strutturale, ma è in grado di produrre diversi mediatori chimici, controllare tono e permeabilità vascolare, modulare i processi coagulativi e le interazioni con le cellule ematiche con cui viene a contatto.



La cascata angiogenica: fasi e tipi cellulari del processo (Kalluri, 2003).

La formazione di un vaso può essere schematicamente delineata attraverso le seguenti tappe principali:

- i. attivazione delle cellule endoteliali in risposta ad uno stimolo ipossico e rilascio di fattori angiogenici e chemoattrattori;
- ii. destabilizzazione dei vasi preesistenti dovuta ad un aumento della permeabilità vasale e alla perdita delle connessioni tra le cellule endoteliali;
- iii. degradazione della lamina basale e della ECM vascolare ad opera di proteasi secrete delle cellule endoteliali attivate al fine di favorire la migrazione cellulare nel tessuto da neovascolarizzare;
- iv. proliferazione delle EC e successivo differenziamento con formazione di capillari primitivi;
- v. arresto della proliferazione cellulare e maturazione della struttura tubulare primitiva a seguito della creazione di una nuova lamina basale, del reclutamento di cellule muscolari lisce e periciti, e della riorganizzazione delle interazioni cellulari (Milkiewicz *et al.*, 2006).

Inizio della risposta angiogenica

L'angiogenesi ha inizio con una prima fase in cui si ha vasodilatazione dovuta al rilascio di ossido nitrico (NO) da parte dei tessuti ipossici. La permeabilità vasale è incrementata anche dal rilascio di VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) che permette lo stravasamento delle proteine ematiche che costituiranno uno *scaffold* per le EC migrate. L'aumento della permeabilità è mediato dalla formazione di fenestrations e dalla ridistribuzione delle molecole di adesione sulle EC per le piastrine (PECAM)-1 e delle caderine (Carmeliet, 2005). In seguito, le cellule endoteliali del vaso preesistente devono degradare la membrana basale sottostante ed invadere lo stroma del tessuto vicino. Il processo di invasione e migrazione cellulare necessita dell'attivazione del sistema dell'attivatore del plasminogeno (PA), delle metalloproteasi di matrice (MMP) e della famiglia delle eparinasi, che cooperano alla degradazione della membrana basale (Carmeliet, 2000) e al tempo stesso influenzano gli eventi angiogenici attivando o liberando fattori di crescita (VEGF, *Fibroblast Growth Factor*, FGF) sequestrati all'interno della ECM. Le varie famiglie di proteasi vengono secrete contemporaneamente ai loro inibitori in modo da assicurare un controllo stringente sull'attività proteolitica e questo sistema di controllo può essere perso durante la crescita tumorale e metastatizzazione (Liekens *et al.*, 2001).

Migrazione delle cellule endoteliali e proliferazione

L'adesione cellulare ai componenti della matrice e la rimodulazione intracellulare dei filamenti citoscheletrici determinano la capacità di mobilitazione delle cellule. In questo, assumono un ruolo importante i recettori sulla superficie della membrana cellulare come le integrine, ed in particolare le classi $\alpha\beta3$ e $\alpha\beta5$, sovraesprese dalle cellule endoteliali proliferanti stimulate da FGF-2 e VEGF (Nisato *et al.*, 2003). La migrazione può essere promossa da una serie di perturbazioni meccaniche a livello dei contatti cellula-matrice. Durante l'angiogenesi, la proteolisi delle proteine della lamina basale comporta un locale assottigliamento della struttura che si traduce in certi punti in una distorsione della membrana cellulare tale da alterare le forze trazionali (Ingber, 2002). Il segnale meccanico così originatosi, è convertito intracellularmente in stimoli biochimici che innescano il movimento (Shin *et al.*, 2001). Le cellule endoteliali 'guida' procedono quindi nello spazio interstiziale fino ad arrivare al tessuto da neovascolarizzare, in cui avrà inizio la fase proliferativa. Il collasso della ECM produce un aumento della concentrazione extracellulare di vari mediatori solubili proangiogenici, i quali alimentano e rafforzano le vie di segnale alla base del processo chemiotattico e proliferativo.

Formazione del capillare e maturazione dei vasi

Una volta che le cellule sonoigrate nel tessuto da neovascolarizzare, iniziano subito ad organizzarsi in un abbozzo vascolare, che si delinea progressivamente fino alla fase di stabilizzazione e maturazione del capillare che prevede la deposizione di una nuova lamina basale e il ristabilirsi dei contatti aderenti tra le cellule. In questo processo la proteolisi deve essere bloccata e vengono depositati i componenti della ECM. Fattori angiogenici, quali l'Angiopietina-2 (Ang2) e il *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF) partecipano al rimodellamento strutturale, promuovendo rispettivamente l'arresto della proliferazione per favorire il differenziamento delle cellule endoteliali (Holash *et al.*, 1999) e il reclutamento di periciti e di cellule muscolari lisce, per ricreare gli strati di rivestimento dell'endotelio (Jain *et al.*, 2003). Infine, quando la vascolarizzazione è sufficiente, i fattori proangiogenici vengono *down-regolati* ed aumenta la concentrazione locale di inibitori. Le EC diventano quindi quiescenti e il vaso rimane o regredisce a seconda delle necessità dell'organismo.

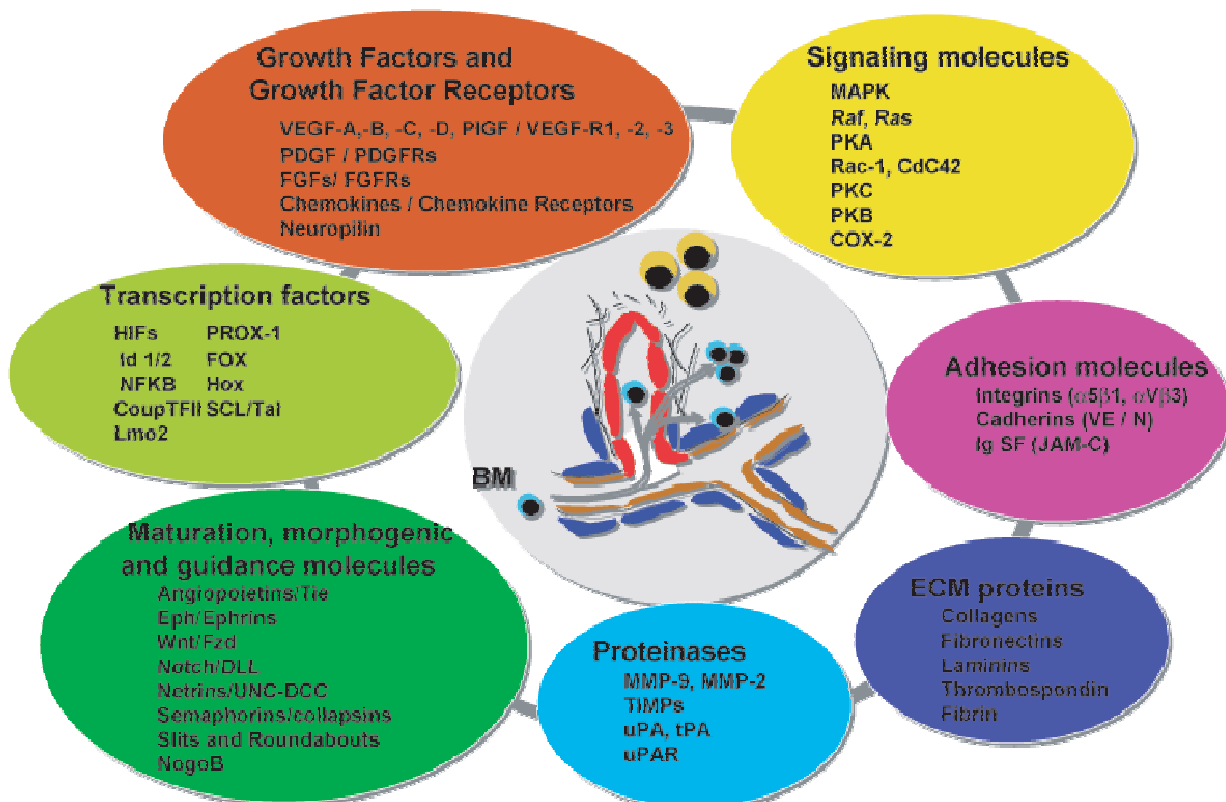
3.1 Regolazione dell'angiogenesi

Nonostante l'abbondanza di fattori angiogenici all'interno dei tessuti, si ritiene che la controparte di molecole inibitorie riesca ad annullarne gli effetti e a mantenere le cellule endoteliali in uno stato inattivo. Il fatto che più studi abbiano osservato la coesistenza di fattori angiogenici positivi e negativi, anche durante lo svolgersi di tutto il processo di neovascolarizzazione, ha contribuito alla formulazione dell'ipotesi secondo cui l'attività dell'endotelio è governata da un delicato e costante bilanciamento di fattori dalle funzioni contrapposte (Iruela-Arispe *et al.*, 1997). Se le molecole proangiogeniche risultano dominanti, le cascate angiogeniche vengono 'accese', altrimenti permane lo stato di quiescenza. Metaforicamente il principio di regolazione viene paragonato ad un interruttore che può cambiare (*switch*) dalla posizione "on" ad "off". Lo svolgimento stesso del processo di angiogenesi può essere suddiviso in una fase di attivazione (iniziazione e progressione dell'angiogenesi) che presenta uno sbilanciamento del rapporto stimoli positivi su stimoli negativi, a favore dei primi, e una fase di risoluzione (terminazione e stabilizzazione del vaso), in cui predomina l'azione di fattori inibitori endogeni, in seguito ad un aumento locale di concentrazione degli stessi e/o all'esaurimento dei segnali positivi.

3.1.1 Stimolatori endogeni dell'angiogenesi

Sono state identificate, in diversi modelli *in vitro* ed *in vivo*, numerose cellule coinvolte nell'induzione dell'angiogenesi, e sulla base del loro comportamento possono essere divise in tre classi principali (Klagsbrun *et al.*, 1999):

- la famiglia del VEGF e le Angiopoietine, la cui azione è diretta in modo specifico sulle cellule endoteliali;
- vari tipi di chemochine, citochine e alcuni enzimi, capaci di attivare in modo diretto oltre alla componente endoteliale, un vasto *range* di bersagli cellulari. Il maggior rappresentante di questo gruppo è il polipeptide FGF;
- fattori indiretti, il cui effetto sull'angiogenesi si esplica con il rilascio di molecole come citochine e fattori di crescita da parte di macrofagi e cellule endoteliali, come il *Tumor Necrosis Factor* (TNF- α), il *Transforming Growth Factor* (TGF- β) e il PDGF (Liekens *et al.*, 2001; Lichtenbeld *et al.*, 1996).



Schema delle fasi angiogeniche e dei fattori proangiogenici che vi partecipano.

Vascular Endothelial Growth Factor

VEGF è un fattore di crescita angiogenico che lega l'eparina e di cui esistono diverse isoforme rispettivamente di 206, 189, 165 e 121 amminoacidi. Tale eterogeneità è dovuta allo splicing

alternativo di alcuni esoni appartenenti ad un unico gene (Veikkola *et al.*, 1999). L'isoforma VEGF₁₆₅ rappresenta la specie molecolare predominante. VEGF è espresso in tessuti differenti quali il cervello, fegato, rene, milza, ovaio, utero e nei tessuti in cui è in corso la cicatrizzazione di ferite. La produzione di VEGF è indotta dall'ipossia e da numerose citochine e fattori di crescita: EGF (*Epidermal Growth Factor*), TGF- β , TNF- α , IL-1 β (interleuchina 1 β), la prostaglandina E₂, IGF-I (*Insulin-like Growth Factor*).

Esistono due recettori per VEGF: Flt-1 (*fms-like tyrosine kinase-1*), recettore con maggiore affinità espresso sulle EC, e KDR (*kinase insert domain-containing receptor*), avente minore affinità, che è stato identificato sulle EC, sui monociti e sulle cellule tumorali. Entrambi i recettori sono organizzati in tre domini: una regione extracellulare costituita da sette domini, una transmembrana e una intracellulare responsabile dell'attività tirosin-chinasica. La cascata dei segnali di VEGF inizia con la dimerizzazione di due recettori che si autofosforilano, grazie al dominio tirosin-chinasico, ed attivano il recettore. Il *signaling* del VEGF prevede il coinvolgimento di numerose proteine, incluse la protein chinasi C (PKC), i membri della famiglia Ras, la fosfatidilinositolo-3 chinasi (PI3K) e le MAP (*mitogen-activated-protein*) chinasi.

VEGF aumenta la permeabilità vasale attivando la cascata del segnale delle MAP chinasi che alterano le giunzioni intercellulari tra le EC ridistribuendo le caderine (Kevil *et al.*, 1998). Stimola inoltre la nitrossido sintetasi endoteliale (eNOS), è un mitogeno specifico per le EC perché attiva la cascata di segnale delle MAP chinasi, promuove la proliferazione (Ferrara, 2001) e sopprime la proteina proapoptotica bax (Carmeliet, 2000). L'effetto proangiogenico di VEGF è infine dovuto alla produzione di integrine che promuovono la migrazione e proliferazione cellulare e la riorganizzazione della matrice (Senger *et al.*, 1997).

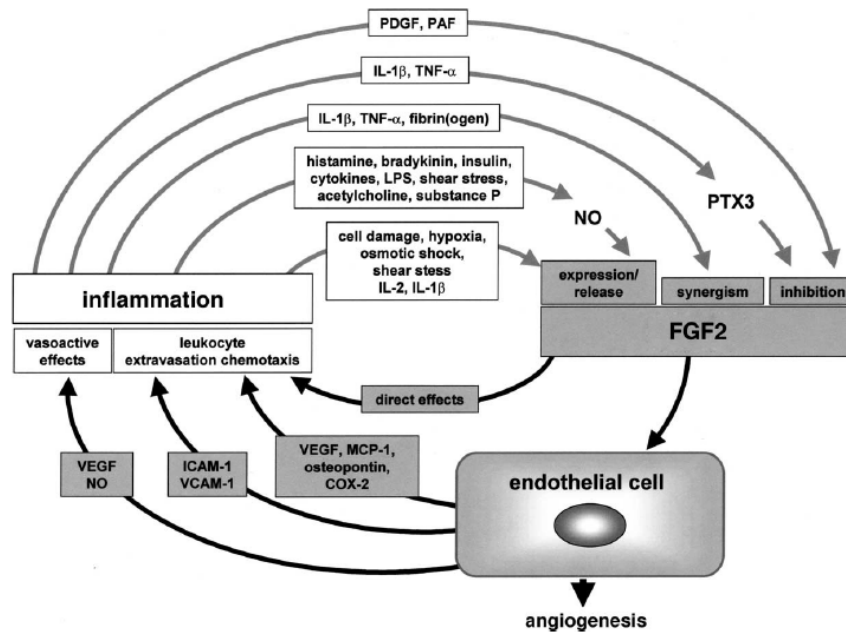
Fibroblast Growth Factor

La famiglia di FGF consiste di almeno 22 molecole. La maggior parte di queste è secreta come glicoproteine. Tutti i composti hanno un peso molecolare compreso tra i 18 i 30 kDa ed hanno grande affinità per l'eparina. Il componente di questa classe di citochine maggiormente studiato e coinvolto nell'angiogenesi è FGF-2 (Presta *et al.*, 1986), il quale viene secreto in basse concentrazioni in molti organi, mentre è invece molto abbondante nel cervello e nella ghiandola pituitaria. È inoltre presente nelle colture di EC, fibroblasti, cellule muscolari lisce e gliali (Florkiewicz *et al.*, 1995). Sono stati identificati due tipi di recettore per FGF-2: recettori tirosin-chinasici ad elevata affinità (FGFR) e a bassa affinità (HSPG, *heparan sulfate proteoglycans*). Sembra che il legame di FGF-2 a HSPG protegga la citochina dalla

disattivazione promossa dall'ambiente extracellulare e ne permetta l'accumulo nella ECM e nella membrana basale. Per questo motivo quando la ECM viene degradata dalle proteasi nella fase iniziale dell'angiogenesi si ha un importante rilascio di FGF-2 (Rusnati *et al.*, 1996). FGFR è invece un recettore transmembrana tirosin-chinasico il cui legame con il substrato porta alla dimerizzazione del recettore che si autofosforila attivandosi. FGF-2 ha un effetto proangiogenico modulando a vari livelli questo processo:

- ha un effetto mitogeno poiché induce l'espressione di proteine antiapoptotiche;
- aumenta la produzione di MMP promuovendo la degradazione della ECM nella fase iniziale dell'angiogenesi;
- stimola la migrazione cellulare. L'effetto chemiotattico è dovuto all'attivazione delle MAP chinasi;
- regola l'espressione di integrine e caderine. Brevi esposizioni a FGF-2 allentano le giunzioni intercellulari, mentre esposizioni prolungate promuovono la ridistribuzione delle molecole di adesione. Quindi, FGF-2 promuove il distacco tra le cellule nelle prime fasi dell'angiogenesi e le interazioni intercellulari nella maturazione dei vasi.
- aumenta l'espressione di VEGF e del suo recettore. I linfociti T e B e i macrofagi, stimolati dal processo infiammatorio, possono rilasciare FGF-2. Questo a sua volta amplifica la risposta infiammatoria e angiogenica provocando vasodilatazione e stimolando la formazione dell'infiltrato infiammatorio (Presta *et al.*, 2005).

Al contrario di VEGF, FGF-2 non è specifico per le cellule endoteliali, infatti, il suo recettore ad alta affinità si può trovare non solo sulla superficie di queste cellule, ma anche su cellule della muscolatura liscia, fibroblasti, mioblasti e cellule tumorali (Basilico *et al.*, 1992). Evidenze sperimentali correlano FGF-2 al processo angiogenico sia in condizioni fisiologiche che patologiche; inoltre topi privi della proteina presentano difetti neuronali ed alterazioni negli eventi di cicatrizzazione delle ferite e di riparazione dei tessuti, sottolineandone il coinvolgimento (Ortega *et al.*, 1998).



Rappresentazione schematica del *loop* che collega FGF-2 e i processi infiammatori (Presta *et al.*, 2005).

3.1.2 Inibitori endogeni dell'angiogenesi

Molti dei *signaling* intracellulari associati alla casata angiogenica, una volta attivati, innescano dei *feedback* positivi, a sostenere una continua stimolazione del processo, mediante produzione e rilascio di fattori di crescita e dei loro recettori. La presenza di inibitori endogeni risulta necessaria al fine di spegnere o limitare il segnale proangiogenico. Sono stati identificati più di 40 inibitori endogeni dell'angiogenesi, e i principali sono:

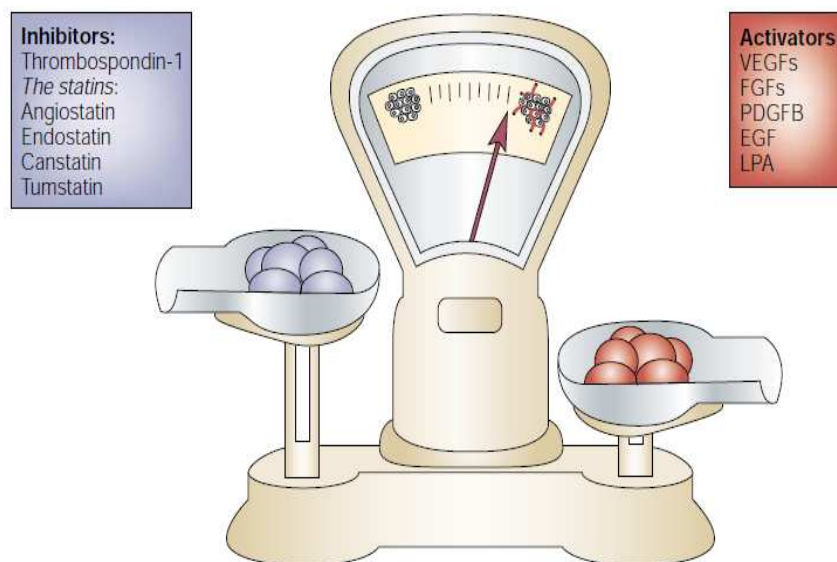
- i. Trombospondina-1 (TSP-1): è considerata l'inibitore fisiologico dell'angiogenesi. Ha un effetto proapoptotico limitato alle EC attivate (Jimenez *et al.*, 2000).
- ii. Interleuchine (IL): è stato dimostrato che le IL che contengono all'N-terminale la sequenza Glu-Leu-Arg favoriscono l'angiogenesi (IL-8), mentre quelle che non la presentano sono antiangiogeniche (IL-4) (Strieter *et al.*, 1995).
- iii. Inibitori tissutali delle metalloproteasi (TIMP): inibiscono la migrazione delle EC.
- iv. Frammenti proteolitici: sono derivati della ECM (collagene e fibronectina) o di enzimi (plasminogeno). L'angiostatina è un frammento di 38 kDa del plasminogeno che diminuisce l'espressione di VEGF e la proliferazione delle EC (Hajitou *et al.*, 2002). L'endostatina è un frammento di 20 kDa del collagene di tipo XVIII, inibisce la proliferazione delle EC indotta da VEGF agendo a vari livelli (blocca il *binding* al recettore e la sua fosforilazione, inibisce l'attivazione delle MAP chinasi) (Kim *et al.*, 2002). Blocca inoltre l'interazione tra FGF-2 e HSPG e riduce l'espressione di proteine proapoptotiche (Dhanabal *et al.*, 1999).

- v. Interferoni: glicoproteine che diminuiscono l'espressione della MMP-9 e modulano blandamente l'espressione di FGF-2 e VEGF (Sasamura *et al.*, 2002; Slaton *et al.*, 1999).

3.2 Angiogenesi patologica

Nonostante l'abbondante presenza di fattori angiogenici nei differenti tessuti, il *turnover* delle EC in un organismo adulto sano è basso. In condizioni fisiologiche il processo angiogenico viene attivato nella formazione del corpo luteo e del follicolo e nell'impianto dell'embrione, per quanto riguarda l'apparato riproduttivo femminile, e nella cicatrizzazione delle ferite. Un plesso vascolare stabile dipende da un perfetto bilanciamento tra i segnali che favoriscono l'angiogenesi e la stabilizzazione dei vasi e quelli che promuovono la regressione vasale.

I regolatori positivi e negativi spesso coesistono nello stesso tessuto e l'attivazione dell'endotelio deriva dal loro bilancio (Iruela-Arispe *et al.*, 1997).



Il bilanciamento tra attivatori e inibitori dell'angiogenesi (Bergers *et al.*, 2003).

Le EC quiescenti mantengono tuttavia la loro capacità di dividersi rapidamente in risposta a stimoli fisiologici come per esempio l'ipossia. In molte patologie questi segnali sono però eccessivi e il bilancio tra induttori e inibitori risulta alterato provocando un'attivazione eccessiva del fenomeno angiogenico (Carmeliet, 2005).

Meccanismi diversi regolano l'angiogenesi nell'embriogenesi e in condizioni patologiche. Nell'embrione, infatti, le EC sono attivate, mentre nell'adulto si trovano incapsulate all'interno di un rivestimento costituito da cellule murali. Per questo durante l'embriogenesi non vengono coinvolti alcuni induttori e inibitori che invece nell'adulto svolgono un ruolo attivo, come il

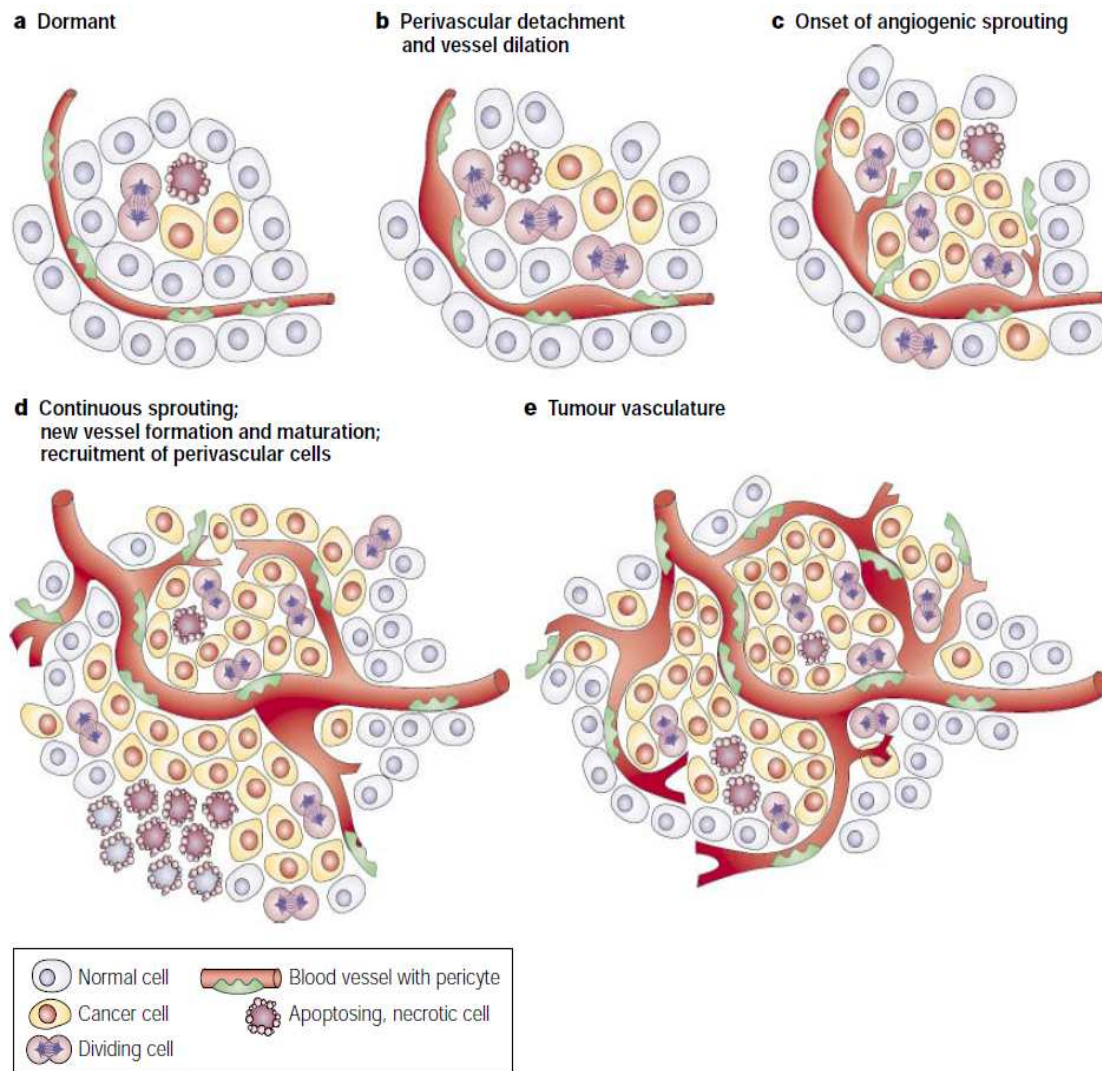
fattore di crescita piastrinico (PDGF), alcune proteinasi, l'attivatore del plasminogeno, l'ossido nitrico, la trombospondina-2. L'angiogenesi patologica, inoltre, è spesso stimolata da un processo infiammatorio. Monociti, macrofagi, piastrine, mast cellule e altri leucociti vengono attratti nel sito dell'infiammazione da fattori proangiogenici come VEGF. Queste cellule producono a loro volta fattori angiogenici che attirano le EC, cellule muscolari lisce, fibroblasti, leucociti e piastrine (Carmeliet, 2000).

Molte malattie, soprattutto infiammazioni croniche, sono provocate da un'attivazione eccessiva dell'angiogenesi: psoriasi, retinopatia diabetica, artrite reumatoide, endometriosi, arteriosclerosi. Di particolare importanza è il ruolo che questo fenomeno svolge nell'accrescimento tumorale e nella metastizzazione.

Al contrario, l'incapacità di attivare una buona risposta angiogenica può provocare patologie come ulcere croniche, inefficiente cicatrizzazione di ferite e malattie vascolari a carattere ostruttivo (Carmeliet, 2000; Folkman, 1995).

3.2.1 Angiogenesi tumorale

La crescita tumorale procede attraverso varie tappe. La prima fase consiste nella perdita del controllo della proliferazione cellulare: le cellule cominciano a dividersi rapidamente e formano un piccolo carcinoma *in situ* (2-3 mm²). Successivamente, più la massa tumorale cresce, più le cellule si trovano lontane dai capillari, la crescita tumorale si blocca e raggiunge uno stadio (*steady state*) in cui un ugual numero di cellule si riproduce e muore a causa della mancanza di ossigeno e nutrienti (Folkman, 1995). Dopo diversi mesi o anni, il tumore può acquisire il fenotipo angiogenico (*angiogenic switch*) e indurre la formazione di nuovi capillari.



Lo switch angiogenico (Bergers *et al.*, 2003).

L'attivazione di questo processo dipende dall'ipossia causata dall'aumento della distanza tra cellule e capillari ed inizia con lo sbilanciamento tra i fattori che regolano l'angiogenesi in modo positivo e negativo. Cellule tumorali, ECM e macrofagi attirati dal tumore rilasciano fattori di crescita, come FGF-2 e VEGF, e viene diminuito il rilascio degli inibitori dell'angiogenesi come la TSP-1 (Pepper, 1997). La neovascolarizzazione del tumore *in situ* aumenta le possibilità che le cellule tumorali entrino nel torrente circolatorio e raggiungano tessuti lontani provocando metastasi. Le cellule metastatizzate, una volta raggiunto l'organo bersaglio, si dispongono attorno al vaso e fuoriescono dal capillare. In assenza del fenomeno angiogenico le cellule si replicano velocemente ma altrettanto rapidamente vanno incontro ad apoptosi. Lo sviluppo del tumore secondario si ha solo dopo che è avvenuta la neovascolarizzazione (Folkman, 1995).

Nonostante l'ipossia sia l'evento scatenante sia dell'angiogenesi fisiologica che patologica, i vasi che si formano nei tumori presentano spesso delle anomalie. Sono infatti caratterizzati da un elevato *turnover* delle EC, fenestrazioni ed interruzioni della membrana basale, una scarsa presenza di periciti, una disomogenea organizzazione e distribuzione delle cellule. Inoltre la permeabilità vascolare è elevata e si hanno fenomeni di coagulazione intravasale. Il flusso sanguigno, la tensione di ossigeno e il pH tissutale sono inferiori rispetto ai tessuti normali e l'assenza di vasi linfatici aumenta la pressione interstiziale. I vasi maligni appaiono quindi collassati, scarsamente differenziati e fragili, probabile risultato di un anomalo bilanciamento delle molecole segnale. Una rete vascolare di questo tipo risulta incapace di sopportare la rapida crescita delle cellule tumorali con conseguente ipossia e necrosi locale (Gasparini, 1995).

3.2.2 Angiogenesi come *target* antitumorale

L'efficacia dei farmaci antitumorali è spesso ridotta da difficoltà di veicolazione delle sostanze, dalla loro mancanza di specificità e dalla resistenza che il carcinoma sviluppa verso di essi. Le cellule tumorali sono quindi un *target* mutevole a causa dell'instabilità genomica. La crescita tumorale si basa su un adeguato apporto sanguigno e, quindi, sviluppo di vasi al suo interno. I vasi anomali che vengono attratti nel tumore sono un bersaglio evidente per la terapia farmacologica, attraverso l'utilizzo di sostanze antiangiogeniche, cercando così di superare anche il problema della resistenza dato che le EC sono geneticamente stabili, omogenee e hanno un basso livello mutazionale (Kerbel, 1997).

L'angiogenesi tumorale può essere inibita da sostanze che hanno un effetto diretto sulle EC e da sostanze che agiscono su cellule che stimolano l'angiogenesi indirettamente (cellule dello stroma, emopoietiche o tumorali). Gli agenti antiangiogenici diretti meglio studiati sono gli inibitori del VEGF. Sono stati sviluppati anticorpi (ad esempio *Avastin*) ed inibitori tirosin-chinasici (TKI) che legano VEGFR. Questa classe di molecole non solo arresta la proliferazione delle EC, ma ne aumenta la morte per apoptosi inducendo la regressione dei vasi formati.

Le cellule tumorali rilasciano molti fattori proangiogenici ed inducono l'espressione dei loro recettori sulle EC. Tra questi, EGF (*Epidermal Growth Factor*) è particolarmente coinvolto nell'angiogenesi tumorale soprattutto perché stimola la produzione di VEGF e del suo recettore sui capillari sanguigni. Inoltre EGF modula la proliferazione, l'adesione, la migrazione e la differenziazione cellulare. Un'alterata espressione o attivazione del recettore di EGF (EGFR) è stata identificata in numerosi tumori solidi e si è visto che bloccando EGFR di cellule epiteliali neoplastiche si ottiene un effetto antiangiogenico dovuto alla diminuzione dei fattori proangiogenici e all'aumento degli inibitori. Molti inibitori di EGFR sono stati sviluppati ed

hanno dimostrato di avere una potente attività antitumorale dovuta in parte all'inibizione del processo angiogenico (Izumi *et al.*, 2002; Ellis, 2004).

Nell'ottica di un approccio *multitarget*, lo sviluppo di composti che riescano a colpire *pathways* sia angiogenici che della crescita tumorale offre un potenziale miglioramento dell'efficacia terapeutica rispetto a inibitori di singole vie di segnale.

4. EGFR nello sviluppo tumorale

4.1 Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)

EGFR è un recettore tirosin-chinasico transmembrana che appartiene alla famiglia dei recettori erbB/HER (Yarden, 2001). Questa classe di recettori rappresenta il centro di una complessa cascata di segnali intracellulari che modula la proliferazione, l'adesione, la migrazione e la differenziazione cellulare. EGFR è fisiologicamente espresso in molti tipi cellulari soprattutto di origine endoteliale, è sovraespresso in alcuni tumori, ma non è presente negli elementi corpuscolati del sangue.

Alla famiglia dei recettori erbB appartengono quattro membri: EGFR (HER1/erbB-1), HER2 (erbB-2/neu), HER3 (erbB-3), HER4 (erbB-4).

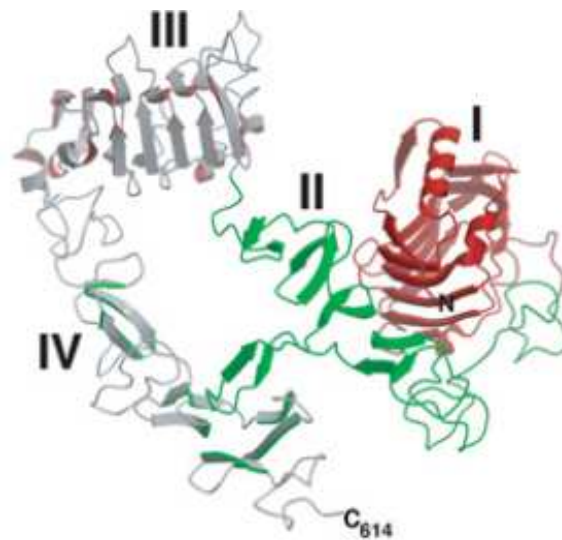
I fattori di crescita che attivano i recettori ErbB sono caratterizzati dalla presenza di un dominio EGF-simile costituito da una sequenza di 40 amminoacidi contenenti sei cisteine aventi la stessa posizione e che formano ponti disolfuro uguali. Si formano in questo modo tre subunità che conferiscono specificità al legame con il recettore. Questi ligandi vengono espressi come proteine ancorate alla membrana e vengono poi attivati da enzimi proteolitici (Massague *et al.*, 1993). A seconda dell'affinità per i diversi membri della famiglia ErbB, i ligandi vengono suddivisi in tre gruppi:

- EGF, TGF- β e anfiregulina legano EGFR;
- betacellulina, HB-EGF (*heparin-binding growth factor*) ed epiregulina interagiscono sia con EGFR che con ErbB-4;
- eregulina e tomoregulina legano ErbB-4 e ErbB-3 (Dutta *et al.*, 2007).

Tutti i recettori ErbB presentano 3 domini:

- a. Il dominio extracellulare N-terminale glicosilato contiene il sito di legame per il ligando specifico. È la porzione meno conservata degli ErbB e per questo motivo i quattro recettori presentano una diversa affinità per i diversi ligandi. È costituito da quattro

subunità (domini I-IV). I domini II e IV sono ricchi di cisteine che legano le due subunità tra di loro attraverso ponti disolfuro, mentre i domini I e III partecipano al *binding* del ligando. A differenza degli altri membri, HER2 non presenta ponti disolfuro tra il dominio II e IV ed è quindi incapace di legare un ligando specifico. Tuttavia, presenta una conformazione simile a quella di EGFR attivato e sembra pertanto essere un recettore costitutivamente attivo sempre in grado di eterodimerizzare con altri recettori ErbB attivati (Roskoski, 2004). La struttura di questo recettore permette quindi la dimerizzazione con altri recettori attivati senza la necessità del *binding* del ligando.



Dominio extracellulare di EGFR. Il dominio I è indicato in rosso, il II in verde, il III e IV in grigio (Ferguson, 2004).

- b. Il dominio transmembrana idrofobico attraversa una sola volta la membrana. Questa regione sembra avere molte funzioni regolatrici come la modulazione dell'internalizzazione del recettore, la sua distribuzione nelle cellule polarizzate e la sua associazione con proteine come la calmodulina (Bazley *et al.*, 2005).
- c. Il dominio intracellulare contiene un dominio tirosin-chinasico responsabile della cascata del segnale intracellulare. La regione intracellulare di EGFR comprende tre subunità. Quella più vicina alla membrana plasmatica regola con un meccanismo a *feed-back* l'attività della protein-chinasi C (PKC). Il secondo dominio è un tratto non catalitico carbossi-terminale che contiene sei siti tirosinici trans-fosforilabili che fungono da siti di legame per trasduttori del segnale e per attivatori di substrati intracellulari. Presenta inoltre motivi strutturali indispensabili per l'internalizzazione del

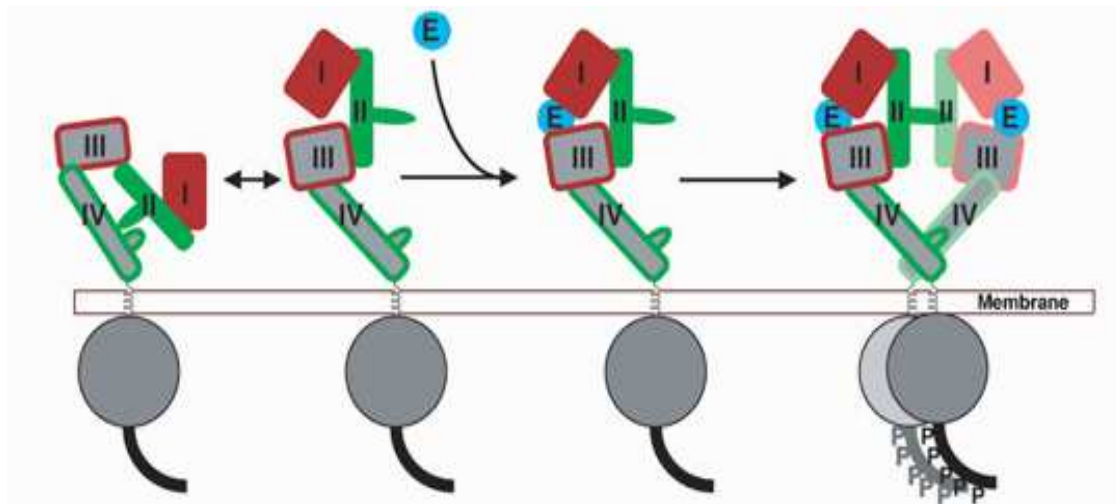
recettore e la sua degradazione. Il terzo dominio presenta attività tirosin-chinasica ed è responsabile della fosforilazione dei residui tirosinici presenti nel secondo dominio (Bazley *et al.*, 2005). Il dominio tirosin-chinasico di EGFR presenta l'architettura bilobata tipica di tutte le protein-chinasi: il lobo minore mostra una regione ricca di glicina indispensabile per il legame dell'ATP, mentre quello maggiore possiede il sito di *binding* per il substrato. Il sito catalitico si trova in una tasca tra i due lobi.

4.1.1 Attivazione di EGFR

Binding del ligando

In assenza del ligando, EGFR si trova in una conformazione chiusa in cui il dominio II forma legami intramolecolari con il dominio IV. In questo modo il recettore è autoinibito poiché incapace di dimerizzare. Il dominio tirosin-chinasico presenta invece una conformazione aperta e attiva contrariamente alle altre tirosin-chinasi che in assenza di ligando presentano una conformazione compatta che impedisce l'entrata del substrato nel sito catalitico (Bazley *et al.*, 2005).

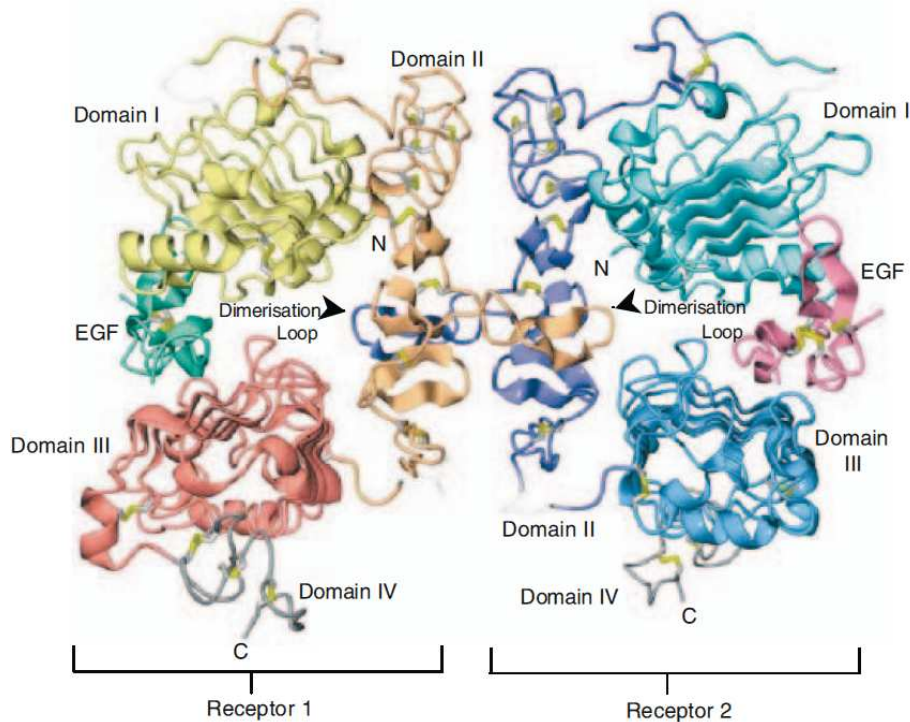
Quando EGF è presente nell'ambiente extracellulare lega contemporaneamente lo scheletro carbonioso del dominio I e i gruppi in catena laterale degli amminoacidi del dominio III della porzione extracellulare del recettore. Nella conformazione inattiva i due domini si trovano troppo lontani tra loro per permettere l'interazione del ligando con entrambi, essendo questo di dimensioni relativamente modeste. Per questo motivo il legame può avvenire con alta affinità solo dopo una rotazione di 130° dei domini I e II rispetto al III. Questo riarrangiamento provoca la rottura dei ponti disolfuro tra il dominio II e IV, esponendo il braccio di dimerizzazione con il passaggio ad una struttura estesa (Roskoski, 2004).



Interazione con il ligando, passaggio alla struttura estesa e dimerizzazione di EGFR (Ferguson, 2004).

Dimerizzazione e attivazione del recettore

Sono stati proposti diversi meccanismi che promuovono il riarrangiamento conformazionale del dominio extracellulare di EGFR, la sua dimerizzazione e conseguente attivazione. L'ipotesi più accreditata sostiene che EGFR sia una struttura dinamica capace di assumere diverse conformazioni e che il *binding* del ligando lo blocchi in una conformazione competente per la dimerizzazione con il dominio II esposto. La differenza di energia libera tra la forma aperta e quella in cui dominio II e IV sono legati è infatti di 1-2 kcal/mol. Quindi, approssimativamente il 95% dell'EGFR totale si trova in una conformazione avente bassa affinità per il ligando, mentre circa il 5% è caratterizzato da un'alta affinità per il ligando competente per la dimerizzazione. Questa teoria è confermata anche da dati forniti da studi cristallografici. Il ligando interagisce preferenzialmente con la conformazione attiva e spostando l'equilibrio verso di essa (Ferguson, 2004; Roskoski, 2004). La modifica conformazionale più rilevante che si ha in seguito al *binding* del ligando è la rottura dei legami intramolecolari tra il dominio II e IV. Questo fenomeno permette l'estensione di un *loop* di dimerizzazione presente nel dominio II che può andare ad interagire con quello di un secondo recettore ErbB attivato. La dimerizzazione avviene grazie a interazioni di tipo omofilico, legami ad idrogeno e forze di Van der Waals (Ferguson, 2004; Bazley *et al.*, 2005).



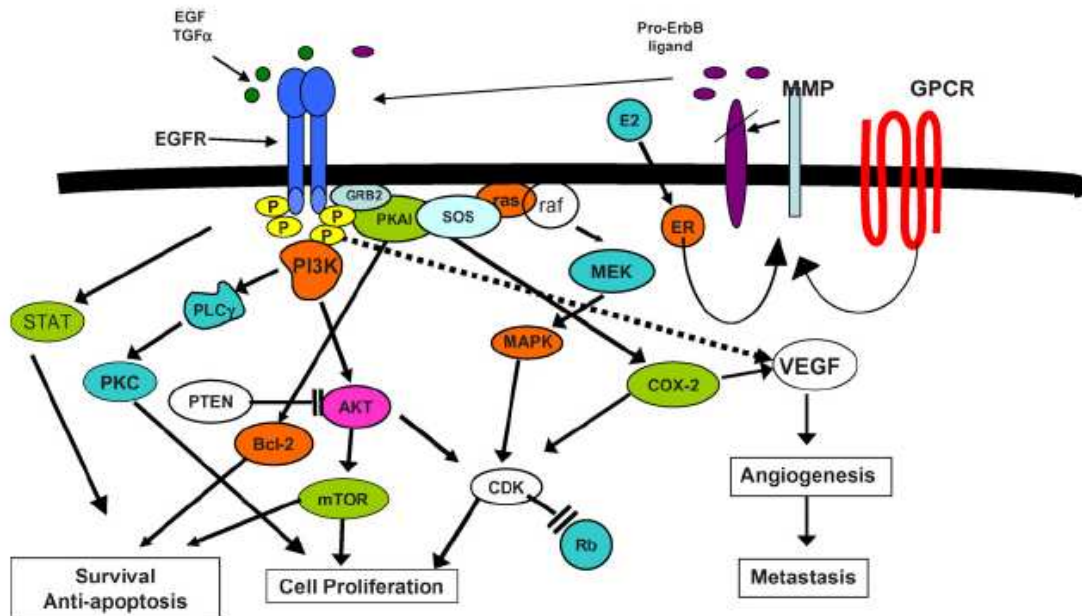
Dimerizzazione del dominio extracellulare di due molecole di EGFR (Bazley *et al.*, 2005).

Dal processo di dimerizzazione si possono ottenere omodimeri, costituiti dall'unione di due recettori uguali, oppure eterodimeri costituiti dall'interazione di due diversi recettori ErbB (Roskoski, 2004). Il miglior *partner* di dimerizzazione di EGFR è ErbB-2 poiché gli eterodimeri contenenti questa isoforma sono particolarmente potenti. ErbB-2 forma infatti eterodimeri molto stabili che vengono internalizzati in misura inferiore e diminuisce il grado di dissociazione tra EGFR a cui è accoppiato e il suo ligando (Yarden, 2001).

La dimerizzazione della regione extracellulare del recettore stimola la cross-fosforilazione tra i due recettori di alcuni residui tirosinici. I residui tirosinici di ogni membro della famiglia ErbB e gli amminoacidi vicini ad essi sono tali che ogni recettore interagisca solo con una specifica classe di secondi messaggeri. In questo modo viene prodotta una risposta biologica precisa (Bazley *et al.*, 2005). In seguito alla fosforilazione del recettore, le proteine intracellulari che riconoscono i siti fosforilati interagiscono con il recettore iniziando la cascata del segnale.

Cascata del segnale

EGFR riveste un ruolo essenziale nello sviluppo di organi e tessuti grazie ai suoi effetti sulla proliferazione cellulare, differenziazione, apoptosi, invasione e angiogenesi. A tal fine, in seguito alla dimerizzazione del recettore, vengono attivate numerose proteine adattatrici.



Cascata del segnale di EGFR in cellule cancerose (Bianco *et al.*, 2007).

Una delle vie di segnale più studiate include la cascata Ras/ERK attivata da EGF attraverso la proteina adattatrice Grb2. La proteina Ras attivata modula l'attivazione delle MAPK (*mitogen-activated protein kinases*). Queste protein-chinasi possono traslocare all'interno del nucleo dove vanno a fosforilare ed attivare alcuni fattori di trascrizione. In questo modo viene incrementata la produzione di proteine inibitrici dell'apoptosi (IAPs) e di alcuni membri della famiglia di proteine antiapoptotiche Bcl-2. Alla superfamiglia delle MAPK appartengono anche le ERK (*extra-cellular signal-regulated kinases*) che promuovono la proliferazione cellulare attivando i maggiori fattori di trascrizione coinvolti nella divisione cellulare, come c-Myc e alcune isoforme della famiglia delle RSK (*ribosomal subunit kinase*). EGFR attivato può inoltre interagire direttamente con la fosfolipasi Cγ che modula l'idrolisi del fosfatidilinositolo 4,5-difosfato in inositolo 1,3,5-trifosfato, importante per il rilascio del calcio intracellulare, e 1,2-diacylglicerolo, implicato nell'attivazione della proteinchinasi C che può a sua volta attivare le MAPK. La via del segnale di EGFR maggiormente implicata nella regolazione della proliferazione cellulare è rappresentata dall'attivazione delle serin-treonin-chinasi AKT. Queste proteine controllano la sopravvivenza cellulare inibendo l'attività apoptotica di alcuni membri della famiglia delle proteine Bcl-2 e della Caspasi 9. EGFR attivato, inoltre, induce la

fosforilazione delle proteine STAT che possono in questo modo traslocare nel nucleo dove regolano l'espressione genica e la sopravvivenza cellulare (Bianco *et al.*, 2007). EGFR, infine, stimola l'angiogenesi aumentando la secrezione di VEGF (Ellis, 2004).

4.1.2 Ruolo di EGF in fisiologia e patologia

I recettori ErbB e i loro ligandi sono espressi in quasi tutti i tessuti sani sia nell'embrione che nell'adulto. Nell'embrione EGFR è indispensabile per lo sviluppo del sistema nervoso, del cuore e del tessuto epiteliale. Tuttavia sembra che nella maggior parte dei tessuti sani esso si trovi in una forma dormiente. I topi in cui è stato silenziato il gene per EGFR presentano neurodegenerazione e inappropriato sviluppo neuronale dell'ippocampo, difetti a livello del tessuto epiteliale, che si manifestano a livello cutaneo con infiltrati infiammatori, ed ipertrofia cardiaca, patologia che ne causa la morte dopo sei mesi dalla nascita (Burgess, 2008). Nell'adulto EGF svolge diversi ruoli importanti:

- a livello dell'epidermide, modula la proliferazione, la migrazione, l'adesione cellulare, i processi infiammatori e la cicatrizzazione delle ferite;
- nella formazione del tessuto osseo stimola la proliferazione dei preosteoblasti;
- a livello dell'apparato riproduttivo femminile media la maturazione del follicolo ovarico e l'impianto dell'embrione (Schneider *et al.*, 2009).

Tuttavia la complessità delle vie di trasduzione del legame e la loro importanza nel modulare la crescita e sopravvivenza cellulare mettono in evidenza il potenziale ruolo di alterazioni a carico di EGFR in condizioni patologiche (Bianco *et al.*, 2007). I recettori ErbB, infatti, sono implicati in molte patologie tra le quali la psoriasi, malattie infiammatorie, patologie cardiache, il morbo di Alzheimer e lo sviluppo tumorale (Burgess, 2008).

4.1.3 EGFR e cancro

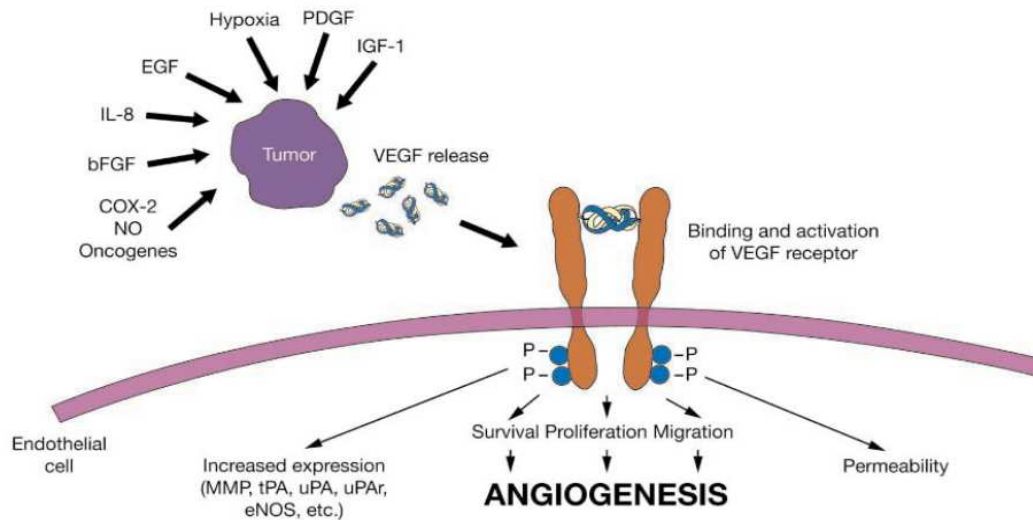
La teoria che alterazioni di EGFR e della sua cascata del segnale contribuiscano alla formazione del fenotipo tumorale è stata formulata nei primi anni '80 a partire dall'omologia di questo recettore con il prodotto di traduzione dell'oncogene virale dell'eritroblastosi aviaria (v-erbB). L'alterazione del segnale di EGFR è infatti associata a tutte le caratteristiche salienti della crescita e sviluppo tumorale: proliferazione cellulare incontrollata, invasione dei tessuti, angiogenesi tumorale e metastasi (Bianco *et al.*, 2007).

Diversamente dalle cellule sane in cui l'attivazione e la trasduzione del segnale è finemente controllata, nelle cellule tumorali questi meccanismi regolatori sono alterati a vari livelli. Elevati livelli di EGFR sono una caratteristica comune di molti tumori solidi come il tumore

mammario, alla testa e al collo, al polmone, ai reni, alle ovaie, alla vescica e al colon (Herbst, 2004). Mentre nelle cellule sane l'espressione di EGFR va da 40000 a 100000 unità per cellula, il numero di recettori esposti dalle cellule cancerose è maggiore e, nel caso di tumore mammario, può raggiungere 2 milioni di unità per ciascuna cellula (Herbst, 2004; Bianco *et al.*, 2007). L'aumento dell'espressione di EGFR è causato da diversi meccanismi, tra cui l'aumento della produzione di ligandi per EGFR, l'aumento della trascrizione e l'amplificazione del gene di EGFR e mutazioni della porzione extracellulare del recettore (Bianco *et al.*, 2007). Vari studi hanno dimostrato che l'espressione di EGFR risulta correlata con una ridotta possibilità di guarigione e di sopravvivenza dopo la malattia, una cattiva prognosi, un maggior rischio di ricadute e metastasi (Bianco *et al.*, 2007). Inoltre, mentre nelle cellule sane EGFR necessita di un ligando per poter essere attivato, in quelle tumorali questo evento non è sempre necessario per l'attivazione del recettore. Le cellule tumorali sovraesprimono un recettore di EGF *wild-type* che viene attivato anche in assenza del ligando attraverso la transattivazione del recettore (Normanno *et al.*, 2006). Inoltre le cellule tumorali esprimono anche EGFR mutato (EGFRvIII) caratterizzato da delezioni a livello del dominio extracellulare del recettore che permettono un'attivazione costitutiva del dominio tirosin-chinasico. Infine, molti tumori sovraesprimono TGF- β , ligando di EGFR (Dutta *et al.*, 2007).

EGFR agisce principalmente a due livelli sullo sviluppo e crescita tumorale:

- previene l'apoptosi sia bloccando i recettori di fattori proapoptotici come TNF- α che modulando positivamente l'espressione di proteine antiapoptotiche (Bianco *et al.*, 2007);
- stimola l'angiogenesi tumorale aumentando la produzione di VEGF, di metalloproteasi e di FGF-2. In particolare VEGF sembra essere il fattore di crescita maggiormente coinvolto nell'angiogenesi tumorale e viene rilasciato in seguito a vari stimoli dalle cellule tumorali. Una volta secreto, VEGF attiva le cellule endoteliali, ne promuove la migrazione e permette loro di acquisire il fenotipo angiogenico (Ellis, 2004; Tabernero, 2007).



Aumento dell'espressione di VEGF indotto dall'ambiente tumorale (Tabertero, 2007).

Le cellule endoteliali stesse, inoltre, esprimono EGFR, il che fa supporre una loro attivazione attraverso un'azione diretta da parte di EGF (Bozec *et al.*, 2006).

4.1.4 Approcci terapeutici

EGFR svolge un ruolo molto importante nella regolazione della crescita cellulare e proliferazione. Il ruolo di EGFR nello sviluppo tumorale è stato solo parzialmente definito, ma è certamente un importante mediatore della patogenesi tumorale. Da solo EGFR non è in grado di indurre la sopravvivenza cellulare in modo indefinito, ma agisce come un sensore del grado di apoptosi all'interno della cellula. Inoltre EGFR stimola la neoangiogenesi tumorale indispensabile per lo sviluppo del carcinoma e la metastasi. Per questo motivo negli ultimi vent'anni la ricerca si è orientata allo studio e alla formulazione di nuovi agenti terapeutici aventi come *target* EGFR. Sono stati sviluppati numerosi inibitori di EGFR aventi diversi meccanismi d'azione:

- i. anticorpi monoclonali (MAb), che legano il dominio extracellulare del recettore e competono con i ligandi endogeni;
- ii. inibitori tirosin-chinasici (TKI): piccole molecole che legano la regione intracellulare di EGFR;
- iii. immunotossine coniugate che veicolano tossine;
- iv. oligonucleotidi antisenso o iRNA che diminuiscono l'espressione di EGFR;
- v. farmaci che hanno come *target* molecole adattatrici coinvolte nella cascata del segnale di EGFR.

Tra questi, MAb e TKI sono sicuramente gli approcci più promettenti e più studiati (Bianco *et al.*, 2007).

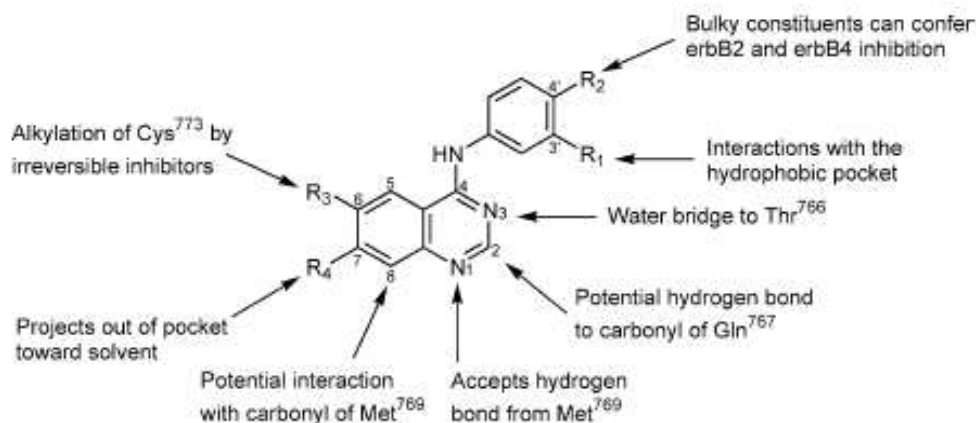
MAb

I MAb competono con il ligando per l'interazione al dominio extracellulare di EGFR, promuovendone l'internalizzazione e la degradazione. Essi, quindi, impediscono l'attivazione del dominio tirosin-chinasico e diminuiscono la densità di recettori liberi per EGF sulla superficie della cellula (Dutta *et al.*, 2007). Il primo MAb ad essere stato approvato è Cetuximab, anticorpo monoclonale umanizzato che ha un'affinità per il recettore maggiore rispetto a quella di EGF e TGF- α ed un'elevata emivita. Cetuximab, inoltre, lega anche il recettore mutato EGFRvIII. La sua attività antitumorale è dovuta all'inibizione della crescita delle cellule cancerose, alla perturbazione del ciclo cellulare, alla promozione dei meccanismi apoptotici e all'inibizione dell'angiogenesi con conseguente riduzione della possibilità di dare metastasi. Cetuximab è una molecola ben tollerata ed è utilizzata da sola o in associazione con altre terapie antitumorali per molti tipi di cancro come quello del colon, nasofaringeo, polmonare, del collo e del cervello (Ellis, 2004). Molti altri MAb diretti contro EGFR sono ora in via di sviluppo, tra cui Panitumumab, anticorpo completamente umano che promuove l'internalizzazione ma non la degradazione del recettore (Bianco *et al.*, 2007).

TKI

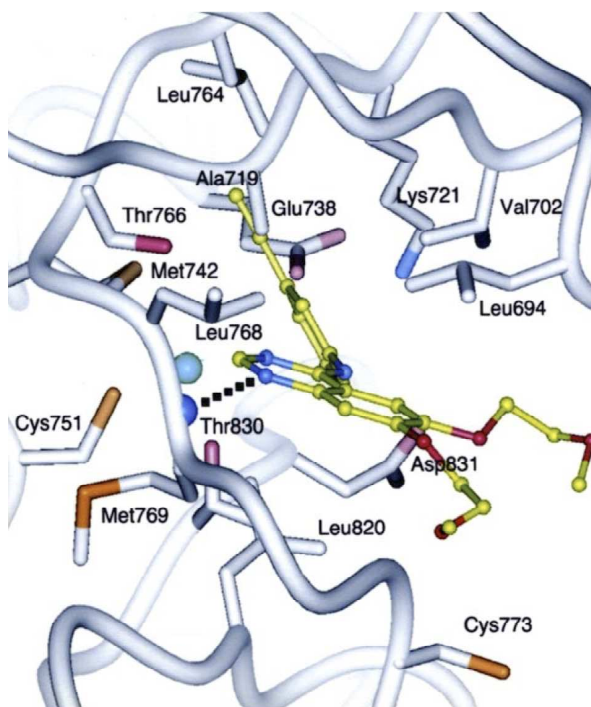
Gli inibitori tirosin-chinasici sono stati proposti come agenti antitumorali da quindici anni. Inizialmente l'attenzione fu riposta in TKI che avessero come *target* solamente ErbB-1, tuttavia furono prodotti molti composti aventi bassa potenza e specificità. Lo sviluppo di TKI ad elevata potenza e specificità si ebbe con l'identificazione dei composti anilinochinazolinici che sono il punto di riferimento per la sintesi di nuovi farmaci aventi come *target* il dominio tirosin-chinasico di EGFR (Fry, 2002). I derivati anilinochinazolinici sono piccole molecole che inibiscono l'autofosforilazione di EGFR e quindi l'attivazione del recettore e la cascata intracellulare del segnale (Ellis, 2004). TKI si legano al sito di legame per ATP nel dominio tirosin-chinasico intracellulare e ne bloccano l'attività catalitica. Uno dei problemi principali, legato all'impiego di questo approccio terapeutico è rappresentato dalla bassa specificità di questi inibitori, poiché molti enzimi utilizzano come substrato l'ATP. Inoltre, la concentrazione cellulare dell'ATP stesso è di 1-5 mM e molte protein-chinasi si attivano a concentrazioni molto più basse (0.2-20 μ M). Quindi a partire da queste considerazioni è lecito pensare che gli inibitori che si legano al sito dell'ATP siano inefficaci *in vivo*. Tuttavia la capacità dell'ATP di

legare le protein-chinasi nella loro conformazione inattiva è di molto inferiore alla capacità di legare la loro conformazione attiva. Questa differenza diminuisce la competizione tra ATP e inibitori, poiché questi si legano preferenzialmente alla conformazione inattiva del recettore, e ciò aumenta di conseguenza la loro efficacia in condizioni fisiologiche (Roskoski, 2004).



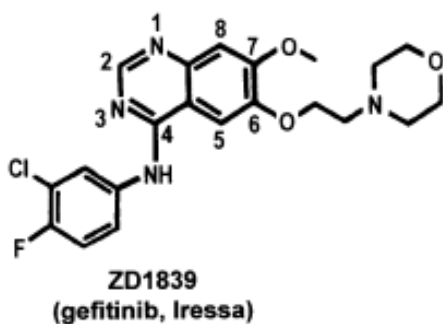
Struttura generica di una chinazolina e principali siti di interazione con i recettori HER (Fry, 2002).

L'atomo N1 della chinazolina interagisce attraverso un ponte ad idrogeno con Met⁷⁶⁹ della chinasi nello stesso modo in cui ATP interagisce con l'enzima. L'importanza di tale interazione è tale che la sostituzione di N1 con un atomo di carbonio diminuisce di circa 3700 volte la potenza inibitoria della molecola. N3, invece, interagisce attraverso un legame ad idrogeno con il gruppo idrossilico di Thr⁷⁶⁶ con l'interposizione di una molecola d'acqua come ponte. Il contributo che questa interazione apporta all'affinità è di molto inferiore rispetto a quella di N1. Infatti se viene sostituito N3 l'attività inibitoria diminuisce di 200 volte. C2 è legato attraverso un ponte ad idrogeno con Gln⁷⁶⁷, mentre probabilmente C8 interagisce con forze di van der Waals con Met⁷⁶⁹. La sostituzione nel nucleo chinazolinico con un'anilina in posizione C4 ha un ruolo importante nell'aumentare la selettività ed affinità di questi inibitori. L'anello fenilico dell'anilina, infatti, esce dal piano occupato dai due anelli condensati e va ad interagire con una tasca idrofobica del recettore. A questa regione del recettore hanno accesso solamente i TKI e non ATP e questo potrebbe spiegare perché alcuni inibitori hanno maggiore affinità per l'enzima rispetto al loro stesso substrato. Un'altra regione della chinazolina di particolare interesse per l'interazione con il sito di *binding* di ATP è C6 che, se alchilato con una catena di pochi atomi avente un gruppo elettrofilo, come l'acrilamide, può interagire con Cys⁷⁷³ formando un prodotto di addizione che provoca l'inibizione irreversibile dell'enzima (Fry, 2002).



Interazione di una chinazolina con il sito di binding dell'ATP (Roskoski, 2004).

Le due molecole di questa famiglia che sono state maggiormente studiate sono Gefitinib (ZD1839, Iressa®, Astra Zeneca) ed Erlotinib (OSI-774, Tarceva™, OSI Pharmaceuticals).

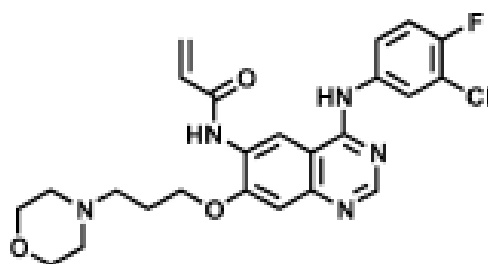


Gefitinib è un TKI reversibile, lega EGFR con grande affinità, bloccandolo, in concentrazioni nanomolari senza però promuoverne l'internalizzazione e la degradazione. Potenzia l'effetto citotossico di altri agenti chemioterapici ed è stato approvato per il trattamento del tumore al polmone in USA e Giappone come monoterapia in pazienti che non rispondono alle terapie convenzionali (Roskoski, 2004; Dutta *et al.*, 2007).

Erlotinib è un TKI reversibile ed è stato approvato per il trattamento di pazienti colpiti da *non-small-cell lung cancer* localmente avanzato o metastatico ed è il trattamento di elezione contro

il cancro pancreatico metastatico o localmente avanzato in associazione con gemcitabina. Erlotinib lega anche la tirosin-chinasi associata ad EGFRvIII, ma come Gefitinib, non diminuisce la densità dei recettori per EGF sulla superficie della cellula. Elevate dosi di Erlotinib sono richieste per ottenere un'efficace inibizione di EGFR e quindi un ottimale effetto chemioterapico nonostante *in vitro* blocchi il suo *target* a concentrazioni nanomolari (Bianco *et al.*, 2007).

Numerosi TKI con diversa specificità e potenza sono ora in fase avanzata di studio. Quelli più promettenti sono Canertinib e PD153035, che verrà descritto in seguito. Canertinib è un inibitore irreversibile di EGFR che lega tutti i membri della famiglia ErbB. Il suo meccanismo d'azione prevede l'alchilazione di un residuo di cisteina all'interno del sito di *binding* di ATP che inibisce l'autofosforilazione del recettore. È inoltre possibile che il potente effetto inibitorio dimostrato negli studi preclinici sia in parte dovuto alla degradazione del recettore (Bianco *et al.*, 2007).

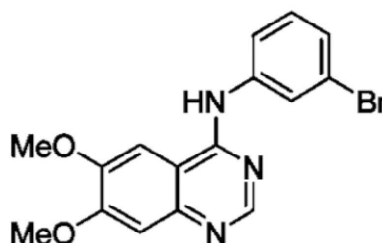


Struttura di Canertinib

I TKI vengono somministrati per via orale ed hanno breve emivita, quindi richiedono una somministrazione giornaliera e, generalmente, possiedono una bassa specificità se comparata a quella dei MAb (Bianco *et al.*, 2007). Un importante vantaggio evidenziato sia da TKI approvati finora sia da quelli in fase avanzata di studio, è rappresentato da effetti collaterali indotti molto meno severi rispetto a quelli causati dalle terapie convenzionali. La tossicità causata da questi inibitori si manifesta come *rash* cutaneo, eruzioni acneiformi localizzate prevalentemente a livello di viso, collo e arti superiori che scompaiono dopo la sospensione della somministrazione (Herbst, 2004).

PD153035

PD153035 o (6,7-dimetossichinazolin-4-il)-(3'-bromofenil)amina cloridrato è un inibitore specifico e potente della tirosin-chinasi di EGFR.

**PD 153035**

La sua costante di inibizione è nell'ordine delle picomoli per EGFR, mentre inibisce le altre tirosin-chinasi purificate se si trova in concentrazioni micromolari o superiori. Questo principio attivo inibisce l'autofosforilazione di EGFR a concentrazioni nanomolari nei fibroblasti e nelle cellule di carcinoma epidermoide umano bloccando selettivamente i processi intracellulari attivati da EGFR tra cui la mitogenesi e la trasformazione oncogenica (Fry *et al.*, 1994). PD153035 provoca una diminuzione della crescita cellulare principalmente nelle cellule che sovraesprimono EGFR e in modo dose-dipendente, contrastando tutti gli effetti provocati dalla somministrazione esogena di EGF (Bos *et al.*, 1997). Il trattamento con questo composto modula in modo diverso la trascrizione di 312 geni associati ai processi infiammatori, all'adesione cellulare, all'apoptosi e alla regolazione del ciclo cellulare. PD153035 stimola l'espressione di chemochine e promuove l'attivazione del sistema immunitario. L'attivazione di una risposta immunitaria potrebbe essere un nuovo meccanismo attraverso cui gli inibitori di EGFR prevengono l'infiammazione persistente dovuta al papilloma virus umano che evolve nel cancro della cervice uterina. In seguito a somministrazione del farmaco si ha diminuzione dell'espressione di diverse proteine antiapoptotiche e aumento delle proteine proapoptotiche. L'inibizione dell'attività di EGFR da parte di PD153035 previene l'invasione dei tessuti da parte delle cellule tumorali. Questo processo è inibito in modo dose-dipendente ed è dovuta al fatto che questo TKI aumenta l'espressione di geni che aumentano l'adesione cellula-cellula e cellula-matrice e diminuisce l'espressione delle metalloproteasi (Woodworth *et al.*, 2005). Questa molecola porta anche ad una significativa inibizione dell'angiogenesi, poiché diminuisce la produzione di VEGF da parte delle cellule che sovraesprimono EGFR (Cole *et al.*, 2005). Tuttavia, come gli altri TKI, non diminuisce l'espressione di EGFR sulla superficie cellulare (Bos *et al.*, 1997).

PD153035 è attualmente in fase clinica II ed è stato estensivamente usato come struttura di base per la progettazione di nuovi e più efficaci farmaci di questa famiglia (Klein *et al.*, 2009).

Vandetanib

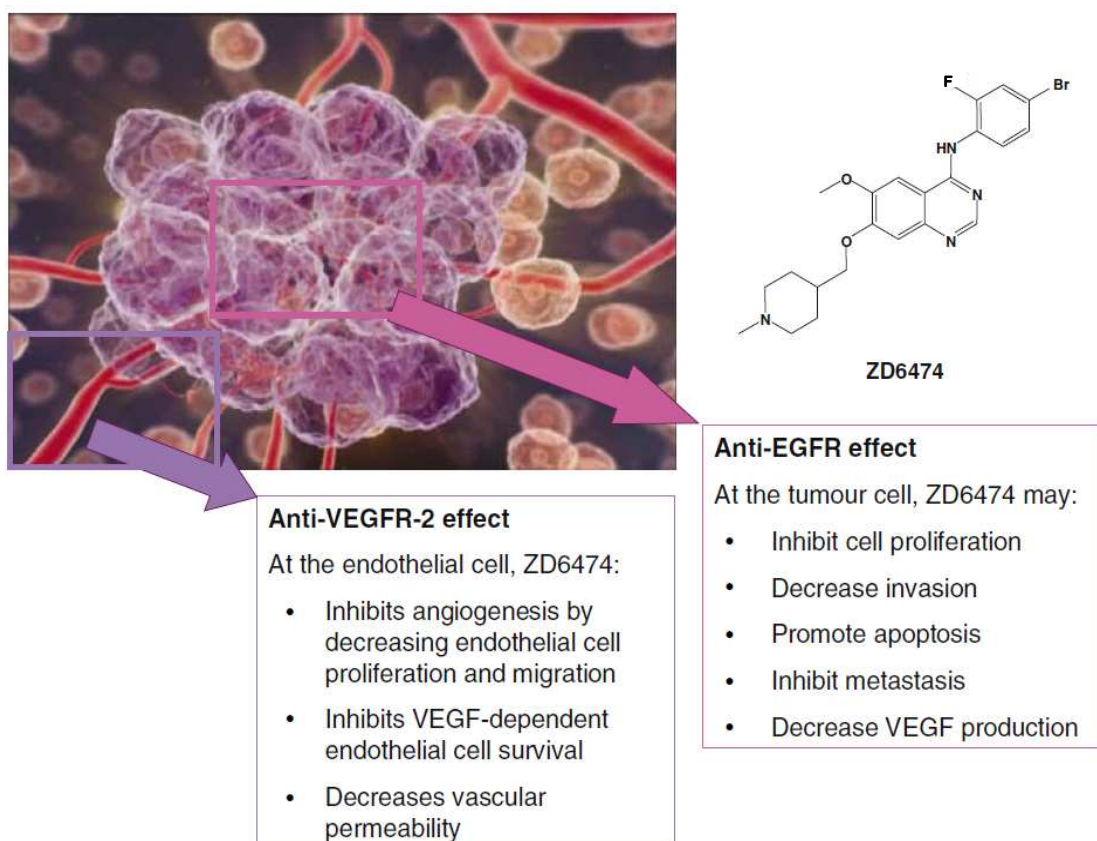
Nei tumori solidi, i *pathways* di EGFR e VEGF sono collegati, in particolare per quanto riguarda l'angiogenesi. EGF e TGF- α inducono l'espressione di VEGF attraverso l'attivazione di EGFR in modelli di colture cellulari, dimostrando quindi proprietà proangiogeniche. La cascata del segnale derivante da EGFR modula quindi l'angiogenesi attraverso l'*up-regulation* di VEGF e di altri mediatori chiave nel processo angiogenico (Ellis, 2004). Nei modelli preclinici, il blocco di EGFR da parte di TKI provoca una *down-regulation* dei mediatori proangiogenici, tra cui VEGF, provocando una riduzione nella densità dei microvasi e della metastasi. Attraverso il blocco di EGFR, può essere possibile sensibilizzare le cellule ad una terapia antiangiogenica, riducendo la loro capacità di sopravvivere e, viceversa, le cellule possono incontrare più difficoltà a sopravvivere in assenza di un'adeguata vascolarizzazione diventando maggiormente sensibili ad una terapia antitumorale. Tuttavia, l'inibizione di EGFR non può, da sola, bloccare la produzione di VEGF perché l'espressione di quest'ultimo è regolata da molti altri fattori. Inoltre, la somministrazione prolungata di inibitori di EGFR può provocare lo sviluppo di resistenze e una maggiore produzione di VEGF, che può contribuire a rendere le cellule tumorali resistenti agli inibitori (Tabernero, 2007).

VEGF interagisce principalmente con recettori presenti sulle cellule endoteliali, ma può legarsi anche a recettori presenti su cellule tumorali, ematopoietiche e neuronali. Dei due recettori noti per questo fattore di crescita, VEGFR-1 o Flt-1 e VEGFR-2 o KFR, il secondo è il recettore principale nella trasmissione del segnale indotto da VEGF. KDR è infatti coinvolto nell'induzione della proliferazione, dell'angiogenesi e della permeabilità vascolare, tutti effetti notoriamente tipici di VEGF. Quando il fattore di crescita si lega a VEGFR-2, al pari di tutti i recettori tirosin-chinasici, avviene la dimerizzazione del recettore e la conseguente induzione della fosforilazione ad opera dell'attività tirosin-chinasica. Inizia in questo modo il *pathway* intracellulare che si traduce in un aumento della proliferazione delle cellule endoteliali, migrazione, sopravvivenza, *sprouting* e formazione di strutture tubulari, così come una *up-regulation* di molecole coinvolte nella degradazione della ECM (Tabernero, 2007). Gli effetti proliferativi indotti da VEGF sono quindi responsabili della progressione tumorale, sia per un'azione diretta sulla proliferazione delle cellule cancerose, che, soprattutto, per l'induzione dell'angiogenesi tumorale.

Rispetto a un approccio terapeutico mirato ad un solo pathway tumorale, la combinazione di più bersagli può far supporre un potenziale aumento dell'efficacia terapeutica. Per tale motivo, sono stati progettati TKI in grado di inibire sia il recettore di EGF che di VEGF. In questo modo si

potrebbero contrastare sia la crescita tumorale, inibendo la proliferazione e la sopravvivenza cellulare EGFR-dipendenti, sia il processo di neovascolarizzazione, con meccanismo indiretto, agendo sull'inibizione del rilascio di VEGF via EGFR da parte delle cellule tumorali, e direttamente sulle cellule endoteliali, bloccando il *signaling* dei due fattori di crescita che non riescono ad attivare il proprio recettore.

Vandetanib (o ZD6474) è un inibitore duale di EGFR e VEGFR-2 che contrasta la progressione di forme cancerose resistenti agli inibitori di EGFR, probabilmente grazie all'effetto inibitorio che questo composto esercita sui segnali derivanti da VEGF. Questo TKI a struttura anilinochinazolinica, che attualmente si trova in fase clinica II, lega in maniera reversibile KDR e EGFR, andando ad occupare il sito intracellulare di legame per l'ATP in modo analogo ai TKI già descritti (Wedge *et al.*, 2002). Vandetanib mostra un potente effetto inibitorio verso VEGFR-1, VEGFR-2 e EGFR in diversi modelli murini, bloccando sia il *signaling* di VEGF che l'angiogenesi e la crescita tumorale (Tabernero, 2007). Inoltre riesce a contrastare la crescita di tumori che hanno già sviluppato una resistenza verso TKI selettivi per solo EGFR, probabilmente grazie alla sua azione inibitoria della cascata intracellulare di VEGF (Ciardiello *et al.*, 2004).



Struttura e effetti biologici di Vandetanib (ZD6474) (Ryan *et al.*, 2005).

5. Agenti antimitotici nella terapia antitumorale

5.1 Agenti antimitotici

Gli agenti anti-mitotici sono una classe di composti, prevalentemente di origine naturale, utilizzati in terapia antitumorale per l'elevata attività antiproliferativa. Il loro bersaglio molecolare è rappresentato dalla tubulina, componente base dei microtubuli. Interferendo sulla dinamica di assemblaggio-disassemblaggio degli α,β -eterodimeri di tubulina, inducono la morte cellulare senza provocare danni al DNA e quindi mutazioni a livello del genoma. Tale meccanismo d'azione è anche alla base dell'attività antiangiogenica, manifestata da alcuni composti di questa classe e che rappresenta un modo indiretto per bloccare o limitare lo sviluppo della massa tumorale tramite soppressione dello scambio di nutrienti e di gas.

Gli agenti anti-mitotici sono suddivisibili in due classi: i) inibitori della polimerizzazione e ii) inibitori della depolimerizzazione.

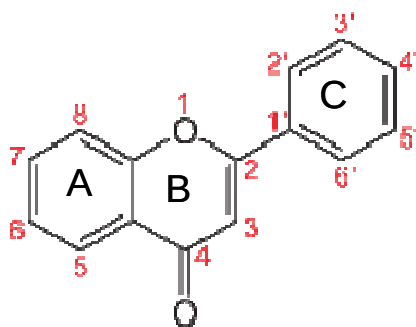
La prima classe comprende sostanze in grado di inibire la polimerizzazione della tubulina, bloccando in tal modo l'assemblaggio del microtubulo e favorendone la depolimerizzazione. Si tratta quindi di agenti destabilizzanti che si legano a due distinti domini presenti nella β -tubulina. La colchicina e i suoi derivati si legano in un sito localizzato all'interfaccia intradimero tra α e β tubulina, mentre gli alcaloidi della *Vinca Rosea*, quali vincristina e vinblastina, interagiscono con un sito presente all'interfaccia dell'estremità positiva della β tubulina, accanto al sito di legame del GTP. In entrambi i casi, il complesso sostanza-microtubulo rallenta il processo di allungamento dei microtubuli, aumentando in misura più o meno marcata la depolimerizzazione del filamento citoscheletrico. Attualmente, mentre la colchicina non viene più utilizzata a causa della sua elevata tossicità, la vinblastina, come del resto anche la vincristina, trovano impiego nella terapia di numerosi tipi di neoplasie.

Gli inibitori della depolimerizzazione, legandosi in tasche lipofile della β -tubulina aumentano il processo di polimerizzazione, portando alla formazione di microtubuli non funzionali. A questa classe di agenti stabilizzanti appartiene il tassolo (Paclitaxel), utilizzato principalmente nella terapia di tumori solidi, quali quello mammario e polmonare (Albert *et al.*, V edizione).

5.2 Flavoni e derivati

I flavoni come antimitotici

I flavoni appartengono alla famiglia dei flavonoidi, composti polifenolici presenti in natura, in grado di inibire la polimerizzazione della tubulina, legandosi allo stesso dominio di legame della colchicina. L'azione antitumorale di questi composti è stata attribuita anche ad altri meccanismi d'azione, quali alterazione dell'espressione genica e dell'attività di enzimi epatici (citocromi) coinvolti nel metabolismo di sostanze cancerose, inibizione di enzimi regolatori come proteinasi K e fosfodiesterasi, inibizione delle aromatasi (implicate nella sintesi degli estrogeni) e inibizione delle topoisomerasi.



Flavoni

E' stato evidenziato che la parte della molecola dei flavoni responsabile del legame con il sito della colchicina all'interno della β -tubulina è il sistema biarilico A-C. Da questa struttura di base sono state effettuate modifiche con lo scopo di ottenere derivati anti-mitotici più potenti. La sintesi di numerose molecole ha consentito di ottenere importanti relazioni struttura-attività, che possono essere così riassunte:

- tutti i composti rigidi (con un sistema di anelli fusi in posizione 2,3) e tutti i derivati con un eterociclo in posizione 2 al posto del fenile risultano essere meno o per niente attivi rispetto agli analoghi 2-fenil sostituiti;
- per quanto riguarda il fenile in posizione 2, i composti più attivi sono quelli con l'anello libero o sostituiti in meta;
- la sostituzione dell'ossigeno in posizione 1 con un atomo di azoto (2-fenil-chinolin-4-oni) aumenta l'effetto antimitotico.

E' stato dimostrato che gli aza-flavoni o 2-fenil-chinolin-4-oni, i diaza-flavoni o 2-fenil-quinazolinoni e i fenil-naftiridinoni possiedono una potente attività citotossica *in vitro* ma sono

privi di qualsiasi selettività (Xia *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1994; Jiang *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 1997). La maggior parte di questi composti interagisce in modo specifico con i siti di legame per la colchicina sulla β -tubulina ed esercita una forte attività citotossica proporzionale all'effetto anti-mitotico (Zhang *et al.*, 2000). E' stato inoltre confermato che i 2-fenil-pirrolo[2,3-h]chinolin-4-oni, aza-analoghi triciclici dei flavoni, sono citotossici, con una significativa selettività nei confronti di linee cellulari la cui crescita dipende dagli estrogeni (Ferlin *et al.*, 2005).

Studi sul meccanismo di azione confermano la capacità di questi nuovi composti triciclici di interferire con i microtubuli, ma anche di inibire CYP-19 (Seralini *et al.*, 2001). È stato supposto che l'attività anti-aromatasi potrebbe essere dovuta all'anello fenilico, ai gruppi carbonilico e 7-NH dei flavoni (Pouget *et al.*, 2002) e alla struttura triciclica, con geometria angolare simile a quella dei 7,8-benzoflavoni, potenti inibitori delle aromatasi (Sanderson *et al.*, 2004).

Alcuni 7-fenil-pirrolo[3,2-f]quinolin-9-oni, che agiscono sulla depolimerizzazione della tubulina, erano più potenti (valori di IC_{50} al di sotto di 1 μ M per le linee cellulari tumorali Hela, H295R e PT-45) rispetto ai 2-fenil-pirrolo[2,3-h]chinolin-4-oni (IC_{50} variabile da 8 a 0.7 μ M), ma a differenza dei loro analoghi, non presentavano alcuna selettività per le linee cellulari tumorali estrogeno-dipendenti, quali Ovar-3, MCF-7, Hela, HepG2 and H295R. Pertanto essi non inibivano l'attività dell'aromatasi CYP-19, confermando che la struttura [3,2-f] pirrolochinolinonica non è adatta all'interazione con quell'enzima, a differenza della struttura [2,3-h] degli analoghi precedentemente descritti, che mostravano citotossicità selettiva verso le linee cellulari tumorali umane sensibili agli estrogeni (Ferlin *et al.*, 2005). In conclusione il meccanismo di citotossicità dei 7-fenil-pirrolochinolinoni è attribuito solo all'attività anti-mitotica, in quanto causano destabilizzazione dei microtubuli analogamente agli alcaloidi della vinca, mentre i 2-fenil-pirrolochinoloni agiscono con duplice meccanismo anti-tubulina e anti-aromatasi, che conferisce una selettiva attività antitumorale verso le linee cellulari tumorali estrogeno-dipendenti.

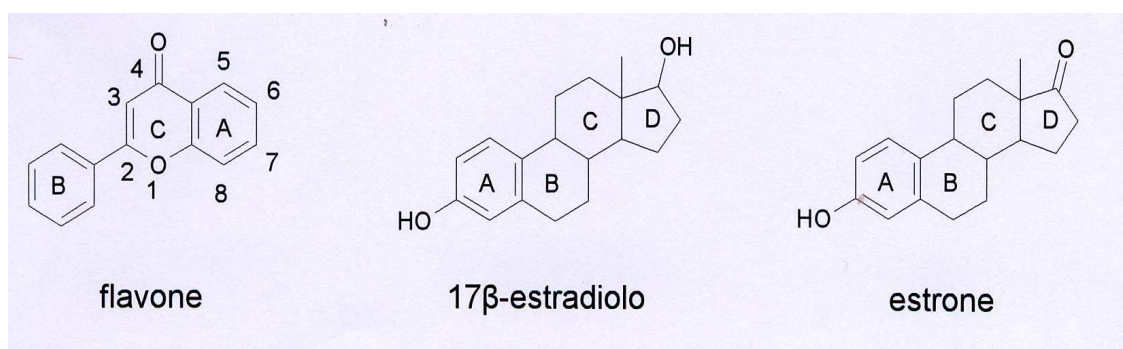
I flavoni e l'aromatasi

Nella postmenopausa, gli estrogeni non vengono più prodotti nelle ovaie, ma sono soprattutto sintetizzati nella corteccia surrenale e nei tessuti muscolare e adiposo attraverso la conversione degli androgeni ad estrogeni tramite l'enzima aromatasi. Alcuni studi hanno evidenziato che la presenza locale di cellule di carcinoma mammario può aumentare l'attività aromatasi, innalzando in modo significativo i livelli di estrogeni nei tessuti tumorali rispetto a quelli

normali (Miller *et al.*, 1997). Gli estrogeni, infatti, sono potenti induttori della crescita tumorale nelle donne affette da carcinoma mammario positivo al recettore per gli estrogeni. Gli ormoni sessuali femminili, estradiolo ed estrone, si legano a recettori citoplasmatici che, formando un complesso dimerico, migrano nel nucleo dove modificano l'espressione genica e stimolano la proliferazione cellulare. Circa un terzo dei tumori alla mammella sono dipendenti da estrogeni e rispondono alla privazione di questi. Per questo motivo, sono state sviluppate sostanze in grado di agire sulle vie nelle quali sono coinvolti tali ormoni.

Gli inibitori delle aromatasi sono nuovi farmaci per il trattamento endocrino del carcinoma mammario primario ed avanzato. Essi bloccano la conversione degli androgeni ad estrogeni, portando gli estrogeni nel tessuto tumorale a livelli molto bassi (Santen *et al.*, 1987). Per questi motivi, il loro utilizzo viene evitato nelle donne in pre-menopausa. L'aromatasi é un enzima citocromo P450 (CYP-19) che é responsabile della conversione dell'androstenedione in estrone (E1) e della conversione del testosterone in estradiolo (E2). Gli inibitori delle aromatasi riducono la biosintesi degli estrogeni, abbassando quindi le concentrazioni di E1, E2 ed estrone solfato nel siero e nel tessuto mammario. Essi si suddividono in due ampie categorie, steroidei e non steroidei, che differiscono tra loro per il meccanismo d'inibizione (Budzar *et al.*, 2002).

In questo contesto, alcuni ricercatori hanno osservato che i flavoni agiscono preferenzialmente a livello della sintesi degli estrogeni, inibendo l'enzima aromatasi. Studi struttura-attività eseguiti in combinazione con un'analisi di *modeling* computazionale hanno evidenziato che i flavoni si legano al sito attivo dell'enzima aromatasi interagendo attraverso gli anelli C e A, i quali mimano gli anelli C e D presenti nel nucleo ciclopentanoperidrofenantrenico degli ormoni steroidei.



In particolare, è stata evidenziata l'importanza del gruppo carbonilico in posizione 4 per l'interazione con l'enzima (la sua riduzione o eliminazione riduce drasticamente l'attività) e che i derivati più potenti sono i 7,8-benzoflavoni e gli analoghi idrossilati in 9.

SCOPO

Lo sviluppo di nuovi principi attivi antitumorali *multitarget* ad azione sia diretta, sulle cellule tumorali, che indiretta, tramite inibizione dell'angiogenesi tumorale, rappresenta un importante obiettivo per identificare nuove strategie terapeutiche antitumorali.

Derivati 4-aminochinazolinici

L'espressione di elevati livelli di EGFR e l'alterazione dei segnali che da esso derivano risultano correlate ad un maggiore rischio di cancerogenesi. Infatti, EGFR risulta sovra-espresso in numerose forme tumorali, nelle quali la sua attivazione risulta priva di controllo, comportando alterazione dei processi di proliferazione e differenziamento cellulari. Sono stati proposti e studiati numerosi approcci terapeutici basati su composti in grado di inibire EGFR, attraverso il *binding* ai suoi diversi domini; tra questi, appare particolarmente interessante lo sviluppo di inibitori delle tirosin-chinasi, che agiscono legandosi alla porzione intracellulare del recettore. EGFR svolge un ruolo centrale anche nell'angiogenesi tumorale in quanto, oltre ad essere espresso sulle cellule tumorali, è presente anche nelle EC localizzate all'interno della massa tumorale. Un'alterata espressione o attivazione del recettore di EGF è stata identificata in numerosi tumori solidi e si è visto che bloccando EGFR di cellule epiteliali neoplastiche si ottiene un effetto antiangiogenico dovuto soprattutto alla diminuzione di fattori proangiogenici nell'ambiente tumorale (Ellis, 2004).

In tale contesto, si inserisce questo lavoro nel quale è stata eseguita una valutazione dell'attività antitumorale *in vitro* e antiangiogenica *in vitro* e *in vivo* di una serie di composti 4-aminochinazolinici di nuova sintesi. I derivati sono stati sintetizzati dalla Prof.ssa Adriana Chilin del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università degli Studi di Padova a partire dalla struttura di PD153035 e Vandetanib.

Per la valutazione dell'attività antitumorale sono state utilizzate due linee cellulari: i) A431, cellule tumorali di adenocarcinoma squamoso vulvare umano che sovra-esprimono EGFR e ii) NIH3T3, fibroblasti murini di origine embrionale non esprimenti EGFR (Koyama *et al.*, 2007). Successivamente è stata valutata sia *in vitro* che *in vivo* l'attività antiangiogenica di tali derivati e la loro capacità di contrastare gli effetti proangiogenici di citochine esogene.

Derivati fenil-pirrolochinolinonici

Gli agenti anti-mitotici sono una classe di composti utilizzati in terapia antitumorale per l'elevata attività antiproliferativa. Un esempio di sostanze attive in questo senso sono i flavoni, composti polifenolici presenti in natura in grado di inibire la polimerizzazione della tubulina, legandosi allo stesso dominio di legame della colchicina. L'azione antitumorale di questi composti è stata attribuita anche ad altri meccanismi d'azione, come l'alterazione dell'espressione genica e dell'attività di enzimi epatici (citocromi) coinvolti nel metabolismo di sostanze cancerose. Il loro bersaglio molecolare è rappresentato dalla tubulina, componente base dei microtubuli. Interferendo sulla dinamica di assemblaggio-disassemblaggio degli α,β -eterodimeri di tubulina, inducono la morte cellulare senza provocare danni al DNA e quindi mutazioni a livello del genoma. Tale meccanismo d'azione è anche alla base dell'attività antiangiogenica, manifestata da alcuni composti di questa classe e che rappresenta un modo indiretto per bloccare o limitare lo sviluppo della massa tumorale.

Studi sul meccanismo di azione confermano la capacità di questi nuovi composti tricyclici di interferire con i microtubuli, ma anche di inibire l'aromatasi CYP-19 (Seralini *et al.*, 2001).

In questo lavoro è stata studiata l'attività antiangiogenica *in vitro* e *in vivo* di una serie di derivati fenil-pirrolochinolinonici in grado di destabilizzare i microtubuli, analogamente alla vinblastina (Ferlin *et al.*, 2005).

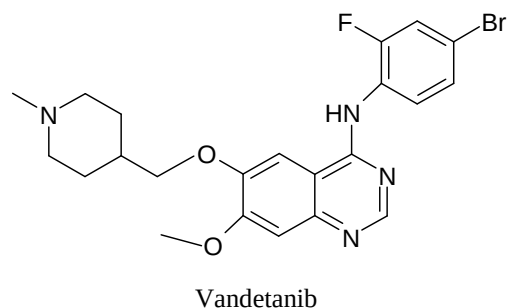
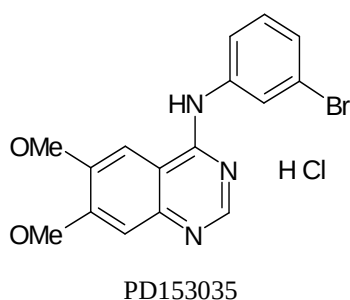
MATERIALI E METODI

1. Composti chimici

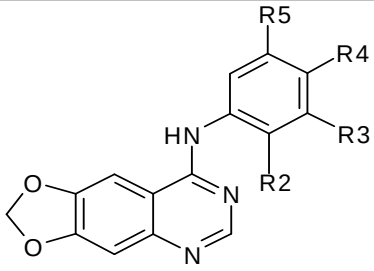
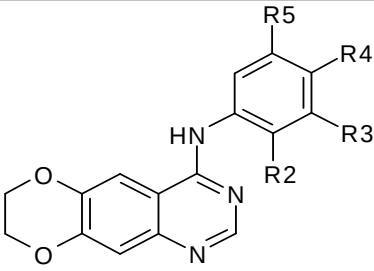
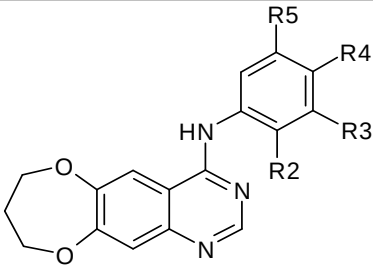
1.1 Derivati 4-aminochinazolinici

Le sostanze sono state sintetizzate dalla Prof.ssa Adriana Chilin del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università degli Studi di Padova.

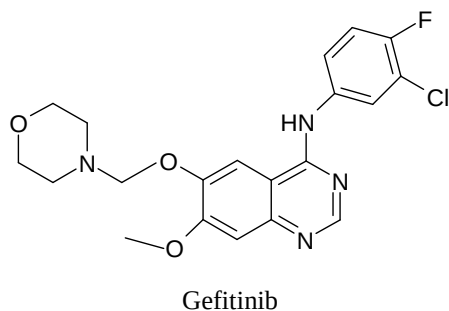
Come composti di riferimento sono stati utilizzati PD153035 o (6,7-dimetossichinazolin-4-il)-(3'-bromofenil)amina cloridrato e Vandetanib o [6-metossi-7-(1-metilpiperidina)chinazolin-4-il]-(4'-bromo-2'-fluorofenil)amina.



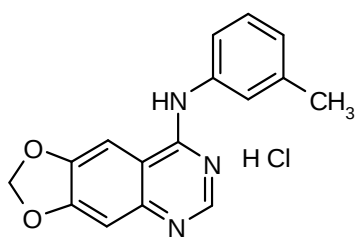
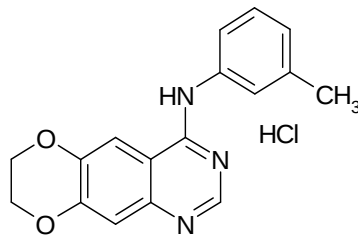
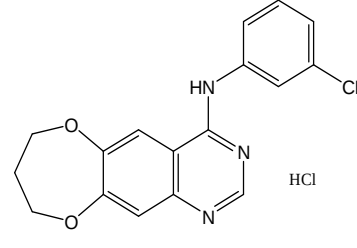
I composti studiati presentano, rispetto a PD153035, un gruppo metilendiossi, etilendiossi oppure propilendiossi condensato alla chinazolina alle posizioni 6 e 7, con conseguente formazione di un eterociclo a 5, 6 o 7 atomi. Sono state inoltre apportate modifiche a livello dell'anilina, legata in posizione 4, introducendo dei gruppi aventi diverso grado di lipofilia e/o ingombro sterico.

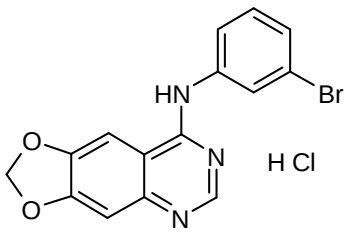
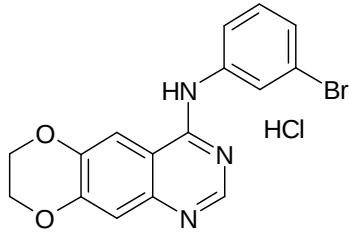
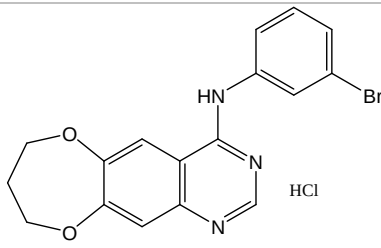
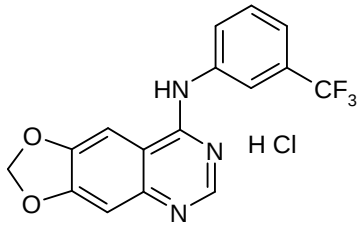
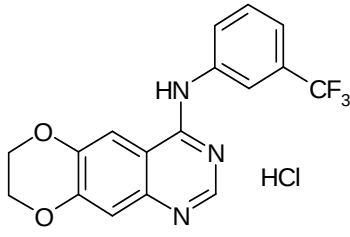
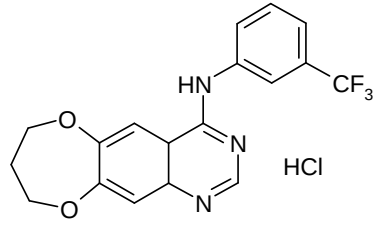
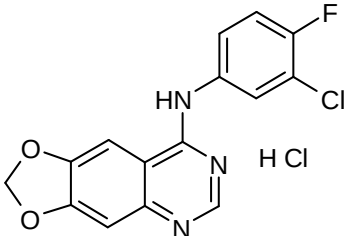
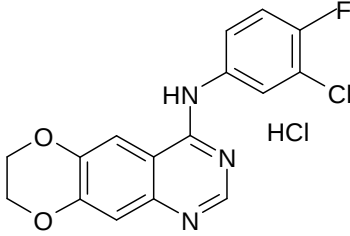
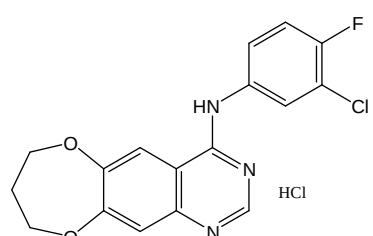
 Struttura di base dei composti 6,7-metilendiossi-4-aminochinazolinici	 Struttura di base dei composti 6,7-etilendiossi-4-aminochinazolinici	 Struttura di base dei composti 6,7-propilendiossi-4-aminochinazolinici
--	---	---

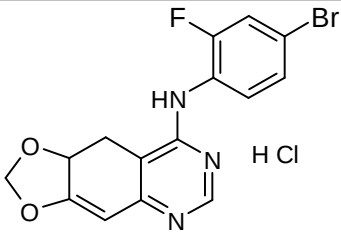
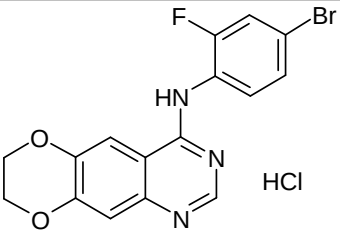
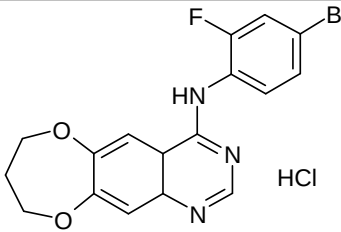
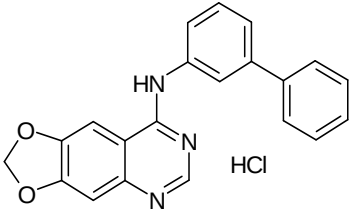
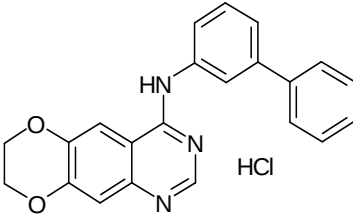
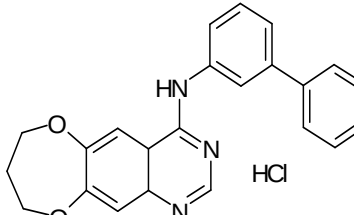
L'introduzione di 2 atomi di alogeno nell'anello dell'anilina è stata effettuata in analogia alle strutture di Gefitinib (5-Cl,F; 6-Cl,F; 7-Cl,F), un altro TKI selettivo per EGFR, e Vandetanib (5-F,Br; 6-F,Br; 7-F,Br).



Di seguito sono riportati i nomi chimici dei composti e le relative formule di struttura.

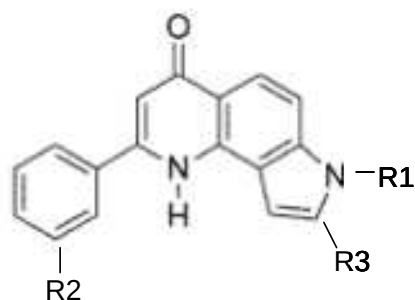
Sigla e nome chimico	5-CH ₃	6-CH ₃	7-CH ₃
	(6,7-metilendiossichinazolin-4-il)-(3'-metilfenil)amina cloridrato (C ₁₆ H ₁₄ ClN ₃ O ₂)	(6,7-etilendiossichinazolin-4-il)-(3'-metilfenil)amina cloridrato (C ₁₇ H ₁₄ ClN ₃ O ₂)	(6,7-propilendiossichinazolin-4-il)-(3'-metilfenil)amina cloridrato (C ₁₈ H ₁₄ ClN ₃ O ₂)
Struttura	 R3: CH₃	 R3: CH₃	 R3: CH₃

Sigla e nome chimico	5-Br (6,7-metilendiossichinazolin-4-il)- (3'-bromofenil)amina cloridrato (C ₁₅ H ₁₁ BrClN ₃ O ₂)	6-Br (6,7-etilendiossichinazolin-4-il)- (3'-bromofenil)amina cloridrato (C ₁₆ H ₁₁ BrClN ₃ O ₂)	7-Br (6,7-propilendiossichinazolin-4-il)- (3'-bromofenil)amina cloridrato (C ₁₇ H ₁₁ BrClN ₃ O ₂)
Struttura	 R3: Br	 R3: Br	 R3: Br
Sigla e nome chimico	5-CF₃ (6,7-metilendiossichinazolin-4-il)- (3'-trifluorometilfenil)amina cloridrato (C ₁₆ H ₁₁ ClF ₃ N ₃ O ₂)	6-CF₃ (6,7-etilendiossichinazolin-4-il)- (3'-trifluorometilfenil)amina cloridrato (C ₁₇ H ₁₁ ClF ₃ N ₃ O ₂)	7-CF₃ (6,7-propilendiossichinazolin-4-il)- (3'-trifluorometilfenil)amina cloridrato (C ₁₈ H ₁₁ ClF ₃ N ₃ O ₂)
Struttura	 R3: CF ₃	 R3: CF ₃	 R3: CF ₃
Sigla e nome chimico	5-Cl,F (6,7-metilendiossichinazolin-4-il)- (3'-cloro,4'-fluorofenil)amina cloridrato (C ₁₅ H ₁₀ ClFN ₃ O ₂)	6-Cl,F (6,7-etilendiossichinazolin-4-il)- (3'-cloro,4'-fluorofenil)amina cloridrato (C ₁₆ H ₁₀ ClFN ₃ O ₂)	7-Cl,F (6,7-propilendiossichinazolin-4-il)- (3'-cloro,4'-fluorofenil)amina cloridrato (C ₁₇ H ₁₀ ClFN ₃ O ₂)
Struttura	 R3: Cl e R4: F	 R3: Cl e R4: F	 R3: Cl e R4: F

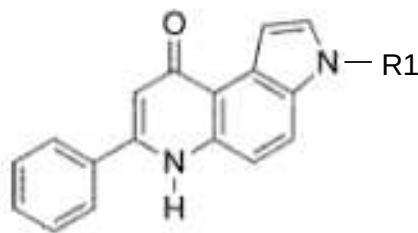
Sigla e nome chimico	5-F,Br (6,7-metilendioossichinazolin-4-il)- (2'-fluoro,4'-bromofenil)amina cloridrato $(C_{15}H_{10}BrClFN_3O_2)$	6-F,Br (6,7-etilendioossichinazolin-4-il)- (2'-fluoro,4'-bromofenil)amina cloridrato $(C_{16}H_{10}BrClFN_3O_2)$	7-F,Br (6,7-propilendioossichinazolin-4-il)- (2'-fluoro,4'-bromofenil)amina cloridrato $(C_{17}H_{10}BrClFN_3O_2)$
Struttura	 R2: F e R4: Br	 R2: F e R4: Br	 R2: F e R4: Br
Sigla e nome chimico	5-Ph (6,7-metilendioossichinazolin-4-il)- (3'fenil-fenil)amina cloridrato $(C_{21}H_{15}ClN_3O_2)$	6-Ph (6,7-etilendioossichinazolin-4-il)- (3'fenil-fenil)amina cloridrato $(C_{22}H_{15}ClN_3O_2)$	7-Ph (6,7-propilendioossichinazolin-4-il)- (3'fenil-fenil)amina cloridrato $(C_{23}H_{15}ClN_3O_2)$
Struttura	 R3: Ph	 R3: Ph	 R3: Ph

1.2 Derivati fenil-pirrolochinolinonici

I derivati fenil-pirrolochinolinonici sono stati sintetizzati dalla prof.ssa Maria Grazia Ferlin del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università degli Studi di Padova. Sono state studiate due serie di composti: la prima serie, composta di otto sostanze, presentava geometria [2,3-*h*], mentre la seconda, alla quale appartenevano tre sostanze, possedeva geometria [3,2-*f*].



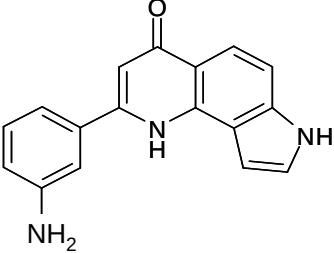
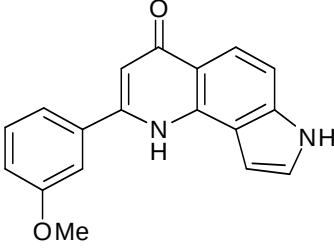
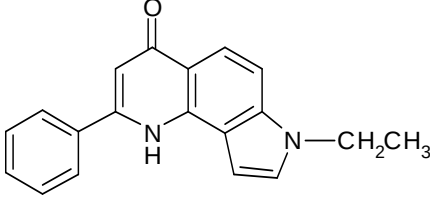
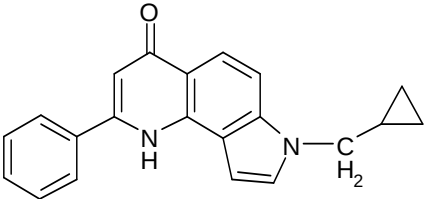
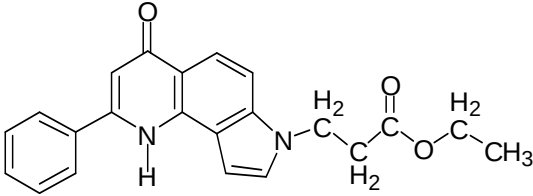
Struttura di base dei derivati con geometria [2,3-*h*]:
2fenil-1*H*,7*H*-pirrolo[2,3-*h*]chinolin-4-one
(serie derivati 2P).

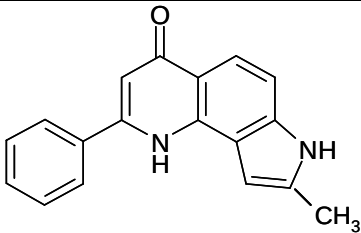
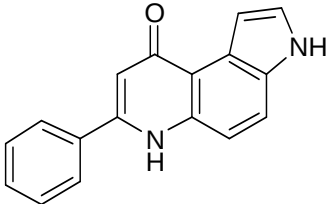
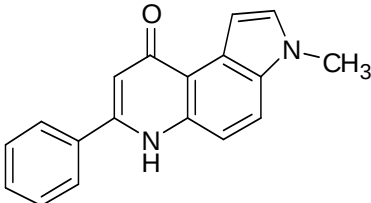
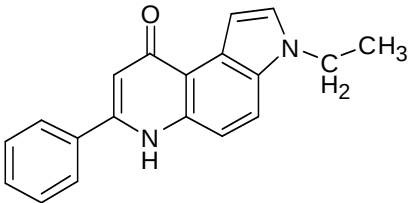


Struttura di base dei derivati con geometria [3,2-*f*]:
7fenil-3*H*,6*H*-pirrolo[3,2-*f*]chinolin-9-one
(serie derivati 7P).

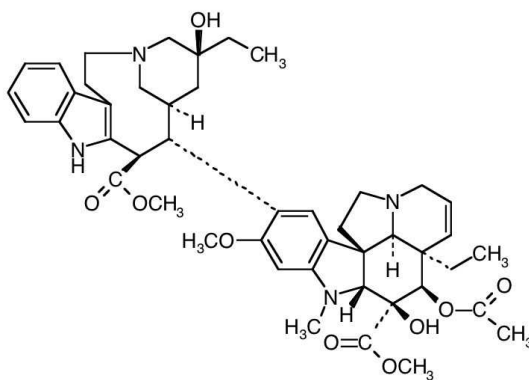
Di seguito sono riportati i nomi chimici delle sostanze studiate, e le relative formule di struttura.

Struttura	Nome	Sigla
R1, R2, R3: H	2-fenil-1 <i>H</i> ,7 <i>H</i> -pirrolo[2,3- <i>h</i>] chinolin-4-one	2P
R2: NO₂ R1, R3: H	2(3'-nitrofenil)-1 <i>H</i> ,7 <i>H</i> -pirrolo [2,3- <i>h</i>]chinolin-4-one	2P-nitro

 R2: NH₂ R1, R3: H	2(3'-aminofenil)-1<i>H</i>,7<i>H</i>-pirrolo [2,3-<i>h</i>]chinolin-4-one	2P-amino
 R2: OCH₃ R1, R3: H	2(3'-metossifenil)-1<i>H</i>,7<i>H</i>-pirrolo [2,3-<i>h</i>]chinolin-4-one	2P-ossimet
 R1: CH₂CH₃ R2, R3: H	7-etil-2-fenil-1<i>H</i>-pirrolo[2,3-<i>h</i>] chinolin-4-one	2P-et
 R1: CH₂(CHCH₂CH₂) R2, R3: H	7(ciclopropilmetil)-2-fenil-1<i>H</i>- pirrolo[2,3-<i>h</i>]chinolin-4-one	2P-cpmet
 R1: CH₂CH₂COOC₂H₅ R2, R3: H	7(etossicarbonilettil)-2-fenil-1<i>H</i>- pirrolo[2,3-<i>h</i>]chinolin-4-one	2P-estere

 R3: CH₃ R1, R2: H	2-fenil-8-metil-1 <i>H</i> ,7 <i>H</i> -pirrolo[2,3- <i>h</i>] chinolin-4-one	2P-met
 R1: H	7-fenil-3 <i>H</i> ,6 <i>H</i> -pirrolo [3,2- <i>f</i>]chinolin-9-one	7P
 R1: CH₃	7-fenil-3-metil-6 <i>H</i> -pirrolo[3,2- <i>f</i>] chinolin-9-one	7P-met
 R1: CH₂CH₃	7-fenil-3-etil-6 <i>H</i> -pirrolo[3,2- <i>f</i>] chinolin-9-one	7P-et

La vinblastina, utilizzata come composto di riferimento, è stata fornita dalla ditta *Sigma*.



Vinblastina

2. Colture cellulari

2.1 A431

Le A431, cellule tumorali di adenocarcinoma squamoso vulvare umano, sono state fornite dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia e sono state coltivate in terreno base *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, *Sigma*) addizionato del 10% di *Fetal Bovine Serum* (FBS, *Euroclone*), di una soluzione di *Penicillin Streptomycin* (*Sigma*) (concentrazione finale 1 mM) e di L-glutamina (*Sigma*) (concentrazione finale 2 mM). Il terreno così composto è stato definito completo.

2.2 NIH3T3

Le NIH3T3, fibroblasti murini embrionali, sono state fornite dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia e sono state coltivate in terreno base *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, *Sigma*) addizionato del 10% di *Fetal Calf Serum* (FCS, *Promocell*), di una soluzione di *Penicillin Streptomycin* (*Sigma*) (concentrazione finale 1 mM) e di L-glutamina (*Sigma*) (concentrazione finale 2 mM). Il terreno così composto è stato definito completo.

2.3 HUVEC

Le EC da vena di cordone ombelicale umano (HUVEC) sono state estratte attraverso digestione enzimatica utilizzando una soluzione di *Collagenasi IV* (*Sigma*) allo 0,1% in una soluzione tampone sodio-fosfato (PBS; *Gibco-Invitrogen Corporation*). In tal modo viene distrutta la componente collagene del tessuto connettivo e vengono disgregati i contatti tra le cellule. Il tratto di cordone è stato sottoposto a ripetuti lavaggi con PBS, contenente un 1% di una soluzione di *Penicillin Streptomycin*, internamente ed esternamente alla vena, per eliminare eventuali coaguli di sangue. Mediante incanulazione è stata inserita all'interno della vena una soluzione allo 0,1% di *collagenasi IV* in PBS. Il cordone è stato incubato con l'enzima per 15 minuti a 37° C in atmosfera umidificata. Al termine di questo periodo, le cellule sono state eluite dalla vena mediante lavaggio con 3-5 mL di terreno selettivo per le cellule endoteliali MV2 (terreno base) (*PromoCell*). Tale terreno è stato definito completo quando addizionato dei seguenti fattori:

<i>Fetal Calf Serum (FCS)</i>	5%
<i>human Epidermal Growth Factor</i>	5,0 ng/mL
Idrocortisone	0,2 µg/mL
<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>	0,5 ng/mL
<i>human basic Fibroblast Growth Factor</i>	10 ng/mL
<i>Insulin-like Growth Factor-1</i>	20 ng/mL
Acido Ascorbico	1 ng/mL
Antibiotico/antimicotico	1%

La sospensione cellulare così ottenuta è stata centrifugata per 5 minuti a 1500 giri/minuto, il pellet è stato risospeso in terreno MV2 completo e le cellule sono state seminate in piastra Petri (*Falcon*) precedentemente condizionata con una soluzione di fibronectina (*B&D Biosciences*) ($1\mu\text{g}/\text{cm}^2$) in acqua. Il condizionamento garantisce la riproduzione dell'effetto dell'ECM all'interno della coltura, migliorando i contatti cellula-substrato. Tutti i saggi sono stati eseguiti con colture cellulari al secondo o terzo passaggio di subcultura.

Tutte e 3 le linee cellulari sono state impiegate nei saggi per i derivati 4-aminochinazolinici, mentre per i composti a struttura fenil-pirrolochinolinonica sono state utilizzate solo le HUVEC.

3. Effetti sulla proliferazione cellulare

Il saggio di vitalità cellulare è stato condotto verificando l'attività metabolica delle cellule in coltura attraverso un saggio colorimetrico che utilizza il 3-[4,5-dimetiltiazolo-2-il]-2,5-difeniltetrazoliobromuro, noto come MTT. L'analisi sfrutta la riduzione del sale di tetrazolio giallo, MTT, a cristalli viola di formazano, trasformazione indotta dalle deidrogenasi presenti nelle cellule vitali.

I cristalli formati, insolubili in ambiente acquoso, sono stati estratti dalle cellule con un solvente organico, il propan-2-olo acido (0,04 M HCl in propan-2-olo). La determinazione quantitativa è stata effettuata tramite lettura spettrofotometrica a 570 nm (Denizot *et al.*, 1986; Wemme *et al.*, 1992).

Procedura

Le cellule sono state seminate, ad una densità di 5×10^3 cellule/pz per le A431 e le NIH3T3 o di $3,5 \times 10^3$ cellule/pz per le HUVEC, in piastre da 96 pz (*BD Falcon*) in presenza di terreno completo. Dopo 24 h d'incubazione a 37° C è stato effettuato un lavaggio con PBS, per eliminare eventuali cellule morte e residui di terreno, e sono stati aggiunti i composti da testare disciolti in terreno (volume finale 200 μ L).

I composti 4-aminochinazolinici e i rispettivi composti di riferimento, disciolti in terreno completo, sono stati testati alle concentrazioni di 10 μ M, 1 μ M, 0,1 μ M e 0,01 μ M. I derivati fenil-pirrolochinolinonici, invece, sono stati impiegati alle seguenti concentrazioni:

- 7P da 1×10^{-4} a 0,1 μ M;
- 7P-met, 7P-et, 2P da 1×10^{-6} a 0,1 μ M;
- 2P-nitro 1×10^{-5} a 1 μ M;
- 2P-ossimet, 2P-et, 2P-estere, 2P-cpmet, 2P-amino e 2P-met da 1×10^{-4} a 10 μ M.

Come composto di riferimento è stata utilizzata la vinblastina alle concentrazioni da 1×10^{-6} a 0,1 μ M. Tutti i composti sono stati disciolti in terreno base privo di siero per evitare possibili fenomeni di aggregazione con la componente proteica di quest'ultimo.

Il controllo era costituito da cellule in terreno completo non trattate. Trascorse 68 h di incubazione con le sostanze a 37° C, nei pozzetti è stato aggiunto il 10% di MTT (*Sigma*, 5 mg/mL in PBS) e si è atteso un periodo di altre 4 h affinché il composto venisse metabolizzato dalle cellule. I cristalli di formazano formati sono stati solubilizzati con 75 μ L di isopropanolo acido (*Carlo Erba*) e la piastra è stata posta sotto blanda agitazione meccanica per 20 minuti al riparo dalla luce. La lettura dei valori di assorbanza è stata eseguita con *Microplate autoreader EL 13* a 570 nm. I risultati, media di almeno 3 esperimenti, sono stati espressi come variazione percentuale rispetto alle colture non trattate. L'analisi statistica è stata effettuata con il t-test di Student. Dalle curve dose-risposta sono stati ottenuti i valori di IC₅₀, corrispondenti alle concentrazioni che inducono una diminuzione del 50% nella proliferazione cellulare rispetto alle colture di controllo non trattate.

Per valutare se l'inibizione della proliferazione cellulare indotta da alcuni dei composti 4-aminochinazolinici in analisi fosse reversibile, è stato effettuato il saggio di reversibilità dell'effetto citotossico che prevede il trattamento delle cellule con i composti in analisi seguito da un tempo di recupero con solo terreno di coltura proliferativo.

Le cellule sono state seminate in piastre da 96 pz, ad una densità di 5×10^3 cellule/pz per le A431 e 3×10^3 cellule/pz per le HUVEC, in presenza di terreno completo. Dopo 24 h di incubazione a 37° C è stato effettuato un lavaggio con PBS, per eliminare eventuali cellule morte e residui di terreno, e sono state aggiunte le sostanze da testare, alla concentrazione di 10 μ M, disciolte in terreno completo (volume finale 200 μ L).

Il controllo era costituito da cellule in terreno completo non trattate. Dopo 4 h di incubazione, i terreni sono stati rimossi, è stato effettuato un lavaggio con PBS ed è poi stato aggiunto solo terreno completo (200 μ L/pz).

Trascorse 64 h di incubazione a 37° C, nei pozzetti sono stati aggiunti 20 μ L di MTT (*Sigma*) (5 mg/mL in PBS) e si è atteso un periodo di altre 4 h affinché il composto venisse metabolizzato dalle cellule. Il saggio è poi proseguito come illustrato precedentemente. I risultati, media di almeno 3 esperimenti, sono stati espressi come variazione percentuale rispetto alle colture non trattate. L'analisi statistica è stata effettuata con il t-test di Student.

4. Valutazione del tasso di apoptosi

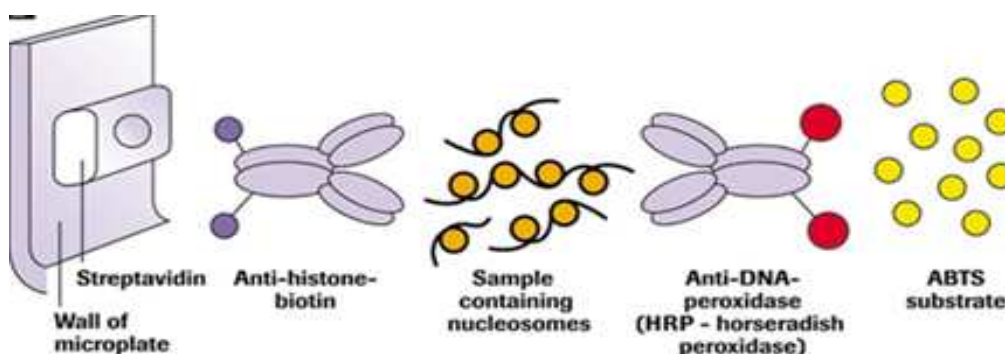
L'apoptosi rappresenta il meccanismo di morte cellulare programmata, attraverso il quale avviene il controllo omeostatico delle condizioni cellulari e del numero di cellule in un determinato tessuto, provvedendo all'eliminazione di cellule inutili o danneggiate. Tuttavia, in determinate circostanze può essere innescata da fattori patologici, quali ischemia, infarto, tumore, AIDS, malattie immunologiche, epatotossicità e malattie degenerative del sistema nervoso centrale. Questo suicidio fisiologico comporta una serie di caratteristiche alterazioni cellulari, quali la riduzione delle dimensioni della cellula, la scomparsa di strutture specializzate di superficie e delle giunzioni intercellulari, la disgregazione della membrana plasmatica in vescicole (*blebbing*) e la frammentazione della cromatina. In particolare, uno degli eventi caratteristici del processo apoptotico è rappresentato dalla frammentazione del DNA, come risultato dell'attivazione di un'endonucleasi endogena Ca^{2+} - Mg^{2+} -dipendente (Celotti, 2002).

4.1 Derivati 4-aminochinazolinici

Per valutare l'eventuale effetto pro-apoptotico indotto dai composti 4-aminochinazolinici, è stato utilizzato il kit *Cell Death Detection ELISA^{PLUS}* (Roche), che prevede la determinazione

quantitativa del tasso di apoptosi sul lisato cellulare attraverso l'utilizzo di un saggio immunoenzimatico di tipo *sandwich*.

I pozzetti di una piastra a 96 pz vengono condizionati con streptavidina che lega un anticorpo monoclonale biotinilato diretto contro la componente istonica del lisato cellulare. Un secondo anticorpo monoclonale riconosce invece i mono- e oligonucleosomi, provenienti dall'azione dell'endonucleasi endogena, presenti nel campione. Quest'ultimo anticorpo è legato alla perossidasi del rafano (HRP) e, in presenza di un substrato specifico (ABTS), si ha sviluppo di una colorazione.



Rappresentazione schematica del dosaggio immunoenzimatico.

Procedura

Le cellule sono state seminate in piastre da 96 pz in presenza di terreno completo ad una densità di $7,5 \times 10^3$ cellule/pz per le A431 e 6×10^3 cellule/pz per le HUVEC. Dopo 24 h di incubazione il terreno è stato rimosso ed è stato effettuato un lavaggio con PBS. Ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 200 μ L di terreno completo con i composti da testare alla concentrazione di 10 μ M. Nei controlli negativi è stato aggiunto solo terreno completo. Dopo 24 h di incubazione la piastra è stata centrifugata a 200 giri/min per 10 minuti. Il surnatante è stato quindi eliminato e il pellet è stato risospeso in 200 μ L di *Lysis Buffer*. La piastra è stata posta in incubazione a temperatura ambiente per 30 minuti. In seguito ad un'ulteriore centrifugazione a 200 giri/min per 10 minuti, da ogni pozzetto sono stati prelevati 20 μ L del lisato, che sono stati trasferiti nei pozzetti forniti dal *kit*. Ad un ulteriore pozzetto condizionato sono stati aggiunti 20 μ L di controllo positivo (*DNA-Histone-Complex*). Infine il *background control*, costituito solo da *Incubation Buffer*, è stato aggiunto in un pozzetto a parte.

A tutti i pozzetti sono stati quindi aggiunti 80 μ L di *immunoreagent* preparato immediatamente prima dell'utilizzo e composto come segue: 1/20 di anti-DNA-perossidasi + 1/20 di anti-istone-biotina + 18/20 di *Incubation Buffer*. La piastra è stata poi ricoperta da un foglio adesivo e

incubata per 2 h sotto agitazione (300 rpm) a temperatura ambiente. Al termine del periodo di incubazione, il surnatante è stato rimosso dai pozzetti che sono stati lavati delicatamente 3 volte con *Incubation Buffer*. È seguita l'aggiunta di 100 μ L di *ABTS Solution* e i pozzetti sono stati lasciati per 10-20 minuti in incubazione sotto agitazione a 250 rpm, al riparo dalla luce, fino allo sviluppo di una colorazione verde di intensità adatta alla lettura spettrofotometrica. Concluso il periodo di incubazione sono stati aggiunti 100 μ L di *ABTS Stop Solution*. E' stata quindi eseguita la lettura spettrofotometrica mediante *Microplate autoreader EL 13* a doppia lunghezza d'onda (405 e 490 nm), utilizzando come riferimento una soluzione costituita da *ABTS Solution* e *ABTS Stop Solution*. I risultati, media di almeno 3 esperimenti, sono stati espressi come variazione percentuale rispetto alle colture non trattate. L'analisi statistica è stata effettuata con il t-test di Student.

Al fine di confrontare la citotossicità dei composti con il tasso di apoptosi indotto, parallelamente è stato effettuato un saggio di determinazione della vitalità cellulare con MTT come descritto precedentemente al punto 3, utilizzando le stesse condizioni di trattamento sopra esposte.

4.2 Derivati fenil-pirrolochinolinonici

La caratteristica frammentazione del DNA conseguente all'evento apoptotico è stata determinata tramite un kit commerciale. *In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein* (TUNEL assay, *Roche Diagnostic*) prevede l'utilizzo dell'enzima deossinucleotidiltransferasi terminale (TdT) che, dopo fissaggio e permeabilizzazione delle cellule apoptotiche, catalizza l'aggiunta di nucleotidi marcati con fluoresceina (fluoreiscin-dUTP) alle estremità 3'-OH libere in modo templato-indipendente, evidenziabili mediante fluorescenza o citometria a flusso.

Procedura

Le HUVEC sono state seminate ad una densità di 2×10^4 cellule/pz in terreno MV2 completo, in *chamber-slide* da otto pozzetti (BD *Falcon*), precedentemente condizionati con una soluzione di fibronectina ($1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) e incubate per 24 h a 37°C . Dopo un lavaggio in PBS, le cellule sono state esposte ai derivati fenil-pirrolochinolinonici ed alla vinblastina (composto di riferimento) sciolti in MV2 base a concentrazioni pari alla loro IC_{50} .

Dopo un'incubazione di 24 h a 37°C le cellule sono state lavate con PBS, fissate con paraformaldeide (*Sigma*) al 4% in PBS per 30 minuti a temperatura ambiente, lavate nuovamente in PBS e permeabilizzate con una soluzione 0,1% Triton X-100 in 0,1% di sodio

citrato (250 μ L/pz) (*Sigma*) per 2 minuti in ghiaccio. Dopo alcuni lavaggi in PBS, le cellule sono state asciugate all'aria e poste a contatto con 70 μ L della miscela TUNEL (composta dall'enzima TdT e dalla *fluorescein-dUTP*) per 1 h al riparo dalla luce, a 37° C e in atmosfera umidificata. Per eliminare l'eccesso di nucleotide marcato che non aveva reagito con il DNA frammentato i pozzetti sono stati lavati tre volte con PBS. Sui vetrini è stato poi posto un montante acquoso con DAPI (*Vector*), sostanza che si intercala nel DNA ed è in grado di emettere fluorescenza nel blu. Per valutare la percentuale delle cellule TUNEL-positive, con un microscopio a fluorescenza sono stati osservati i nuclei apoptotici colorati di verde (Fluoresceina: λ_{ecc} =488 nm; λ_{em} =515-565 nm) e i nuclei di tutte le cellule colorati in blu (DAPI: λ_{ecc} =360 nm; λ_{em} =460 nm). Con un obiettivo 40x, sono stati fotografati dieci campi *random* e sono state contate le cellule positive per i fluorocromi. Infine, dal rapporto cellule TUNEL-positive e numero di cellule totali DAPI-positive, è stata determinata la percentuale di cellule apoptotiche. In ogni saggio è stato introdotto un controllo costituito da cellule non trattate in terreno MV2 base per quantificare la percentuale di apoptosi spontanea. L'analisi statistica dei dati, media di almeno 3 esperimenti, è stata effettuata con t-test di Student.

5. Effetti sulla proliferazione cellulare indotta da citochine esogene

5.1 Derivati 4-aminochinazolinici

5.1.1 Modulazione dell'effetto di EGF esogeno

Per verificare se i derivati fossero in grado di contrastare l'aumento della vitalità cellulare stimolata da EGF esogeno, l'attività metabolica delle cellule è stata valutata attraverso il saggio colorimetrico con MTT, come descritto al punto 3, seguendo due protocolli di trattamento.

a) Incubazione con i composti, rimozione e aggiunta di EGF esogeno.

Le cellule A431 sono state seminate ad una densità di 5×10^3 cellule/pz in piastre da 96 pz in presenza di terreno completo (200 μ L per pz). Dopo 24 h di incubazione a 37° C è stato effettuato un lavaggio con PBS e sono state aggiunte le sostanze da testare disciolte in terreno completo (volume finale 200 μ L). I derivati 4-aminochinazolinici sono stati testati alla concentrazione risultata meno citotossica nel saggio di determinazione della vitalità cellulare: i composti 6-CH₃, 6-Br, 7-CF₃, 6-F,Br, 6-Ph, 7-Ph, e PD153035 sono stati testati alla

concentrazione 0.01 μM , i composti 5-CH₃, 7-CH₃, 5-Br, 6-CF₃, 7-Cl,F, 5-Ph e Vandetanib alla concentrazione 0.1 μM e il composto 5-CF₃ alla concentrazione di 1 μM .

Trascorse 24 h di incubazione a 37° C, le sostanze sono state rimosse, è stato effettuato un lavaggio con PBS ed è stato aggiunto terreno base DMEM addizionato dello 0,5% di FBS, di una soluzione di *Penicillin Streptomycin* (concentrazione 1 mM), di L-glutamina (concentrazione 2 mM) e di EGF (*Sigma*) 5ng/mL, per un volume totale di 200 μL /pz. Il controllo era costituito da cellule non trattate coltivate nel terreno appena descritto. Trascorse 68 h di incubazione a 37° C, nei pozzetti sono stati aggiunti 20 μL di MTT e si è atteso un periodo di altre 4 h per permettere alle cellule di metabolizzare il composto. La rilevazione dei cristalli di formazano è stata effettuata come descritto nel punto 3. I risultati, media di almeno 3 esperimenti, sono stati espressi come variazione percentuale rispetto alle colture di controllo non trattate. L'analisi statistica è stata effettuata con il t-test di Student.

b) Incubazione contemporanea con i composti ed EGF esogeno.

Le cellule A431 sono state seminate ad una densità di 5×10^3 cellule/pz in piastre da 96 pz in presenza di terreno completo (200 μL per pz). Dopo 24 h di incubazione a 37° C è stato effettuato un lavaggio con PBS e sono state aggiunte le sostanze da testare, alle concentrazioni sopra elencate, disciolte in terreno base DMEM addizionato dello 0,5% di FBS, di una soluzione di *Penicillin Streptomycin* (concentrazione 1 mM), di L-glutamina (concentrazione 2 mM) e di EGF 5 ng/mL, per un volume totale di 200 μL /pz. Il controllo era costituito da cellule non trattate coltivate nel terreno appena descritto.

Trascorse 68 h di incubazione a 37° C, nei pozzetti sono stati aggiunti 20 μL di MTT e si è atteso un periodo di altre 4 h per permettere alle cellule di metabolizzare il composto, che è stato rilevato come nel punto 3. I risultati, media di almeno 3 esperimenti, sono stati espressi come variazione percentuale rispetto alle colture di controllo non trattate. L'analisi statistica è stata effettuata con il t-test di Student.

5.2 Derivati fenil-pirrolochinolinonici

5.2.1 Modulazione dell'effetto di FGF-2 esogeno

E' noto che nel microambiente tumorale sono presenti grandi quantità di fattori di crescita proangiogenici prodotti dalle stesse cellule tumorali. Viene attivato così un meccanismo autocrino-paracrino che permette di sostenere sia la proliferazione delle cellule cancerose sia la

formazione di una rete microvascolare necessaria per la loro sopravvivenza e successivamente per la loro migrazione. É quindi auspicabile che un agente antitumorale sia in grado di contrastare anche gli effetti di stimolazione indotti da queste citochine.

Per verificare se i derivati fossero in grado di contrastare l'aumento della vitalità cellulare stimolata dalla citochina proangiogenica FGF-2 esogena, l'attività metabolica delle cellule endoteliali è stata valutata attraverso il saggio colorimetrico con MTT, come descritto al punto 3, lasciando incubare le cellule per 72 h con i composti in analisi da soli o con 50 ng/mL di FGF-2. I derivati fenil-pirrolochinolinonici sono stati utilizzati a concentrazioni che non avevano modificato la vitalità cellulare nella precedente sperimentazione: 0,01 μM composti 2P-ossimet, 2P-et, 2P-estere, 2P-cpmet, 2P-amino e 2P-met; 1×10^{-3} μM il composto 2P-nitro; 1×10^{-4} μM i composti 2P e 7P; 1×10^{-5} μM i composti 7P-met, 7P-et e vinblastina.

6. Effetti sulla fosforilazione di EGFR

L'attivazione di EGFR, in quanto recettore tirosin chinasi, porta all'autofosforilazione dei propri residui tirosinici, e *Human Phospho-EGFR (Y1068) Immunoassay Cell-Based ELISA (R&D Systems)* permette la determinazione della fosforilazione del recettore di EGF *in vitro*. Il kit si basa su un doppio trattamento immunoenzimatico (*sandwich*) con due mix di anticorpi: due anticorpi primari, uno per EGFR fosforilato e uno per EGFR totale e due anticorpi secondari specifici, legati rispettivamente alla perossidasi (HRP) o alla fosfatasi alcalina (AP). Due substrati fluorogenici distinti per HRP o AP vengono usati per la determinazione quantitativa delle proteine fosforilate, che si ottiene mediante lettura di fluorescenza dei due diversi substrati, rispettivamente a 600 nm e a 450 nm.

Procedura

Le cellule sono state seminate ad una densità di $1,5 \times 10^4$ cellule/pz per le A431 e 1×10^4 cellule/pz per le HUVEC, in piastra da 96 pz nera con fondo trasparente. Dopo 24 h di incubazione a 37° C sono stati aggiunti i derivati 4-aminochinazolinici alla concentrazione di 1 μM , disciolti in terreno senza siero (DMEM o MV2 base), e lasciati a contatto a 37° C per 35 minuti oppure 30 minuti e ulteriori 5 minuti dopo l'aggiunta di 50 ng/mL EGF. Sono stati inseriti due tipi di controllo: cellule trattate con solo terreno senza siero per 35 minuti e cellule trattate con solo terreno per 30 minuti e ulteriori 5 minuti con aggiunta di 50 ng/mL EGF.

Le cellule sono state fissate con formaldeide al 4% in PBS (100 μ L/pz) e incubate per 20 minuti a TA. E' stato quindi effettuato un lavaggio con *Wash Buffer* per 3 volte. E' stato aggiunto alle colture il *Quenching Buffer* (100 μ L/pz) e lasciato in incubazione per 20 minuti a TA, seguito da un ulteriore lavaggio con *Wash Buffer*. Successivamente è stato aggiunto *Blocking Buffer* (100 μ L/pz) e lasciato ad incubare per 1 h a TA. Dopo un lavaggio con *Wash Buffer* sono stati aggiunti 100 μ L/pz del mix di anticorpi primari, la piastra è stata coperta con foglio adesivo e lasciata per 16 h a 4° C. In seguito sono stati aggiunti 100 μ L/pz del mix di anticorpi secondari con ulteriore incubazione per 2 h a TA coprendo nuovamente con foglio adesivo. In seguito alla rimozione della soluzione di anticorpi, le cellule sono state lavate 2 volte con *Wash Buffer* e 2 volte con PBS. E' stato quindi aggiunto il Substrato F1 e lasciato a contatto a TA per 40 minuti al riparo dalla luce. Infine è stato aggiunto il Substrato F2 e lasciato in incubazione per 40 minuti a TA al riparo dalla luce.

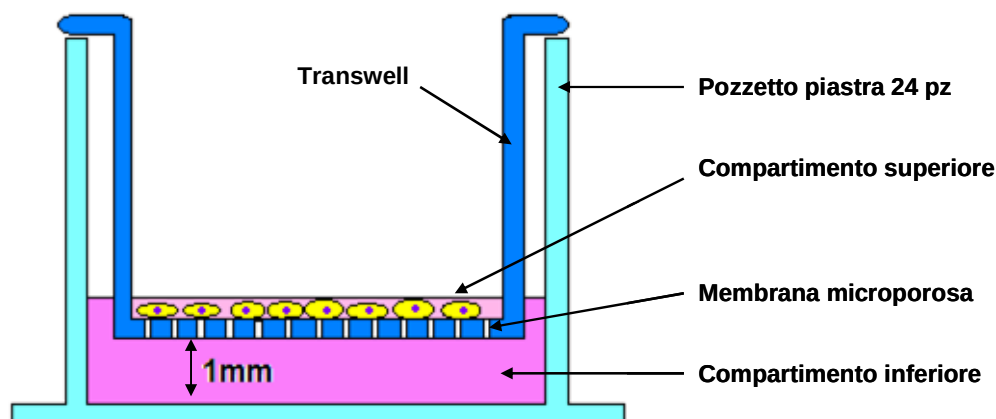
E' stata effettuata quindi una doppia lettura della fluorescenza con l'utilizzo del fluorimetro *Victor 1420 Multilabel Counter (PerkinElmer)*: una con eccitazione a 540 nm ed emissione a 600 nm per la determinazione quantitativa di EGFR fosforilato, e una con eccitazione a 360 nm ed emissione a 450 nm per EGFR totale.

I risultati, media di almeno 3 esperimenti, sono stati espressi come variazione percentuale di EGFR fosforilato rispetto all'EGFR totale. L'analisi statistica è stata effettuata con il t-test di Student.

7. Migrazione cellulare

La migrazione delle EC dal lume del vaso al tessuto da neovascolarizzare è una fase fondamentale del processo angiogenico. Per valutare l'eventuale inibizione della migrazione cellulare indotta dai composti oggetto di studio è stato eseguito un test in cui si determina se le EC, seminate su un filtro poroso inserito in un pozzetto e contenente i composti da testare in concentrazione non citotossica, tendano a migrare al di là della membrana microporosa. Sono stati utilizzati dei filtri *Transwell®* per piastre a 24 pozzetti costituiti da una membrana di policarbonato di diametro di 6,5 mm aventi pori di 5,0 μ m (*Corning*). Le cellule migrate sono state quindi identificate tramite un montante acquoso contenente DAPI (4',6-diamino-2-fenilindolo), che intercalandosi nel DNA fornisce una fluorescenza blu ai nuclei. Per ogni filtro sono stati fotografati cinque campi utilizzando un microscopio a fluorescenza e sono state

contate le cellule migrate. Il numero di cellule migrate è stato rapportato al controllo rappresentato da colture non trattate.



Procedura

Le HUVEC sono state seminate sulla membrana microporosa ad una densità di 5×10^4 cellule/filtro in terreno base contenente l'1% di FCS (*Fetal Calf Serum*, *Promocell*) e i derivati 4-aminochinazolinici, PD153035 e Vandetanib in concentrazione pari a $1 \mu\text{M}$, i derivati fenil-pirrolochinolinonici e vinblastina in concentrazione di $0,01 \mu\text{M}$. Ogni filtro è stato posizionato in un pozzetto di una piastra da 24 pozzetti, in cui erano stati precedentemente posti $400 \mu\text{L}$ di terreno di coltura completo. Dopo 4 h di incubazione a 37°C le cellule sono state fissate con una soluzione di formaldeide al 10% per 24 h. Il filtro è quindi stato sciacquato con PBS e le cellule che non erano migrate, rimaste quindi sul lato superiore della membrana, sono state rimosse con un bastoncino di cotone. Il filtro è stato nuovamente lavato con PBS e, una volta staccato dal supporto, è stato posizionato su un vetrino portaoggetti e trattato con un montante acquoso con DAPI (*Vector*). Utilizzando un microscopio a fluorescenza (*Leica*), sono stati fotografati cinque campi per ogni filtro (ingrandimento $\times 100$) seguendo uno schema a croce e sono state contate le cellule migrate che erano rimaste adese alla parte inferiore del filtro. La migrazione è stata espressa come variazione percentuale rispetto al controllo non trattato. L'analisi statistica dei dati, media di almeno 3 esperimenti, è stata effettuata con il t-test di Student.

Precedentemente era stato effettuato un saggio di determinazione della vitalità cellulare con MTT come descritto precedentemente al punto 3, lasciando però incubare le cellule per 4 h con i composti in analisi al fine di identificare la concentrazione non citotossica da utilizzare nel saggio sopra descritto.

8. Morfogenesi *in vitro*

Saggi *in vitro* hanno dimostrato che le EC sono in grado di aggregarsi per formare delle strutture simil-capillari, mimando il processo di formazione dei capillari che si verifica *in vivo* (Folkman *et al.*, 1980; Maciag *et al.*, 1982; Madri *et al.*, 1983).

In alcuni studi è stato dimostrato che le HUVEC possono essere indotte a differenziare e a formare strutture tubulari dopo un periodo di 4-6 settimane se seminate in assenza di mitogeni (Maciag *et al.*, 1982). Tuttavia, tale evento può essere accelerato seminando le cellule su superfici condizionate con componenti proteiche della matrice extracellulare. *In vivo* le EC poggiano sulla lamina basale costituita da collagene IV, proteoglicani ad eparan solfato (HSPG) e glicoproteine, come ad esempio la laminina. Quest'ultima, in particolare, oltre a promuovere l'adesione cellulare al pari del collagene, sembra stimolare anche la crescita, la differenziazione e la migrazione delle cellule (Grant *et al.*, 1985; Hay, 1981; Kleinman *et al.*, 1985). Sulla base di queste considerazioni è stato utilizzato, per il condizionamento delle piastre, il Matrigel, un estratto di lamina basale del sarcoma murino di Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), ricco in proteine della matrice extracellulare, quali laminina, collagene IV, entactina, HSGP. Il Matrigel, a temperatura ambiente, polimerizza producendo una matrice biologicamente attiva simile a quella presente nei tessuti di mammifero, mentre a 4° C è liquido. Si è dimostrato efficace nel promuovere i processi di adesione e differenziamento sia di cellule normali che trasformate, e fornisce un substrato ideale per studi di angiogenesi. In commercio sono disponibili due tipi di Matrigel: un primo tipo, chiamato Matrigel normale, contiene, oltre alle proteine della matrice extracellulare, anche fattori di crescita come TGF-2, FGF-2, IGF-1 e IGF-2. Un secondo tipo (chiamato *Growth Factor Reduced* - Matrigel Ridotto), invece, contiene le proteine della matrice extracellulare e una quantità ridotta di fattori di crescita.

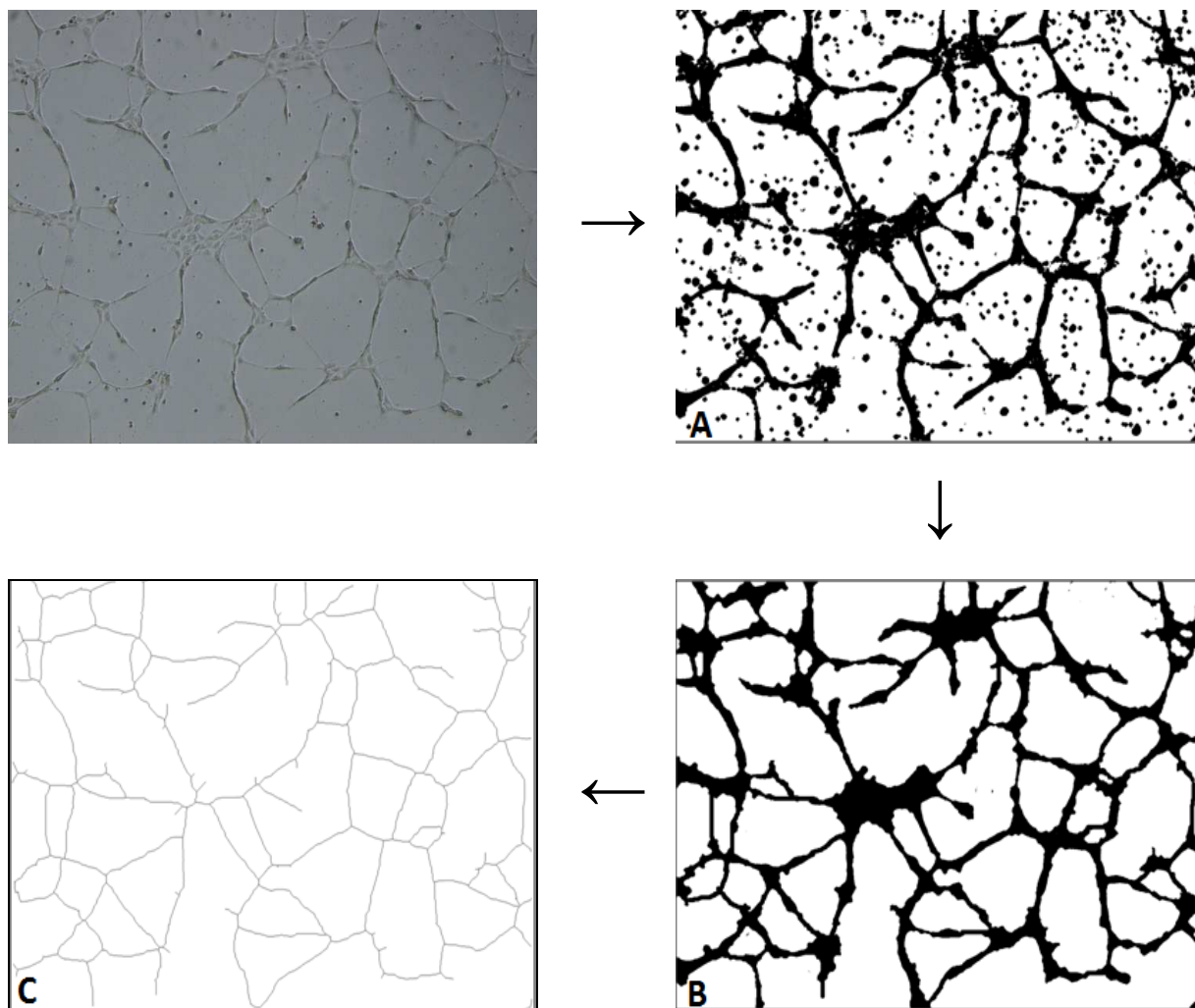
Fattori di crescita	Matrigel normale	Matrigel ridotto
FGF-2 (pg/mL)	0-0.1	0-0.1
EGF (ng/mL)	0.5-1.3	<0.5
IGF-1 (ng/mL)	15.6	5
PDGF (pg/mL)	12	<5
NGF (ng/mL)	<0.2	<0.2
TGF- β (ng/mL)	2.3	1.7

Concentrazione dei fattori di crescita nel Matrigel Normale e Ridotto

8.1 Effetti sulla morfogenesi *in vitro*.

Procedura

Ciascun pozzetto di una piastra da 24 pz (*Falcon*) è stato condizionato con uno strato di Matrigel Normale (50 μ L/pz) (*B&D Biosciences*), precedentemente scongelato *overnight* a 4° C in ghiaccio, con l'accortezza di utilizzare materiale (puntali, pipette, piastre) preraffreddato in *freezer* e che il supporto di plastica per la coltura cellulare rimanesse in ghiaccio durante tutta la procedura di condizionamento. La piastra è poi stata incubata a 37° C per almeno 1 h per indurre la gelificazione della matrice glicoproteica. In ciascun pozzetto condizionato sono state seminate $7,5 \times 10^4$ cellule sospese in 1 mL di terreno MV2 base contenente l'1% di FCS (*Promocell*) e i composti in esame a concentrazione non citotossica come risultato da saggi di vitalità cellulare condotti nelle medesime condizioni: 0,1 μ M per i derivati 4-aminochinazolinici, PD153035 e Vandetanib. Le concentrazioni non citotossiche per i derivati fenil-pirrolochinolinonici impiegate nel saggio sono state invece: 0,01 μ M derivati 2P-ossimet, 2P-et, 2P-estere, 2P-cpmet, 2P-amino e 2P-met; 1×10^{-3} μ M il derivato 2P-nitro; 1×10^{-4} μ M i derivati 2P e 7P; 1×10^{-5} μ M i derivati 7P-met, 7P-et e vinblastina. Dopo 18 h di incubazione a 37°C e un lavaggio in PBS, le cellule sono state fissate con una soluzione al 2% di glutaraldeide (*Merck*) in tampone sodio cacodilato 0,1 M (*Sigma*) (*Albini et al.*, 2004). Per ogni pozzetto sono poi stati fotografati 5 campi (ingrandimento 50x), seguendo uno schema a croce. Le immagini così ottenute sono state analizzate grazie all'impiego del *Software ImageJ-Matrigel Assay*, valutando sia parametri dimensionali, come la percentuale dell'area coperta dalle cellule, la lunghezza totale della rete formata dalle HUVEC per ogni campo e l'area percentuale racchiusa all'interno delle maglie, sia parametri topologici, quali il numero di maglie chiuse e di punti di ramificazione per campo.



Analisi delle immagini ottenute con il software “*IMAGEJ ANGIOJ- MATRIGEL ASSAY*”. Partendo dall’immagine catturata al microscopio, grazie al software, si ottiene dapprima l’immagine di contrasto in bianco e nero (A), quindi l’immagine viene corretta manualmente (B) ed infine si ottiene lo scheletro della rete di maglie (C).

I risultati, media di almeno 3 esperimenti, sono stati espressi come variazioni percentuali rispetto al campione non trattato. L’analisi statistica è stata effettuata con il t-test di Student.

8.2 Effetti sulla morfogenesi *in vitro* indotta da citochine esogene.

Il saggio è stato ripetuto utilizzando Matrigel ridotto di fattori di crescita seminando le cellule in 1 mL di terreno base contenente l’1% di FCS, 50 ng/mL FGF-2 o 20 ng/mL VEGF da soli o con i composti 4-aminochinazolinici o fenil-pirrolochinolinonici alle stesse concentrazioni non citotossiche elencate nel protocollo precedente. I risultati, media di almeno 3 esperimenti, sono

stati espressi come variazioni percentuali rispetto alle colture di controllo trattate solo con FGF-2 o VEGF. L'analisi statistica è stata effettuata con il t-test di Student.

Precedentemente erano stati effettuati saggi di determinazione della vitalità cellulare con MTT come descritto precedentemente al punto 3, lasciando però incubare le cellule per 18 h con i composti in analisi da soli o con 50 ng/mL di FGF-2 o 20 ng/mL di VEGF, al fine di identificare la concentrazione non citotossica da utilizzare nei saggi sopra descritti.

9. Determinazione del rilascio di VEGF nel terreno di coltura

Per valutare l'eventuale inibizione che i composti 4-aminochinazolinici esercitano sul rilascio di VEGF da parte sia delle A431 che delle HUVEC, è stato utilizzato il *kit Human VEGF Immunoassay (Quantikine)* che permette di misurare la concentrazione di VEGF rilasciato dalle cellule nel terreno di coltura attraverso l'utilizzo di un saggio immunoenzimatico di tipo *sandwich*. Un anticorpo monoclonale, immobilizzato sul fondo dei pozzetti presenti dal *kit*, riconosce e lega VEGF presente all'interno del terreno di coltura. Un secondo anticorpo policlonale diretto contro VEGF e legato ad una perossidasi viene aggiunto al campione ed interagisce con il fattore di crescita ancorato sul fondo del pozzetto. In presenza del substrato per l'enzima si sviluppa una colorazione di intensità proporzionale alla concentrazione di VEGF presente nel campione.

Procedura

Le cellule sono state seminate ad una densità di 1×10^4 cellule/pz per le A431, e 1×10^5 cellule/pz per le HUVEC in piastre da 24 pz in presenza di terreno completo. Dopo 24 h di incubazione il terreno è stato rimosso ed è stato effettuato un lavaggio con PBS. Ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 350 μ L di terreno completo (A431) o MV2 base contenente il 10% di FCS (HUVEC) con i composti da testare alla concentrazione non citotossica di 0,1 μ M. I controlli erano rappresentati da solo terreno completo o MV2 base arricchito con il siero. Dopo 72 h di incubazione è stato prelevato il terreno di coltura e centrifugato a 1500 giri/minuto per cinque minuti. Ad ogni pozzetto del *kit* sono stati aggiunti 50 μ L di *Assay Diluent RD1W* e 200 μ L di terreno di coltura. La piastra è stata poi ricoperta da un foglio adesivo e incubata per 2 h a TA. Al termine del periodo di incubazione, il surnatante è stato rimosso dai pozzetti che sono stati lavati delicatamente con *Wash Buffer*. Ad ogni pozzetto sono quindi stati aggiunti 200 μ L di

VEGF conjugate contenente l'anticorpo policlonale diretto contro VEGF coniugato alla perossidasi. La piastra è stata nuovamente ricoperta con un foglio adesivo e incubata per 2 h a TA. Al termine del periodo di incubazione il surnatante è stato rimosso dai pozzetti e, dopo diversi lavaggi con *Wash Buffer*, sono stati aggiunti 200 μ L di *Substrate Solution*, una soluzione contenente il substrato cromogenico della perossidasi. I pozzetti sono stati lasciati per 20 minuti in incubazione a temperatura ambiente al riparo dalla luce fino allo sviluppo di una colorazione azzurra. Concluso il periodo di incubazione sono stati aggiunti 50 μ L di *Stop Solution*. La lettura spettrofotometrica è stata eseguita con *Microplate autoreader EL 13* a 450 nm con correzione a 540 nm.

In precedenza era stata costruita una retta di taratura attraverso una serie di standard compresi nel kit. Questa è stata ottenuta mediante l'utilizzo di una soluzione madre standard di VEGF in concentrazione 2000 pg/mL e con la quale sono stati preparati sette standard diluiti con *Calibrator Diluent RD5K* in un intervallo compreso tra 1000 pg/mL e 15,6 pg/mL (diluizioni seriali 1:2). Gli standard sono stati trattati con lo stesso protocollo precedentemente descritto ed è stata quindi calcolata la retta con i valori di assorbanza contro la concentrazione di VEGF in pg/mL. Mediante questa curva di calibrazione sono state calcolate le concentrazioni del fattore di crescita nei campioni dopo la lettura spettrofotometrica a 450 nm.

I risultati, media di almeno 3 esperimenti, sono stati espressi come pg/mL di VEGF. L'analisi statistica è stata effettuata con il t-test di Student.

10. Determinazione del rilascio di FGF-2 nel terreno di coltura

E' stato dimostrato che FGF-2 viene rilasciato, oltre che dalle cellule periendoeliali, anche dalle EC stesse, le quali vengono stimulate dal fattore di crescita attraverso un meccanismo autocrino (Presta *et al.*, 2005).

Per valutare l'eventuale inibizione che i composti 4-aminochinazolinici esercitano sul rilascio di FGF-2 da parte delle EC è stato utilizzato il kit *Human FGF basic Immunoassay (Quantikine)* che permette di misurare la concentrazione di FGF-2 rilasciato dalle HUVEC nel terreno di coltura attraverso l'utilizzo di un saggio immunoenzimatico di tipo *sandwich* analogo a quello utilizzato per la determinazione del rilascio di VEGF.

Procedura

Le HUVEC sono state seminate ad una densità di 1×10^5 cellule/pz in piastre da 24 pz in presenza di terreno completo. Dopo 24 h di incubazione il terreno è stato rimosso ed è stato effettuato un lavaggio con PBS. Ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 350 μ L di terreno base contenente il 10% di FCS con i composti da testare alla concentrazione non citotossica di 0,1 μ M. Nei controlli è stato aggiunto solo terreno base arricchito con il siero. Dopo 72 h di incubazione è stato prelevato il terreno di coltura e centrifugato a 1500 giri/minuto per cinque minuti. Ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 100 μ L di *Assay Diluent RD1-43* e 100 μ L di terreno di coltura. La piastra è stata poi ricoperta da un foglio adesivo e incubata per 2 h a TA. Al termine del periodo di incubazione, il surnatante è stato rimosso dai pozzetti che sono stati lavati delicatamente con *Wash Buffer*. Ad ogni pozzetto sono quindi stati aggiunti 200 μ L di soluzione contenente l'anticorpo monoclonale diretto contro FGF-2 e legato alla perossidasi. La piastra è stata nuovamente ricoperta con un foglio adesivo e incubata per 2 h a TA. Al termine del periodo di incubazione il surnatante è stato rimosso dai pozzetti e, dopo diversi lavaggi con *Wash Buffer*, sono stati aggiunti 200 μ L di *Substrate Solution*, una soluzione contenente il substrato cromogenico della perossidasi. I pozzetti sono stati lasciati per 30 minuti in incubazione a temperatura ambiente al riparo dalla luce fino allo sviluppo di una colorazione verde. Concluso il periodo di incubazione sono stati aggiunti 50 μ L di *Stop Solution*. La lettura spettrofotometrica è stata eseguita con *Microplate autoreader* EL 13 a 450 nm con correzione a 540 nm.

In precedenza era stata costruita una retta di taratura attraverso una serie di standard compresi nel kit. Questa è stata ottenuta mediante l'utilizzo di una soluzione madre standard di FGF-2 in concentrazione 640 pg/mL e con la quale sono stati preparati sette standard diluiti con *Calibrator Diluent RD5-14* in un intervallo compreso tra 640 pg/mL e 10 pg/mL (diluizioni seriali 1:2). Gli standard sono stati trattati con lo stesso protocollo precedentemente descritto ed è stata quindi calcolata la retta con i valori di assorbanza contro la concentrazione di FGF-2 in pg/mL. Mediante questa curva di calibrazione sono state calcolate le concentrazioni del fattore di crescita nei campioni dopo la lettura spettrofotometrica a 450 nm.

I risultati, media di almeno 3 esperimenti, sono stati espressi come pg/mL di FGF-2. L'analisi statistica è stata effettuata con il t-test di Student.

11. Saggio *in vivo* con *plug* di Matrigel

I modelli *in vitro* per lo studio dell'angiogenesi permettono di valutarne singolarmente le diverse fasi e offrono il vantaggio di ottenere un controllo sulle molteplici variabili che accompagnano l'esecuzione dei saggi (quali le concentrazioni dei fattori angiogenici o il numero di cellule impiegate per il test), oltre alla possibilità di ridurre i costi e le difficoltà rispetto agli esperimenti *in vivo*. Tuttavia, i saggi *in vitro* sono caratterizzati anche da diverse limitazioni, prima fra tutte la natura stessa delle EC, le quali mostrano differenze fenotipiche legate all'origine micro e macrovascolare e all'organo d'origine. Inoltre all'interno della parete del vaso sanguigno le EC si trovano in una fase di quiescenza, da cui escono quando poste in coltura, riacquistando così la capacità di dividersi. Le cellule proliferanti, però, possono subire variazioni del loro stato di attivazione, del cariotipo, dell'espressione di antigeni superficiali e delle proprietà legate alla crescita in funzione del tessuto di provenienza (Liekens *et al.*, 2001). Le EC, inoltre, non sono i soli tipi cellulari coinvolti nell'angiogenesi. All'interno delle varie fasi del processo, infatti, intervengono cellule di supporto (periciti, fibroblasti, cellule muscolari lisce), cellule mesenchimali e cellule circolanti del sangue, oltre a una vasta gamma di fattori pro e antiangiogenici prodotti e liberati dai diversi tipi cellulari. L'influenza di questo insieme di cellule e fattori sull'endotelio durante la creazione di nuovi vasi è difficile da valutare appieno *in vitro*. Inoltre, sono presenti diversi studi in letteratura in cui composti in grado di interferire con una o più fasi del processo angiogenico non hanno dimostrato la stessa attività anche *in vivo*, rendendo quindi indispensabile affiancare i risultati ottenuti dai modelli *in vitro* a quelli derivanti da saggi *in vivo*. I modelli *in vivo* utilizzati per lo studio dell'angiogenesi comprendono test su membrana corioallantoidea di pollo (CAM test), saggio su mesentero di ratto, saggi con impianto di *plug* di Matrigel e modelli di angiogenesi tumorale (Norrby, 2006). L'impianto di una matrice polimerica (*plug* di Matrigel) nella zona sottocutanea di topi C57 Black rappresenta un saggio largamente utilizzato *in vivo* per verificare la formazione di nuovi vasi sanguigni all'interno del gel inoculato, grazie alla possibilità di sospendere cellule e/o fattori pro o antiangiogenici all'interno del Matrigel (Plunkett *et al.*, 1990; Dellian *et al.*, 1996). Il Matrigel, mantenuto alla temperatura di 4° C, viene aggiunto di eparina, FGF-2 ed eventuali sostanze da testare per valutare la capacità di quest'ultime di contrastare l'effetto stimolatorio sul processo angiogenico esercitato dalla citochina. Il gel viene quindi inoculato sottocute e, solidificando alla temperatura corporea, forma un *plug* gelatinoso e compatto. Dopo un certo periodo, la risposta angiogenica può essere quantificata attraverso una misurazione del

contenuto di emoglobina, indicatore della presenza di nuovi vasi sanguigni, mediante immunoistochimica per verificare la presenza di *marker* specifici delle EC su microsezioni di matrice polimerica, o ancora mediante fluorescenza (Akthar *et al.*, 2002). Il dosaggio dell'emoglobina viene effettuato attraverso l'impiego del *kit Drabkin's Reagent (Sigma)*, normalmente utilizzato per la determinazione quantitativa di tipo colorimetrico dell'emoglobina nel sangue intero a scopo diagnostico. La reazione specifica è l'ossidazione dell'emoglobina e dei suoi derivati a metaemoglobina, in presenza di un composto alcalino quale il ferricianuro di potassio. La metaemoglobina reagisce col cianuro di potassio per formare cianometamoglobina, che presenta un massimo di assorbimento a 540 nm. L'assorbanza misurata a questa lunghezza d'onda è proporzionale alla concentrazione di emoglobina. Questa metodica offre un'esecuzione relativamente rapida e semplice, se paragonata ad altri modelli di studio *in vivo*.

11.1 Impianto dei *plug* di Matrigel

Per ogni animale (topi C57 Black), sono stati usati 500 μ L di Matrigel (*B&D Biosciences*), precedentemente scongelato a 4° C *overnight*. Il materiale da utilizzare per la procedura (puntali, eppendorf) è stato preraffreddato in *freezer*. Sono stati quindi miscelati con il Matrigel 200 ng/mL di FGF-2 (*Sigma*) e 12 U.I./*plug* di eparina (*Vister*); successivamente sono stati aggiunti i composti oggetto di studio in concentrazione non citotossica: 0,01 μ M per i derivati 4-aminochinazolinici, PD153035 e Vandetanib; 0,01 μ M per i derivati fenil-pirrolochinolinonici e la vinblastina. I topi sono stati anestetizzati con anestesia gassosa e al momento dell'iniezione sottocutanea sono stati utilizzati aghi e siringhe preventivamente raffreddati in *freezer*. I topi trattati con Matrigel contenente solo eparina rappresentavano i controlli negativi, mentre quelli con Matrigel contenente eparina ed FGF-2 i controlli positivi.

11.2 Determinazione del contenuto di emoglobina

Dopo sette giorni dall'iniezione gli animali sono stati sacrificati tramite inalazione di anidride carbonica. I *plug* sono stati rimossi, immersi in un *buffer* costituito da 300 μ L di *Brij-35* 0.1% in PBS per *plug*, e posti a 4° C *overnight*. Successivamente sono stati centrifugati per 5 minuti a 13500 g/min e nel surnatante è stato determinato il contenuto di emoglobina, usando il *Drabkin's Reagent*, contenente sodio bicarbonato, ferricianuro di potassio, e cianuro di potassio.

È stata costruita una retta di taratura per calcolare la concentrazione di emoglobina estratta dal *plug*, dopo lettura dell'assorbanza. Questa è stata ottenuta mediante la preparazione di una soluzione standard di emoglobina con concentrazione pari a 10 mg/mL in *Drabkin's Solution* (1 vial di *Drabkin's Reagent* in 1 L di acqua distillata addizionato di 0.5 mL di *Brij-35 Solution* 30%). Con questa soluzione madre sono stati preparati sette standard di cianometemoglobina diluiti con *Drabkin's Solution* a concentrazione nota in un intervallo compreso tra 0 e 10 mg/mL (0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 10 mg/mL). L'assorbanza degli standard è stata letta a 540 nm ed è stata ricavata una retta con i valori di assorbanza contro la concentrazione di cianometemoglobina (mg/mL). Da questa sono state calcolate le concentrazioni a partire dai valori di assorbanza dei campioni letti a 540 nm. I risultati, media di almeno 3 animali, sono stati espressi come mg/mL di emoglobina. L'analisi statistica è stata effettuata con il t-test di Student.

11.3 Analisi istologica

11.3.1 Inclusione in paraffina

Alcuni *plug* sono stati fissati per 24 h in PBS contenente formalina al 4% (*Sigma*) e successivamente sono stati disidratati mediante la scala ascendente degli alcoli nel seguente modo: 2 h in alcool 70%, 2 ore in alcool 80%, 2 ore in alcool 90%, *overnight* in alcool 95%, 2 ore in alcool 100%, 2 ore in xilolo/alcool 100% (1:1, v/v) e quindi in xilolo per altre 2 ore. E' seguito quindi un passaggio in paraffina a 60° C per 2 h per l'impregnazione e quindi l'inclusione in vaschette metalliche. Al microtomo (*Histoslide 2000, Reichert-Jung*), sono state ottenute sezioni dello spessore di 5 µm, che sono state fatte aderire su vetrini portaoggetti *SuperFrost Plus (Menzel-Glaser)*.

11.3.2 Colorazione

La colorazione delle sezioni ottenute al microtomo è stata eseguita con ematossilina-eosina (*Merck*). Le sezioni sono state preventivamente sparaffinate tramite due passaggi in *Histochoice Clearing Agent 1X*, ciascuno di 5 minuti, e idratate tramite passaggi di 5 minuti ciascuno in una scala discendente di alcool: alcool 100%, alcool 95%, alcool 80%, alcool 70%, alcool 50%, alcool 30%, alcool 10%, per finire con un passaggio di 5 minuti in acqua distillata. In seguito ciascuna sezione è stata trattata con ematossilina per 2,5 minuti, lavata 2 volte velocemente in acqua distillata e differenziata per 2 minuti in acqua di fonte. E' stata quindi trattata con eosina

per 10 secondi e lavata ancora velocemente in acqua distillata. Dopo la colorazione, i preparati sono stati disidratati tramite passaggi veloci in alcool 95% e alcool assoluto, trattati con *Histochoice Clearing Agent 1X* e montati con *Histochoice Mounting Media*.

Le osservazioni sono state effettuate con microscopio ottico DM2000 (*Leica*).

RISULTATI

1. DERIVATI 4-AMINOCHINAZOLINICI

a) Valutazione *in vitro* dell'attività citotossica

Effetti sulla proliferazione cellulare

Per la valutazione dell'effetto anti-proliferativo dei derivati 4-amino-chinazolinici è stata utilizzata la linea cellulare umana A431, derivata da un carcinoma vulvare squamoso, e caratterizzata da una sovra-espressione di EGFR. Dopo trattamento per 72 ore con i composti oggetto di studio a concentrazioni comprese tra 0.01 e 10 μ M, la proliferazione cellulare è stata determinata con il saggio dell'MTT. In Figura 1 sono riportati i risultati ottenuti, dai quali sono state calcolate le IC_{50} relative a ciascun composto (Tabella 1). Per tutti i composti è stato evidenziato un andamento dose-risposta.

Confrontando i valori di IC_{50} dei derivati 4-aminochinazolinici, con quelli relativi a PD153035 e Vandetanib, utilizzati come composti di riferimento, si evidenzia quanto segue:

- rispetto a PD153035, una diminuzione di circa 6-50 volte nel valore di IC_{50} si è osservata con i composti caratterizzati dalla presenza di un anello a 6 atomi, eccezion fatta per i derivati con 2 alogeni all'anilina;
- i derivati propilen e metilendiossi, fuorché i composti bialogenati, presentavano valori di IC_{50} paragonabili a quello calcolato per PD153035;
- rispetto a PD153035, una diminuzione di circa 5-50 volte nel valore di IC_{50} si è osservata con i derivati caratterizzati dalla presenza di un fenile in 3'. In particolare, il derivato etilendiossi si è rivelato il composto più attivo;
- il derivato etilendiossi con F e Br all'anilina presentava un valore di IC_{50} paragonabile a quello calcolato per Vandetanib; al contrario, i corrispondenti composti con ciclo a 5 o 7 atomi erano molto meno attivi.

Sulla base dei risultati ottenuti, la sperimentazione successiva è stata limitata ai derivati dotati di maggiore attività antiproliferativa, per i quali era stato possibile calcolare la IC_{50} .

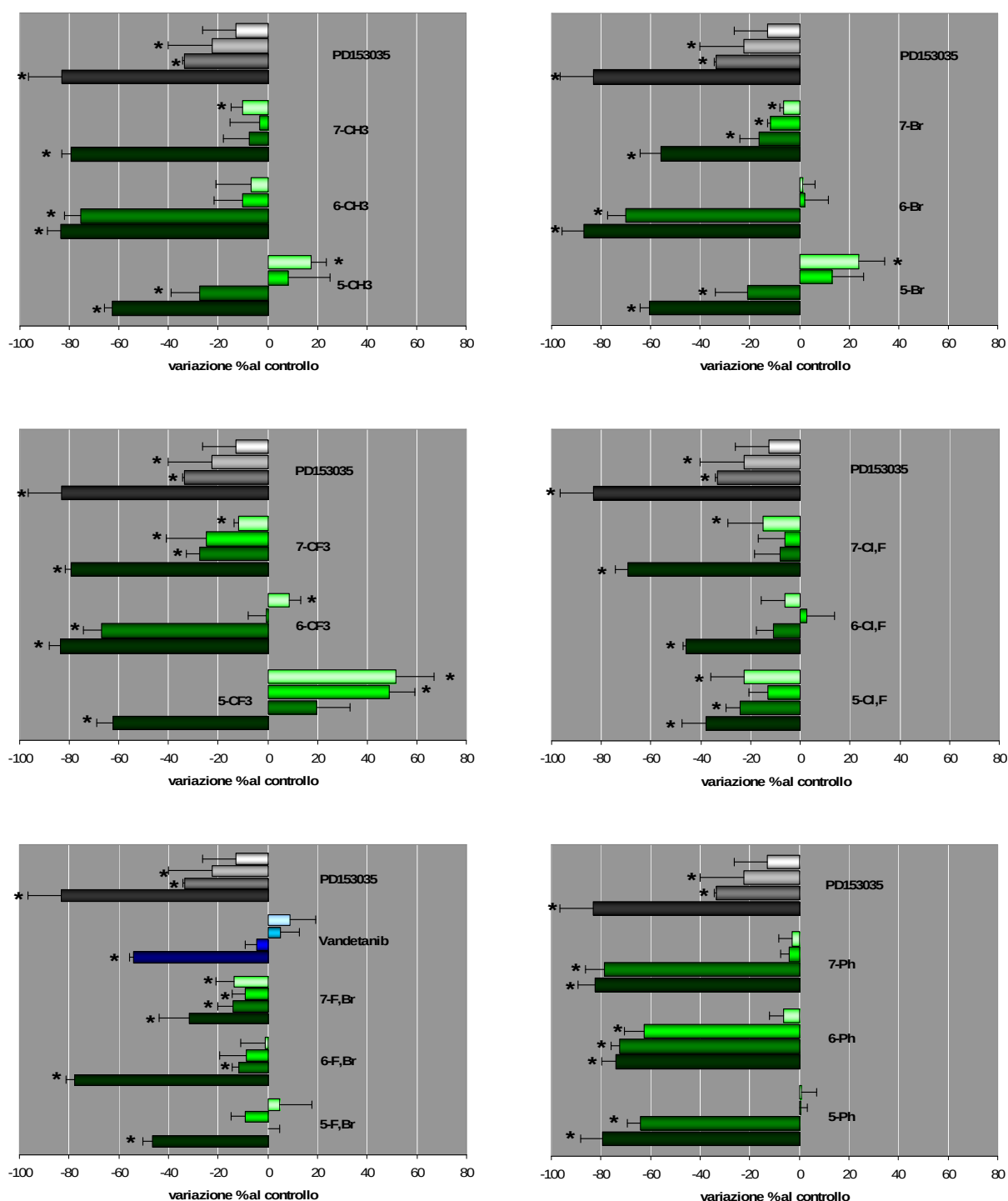


Figura 1. Effetti dei derivati 4-aminochinazolinici sulla proliferazione di cellule A431. La proliferazione cellulare è stata determinata con MTT dopo 72 ore di incubazione con i composti in esame:

□ □ □ = 0.01 μM
 ■ ■ ■ = 0.1 μM
 ■ ■ ■ = 1 μM
 ■ ■ ■ = 10 μM.

I risultati, media di 3 esperimenti ed espressi come variazione percentuale dalle colture di controllo non trattate (considerate come 0), sono riportati come media ± deviazione standard. * = $p < 0.05$ vs controllo (colture non trattate), t test di Student.

Composti	IC ₅₀ (μM) A431
PD153035	4.40 ± 1.30
Vandetanib	9.22 ± 0.33
5-CH ₃	6.69 ± 0.92
6-CH ₃	0.67 ± 0.11
7-CH ₃	6.29 ± 0.62
5-Br	7.16 ± 1.11
6-Br	0.75 ± 0.09
7-Br	8.17 ± 0.76
5-CF ₃	8.46 ± 0.87
6-CF ₃	0.77 ± 0.09
7-CF ₃	4.73 ± 0.56
5-Cl,F	> 10
6-Cl,F	> 10
7-Cl,F	7.13 ± 0.63
5-F,Br	> 10
6-F,Br	6.28 ± 0.46
7-F,Br	> 10
5-Ph	0.81 ± 0.06
6-Ph	8.06x10 ⁻² ± 1.04x10 ⁻²
7-Ph	0.66 ± 0.08

Tabella 1. Valori di IC₅₀ determinati in seguito a trattamento per 72 h delle cellule A431 con i derivati 4-aminochinazolinici.

Per verificare se l'effetto antiproliferativo fosse legato ad un'azione proapoptotica, le cellule A431 sono state trattate per 24 ore con i composti in esame utilizzati ad una concentrazione pari a 10 μM. Successivamente le cellule sono state lisate e sul lisato cellulare è stata determinata la presenza di mono- e oligo-nucleosomi, che si formano durante il processo di frammentazione del DNA, caratteristico dell'apoptosi. I risultati relativi sono riportati in Figura 2. Rispetto alle colture di controllo non trattate, tutti i derivati 4-aminochinazolinici aumentavano in modo significativo il tasso di apoptosi, analogamente a quanto osservato con i composti di riferimento. In particolare, i derivati con ciclo a 6 atomi inducevano la formazione di mono e oligo-nucleosomi in modo paragonale o superiore a PD153035 e Vandetanib. Parallelamente e nelle stesse condizioni sopra riportate, è stata anche determinata la proliferazione cellulare.

Analogamente ai composti di riferimento, tutti i derivati esercitavano un forte effetto antiproliferativo (dati non mostrati).

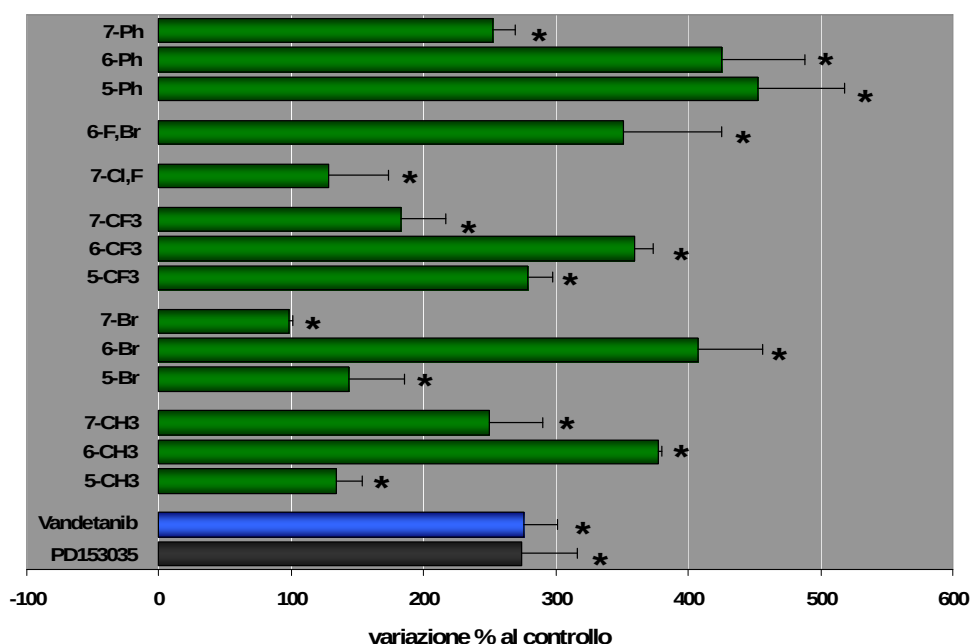
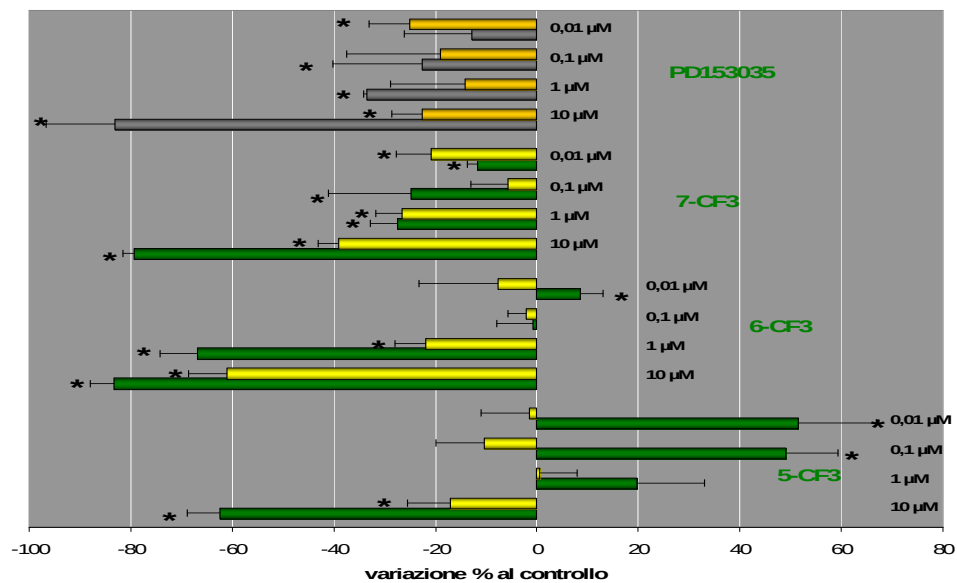
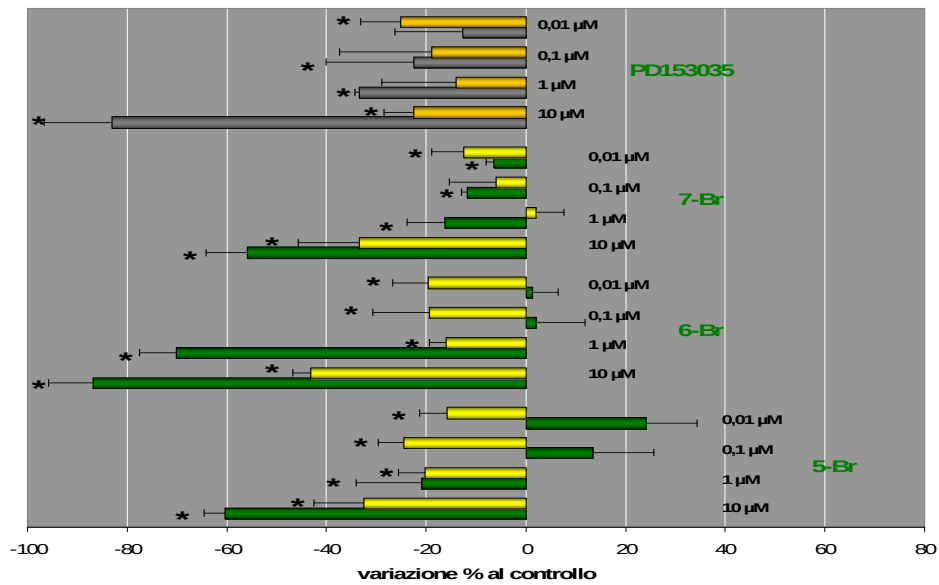
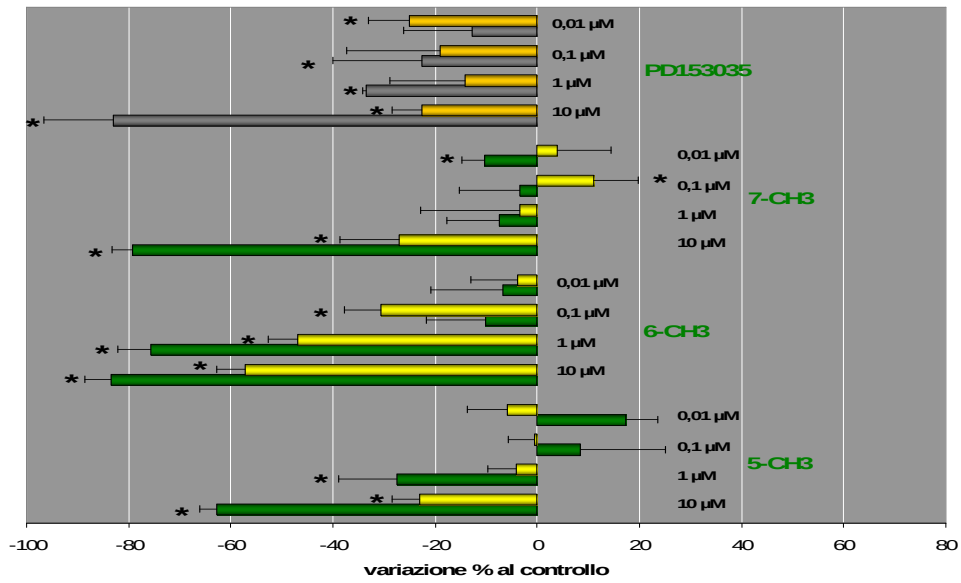


Figura 2. Effetti pro-apoptotici dei derivati 4-aminochinazolinici su cellule A431. Dopo 24 h di trattamento con i composti (10 μ M), le cellule A431 sono state lisate e la quantità di oligo- e mono-nucleosomi è stata determinata utilizzando un saggio immunoenzimatico. I risultati, media di 3 esperimenti ed espressi come variazione percentuale dalle colture di controllo non trattate (considerate come 0), sono riportati come media $\pm$ deviazione standard.

* = $p < 0.05$ vs controllo (colture non trattate), t test di Student.

Per verificare se l'attività antiproliferativa fosse dovuta esclusivamente all'inibizione di EGFR, è stata determinata la proliferazione cellulare utilizzando la linea cellulare NIH3T3, fibroblasti murini di origine embrionale non esprimenti EGFR.

In Figura 3 sono riportati i risultati dei saggi di vitalità cellulare effettuati utilizzando i composti chimici in esame a concentrazioni variabili tra 0.01 e 10 μ M. Da questi esperimenti sono stati ricavati i valori di IC_{50} , elencati in Tabella 2. Analogamente a PD153035, l'attività antiproliferativa di tutti i composti era inferiore a quella evidenziata nelle cellule A431, eccezion fatta per i composti 6-F,Br, 5-Ph e 7-Ph che presentavano valori di IC_{50} paragonabili a quelli evidenziati nelle cellule sovraesprimenti EGFR.



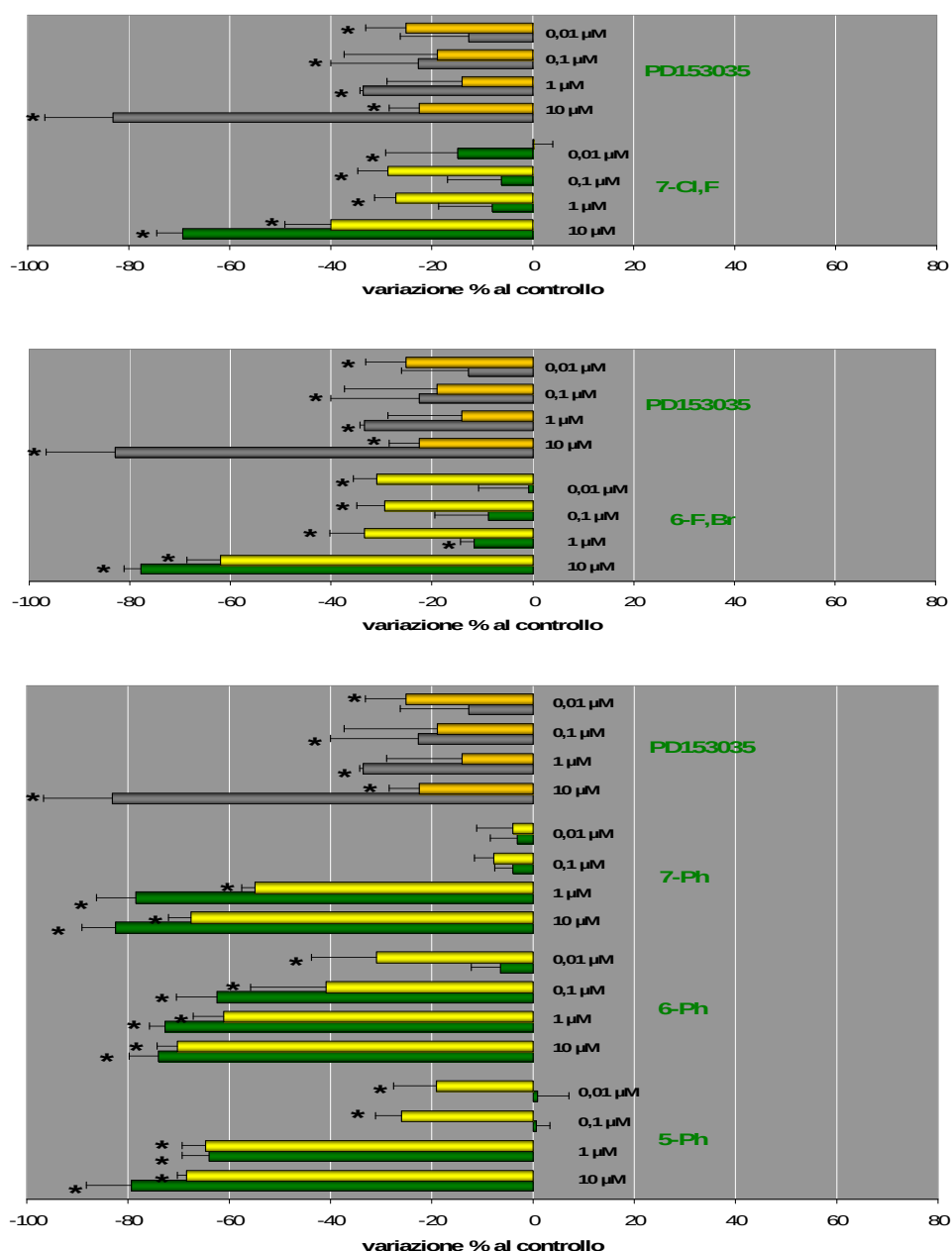


Figura 3. Effetti dei derivati 4-aminochinazolinici sulla proliferazione di cellule A431 (barre grigie o verdi) e NIH3T3 (barre gialle). La proliferazione cellulare è stata determinata con MTT dopo 72 ore di incubazione con i composti in esame (0.01-10 μM). I risultati, media di 3 esperimenti ed espressi come variazione percentuale dalle culture di controllo non trattate (considerate come 0), sono riportati come media ± deviazione standard.

* = p<0.05 vs controllo (culture non trattate), t test di Student.

Composti	IC ₅₀ (μM) A431	IC ₅₀ (μM) NIH3T3
PD153035	4.40 ± 1.30	> 10
Vandetanib	9.22 ± 0.33	n.d.
5-CH ₃	6.69 ± 0.92	> 10
6-CH ₃	0.67 ± 0.11	5.80 ± 0.58
7-CH ₃	6.29 ± 0.62	> 10
5-Br	7.16 ± 1.11	> 10
6-Br	0.75 ± 0.09	> 10
7-Br	8.17 ± 0.76	> 10
5-CF ₃	8.46 ± 0.87	> 10
6-CF ₃	0.77 ± 0.09	7.10 ± 0.60
7-CF ₃	4.73 ± 0.56	> 10
5-Cl,F	> 10	n.d.
6-Cl,F	> 10	n.d.
7-Cl,F	7.13 ± 0.63	> 10
5-F,Br	> 10	n.d.
6-F,Br	6.28 ± 0.46	5.40 ± 0.20
7-F,Br	> 10	n.d.
5-Ph	0.81 ± 0.06	0.60 ± 0.02
6-Ph	8.06x10 ⁻² ± 1.04x10 ⁻²	0.60 ± 0.20
7-Ph	0.66 ± 0.08	0.92 ± 0.06

Tabella 2. Valori di IC₅₀ determinati in seguito a trattamento per 72 h delle cellule A431 e NIH3T3 con i derivati 4-aminochinazolinici.

E' stato successivamente valutato se gli effetti antiproliferativi indotti dai derivati 4-aminochinazolinici fossero reversibili. A tal fine, ad un periodo di trattamento di 4 ore con i composti utilizzati in concentrazione pari a 10 μM, è seguito un periodo di recupero di 68 ore, nel quale le cellule A431 sono state mantenute in solo terreno (Figura 4). Comparando i risultati con quelli ottenuti in seguito ad un trattamento continuo per 72 ore, si osservava che, dopo il periodo di recupero, i composti 5-Br, 5-Ph, 6-Ph e 7-Ph manteneva una buona attività antiproliferativa. Al contrario, per tutti gli altri derivati e i composti di riferimento, la proliferazione cellulare ritornava a valori paragonabili a quelli rilevati nelle colture di controllo non trattate.

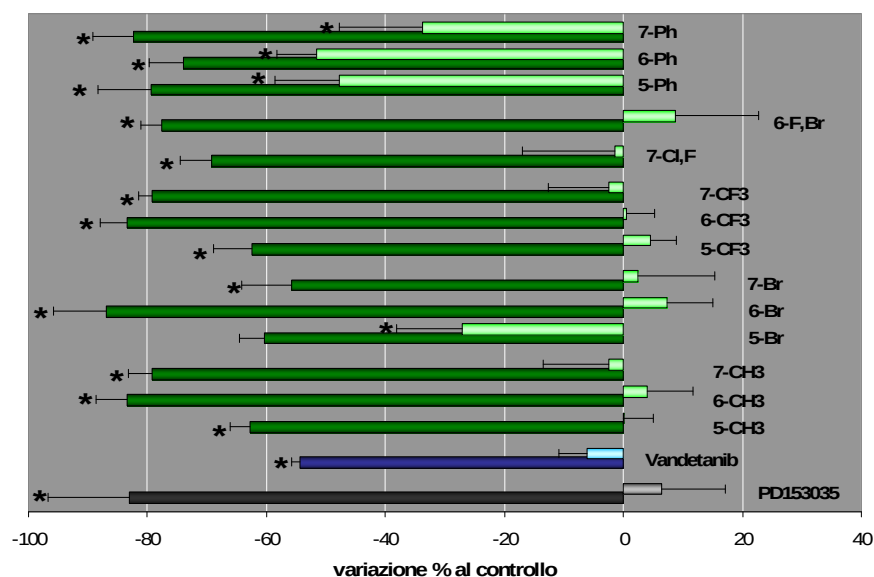


Figura 4. Reversibilità dell'effetto antiproliferativo. Dopo 4 ore di trattamento con i derivati 4-aminochinazolinici (10 μ M), il terreno è stato rimosso e sostituito con terreno fresco. Dopo incubazione per 68 ore, la proliferazione cellulare è stata determinata con il saggio dell'MTT. Parallelamente, è stato anche effettuato un trattamento continuo per 72 ore con i composti.

Barre chiare: 4 ore di trattamento + 68 ore di recupero; barre scure: 72 ore di trattamento.

I risultati, media di 3 esperimenti ed espressi come variazione percentuale dalle colture di controllo non trattate (considerate come 0), sono riportati come media $\pm$ deviazione standard.

* = $p < 0.05$ vs controllo (colture non trattate), t test di Student.

Effetti sulla fosforilazione di EGFR

Per verificare se i derivati 4-aminochinazolinici fossero in grado di inibire la fosforilazione di EGFR, è stato effettuato un saggio immunoenzimatico, che utilizza un anticorpo specifico in grado di riconoscere solamente l'EGFR fosforilato e non altre tirosinchinasi. Come mostrato in Figura 5, tutti i derivati, analogamente ai composti di riferimento, diminuivano in modo significativo la fosforilazione del recettore indotta da EGF esogeno. Tuttavia, solo il composto 7-Cl,F era efficace in assenza di stimolazione da parte del fattore di crescita.

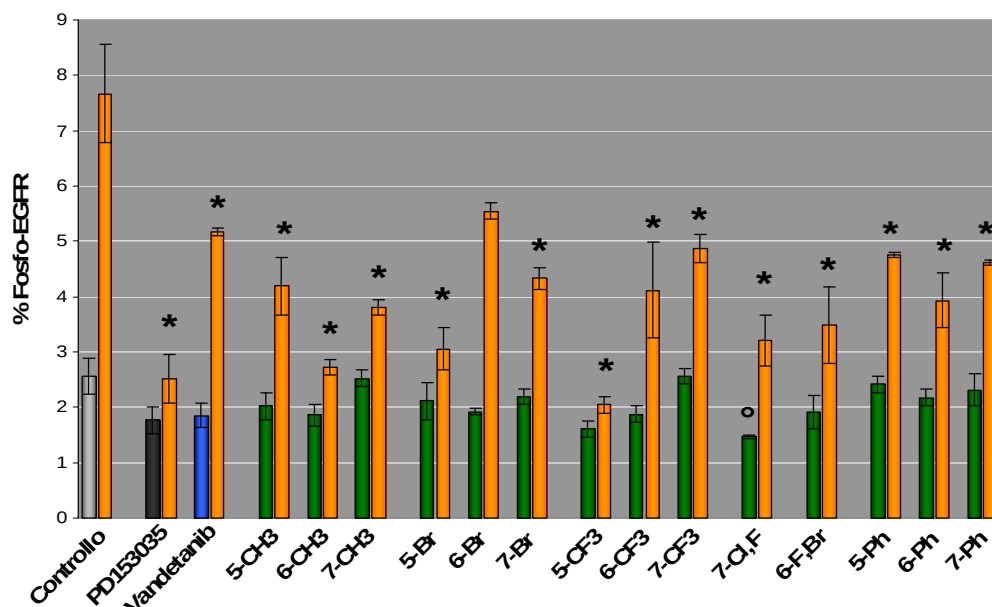


Figura 5. Le cellule A431 sono state pre-trattate per 30 min con i derivati (1 μ M) e poi incubate in assenza (barre verdi, blu o grigie) o in presenza (barre gialle) di 50 ng/mL EGF per 5 min. La percentuale di EGFR fosforilato è stata determinata tramite ELISA. I risultati, media di 3 esperimenti, sono espressi come rapporto tra EGFR fosforilato ed EGFR totale.

° = $p < 0.05$ vs controllo senza EGF; * = $p < 0.05$ vs controllo con EGF; t test di Student.

Effetti sulla proliferazione cellulare indotta da EGF esogeno

Per valutare se i derivati 4-aminochinazolinici fossero in grado di contrastare l'aumento della crescita cellulare indotto da EGF esogeno, sono stati utilizzati due protocolli di trattamento. Nel primo (Figura 6A), le cellule A431 sono state trattate per 24 ore con i composti e, dopo rimozione del mezzo di coltura e lavaggio, sono state incubate per 72 ore in presenza di EGF utilizzato in concentrazione pari a 5 ng/mL. Nel secondo caso (Figura 6B), i composti e l'EGF sono stati aggiunti nello stesso momento nel terreno di coltura e le cellule sono state incubate per 72 ore. Sulla base dei risultati ottenuti negli esperimenti precedenti, i composti sono stati utilizzati in concentrazioni che non avevano modificato la vitalità cellulare nei saggi con MTT, per evitare falsi positivi dovuti ad un effetto citotossico diretto e non ascrivibile ad una azione su EGF. In entrambi i protocolli sperimentali, PD153035, 5-CF₃, 5-Ph e 6-Ph erano in grado di contrastare in modo significativo l'effetto proliferogeno indotto da EGF. Il composto 6-CF₃ era efficace nel primo protocollo di trattamento, mentre i composti 6-F,Br e Vandetanib nel secondo. Tutti gli altri derivati non esercitavano alcun effetto.

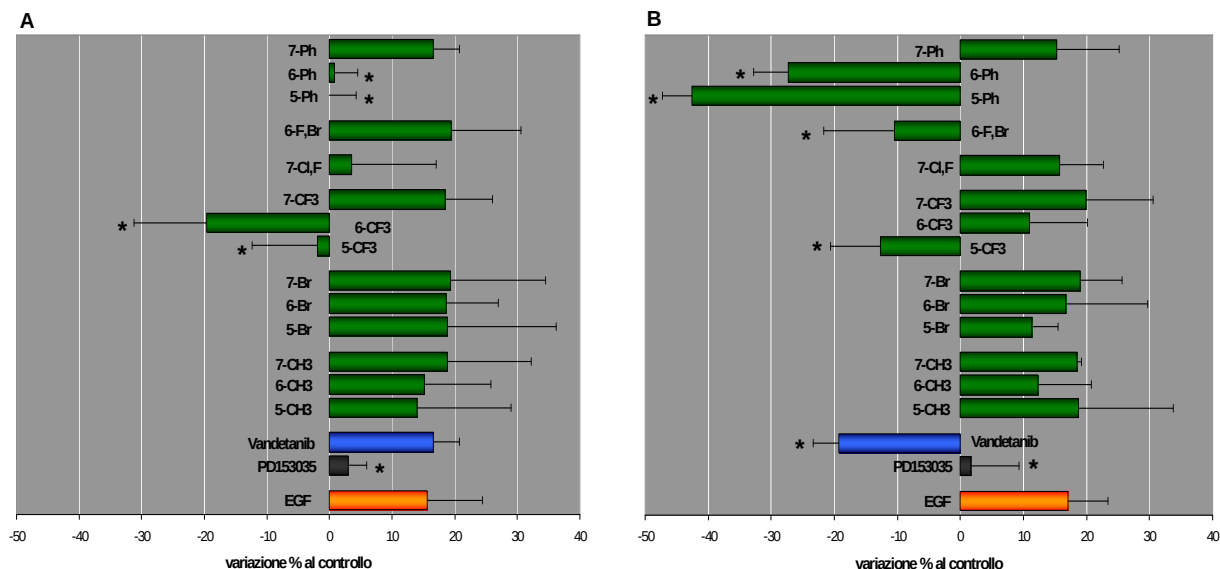


Figura 6. Effetti sulla stimolazione della crescita cellulare indotta da EGF esogeno. **(A)** Dopo 24 ore di trattamento con i composti a concentrazione non citotossica, il mezzo è stato rimosso e sostituito con terreno contenente 5 ng/mL EGF. Successivamente le colture sono state incubate per 72 ore. **(B)** Le cellule A431 sono state trattate per 72 ore con 5 ng/mL EGF e concentrazioni non citotossiche dei composti. Alla fine del periodo di incubazione, la proliferazione cellulare è stata determinata tramite il saggio dell'MTT.

I risultati, media di 3 esperimenti ed espressi come variazione percentuale dalle colture di controllo non trattate (considerate come 0), sono riportati come media $\pm$ deviazione standard.

* = $p < 0.05$ vs colture trattate con EGF, t test di Student.

b) Valutazione *in vitro* dell'attività antiangiogenica

Effetti sulla proliferazione cellulare

In Figura 7 sono contenute le curve dose-risposte ottenute in seguito a trattamento per 72 h delle HUVEC con diverse concentrazioni delle sostanze (da 0,01 a 10 μ M). I valori di IC_{50} relativi sono riportati nella Tabella 3. Dal confronto dei valori di IC_{50} si può evidenziare che:

- i composti, caratterizzati da un gruppo fenilico in posizione 3', esercitavano un'attività antiproliferativa maggiore di PD153035. I composti 5-Ph e 7-Ph presentavano valori di IC_{50} circa 5 volte inferiori a quelli calcolati per PD153035;
- la ciclizzazione dei metossili in posizione 6,7 con formazione di un anello a 6 atomi e la contemporanea presenza del gruppo fenilico (composto 6-Ph) miglioravano ulteriormente l'attività citotossica, con valori di IC_{50} circa 100 volte inferiori a quelli di PD153035;
- i composti 6- CF_3 e 5- CF_3 mostravano un'attività paragonabile a PD153035;

- i composti 5-F,Br e 6-F,Br presentavano un'attività paragonabile a quella osservata per Vandetanib.
- i composti 7-CF₃ e 7-F,Br esercitavano poco o nessun effetto sulla crescita cellulare.

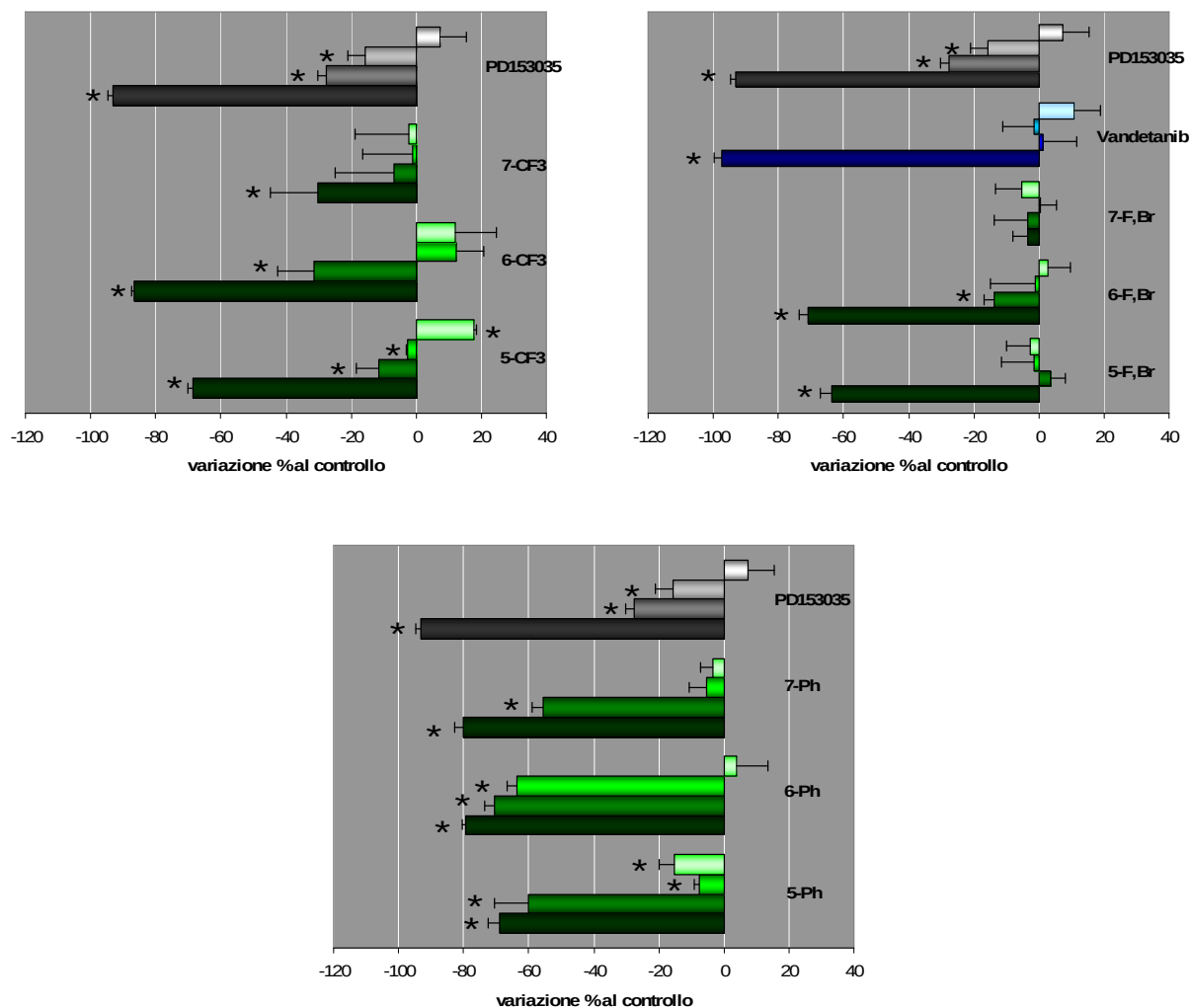


Figura 7. Effetti dei derivati 4-aminochinazolinici sulla proliferazione delle HUVEC. La proliferazione cellulare è stata determinata con MTT dopo 72 h di incubazione con i composti in esame:

□ □ □ = 0.01 μM
 ■ ■ ■ = 0.1 μM
 ■ ■ ■ = 1 μM
 ■ ■ ■ = 10 μM.

I risultati, media di 3 esperimenti ed espressi come variazione percentuale dalle colture di controllo non trattate (considerate come 0), sono riportati come media ± deviazione standard.

* = p<0.05 vs controllo (colture non trattate), t test di Student.

Composti	IC ₅₀ (μM) HUVEC
PD153035	4.06 ± 0.19
Vandetanib	5.64 ± 0.42
5-CF ₃	7.06 ± 0.30
6-CF ₃	3.86 ± 1.33
7-CF ₃	> 10
5-F,Br	8.30 ± 0.55
6-F,Br	6.70 ± 0.36
7-F,Br	> 10
5-Ph	0.75 ± 0.01
6-Ph	8.20x10 ⁻² ± 0.17x10 ⁻²
7-Ph	0.91 ± 0.06

Tabella 3. Valori di IC₅₀ determinati in seguito a trattamento per 72 h delle HUVEC con i derivati 4-aminochinazolinici.

Analogamente ai composti di riferimento, i derivati 6-CF₃, 7-CF₃, 5-F,Br, 6-F,Br, 5-Ph, 6-Ph e 7-Ph inducevano, rispetto alle colture di controllo non trattate, un forte effetto antiproliferativo (dati non mostrati) ed aumentavano in modo significativo il tasso di apoptosi (Figura 8). E' da sottolineare che il composto 6-Ph con eterociclo a 6 atomi e sostituito all'anilina con un gruppo fenilico, induceva un effetto proapoptotico minore rispetto agli altri derivati nonostante l'elevata attività citotossica. I derivati 5-CF₃ e 7-F,Br non modificavano la crescita cellulare (dati non mostrati) e non inducevano il processo di apoptosi nelle colture cellulari.

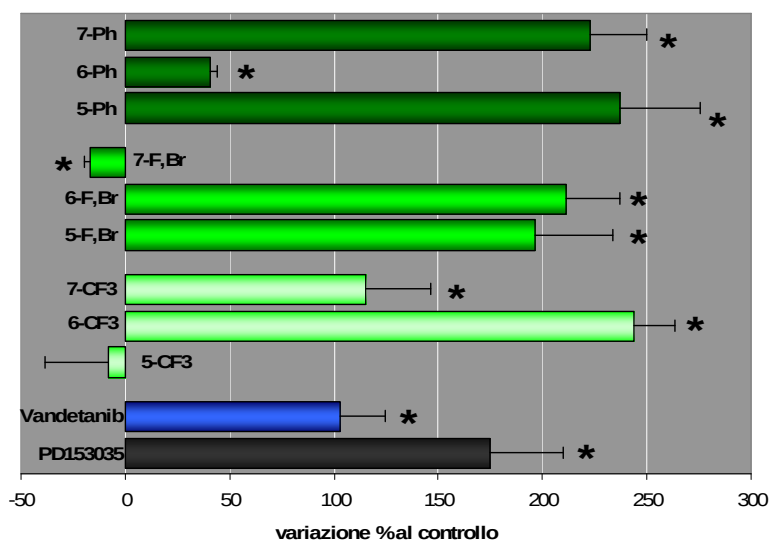


Figura 8. Effetti proapoptotici dei derivati 4-aminochinazolinici sulle HUVEC.

Dopo 24 h di trattamento con i composti (10 μ M), le HUVEC sono state lisate e la quantità di mono- e oligo-nucleosomi è stata determinata utilizzando un saggio immunoenzimatico. I risultati, media di 3 esperimenti ed espressi come variazione percentuale dalle colture di controllo non trattate (considerate come 0), sono riportati come media $\pm$ deviazione standard.

* = $p < 0.05$ vs controllo (colture non trattate), t test di Student.

Per verificare la reversibilità dell'effetto antiproliferativo è stato utilizzato il protocollo di trattamento descritto nella sperimentazione con cellule A431, nel quale dopo un'incubazione di 4 h con i composti utilizzati in concentrazione pari a 10 μ M, è seguito un periodo di recupero di 68 h (Figura 9). Comparando i risultati con quelli ottenuti in seguito ad un trattamento continuo per 72 h, si osservava che per i composti sostituiti con il gruppo trifluorometilico (5-CF₃ e 6-CF₃), il composto 6-F,Br, PD153035 e Vandetanib, la proliferazione cellulare ritornava a valori paragonabili a quelli rilevati nelle colture di controllo non trattate. Al contrario, dopo il periodo di recupero, i composti 5-F,Br e 7-Ph mantenevano una buona attività antiproliferativa. L'effetto citotossico veniva invece completamente mantenuto nel caso dei composti 5-Ph e 6-Ph sostituiti all'anilina con il fenile.

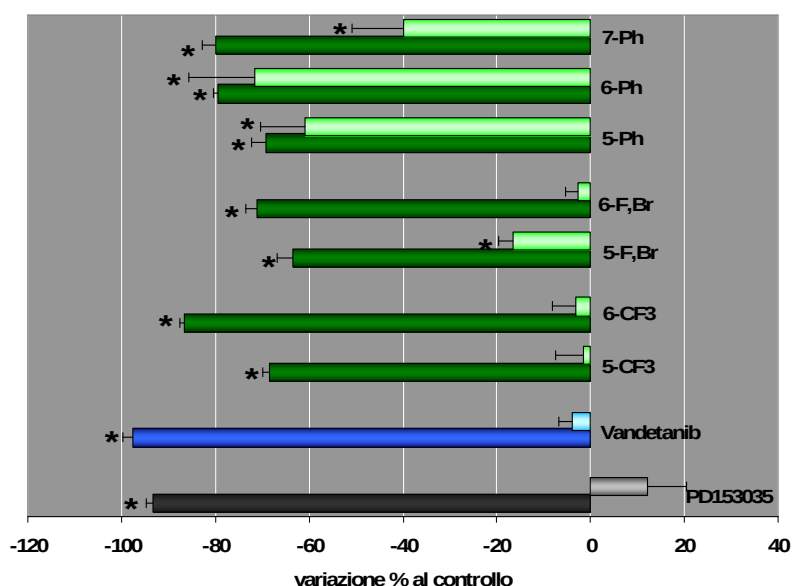


Figura 9: Reversibilità dell'effetto antiproliferativo. Dopo 4 h di trattamento con i derivati

4-aminochinazolinici (10 μ M), il terreno è stato rimosso e sostituito con terreno fresco. Dopo incubazione per 68 h, la proliferazione cellulare è stata determinata con il saggio dell'MTT. Parallelamente, è stato anche effettuato un trattamento continuo per 72 h con i composti. Barre chiare: 4 ore di trattamento + 68 ore di recupero; barre scure: 72 ore di trattamento. I risultati, media di 3 esperimenti ed espressi come variazione percentuale dalle colture di controllo non trattate (considerate come 0), sono riportati come media $\pm$ deviazione standard.

* = $p < 0.05$ vs controllo (colture non trattate), t test di Student.

Effetti sulla fosforilazione di EGFR

Tutti i composti, compresi quelli di riferimento, non modificavano la fosforilazione di EGFR in assenza di stimolazione (Figura 10). Come atteso, il trattamento con la citochina induceva un aumento della fosforilazione rispetto alle colture non trattate. Tutti i derivati, eccezion fatta per 5-CF₃, 6-F,Br e 7-F,Br, antagonizzavano in modo significativo l'aumento nella fosforilazione osservato in seguito a trattamento con EGF.

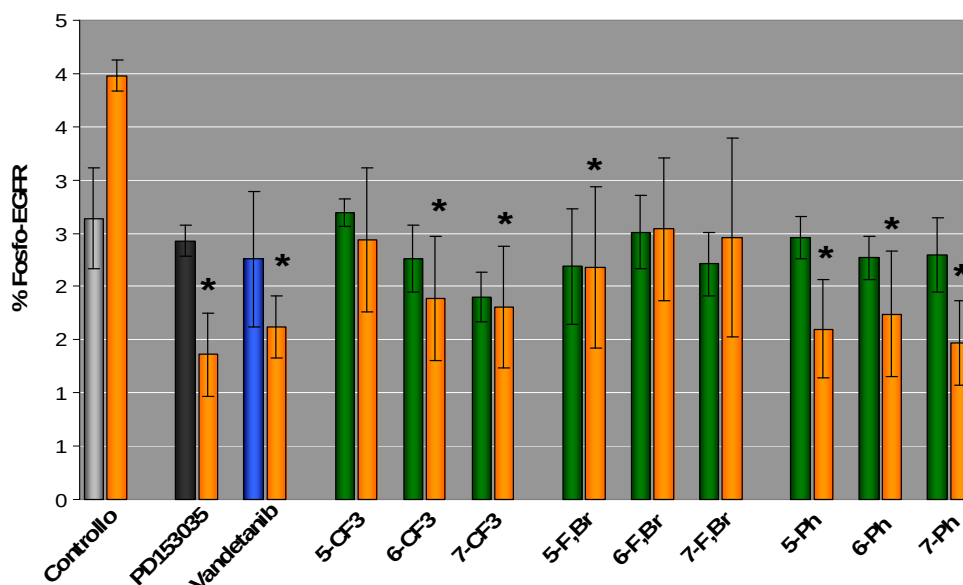


Figura 10. Le HUVEC sono state pre-trattate per 30 min con i derivati (1 μ M) e poi incubate in assenza (barre verdi, blu o grigie) o in presenza (barre gialle) di 50 ng/mL EGF per 5 min. La percentuale di EGFR fosforilato è stata determinata tramite ELISA. I risultati, media di 3 esperimenti, sono espressi come rapporto tra EGFR fosforilato ed EGFR totale.

* = $p < 0.05$ vs controllo senza EGF, t test di Student.

Effetti sulla migrazione cellulare

Per verificare la capacità dei composti di inibire la migrazione delle cellule endoteliali, è stato utilizzata una variante della camera di Boyden, in cui le cellule vengono seminate sulla parte superiore di un *insert*, costituito da una membrana in policarbonato con pori del diametro di 5 μ m. L'*insert* veniva inserito in un pozzetto riempito con terreno di coltura contenente fattori chemotattici, che stimolano il passaggio delle cellule attraverso la membrana. L'esperimento è stato eseguito seminando le cellule sul comparto superiore del filtro in presenza o in assenza dei derivati 4-aminochinazolinici. I composti sono stati utilizzati a concentrazione non citotossica, pari a 1 μ M, come dimostrato dai risultati del saggio dell'MTT effettuato in seguito ad esposizione per 4 h (dati non mostrati). I filtri sono stati quindi inseriti in pozzetti a contatto con terreno completo di fattori aggiunto all'interno dei singoli pozzetti. Dopo un periodo di incubazione di 4 h, le colture sono state fissate e le cellule che avevano attraversato il setto poroso, quindi adese alla faccia inferiore, sono state contate attraverso l'impiego di un microscopio a fluorescenza, dopo trattamento con un montante acquoso contenente DAPI, sostanza caratterizzata da una intensa fluorescenza blu e che si intercala nel DNA. La migrazione è stata espressa come percentuale rispetto alle colture di controllo non trattate con i composti.

Come evidenziato in Figura 11, tutti i composti inibivano la migrazione delle cellule endoteliali, analogamente a quanto determinato per i composti di riferimento.

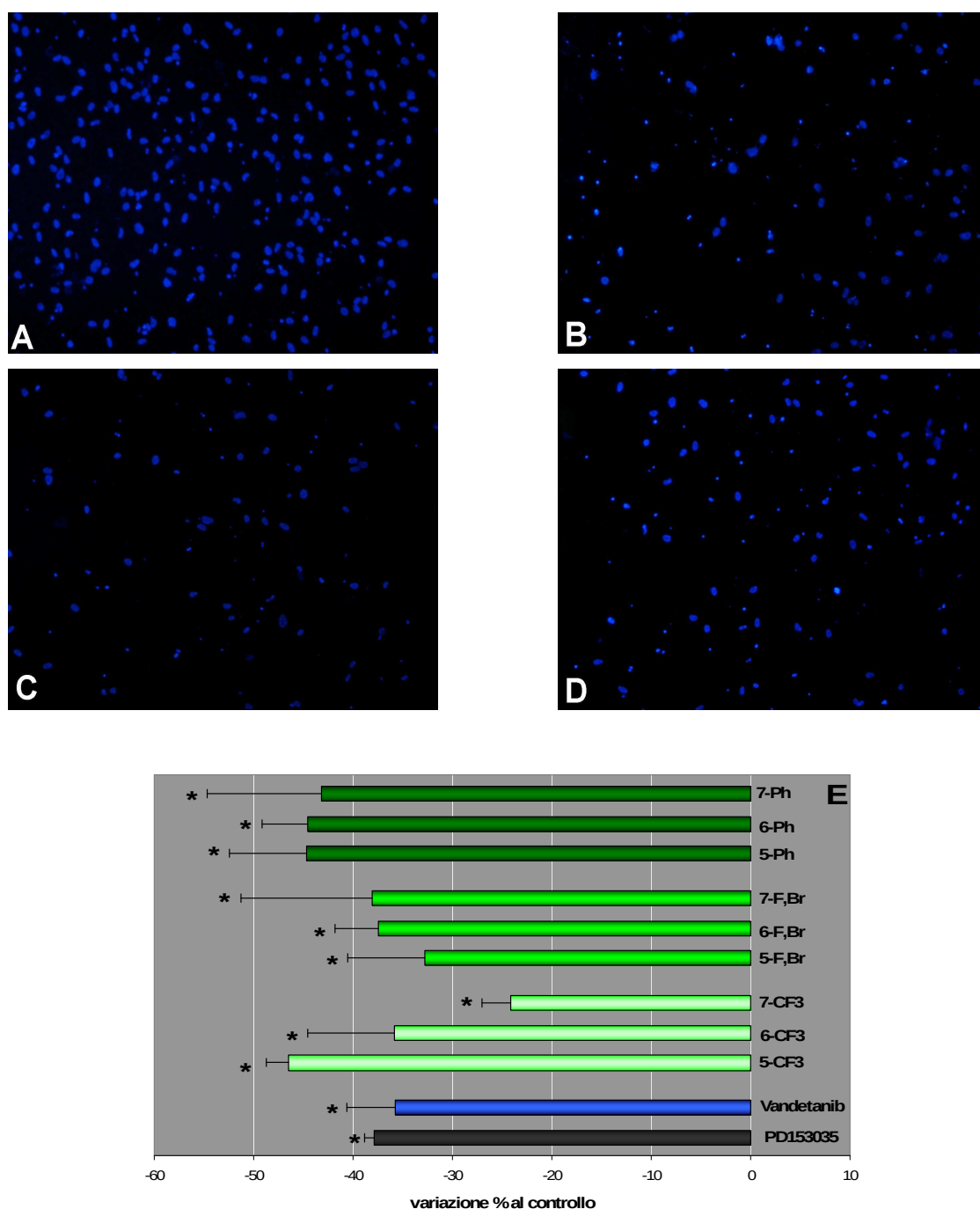


Figura 11. HUVEC migrate attraverso un setto poroso avente pori dal diametro di 5 μ m dopo 4 h di incubazione con solo terreno completo (A), con terreno addizionato di PD153035 (B), 5-Ph (C) e 5-CF₃ (D). L'insert è stato trattato con un montante acquoso contenente DAPI. Utilizzando un microscopio a fluorescenza, sono stati fotografati cinque campi per ogni filtro seguendo uno schema a croce (ingrandimento x100). (E) Effetti sulla migrazione cellulare.

I risultati, media di 3 esperimenti ed espressi come variazione percentuale dalle culture di controllo non trattate (considerate come 0), sono riportati come media $\pm$ deviazione standard.

* = $p < 0.05$ vs controllo (colture non trattate), t test di Student.

Morfogenesi su Matrigel

Per valutare *in vitro* l'effetto dei derivati 4-aminochinazolinici sulla morfogenesi, le HUVEC sono state seminate su Matrigel, un estratto di un sarcoma murino ricco di componenti della membrana basale e ampiamente utilizzato per determinare *in vitro* l'azione pro- o antiangiogenica di sostanze di origine sia naturale che sintetica. Le cellule endoteliali non trattate si organizzano in modo tale da formare all'interno del gel strutture a maglie chiuse. Le colture sono state trattate per 18 h con i composti utilizzati a concentrazione non citotossica pari a 0,1 μ M, come dimostrato dai risultati del saggio dell'MTT effettuato in seguito ad esposizione per 18 h (dati non mostrati). Per il saggio di morfogenesi, le colture sono state fissate e per ciascuna di esse sono state acquisite 5 immagini utilizzando un microscopio a contrasto di fase collegato ad una fotocamera digitale. Su tali immagini, grazie ad un sistema computerizzato di analisi di immagine, sono stati misurati parametri dimensionali, quali, l'area percentuale coperta dalle cellule endoteliali e la lunghezza totale della rete cellulare per campo, e parametri topologici, quali il numero di maglie chiuse e i punti di ramificazione per campo.

In Figura 12, sono riportati alcuni esempi di immagini relative alle colture in seguito ai vari tipi di trattamento.

Da un punto di vista quantitativo (Figura 13), PD153035 diminuiva in modo significativo l'area percentuale coperta dalle cellule endoteliali, il numero di maglie chiuse e l'area da esse occupata rapportata all'area totale. Simili risultati si ottenevano per i composti caratterizzati da un anello a 5 o a 7 atomi (5-CF₃, 7-CF₃, 5-F,Br, 7-F,Br, 5-Ph, 7-Ph). I parametri sia dimensionali che topologici venivano diminuiti in seguito a trattamento con 6-Ph e 6-CF₃, entrambi caratterizzati da un anello a 6 atomi e sostituiti all'anilina, rispettivamente, con un anello fenilico e un gruppo trifluorometilico. Il composto 6-CF₃ appariva molto meno efficace del composto 6-Ph. Il composto 6-F,Br risultava inefficace e Vandetanib induceva una diminuzione solo nei valori dell'area percentuale.

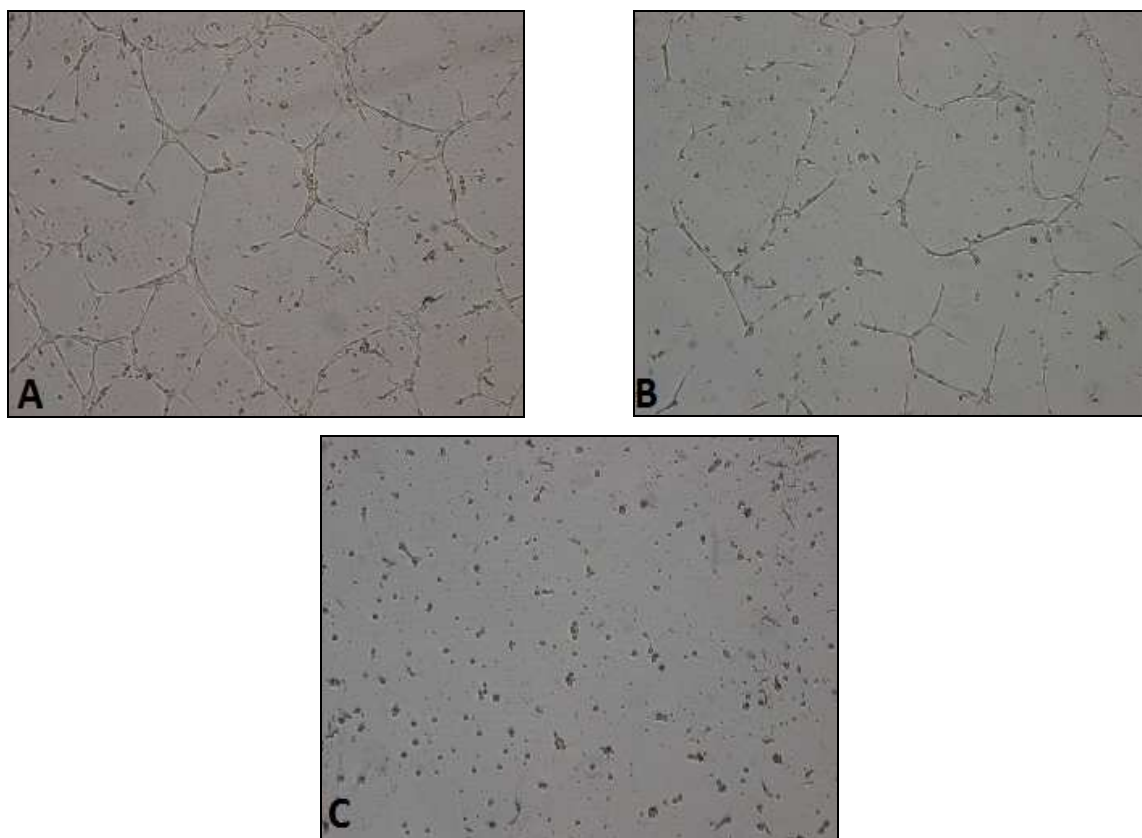


Figura 12. HUVEC coltivate su Matrigel non trattate (A) e trattate per 18 h con 0,1 μ M PD153035(B) e 6-Ph (C). Le colture sono state fissate e per ciascuna di esse sono state acquisite 5 immagini ad un ingrandimento di 50x, seguendo uno schema a croce.

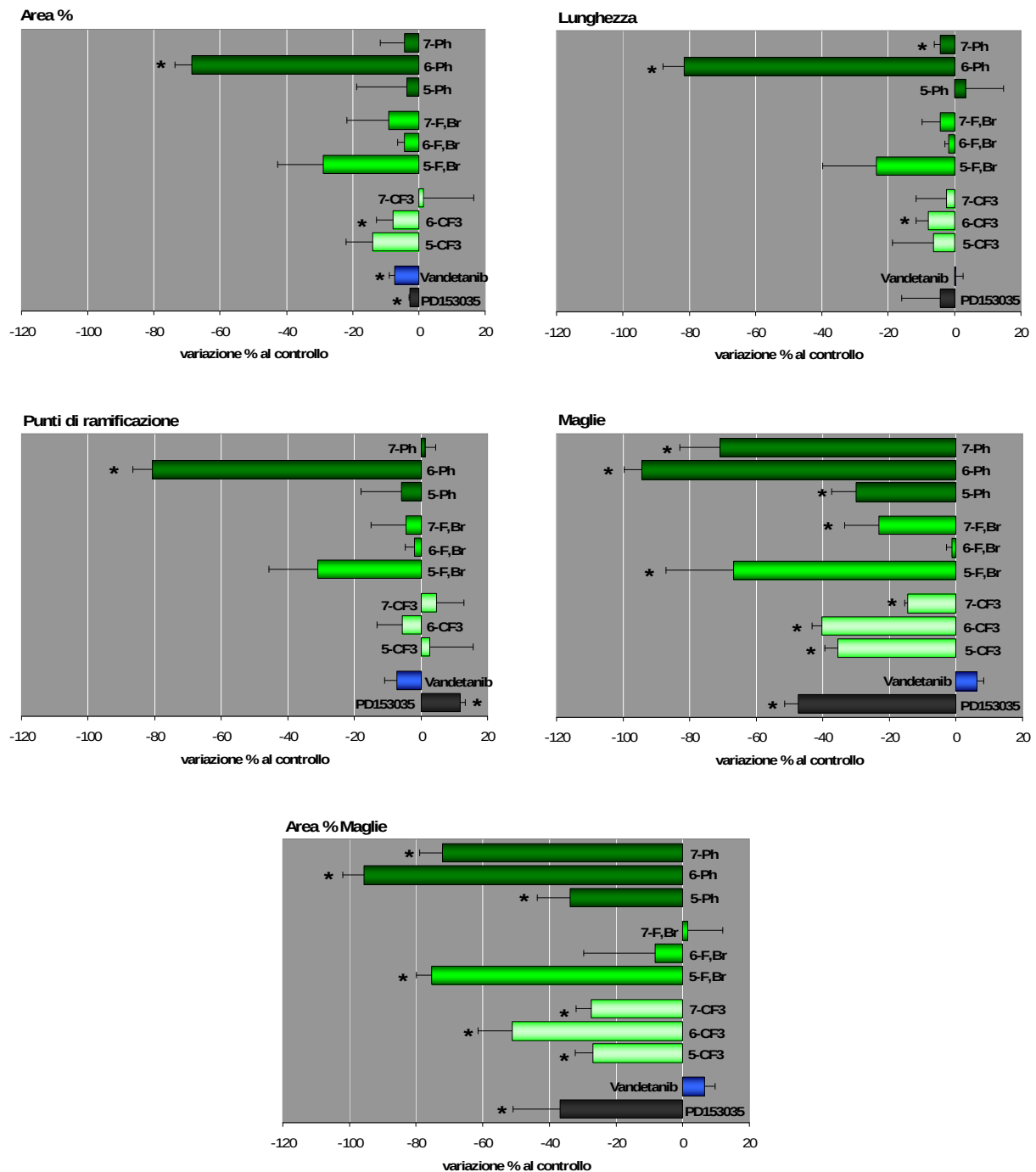


Figura 13. Morfogenesi su Matrigel di HUVEC trattate per 18 h con i composti in analisi. I risultati, media di 3 esperimenti, sono stati espressi come media $\pm$ deviazione standard.

* = $p < 0.05$ vs controllo, t test di Student.

Effetti sul rilascio di citochine esogene

Rilascio di FGF-2 da parte di HUVEC

Per verificare se l'effetto antiangiogenico fosse dovuto ad un'inibizione della produzione della citochina, è stato valutato, tramite un saggio immunoenzimatico, il rilascio di FGF-2 nel mezzo

di coltura da parte delle HUVEC in presenza dei derivati 4-aminochinazolinici, utilizzati in concentrazione pari a 0,1 μ M. Tale dosaggio non esercitava effetti citotossici, come precedentemente dimostrato nei saggi di vitalità cellulare effettuati con 72 h di incubazione. Solamente i composti 5-Ph, 6-Ph, e 7-Ph, caratterizzati da un gruppo fenilico in posizione 3', e il composto 7-F,Br, diminuivano in modo significativo il rilascio della citochina rispetto alle colture di controllo (Figura 14).

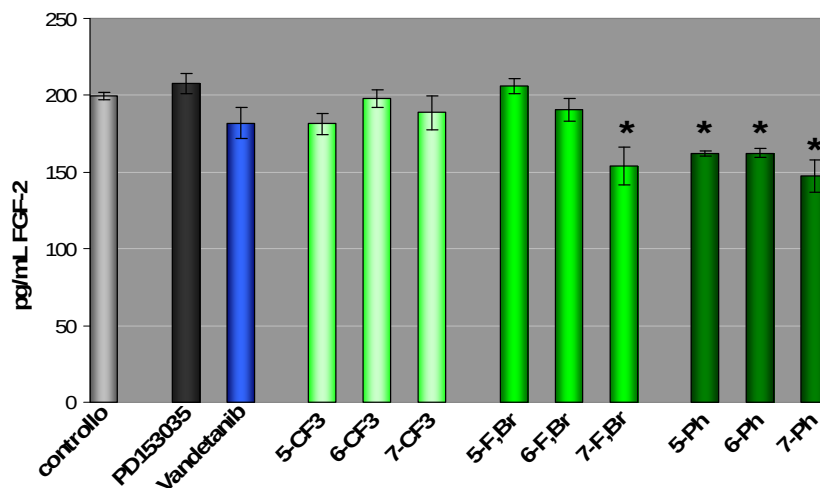


Figura 14. Effetti dei derivati 4-aminochinazolinici sul rilascio di FGF-2 nel mezzo di coltura mediante saggio immunoenzimatico. Dopo 72 h di trattamento delle HUVEC con i composti in analisi alla concentrazione di 0,1 μ M, il terreno di coltura è stato prelevato ed è stata determinata la concentrazione della citochina. I risultati, media di 3 esperimenti, sono stati espressi come media $\pm$ deviazione standard.

* = $p < 0.05$ vs controllo, t test di Student.

Rilascio di VEGF da parte di A431

Analogamente a EGF, anche VEGF è un fattore di crescita presente nel microambiente tumorale e viene prodotto dalle stesse cellule tumorali che, in tal modo, tramite meccanismi autocrini-paracrini, sostengono il loro sviluppo. Dato che le HUVEC presentano un rilascio basale di VEGF talmente basso da non poter apprezzare eventuali variazioni indotte dai composti studiati, non è stato possibile verificarne l'effetto sulla produzione della citochina. La sperimentazione è stata quindi effettuata sulle A431 utilizzando un saggio immunoenzimatico in grado di quantificare in modo selettivo la citochina nel mezzo di coltura. Tale dosaggio ha messo in evidenza una diminuzione del rilascio di VEGF dopo trattamento con Vandetanib e il composto 6-Ph (Figura 15).

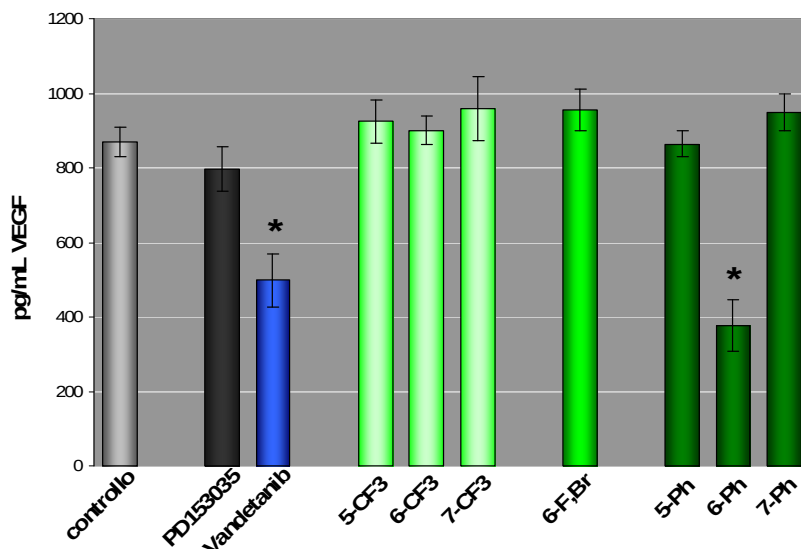


Figure 15. Effetti dei derivati 4-aminochinazolinici sul rilascio di VEGF. Le cellule A431 sono state trattate per 72 ore con i composti utilizzati a concentrazione non citotossica (0.1 μ M). Alla fine del periodo di incubazione, la quantità di citochina presente nel mezzo di coltura è stata determinata tramite saggio immunoenzimatico. I risultati, media di 3 esperimenti ed espressi come pg/mL di VEGF, sono riportati come media $\pm$ deviazione standard.

* = $p < 0.05$ vs colture non trattate, t test di Student.

Effetti sulla morfogenesi indotta da citochine esogene

FGF-2

La sperimentazione è stata effettuata utilizzando i composti in concentrazione pari a 0,1 μ M. Come mostrato in Figura 16, a tale dosaggio solo il composto 6-Ph riusciva a contrastare l'effetto proliferogeno dell'FGF-2, mentre tutti gli altri derivati risultavano inefficaci.

Il trattamento delle colture con 50 ng/mL FGF-2 induceva un aumento di tutti i parametri rispetto a quanto osservato nelle colture di controllo non trattate (Figura 17). PD153035 e 7-Ph contrastavano l'effetto della citochina sulla lunghezza totale della rete cellulare, sul numero di maglie chiuse e sulla loro area percentuale (Figura 18). Al contrario, il composto 7-F,Br e Vandetanib erano completamente inefficaci. Tutti gli altri composti hanno indotto una diminuzione significativa di tutti parametri misurati rispetto a quanto osservato nelle colture trattate con FGF-2. In particolare, il composto 6-Ph risultava il più attivo.

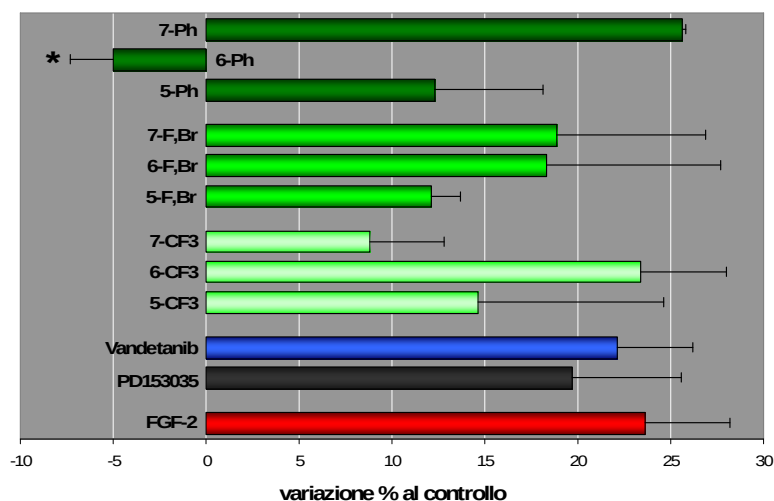


Figura 16. Determinazione della vitalità cellulare utilizzando il saggio dell'MTT. La proliferazione cellulare è stata determinata dopo 18 h di incubazione utilizzando contemporaneamente 50 ng/mL di FGF-2 e i derivati 4-aminochinazolinici in concentrazione 0,1 μ M. I risultati, media di 3 esperimenti ed espressi come variazione percentuale dalle colture di controllo non trattate (considerate come 0), sono riportati come media $\pm$ deviazione standard.

* = $p < 0.05$ vs controllo (colture trattate con FGF-2), t test di Student.

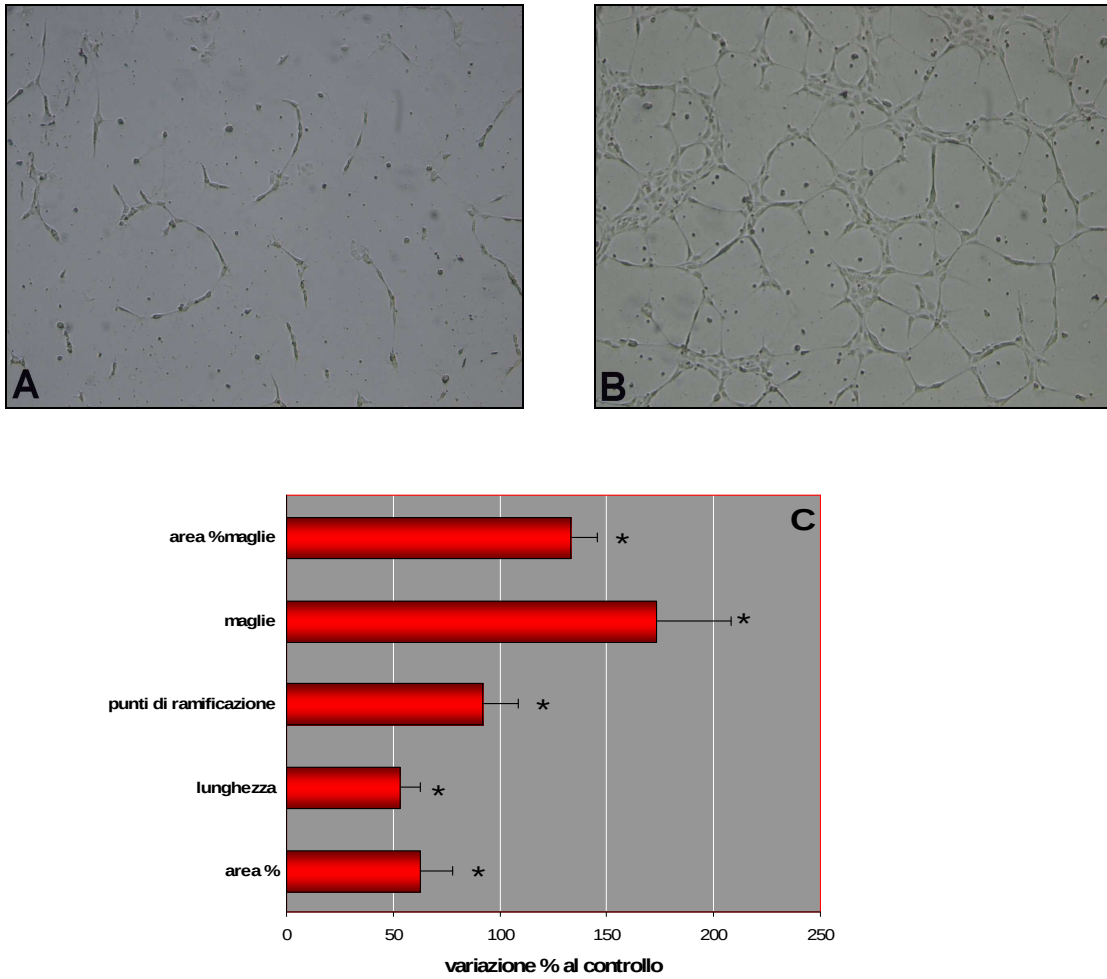


Figura 17. HUVEC coltivate su Matrigel non trattate (A) e trattate (B) per 18 h con 50 ng/mL di FGF-2. (C) Morfogenesi su Matrigel di HUVEC trattate per 18 h con 50 ng/mL di FGF-2. I risultati, media di 3 esperimenti, sono stati espressi come media $\pm$ deviazione standard. * = $p < 0.05$ vs controllo t test di Student.

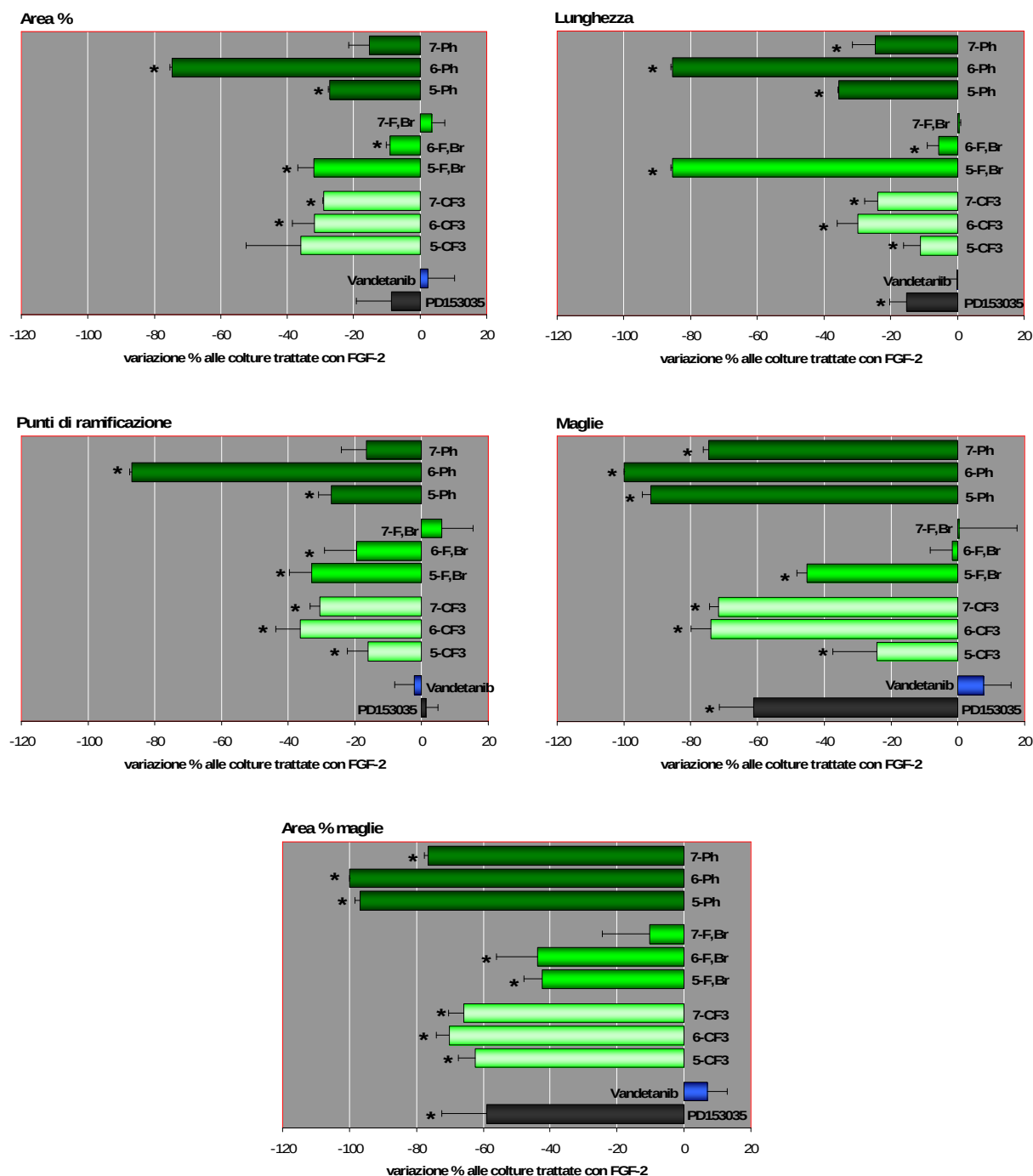


Figura 18. Morfogenesi su Matrigel di HUVEC trattate per 18 h con i composti in analisi in concentrazione 0,1 μ M e 50 ng/mL di FGF-2. I risultati, media di 3 esperimenti, sono stati espressi come media $\pm$ deviazione standard.

* = $p < 0.05$ vs colture trattate con FGF-2, t test di Student.

VEGF

La sperimentazione è stata effettuata utilizzando i composti in concentrazione pari a 0,1 μ M. A tale concentrazione, solo il composto 6-Ph contrastava l'effetto della citochina, mentre gli altri erano inefficienti (Figura 19).

Il trattamento delle colture con 20 ng/mL VEGF induceva un aumento di tutti i parametri rispetto a quanto osservato nelle colture di controllo non trattate (Figura 20).

I derivati, caratterizzati da un gruppo fenilico in posizione 3', risultavano più attivi di PD153035 nel contrastare la formazione di strutture simil-capillari indotta da VEGF esogeno (Figura 21). Infatti, rispetto alle colture trattate con la citochina, diminuivano in modo significativo tutti i parametri misurati. Analoghi effetti, ma con un intensità minore, si registravano in seguito a trattamento con il composto 5-F,Br, derivato metilendiossichinazolinico con due alogeni in posizione 2' e 4'. Tutti gli altri composti risultavano meno attivi di PD153035 ed, in particolare, il composto 6-F,Br era il meno efficace. Vandetanib non induceva alcun effetto.

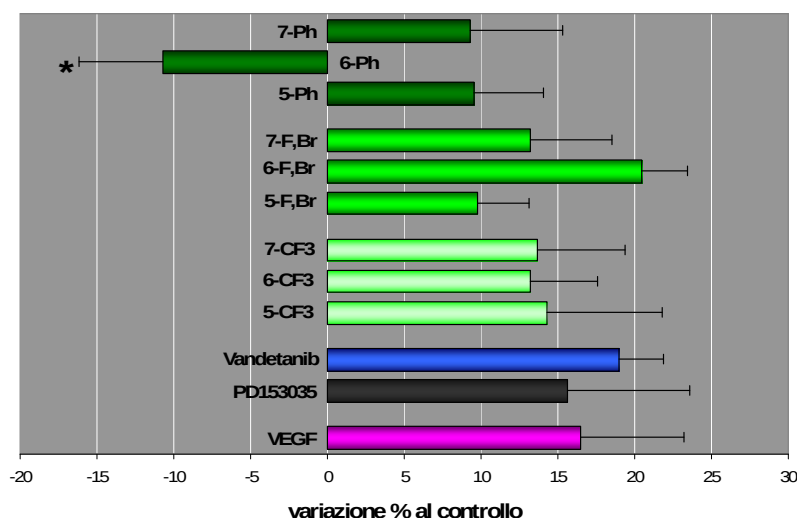


Figura 19. Determinazione della vitalità cellulare utilizzando il saggio dell'MTT. La proliferazione cellulare è stata determinata dopo 18 h di incubazione utilizzando contemporaneamente 20 ng/mL di VEGF e i derivati 4-aminochinazolinici in concentrazione 0,1 μ M. I risultati, media di 3 esperimenti ed espressi come variazione percentuale dalle colture di controllo non trattate (considerate come 0), sono riportati come media $\pm$ deviazione standard.

* = $p < 0.05$ vs controllo (colture trattate con VEGF), t test di Student.

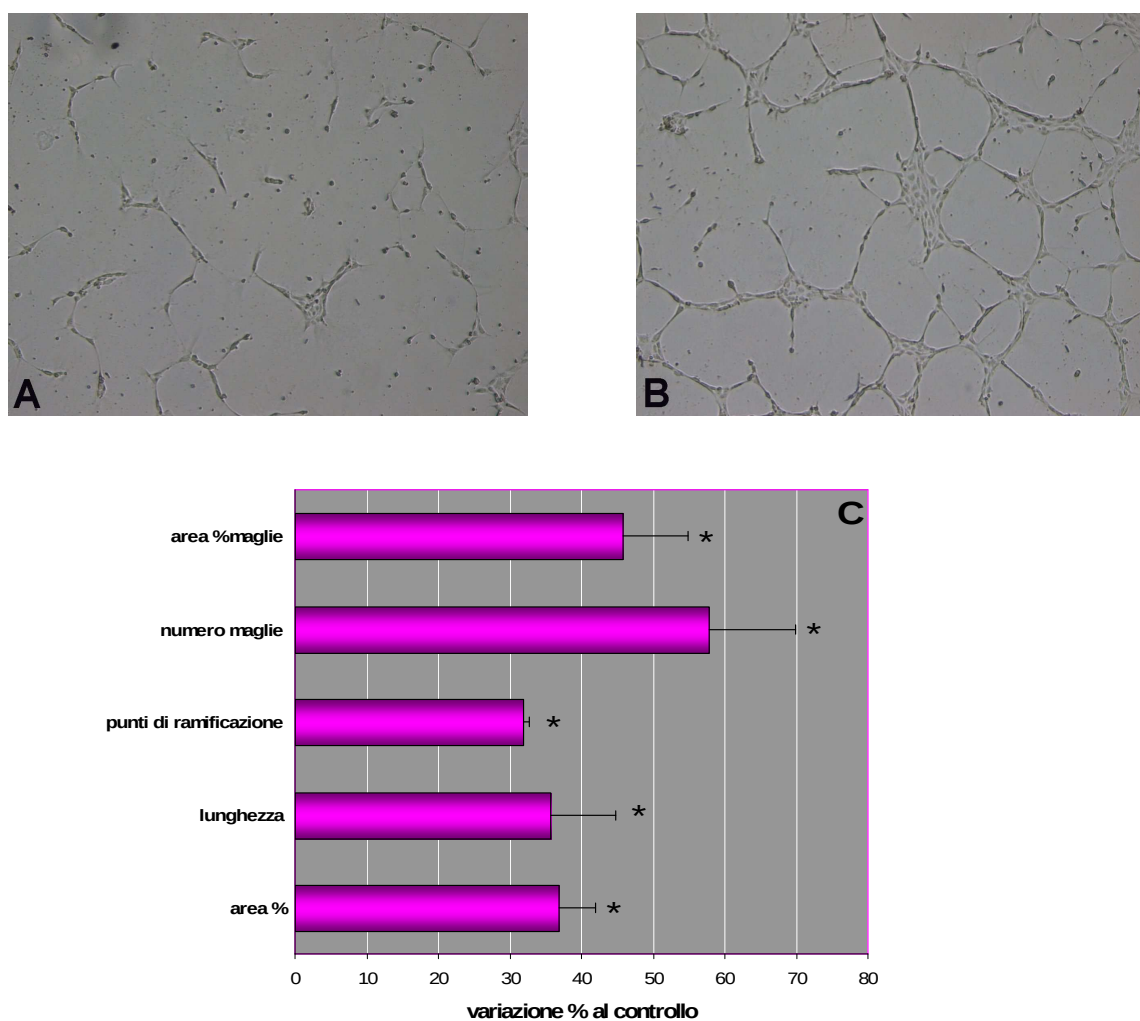


Figura 20. HUVEC coltivate su Matrigel non trattate (A) e trattate per 18 h con 20 ng/mL di VEGF (B). (C) Morfogenesi su Matrigel di HUVEC trattate per 18 h con 20 ng/mL di VEGF.

I risultati, media di 3 esperimenti, sono stati espressi come media $\pm$ deviazione standard.

* = $p < 0.05$ vs controllo, t test di Student.

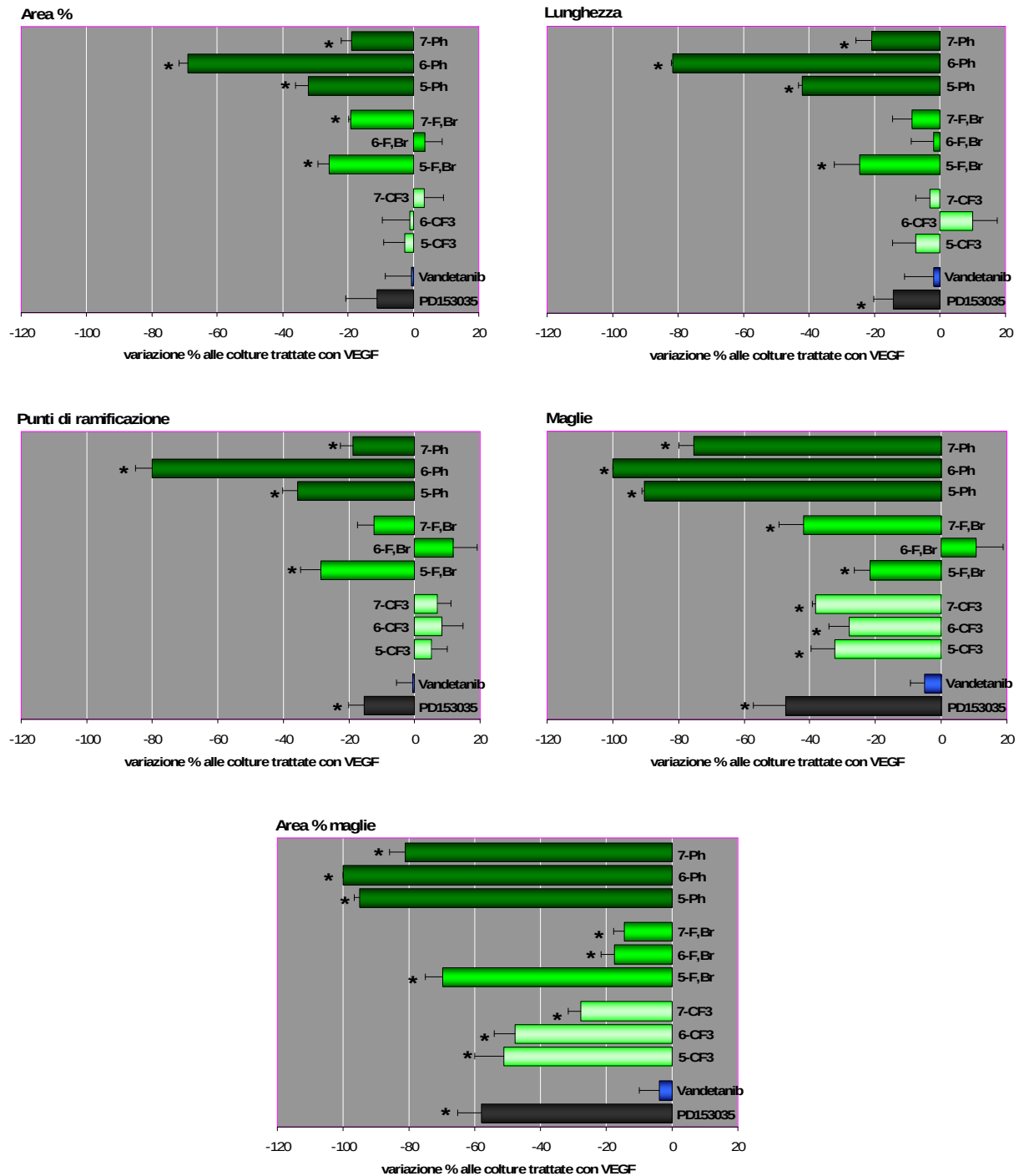


Figura 21. Morfogenesi su Matrigel di HUVEC trattate per 18 h con i composti in analisi in concentrazione 0,1 μ M e 20 ng/mL di VEGF. I risultati, media di 3 esperimenti, sono stati espressi come media $\pm$ deviazione standard.

* = $p < 0.05$ vs colture trattate con VEGF, t test di Student.

c) Valutazione *in vivo* dell'attività antiangiogenica

Sulla base dei risultati ottenuti nei saggi *in vitro*, la sperimentazione *in vivo* è stata limitata ai composti caratterizzati da un gruppo fenilico in posizione 3'. La Figura 22 mostra le immagini relative a sezioni istologiche dei *plug* di Matrigel dopo espianto, colorate con ematossilina ed eosina. Dopo 7 giorni dall'impianto, i *plug* composti da solo Matrigel apparivano compatti e si osservavano solo poche cellule infiltrate, principalmente localizzate ai bordi (A). La presenza di FGF-2 induceva la formazione di numerosi vasi, alcuni di grandi dimensioni, e uno sfaldamento del *plug*. Parallelamente, numerose cellule erano presenti all'interno dell'impianto (B). Un analogo quadro istologico, caratterizzato però da una minore dimensione dei vasi, si osservava quando negli impianti contenenti FGF-2 veniva aggiunto PD153035 (C). I derivati 4-aminochinazolinici riuscivano a contrastare, in modo maggiore rispetto al composto di riferimento, gli effetti proangiogenici della citochina. Infatti, i *plug* presentavano una struttura più compatta e un numero minore di neo-vasi con dimensioni ridotte (D, E, F). Queste osservazioni sono state confermate dall'analisi del contenuto di emoglobina nei *plug* (Figura 23). Solo i derivati 4-aminochinazolinici, e non PD153035, riuscivano a diminuire in modo significativo il contenuto della proteina rispetto a quanto determinato nei campioni contenenti solo FGF-2.

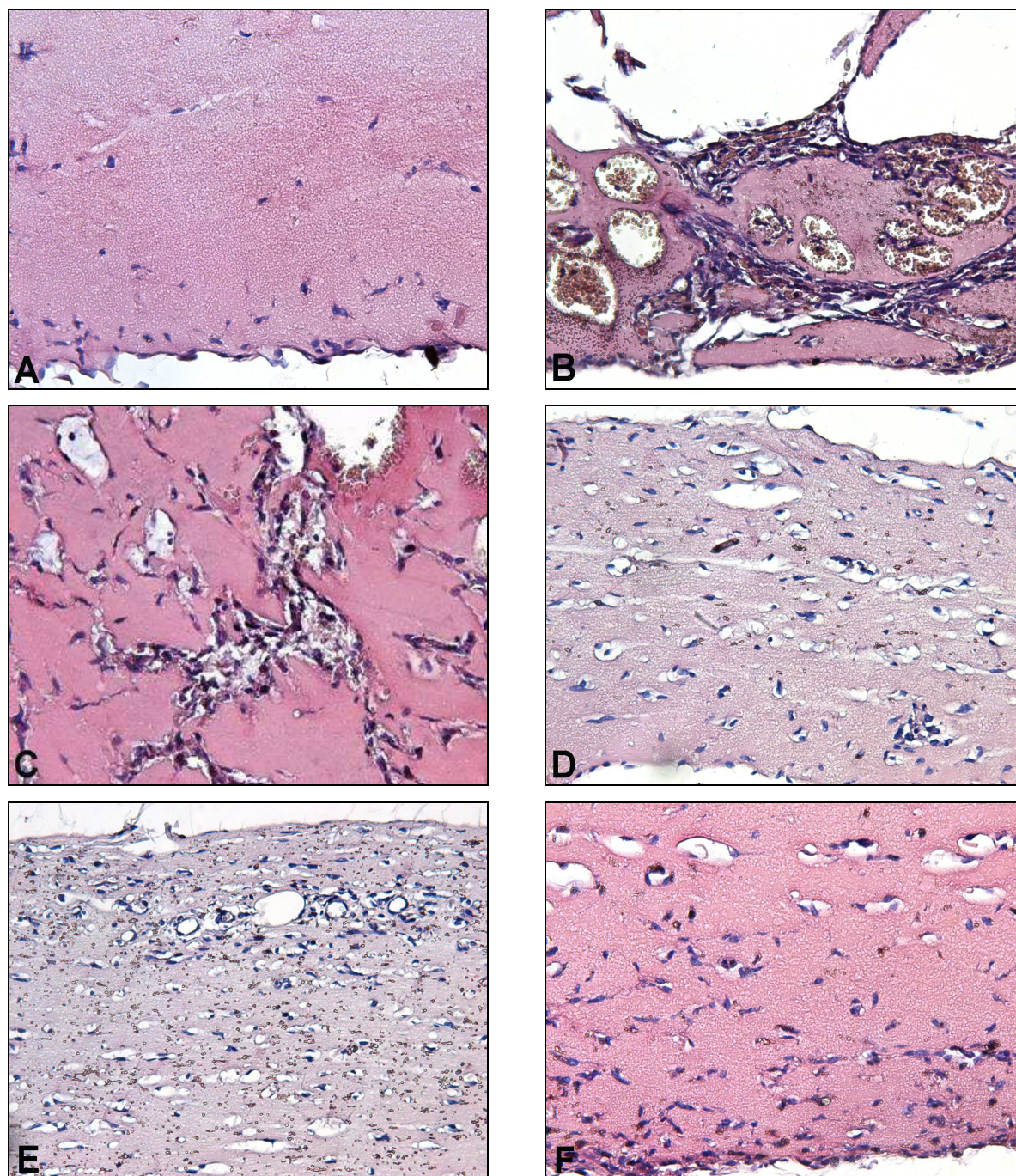


Figura 22. Sezioni istologiche dei *plug* di Matrigel dopo espanto, colorate con ematossilina ed eosina: solo Matrigel (A), Matrigel addizionato di: 200 ng/mL FGF-2 (B), FGF-2 e 0,01 μ M PD153035 (C), FGF-2 e 0,01 μ M 5-Ph (D), FGF-2 e 0,01 μ M 6-Ph (E), FGF-2 e 0,01 μ M 7-Ph (F). Ingrandimento x200.

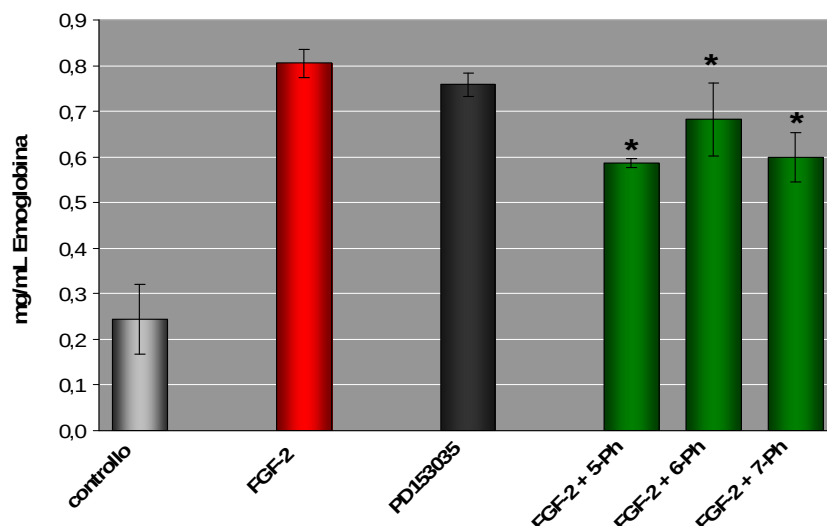


Figura 23. Determinazione della concentrazione di emoglobina presente nei *plug* di Matrigel contenenti 200 ng/mL di FGF-2 e in presenza o meno dei derivati in analisi in concentrazione di 1 μ M. I *plug* sono stati rimossi a 7 giorni dall'impianto ed è stata determinata la concentrazione di emoglobina attraverso un saggio colorimetrico con l'impiego del kit *Drankin's Reagent*.

I risultati, media di 3 esperimenti, sono stati espressi come media $\pm$ deviazione standard.

* = $p < 0.05$ vs FGF-2; t test di Student.

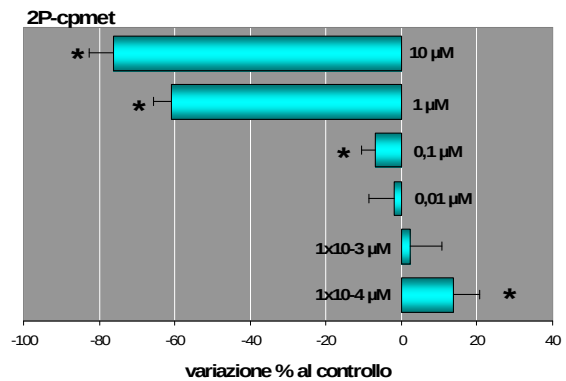
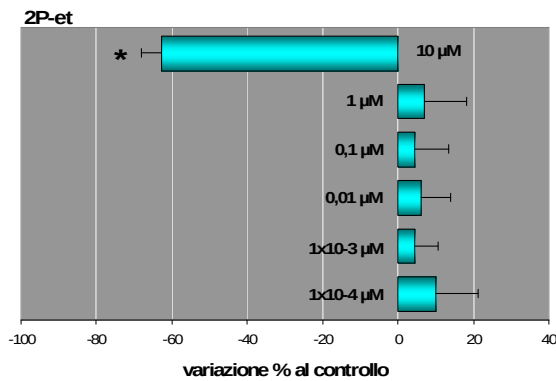
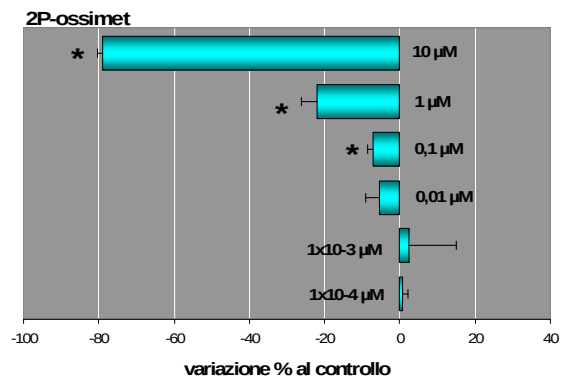
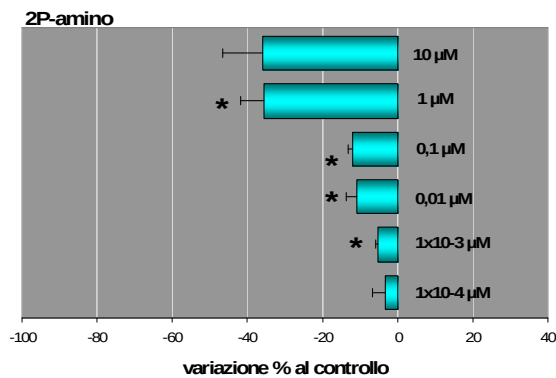
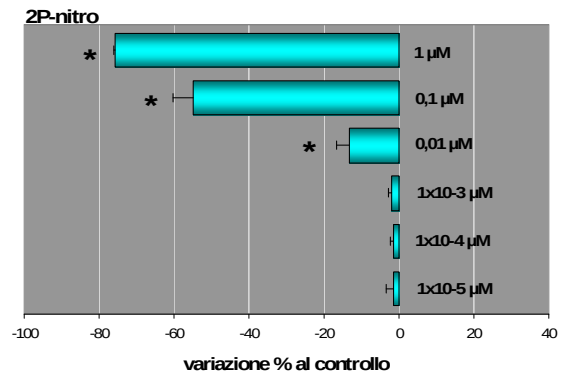
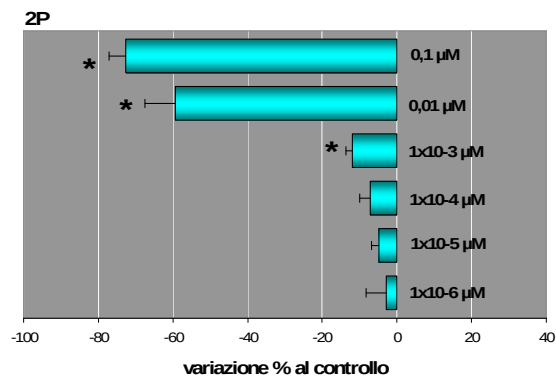
2. DERIVATI FENIL-PIRROLOCHINOLINONICI

Effetti sulla proliferazione cellulare

In Figura 24 sono riportate le curve dose-risposte ottenute in seguito a trattamento per 72 h delle HUVEC con diverse concentrazioni dei derivati fenil-pirrolochinolinonici. In Tabella 4 sono riportati i valori di IC_{50} relativi, da cui si può evidenziare che:

- i composti 7P-met e 7P-et, a geometria [3,2-*f*] con l'introduzione in posizione 3 di un gruppo metilico o etilico, esercitavano un'attività antiproliferativa maggiore della vinblastina, con valori di IC_{50} circa 100 volte inferiori a quelli calcolati per il composto di riferimento;
- i composti con struttura base [2,3-*h*] e [3,2-*f*], privi di sostituenti, presentavano un'attività paragonabile a quella osservata per la vinblastina; al contrario, i derivati 2P-ossimet, 2P-et, 2P-cpmet e 2P-estere erano molto meno attivi;
- il derivato 2P-nitro presentava un valore di IC_{50} di circa 9 volte superiore a quello calcolato per il composto antitumorale di riferimento;
- i composti 2P-amino e 2P-met non mostravano, alle massime dosi utilizzate, un effetto sulla crescita cellulare tale da consentire il calcolo dell' IC_{50} .

Sulla base dei risultati ottenuti, la sperimentazione successiva è stata limitata ai derivati dotati di maggiore attività antiproliferativa, per i quali era stato possibile calcolare la IC₅₀.



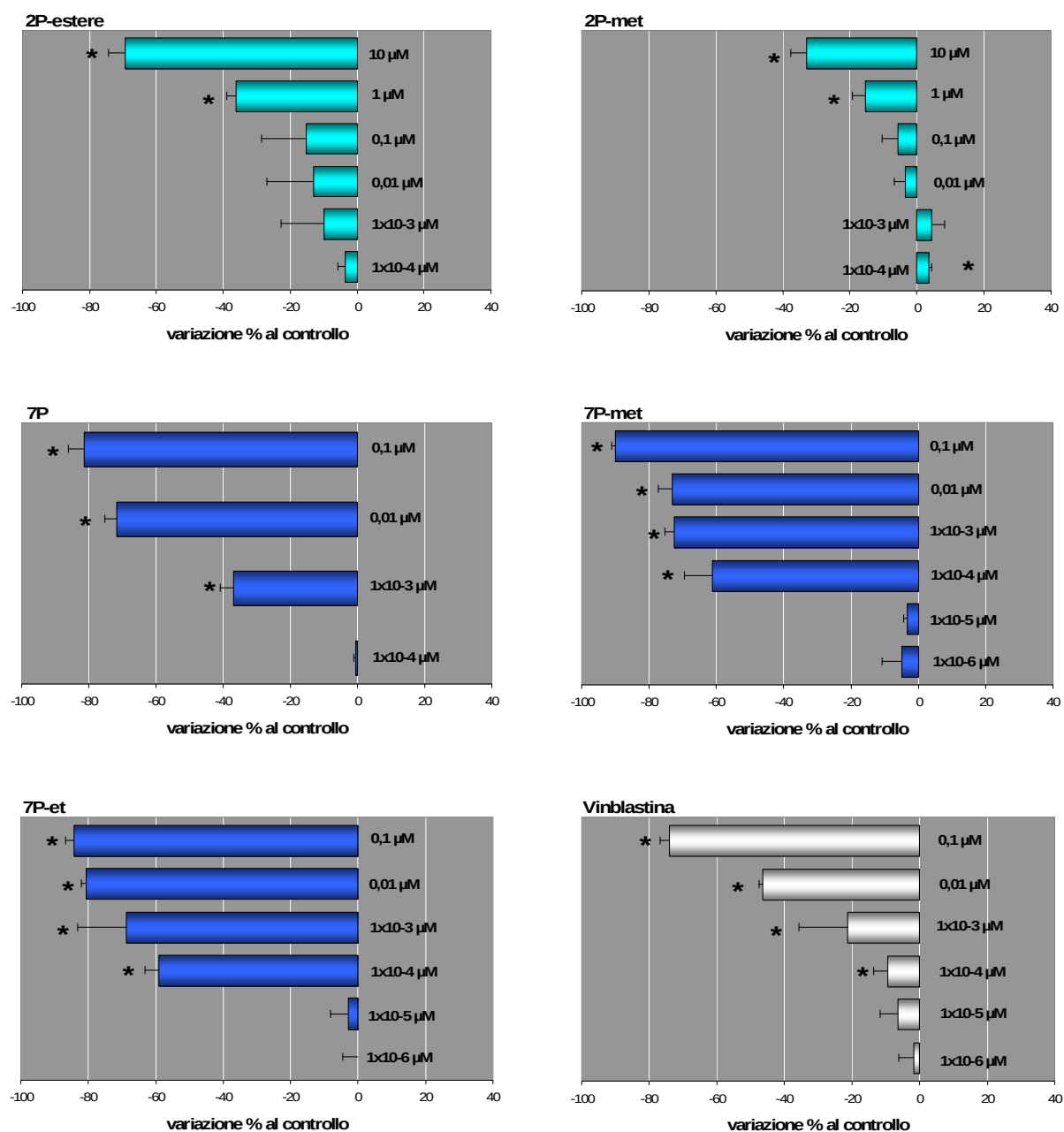


Figura 24. Effetti dei derivati fenil-pirrolochinolinonici sulla proliferazione delle HUVEC. La proliferazione cellulare è stata determinata con MTT dopo 72 h di incubazione con i composti in esame.

I risultati, media di 3 esperimenti ed espressi come variazione percentuale dalle colture di controllo non trattate (considerate come 0), sono riportati come media $\pm$ deviazione standard.

* = $p < 0.05$ vs controllo (colture non trattate), t test di Student.

Composti	IC ₅₀ (μM)
Vinblastina	$4,89 \times 10^{-2} \pm 0,33 \times 10^{-2}$
2P	$4,32 \times 10^{-2} \pm 0,61 \times 10^{-2}$
2P-nitro	$0,45 \pm 0,05$
2P-amino	> 10
2P-ossimet	$5,79 \pm 0,91$
2P-et	$8,12 \pm 1,14$
2P-cpmet	$4,23 \pm 0,72$
2P-estere	$5,74 \pm 0,83$
2P-met	> 10
7P	$3,24 \times 10^{-2} \pm 0,24 \times 10^{-2}$
7P-met	$4,28 \times 10^{-4} \pm 0,19 \times 10^{-4}$
7P-et	$4,55 \times 10^{-4} \pm 0,35 \times 10^{-4}$

Tabella 4. Valori di IC₅₀ determinati in seguito a trattamento per 72 h delle HUVEC con i derivati fenil-pirrolochinolinonici.

Per valutare la presenza di effetti proapoptotici in seguito all'esposizione delle HUVEC ai composti in esame, è stato utilizzato il saggio TUNEL, che mette in evidenza la frammentazione del DNA, evento caratteristico del processo apoptotico (Figura 25). In questo caso, come illustrato in Figura 26, tutti i derivati fenil-pirrolochinolinonici, a concentrazioni pari alla loro IC₅₀ e analogamente alla vinblastina, inducevano un aumento significativo del tasso di apoptosi rispetto alle colture di controllo, eccezion fatta per i composti 2P-et e 2P-estere.

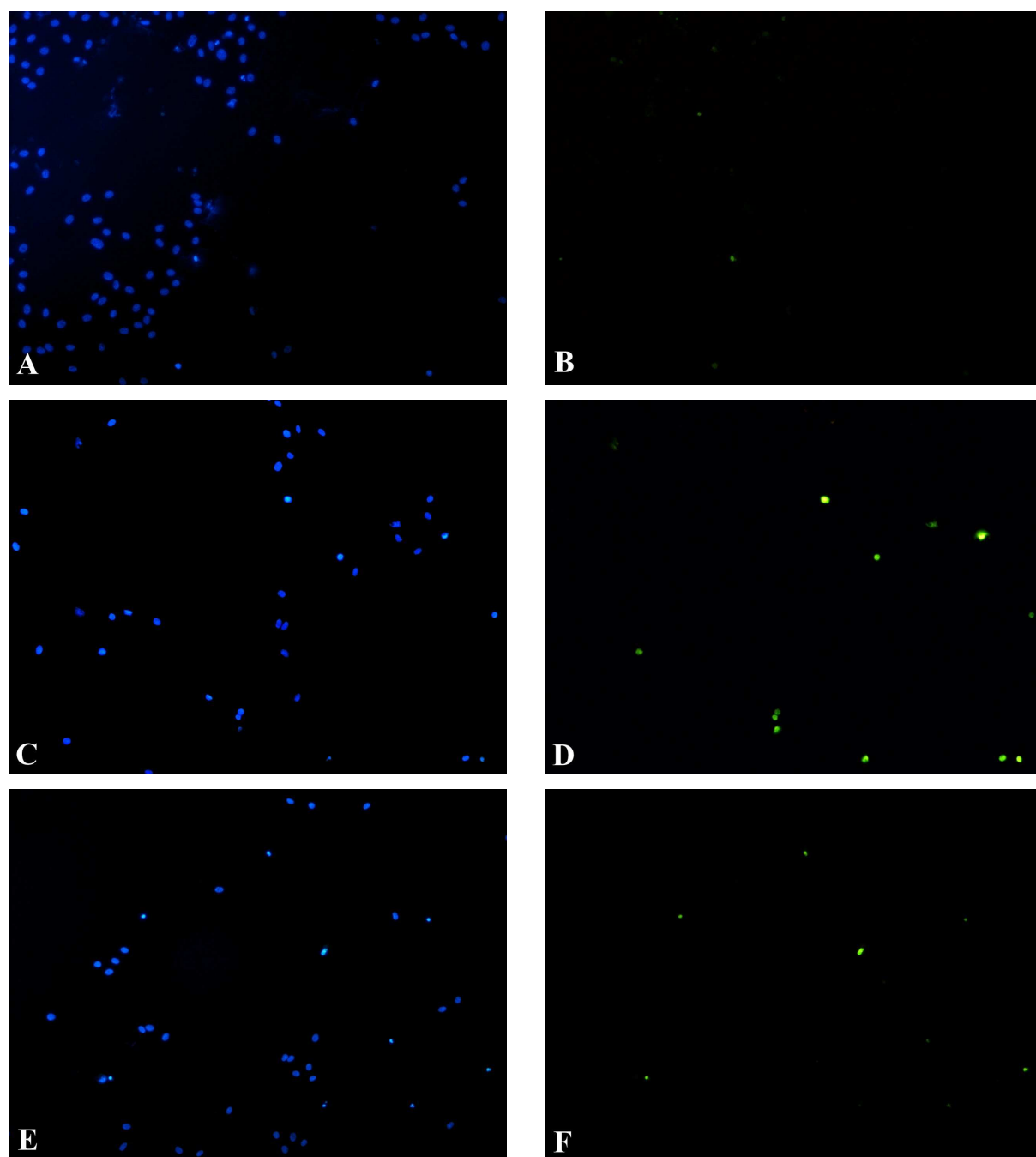


Figura 25. HUVEC DAPI-positive (nuclei colorati in blu) e HUVEC TUNEL-positive (nuclei colorati in verde): A) e B) Controllo; C) e D) Cellule trattate con vinblastina; E) e F) Cellule trattate con 2P-nitro.
Ingrandimento x40.

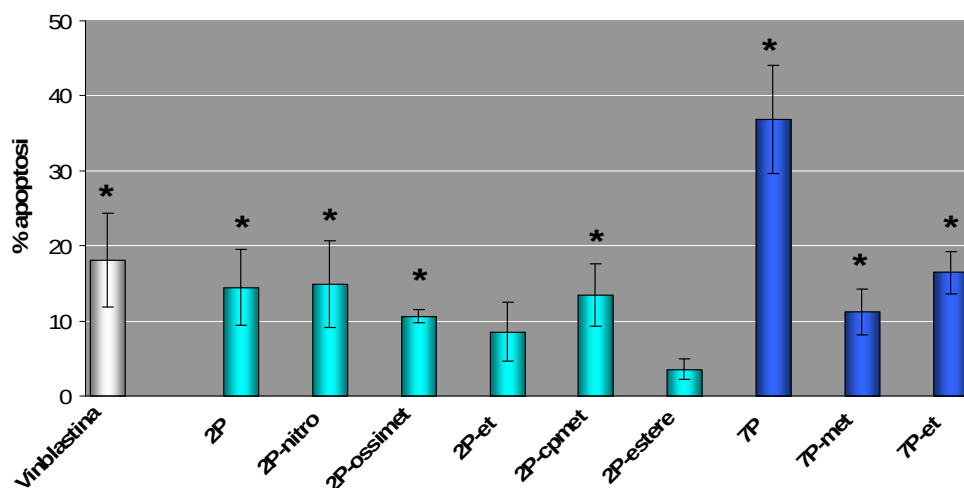


Figura 26. Percentuale di apoptosi di HUVEC trattate per 24 ore con i composti fenil-pirrolochinolinonici utilizzati a concentrazioni pari alla IC_{50} . I risultati, media di almeno 3 esperimenti, sono stati espressi come media $\pm$ deviazione standard.

* = $p < 0.05$ vs controllo t test di Student.

Effetti sulla migrazione cellulare

La sperimentazione è stata condotta in modo analogo a quanto sopra descritto per i derivati 4-aminochinazolinici. I composti fenil-pirrolochinolinonici sono stati utilizzati a concentrazioni non citotossiche, ricavate dai risultati del saggio dell'MTT effettuato in seguito ad esposizione per 4 h (dati non mostrati). Come evidenziato in Figura 27, tutti i composti inibivano la migrazione delle cellule endoteliali, analogamente a quanto determinato per la vinblastina, eccezion fatta per i derivati 2P-nitro e 7P-met.

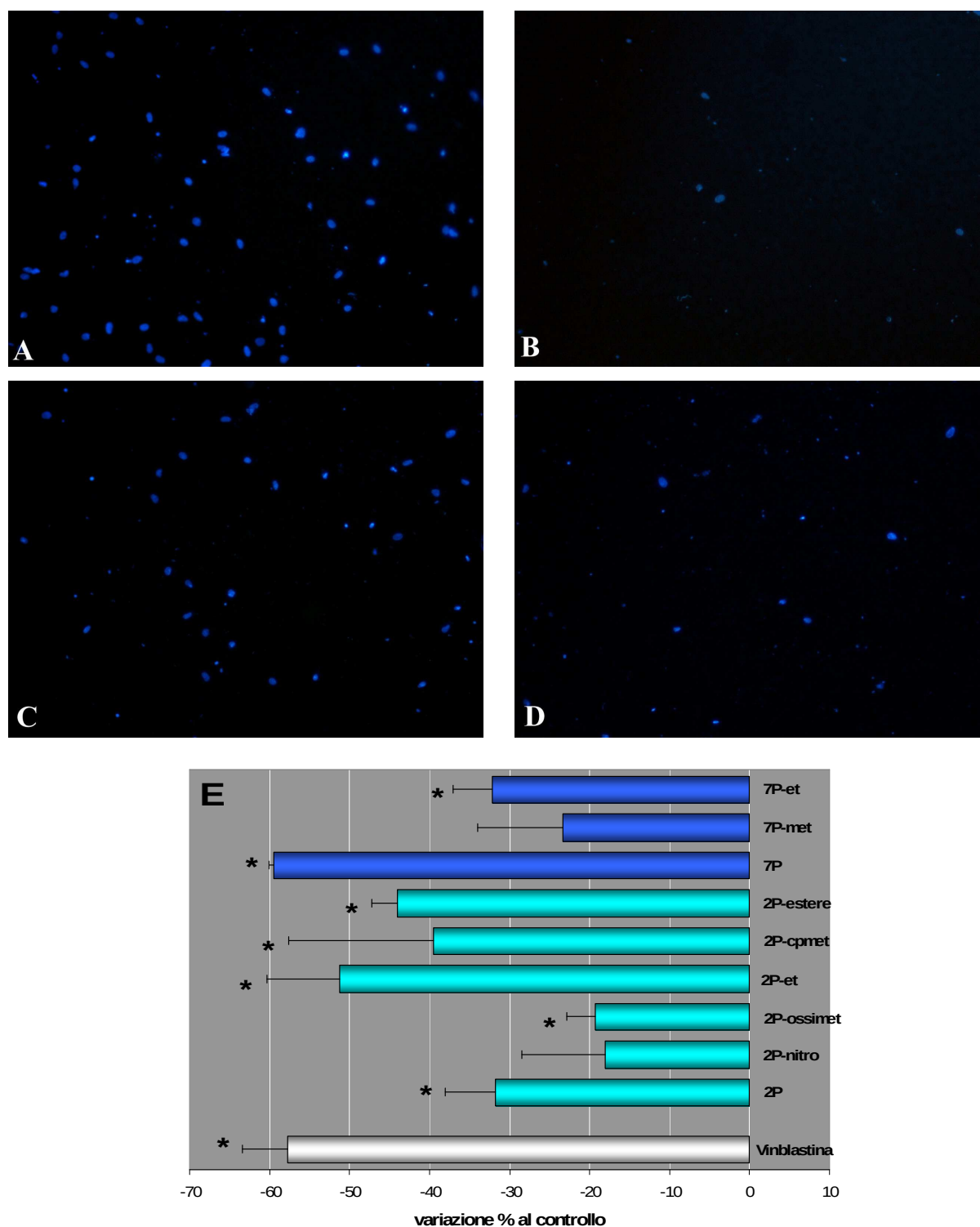


Figura 27. HUVEC migrate attraverso un setto poroso avente pori dal diametro di 5 μm dopo 4 h di incubazione con solo terreno completo (A), con terreno addizionato di vinblastina (B), di 2P (C) e 7P (D). L'insert è stato trattato con un montante acquoso contenente DAPI. Utilizzando un microscopio a fluorescenza, sono stati fotografati cinque campi per ogni filtro seguendo uno schema a croce (ingrandimento x100). (E) Effetti sulla migrazione cellulare.

I risultati, media di 3 esperimenti ed espressi come variazione percentuale dalle colture di controllo non trattate (considerate come 0), sono riportati come media $\pm$ deviazione standard.

* = $p < 0.05$ vs controllo (colture non trattate), t test di Student.

Morfogenesi su Matrigel

Da un punto di vista quantitativo, la vinblastina (Figura 28 e 29), utilizzata a concentrazione non citotossica, induceva una diminuzione significativa dei parametri sia topologici che dimensionali. Analoghi risultati si ottenevano in seguito a trattamento con i composti 2P, 2P-et, 2P-cpmet, 2P-estere e 7P-et. Il trattamento con 7P-met provocava una diminuzione di tutti i parametri, eccezion fatta per il numero di maglie chiuse. I composti 2P-nitro, 2P-ossimet e 7P erano quasi inefficaci, diminuendo un solo parametro.

In Figura 28 sono riportati alcuni esempi di immagini relative alle colture in seguito ai vari tipi di trattamento.

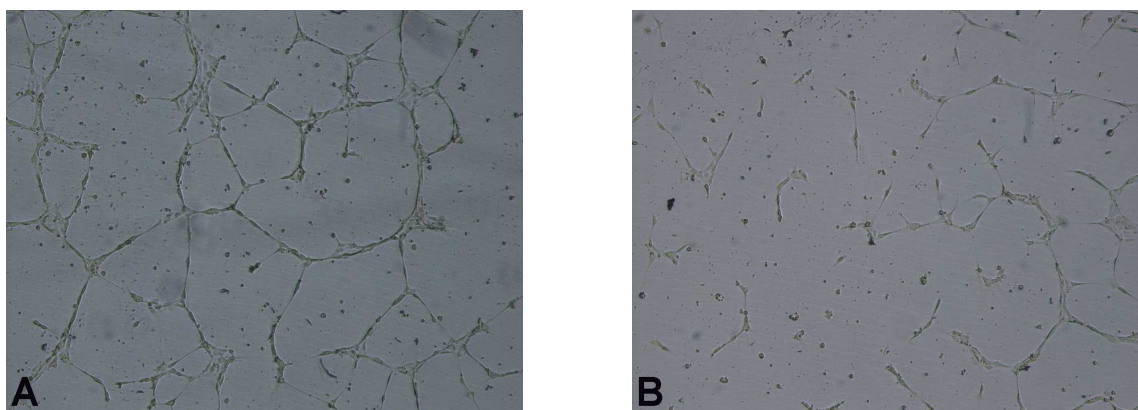


Figura 28. HUVEC coltivate su Matrigel non trattate (A) e trattate per 18 h con vinblastina (B). Le colture sono state fissate e per ciascuna di esse sono state acquisite 5 immagini ad un ingrandimento di 50x, seguendo uno schema a croce.

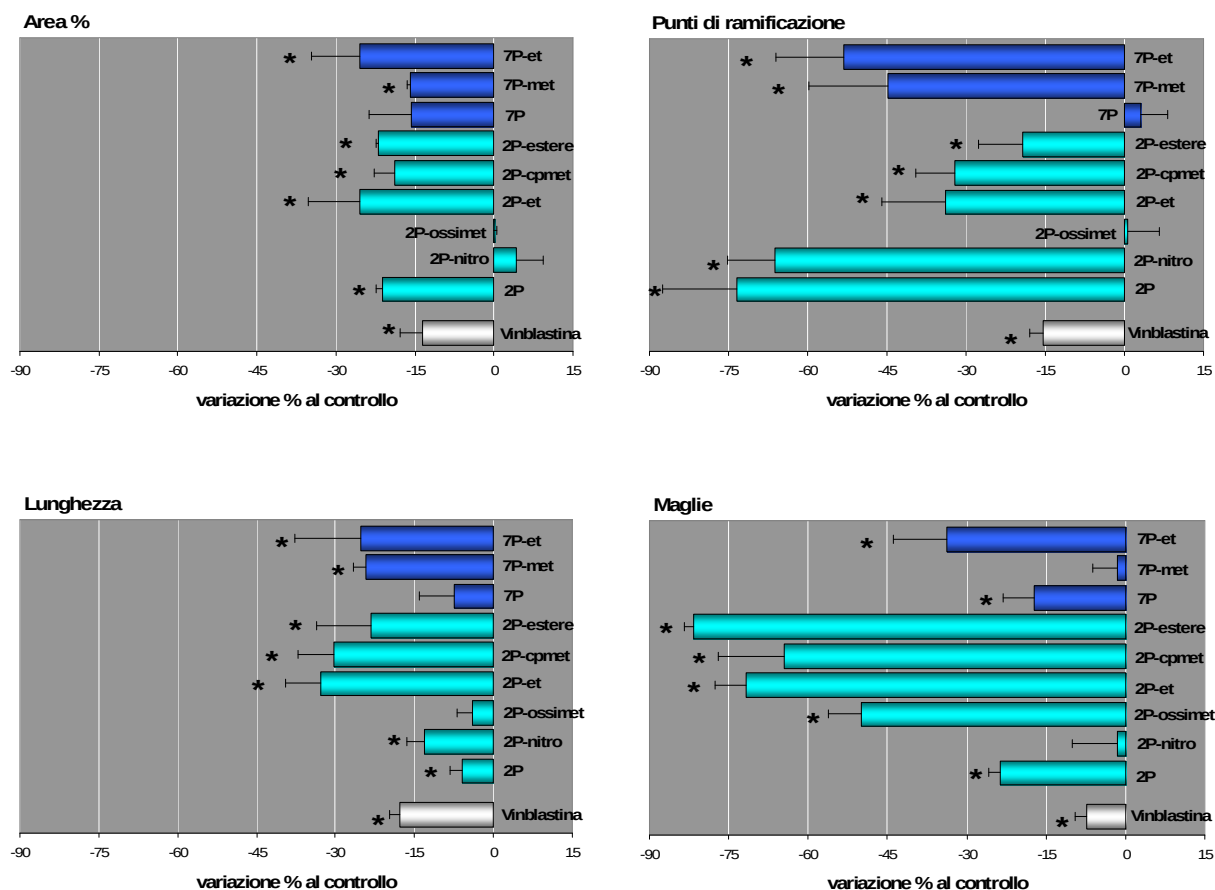


Figura 29. Morfogenesi su Matrigel di HUVEC trattate per 18 h con i composti fenil-pirrolochinolinonici a concentrazione non citotossica: 2P-ossimet, 2P-et, 2P-estere e 2P-cpmet 0,01 μ M; 2P-nitro 1×10^{-3} μ M; derivati 2P e 7P 1×10^{-4} μ M; 7P-met, 7P-et e vinblastina 1×10^{-5} μ M.

I risultati, media di 3 esperimenti, sono stati espressi come media $\pm$ deviazione standard.

* = $p < 0.05$ vs controllo, t test di Student.

Effetti sulla proliferazione cellulare indotta da FGF-2 esogeno

Il trattamento per 24 ore delle colture con FGF-2 in concentrazione pari a 50 ng/ml induceva un aumento significativo della vitalità cellulare rispetto alle colture di controllo (Figura 30). Tutti i derivati fenil-pirrolochinolinonici hanno antagonizzato, a concentrazioni non citotossiche, l'effetto proliferogeno di FGF-2. In particolare, i composti 2P, 2P-et, 7P-met e 7P-et hanno indotto un effetto confrontabile a quello ottenuto con la vinblastina.

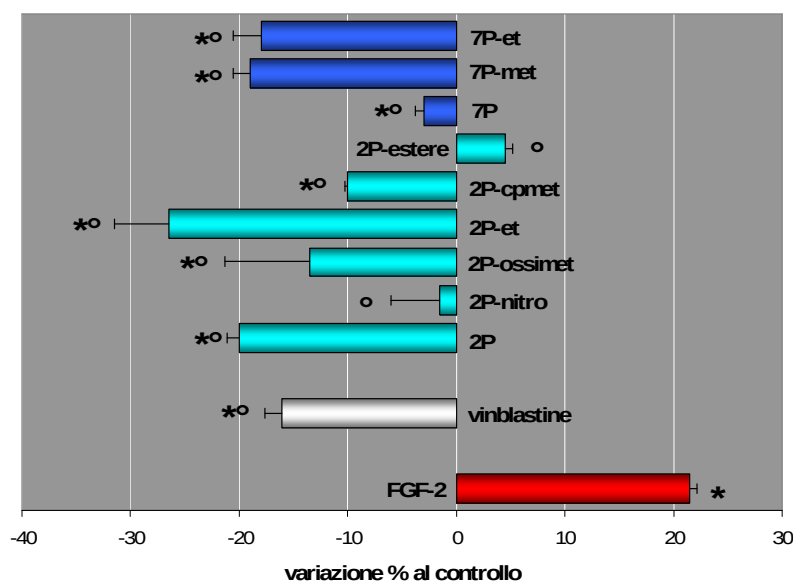


Figura 30. Vitalità di HUVEC trattate per 24 ore con 50 ng/ml di FGF-2 da solo o in presenza dei derivati fenil-pirrolochinolinonici e vinblastina utilizzati a concentrazione non citotossica: 2P-ossimet, 2P-et, 2P-estere e 2P-cpmet 0,01 μ M; 2P-nitro 1×10^{-3} μ M; derivati 2P e 7P 1×10^{-4} μ M; 7P-met, 7P-et e vinblastina 1×10^{-5} μ M.

I risultati, media di 3 esperimenti, sono stati espressi come media $\pm$ deviazione standard.

° = $p < 0.05$ vs FGF-2; * = $p < 0.05$ vs controllo, t test di Student.

Effetti sulla morfogenesi indotta da FGF-2 esogeno

In Figura 31 sono riportate due immagini esemplificative della stimolazione della formazione di strutture simil-capillari da parte della citochina. Dall'analisi dei parametri topologici e morfologici, i composti 2P-nitro, 2P-estere e 7P antagonizzavano l'aumento della morfogenesi indotto da FGF-2, in misura maggiore o paragonabile a quanto osservato dopo trattamento con vinblastina (Figura 32). Al contrario, i derivati 2P-ossimet, 2P-et, 2p-cpmet e 7P-met si sono rivelati inefficaci o poco attivi, modificando solo alcuni parametri. Una diminuzione significativa di 3 parametri è stata osservata in seguito a trattamento con i composti 2P e 7P-et.

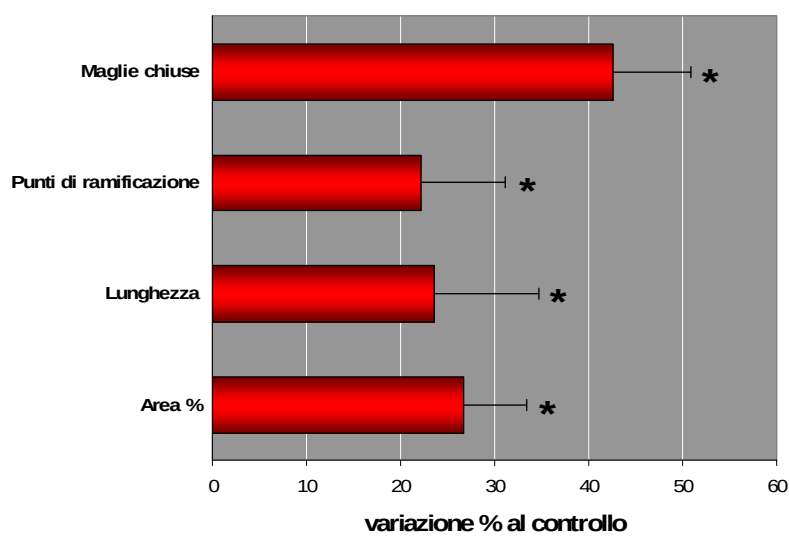
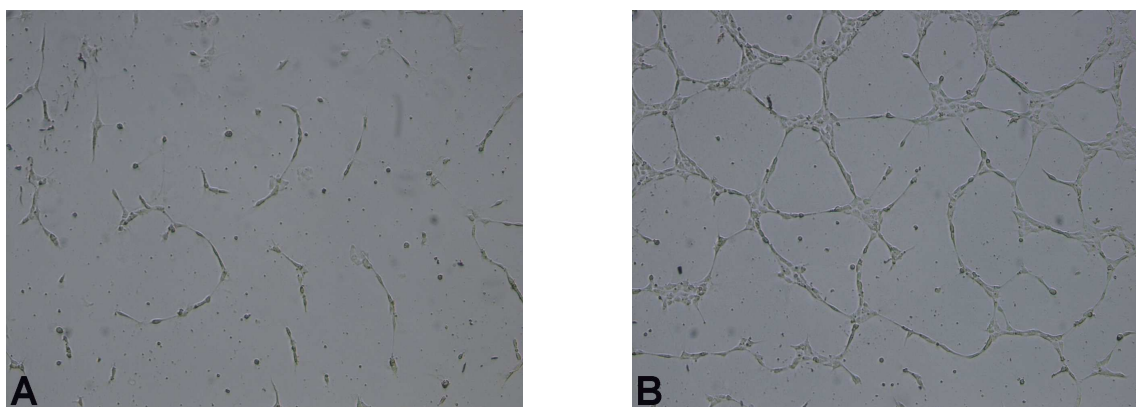


Figura 31. HUVEC coltivate su Matrigel non trattate (A) e trattate (B) per 18 h con 50 ng/mL di FGF-2. (C) Morfogenesi su Matrigel di HUVEC trattate per 18 h con 50 ng/mL di FGF-2. I risultati, media di 3 esperimenti, sono stati espressi come media $\pm$ deviazione standard.

* = $p < 0.05$ vs controllo t test di Student.

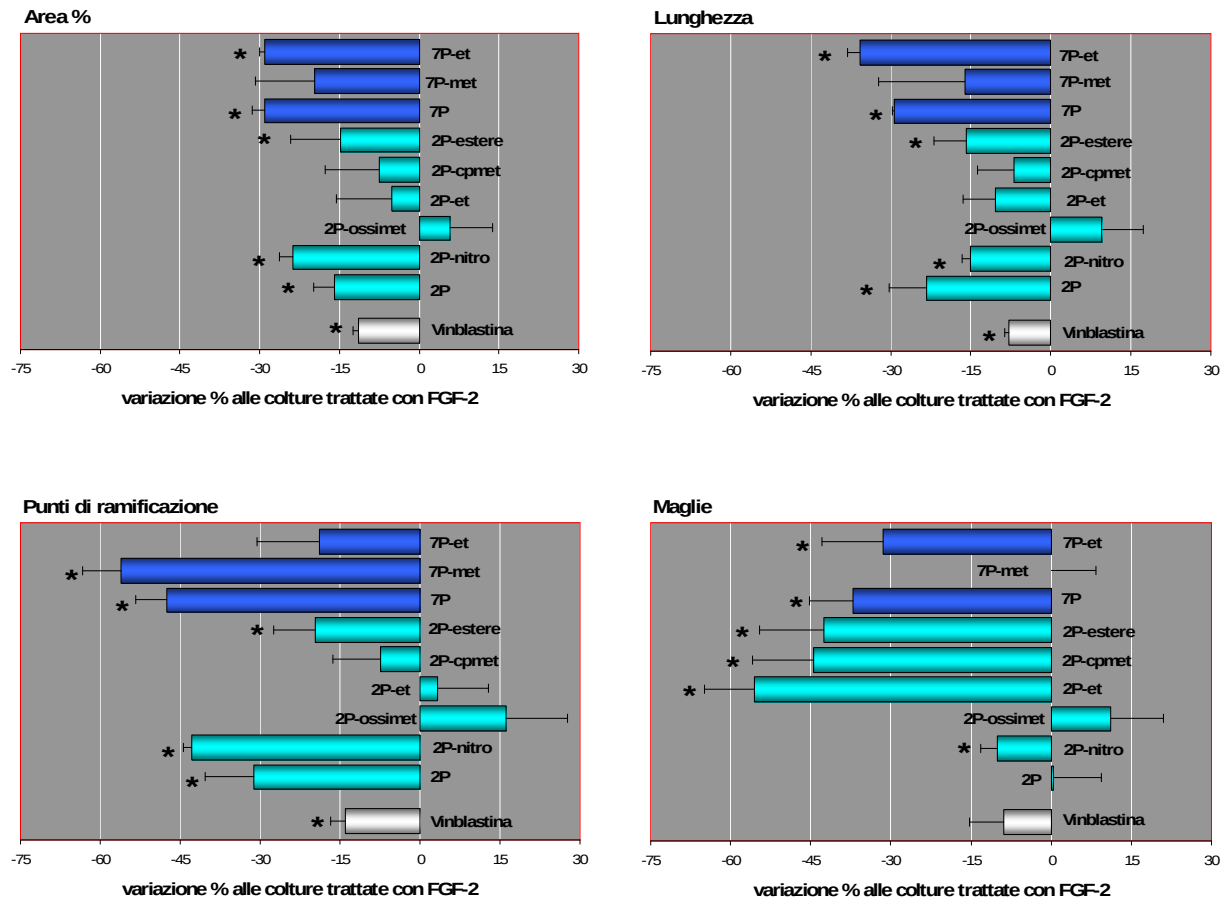


Figura 32. Morfogenesi su Matrigel di HUVEC trattate per 18 ore con 50 ng/ml di FGF-2 in associazione con i composti fenil-pirrolochinolinonici e vinblastina utilizzati a concentrazioni non citotossiche: 2P-ossimet, 2P-et, 2P-estere e 2P-cpmet 0,01 μ M; 2P-nitro 1×10^{-3} μ M; derivati 2P e 7P 1×10^{-4} μ M; 7P-met, 7P-et e vinblastina 1×10^{-5} μ M.

I risultati, media di almeno 3 esperimenti, sono stati espressi come media $\pm$ deviazione standard.

* = $p < 0.05$ vs FGF-2, t test di Student.

Valutazione *in vivo* dell'attività antiangiogenica

Tutti i derivati fenil-pirrolochinolinonici hanno antagonizzato l'effetto proangiogenico di FGF-2. In particolare, i composti 2P, 2P-nitro e 2P-cpmet si sono rivelati più efficaci della vinblastina, in quanto hanno riportato il contenuto di emoglobina a valori paragonabili a quelli determinati nei *plug* di controllo (Figura 33).

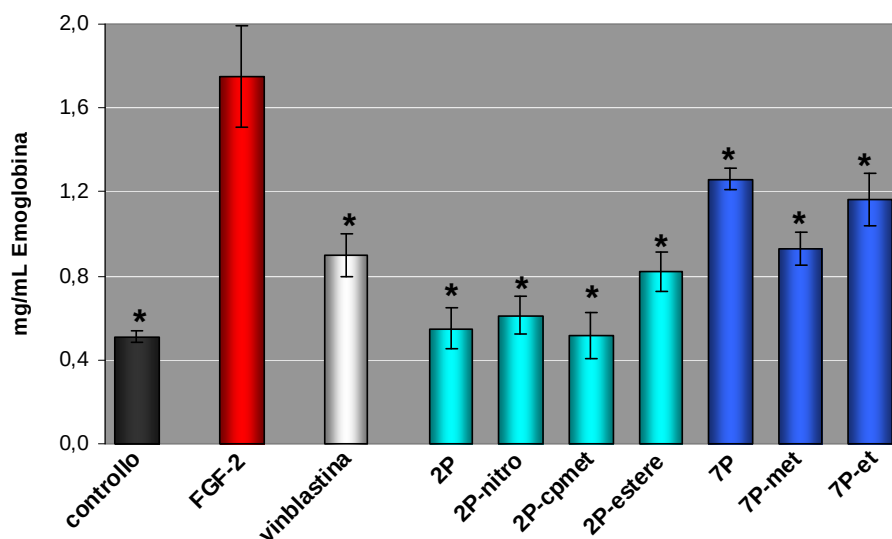


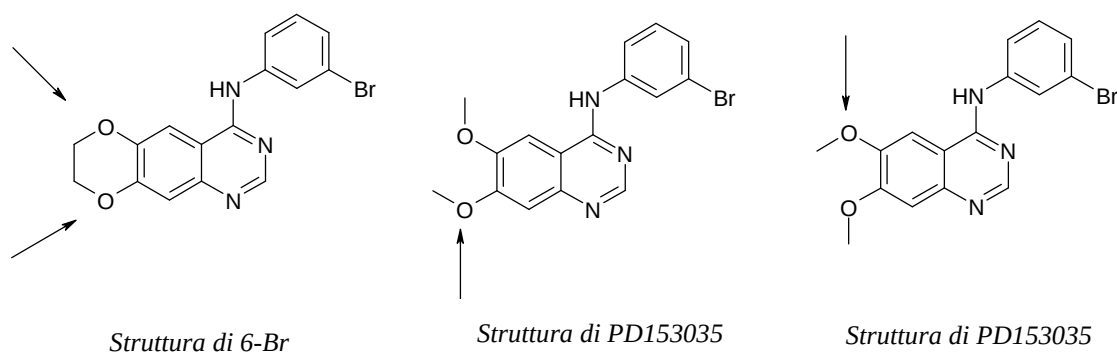
Figura 33. Determinazione della concentrazione di emoglobina presente nei *plug* di Matrigel contenenti 200 ng/mL di FGF-2 e in presenza o meno dei derivati fenil-pirrolochinolinonici in concentrazione di 0,01 μ M. I *plug* sono stati rimossi a 7 giorni dall'impianto ed è stata determinata la concentrazione di emoglobina attraverso un saggio colorimetrico con l'impiego del kit *Drankin's Reagent*. I risultati, media di 3 esperimenti, sono stati espressi come media $\pm$ deviazione standard.

* = $p < 0.05$ vs FGF-2 t test di Student.

DISCUSSIONE

1. DERIVATI 4-AMINOCINAZOLINICI

In questo lavoro è stata valutata l'attività citotossica e antiangiogenica di alcuni derivati 4-aminocinazolinici, progettati modificando la struttura di PD153035 a livello i) della regione coinvolta nell'interazione con il sito di legame per l'ATP presente in EGFR, tramite fusione dei gruppi metossilici in posizione 6 e 7 con formazione di eterocicli a 5, 6 o 7 atomi, e ii) dell'anello dell'anilina che interagisce con una tasca idrofobica dell'EGFR, tramite sostituzione dell'atomo di bromo con gruppi funzionali caratterizzati da diversa lipofilia e ingombro sterico. Dai risultati ottenuti dai saggi di citotossicità su cellule A431, sovraesprimenti EGFR, è emerso che la presenza del gruppo etilendiossi porta ad un aumento dell'attività antiproliferativa: infatti i valori di IC_{50} relativi ai derivati con ciclo a 6 atomi erano inferiori, eccezion fatta per i composti alogenati, a quelli del composto di riferimento PD153035. La maggior attività può essere ascrivibile alla possibile formazione di due legami ad idrogeno tra gli ossigeni in posizione 6 e 7 e il sito catalitico del recettore. La ciclizzazione, infatti, renderebbe rigida la struttura e costringerebbe l'anello eterociclico all'interno del sito. Al contrario, i 2 gruppi metossilici di PD153035 sono dotati di una maggiore libertà di rotazione e, probabilmente, solo uno di essi si trova all'interno della molecola proteica, favorendo quindi un'interazione più debole, dovuta alla formazione di un unico legame ad idrogeno. Nei cicli a 5 e 7 atomi, invece, la conformazione relativa potrebbe essere tale da non rendere possibile la formazione di nessun legame ad idrogeno, come conseguenza di non adeguate distanze tra gli atomi coinvolti nel legame.



Le frecce indicano i punti dove possono formarsi i ponti ad idrogeno. Per la struttura della tasca recettoriale, se un metile non sta verso l'interno copre la possibilità di accesso all'ossigeno corrispondente.

I risultati ottenuti hanno inoltre suggerito che i sostituenti all'anello dell'anilina possono modulare l'attività antiproliferativa. In particolare, l'aumento del carattere lipofilo della struttura si traduce in una maggiore efficacia rispetto a PD153035, con valori di IC_{50} da 5 a 200 volte più bassi. È stato già dimostrato che i TKI interagiscono con il recettore, non solo a livello del suo sito catalitico, ma si inseriscono anche in un'adiacente tasca lipofila (Roskoski, 2004). Quindi l'inserimento di gruppi ad elevato ingombro sterico (gruppi fenilici) o comunque caratterizzati da elevata lipofilia (gruppo trifluorometilici), aumentano l'affinità nei confronti della proteina e potenziano l'attività citotossica.

Tutti i derivati 4-aminochinazolinici esercitavano un effetto pro-apoptotico analogamente a PD153035 e Vandetanib. E' stato già dimostrato in linee cellulari tumorali che PD153035, in seguito all'interazione con EGFR, attiva vie di segnale che si traducono in una diminuzione dell'espressione di molti geni antiapoptotici: SFRP1, BIRC5 e BAG1 (Woodworth *et al.*, 2005). Il derivato 6-Ph, caratterizzato da un elevato carattere lipofilo, si è rivelato il più efficace, con un valore di IC_{50} circa 200 volte inferiore a quello di PD153035. Un'ulteriore conferma della maggiore affinità di quest'ultimo derivato nei confronti del recettore si ha dalle seguenti evidenze sperimentali:

- L'effetto antiproliferativo indotto dal composto 6-Ph è stato mantenuto anche in seguito a rimozione della sostanza dal mezzo di coltura; questo garantisce al composto un'azione prolungata nel tempo, a differenza di quasi tutti gli altri derivati, per i quali l'effetto antiproliferativo era reversibile. Tali derivati, quindi, analogamente a PD153035 (Bos *et al.*, 1997), sono citostatici e le cellule riacquistano la loro capacità di crescita e la sensibilità al ligando dopo rimozione del composto. Questo suggerisce che sia richiesta una continua esposizione all'inibitore per raggiungere un'efficacia clinica.

- Il composto 6-Ph, analogamente a PD153035, è stato in grado di contrastare la crescita cellulare indotta da EGF esogeno. Questo effetto è stato evidenziato non solo quando il composto è stato aggiunto alle colture contemporaneamente alla citochina, ma anche quando le cellule venivano esposte a EGF in seguito ad un pre-trattamento con il composto.
- Inoltre, il composto 6-Ph è particolarmente attivo nell'inibire il rilascio di VEGF da parte delle cellule A431. Questi ultimi risultati assumono particolare importanza in quanto nel microambiente tumorale sono presenti alti livelli di EGF e VEGF, che vengono prodotti dalle cellule tumorali stesse e sono fondamentali per la progressione della patologia.

L'introduzione di 2 atomi di alogeno nell'anello dell'anilina è stata effettuata in analogia alle strutture di Vandetanib, inibitore duale di EGFR e VEGFR. I saggi di citotossicità su cellule A431 hanno evidenziato che il composto 6-F,Br presentava valori di IC_{50} paragonabili a quelli di Vandetanib.

Per la maggior parte dei derivati, compreso PD153035, anche se è stata evidenziata una diminuzione dell'attività antiproliferativa in cellule NIH3T3, non esprimenti EGFR, veniva comunque mantenuta una certa attività citotossica, suggerendo quindi una possibile interazione con altri recettori tirosin-chinasici. In particolare, i composti 6-F,Br, 5-Ph e 7-Ph non sembrano esercitare un'azione preferenziale su EGFR, in quanto i valori di IC_{50} erano paragonabili a quelli calcolati in A431. La mancata o parziale selettività nei confronti di EGFR può avere risvolti sia negativi che positivi. L'azione su altri recettori tirosin-chinasici, espressi anche dalle cellule sane, potrebbe portare ad effetti collaterali indesiderati; tuttavia l'interazione con altri recettori, quali VEGFR, sovra-espressi dalle cellule tumorali, potrebbe potenziare l'attività antitumorale di tali composti, grazie ad un'inibizione dell'angiogenesi.

Sulla base dei risultati ottenuti, la valutazione *in vitro* e *in vivo* dell'attività antiangiogenica è stata limitata ai derivati fenilici e trifluorometilici e a quelli con F e Br, progettati, rispettivamente, in analogia alla struttura di PD153035 e Vandetanib.

I risultati ottenuti sulle HUVEC, che esprimono EGFR (Soares *et al.*, 2003), dimostrano chiaramente che la maggior parte dei composti presentano, seppure in grado diverso, un'attività antiangiogenica influenzando le varie fasi del processo che porta alla formazione di nuovi vasi. Ad alte concentrazioni, infatti, esercitano, nei confronti delle cellule endoteliali, un effetto antiproliferativo, mentre, a concentrazioni non citotossiche, inibiscono la migrazione cellulare e la formazione di strutture tubolari. Analogamente a PD153035, l'effetto antiproliferativo dei derivati 4-aminochinazolinici sembra dovuto ad una induzione dell'apoptosi, come dimostrato

dai risultati ottenuti nel saggio di determinazione della frammentazione del DNA in mono e oligonucleosomi.

Tra i composti studiati, quelli caratterizzati da un gruppo fenilico in posizione 3' si sono rivelati i più efficaci. Questa maggiore attività conferma l'ipotesi, precedentemente espressa, che i sostituenti all'anello dell'anilina possono modulare l'affinità nei confronti di EGFR. Un'ulteriore conferma della maggiore affinità dei derivati fenilici nei confronti del recettore deriva dal mantenimento totale o parziale dell'effetto antiproliferativo anche in seguito a rimozione dei composti dal mezzo di coltura. Questo garantisce anche un'azione prolungata nel tempo, a differenza di PD153035 e di tutti gli altri derivati, per i quali l'effetto antiproliferativo era reversibile. Inoltre, all'interno del gruppo dei derivati fenilici, il composto 6-Ph, in cui i metossili erano stati fusi per formare un anello a 6 atomi, appariva maggiormente attivo dei suoi analoghi metilen e propilendiossi nell'inibire sia la crescita cellulare, sia la morfogenesi su Matrigel. Questi risultati concordano con quelli ottenuti nella linea cellulare tumorale A431 sovraesprimente EGFR.

In linea con i rapporti struttura-attività sopra esposti e in accordo con precedenti evidenze sperimentali, i composti con il gruppo trifluorometilico in posizione 3' presentavano un'attività antiproliferativa minore del composto di riferimento, mentre erano paragonabili a PD153035 per gli effetti sulla morfogenesi e sulla migrazione cellulare. Anche in questo gruppo, il composto 6-CF₃, con anello a 6 atomi, appariva più efficace dei suoi analoghi metilen e propilendiossi.

Per aumentare gli effetti antiangiogenici, come già ricordato, sono stati introdotti a livello dell'anello dell'anilina, 2 atomi di alogeno, in analogia alla struttura Vandetanib (ZD6474). Nei tumori solidi, i *pathways* di EGFR e VEGF sono collegati, in particolare per quanto riguarda l'angiogenesi. EGF e TGF- α inducono l'espressione di VEGF attraverso l'attivazione di EGFR in modelli di colture cellulari e hanno proprietà proangiogeniche. È probabile che la cascata del segnale derivante da EGFR moduli l'angiogenesi attraverso l'*up-regulation* di VEGF o di altri mediatori chiave nel processo angiogenico (Ellis, 2004). Nei modelli preclinici, il blocco di EGFR da parte di TKI provoca una *down-regulation* dei mediatori proangiogenici, tra cui VEGF, provocando una riduzione nella densità dei microvasi e della metastasi (Tabernero, 2007). Attraverso il blocco di EGFR, può essere possibile sensibilizzare le cellule ad una terapia antiangiogenica, riducendo la loro capacità di sopravvivere: ad esempio le cellule possono incontrare più difficoltà a sopravvivere in assenza di un'adeguata vascolarizzazione e possono essere quindi più sensibili ad una terapia antiangiogenica. Tuttavia, l'inibizione di EGFR non può, da sola, bloccare la produzione di VEGF perché l'espressione di quest'ultimo è

regolata da molti altri fattori. Inoltre, la somministrazione prolungata di inibitori di EGFR può provocare lo sviluppo di resistenze e una maggiore produzione di VEGF e anch'esso può contribuire a rendere le cellule tumorali resistenti agli inibitori. Per tali motivi, sono stati progettati TKI, quali Vandetanib, in grado di inibire sia EGFR che VEGFR. La progressione di forme cancerose resistenti agli inibitori di EGFR può essere inibita da Vandetanib, probabilmente grazie all'effetto inibitorio che questo composto esercita sui segnali derivanti da VEGF (Tabernero, 2007). I derivati 4-aminochinazolinici, progettati in analogia a Vandetanib, inducevano effetti antiproliferativi inferiori a entrambi i composti di riferimento. Rispetto a Vandetanib, esercitavano effetti di inibizione della morfogenesi leggermente superiori, ed erano ad esso paragonabili solamente per quanto riguarda l'attività sulla migrazione cellulare. Anche questi risultati sono in linea con quelli precedentemente ottenuti sulle cellule tumorali e confermano ulteriormente l'importanza di sostituenti non polari per migliorare l'interazione con EGFR e conseguentemente l'attività biologica. In prospettiva, sarà interessante valutare se questi composti effettivamente interagiscano con VEGFR, inibendone la fosforilazione.

Come sopra ricordato, l'attivazione di EGFR induce una sovraespressione di citochine proangiogeniche, quali VEGF and FGF-2, mentre la sua inibizione tramite TKI porta ad una loro sotto-regolazione traducendosi in un blocco della formazione di neovasi all'interno della massa tumorale (Ellis, 2004). I risultati raccolti indicano che l'attività antiangiogenica dei derivati fenilici e del composto 7-F,Br, con ciclo a 7 atomi e alogeni a livello dell'anello dell'anilina, può essere dovuta, almeno in parte, all'inibizione del rilascio di FGF-2. Non è stato possibile verificare un simile effetto nella produzione di VEGF nelle HUVEC, in quanto tali cellule presentano un rilascio basale della citochina talmente basso da non poter apprezzare eventuali variazioni indotte dai composti studiati. Analoga sperimentazione effettuata sulle A431 ha messo in evidenza, invece, che il rilascio di VEGF veniva diminuito da Vandetanib e dal composto 6-Ph. È importante ricordare, tuttavia, che EGFR non rappresenta l'unico bersaglio cellulare dei derivati 4-aminochinazolinici e di PD153035. Infatti, gli studi effettuati sulle linee cellulari sovraesprimenti o non esprimenti tale recettore hanno evidenziato una possibile molteplicità di azione nei confronti di altri recettori tirosin-chinasici, che sono strutturalmente collegati.

È noto che nel microambiente tumorale sono presenti grandi quantità di fattori di crescita proangiogenici, prodotti dalle cellule tumorali stesse, che in tal modo, tramite un meccanismo autocrino-paracrino, sostengono sia la loro proliferazione sia la formazione di una rete microvascolare necessaria per la loro sopravvivenza e successivamente per la loro migrazione. È quindi auspicabile che un agente antitumorale sia in grado di contrastare anche gli effetti di

stimolazione indotti da queste citochine. Negli esperimenti effettuati con VEGF esogeno, solo i derivati fenilici e il composto 5-F,Br erano più efficaci di PD153035 nell'inibire l'aumento nella morfogenesi indotto dalla citochina, mentre Vandetanib era inefficace. Al contrario, tutti i derivati 4-aminochinazolinici, eccezion fatta per il composto 7-F,Br e Vandetanib, erano in grado di annullare l'aumento nella formazione di strutture tubulari su Matrigel indotto da FGF-2 esogeno, con attività superiore o paragonabile a quella del composto di riferimento.

E' importante sottolineare che gli effetti d'inibizione sulla morfogenesi e sulla migrazione cellulare osservati sia in presenza che in assenza di VEGF e FGF-2 sono stati ottenuti utilizzando concentrazioni non citotossiche dei composti. Questo fatto potrebbe assumere particolare importanza in prospettiva di un possibile utilizzo dei derivati 4-aminochinazolinici in campo terapeutico. Infatti, il blocco dell'angiogenesi raggiungibile a dosaggi non citotossici potrebbe garantire un'attività antitumorale, priva degli effetti collaterali collegati a un'azione indiscriminata anche sulle cellule normali.

Infine, la sperimentazione *in vivo* è stata limitata ai derivati fenilici, che si erano dimostrati più attivi degli altri composti nei saggi di angiogenesi effettuati su HUVEC. Sebbene essi abbiano parzialmente diminuito, ma non annullato, l'effetto proangiogenico di FGF-2, si sono rivelati più efficaci del composto di riferimento.

Questo studio ha messo in evidenza che i derivati 4-aminochinazolinici posseggono un'attività antiangiogenica che si manifesta anche a concentrazioni che non inibiscono la proliferazione cellulare. In particolare, i composti con un fenile in posizione 3' dell'anello dell'anilina sono più efficaci del composto di riferimento PD153035, anche in presenza di citochine esogene.

In prospettiva, sarà importante studiare il meccanismo d'azione di tali composti, verificando, per esempio, la loro interazione con altre tirosin-chinasi e la loro effettiva attività antitumorale tramite ulteriori saggi *in vitro* e *in vivo*, utilizzando un ampio pannello di linee cellulari tumorali.

2. DERIVATI FENIL-PIRROLOCHINOLINONICI

Alcuni agenti chemioterapici, già da tempo utilizzati nella terapia anti-tumorale, presentano anche attività antiangiogenica. Tra questi, la vinblastina, farmaco ad azione antimitotica, esercita attività antiangiogenica a bassi dosaggi, che non inducono citotossicità (Distler *et al.*, 2003). E' stato osservato, infatti, che, somministrando vinblastina in seguito a *xenograft* di linee

cellulari di neuroblastoma e utilizzando dosi pari a 1/10-1/20 della dose massima tollerata, si otteneva una regressione significativa dello *xenograft*, una diminuzione della perfusione nel tumore e un'inibizione diretta dell'angiogenesi (Rundhaug, 2005).

In questo lavoro sono stati studiati 2 gruppi di derivati fenil-pirrolochinolinonici dotati di attività antimittotica, in quanto in grado di interagire con i microtubuli a livello del sito di legame per la colchicina (Ferlin *et al.*, 2005). Il primo gruppo era composto da otto molecole con geometria [2,3-*h*] sostituite o meno all'atomo di azoto pirrolico, mentre il secondo gruppo comprendeva 3 composti con geometria [3,2-*f*] con o senza sostituenti all'anello fenilico. Il primo gruppo di sostanze, oltre all'attività antimittotica, inibisce l'enzima aromatasi, il cui coinvolgimento nelle forme tumorali estrogeno-dipendenti è ben noto (Ferlin *et al.*, 2005).

I risultati raccolti hanno evidenziato che alcuni derivati 2-fenilpirrolochinolinonici e tutti i 7-fenilpirrolochinolinoni, seppure con intensità diverse, presentano attività antiangiogenica sia *in vitro* che *in vivo* e, alcuni di essi, hanno un'attività paragonabile a quella della vinblastina, utilizzata come sostanza di riferimento.

Dai saggi di valutazione della vitalità cellulare, è emerso che i due derivati non sostituiti, 2P e 7P, hanno presentato un'attività simile a quella della vinblastina. In particolare, tra i derivati 2-fenilpirrolochinolinonici, tutti i composti sostituiti in posizione 7 a livello dell'anello pirrolico (2P-et, 2P-cpmet, 2P-estere), e quelli con il gruppo metossilico o il nitro gruppo in posizione 2 a livello dell'anello fenilico (2P-ossimet e 2P-nitro) presentavano IC₅₀ nell'ordine delle micromoli. Tuttavia, essi possedevano un'attività inferiore a quella determinata per la vinblastina, in quanto i valori relativi di IC₅₀ erano di circa da 10 a 100 volte superiori a quelli calcolati per la sostanza di riferimento. L'inserimento di un gruppo metilico (2P-met), non polare, nell'anello pirrolico ha ulteriormente diminuito l'attività antiproliferativa. Analogo effetto è stato provocato dall'inserimento di un gruppo amminico, polare ed elettron-donatore, nell'anello fenilico (2P-amino). Confermando indicazioni sui rapporti struttura-attività già presenti in letteratura (Ferlin *et al.*, 2005), la presenza di un gruppo etilico o metilico in posizione 3 del composto 7P determina una diminuzione di circa 100 volte dei valori di IC₅₀ rispetto a quello relativo al derivato non sostituito sull'anello pirrolico. Probabilmente, l'inserimento di gruppi non polari aumenta la capacità del composto di interagire con le regioni lipofile adiacenti ai siti attivi della tubulina, con conseguente aumento dell'attività antimittotica. L'attività citotossica dei derivati fenil-pirrolochinolinonici e della vinblastina è imputabile ad un effetto pro-apoptotico. Infatti, la percentuale di cellule TUNEL-positive presenti nelle colture trattate, era significativamente maggiore di quella determinata nelle colture di controllo. Questo risultato si accorda con l'osservazione che gli agenti che interferiscono con il sistema

dei microtubuli promuovono l'apoptosi nelle cellule tumorali (Ribatti *et al.*, 2004). La distruzione della struttura dei microtubuli si traduce nell'induzione del gene p-53 e nell'attivazione/inattivazione di numerose protein chinasi, quali Ras/Raf, PKC/PKA e MAP chinasi. Queste protein chinasi sono associate in modo diretto o indiretto con la fosforilazione di bcl-2 e l'aumento di p-53 e p-21 porta all'apoptosi (Wang *et al.*, 1999).

E' importante sottolineare che per quanto riguarda 2P-et, 7P-met e 7P-et, sebbene questi ultimi due si siano rivelati i composti più attivi nell'inibire la proliferazione cellulare, la differenza tra dosi tossiche e non tossiche è ridotta (tra 10 e 100 volte) rispetto a quanto determinato per le altre molecole studiate, compresa la vinblastina. Questo taglio molto stretto tra le due concentrazioni non rappresenta una caratteristica positiva, in quanto occorre ricordare che *in vivo* queste sostanze possono agire non solo sull'endotelio dei vasi tumorali, ma anche su quello della rete vascolare normale, portando così ad effetti collaterali non desiderati. Per questo motivo nella sperimentazione successiva è stata valutata l'attività antiangiogenica dei composti a concentrazione che non modificava la vitalità cellulare nei saggi con MTT.

I derivati testati a concentrazioni non citotossiche hanno ridotto la migrazione delle HUVEC e la formazione di strutture tubolari su Matrigel rispetto a quanto osservato nelle colture non trattate, inducendo una diminuzione significativa dei parametri sia topologici che dimensionali. In particolare, i derivati 2-fenilpirrolochinolinonici sostituiti in posizione 7 a livello dell'anello pirrolico (2P-et, 2P-cpmet e 2P-estere), hanno mostrato un'attività paragonabile o superiore alla vinblastina, mentre il composto non sostituito 2P e i derivati 2P-nitro e 2P-ossimet si sono rivelati meno attivi del composto di riferimento. Appare evidente che, contrariamente a quanto emerso con i saggi di vitalità cellulare, la sostituzione in posizione 7 a livello dell'anello pirrolico aumenta l'attività di inibizione della fase differenziativa del processo angiogenico, nella quale la fase proliferativa finisce e le EC cominciano ad organizzarsi in abbozzi capillari. Per quanto riguarda i derivati 7P-met e 7P-et, hanno mostrato un'attività paragonabile alla vinblastina, mentre il derivato non sostituito, 7P, si è rivelato inefficace. Questo risultato conferma l'importanza di sostituenti non polari legati all'azoto dell'anello pirrolico. Probabilmente l'effetto inibitore sull'organizzazione delle HUVEC in strutture a maglie chiuse e sulla loro migrazione è sempre conseguenza del legame dei composti ai microtubuli. Questi ultimi, infatti, sono coinvolti non solo nella formazione del fuso mitotico durante la divisione cellulare, ma svolgono anche una funzione di supporto meccanico per la cellula e partecipano ai movimenti cellulari. E' quindi verosimile che gli effetti osservati possano essere attribuiti all'interazione delle molecole con il contingente "stabile" dei microtubuli associato alle ultime due funzioni sopra citate. Non sono da escludere, comunque, meccanismi alternativi, come per

esempio un effetto antagonista sull'azione di fattori proangiogenici prodotti dalle stesse cellule endoteliali.

Per questo motivo, in una fase successiva è stato valutato se i composti in esame fossero in grado di inibire *in vitro* e *in vivo* gli effetti proangiogenici indotti da FGF-2. I risultati ottenuti evidenziano come i derivati fenil-pirrolochinolinonici, analogamente alla vinblastina, siano in grado di antagonizzare gli effetti induttivi di FGF-2.

Anche in questa fase della sperimentazione sono state utilizzate concentrazioni che non modificavano la vitalità cellulare. Per quanto riguarda la vitalità cellulare, tutti i derivati fenil-pirrolochinolinonici hanno contrastato l'effetto proliferogeno dell'FGF-2, dimostrando attività analoga alla vinblastina, in particolar modo per quanto riguarda i composti 2P, 2P-et, 7P-met e 7P-et. Nei saggi di morfogenesi, invece, 2P, 2P-nitro, 2P-estere, 7P e 7P-et, assieme alla vinblastina, si sono rivelati i composti maggiormente attivi.

Nei saggi *in vivo*, tutti i derivati fenil-pirrolochinolinonici testati hanno diminuito in modo significativo la formazione di vasi indotta da FGF-2 nei *plug* di Matrigel. In particolare, 2P, 2P-nitro e 2P-cpmet hanno riportato il contenuto di emoglobina nei *plug* a valori uguali a quelli misurati negli animali di controllo, esercitando un'azione maggiore a quella della vinblastina.

I risultati ottenuti dimostrano quindi chiaramente che, indipendentemente dall'attività citotossica, i derivati fenil-pirrolochinolinonici sono in grado di antagonizzare in modo efficace gli effetti stimolatori dell'FGF-2 sulle cellule endoteliali *in vitro* e *in vivo*. In questa serie di esperimenti non è stato possibile confermare i rapporti-struttura azione, che erano stati evidenziati nella fase precedente in cui le HUVEC venivano incubate solamente con i derivati antimitotici. Questo suggerisce che alla base dell'inibizione degli effetti induttivi di FGF-2 ci sia un meccanismo diverso dall'interazione con i microtubuli e ancora da stabilire. Al momento attuale si può ipotizzare che i composti studiati possano esercitare i) un effetto inibitorio sulla produzione di FGF-2 da parte delle cellule endoteliali; ii) un effetto antagonista sul recettore dell'FGF-2; o iii) interferiscano sulla vie di segnale attivate da FGF-2.

BIBLIOGRAFIA

Akhtar N, Dickerson EB, Auerbach R (2002): "The sponge/Matrigel angiogenesis assay." *Angiogenesis*, **5** (75-809).

Albert B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: "Biologia molecolare della cellula." Edizioni Zanichelli, **V edizione**.

Albini A, Benelli R, Noonan DM, Brigati C (2004): "The "chemoinvasion assay": a tool to study tumor and endothelial cell invasion of basement membranes." *Int J Dev Biol*, **48** (563-571).

Basilico C, Moscatelli D (1992): "The FGF family of growth factors and angiogenesis." *Adv. Cancer Res.*, **159**:115-165.

Bazley LA, Gullick WJ (2005): "The epidermal growth factor receptor family." *Endocrine-Related Cancer*, **12** (17-27).

Bergers G, Benjamin LE (2003): "Tumorigenesis and the angiogenic switch." *Nature*, **3** 401-410.

Bianco R, Gelardi T, Damiano V, Ciardiello F, Tortora G (2007): "Rational bases for the development of EGFR inhibitors for cancer treatment." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **39** (1416-1431).

Bos M, Mendelshon J, Kim YM, Albanell J, Fry DW, Baselga J (1997): "PD153035, a tyrosine kinase inhibitor, prevents epidermal growth factor receptor activation and inhibits growth of cancer cells in a receptor number-dependent manner." *Clinical Cancer Research*, **3** (2099-2106).

Bozec A, Fischel JL, Milano G (2006): "Epidermal growth factor receptor/angiogenesis dual targeting:preclinical experience." *Curr Opin Oncol*, **18** (330-334).

Budzar AU, Jonat W, Howell A, Jones SE, Blomqvist CP, Vogel CL, Eiermann W, Wolter JM, Steinberg M, Webster A, Lee D (1998): "Anastrozole versus megestrol acetate in the treatment of postmenopausal women with advanced breast carcinoma: results of a survival update based on a combined analysis of data from two mature phase III trials." *Arimidex Study Group, Cancer* **83**: 1142-1152.

Budzar AU, Robertson JF, Eiermann W, Nabholz JM (2002): "An overview of the pharmacology and pharmacokinetics of the newer generation aromatase inhibitors anastrozole, letrozole, and exemestano." *Cancer* **95(9)**: 2006-20016.

Burgess AW (2008): "EGFR family: structure physiology signalling and therapeutic targets." *Growth Factors*, **26** (263-274).

Campos SM (2004): "Aromatase inhibitors for breast cancer in postmenopausal women." *Oncologist* **9(2)**: 126-136.

Carmeliet P (2000): "Mechanism of angiogenesis and arteriogenesis." *Nature Medicine*, **6** (389-395).

Carmeliet P (2005): "Angiogenesis in life, disease and medicine." *Nature*, **438** (932-936).

Celotti F (2002): "Patologia generale e fisiopatologia." *Edises*, Napoli, 40-41.

Chen K, Kuo SC, Hsieh MC, Mauger A, Lin CM, Hamel E, Lee KH (1997): „Antitumor agents. 178. Synthesis and biological evaluation of substituted 2-aryl-1,8-naphthyridin-4(1H)-ones as antitumor agents that inhibit tubulin polymerization." *J Med Chem* **40**: 3049-3056.

Ciardiello F, Bianco R, Caputo R (2004): "Antitumor activity of ZD6474, a vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in human cancer cells with acquired resistance to antiepidermal growth factor receptor therapy." *Clin Cancer Res*, **10** 784-93.

Cole GW, Alleva AM, Reddy RM, Maxhimer JB, Zuo JT, Schrupp DS, Nguyen DM (2005): "The selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor PD153035 suppresses expression of prometastasis phenotypes in malignant pleural mesothelioma cells in vitro." *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, **129** (1010-1017).

Dellian M, Witwer BP, Salehi HA, Yuan F, Jain RK (1996): "Quantitation and physiological characterization of angiogenic vessels in mice: effect of basic fibroblast growth factor, vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor, and host microenvironment." *Am J Pathol*, **149** (59-71).

Denizot F, Lang R (1986): "Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability." *J Immunol Methods*, **89** (271-7).

Dhanabal M, Ramchandran R, Waterman MJ, Lu H, Knebelmann B, Segal M, Sukhatme VP (1999): "Endostatin induces endothelial cell apoptosis." *J Biol Chem*, **274** (11721-11726).

Distler JH, Hirth A, Kurowska-Stolarska M, Gay RE, Gay S, Distler O (2003): "Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis." *QJ Nucl Med* **47(3)**: 149-161.

Dombernowsky P, Smith I, Falkson G, Leonard R, Panasci L, Bellmunt J, Bezwoda W, Gardin G, Gudgeon A, Morgan M, Fornasiero A, Hoffmann W, Michel J, Hatschek T, Tjabbes T, Chaudri HA, Hornberger U, Trunet PF (1998): "Letrozole, a new oral aromatase inhibitor for advanced breast cancer: double-blind randomized trial showing a dose effect and improved efficacy and tolerability compared with megestrol acetate." *J Clin Oncol* **16**: 453-461.

Dutta PR, Maity A (2007): "Cellular responses to EGFR inhibitors and their relevance to cancer therapy." *Cancer Letters*, **254** (165-177).

Ellis LM (2004): "Epidermal growth factor receptor in tumor angiogenesis." *Hematol Oncol Clin N Am*, **18** (1007-1021).

Ferguson KM (2004): "Active and inactive conformations of the epidermal growth factor receptor." *Biochemical Society Transaction*, **32** (742-745).

Ferlin MG, Chiarello G, Gasparotto V, Dalla Via L, Pezzi V, Barzon L, Palù G, Castagliuolo I (2005): "Synthesis and in vitro and in vivo antitumor activity of 2-phenylpyrroloquinolin-4-ones." *J Med Chem* **48**: 3417-3427.

Ferrara N (2001): "Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis." *Am J Physiol Cell Physiol*, **280** (C1358-C1366).

Florkiewicz RZ, Majack RA, Buechler RD, Florkiewicz E (1995): "Quantitative export of FGF-2 occurs through an alternative, energy-dependent, non-ER/Golgi pathway." *J Cell Physiol*, **162** (388-399).

Folkman J, Haudehschild C (1980): "Angiogenesis in vitro." *Nature*, **288** (551-556).

Folkman J (1995): "Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease." *Nature Medicine*, **1** (27-31).

Fry DW, Kraker AJ, McMichael A, Ambroso LA, Nelson JM, Leopold WR, Connors RW, Bridges AJ (1994): "A specific inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase." *Science*, **265** (1093-1095).

Fry DW (2002): "Mechanism of action of ErbB tyrosine kinase inhibitors." *Experimental Cell Research*, **284** (131-139).

Gasparini G (1995): "Angiogenesis in preneoplastic and neoplastic lesions." *Cancer J*, **8** (91-93).

Geisler J, Haynes B, Anker G, Dowsett M, Lonning PE (2002): "Influence of letrozole and anastrozole on total body aromatization and plasma estrogen levels in postmenopausal breast cancer patients evaluated in a randomized, crossover study." *J Clin Oncol* **20**: 751-757.

Grant DS, Kleinman HK, Leblond CP, Inoue S, Chung AE, Martin GR (1985): "The basement-membrane-like matrix of mouse EHS tumor: II Immunohistochemical quantitation of six of its components." *Am J Anat*, **174** (387-398).

Hajitou A, Grignet C, Devy L, Berndt S, Blacher S, Deroanne CF, Bajou K, Fong T, Chiang Y, Foidart JM, Noel A (2002): "The antitumoral effect of endostatin and angiostatin is associated with a downregulation of vascular endothelial growth factor expression in tumor cells." *FASEB J*, **16** (1802-1804).

Hay ED (1981): "Extracellular matrix." *J Cell Biol*, **91** (153-165).

Herbst RS (2004): "Review of epidermal growth factor receptor biology." *International Journal of Radiation Oncology & Biol Phys*, **59** (21-26).

Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD (1999): "New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF." *Oncogene*, **18(38)**: 5356-62.

Howell A, Osborne CK, Morris C, Wakeling AE (2000): "ICI 182, 780 (Faslodex): development of a novel, "pure" antiestrogen." *Cancer* **89**: 817-825.

Ingber DE (2002): "Mechanical signaling and the cellular response to extracellular matrix in angiogenesis and cardiovascular physiology." *Circulation research*, **91**: 877-887.

Iruela-Arispe ML, Dvorak HF (1997): "Angiogenesis: a dynamic balance of stimulators and inhibitors." *Thromb Haemost*, **78** (672-677).

Izumi Y, Xu L, di Tomaso E, Fukumura D, Jain RK (2002): "Tumour biology: Herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail." *Nature*, **416** (279-280).

Jain RK, Booth MF (2003): "What brings pericytes to tumor vessels?" *J Clin Invest*, **112(8)**: 1134-6.

Jiang JB, Hesson DP, Dusak BA, Dexter DL, Kang GJ, Hamel E (1990): "Synthesis and biological evaluation of 2-styrylquinazolin-4(3H)-ones, a new class of antimitotic anticancer agents which inhibit tubulin polymerization." *J Med Chem* **33**: 1721-1728.

Kalluri R (2003): "Basement membranes: structure, assembly and role in tumor angiogenesis." *Nature Reviews Cancer* **3**, 422-433.

Kerbel RS (1997): "A cancer therapy resistant to resistance." *Nature*, **390** (335-336).

Kevil CG, Payne DK, Mire E, Alexander JS (1998): "Vascular permeability factor/vascular endothelial cell growth factor-mediated permeability occurs through disorganization of endothelial junctional proteins." *J Biol Chem*, **273** (15099-15103).

Kim YM, Hwang S, Kim YM, Pyun BJ, Kim TY, Lee ST, Gho YS, Kwon YG (2002): "Endostatin Blocks Vascular Endothelial Growth Factor-mediated Signaling via Direct Interaction with KDR/Flk-1." *J Biol Chem*, **277** (27872-27879).

Klagsbrun M, Moses MA (1999): "Molecular angiogenesis." *Chem Biol*, **6**:217-224.

Klein S, Levitzki A (2009): "Targeting the EGFR and the PKB pathway in cancer." *Current Opinion in Cell Biology* **21** (185-193).

Kleinman HK, Cannon FB, Laurie GW, Hassell JR, Aumailley M, Terranova VP, Martin GR, DuBois-Dalcq M (1985): "Biological activities of laminina." *J Cell Biochem*, **27** (317-325).

Koyama Y, Barrett T, Hama Y, Ravizzini G, Choyke PL, Kobayashi H (2007): "In vivo molecular imaging to diagnose and subtype tumors through receptor-targeted optically labeled monoclonal antibodies." *Neoplasia*, **9**: 1021-1029.

Li L, Wang HK, Kuo SC, Wu TS, Lednicer D, Lin CM, Hamel E, Lee KH (1994): "Antitumor agents. 150. 2',3',4',5',6,7-substituted 2-phenyl-4-quinolones and related compounds: their synthesis, cytotoxicity, and inhibition of tubulin polymerization." *J Med Chem* **37**: 1126-1135.

Lichtenbeld HHC, van Dam-Mieras MCE, Hillen HFP (1996): "Humour angiogenesis: pathophysiology and clinical significance." *Neth. J. Med.*, **49**:42-51.

Liekens S, De Clercq E, Neyts J (2001): "Angiogenesis: regulators and clinical applications." *Biochemical Pharmacology*, **61** (253-270).

Maciag T, Kadish J, Wilkins L, Stemerman MB, Weinstein R (1982): "Organizational behavior of human umbilical vein endothelial cells." *J Cell Biol*, **94** (511-520).

Madri JA, Williams SK (1983): "Capillary endothelial cell cultures: phenotypic modulation by matrix components." *J Cell Biol*, **97** (153-65).

Massague J, Pandiella A (1993): "Membrane-anchored growth factors." *Annu Rev Biochem*, **62** (515-541).

Milkiewicz M, Ispanovic E, Doyle JL, Haas TL (2006): "Regulators of angiogenesis and strategies for their therapeutic manipulation." *Int J Biochem Cell Biol*. **38**(3):333-57.

Miller WR, Mullen P, Sourdain P, Watson C, Dixon JM, Telford J (1997): "Regulation of aromatase activity within the breast." *J Steroid Biochem Mol Biol* **61**: 192-202.

Mouridsen H, Gershanovich M, Sun Y, Pérez-Carrión R, Boni C, Monnier A, Apffelstaedt J, Smith R, Sleeboom HP, Jänicke F, Pluzanska A, Dank M, Becquart D, Bapsy PP, Salminen E, Snyder R, Lassus M, Verbeek JA, Staffler B, Chaudri-Ross HA, Dugan M (2001): "Superior efficacy of letrozole versus tamoxifen as first-line therapy for postmenopausal women with advanced breast cancer: results of a phase III study of the International Letrozole Breast Cancer Group." *J Clin Oncol* **19(10)**: 2596-2606.

Nisato RE, Tille JC, Jonczyk A, Goodman SL, Pepper MS (2003): " $\alpha\text{v}\beta 3$ and $\alpha\text{v}\beta 5$ integrin antagonists inhibit angiogenesis *in vitro*." *Angiogenesis*, **6**: 105-119.

Normanno N, De Luca A, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, Carotenuto A, De Feo G, Caponigro F, Salomon DS (2006): "Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer." *Gene*, **366** (2-16).

Norrby K (2006): "In vivo models of angiogenesis." *J Cell Mol Med*, **10** (588-612).

Ortega S, Ittmann M, Tsang SH, Ehrlich M, Basilico C (1998): "Neuronal defects and delayed wound healing in mice lacking fibroblast growth factor 2." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**:5672-5677.

Osborne CK, Zhao H, Fuqua SA (2000): "Selective estrogen receptor modulators: structure, function, and clinical use." *J Clin Oncol* **18**: 3172-3186.

Peethambaram PP, Ingle JN, Suman VJ, Hartmann LC, Loprinzi CL (1999): "Randomized trial of diethylstilbestrol vs. Tamoxifen in postmenopausal women with metastatic breast cancer. An updated analysis, Breast Cancer." *Res Treat* **54**: 117-122.

Pepper MS (1997): "Manipulating angiogenesis. From basic science to the bedside." *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **17** (605-619).

Plunkett ML, Hailey JA (1990): "An in vivo quantitative angiogenesis model using tumor cells entrapped in alginate." *Lab Invest*, **62** (510-517).

Pouget C, Fagnere C, Basly JP, Besson AE, Champavier Y, Habrioux G, Chulia AJ (2002): "Synthesis and aromatase inhibitory activity of flavanones." *Pharm Res* **19(3)**: 286-291.

Presta M, Moscatelli D, Joseph-Silverstein J, Rifkin DB (1986): "Purification from a human hepatoma cell line of a basic fibroblast growth factor-like molecule that stimulates capillary endothelial cell plasminogen activator production, DNA synthesis, and migration." *Mol Cell Biol*, **6** (4060-4066).

Presta M, Dell'Era P, Mitola S, Moroni E, Ronca R, Rusnati M (2005): "Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis." *Cytokine & Growth Factor Reviews*, **16** (159–178).

Ribatti D, Marimpietri D, Pastorino F, Brignole C, Nico B, Vacca A, Ponzoni (2004): "Angiogenesis in neuroblastoma." *M Ann N Y Acad Sci* **1028**: 133-142.

Rose C, Vtoraya O, Pluzanska A, et al. (2003): "An open randomised trial of second-line endocrine therapy in advanced breast cancer: comparison of the aromatase inhibitors letrozole and anastrozole." *Eur J Cancer* **39**: 2318-2327.

Roskoski RJr (2004): "The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer." *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **319** (1-11).

Rundhaug JE (2005): "Matrix metalloproteinases and angiogenesis." *J Cell Mol Med* **9(2)**: 267-285.

Rusnati M, Presta M (1996): "Interaction of angiogenic basic fibroblast growth factor with endothelial cell heparan sulfate proteoglycans. Biological implications in neovascularization." *Int J Clin Lab Res*, **26** (15–23).

Ryan AJ, Wedge SR (2005): "ZD6474 – a novel inhibitor of VEGFR and EGFR tyrosine kinase activity." *British Journal of Cancer* **92(1)**: S6-S13.

Sanderson JT, Hordijk J, Denison MS, Springsteel MF, Nantz MH, van den Berg M (2004): "Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by natural and synthetic flavonoid compounds in H295R human adrenocortical carcinoma cells." *Toxicol Sci* **82**: 70-79.

Santen RJ, Boucher AE, Santner SJ, Henderson IC, Harvey H, Lipton A (1987): "Inhibition of aromatase as treatment of breast carcinoma in postmenopausal women." *J Lab Clin Med* **109**: 278-289.

Sasamura H, Takahashi A, Miyao N, Yanase M, Masumori N, Kitamura H, Itoh N, Tsukamoto T (2002): "Inhibitory effect on expression of angiogenic factors by antiangiogenic agents in renal cell Carcinoma." *Br J Cancer*, **86** (768-773).

Schneider MR, Wolf E (2009): "The epidermal growth factor receptor ligands at a glance." *J Cell Physiol*, **218(3)** (460-6).

Senger DR, Claffey KP, Benes JE, Perruzzi CA, Sergiou AP, Detmar M (1997): "Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor: regulation through alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins." *Proc Natl Acad Sci USA*, **94** (13612-13617).

Seralini GE, Moslemi S (2001): "Aromatase inhibitors: past, present and future." *Mol Cell Endocrinol*, **178**(1-2):117-131.

Shin EY, Kim SY, Kim EG (2001): "c-Jun N-terminal kinase is involved in motility of endothelial cell." *Experimental and Molecular Medicine*, **33** (4) 276-283.

Siemann DW (2002): "Vascular targeting agents". *Horizons in cancer therapeutics: from bench to bedside* **3**:4-15.

Shou J, Massarweh SA, Osborne CK, Wakeling AE, Ali S, Weiss H, Schiff R (2004): "Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer." *J Natl Cancer Inst* **96**: 926-935.

Slaton JW, Perrotte P, Inoue K, Dinney CP, Fidler IJ (1999): "Interferonalpha-mediated down-regulation of angiogenesis-related genes and therapy of bladder cancer are dependent on optimization of biological dose and schedule." *Clin Cancer Res*, **5** (2726-2734).

Soares R, Guo S, Gärtner F, Schmitt FC, Russo J (2003): "17 beta-estradiol-mediated vessel assembly and stabilization in tumor angiogenesis requires TGF beta and EGFR crosstalk." *Angiogenesis*, **6** (271-81).

Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, Arenberg DA, Burdick MD, Kasper J, Dzuiba J, Van Damme J, Walz A, Marriott D (1995): "The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated Angiogenesis." *J Biol Chem*, **270** (27348-27357).

Tabernero J (2007): "The Role of VEGF and EGFR Inhibition: Implications for Combining Anti-VEGF and Anti-EGFR Agents." *Mol Cancer Res*, **5**(3) (203-220).

Veikkola T, Alitalo K (1999): "VEGFs, receptors and angiogenesis." *Semin Cancer Biol*, **9** (211-220).

Wang LG, Liu XM, Kreis W, Budman DR (1999): "The effect of antimicrotubule agents on signal transduction pathways of apoptosis: a review." *Cancer Chemother Pharmacol* **44**: 355-361.

Wedge SR, Ogilvie DJ, Dukes M, Kendrew J, Chester R, Jackson JA, Boffey SJ, Valentine PJ, Curwen JO, Musgrove HL, Graham GA, Hughes GD, Thomas AP, Stokes ESE, Curry B, Richmond GHP, Wadsworth PF, Bigley AL, Hennepuin LF (2002): "ZD6474 inhibits vascular endothelial growth factor signaling, angiogenesis, and tumor growth following oral administration." *Cancer Research*, **62** (4645-4655).

Wemme H, Pfeifer S, Heck R, Müller-Quernheim J (1992): "Measurement of lymphocyte proliferation: critical analysis of radioactive and photometric methods." *Immunobiology*, **185** (78-89).

Woodworth CD, Michael E, Marker D, Allen S, Smith L, Nees M (2005): "Inhibition of the epidermal growth factor receptor increases expression of genes that stimulate inflammation, apoptosis, and cell attachment." *Molecular Cancer Therapy*, **4** (650-658).

Xia Y, Yang ZY, Xia P, Bastow KF, Tachibana Y, Kuo SC, Hamel E, Hackl T, Lee KH (1998): "Antitumor agents. 181. Synthesis and biological evaluation of 6,7,2',3',4'-substituted-1,2,3,4-tetrahydro-2-phenyl-4-quinolones as a new class of antimitotic antitumor agents." *J Med Chem* **41**: 1155-1162.

Yarden Y (2001): "The EGFR family and its ligands in human cancer. Signalling mechanisms and therapeutic opportunities." *Eur J Cancer*, **37** (S3-S8).

Zhang SX, Feng J, Kuo SC, Brossi A, Hamel E, Tropsha A, Lee KH (2000): "Antitumor agents. 199. Three-dimensional quantitative structure-activity relationship study of the colchicine binding site ligands using comparative molecular field analysis." *J Med Chem* **43**: 167-176.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio la Prof.ssa Adriana Chilin e il Dott. Giovanni Marzaro del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università degli Studi di Padova per aver progettato e sintetizzato i composti 4-aminochinazolinici.

Ringrazio la Prof.ssa Maria Grazia Ferlin del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università degli Studi di Padova per aver fornito i composti fenil-pirrolochinolinonici.