



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Sede Consorzziata: Università degli Studi di Trieste

Dipartimento di Scienze della Vita

DOTTORATO DI RICERCA IN FARMACOLOGIA, TOSSICOLOGIA E TERAPIA
CICLO XXI

FARMACI INNOVATIVI BASATI SULL'ACIDO IALURONICO PER IL TRATTAMENTO DEI TUMORI

Coordinatore: Ch.ma Prof.ssa Rosa Maria Gaion

Supervisore: Ch.mo Prof. Gianni Sava

Correlatore: Prof. ssa Sonia Zorzet

Dottoranda : Ilaria Crucil

INDICE

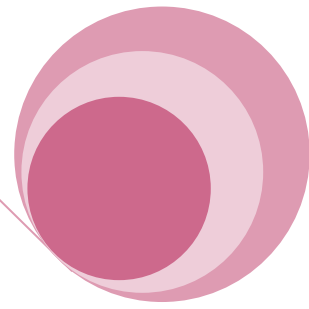
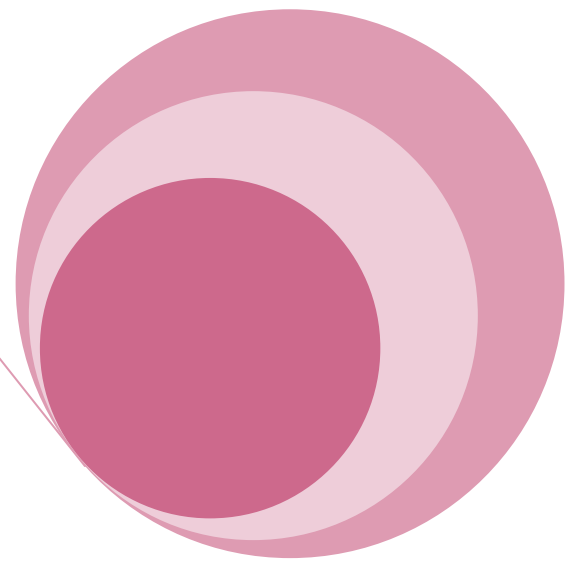
INTRODUZIONE	Pag. 1
La neoplasia	Pag. 2
Tumori solidi	Pag. 4
Le leucemie	Pag. 5
La terapia antitumorale classica	Pag. 7
Gli effetti collaterali della terapia antitumorale	Pag. 9
La resistenza alla terapia antitumorale	Pag. 10
Terapia antitumorale non citotossica	Pag. 14
Anticorpi monoclonali	Pag. 15
Terapia genica	Pag. 15
Plasmaferesi	Pag. 15
Trapianto di midollo osseo	Pag. 16
Nuovi approcci terapeutici antitumorali	Pag. 17
I farmaci antiangiogenici	Pag. 18
Angiogenesi	Pag. 18
Farmaci antineoplastici veicolati in maniera specifica	Pag. 22
I liposomi	Pag. 23
I bioconiugati	Pag. 28
Coniugati con poliesteri biodegradabili	Pag. 29
Bioconiugati con polietilenglicoli	Pag. 30
Coniugati con polisaccaridi	Pag. 31
Acido ialuronico	Pag. 33
Caratteristiche e funzioni dell'acido ialuronico	Pag. 33

CD44: recettore di membrana specifico per l'acido ialuronico	Pag. 36
CD44 e acido ialuronico	Pag. 39
CD44 e segnali intracellulari	Pag. 41
PI3K: fosfatidilinositolo 3 fosfato chinasi	Pag. 42
Bioconiugati dell'acido ialuronico	Pag. 46
NaBu e gli inibitori delle istonedeacetilasi	Pag. 46
Localizzazione e funzione degli istoni	Pag. 46
Gli inibitori delle istonedeacetilasi nella carcinogenesi	Pag. 47
Tricostatina-A (TSA)	Pag. 48
Acido valproico	Pag. 48
Sodio butirrato	Pag. 49
ATRA: terapia differenziante	Pag. 50
Desametasone	Pag. 52
Recettore per i glucocorticoidi	Pag. 52
Desametasone in campo oncologico	Pag. 56
SCOPO DELLA TESI	Pag. 59
MATERIALI E METODI	Pag. 63
Composti utilizzati	Pag. 64
HABut	Pag. 66
HBR7	Pag. 66
Bioconiugati con desametasone	Pag. 67
Linee cellulari utilizzate	Pag. 68
MIA PaCa2	Pag. 68

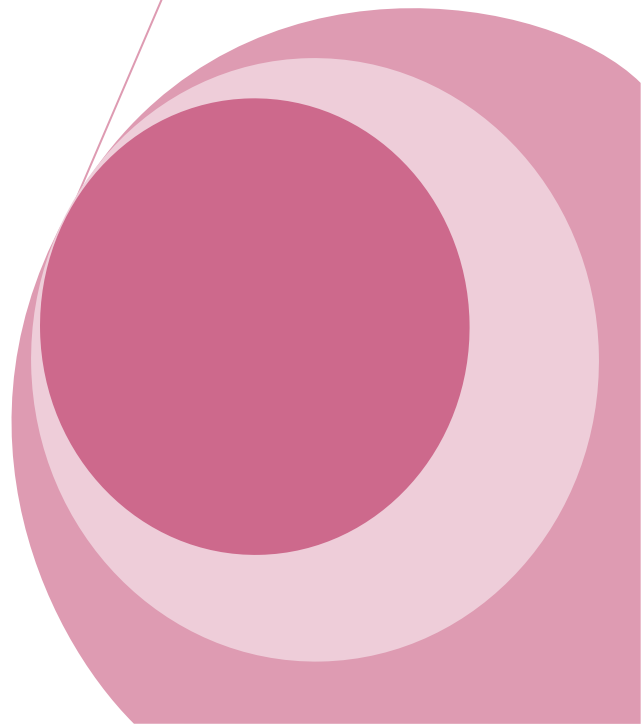
MCF-7	Pag. 68
NB4	Pag. 68
P388	Pag. 69
MDA-MB-231	Pag. 69
MATERIALI E METODI <i>IN VITRO</i>	Pag. 70
Metodo per lo svolgimento del passaggio cellulare	Pag. 70
Test dell'esclusione del trypan bleu	Pag. 71
Valutazione dell'espressione di CD44 nelle linee cellulari utilizzate	Pag. 72
Inibizione della crescita cellulare - determinazione della IC50	Pag. 73
Test dell'MTT	Pag. 75
Analisi della variazione della vitalità cellulare	Pag. 76
Trattamento preventivo con anticorpo bloccante il CD44	Pag. 77
Test dell'NBT	Pag. 78
Angiokit: valutazione delle proprietà pro o anti - angiogeniche di farmaci	Pag. 79
Test di controllo su angiokit	Pag. 82
MATERIALI E METODI <i>IN VIVO</i>	Pag. 84
Animali utilizzati	Pag. 85
Ceppo BD2F1	Pag. 85
Ceppo SCID (severe combined immunodeficient)	Pag. 85
Tossicità subacuta nel topo trattato per via intraperitoneale	Pag. 87
Attività antitumorale dei bioconiugati D3 e BD2 su un modello di xenotrapianto di leucemia umana NB4	Pag. 88
Analisi statistica	Pag. 90

MATERIALI E METODI WESTERN BLOT	Pag. 91
Preparazione dei lisati cellulari	Pag. 91
Dosaggio proteico	Pag. 93
SDS-Page	Pag. 94
Western Blot	Pag. 96
RISULTATI E DISCUSSIONE	Pag. 99
Analisi dei livelli di espressione del recettore CD44 nelle linee utilizzate	Pag. 100
STUDIO <i>IN VITRO</i>	Pag. 102
HABut: estere singolo di acido ialuronico e sodio butirrato	Pag. 103
Citotossicità di HABut sulla linea MIA PaCa2	Pag. 104
Tossicità di HABut sulla linea di carcinoma del pancreas MIA PaCa2 in presenza di un anticorpo bloccante	Pag. 108
Prova di adesione su Matrigel®	Pag. 114
Effetto di HABut e di HA sulla capacità di invasione delle cellule MIA PaCa2 <i>in vitro</i>	Pag. 117
HBR7: doppio estere di acido ialuronico, sodio butirrato e acido all-trans retinoico	Pag. 121
Citotossicità di HBR7 sulla linea MIA PaCa2	Pag. 121
Tossicità di HBR7 sulla linea di carcinoma del pancreas MIA PaCa2 in presenza di un anticorpo bloccante	Pag. 124
Bioconiugati a base di acido ialuronico e desametasone o desametasone e sodio butirrato	Pag. 127
Citotossicità del desametasone e dei suoi bioconiugati con acido ialuronico sulle linee NB4 e P388	Pag. 128
Tossicità dei bioconiugati con desametasone sulla linea cellulare NB4 in presenza di un anticorpo bloccante	Pag. 134

Effetto differenziante del desametasone e dei suoi bioconiugati con acido ialuronico sulle cellule NB4	Pag. 138
Citotossicità dei bioconiugati D3 e BD2 sulle linee cellulari MIA PaCa2 e MDA-MB-231	Pag. 141
Attività dei bioconiugati sul processo angiogenetico <i>in vitro</i>	Pag. 144
STUDIO IN VIVO	Pag. 150
Tossicità subacuta dei bioconiugati sul topo	Pag. 152
Attività antitumorale di desametasone, D3 e BD2 sullo xenotrapianto di leucemia umana nel topo SCID	Pag. 155
Attività antitumorale di ATRA, D3 e BD2 sullo xenotrapianto di leucemia umana nel topo SCID	Pag. 158
WESTERN BLOT	Pag. 161
CD44 e segnali intracellulari	Pag. 162
MCF-7 Trattamenti per 1 ora	Pag. 164
MIA PaCa2 trattamenti per 1 ora	Pag. 165
CONCLUSIONI	Pag. 167
BIBLIOGRAFIA	Pag. 171
RINGRAZIAMENTI	Pag. 189



Introduzione



LA NEOPLASIA

La proliferazione incontrollata di cellule atipiche rispetto alle cellule normali viene classificata come neoplasia (o tumore).

Queste cellule solitamente derivano da un'unica cellula dell'organismo che ha maturato una serie di mutazioni favorevoli alla proliferazione e trasmissibili alla discendenza.

In genere queste cellule presentano caratteristiche peculiari quali:

✚ **Clonalità:** il tumore prende origine da una singola cellula mutata, che prolifera fino a formare un clone di cellule neoplastiche.

✚ **Anaplasia:** mancanza della normale differenziazione cellulare.

✚ **Autonomia:** la crescita delle cellule tumorali è completamente svincolata dai meccanismi di regolazione.

✚ **Assenza di inibizione della crescita da elevata densità cellulare:** cellule normali diventano quiescenti nel momento in cui rilevano nei loro dintorni una elevata presenza di cellule; tale controllo sparisce nel clone tumorale, che continua a replicarsi comunque.

✚ **Riduzione o perdita di controllo apoptotico:** cloni tumorali innescano con difficoltà oppure perdono la possibilità di andare incontro a morte programmata.

✚ **Angiogenesi:** all'interno della massa tumorale si possono formare nuovi vasi sanguigni per il recupero e la distribuzione di sostanze nutrienti.

✚ **Invasività e capacità di metastatizzare:** cellule tumorali sono in grado di staccarsi dal tessuto, riescono a passare attraverso la matrice extracellulare, sfruttare il torrente sanguigno per spostarsi all'interno del corpo e colonizzare nuove aree, dando origine a tumori secondari.

Le neoplasie vengono classificate in:

neoplasie benigne: caratterizzate da una lenta crescita per espansione in loco di cellule ben differenziate, senza infiltrazione di tessuti circostanti e delimitate da una pseudocapsula fibrosa.

neoplasie maligne: caratterizzate da una proliferazione cellulare incontrollata di cellule indifferenziate (anaplastiche) morfologicamente e fisiologicamente dissimili da quelle presenti nel tessuto di origine. Le cellule, in questo caso, sono caratterizzate dalla capacità di invadere sia tessuti vicini sia il torrente sanguigno e/o il circolo linfatico, iniziando il processo di metastatizzazione. Possono essere recidivanti, ovvero, a seguito di asportazione chirurgica la massa può ripresentarsi.

Il tumore scaturisce da modificazioni genetiche a livello di una singola cellula. Mutazioni puntiformi iniziali portano ad instabilità genetica della cellula. Questa instabilità può aumentare fino alla perdita di interi cromosomi o alla formazione di copie multiple (Dixon et al, 2004) oppure al danneggiamento di geni che regolano la crescita cellulare (Knudson, 2001). L'accumulo di mutazioni porta alla comparsa di modificazioni stabili ed irreversibili nella cellula, che vengono trasmesse alle cellule figlie. Si ha la perdita dei normali meccanismi di controllo a livello di geni, in particolare di geni proto-oncogeni (che promuovono la crescita cellulare), geni oncosoppressori (che inibiscono la crescita cellulare), i geni DNA-repair (che riparano i danni al DNA) e i geni che regolano l'apoptosi. Si ha la perdita di inibizione da contatto e la proliferazione incontrollata (Gatenby et al, 2004).

L'alterazione genetica coinvolge soprattutto i geni che sono responsabili dell'amplificazione del DNA o la over-espressione di proto-oncogeni quali EGF-R (Epidermal Growth Factor-Receptors), il gene Ras, che codifica per una proteina GTP-asi ed è parte integrante della trasduzione del segnale proliferativo dalla membrana al nucleo, il gene p53 che ha la capacità di inibire la progressione del ciclo cellulare, il gene bcl-2 che è capace di inibire l'attività pro-apoptotica.

Anche lo schema della metilazione del DNA della cellula cambia, attivando e disattivando geni in modo incontrollato (Sarasin, 2003). Di conseguenza, cellule che proliferano rapidamente, come le cellule epiteliali, hanno un rischio maggiore di trasformarsi in cellule tumorali rispetto a quelle cellule che si dividono meno, per esempio i neuroni.

Un'ulteriore classificazione dei tumori può essere fatta suddividendo i tumori in solidi (presenza di una massa tumorale) e non-solidi (leucemie).

TUMORI SOLIDI

Appaiono come una massa solida con contorni più o meno definiti, all'interno della quale (figura 1) è possibile distinguere diversi tipi di cellule, ciascuna in maniera più o meno evidente modificata nell'aspetto e nella funzionalità.

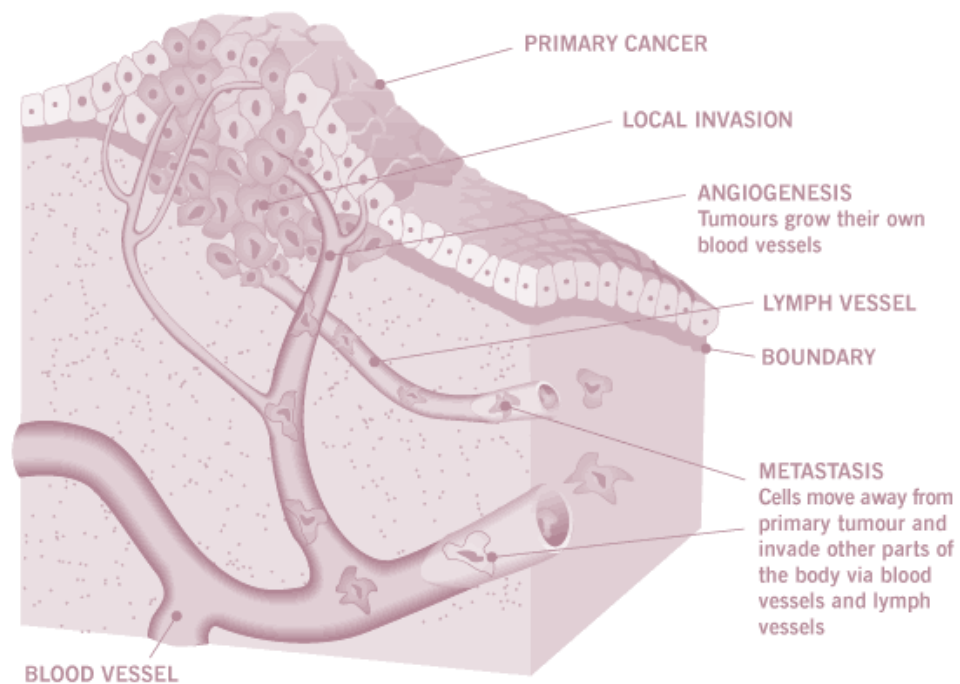


Figura 1. Morfologia della massa tumorale solida.

All'interno di un tumore solido si possono ritrovare:

- + + + + Cellule necrotiche: morte per mancanza di ossigeno, oppure perché riconosciute dal sistema immunitario, oppure semplicemente per vecchiaia.
- + + + + Cellule stromali ed immunitarie: richiamate *in loco* dalla reazione dell'organismo nei confronti della massa tumorale che portano ad un aumento del volume della massa tumorale stessa.

✚ Cellule in replicazione: capaci di replicarsi e di crescere in modo autonomo, senza risentire cioè dei normali segnali inibitori interni. E' questa la classe più sensibile ai chemioterapici, fintanto che non si sviluppano fenomeni di resistenza.

✚ Cellule in G0: sono spesso causa di complicazioni. Infatti, essendo silenti al momento del trattamento chemioterapico, non hanno una spiccata attività metabolica e risentono molto poco dell'azione dei farmaci. Pertanto sono in grado di risvegliarsi e di riprendere il loro ciclo riproduttivo dopo la conclusione della terapia farmacologica.

LE LEUCEMIE

Sotto il nome di leucemia rientrano tutti i tumori dei globuli bianchi (leucociti). Data la loro origine, questi tumori non sono solidi, non sono cioè connotati dalla presenza di una massa tumorale, ma derivano semplicemente dalla proliferazione incontrollata di queste cellule che diffondono in tessuti e organi.

Tutte le cellule del sangue, globuli rossi, globuli bianchi e piastrine, sono generate nel midollo osseo a partire da un progenitore comune, la cellula staminale ematopoietica, che si differenzia attraverso stadi successivi di maturazione, dando origine a tutte e tre le linee cellulari ematiche. Quando una delle forme immature (cellule nello stadio intermedio) inizia a riprodursi in maniera incontrollata si ha un eccesso di globuli bianchi immaturi, che non sono in grado di svolgere la loro azione difensiva, e la progressiva perdita di globuli rossi e piastrine, il cui sviluppo è limitato dalle cellule maligne. Pertanto, i soggetti affetti da tale malattia sviluppano in un periodo di tempo più o meno variabile:

anemia (per insufficiente produzione di globuli rossi),

infezioni gravi (per ridotta produzione di linfociti),

emorragie (per ridotta produzione di piastrine).

I leucociti adulti circolanti sono costituiti da numerose sottofamiglie: i linfociti T e i linfociti B; i leucociti neutrofili, eosinofili e basofili (detti anche granulociti); i monociti, che al bisogno si trasformano in macrofagi (spazzini). I linfociti derivano da

un progenitore comune linfoide, i granulociti e monociti condividono un precursore mieloido. Da qui una prima classificazione delle leucemie in base al tipo di globuli bianchi:

- ✚ *leucemia mieloide*: coinvolge la produzione di granulociti,
- ✚ *leucemia linfoide*: coinvolge la produzione di linfociti,
- ✚ *leucemia monocitica*: coinvolge la produzione di monociti,
- ✚ *Mieloma multiplo*: è il tumore delle plasmacellule, che vengono normalmente prodotte dai linfociti B

A seconda dell'aggressività e dalla durata possono essere inoltre classificate come acute o croniche: le prime hanno prognosi più severa e decorso molto rapido, le seconde decorrono più lentamente.

Leucemia Promielocitica acuta: caratterizzata da un blocco della differenziazione cellulare allo stadio di blasti, e dalla riduzione della produzione di globuli bianchi, globuli rossi e piastrine. Negli adulti interessa soprattutto la linea granulocitaria, mentre nei bambini i linfociti. Nello specifico, la linea NB4, utilizzata nelle prove in vitro ed in vivo nella presente tesi, viene classificata come Leucemia Promielocitica Acuta e pertanto presenta le caratteristiche elencate qui sopra.

Esistono poi due forme di tumore del sistema linfatico:

Linfoma di Hodgkin: è il tumore dei linfociti (globuli bianchi), ma colpisce anche tutti gli organi del sistema linfatico.

Linfoma di non-Hodgkin: è il tumore maligno dei linfociti e del sistema linfatico.

LA TERAPIA ANTITUMORALE CLASSICA

La scelta della terapia e la prognosi dipendono da diversi fattori, tra i quali i più importanti sono l'avanzamento della malattia ed il tipo di tumore.

I più comuni approcci alla terapia dei tumori al giorno d'oggi sono:

asportazione chirurgica

chemioterapia

radioterapia.

L'asportazione chirurgica del tumore (quando questa è possibile) viene per prassi seguita da una profilassi chemioterapica e/o radioterapica.

La radioterapia prevede l'utilizzo di radiazioni, o tramite appositi strumenti che le generano (terapia esterna) o tramite la somministrazione al paziente di radioisotopi (terapia interna) (Ahamad et al, 2004).

La chemioterapia è la modalità terapeutica più utilizzata per arrestare la crescita delle cellule neoplastiche, distruggendole e fermandone la produzione sia nel caso sia stato possibile l'asportazione della massa tumorale sia nel caso in cui questo non sia stato possibile. Consiste nella somministrazione di farmaci citotossici, che entrano nel circolo sanguigno e si diffondono, raggiungendo le cellule neoplastiche in qualsiasi parte del corpo.

Il problema di questo tipo di terapia è la scarsa selettività dei farmaci verso le cellule neoplastiche. Spesso gli effetti tossici si sovrappongono agli effetti terapeutici, in quanto vengono colpite anche le cellule sane.

L'azione dei comuni chemioterapici antineoplastici infatti non è determinata da differenze biologiche specifiche tra le cellule normali e cellule tumorali, bensì solo dalla velocità con la quale queste ultime si moltiplicano (Marchini et al., 2004).

La maggior parte dei composti antitumorali sono farmaci ciclo-specifici, ossia agenti citotossici che intervengono in fasi specifiche del ciclo cellulare (figura 1) per essere il più possibile attivi nei confronti delle sole cellule tumorali (Lobert et al.,

1992). La natura della sensibilità ai chemioterapici antitumorali collegata alle diverse fasi del ciclo cellulare non è ancora ben nota. In un recente articolo cellule umane tumorali sono state sincronizzate in una specifica fase del ciclo cellulare al fine di valutare gli effetti dei farmaci antineoplastici in esame (Kazi, 2005).

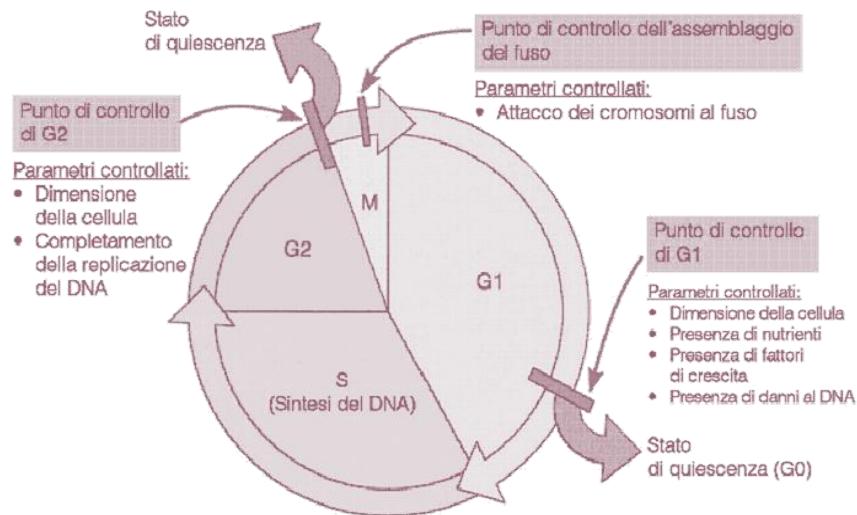


Figura 2. Ciclo cellulare.

GLI EFFETTI COLLATERALI DELLA TERAPIA ANTITUMORALE

La terapia antineoplastica è efficace quando il farmaco riduce la massa tumorale ad un livello minimo su cui il sistema immunitario è in grado di agire, eliminando cioè le cellule rimanenti. Come già detto, i farmaci chemioterapici antitumorali attualmente utilizzati in clinica però mancano di selettività e pertanto necessitano di alti dosaggi per esprimere la loro azione citotossica. Ciò si traduce però anche nell'insorgenza di effetti tossici indesiderati che costituiscono un aspetto importante di questo trattamento medico.

La sensibilità degli organi sani ai vari farmaci chemioterapici determina la comparsa di una moltitudine di effetti collaterali che in parte variano a seconda del tipo di farmaci impiegati. La tossicità dei chemioterapici è di tipo arigenerativo e si manifesta soprattutto a livello dei tessuti ad alto indice proliferativo: midollo osseo (leucopenia, piastrinopenia, anemia, immunosoppressione, infezioni), mucosa gastrointestinale (stomatite, enterite, colite muco-membranosa, diarrea), cute ed annessi cutanei (alopecia), gonadi (amenorrea, azospermia).

I più comuni effetti collaterali possono essere riassunti in:

- ✚ Tossicità gastrointestinale: terapie citostatiche inducono spesso nausea e vomito che possono presentarsi anche in periodi successivi alla somministrazione del farmaco. L'utilizzo di antagonisti della serotonina hanno aumentato la tollerabilità a questi farmaci (Del Favero et al., 1993).
- ✚ Leucopenia: comporta la riduzione del numero di globuli bianchi nel sangue portando ad una diminuzione della capacità di difesa del corpo verso agenti come batteri e virus. Per ovviare al problema si somministrano dei fattori di crescita leucocitari tra un ciclo chemioterapico e l'altro (Alliance for Lung Cancer Advancy, Support and Education, 2003-2004).
- ✚ Anemia: i farmaci antitumorali, agendo sulle cellule ad alta capacità replicativa influenzano anche la crescita dei globuli rossi. Durante i cicli di chemioterapia si ha un'accentuata riduzione del loro numero nel sangue e del loro contenuto di emoglobina. Somministrazioni di eritropoietina (EPO), un fattore di crescita per i globuli rossi, può in parte alleviare il problema.

LA RESISTENZA ALLA TERAPIA ANTITUMORALE

Accanto agli effetti collaterali, l'altro problema della chemioterapia antitumorale è la comparsa di resistenza. Il fenomeno della resistenza al trattamento farmacologico è un fattore che può compromettere in maniera determinante la terapia di un paziente. Le cause per le quali una cellula neoplastica può risultare resistente sono molteplici ma possono essere classificate in alcune classi fondamentali. La resistenza può insorgere naturalmente, qualora la cellula non sia mai venuta in contatto con il farmaco, oppure può essere il risultato di varie modificazioni a carico della cellula dopo trattamenti ripetuti. Inoltre, determinante ai fini della terapia, è che tale resistenza sia limitata ad un solo farmaco e non si estenda ad una classe di farmaci chimicamente affini (resistenza crociata) o peggio ancora a farmaci totalmente diversi (resistenza multipla).

Le principali cause di resistenza possono essere riassunte come:

- ✚ aumento dell'inattivazione del farmaco.
- ✚ riduzione della capacità di attivazione.
- ✚ alterata quantità di target specifici.
- ✚ riduzione dell'affinità del farmaco verso il target.
- ✚ aumento dei sistemi di riparo del DNA.
- ✚ aumentata espressione di trasportatori.

I principali fattori che possono far insorgere resistenza sono suddivisi in:

- ✚ Fattori cellulari: la resistenza è conseguenza della stessa condizione replicativa della cellula, come nel caso delle cellule nella fase G0 del ciclo replicativo, che non sono sensibili a farmaci ciclo-specifici.

- ✚ Fattori biochimici: la resistenza ha basi genetiche e modificazioni nell'espressione proteica portano variazioni del numero di target del farmaco, riducendone di conseguenza l'attività.
- ✚ Fattori farmacologici: la resistenza è dovuta a variazioni nell'assorbimento, nella distribuzione e nell'eliminazione del farmaco che non plasmatiche sufficienti per essere efficace. raggiunge concentrazioni

La resistenza multipla, o pleiotropica, è la più problematica perché può insorgere a piccole concentrazioni ed anche con un carico tumorale basso. Le cellule neoplastiche possono presentare infatti un'aumentata espressione di trasportatori capaci di ridurre attivamente le concentrazioni intracellulari di vari farmaci (Borst et al., 2000) e di conferire al tumore proprietà di farmacoresistenza multipla (Bradshaw et al., 1998). Un caso specifico di resistenza ai chemioterapici può essere quello in cui l'anomala forma ed espressione di un trasportatore di membrana impedisce al farmaco di raggiungere le concentrazioni terapeutiche richieste, estrudendolo dalla cellula (Luqmani, 2005).

La più studiata delle pompe d'efflusso ATP-dipendenti è la P-glicoproteina (P-gp), caratterizzata da un peso molecolare 170kDa e codificata nell'uomo dal gene *mdr1*. Essa fa parte della superfamiglia ABC (ATP Binding Cassette) dei trasportatori ATP-dipendenti, agisce esclusivamente nei confronti di farmaci e composti endogeni

con una determinata grandezza molecolare. Fisiologicamente ha un'espressione strategica sulle superfici di organi deputati all'assorbimento, alla distribuzione ed all'eliminazione dei farmaci, quali, ad esempio, fegato, intestino, placenta, ghiandole surrenali, ed è particolarmente presente negli organi secretori (Kim et al., 2001).

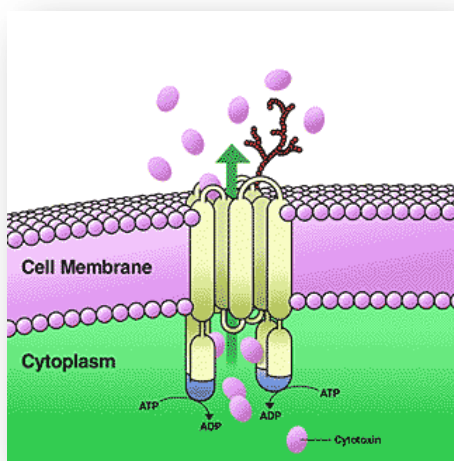


Figura 3. Struttura della P-glicoproteina

La P-gp (figura 3) è inoltre localizzata sulla membrana canalicolare degli epatociti, nelle membrane ad orletto a spazzola degli enterociti dell'intestino tenue e delle cellule dei tubuli renali prossimali, nelle cellule endoteliali e negli astrociti della barriera ematoencefalica, nella barriera ematotesticolare, nel lato materno della placenta, nelle ghiandole surrenali e nelle cellule del pancreas. Oggi è chiaro che la sua funzione principale è quella di proteggere i tessuti normali dalle tossine esogene o endogene, impedendone l'assorbimento intestinale.

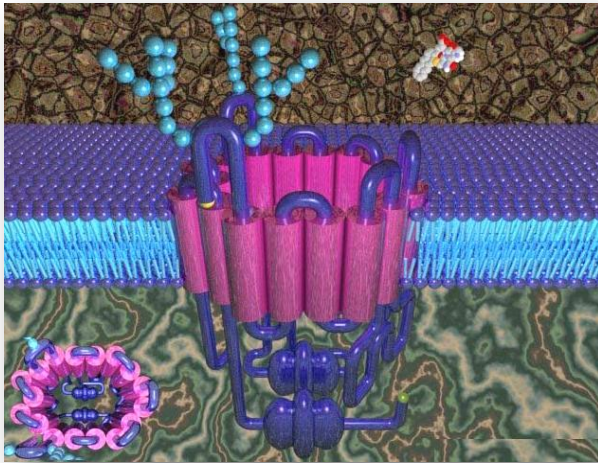


Figura 4. Struttura delle MRP.

Altri esempi di trasportatori che hanno un ruolo fondamentale nella farmacoresistenza sono le MRP (Multidrug Resistance-associated proteins) rappresentate da sette membri (figura 4).

La MRP1, identificata nel 1992 (Cole et al., 1992), ha una distribuzione ubiquitaria nei tessuti normali mentre la MRP2 è localizzata principalmente nel fegato (dove le sue alterazioni sono responsabili della sindrome di Dubin-Johnson), nel rene e nell'intestino.

La MRP2 sembra sia correlata alla resistenza per alcuni antimetaboliti, ma questo avviene solo e unicamente se è presente una mutazione a carico di specifici amminoacidi molto conservati (Ito et al., 2001). MRP4 e MRP5 invece presentano forti similitudini tra loro e conferiscono resistenza verso purine e nucleotidi analoghi (Kruh et al., 2001).

Lo spettro dei composti endogeni o esogeni collettivamente trasportati dalle MRP differisce, almeno in parte, da quello della P-gp. Oltre ad alcune sostanze anfipatiche neutre o debolmente basiche (come antracicline o alcaloidi della vinca), che sono i tipici substrati della P-gp, le MRP estrudono dalle cellule anioni organici,

spesso come metaboliti coniugati a glutatione, acido glicuronico o solfato. Tra i substrati delle MRP si trovano metotrexato, cisplatino, aflatoossina B1, leucotriene C₄, 17beta-estradiolo, glutatione ossidato, nitrosamine, alcuni pesticidi e metalli pesanti (Borst et al., 2000).

Altri trasportatori responsabili della farmacoresistenza sono la BCRP (Breast Cancer Resistance Protein), le proteine TAP (TAP1 e TAP2), il cui ruolo fisiologico è di trasportare peptidi antigenici attraverso il reticolo endoplasmico), e la LRP (Lung-Related Protein), implicata nel trasporto di vari substrati tra i compartimenti subcellulari, includendo il nucleo (Bradshaw et al., 1998; Doyle et al., 1998).

La conoscenza del meccanismo di questi trasportatori ha fatto nascere una serie di studi rivolti alla modulazione dei meccanismi causanti la farmacoresistenza tumorale. Sono stati così progettati dei substrati-inibitori delle pompe, in grado di bloccare l'efflusso dei composti antitumorali dalle cellule neoplastiche.

TERAPIA ANTITUMORALE NON CITOTOSSICA

Per cercare di superare il problema della tossicità e della resistenza, già da anni vengono utilizzati in clinica farmaci antitumorali la cui azione non è legata alla citotossicità nei confronti della cellula tumorale, ma è diretta verso altri bersagli cellulari. Queste tecniche sono rivolte principalmente al trattamento delle leucemie e dei linfomi:

IMMUNOTERAPIA

Le cellule tumorali presentano antigeni di membrana in grado di essere riconosciuti dal sistema immunitario. Lo scopo di questa terapia è quello di stimolare nel paziente una reazione immunitaria rivolta verso la massa tumorale in crescita.

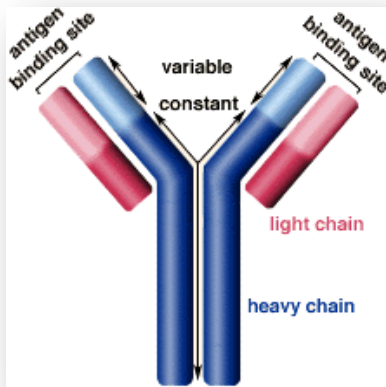
A tal fine, vengono inoculati nel paziente antigeni tumorali in varie forme. Solitamente si utilizzano cellule tumorali (autologhe o allogeniche rese incapaci di moltiplicarsi mediante irraggiamento), lisati cellulari, anticorpi mono/policlonali, cellule dendritiche caricate con peptidi tumorali antigenici.

Si tratta di un approccio terapeutico ancora in fase sperimentale ma promettente: sono stati registrati risultati positivi in pazienti affetti da carcinoma del colon, dell'ovaio (Bolhuis et al., 1992), del polmone (Karp et al., 1996) nonché della vescica (Schenk-Braat et al., 2005).

L'immunoterapia cellulare passiva è un termine utilizzato quando cellule effettrici specifiche, attivate, sono direttamente infuse nel paziente e non sono indotte o espanse nell'organismo del paziente. I primi tentativi riguardano la reinfusione dei linfociti del paziente stesso dopo espansione in vitro mediante esposizione all'interleuchina 2 (Il-2), il fattore di crescita delle cellule T. Queste cellule sono definite cellule killer attivate da linfocine (Liu et al., 2006).

Un'altra modifica dell'immunità cellulare passiva è l'utilizzo concomitante di interferone, che aumenta l'espressione degli antigeni sulle cellule tumorali, aumentando quindi il numero di cellule tumorali uccise da parte delle cellule effettrici infuse. Gli effetti collaterali nella maggior parte dei casi si limitano ad una sintomatologia simile a quella influenzale, con febbre, brividi, dolori muscolari, nausea, vomito. Questi sintomi, a volte anche intensi, regrediscono alla sospensione del trattamento (Culine et al., 2006).

ANTICORPI MONOCLONALI:



Gli anticorpi sono delle piccole proteine (normalmente sintetizzate e liberate dai Linfociti B) che legano in modo specifico gli antigeni presenti sulla superficie delle cellule estranee all'organismo (figura 5). Anche le cellule tumorali esprimono sulla superficie antigeni "anomali" (Ross et al., 2003), che possono essere riconosciuti da anticorpi specifici. Questo legame può portare la cellula alla morte o al riconoscimento da parte del sistema immunitario che provvede ad eliminarla.

Figura 5. Anticorpo monoclonale.

Il legame dell'anticorpo a un target generico, porta al riconoscimento della cellula tumorale da parte del sistema immunitario e la sua distruzione. Si ha il legame e il blocco di recettore specifico come Endotelian Growth Factor Receptor (EGFR) così da impedire il signaling cellulare e rallentare la crescita della cellula (Hemminki 2002). Gli anticorpi possono inoltre trasportare un farmaco citotossico da rilasciare una volta che si attua il legame con la cellula tumorale (Wu et al., 2006).

TERAPIA GENICA

In termini generali per terapia genica si intende un trasferimento di materiale genetico a scopo terapeutico. A differenza delle classiche terapie farmacologiche, invece di utilizzare una molecola con capacità citotossiche, vengono forniti al paziente tramite veicolazione virale (Retro virus o Adeno virus) o liposomica, uno o più geni che si vanno a sostituire ai geni che nelle cellule "malate" non agiscono più in maniera fisiologica (Kaplan, 2005).

Il problema principale della terapia genica al momento attuale risiede nella mancanza di vettori sicuri per il paziente e specifici per le cellule tumorali (Young et al., 2006).

PLASMAFERESI (LEUCEMIE)

La plasmateresi consiste nel prelievo di sangue dal paziente e il suo trasferimento ad un macchinario che separa il plasma dalle cellule ematiche.

Il plasma prelevato contiene anticorpi superflui e quindi non viene reinfuso nel paziente. Le cellule ematiche normali, invece, vengono reimmesse nel flusso ematico insieme al plasma di un donatore. La plasmaferesi non prevede la formazione di nuovi anticorpi.

TRAPIANTO DI MIDOLLO OSSEO

Il trapianto di midollo osseo (Tmo) consiste nel trasferimento di cellule staminali ematopoietiche nel paziente ricevente. Le nuove cellule, differenziandosi potranno rigenerare le cellule del sangue del paziente malato, ristabilendo un normale equilibrio ematologico e immunologico.

Esistono due tipi di TMO:

il TMO autologo, ottenuto con il trapianto di cellule staminali prelevate dal paziente stesso, dopo opportuno trattamento;

il TMO allogenico, ovvero il trapianto di midollo tramite il prelievo di cellule staminali sane da un donatore.

NUOVI APPROCCI TERAPEUTICI ANTITUMORALI

Gli studi sempre più approfonditi degli eventi molecolari alla base della sopravvivenza ed allo sviluppo delle cellule tumorali e dei meccanismi secondo i quali tali cellule riescono a sviluppare resistenza ai farmaci usati in clinica stanno permettendo di mettere a punto strategie nuove e diverse per la lotta al cancro.

Si cerca di riuscire a colpire in maniera più selettiva solo le cellule “malate”, direttamente, sfruttando cioè dei veri e propri bersagli tumorali, o indirettamente, andando a colpire processi indispensabili alla loro sopravvivenza quali, ad esempio, l'angiogenesi.

Tra i bersagli più rilevanti attualmente in sperimentazione vi sono:

Recettori di fattori di crescita, che favoriscono sia, l'accrescimento del tumore sia, l'angiogenesi tumorale (Ma et al., 1998).

Proteine implicate nei meccanismi attraverso cui le cellule tumorali resistono alle terapie radianti e farmacologiche (come bcl-2) o, viceversa muoiono in seguito ad esse (Hu et al., 2003).

Protein-tirosina fosfatasi (PTP), enzimi funzionali come soppressori tumorali (Ostman et al., 2006).

Proteine di membrana che sono espresse o che funzionano in maniera anomala solo nelle cellule tumorali come ad esempio varianti del recettore CD44 (Nair et al., 2005).

I nuovi agenti antitumorali in grado di bloccare selettivamente i bersagli elencati hanno struttura e meccanismi di azione molto diversi e le modalità di attuazione della chemioterapia poi, dipendono dal sottotipo di neoplasia.

I FARMACI ANTIANGIOGENICI

L'inibizione dell'angiogenesi presenta diversi vantaggi teorici rispetto alla chemioterapia:

- diverso target biologico,
- scarsa tossicità sistemica
- assenza di resistenza farmacologica (Bohem et al., 1997).

Tuttavia, come singola modalità terapeutica può essere solo parzialmente attiva in quei tumori in cui la crescita e le metastasi sono sostenute anche da altri meccanismi biologici o in presenza di grosse masse tumorali. Si può ipotizzare pertanto che la terapia antiangiogenica sia una promettente terapia antitumorale di sostegno se associata con i trattamenti convenzionali e/o con altri modificatori della risposta biologica (Burke et al, 2001).

L'ANGIOGENESI

Per la sopravvivenza e la crescita, il tumore ha costante necessità di nutrimento. Pertanto, è fondamentale per il suo mantenimento il riuscire a formare nuovi vasi sanguigni che partendo da vasi preesistenti nelle vicinanze portino sangue e nutrimento alla massa in crescita (Siemann et al, 2002). Tale processo non è estraneo alla fisiologia umana, anzi è fondamentale in molti processi fisiologici e patologici, quali lo sviluppo embrionale o nella cicatrizzazione delle ferite del ciclo mestruale, ed è conosciuto con il termine di angiogenesi.

La formazione di un vaso passa attraverso diversi stadi ben definiti, caratterizzati da modificazioni dell'endotelio e della matrice extracellulare.

Si individuano 4 tappe nel processo angiogenico:

- 1) Destabilizzazione dei vasi preesistenti in seguito ad un aumento della permeabilità vasale e ad una perdita delle connessioni tra le cellule endoteliali.
- 2) Migrazione e proliferazione delle cellule endoteliali in una zona del tessuto dove è necessaria la formazione di nuovi vasi. In questa fase avviene la

liberazione di enzimi proteolitici che modificano la matrice extracellulare, facilitando la migrazione delle cellule endoteliali.

3) Differenziazione delle cellule endoteliali caratterizzata da un arresto della proliferazione cellulare e dalla formazione di capillari primitivi.

4) Richiamo di cellule subendoteliali di supporto quali i periciti e le cellule della muscolatura liscia. Avviene così una riorganizzazione delle interazioni cellulari. (Sholley et al., 1984; Folkman et al., 1987)

In qualsiasi tipo di processo angiogenico, sia fisiologico che patologico, l'inizio della risposta angiogenica si ha con l'attivazione delle cellule endoteliali per il rilascio di citochine a seguito di ipossia o ischemia (Gasparini et al, 1994). Dalle cellule tumorali ipossiche, dai macrofagi e dalle altre cellule del sistema immunitario, viene prodotto il fattore di crescita endoteliale (VEGF) che provoca vasodilatazione e aumento della permeabilità vascolare, il rilascio di proteasi, e il rimodellamento dei tessuti.

Accanto al VEGF, vanno poi ricordati il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF), l'interleuchina 4 (IL-4) e l'interleuchina 8 (IL-8). Nell'angiogenesi tumore-associata l'equilibrio tra queste risulta alterato o per una ridotta produzione di fattori ad attività inibitoria o per una eccessiva produzione e liberazione di sostanze ad azione proangiogenica (Hanahan et al, 1996).

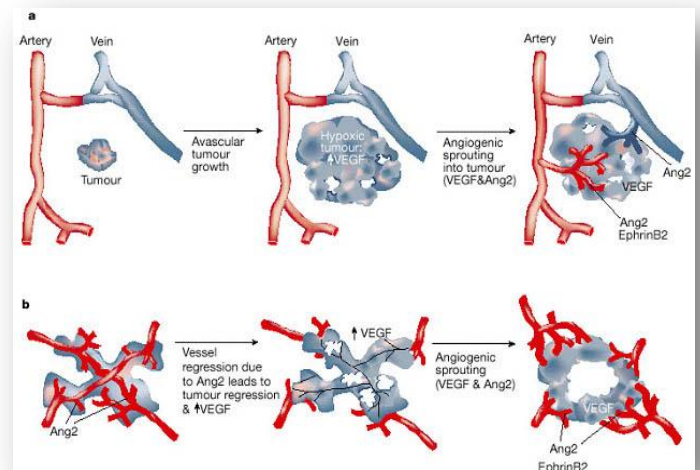


Figura 6. Angiogenesi tumorale.

La vascolarizzazione tumorale mostra due effetti contrapposti: da una parte la struttura della parete dei vasi tumorali disturba gli scambi transvascolari di sostanze nutritive (dannoso per il tumore) e di molecole terapeutiche (vantaggioso per il tumore); dall'altra parte la struttura dei vasi permette un facile accesso per le cellule tumorali alla vascolarizzazione, facilitando così l'insorgenza di metastasi.

I FARMACI ANTIANGIOGENICI

Attualmente, sono stati identificati circa 40 farmaci per i loro effetti antiangiogenici, dimostrati sia in modelli *in vitro* (inibizione della crescita di cellule endoteliali) sia *in vivo* (attività angiosoppressiva di tumori umani trapiantati su topo nudo, test su membrana corioallantoidea ed impianto su cornea di coniglio (Folkman, 2003).

Caratteristica comune degli inibitori dell'angiogenesi è il blocco della crescita tumorale non attraverso un'azione citotossica diretta sulle cellule neoplastiche, ma attraverso il blocco dei meccanismi che regolano la neovascolarizzazione tumorale (Gille, 2006).

Possiamo classificare i farmaci antiangiogenici in quattro categorie:

- Inibitori naturali dell'angiogenesi: angiostatina, endostatina (O'Reilly et al, 1994; O'Reilly et al, 1997).
- Farmaci con potenziale attività angiosoppressiva già utilizzati per patologie non neoplastiche: talidomide, captopril, furosemide (D'Amato et al., 1994; Volpert et al., 1996; Panet et al., 1994).
- Farmaci citotossici con parziale attività di inibizione dell'angiogenesi: interferone, interleuchina 2 (Ezekowitz et al., 1992; Voest et al., 1995).
- Nuovi agenti specificamente sviluppati come inibitori dell'angiogenesi.

La terapia antiangiogenica non è da considerarsi mirata ai soli tumori solidi, ma si può estendere al trattamento di leucemie e linfomi (Padro et al., 2000). Infatti la secrezione autocrina e paracrina dei fattori di crescita angiogenici ed ematopoietici, quali VEGF (vascular endothelial growth factor) e SCF (stem cell factor), può promuovere la proliferazione e la sopravvivenza dei blasti leucemici nel midollo osseo (Maher Albitar, 2001).

Il normale letto vascolare nel midollo osseo forma una rete sinoidale che funge da supporto per le cellule ematopoietiche, simile ai supporti cellulari presenti negli altri organi, come ad esempio i reni e la milza (Aguayo et al., 2000)

La crescita della leucemia mieloide acuta (AML) dipende dall'interazione tra blasti leucemici e le cellule del microambiente del midollo osseo. Queste cellule includono le cellule endoteliali, i fibroblasti, le cellule adipose e macrofagi.

Nelle biopsie del midollo osseo, nei pazienti affetti da AML, è stato notato un numero più elevato (in confronto a pazienti sani) di cellule endoteliali, ossia un aumento della densità dei microvasi, l'aumento dei livelli di VEGF, di TNF- α , e di FGF (fibroblastic growth factor).

I blasti di pazienti affetti da AML secernono, in continuazione, il VEGF. Questo induce l'attivazione e la proliferazione delle cellule endoteliali che, a loro volta, producono fattori di crescita ematopoietici (SCF oppure GM-CSF).

I blasti della AML, tra l'altro, esprimono recettori per SCF (denominati c-kit) in circa la metà dei casi ed uno dei recettori per VEGF (VEGFR-2). Questi recettori potrebbero essere coinvolti nella proliferazione delle cellule leucemiche e nello sviluppo della resistenza all'apoptosi, come conseguenza alla risposta dello stimolo di crescita dato dalle cellule endoteliali dal microambiente del midollo osseo. (Fiedler et al., 2003).

FARMACI ANTINEOPLASTICI VEICOLATI IN MANIERA SPECIFICA

Come già accennato, la maggioranza dei chemioterapici classici manca di specificità verso le cellule tumorali. Questo porta all'insorgenza dei molteplici effetti tossici legati al loro utilizzo, fatto che sempre più spesso ne limita l'efficacia in terapia. Inoltre numerosi farmaci potenziali spesso dimostrano in vitro delle ottime caratteristiche antitumorali, ma, o per l'insorgenza di effetti collaterali pesanti, dovuti alla loro scarsa selettività, oppure in quanto vanno incontro a rapide reazioni metaboliche e vengono quindi degradati prima di poter agire (è questo il caso, per esempio, del sodio butirrato) non riescono a trovare applicazioni cliniche.

Lo studio si è rivolto quindi alla progettazione di vettori che riconoscono selettivamente le cellule tumorali, mediante i quali sia possibile veicolare i farmaci antitumorali ad essi legati esclusivamente laddove sia necessaria la loro azione, risolvendo pertanto i problemi legati sia alla scarsa selettività, sia all'eventuale instabilità dei citotossici.

Un approccio molto studiato per la veicolazione di chemioterapici è quello di utilizzare liposomi, ovvero piccole sfere lipidiche opportunamente sintetizzate che racchiudono all'interno il farmaco. Queste sfere altro non sono che piccoli depositi che possono contenere un antigene, un antibiotico, un allergene, un farmaco o un gene ed essere introdotti nell'organismo senza provocare reazioni immunitarie di rigetto.

Accanto a queste, ultimamente si è cercato di associare vecchi chemioterapici o chemioterapici mai arrivati in clinica a molecole vettore come l'acido ialuronico (HA), il polietilenglicole (PEG), il polivinilpirrolidone (PVP) o polimeri acrilici opportunamente modificati chimicamente (PLGA).

I LIPOSOMI

I liposomi sono microsfeere cave formate da uno o più doppi strati lipidici (figura 9).

Fin dagli anni '80 sono stati utilizzati, in forma sperimentale, come veicoli di farmaci. Inoltre, la comprensione del loro comportamento *in vivo* ha permesso di realizzare studi più mirati sul trattamento specifico di determinate patologie.

Attualmente, esistono varie aziende che si occupano di biotecnologia che stanno lavorando esclusivamente con i liposomi per lo sviluppo di diversi trattamenti:

antibiotici,

antitumorali,

di sensibilizzazione allergica,

terapia genica.

Il grande interesse suscitato dai liposomi risiede nella loro membrana (costituita da colesterolo e fosfolipidi come la fosfatidilcolina e il diacetilfosfato), la cui struttura, composizione e proporzioni sono praticamente identiche alla membrana citoplasmatica delle cellule dell'ospite.

I fosfolipidi hanno una coda idrofobica e una testa idrofila per cui, se posti in acqua, si riorganizzano allineando le code idrofobiche le une con le altre e mettendo le teste idrofile a contatto con l'esterno e con l'ambiente acquoso interno (disposizione analoga a quella delle micelle). Di conseguenza, si forma una membrana a doppio strato lipidico che si richiude su se stessa dando origine a piccole vescicole simili alle cellule dell'organismo ed ai suoi organuli.

Un ulteriore vantaggio dei liposomi deriva dal fatto che essi possono essere "costruiti" ottimizzandoli per il tipo di sostanza che dovranno veicolare. Ad esempio, per diminuire la velocità di degradazione del liposoma e rallentare la liberazione del suo contenuto, si può agire modificandone composizione e dimensioni. Si può anche

aumentare l'affinità dei liposomi per un determinato tessuto modificando la loro composizione, la carica elettrica (aggiungendo stearylammina si ottengono vescicole con carica positiva; con fosfato dicetilico, si ottengono cariche negative) o anche aggiungendo recettori o antigeni adesivi, il che porta ad un aumento di affinità del liposoma per l'organo bersaglio e conseguentemente ad un aumento della concentrazione del farmaco in tale sito (Manosroi et al., 2002).

E' possibile classificare i liposomi in base alle loro diverse e più rilevanti caratteristiche: le dimensioni, la lamellarità (numero di doppi strati lipidici di cui è composto il liposoma) ed il metodo di preparazione adottato. Questi parametri, oltre che definire le differenze fra i liposomi, comportano significative caratteristiche, quali

stabilità, farmacocinetica e biodisponibilità e possono ovviamente influenzare notevolmente le possibilità di utilizzo dei liposomi come carrier di sostanze attive.

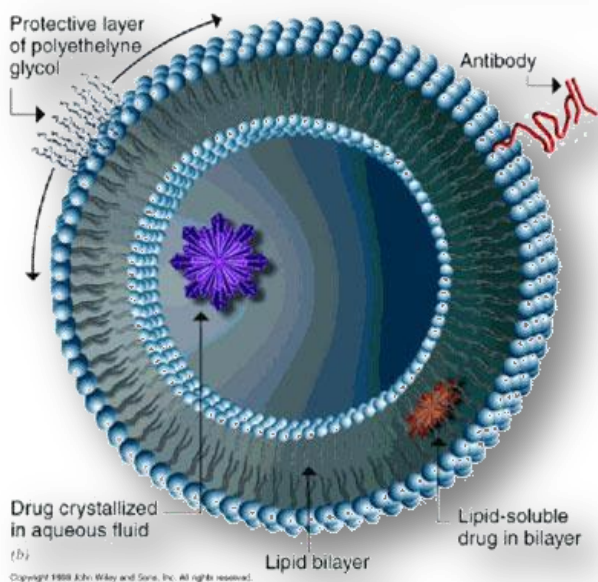


Figura 7. Struttura di un liposoma.

Solitamente, la classificazione più utilizzata tende a raggruppare tali strutture in soli quattro gruppi in base alla natura del liposoma.

Si distinguono in tal senso:

Liposomi sensibili al pH: sono liposomi che data la loro struttura particolare sono sensibili ad eventuali abbassamenti di pH. A pH 6.5 i lipidi che li costituiscono si protonano e favoriscono la liberazione del farmaco. Si osserva spesso che nei distretti del corpo dove sono presenti tumori si ha un sensibile abbassamento del pH rispetto a quello fisiologico, questo a causa del tessuto necrotico che va formandosi con la crescita del tumore (Smallbone et al., 2005).

Liposomi termosensibili: sono liposomi che diventano permeabili al farmaco, e quindi lo rilasciano, ad una temperatura critica (generalmente intorno a 38-39 gradi). Quindi, dopo somministrazione, si provvede a riscaldare la zona dove è presente la massa tumorale, ad esempio tramite ultrasuoni, facendo sì che ci sia un forte rilascio di farmaco solo nella zona da trattare. Questo porta a numerosi vantaggi: innanzitutto il farmaco è concentrato nella zona interessata (quindi necessitano dosaggi più bassi), secondariamente si riducono eventuali tossicità in altri distretti come reni e fegato (Mills et al., 2004).

Immunoliposomi: vengono creati e studiati in maniera tale che si aprano e liberino il farmaco quando entrano in contatto con una cellula che presenti un antigene specifico. Questo è realizzato integrando nella membrana fosfolipidica del liposoma anticorpi monoclonali specifici per antigeni tumorali. In questo modo, il legame tra antigene e anticorpo avvicinerà in maniera determinante il liposoma alla cellula bersaglio liberando il farmaco preferenzialmente su quest'ultima (Park, 2002).

Niosomi: acronimo registrato di non ionic liposomes, sono un'evoluzione dei liposomi, dove i fosfolipidi di membrana sono costituiti da lipidi anfifilici non ionici di sintesi. I niosomi sono coperti da particelle lipidiche lamellari, che secondo l'azienda che ha registrato il nome, imitano le particelle lipidiche intercellulari presenti nella pelle. I niosomi o le nanocapsule hanno dimensioni inferiori ai 200 nanometri, equivalenti allo spazio intercellulare presente nello strato corneale. I principali vantaggi dell'uso di questi vettori in terapia sono la possibilità di somministrare sostanze poco solubili in acqua, la modificazione della biodistribuzione dei principi attivi, la possibilità di rilasciare in modo controllato la molecola incorporata, il miglioramento dell'indice terapeutico attraverso l'aumento della quantità di farmaco che raggiunge il sito d'azione farmacologico e la diminuzione della concentrazione di principio attivo nei siti aspecifici. Infine, l'incorporazione di una molecola nelle nanoparticelle permette di proteggerla dalla degradazione e/o inattivazione precoce nell'organismo. Le nanoparticelle possono contenere farmaci antitumorali come la doxorubicina, attiva nel carcinoma mammario ed ovarico (Uchegbu et al., 1996) e sono state utilizzate in formulazioni con agenti antifungini (Ning et al., 2006).

Per aumentare ulteriormente l'emivita plasmatica di questi sistemi colloidali è possibile modificare la loro superficie con dei polimeri idrofili, flessibili e non ionici,

come il polietilenglicole (PEG). In questo modo i liposomi pegilati possono circolare liberamente senza venire distrutti: restano nel sangue per 2-3 settimane senza liberare il farmaco e gradualmente entrano nelle cellule cancerose attraverso i capillari del tumore. Infatti, i capillari neoformati destinati ad irrorare le aree tumorali sono più permeabili rispetto a quelli dei tessuti sani, perciò favoriscono nel tessuto neoplastico un accumulo dei liposomi che quindi rilasciano il principio attivo proprio nel microambiente tumorale svolgendo selettivamente la sua azione tossica sulle cellule cancerose.

Come i liposomi liberano il loro contenuto è riassumibile in pochi meccanismi (figura 8):

Adsorbimento: il liposoma entra nella membrana cellulare e, pur mantenendo la sua identità, libera il farmaco.

Trasferimento o scambio di lipidi tra cellula e liposoma: questo meccanismo fa sì che durante il trasferimento lipidico da membrana cellulare a liposoma (e viceversa) ci sia anche la liberazione del farmaco.

Fusione con la membrana cellulare: la membrana del liposoma si fonde in maniera continua con quella cellulare liberandone il contenuto all'interno.

Endocitosi: il liposoma viene internalizzato così come si presenta e solo successivamente all'interno della cellula il farmaco viene liberato.

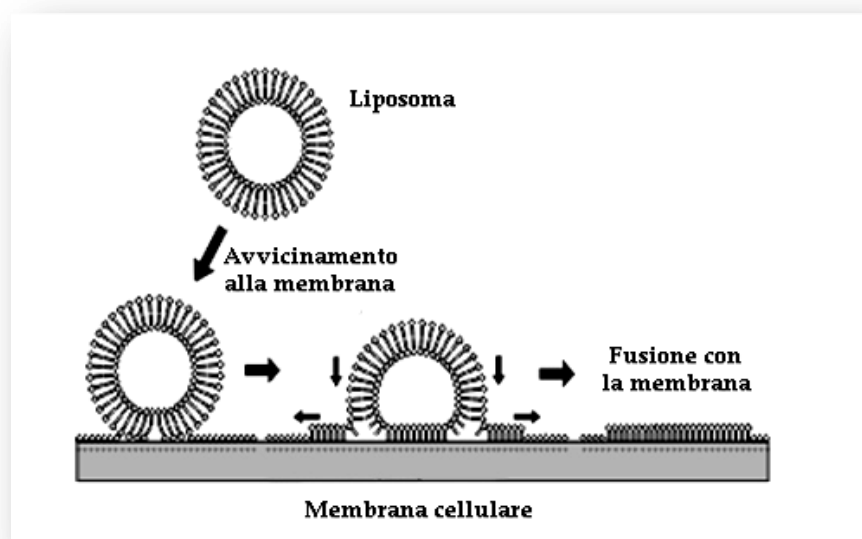


Figura 8. Esempio di fusione del liposoma con la membrana cellulare.

Tra i vari farmaci veicolati in modo selettivo per associazione con liposomi annoveriamo la doxorubicina nella cura di tumori della prostata (Harris et al., 2002) ed altri antitumorali usati nella cura di carcinoma di ovaio e seno, veicolati attraverso liposomi con PEG (Immordino et al., 2003).

I BIOCONIUGATI

Con il termine bioconiugati si intende qualsiasi composto macromolecolare di sintesi nato dal legame covalente tra una molecola di piccole dimensioni, nel nostro caso il farmaco, e un polimero di varia natura.

I polimeri più comunemente utilizzati sono:

i polietilenglicoli (PEG).

poliesteri alifatici biodegradabili (PGA - PLA - PCL).

polisaccaridi (acido ialuronico).

Il legame tra farmaco e vettore può essere diretto, ovvero il farmaco viene legato al polimero tramite un suo gruppo funzionale, oppure può essere presente uno spacer, spesso peptidico (Veronese et al., 1999).

L'utilizzo degli spacer ha senso in un'ottica di biodisponibilità del farmaco; è di scarsa utilità un farmaco che, legato ad un polimero, va incontro a lisi non appena iniettato per via endovenosa. La lisi è necessaria solo ad internalizzazione avvenuta, cioè quando ci si trova nel compartimento lisosomiale.

La massa piuttosto elevata del bioconiugato sembra favorire la localizzazione nei distretti che presentano neoplasia a causa della maggiore fenestrazione dei vasi, come succede per l'associazione con PEG (Takakura et al., 1998).

I polisaccaridi (vedi in seguito l'acido ialuronico) spesso sono ligandi per recettori di membrana particolarmente espressi in alcuni tumori come il CD44, e questo ne favorisce l'internalizzazione e l'azione del farmaco ad essi associati.

La schermatura dei polisaccaridi nei confronti del farmaco fa sì che l'azione idrolitica degli enzimi sia ridotta. Inoltre, un'eventuale azione immunogenica del farmaco è decisamente contrastata poiché i siti antigenici del farmaco sono mascherati.

Utilizzando un bioconiugato, si riduce l'escrezione renale grazie alla grandezza della molecola ed alla sua capacità di idratarsi; questo favorisce in genere la permanenza nel sangue e ne riduce la filtrazione.

Inoltre, la coniugazione, specie con polisaccaridi, aumenta significativamente la solubilità del farmaco; questo è utile in clinica perché ne facilita il dosaggio farmacologico (Veronese et al., 1999).

CONIUGATI CON POLIESTERI BIODEGRADABILI

Negli ultimi anni, poliesteri biodegradabili come il PLA (acido polilattico), il PGA (acido poliglicolico) e il PLGA (acido polilattico-co-glicolico) sono stati ampiamente studiati per un'ampia varietà di applicazioni farmaceutiche e biomediche (figura 9).

Questi biomateriali nascono dalla polimerizzazione di acido lattico e glicolico, accanto ai quali possono essere associate unità di acido butirrico o coprolattone.

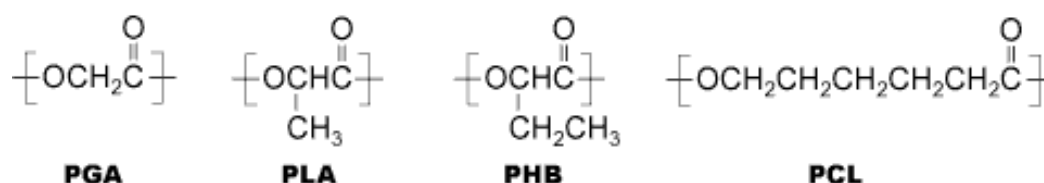


Figura 9. Poliesteri biodegradabili.

I polimeri e i copolimeri che ne derivano sono dotati di caratteristiche peculiari che fanno di essi dei promettenti carriers farmacologici.

Accanto a ciò bisogna tuttavia ricordare che i poliesteri biodegradabili sono notevolmente idrofobici e questo causa alcune limitazioni nelle formulazioni pratiche di farmaci. Per aggiungere caratteristiche idrofiliche e chimico-fisiche ottimali a tali biomateriali, ai poliesteri è stato incorporato del PEG (Kang et al., 2003).

Un'ampia varietà di formulazioni farmaceutiche sono state sviluppate utilizzando questi polimeri anfifilici (Bae et al., 2000), in particolare sono state sviluppate strutture come micro e nano particelle (Li et al., 2001), micelle (Liggins et

al., 2002), idrogel (Qiao et al., 2006) e sistemi iniettabili (Chaubal et al., 2002; Zhu et al., 2000).

Tale strategia in molti casi ha permesso di veicolare farmaci proteggendoli dall'inattivazione chimica o enzimatica e di prolungarne l'attività terapeutica.

L'esperienza più significativa nella microincapsulazione di proteine ha riguardato l'insulina bovina, proteina caratterizzata da una notevole instabilità chimica e conformazionale (Hinds et al., 2005; Ibrahim et al., 2005). Sono state messe a punto condizioni formulative ottimizzate per preservarne la stabilità grazie all'ausilio di tecniche di microincapsulazione diverse (emulsione e spray drying) nonché strategie per modulare la velocità di rilascio della proteina. Grazie all'impiego di ciclodestrine, è stato anche possibile preparare microsfele respirabili per la somministrazione polmonare (De Rosa et al., 2005).

La tecnologia delle microsfele biodegradabili a base di PLGA è applicata anche alla veicolazione di oligonucleotidi. Studi *in vitro* hanno mostrato una maggiore internalizzazione cellulare di oligonucleotidi dopo lento rilascio da microsfele, in confronto ad oligonucleotidi somministrati in forma libera (De Rosa et al., 2005).

Sono stati veicolati in questo modo anche alcuni antibiotici, inclusi la gentamicina (Schnieders et al., 2006) e la ciproflossacina (Makinen et al., 2005), agenti antifungini (Miyamoto et al., 1997), farmaci anti-infiammatori (Samati et al., 2006) ed anestetici (Seo et al., 2003).

I prodotti più interessanti sono tuttavia stati formulati nel settore della cura del cancro, dove una singola somministrazione mensile di farmaco veicolato attraverso polimeri biodegradabili ha sostituito trenta iniezioni giornaliere dello stesso principio attivo (Attawia et al., 1995)

BIOCONIUGATI CON POLIETILENGLICOLI

I PEG (polietilenglicoli) sono una classe di polimeri che deriva dall'ossido di etilene e sono classificati in funzione del loro peso molecolare medio (figura 10).

Quelli con peso inferiore a 200 hanno aspetto liquido-viscoso, quelli invece superiori a 200, fino a 40000, sono di aspetto solido-ceroso. Il PEG non sviluppa reazioni immunitarie, protegge i farmaci ad esso associati dall'azione di lisi degli

enzimi nel sangue, riduce la filtrazione (Roberts et al., 2002) ed aumenta il tempo di eliminazione del farmaco dall'organismo.

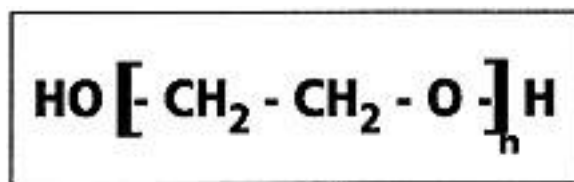


Figura 10. Struttura del PEG.

Al PEG quindi sono stati legati covalentemente anticorpi diretti verso un target tumorale (Chapman, 2002), ad esempio, è stato preparato un complesso con la doxorubicina che ne ha migliorato l'attività (Veronese et al., 2005).

Sono stati inoltre formulati due composti utilizzati nella cura dell'epatite C cronica unendo l'interferone α -2a (PEGASYS) ed α -2b (PEG-intron) al PEG, entrambi composti approvati ed usati da soli o in combinazione con il Ribavirin (Pedder, 2003).

Altra applicazione del PEG è quella di rivestimento di strutture di trasporto come nanosfere e liposomi. Come già detto precedentemente, il principale sito di eliminazione dei liposomi, e quindi dei farmaci da essi veicolati, è il sistema RES costituito dai macrofagi presenti a livello del fegato (cellule del Kupffer), della milza, del midollo osseo e dei linfonodi. Il modo migliore per evitare ciò è l'introduzione del PEG. Sempre in ambito oncologico, promettente è l'utilizzo di nanosfere pegilate con all'interno ormoni estrogeni (Ameller et al., 2003).

CONIUGATI CON POLISACCARIDI

I carboidrati possiedono particolari proprietà funzionali che li rendono substrati ideali per applicazioni farmaceutiche, sia come carrier inerti, sia come veicoli biologicamente attivi.

Essi infatti sono biocompatibili, non provocano reazioni immunitarie, sono solubili in acqua e in liquidi fisiologici e possiedono una struttura molecolare altamente versatile.

L'elevato numero di siti reattivi sulla catena polimerica permette l'ottenimento di elevati gradi di caricamento di farmaco e di tipologie di coniugazione: ad esempio, è possibile effettuare una coniugazione selettiva su uno specifico tipo di sito attivo, o

causale su diversi tipi di siti reattivi. In questo caso è possibile legare direttamente il farmaco al carboidrato o legarlo tramite un distanziatore. Inoltre, alcuni oligosaccaridi e polisaccaridi possiedono gruppi molecolari specifici che possono interagire con determinati recettori delle superfici cellulari (Veronese et al., 1999).

I sistemi farmaco-polisaccaridi presentano alcuni notevoli vantaggi:

- ✚ aumentano la solubilità di farmaci poco solubili.
- ✚ prolungano l'emivita del farmaco nel sistema circolatorio e, di conseguenza, aumentano l'attività del farmaco stesso.
- ✚ veicolano passivamente i coniugati verso tessuti tumorali mediante l'effetto "enhanced permeability and retention".
- ✚ veicolano i farmaci direttamente su cellule o tessuti mediante interazione selettiva tra recettori e gruppi molecolari presenti sul polisaccaride.

Questo permette di diminuire la dose di farmaco somministrato e ridurre gli effetti collaterali. Inoltre, dato che la solubilità è spesso un fattore limitante nella formulazione e nella somministrazione del farmaco, i chemioterapici vengono legati ai polimeri attraverso un legame chimico che sia idrolizzabile in ambiente fisiologico.

Uno dei polisaccaridi più utilizzato da questo punto di vista è l'acido ialuronico (HA). Esso interagisce specificatamente con un recettore di membrana, il CD44, overespresso sulla superficie delle cellule tumorali.

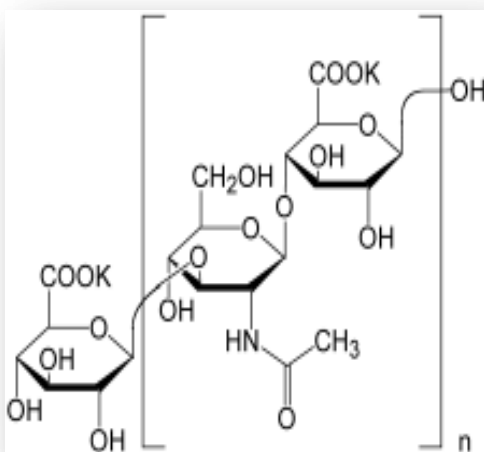
ACIDO IALURONICO

CARATTERISTICHE E FUNZIONI DELL'ACIDO IALURONICO (HA)

L'acido ialuronico (HA) è un glicosaminoglicano (GAG) lineare che consiste nella ripetizione di unità disaccaridiche di acido D-glucuronico e N-acetil-D-glucosamina [D-acido glucuronico ($\beta 1 \rightarrow 3$) N-acetil-D-glucosamina ($\beta 1 \rightarrow 4$)]_n (figura 11).

HA ha dei siti specifici di legame su recettori quali CD44, RHAMM e ICAM-1 tutti coinvolti in meccanismi cellulari come la riparazione cellulare, la proliferazione, la motilità e la regolazione della risposta infiammatoria (Weiss et al., 1998; Tzircotis et al., 2005).

Figura 11: Struttura dell'acido ialuronico.



HA è uno dei principali componenti polisaccaridici della matrice extracellulare dove svolge un ampio numero di funzioni strutturali. Esso è il principale componente strutturale di tessuti connettivi come la pelle, la cartilagine, l'umor vitreo e il cordone ombelicale, i tessuti mesenchimali dell'embrione dove costituisce un primitivo ambiente per le cellule in via di differenziamento.

L'acido ialuronico influenza l'idratazione e le proprietà fisiche dei tessuti (Laurent, 1992), partecipa ad un numero elevato di eventi fisiologici come l'adesione, la migrazione e la proliferazione cellulare (Toole, 1997), interagisce con altre molecole della matrice extracellulare come l'aggracano (Kiani et al., 2002) e con recettori di membrana, noti come CD44 (Aruffo et al., 1990).

Sempre HA poi gioca un ruolo importante in situazioni patologiche, incluso il cancro. Un aumento nella sintesi di HA è stato infatti dimostrato in diversi tumori

maligni, come il carcinoma del colon e il tumore del seno (Ropponen et al., 1998; Auvinen et al., 2000).

Esso promuove l'adesione e la migrazione delle cellule tumorali (Itano et al., 2002) e forma una barriera protettiva attorno ad esse, permettendo così la loro sopravvivenza (Toole, 2002).

Alla base di questa doppia natura dell'acido ialuronico vi è la differenza tra il peso molecolare dei vari residui che si considerano: molecole di HA di diversa grandezza hanno diversa funzione (Sugahara et al., 2003).

Così, è possibile affermare che:

- a. il polimero ad alto peso molecolare, sopra i 1000kDa, lo si trova in condizioni fisiologiche nella matrice extracellulare (Laurent et al., 1992).
- b. residui con peso molecolare minore sono associati a condizioni patologiche e soprattutto al cancro (Lokeshwar et al., 1997).

Nello specifico, è stato dimostrato che residui di HA da 4 a 20 oligomeri regolano il processo infiammatorio, inducendo l'espressione genica e la maturazione di citochine (Termeer et al., 2000); residui di circa 36 unità attivano le integrine delle cellule tumorali (Fujisaki et al., 1999), promuovono il cleavage del CD44 e la migrazione delle cellule tumorali, processo CD44 dipendente (Sugahara et al., 2005). Infine HA da 8 a 50 oligomeri inducono l'angiogenesi (Trochon et al., 1997) e la linfoangiogenesi (Guo et al., 2005).

E' stato inoltre dimostrato che alcune cellule tumorali (tra queste, in particolare, la linea cellulare MIA PaCa2) sono in grado di produrre e secernere nell'ambiente extracellulare almeno due tipi di ialuronidasi (I e II). In questo modo, sono in grado di degradare l'acido ialuronico costitutivo della matrice extracellulare, di peso molecolare superiore ai 200kDa, e di riportarlo a dimensioni dell'ordine di 10-40 oligomeri, in maniera da attivare autonomamente i processi favorevoli la progressione e l'invasione sopra elencati (Sugahara et al., 2005).

Per quanto concerne la capacità di HA di stimolare la motilità cellulare, è stato dimostrato che dipende essenzialmente dalla sovraespressione del recettore di membrana denominato CD44 (Aruffo et al., 1990).

Si tratta di un complesso espresso sulla superficie cellulare, la cui presenza è di notevole importanza in diversi eventi biologici, quali l'invasione e la migrazione cellulare (Naor et al., 1997).

Studi recenti su linee di cellule tumorali del pancreas hanno dimostrato che l'induzione del cleavage del CD44 da parte di piccoli oligosaccaridi di HA fornisce alle stesse cellule una maggior capacità di invadere i tessuti circostanti e di metastatizzare (Sugahara et al., 2005).

La capacità invece di HA di stimolare il processo di angiogenesi sembra essere correlata ad un effetto sinergico con il fattore di crescita VEGF sulla proliferazione delle cellule endoteliali e la formazione dei capillari *in vitro* (Montesano et al., 1996).

Gli innumerevoli studi condotti per valutare l'attività di HA endogeno hanno spinto i ricercatori a considerare quali potrebbero essere gli effetti indotti da HA qualora questo fosse somministrato dall'esterno.

In quest'ottica, sono stati condotti solo pochi esperimenti che hanno dimostrato che, diversamente dal corrispondente endogeno, l'HA esogeno mostra una certa attività antitumorale.

Alcuni oligomeri utilizzati, costituiti da 5 o 6 unità di disaccaride, hanno bloccato la crescita tumorale su esempi di melanoma murino (Zeng et al., 1998) e su un modello di carcinoma del colon (Ghatak et al., 2002).

CD44: RECETTORE DI MEMBRANA SPECIFICO PER L'ACIDO IALURONICO

CD44 è una proteina transmembrana di tipo 1, ha la funzione di principale molecola di adesione cellulare per l'acido ialuronico (HA) e di internalizzazione dello stesso (Nagano, Saya, 2004; Bajorat, 2000).

Come tutte le proteine transmembrana, anche CD44 è soggetto a glicosilazione, fosforilazione ed aggiunta di glicosamminoglicani. Al momento attuale non esiste una teoria unificatrice sulla funzione della glicosilazione del recettore, ovvero se questa influenzi o meno il legame dello stesso con l'acido ialuronico. In effetti, ricombinanti non glicosilati mantengono comunque la capacità di legare il substrato (www.glycoforum.gr.jp).

L'interazione tra acido ialuronico e CD44 influenza l'adesione ai componenti della matrice extracellulare ed è implicata nella stimolazione di aggregazione, proliferazione, migrazione cellulare e nell'angiogenesi (Turley et al., 2002).

Tutte queste proprietà biologiche sono essenziali nell'attività fisiologica delle cellule normali ma in particolari condizioni sono associate ad attività patologiche ed inoltre possono essere messe in atto dalle cellule tumorali (Naor et al., 2002).

Il legame tra l'acido ialuronico e la molecola di adesione CD44 può dare inizio ad una serie di eventi che cominciano con modificazioni dell'aderenza alla matrice e proseguono con l'attivazione di altre molecole (quali fattori di crescita), degradazione della matrice stessa, angiogenesi, permeazione dei vasi, extravasazione (Aruffo et al., 1990). Tutti questi steps sono necessari nell'iniziazione della via metastatica (Marhaba et al., 2004; Agnantis et al., 2004).

Schematicamente si possono considerare 4 domini come costituenti il recettore:

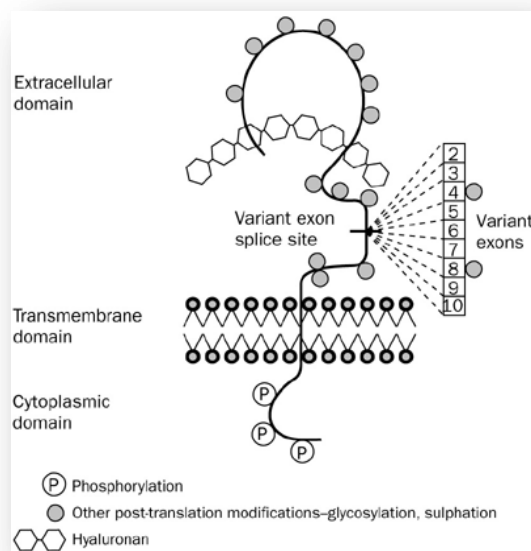
Un dominio distale extracellulare, sede del legame con acido ialuronico;

Un dominio prossimale extracellulare, in cui si riscontrano variazioni per splicing alternativo

Un dominio transmembrana, modulatore del legame col ligando

Un dominio citoplasmatico, responsabile dell'interazione con le proteine del citoscheletro e dell'attivazione dei segnali intracellulari. Anche questa regione è interessata a splicing alternativo, per formare 2 varianti (Short tail o Long tail).

Anche la porzione citoplasmatica del recettore sembra influenzare il legame con l'HA, ma una sua eventuale troncatura non ne preclude totalmente il legame. Si è visto infatti che i recettori tronchi hanno comunque capacità di legame verso alcuni anticorpi anti-CD44 (Lesley et al., 1992).



Il CD44 non lega solamente HA: esso infatti ha capacità di legame anche verso fibronectine (Lesley et al., 1993), verso la parte invariante delle MHC di classe II (Huet et al., 1989) e anche verso proteoglicani ad alto peso molecolare (Toyama Sorimachi et al., 1994).

Figura 12. Struttura del CD44.

L'eterogeneità di questi ligandi non stupisce considerando il fatto che il gene che codifica per il CD44 è composto da 20 esoni, i primi e gli ultimi 5 sono costanti, mentre i 10 centrali sono soggetti a splicing alternativo generando la "regione variabile" del recettore. A questo proposito, è stato dimostrato infatti che esistono circa una trentina diverse isoforme del recettore.

L'isoforma più comune del recettore è la CD44s (standard), altamente espressa nelle cellule ematopoietiche; al momento attuale sono state clonate 39 varianti (CD44v), molte delle quali risultano espresse su cellule tumorali, nate da splicing alternativo a livello della porzione extracellulare prossimale del recettore.

In alcuni casi la sovraespressione di CD44v(v3 e v6) (Bourguignon et al., 2003) risulta essere fattore di invasività cellulare e porta ad una maggiore aggressività del

tumore, come ad esempio nel carcinoma polmonare (Zhang et al., 1995) e nel melanoma (Nagano, Saya, 2004).

Inoltre, aumenti significativi di cleavage di CD44 sono stati riscontrati in numerosi tumori, ovvero nel 58% dei gliomi, nel 67% dei carcinomi del seno, nel 45% dei tumori polmonari non small cell, nel 90% dei carcinomi del colon e nel 25% dei carcinomi dell'ovaio (Okamoto et al., 2002).

E' comunque dimostrato che, da un punto di vista oncologico, il CD44 abbia una notevole importanza nello studio della progressione e dell' invasività tumorale. Un tumore invasivo infatti, per espandersi, aggredisce la matrice extracellulare dei tessuti circostanti ed il CD44 insieme all'acido ialuronico hanno un ruolo sicuramente determinante nei vari pathways cellulari (Nagano et al., 2004).

Il CD44 è coinvolto anche nel trasporto di linfociti circolanti ai linfonodi e nell'interazione linfocitica-epiteliale. Modula l'adesione e l'attivazione linfocitica, e il legame con HA, componente della matrice extracellulare, il che può portare alla metastatizzazione (Ayroldi et al., 1995).

Il CD44 è espresso anche sulla superficie delle cellule di pazienti affetti da leucemia mieloide acuta (AML). Dagli studi effettuati sulla AML, si è vista la possibilità di ribaltare il blocco della differenziazione attraverso il legame di anticorpi specifici con il CD44 (Gadhoum et al., 2004).

CD44 E ACIDO IALURONICO

Il recettore CD44 non solo è il principale recettore per l'acido ialuronico espresso sulle cellule, ma è anche responsabile del suo ingresso nella cellula. Studi effettuati su macrofagi alveolari, condrociti umani e bovini e sulla linea isolata SV-3T3 utilizzando acido ialuronico marcato hanno messo in luce un meccanismo vescicola-mediato di internalizzazione che è illustrato in figura 13. (Hua et al., 1993; Kaya et al., 1997)

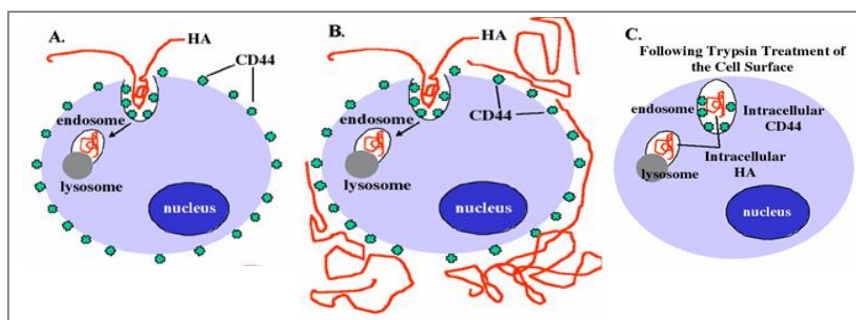


Figura 13. Meccanismo proposto per l'internalizzazione di HA

logica non si ritrovano secrete nell'ambiente extracellulare.

La struttura del recettore CD44, con un dominio extracitoplasmatico, un dominio transmembrana ed un dominio citoplasmatico, ricorda da vicino la struttura di molti trasduttori di segnale. Ma la coda citoplasmatica del recettore non possiede nessuna attività intrinseca, né come fosfatasi, né come tirosin chinasi. La trasduzione del segnale all'interno del citoplasma avviene per CD44 in maniera analoga al signaling delle integrine, ovvero, tramite la mediazione di proteine di segnale associate che si legano al dominio citoplasmatico di CD44.

In generale, le risposte evocate all'interno della cellula dal legame tra acido ialuronico e recettore CD44 sono molteplici, ma generalmente il tipo di risposta è determinato dalle dimensioni della molecola di HA che lega il recettore.

Numerosi studi sono stati condotti per cercare di spiegare verosimilmente quali siano i motivi di una tale eterogenicità di effetti. La spiegazione più accreditata al momento sembra essere la capacità dell'acido ialuronico di legare contemporaneamente più recettori, formando dei veri e propri "cluster".

Una volta all'interno della cellula, l'acido ialuronico viene degradato nell'endosoma così formato, ad opera di enzimi specifici, le ialuronidasi, che in situazione fisiologica

A seconda del numero di recettori “cristallizzati” dal legame con la molecola di acido ialuronico, non più liberi, cioè, di muoversi all’interno del mosaico fluido della membrana citoplasmatica in maniera indipendente, la risposta associata sarebbe differente, dipendentemente anche dal tipo di cellula che si prende in esame.

Nello specifico:

Cellule del sangue, embrionali o maligne: restano “quiescenti” con recettori CD44 liberi, ed il contatto ed il legame con l’acido ialuronico (soprattutto se in maniera focale) determina in esse un’attivazione verso la risposta migratoria, con riarrangiamenti a carico dell’actina del citoscheletro (Fujita et al., 2002; Murai et al., 2004).

Cellule normalmente legate alla matrice: lo stato di quiescenza è dato da un legame massivo di recettori CD44 ed acido ialuronico ad alto peso molecolare, che di fatto blocca i movimenti ai recettori. Per queste cellule, il segnale di attivazione è dato dall’inizio di movimento di recettori CD44, quando il ligando viene meno. Il legame può essere rescisso in numerosi modi:

- ✚ degradazione dell’acido ialuronico (Nishida et al., 2003)
- ✚ presenza di sCD44 (CD44 solubile, ovvero la porzione extra-citoplasmatica di CD44, che si stacca in condizioni patologiche) che compete con HA per il sito di legame (Peterson et al., 2000)
- ✚ cleavage dell’ectodominio di CD44 (Okamoto et al., 2001; Sugahra et al., 2003)
- ✚ presenza di frammenti di acido ialuronico di medie dimensioni (prodotte in situazione patologica) che competono per il sito di legame (Ghatak et al, 2002; Knudson et al., 2000).

Un comportamento molto particolare è stato notato per oligomeri di HA (oHA), costituiti da un bassissimo numero di ripetizioni del dimero costituente HA (3-10 ripetizioni). Essi sono infatti in grado di inibire la proliferazione tumorale in vivo (Zeng et al., 1998), inducono apoptosi (Ghatak et al., 2002, Alaniz et al, 2006), e reversiono la resistenza ai chemioterapici (Misra et al., 2003) a seguito del legame con il recettore CD44.

CD44 E SEGNALI INTRACELLULARI

Come sin qui ricordato, il recettore CD44 prende parte a numerosi processi cellulari:

- ✚ risulta coinvolto nella migrazione cellulare durante la morfogenesi, l'angiogenesi e nell'invasione tumorale e conseguente formazione di metastasi
- ✚ partecipa all'endocitosi, all'organizzazione ed alla ritenzione di acido ialuronico a livello cellulare
- ✚ media il rolling e l'adesione linfocitarie
- ✚ coordina segnali di contatto con la matrice extracellulare che bilanciano i pathway di sopravvivenza e morte cellulare.

Numerosi studi in letteratura hanno messo in luce la connessione tra CD44, acido ialuronico ed il sistema PI3K-Akt, la cui stimolazione porta alla fosforilazione di Akt (nota anche come PkB); p-Akt è coinvolta positivamente nei processi di sopravvivenza cellulare sopraelencati (Bourguignon et al., 2003), nonché nello sviluppo di resistenza ai chemioterapici (Misra et al., 2003; Misra et al., 2005).

L'attivazione di PI3K viene indotta infatti dal legame tra CD44 ed Acido Ialuronico. Il sistema PI3K/Akt sembra essere coinvolto nella promozione dei sistemi di sopravvivenza mediati dal recettore CD44.

Nello specifico, si è visto che:

- ✚ l'interazione tra acido ialuronico e CD44 è in grado di attivare la subunità catalitica p110 tramite interessamento di Rho chinasi e RhoGEF (Bourguignon et al., 2003);
- ✚ oligosaccaridi di HA inibiscono l'attivazione di PI3k indotta in cellule tumorali da acido ialuronico di medie dimensioni (Zeng et al., 1998, Ghatak et al., 2002, Misra et al., 2003)
- ✚ oligosaccaridi di HA sono in grado di sensibilizzare cellule MDR resistenti a diversi chemioterapici generata dal sistema PI3K/Akt (Russo et al., 2008).

PI3K: FOSFATIDILINOSITOLE 3 FOSFATO KINASI

Una o più mutazioni a carico della pathway di PI3K è stata riscontrata in almeno il 30% di tumori di origine umana (Shaw et al., 2006), inoltre è ormai associato che il legame tra acido ialuronico e CD44 porta nelle cellule tumorali ad una sua attivazione (Toole, 2004).

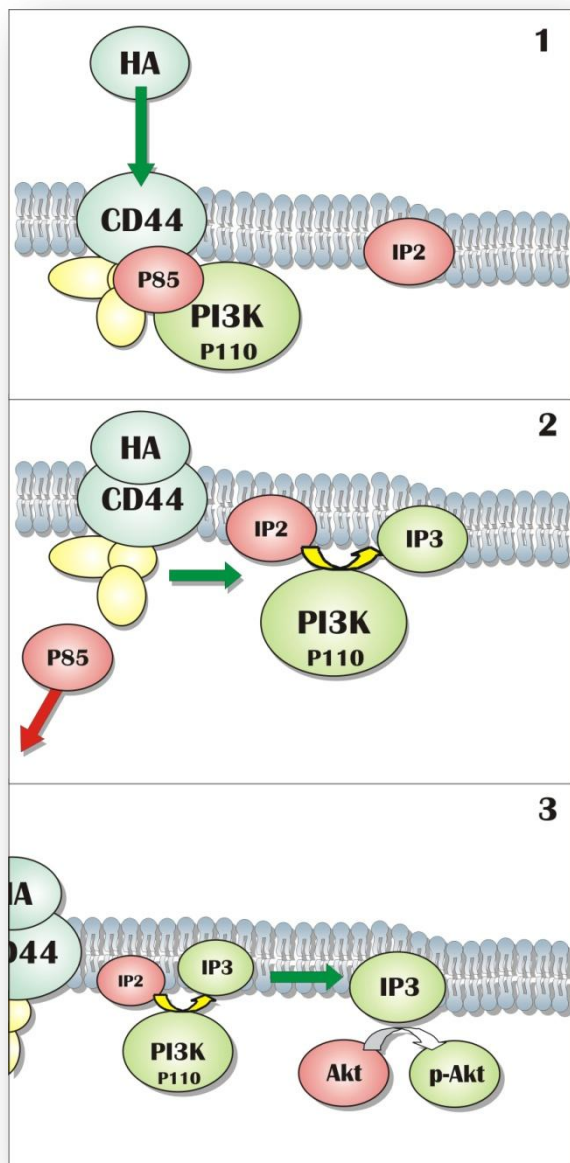


Figura 14. Meccanismo di attivazione del sistema PI3K/Akt.

Esistono diverse classi di PI3K, al momento, l'unica classe che si è vista essere coinvolta attivamente nelle cellule tumorali è la classe IA (Shaw et al., 2006).

L'attivazione di questo enzima innesca infatti una serie di reazioni rivolte tutte all'aumento della proliferazione ed alla sopravvivenza cellulare.

IA PI3K è formato da due subunità:

p110, subunità catalitica

p85, subunità regolatrice.

Nello stato quiescente, l'enzima si trova nel citoplasma sotto forma di dimero, di solito legato a recettori transmembrana, con la sub unità p85 che blocca il sito di legame per il fosfatidilinositolo(4,5)difosfato (IP2) (figura14, 1).

A seguito di un segnale di attivazione (ad esempio, il legame tra CD44 ed HA) un enzima ad attività tirosin chinasi scinde il legame tra le due

subunità, liberando la porzione catalitica. Questa recluta e trasforma fosfatidilinositolo(4,5)difosfato (IP2) che si trova nella membrana citoplasmatica a fosfatidilinositolo (3,4,5) trifosfato (IP3) (figura14, 2).

IP3 è in grado di legare enzimi che possiedono uno dei 2 diversi domini proteici:

FYVE

PH (Plekstrin Homology) domain (Kippel et al., 1996).

Del secondo gruppo fa parte la molecola effettrice più importante di PI3K, ovvero Akt. (Xia et al., 2006).

Nota anche come pKB o RAC, Akt è una ser-tyr chinasi, del peso approssimativo di 53kDa. Viene richiamata a livello della membrana citoplasmatica dalla presenza di fosfatidilinositolo(3,4,5)trifosfato e, una volta legata a IP3, viene da esso fosforilata (Ser-472 o Thr-308) (figura 14, 3) ed in seguito rilasciata nel citoplasma e/o traslocata nel nucleo (il meccanismo non è ancora chiaro).

La forma attiva p-Akt a sua volta fosforila una serie di proteine, diversamente coinvolte nella proliferazione cellulare e nell'apoptosi, su residui di serina o treonina.

Alcune di queste proteine sono riportate nello schema seguente:

- P
R
O
L
I
F
E
R
A
Z
I
O
N
E
- ✚ Glucogeno sintasi Kinasi (GSK)
 - ✚ GLUT4
 - ✚ Alcune chinasi ciclina dipendenti (P21, Waf1, Cip1 vengono inibite da p-Akt)
 - ✚ mTOR fosforilata promuove la sintesi di ciclina D, inoltre attiva fattori di trascrizione (attiva chinasi S6 e inattiva 4E-BP1)
 - ✚ TSC2, fosforilata da p-Akt ;
 - ✚ GSK viene inibita per fosforilazione da parte di p-Akt; questo porta ad una serie di eventi che porta ad un aumento intracellulare di ciclina D;
- A
N
T
I
A
P
O
P
T
O
S
I
- ✚ Bad (regola il rilascio di citocromo C dai mitocondri) viene inattivata per fosforilazione da p-Akt;
 - ✚ AFX, FKHR, FKHL1 fosforilate da p-Akt diminuiscono la trascrizione di geni proapoptotici;
 - ✚ I Kappa B Kinasi a attivata da p-Akt, downstream con attivazione di NFK-B e trascrizione di Bcl-XL, inibitori delle caspasi;
 - ✚ cAMP-response-element-binding-protein: la sua interazione con p-Akt aumenta la trascrizione di geni antiaoptosi quali Bcl2, Mcl1 e la stessa Akt, generando un feedback positivo del segnale.

(Cantley, 2002; Osaki et al., 2004).

L'attivazione di p-Akt ha inoltre effetto sul mantenimento del metabolismo cellulare in condizioni limitanti la crescita. Akt è infatti in grado di stimolare la produzione di ATP regolando sia l'espressione e l'attività di alcuni enzimi glicolitici, sia l'uptake cellulare di glucosio e di altri nutrienti (Shaw et al., 2006).

Inoltre, il sistema PI3K/Akt è risultato coinvolto nella modulazione della resistenza ai chemioterapici MDR mediata (Russo et al., 2008).

Il sistema PI3K/Akt è inibito da PTEN (Phosphatase and Tensin Homologue detected on chromosome TEN). Il substrato principale di questo enzima è IP3 (fosfatidilinositolo(3,4,5)trifosfato; la sua attività catalitica riduce i livelli di IP(3,4,5)P3 trasformandolo in IP(4,5)P2. Questo va ad abbattere la fosforilazione di Akt mediata da IP3.

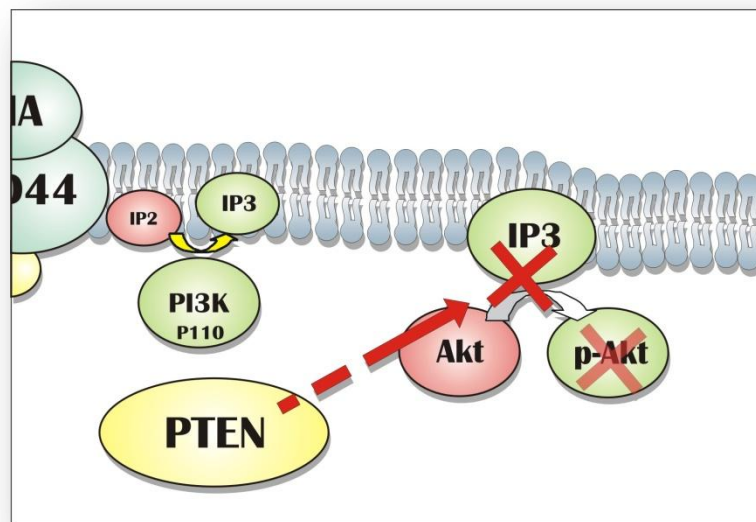


Figura 15. Attività inibitoria di PTEN.

Si è notata una tendenza alla down regolazione di questo inibitore in numerosi tumori primari ed in un grande numero di linee tumorali stabilizzate; inoltre la diminuzione di PTEN è correlata alla progressione del carcinoma ovarico (Obata et al, 1999).

All'atto pratico, la downregulation di questo enzima porta ad una attivazione permanente del sistema PI3K/Akt, favorendo tutta la serie di processi precedentemente elencati che portano ad un aumento dell'attività e della proliferazione cellulare.

BIOCONIUGATI DELL'ACIDO IALURONICO

Sono stati sviluppati numerosi bioconiugati contenenti acido ialuronico, ed alcuni di questi erano già stati oggetto di studio nel laboratorio da me frequentato.

Ho pertanto continuato lo studio su due bioconiugati che avevano dimostrato promettenti attività antitumorali (HABut e HBR7), contenenti i principi attivi sodio butirrato (NaBu) e acido all-trans retinoico (ATRA) (Coradini et al., 1999; Coradini et al., 2004).

Accanto a questo, lo studio è stato esteso a nuovi composti a base di desametasone.

A seguito, vengono riportate le caratteristiche dei diversi principi attivi presenti nei vari bioconiugati oggetto di questa tesi.

NABU E GLI INIBITORI DELLE ISTONEDEACETILASI

LOCALIZZAZIONE E FUNZIONE DEGLI ISTONI

Gli istoni sono una delle famiglie di proteine meglio evolutivamente conservate in tutti gli eucarioti. Il loro ruolo fondamentale è quello di organizzare il DNA, compattandolo in modo tale da consentire alle cellule di conservarlo in un volume ristretto come quello del nucleo. La famiglia degli istoni comprende le proteine H1, H2a, H2b, H3 e H4. Due proteine H2a, due H2b, due H3 e due H4 si uniscono a formare un ottamero, detto nucleosoma (figura 16). I nucleosomi hanno un diametro di circa 11 nm, ed il DNA vi si avvolge attorno per quasi due giri: in totale ogni nucleosoma ha quindi 146 bp di DNA avvolte intorno. Tra un nucleosoma e l'altro, è presente il DNA detto linker, che può variare in lunghezza tra poche basi fino a circa 150 (figura 16).

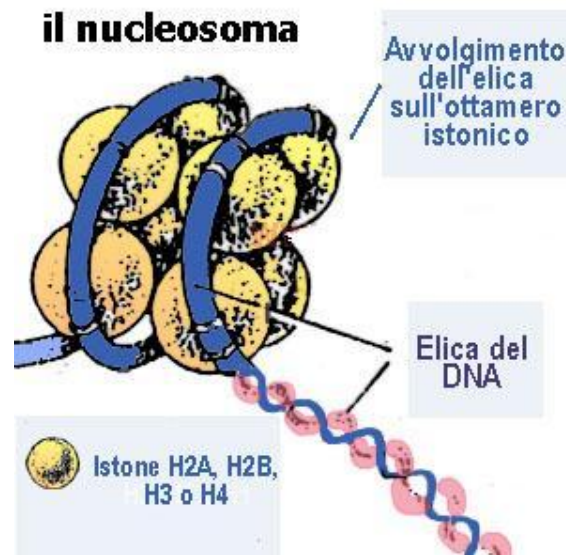


Figura 16. Il nucleosoma.

H1 pare prendere contatto proprio con il DNA linker; tuttavia il suo ruolo preciso non è ancora del tutto chiarito. I vari nucleosomi uniti dal DNA linker si presentano quindi come una serie di unità circolari, e formano la cosiddetta fibra da 10 nm. Gli istoni ed i nucleosomi da loro formati non vanno tuttavia pensati come entità completamente passive con funzioni puramente strutturali. Gli istoni infatti sono soggetti ad un gran numero di modificazioni post-traduzionali, tanto è vero che è ormai evidente l'esistenza di un vero e proprio "codice istonico". Le modificazioni post-traduzionali che interessano gli istoni possono essere acetilazioni (su residui di lisina), metilazioni (su arginine e lisine), fosforilazioni (su serine e treonine). Questo "codice istonico" stabilisce, ad esempio, quali siano le regioni di DNA accessibili dall'apparato trascrizionale, ed è quindi di fondamentale importanza nei meccanismi di regolazione dell'espressione genica.

GLI INIBITORI DELLE ISTONE DEACETILASI NELLA CARCINOGENESI

L'acetilazione e la deacetilazione degli istoni svolgono un ruolo essenziale nella modificazione della struttura della cromatina e nella regolazione dell'espressione genica negli eucarioti. Una mancanza di equilibrio nell'acetilazione o nella

deacetilazione degli istoni, con la conseguente repressione degli onco-soppressori, è un evento associato alla progressione tumorale.

Il livello di acetilazione delle proteine è regolata da due classi di enzimi: istone acetil-transferasi (HAT) ed istone deacetilasi (HDAC) che rispettivamente aggiungono o sottraggono un acetile all' ϵ -amino gruppo di residui di lisina collocati nel terminale amminico degli istoni (Marks et al., 2004). L'iperacetilazione e l'ipoacetilazione della cromatina promuovono rispettivamente l'espressione e la repressione genica.

Gli inibitori delle HDAC sono capaci di dereprimere geni la cui espressione è bloccata da un'alterata ipoacetilazione della cromatina, generando quindi processi come apoptosi, necrosi, differenziazione ed inibizione della proliferazione nelle cellule tumorali (Ballah et al., 2004). Il loro principale meccanismo d'azione consiste quindi nella riattivazione dei geni-soppressori silenziati dalle cellule tumorali come, ad esempio, il gene p21WAF1 (Villar-Garea et al., 2004).

Oltre ad aumentare il livello di acetilazione della cromatina, essi agiscono a livello del ciclo cellulare bloccando sia la fase G1 che G2 (Beamish et al., 2004).

Esistono diverse classi di inibitori degli HDAC che, nonostante differiscano per diverse caratteristiche biochimiche e biologiche, presentano tutte la stessa capacità nell'acetilare gli istoni. Questi farmaci sono utilizzati nella cura di malattie neurodegenerative oltre che al trattamento dei tumori solidi (Lehermann et al., 2002). In quest'ultimo caso sono stati eseguiti studi su diversi tipi di carcinomi tra cui quelli polmonari, ovarici (Takai et al., 2004), mammari (Margueron et al., 2004), alla prostata (Fronsdal et al., 2004) e del pancreas che hanno fornito promettenti risultati.

TRICOSTATINA-A (TSA)

La tricostatina è un induttore dell'apoptosi nelle linee cellulari dell'osteosarcoma HOS. Il trattamento con TSA aumenta l'acetilazione dell'istone H3 e determina la morte cellulare in seguito alla frammentazione del DNA, all'attivazione della procaspase-3, cleavage PARP (Roh et al., 2004).

ACIDO VALPROICO

Questo farmaco è stato ampiamente utilizzato come antiepilettico (Eyal et al., 2004). Recentemente è stato scoperto anche come inibitore degli enzimi istone

deacetilasi infatti inibisce la proliferazione cellulare, stimola l'apoptosi ed arresta il ciclo cellulare delle cellule maligne in modo particolare nel tumore ovarico senza manifestare effetti tossici (Takai et al., 2004) e nel tumore alla prostata umano (Thelen et al., 2004).

SODIO BUTIRRATO (NABU)

Costituito da una corta catena di acido grasso (Joseph et al., 2004), il sodio butirrato rappresenta un potente inibitore dell'istone deacetilasi, e di conseguenza induce iperacetilazione degli istoni H3 e H4.

Esso è in grado di indurre la differenziazione cellulare e inibire la crescita di una varietà di cellule tumorali umane, come quelle epatiche (Yamamoto et al., 1998) o quelle del tumore al seno (Coradini et al., 1997).

Studi condotti per chiarire il meccanismo d'azione del sodio butirrato hanno dimostrato che questo interferisce con diversi meccanismi cellulari, che convergono alla fine nella citodifferenziazione e nell'induzione dell'apoptosi (Coradini et al., 1999).

In particolare, ha dimostrato di modulare l'espressione di alcuni oncogeni come c-myc, di alcune proteine legate al ciclo cellulare e di geni che regolano l'apoptosi, come il p53 (Coradini et al., 1999).

Inoltre NaBu aumenta l'attività di vari enzimi antiossidanti quali glutatione reduttasi, glutatione perossidasi e catalasi. Questi dati suggeriscono che gli effetti del NaBu sono associati allo stress ossidativo (Louis et al., 2004).

Nelle cellule di tumore epatico umano HuH-6 esso induce la perdita della membrana mitocondriale, libera il citocromo c dai mitocondri, attiva le caspasi 9 e 3 (Emanuele et al., 2004). Ultimamente, ci si è soffermati sulla sua attività in vitro sulla crescita di due linee di carcinoma del polmone, in associazione ad HA (Coradini et al., 2004).

ATRA: TERAPIA DIFFERENZIANTE.

La nuova tattica, definita "terapia della differenziazione", si basa sulla ricerca del metodo di riconversione della cellula neoplastica a cellula normale ed origina dalla scoperta delle proprietà possedute dell'acido retinoico in tal senso.

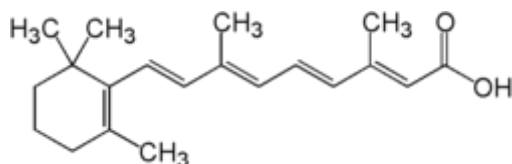


Figura 17. Acido retinoico.

L'acido retinico (RA), denominato anche ATRA (All-Trans Retinoic Acid), è un derivato della vitamina A di formula $C_{20}H_{28}O_2$ e con peso molecolare di 300,44 kDa (Figura 17). Esso è un composto organico carotenoide implicato in processi di differenziazione, crescita e sviluppo embrionale.

Il nome chimico dell'acido retinoico è acido 3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetil-1-cicloesen-1-il)-2,4,6,8-nonatetraenoico. Esso viene usato nei trattamenti delle acne e altri problemi dermatologici, ma anche nel trattamento della leucemia promielocitica acuta.

I derivati sia naturali che sintetici dell'acido retinoico (retinoidi) sono composti molto promettenti in ambito oncologico. Tali composti svolgono il loro effetto anti-leucemico e anti-tumorale attraverso tre diversi meccanismi: cito-differenziazione, arresto della crescita cellulare e apoptosi (morte cellulare programmata).

Questi meccanismi sono parzialmente dissociabili. Esistono, infatti, retinoidi di sintesi a forte effetto anti-proliferativo e/o cito-differenziante.

I derivati dei retinoidi (RRM, retinoid related molecules), originariamente sviluppati come agonisti specifici dei recettori nucleari per l'acido retinoico di tipo gamma (RAR-gamma) inducono apoptosi in diversi tipi di cellule leucemiche e carcinomatose.

L'acido retinoico, è in grado di interagire con la proteina anomala PML/RAR senza interferire con la funzione delle cellule ematiche normali, questa scoperta è stata proprio la chiave dello sviluppo della strategia terapeutica differenziante.

Rigorosi studi clinici hanno dimostrato che l'acido retinoico è in grado di restaurare la funzione normale e causare remissioni complete nei pazienti con leucemia promielocitica acuta (APL). Attualmente la chemioterapia in combinazione con l'acido retinoico è considerata il trattamento di scelta per pazienti con APL, e diventa la cura definitiva nell'80% dei casi.

Uno degli effetti clinici più significativi dell'acido retinoico è rappresentato dalla capacità di questo composto di favorire la maturazione del blasto leucemico verso un fenotipo più simile a quello della cellula normale.

L'utilizzo clinico dell'acido retinoico per il trattamento della APL rappresenta, al momento, il primo e unico esempio di terapia differenziante in ambito oncologico.

La terapia con acido retinoico ottiene la scomparsa della malattia nel 95% dei casi e l'assenza di ricadute per almeno 5 anni nell'80% dei casi. Il principio innovativo della ricerca è che il farmaco agisce esclusivamente sulla molecola anomala responsabile della malattia, invece che su tutta la cellula malata. La terapia con acido retinoico ha una tossicità estremamente bassa e il paziente può essere curato per lo più a domicilio.

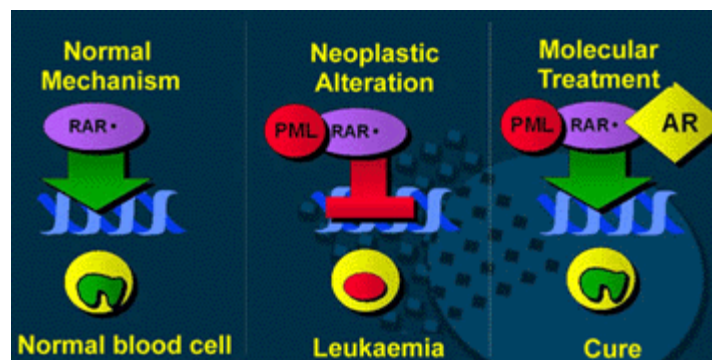


Figura 18. Trattamento di una cellula leucemica con acido retinoico.

Sono attualmente in corso alcuni studi clinici miranti a valutare l'efficacia di altre modalità terapeutiche con agenti differenzianti.

DESAMETASONE

Il Desametasone è un farmaco cortisonico sintetizzato chimicamente, analogo ai corticosteroidi surrenalici. Le sue proprietà sono riconducibili a quelli degli ormoni steroidei glucocorticoidi secreti dalla corteccia surrenale.

Regolano il metabolismo delle proteine e dei carboidrati, il bilancio idrico ed elettrolitico e, attraverso specifici meccanismi citosolici ed il legame al recettore per i glucocorticoidi (GR), svolgono un'attività antiinfiammatoria e immunosoppressiva inibendo l'espressione delle citochine pro-infiammatorie e molecole di adesione, e inducono apoptosi cellulare, sia nelle cellule sane che quelle neoplastiche (Cato and Wade, 1996; Fushimi et al., 1997; Getting et al., 1997).

Per tale motivo, hanno un ruolo cruciale nel trattamento delle patologie ematologiche, e soprattutto nella leucemia linfoblastica acuta, nel linfoma, nel mieloma multiplo e nelle malattie autoimmuni (Fourcher et al., 1997).

Essi esplicano il loro effetto grazie alla capacità di interagire con un recettore specifico.

IL RECETTORE PER I GLUCOCORTICOIDI

Il recettore per i glucocorticoidi fa parte della superfamiglia di recettori citoplasmatici per ormoni tiroidei/steroidi che include anche recettori per steroidi sessuali, mineralcorticoidi, ormone tiroideo, vitamina D e retinoidi.

Il recettore ligando-dipendente interviene nella crescita cellulare, sviluppo, funzioni metaboliche e risposta allo stress.

Il complesso recettore-glucocorticoide, viene traslocato nel nucleo della cellula ed interviene nella modulazione dell'espressione di una serie di geni (Distelhorst et al., 1984).

Esistono due forme di recettore:

- ✚ la forma GR α che lega i corticosteroidi
- ✚ la forma GR β che è una forma alternativa del recettore. Questa lega il DNA ma non viene attivata dai corticosteroidi. I livelli di espressione di GR β riscontrati nelle cellule umane sono molto bassi (Wu et al., 2004).

Il GR è formato da 777 aminoacidi ; sono riconoscibili tre domini principali:

- ✚ NTD (N-terminal domain): è il dominio regolatorio, scarsamente conservato sia in lunghezza sia in sequenza; detto anche regione ipervariabile. Questa regione è necessaria per la regolazione della trascrizione.
- ✚ DBD (DNA-Binding Domain): è altamente conservato e media il legame specifico con GREs (sequenze specifiche di DNA alle quali si lega l'omodimero attivato). E' costituito da 66 aminoacidi, e contiene 2 domini composti da 8 Cys che coordinano tetraedricamente 2 Zn²⁺ (domini ad alta affinità per DNA).
- ✚ HBD (Hormone Binding Domain): è il dominio che lega l'ormone. Contiene il terminale -COOH della proteina. Contiene sequenze necessarie per la localizzazione nel nucleo, la dimerizzazione del recettore e l'attivazione della trascrizione.

I GR nel citoplasma sono normalmente legati ad alcune chaperonine, il cui ruolo è quello di proteggere il recettore dal trasporto attraverso la membrana nucleare, legandosi al suo sito recettoriale (Wu et al., 2004).

Dopo il legame dei glucocorticoidi al recettore, si ha variazione conformazionale del recettore stesso, a cui segue la dissociazione dalle chaperonine e l'esposizione di segnali per la localizzazione nucleare. Il complesso GR, in forma dimerica, viene traslocato nel nucleo dove interagisce col DNA attraverso l'interazione diretta con specifiche sequenze del DNA, note come glucocorticoid response elements (GREs) (Figura 16). Infatti, il legame del dimero con le GREs generalmente promuove

l'attivazione di trascrizione di proteine antiinfiammatorie e attivazione delle istone acetilasi (Ito et al., 2000; Ito et al., 2001). Per il legame con i fattori di trascrizione (NK-kB, AP-1) è necessario un GR monomero (Ito et al., 2001).

Fosforilazioni a carico di residui di Ser e Thr da parte di protein-chinasi alterano la capacità di legame dei glucocorticoidi con il GR o la traslocazione nel nucleo (Bodwell et al. 1998; Ismaili et al. 2004).

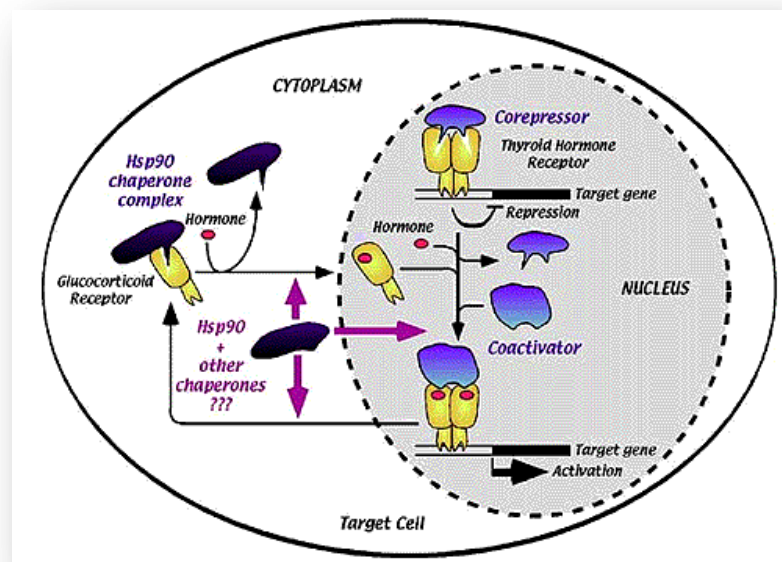


Figura 19. Traslocazione del complesso recettoriale nel nucleo.

L'attivazione di questi recettori scatena una serie di reazioni intracellulari, secondo lo schema riportato in figura 19. (Greenstein et al., 2002)

L'apoptosi mediata da glucocorticoidi è dovuta alla perdita del potenziale transmembrana nei mitocondri ed al rilascio di molecole proapoptotiche nel citosol.

Numerosi studi hanno cercato di determinare la relazione tra il numero di GR presente nel citosol e la sensibilità ai glucocorticoidi; e, mentre un numero minore di GR è stato associato al fenomeno della resistenza, per un numero elevato di GR non si è visto un aumento di sensibilità ai glucocorticoidi.

Da alcuni studi, il fenomeno della resistenza è stato attribuito alla forma β del recettore (Wu et al., 2004).

Inoltre, la resistenza è dovuta anche alla presenza di GR anomali che non hanno la capacità di dimerizzare, e quindi legarsi alle GRE's (Reichardt et al., 2001).

E' stato dimostrato che la resistenza ai glucocorticoidi nelle cellule leucemiche, e nello specifico per il desametasone, non è dovuta alla diminuita traslocazione del complesso recettoriale con desametasone nel nucleo, nè alla mutazione a livello del GR che impedisce il legame stesso con il desametasone, ma al possibile fallimento di espressione di proteine apoptotiche. (Bachmann et al., 2005).

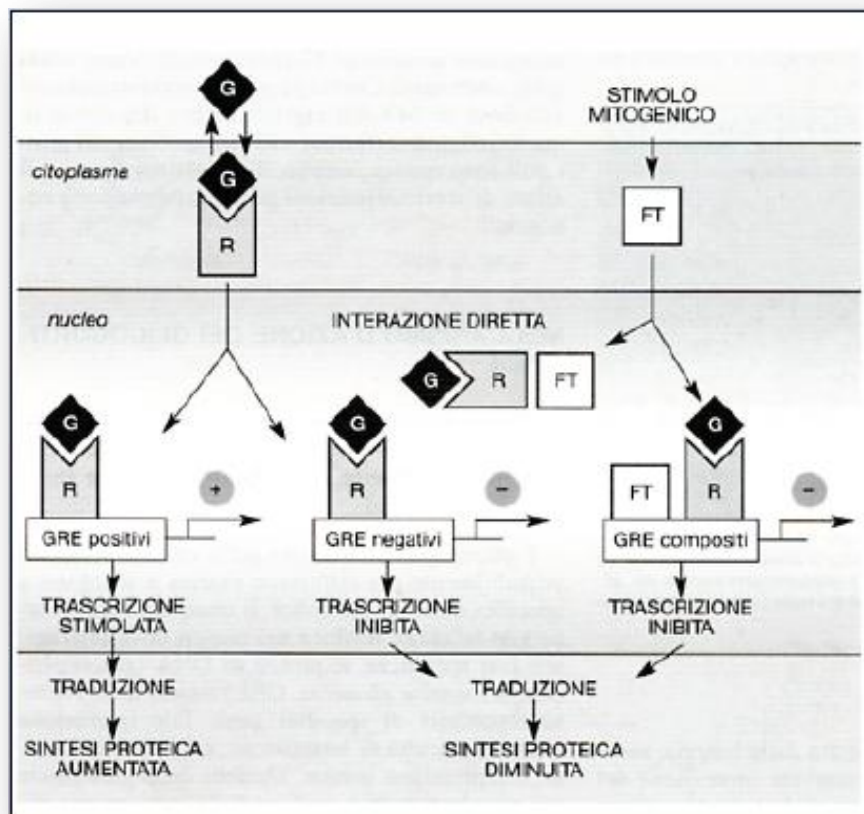


Figura 20. L'effetto di attivazione delle sequenze GREs.

DESAMETASONE IN CAMPO ONCOLOGICO.

Il desametasone è un utilizzato sia per via orale, IM, EV, sia per applicazioni locali, specie in campo oculistico, dermatologico, neurologico, pneumologico, allergologico ecc.

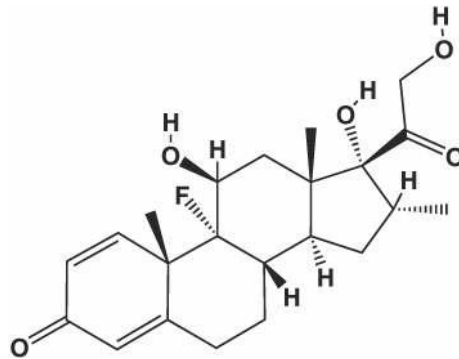


Figura 21. Struttura del desametasone.

E' uno tra i più attivi membri della sua classe, essendo circa 25-30 volte più potente dell'idrocortisone (ormone glucocorticoide secreto dalla corteccia surrenale).

A parità di dosi antiinfiammatorie, il desametasone ha effetti minimi sulla ritenzione sodica propria dell'idrocortisone e dei suoi derivati diretti ed ha una lunga durata d'azione, il che è dovuto all'assenza dell'attività mineralcorticoide.

Il desametasone viene usato in associazione ai chemioterapici antitumorali nel trattamento della leucemia linfatica acuta, dei linfomi e del mieloma multiplo, per le sue proprietà proapoptotiche, antiemetiche e antiinfiammatorie (Herr et al., 2003).

I meccanismi attraverso i quali il desametasone svolge un ruolo importante nella cura delle malattie neoplastiche sono molteplici, e alcuni ancora non del tutto noti.

Attraverso le GREs, il desametasone inibisce o attiva la sintesi proteica e l'espressione di determinati geni.

L'azione antiinfiammatoria e antiproliferativa dei glucocorticoidi è principalmente ottenuta attraverso l'inibizione del sistema del Fattore Nucleare Kappa B (NF-κB) (Antwerp et al., 1996).

NF- κ B regola un elevato numero di geni tra cui quelli che codificano per:

- ✚ Citochine (IL-1, IL-2, TNF, GM-CSF)
- ✚ Chemochine
- ✚ Molecole di adesione e enzimi inducibili (ICAM-1, iNOS, COX-2)

L' NK- κ B viene sintetizzato, in condizioni normali, in risposta all'infiammazione e costitutivamente nelle cellule tumorali. Infatti, l' NK- κ B regola molti meccanismi coinvolti nella cancerogenesi quali:

- ✚ autosufficienza nei segnali di crescita,
- ✚ insensibilità ai segnali di inibizione di crescita,
- ✚ insensibilità agli stimoli apoptotici,
- ✚ elevata angiogenesi
- ✚ invasione tissutale e metastasi (Hanahan et al., 1996).

Nelle cellule non stimulate, il fattore di trascrizione NF- κ B è legato alla proteina inibitrice I κ -B α nel citoplasma, mantenuto in tal modo in forma inattiva. Citochine pro-infiammatorie come IL-1 o TNF, interagendo con il proprio recettore, stimolano una serie di processi che sfociano nel distacco di NF- κ B dal suo inibitore. NF- κ B a sua volta trasloca nel nucleo e attiva la trascrizione di geni delle stesse e di altre citochine e inibisce l'apoptosi. Il desametasone, mediante attivazione trascrizionale, stimola la sintesi ex novo di I κ -B α , che si lega al NF- κ B e impedisce il suo legame con il DNA. Con questo meccanismo viene bloccata la trascrizione di determinati geni, tra i quali, quelli per le molecole d'adesione intracellulare, le ICAM-1.

Le ICAM-1 sono proteine di membrana che hanno il ruolo di adesione all'endotelio durante l'attivazione e l'infiammazione. Sono espresse su cellule endoteliali, sui linfociti B e T, su monociti e timociti. Esse permettono ai linfociti e/o leucociti di migrare nei focolai extravasali nella zona dell'infiammazione, ai linfociti di migrare nei tessuti linfatici secondari, e ai linfociti T e B di interagire tra di loro e con le altre cellule.

Inibendo questo meccanismo, viene inibita anche la migrazione dei linfoblasti leucemici, il che impedisce la progressione della malattia.

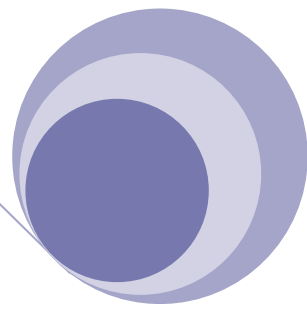
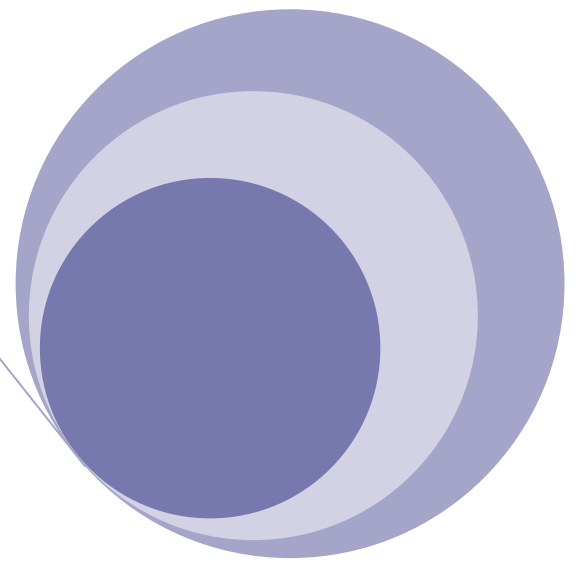
L'apoptosi indotta da desametasone è associata alla alcalinizzazione intracellulare, indotta attraverso la mobilitazione del calcio citosolico e l'attivazione

delle endonucleasi-calcio-dipendenti con la conseguente alterazione e frammentazione del DNA. Si è visto che l'apoptosi di timociti mediata da desametasone, *in vitro*, è pH-dipendente.

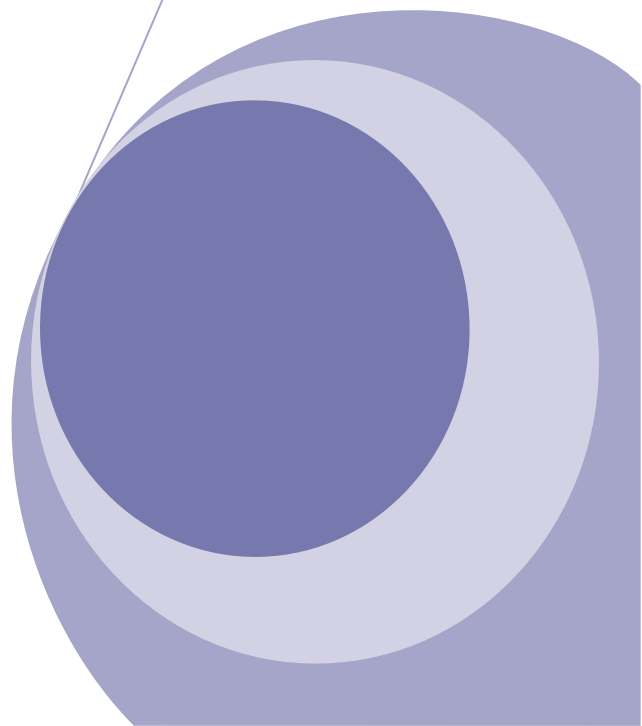
Inoltre, l'apoptosi cellulare viene indotta anche dal blocco del fattore di trascrizione NF-kB.

Il desametasone, viene usato in associazione con l'ATRA, nei pazienti con APL, per trattare la sindrome da ATRA. La sindrome da ATRA consiste nella comparsa di sintomi come la febbre, l'ipotensione, problemi respiratori ed edema. Si è visto che il desametasone associato in terapia all'acido retinoico non antagonizza gli effetti differenzianti dell'acido retinoico nelle cellule della leucemia promielocitica acuta (De Ridder et al., 1999). Inoltre, il desametasone associato ad antagonisti 5-HT (inibitori del recettore della serotonina) e la metoclopramide (antagonista del recettore dopaminergico), diminuisce significativamente la nausea dovuta alla chemioterapia (Sarcev et al., 2007).

Infine, è stato provato un coinvolgimento del desametasone anche nell'angiogenesi, che, come già detto, gioca un ruolo cruciale nella sopravvivenza, nella migrazione e crescita tumorale, non solo nei tumori solidi, ma anche nelle leucemie e linfomi. Infatti nell'angiogenesi indotta da VEGF, il desametasone ha dato risultati promettenti, in quanto ha inibito il processo di infiammazione che accompagna la formazione dei vasi indotta da VEGF, e quindi ha inibito la formazione dei nuovi vasi (Kasselman et al., 2007).



Scopo della Tesi



La scarsa selettività dei farmaci chemioterapici "classici", che esplicano la loro azione su tutte le cellule in replicazione o metabolicamente molto attive, ne limita terribilmente sia l'efficacia, sia spesso la possibilità di utilizzo, a causa della comparsa di effetti collaterali molto importanti.

Per questo motivo la ricerca si è rivolta allo sviluppo di farmaci "veicolati" da un carrier biologico che può essere selettivamente riconosciuto da marker presenti esclusivamente sulle cellule tumorali, in modo da trattare farmacologicamente le sole cellule "malate". L'obiettivo è quello di aumentare in questo modo l'attività citotossica sulle cellule neoplastiche, minimizzando allo stesso tempo la comparsa di effetti tossici legati all'azione dei farmaci sulle cellule sane dell'organismo.

Sono stati sviluppati pertanto numerosi sistemi di veicolazione dei farmaci che comprendono l'utilizzo di liposomi, anticorpi monoclonali, immunoconiugati, polimeri e polisaccaridi.

Uno dei polisaccaridi più comunemente utilizzato come carrier in terapia antitumorale è l'acido ialuronico. Questa molecola, infatti, presenta numerosi siti in cui è possibile legare i farmaci ed è inoltre selettivamente riconosciuta da un recettore di membrana, che ne media l'internalizzazione nella cellula ed è risultato overespresso in numerose patologie tumorali. La sua espressione inoltre ben si correla alla progressione tumorale. (Ponta et al, 1998)

Scopo della presente tesi è stato quello di indagare le caratteristiche farmacologiche di una serie di bioconiugati a base di acido ialuronico al fine di verificare la loro attività antitumorale specifica.

L'analisi è stata inizialmente condotta in vitro su tre linee cellulari tumorali umane ed una linea di leucemia murina, caratterizzate da diversi livelli di espressione di CD44.

E' stata valutata la citotossicità dei bioconiugati, confrontandola su base equimolare alla citotossicità dei principi attivi in essi contenuti (Sodio Butirrato, Acido all-trans retinoico, Desametasone).

Lo studio, per i quattro bioconiugati HABut, HBR7, D3 e BD2, è proseguito verificando l'effettivo interessamento del recettore nell'internalizzazione dei coniugati. E' stata infatti valutata la vitalità cellulare e, sulla linea MIA PaCa2, anche la morfologia delle cellule, a seguito del pretrattamento con un anticorpo bloccante il sito di legame tra CD44 ed acido ialuronico.

E' stato inoltre verificato per i composti contenente desametasone (noto agente differenziante) se la coniugazione con acido ialuronico potesse in qualche modo interferire con questa importantissima caratteristica del principio attivo, mediante il test dell'NBT.

Essendo l'acido ialuronico attivamente coinvolto nel processo di angiogenesi (Slevin et al, 2002 Slevin et al, 2004), mediante l'uso di un kit commerciale (Angiokit, TCS CellWorks) è stata anche effettuata la valutazione dell'effetto dei bioconiugati sulla formazione di nuovi vasi sanguigni *in vitro*. Tale attività è stata paragonata a quella dell'acido ialuronico di peso molecolare analogo a quello presente nei bioconiugati (peso molecolare di 16kDa).

L'analisi è stata estesa a studi *in vivo*, allo scopo di valutare l'efficacia dei composti sull'organismo in toto.

Per ragioni etiche, onde evitare uno spreco non giustificabile di animali, sono stati selezionati i due bioconiugati D3 e BD2, visti i loro promettenti risultati ottenuti negli studi *in vitro*.

Le analisi in vivo sono state precedute da studi di tossicità su animali sani, mirati ad individuare le dosi utilizzabili dei bioconiugati sul modello di xenotrapianto.

La valutazione dell'efficacia antitumorale dei due bioconiugati è stata quindi valutata sul modello di xenotrapianto di leucemia umana NB4 su topi SCID (Severe Combined Immuno Deficient mice).

Utilizzando questo modello murino, è stata confrontata l'efficacia dei bioconiugati sia con quella del desametasone, il principio attivo in essi contenuti, sia con quella dell'acido all-trans retinoico, che rappresenta la terapia d'elezione della leucemia promielocitica acuta.

Relativamente ai meccanismi molecolari che seguono l'attivazione del CD44, sempre più evidenze stanno correlando tale recettore ed il suo legame con acido ialuronico al sistema PI3K/Akt, meccanismo coinvolto positivamente in una serie di processi di sopravvivenza cellulare (Bourguignon et al, 2003), nonché nello sviluppo di resistenza ai chemioterapici (Misra et al, 2003; Misra et al, 2005). Inoltre, anche due dei principi attivi contenuti nei bioconiugati (nello specifico, ATRA e desametasone) hanno dimostrato di poter interferire nello stesso meccanismo molecolare, che risulta mutato nel 30% dei tumori umani (Shaw et al, 2006).

E' stato pertanto voluto verificare se anche in simultanea presenza di acido ialuronico tali composti mantenessero le note attività stimolanti la fosforilazione di Akt nel caso di ATRA (Matkovic, 2006), e stimolanti la sintesi proteica dell'inibitore del sistema, PTEN, nel caso del desametasone (Krasil'nikov et al, 2003).

The image features a minimalist design with three blue circles of varying sizes, each composed of concentric rings in different shades of blue. These circles are arranged vertically, with the largest at the top and bottom, and a smaller one in the middle. Two thin, light blue lines intersect at the top left and extend diagonally across the page, framing the central text. The background is plain white.

Materiali e Metodi

COMPOSTI UTILIZZATI

Tutti i composti utilizzati sono bioconiugati di acido ialuronico (HA), un glicosaminoglicano lineare costituito dalla ripetizione di unità disaccaridiche di acido D-glucuronico ed N-acetil-D-glucosammina ([D-acido glucuronico ($\beta 1 \rightarrow 3$) N-acetil-D-glucosammina ($\beta 1 \rightarrow 4$)]_n), al quale sono legati i composti riportati in tabella 1.

I composti utilizzati sono stati purificati mediante colonna cromatografica e la loro struttura determinata per via spettroscopica (NMR).

I campioni sono caratterizzati da una purezza di almeno il 95%.

A seconda delle diverse sostituzioni sull'acido ialuronico, i bioconiugati sono stati rispettivamente denominati come indicato nella tabella sottostante:

Tabella 1: caratteristiche dei bioconiugati utilizzati:

Nome composto	Concentrazione (mg/ml)	Acido Butirrico
HABut	5	5,18 mM

Nome composto	Concentrazione (mg/ml)	ATRA	Acido Butirrico
HBR7	4	$5,8 \times 10^{-5}$ mM	2,2 mM

Nome composto	Concentrazione (mg/ml)	Desametasone (mg/ml)	Acido butirrico (mg/ml)
Desametasone (fiala commerciale)*	4	/	/
D1	25	3,2	/
D3	10	0,7	/
BD1	20	2,1	0,2
BD2	25	1,5	0,2

*Soldeam forte® 8mg/2ml, soluzione iniettabile, desametasone sodio fosfato.

In tutti gli esperimenti, ove non diversamente indicato, le dosi di bioconiugato utilizzate sono state calcolate prendendo in considerazione la quantità di principio attivo presente nei composti.

HABUT

Bioconiugato di Acido Ialuronico e Sodio Butirrato (NaBu).

Per queste prove è stato usato HABut in soluzione sterile fisiologica già fornito dalla Coimex S.c.r.l. di Reggio Emilia (Italia) alla massima concentrazione possibile di 8 gr/L. Tale limite di solubilità ha ovviamente condizionato le dosi utilizzabili.

Il campione di HABut testato è stato preparato come descritto altrove (Coradini et al., 2004) ed è caratterizzato da un grado di sostituzione di 0,09 come valore medio. Come grado di sostituzione si intende il rapporto tra il numero di gruppi idrossilici sostituiti con i residui di butirrato ed il numero di unità dissacaridiche ripetute nel polisaccaride.

Come controllo interno delle prove di citotossicità è stato utilizzato il sale sodico di un acido ialuronico con il peso molecolare di 16.000 Dalton di seguito indicato con la sigla HA ed il sodio butirrato, indicato come NaBu.

La scelta di HA con PM 16.000 è condizionata dalle analisi HPLC condotte su HABut dalla ditta produttrice che indicano la presenza di acido ialuronico con tali dimensioni nel bioconiugato (Coradini et al., 2004).

HBR7

Doppio estere di acido ialuronico sostituito con Sodio butirrato ed Acido retinoico.

Il composto testato è stato gentilmente fornito da Sintofarm S.P.A., Roma, Italy, già disciolto in soluzione fisiologica sterile alla concentrazione di 4 mg/ml.

BIOCONIUGATI CON DESAMETASONE

I bioconiugati a base di desametasone e desametasone e sodio butirrato sono stati cortesemente forniti da Sintofarm S.P.A., Roma, Italy, disciolti in PBS sterile alle concentrazioni riportate in tabella 2.

Tabella 2: caratteristiche dei bioconiugati contenenti desametasone.

Composto	Peso (g)	Vol. (ml)	Conc (mg/ml)	Grado sost. NaBu	Grado sost. desa	M NaBu (mM)	M desa (mM)
D1	0,2	8	25	-	0,17	-	8,3
D3	5	500	10	-	0,08	-	1,8
BD1	0,2	10	20	0,13	0,13	0,23	5,3
BD2	10	400	25	0,07	0,07	0,20	3,9

LINEE CELLULARI UTILIZZATE

MIA PACA2

Linea di carcinoma del pancreas stabilizzata nel 1975 da A. Yunis (Yunis et al., 1977) dal pancreas di un uomo di origine caucasica di 65 anni. Le cellule crescono in adesione, danno origine a colture monostratificate. Il tempo di replicazione medio è di 40 ore, presentano un'efficienza del 19% nella formazione di colonie su agar.

Il passaggio cellulare veniva effettuato tre volte a settimana, partendo da una semina compresa tra 800.000 ed 1.000.000 di cellule in 20 ml di terreno completo.

MCF-7

Linea di adenocarcinoma mammario isolato da una donna caucasica di 69 anni di età. Le cellule crescono in adesione, mantengono alcune caratteristiche dell'epitelio mammario differenziato come la capacità di processare l'estradiolo attraverso specifici recettori citoplasmatici. Il tempo di replicazione medio è 25,4 ore.

Il passaggio cellulare veniva effettuato tre volte a settimana, partendo da una semina compresa tra 800.000 ed 1.000.000 di cellule in 20 ml di terreno completo.

LEUCEMIA PROMIELOCITICA ACUTA UMANA NB4

La linea di leucemia promielocitica acuta umana è stata gentilmente fornita dalla Dott.ssa Danila Coradini dell'Istituto Tumori di Milano. Le cellule crescono in sospensione e la loro concentrazione di semina è di 4×10^6 cellule in 20ml di terreno completo.

LEUCEMIA LINFOCITICA MURINA P388

La leucemia linfocitica murina P388 è stata originariamente fornita dal National Cancer Institute (NCI, Bethesda, MD, USA). Essa è stata indotta in topi DBA/2 a seguito di trattamento con metilcolantrene, un idrocarburo aromatico policiclico altamente cancerogeno e utilizzato in laboratorio per studi di carcinogenesi (<http://www.online-medical-dictionary.org>). Inoltre, la linea può essere mantenuta *in vivo* nel peritoneo di topi DBA/2 attraverso passaggi settimanali di 1×10^5 cellule/topo.

Per la preparazione del terreno completo per tutte le linee sopra elencate sono stati utilizzati:

RPMI1640 (Euroclone);

10 % FBS, siero fetale bovino (Euroclone);

1% L-glutamina 100x (200 mM) (Euroclone);

1% penicillina-streptomicina (Euroclone);

MDA-MB-231

Linea isolata dalla pleura di una donna caucasica di 51 anni affetta da adenocarcinoma mammario. Le cellule hanno morfologia epiteliale, crescono in adesione formando monolayer. Il tempo di replicazione medio si attesta sulle 48,7 ore.

Per la preparazione del terreno completo vengono utilizzati:

DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium low Glucose (Euroclone);

10 % FBS, siero fetale bovino (Euroclone);

1% L-glutamina 100x (200 mM) (Euroclone);

1% penicillina-streptomicina (Euroclone);

(tutte le caratteristiche cellulari da: <http://www.lgcpromocell-atcc.com>)

MATERIALI E METODI *IN VITRO*

METODO PER LO SVOLGIMENTO DEL PASSAGGIO CELLULARE

Le linee sono state mantenute mediante passaggi effettuati 2 o 3 volte a settimana.

CELLULE ADESE:

Sotto cappa sterile veniva aspirato il terreno di coltura ed effettuato un lavaggio con circa 5 ml di PBS sterile per eliminare residui metabolici e cellule morte.

Dopo aver eliminato il PBS, le cellule venivano staccate utilizzando 4ml di soluzione di Tripsina EDTA (Celbio). Dopo l'aggiunta della tripsina, le cellule venivano poste in incubatore a 37°C per circa 5 min, fino ad ottenerne il distacco completo. In seguito, l'azione della tripsina veniva tamponata mediante l'aggiunta di 5 ml di terreno completo (TC). La sospensione veniva trasferita in provetta sterile da 15 ml e centrifugata a 300xg a 4°C per 7 minuti.

Si procedeva poi alla sostituzione del surnatante con un appropriato volume di terreno completo (0,5-1,0 ml) ed il numero di cellule vive per millilitro veniva determinato mediante il test di esclusione del Trypan Bleu.

CELLULE IN SOSPENSIONE:

Sotto cappa sterile la sospensione cellulare (20ml) veniva trasferita in Falcon sterile da 50ml e centrifugata a 300xg a 4°C per 7 minuti.

Il pellet ottenuto veniva rispeso in un adeguato volume di terreno completo (1-2ml) ed il numero di cellule vive veniva poi determinato mediante il test di esclusione del Trypan Bleu.

TEST DELL'ESCLUSIONE DEL TRYPAN BLEU

Il test permette la valutazione effettiva della vitalità cellulare.

Il trypan bleu (soluzione allo 0,5%, Sigma, diluita 1:1 con PBS) è un colorante che riesce ad entrare nelle cellule quando queste non abbiano integra la membrana citoplasmatica; rende pertanto visibili al microscopio ottico le cellule:

vive, che appaiono chiare e traslucide

morte, che appaiono opache e colorate in blu.

La sospensione cellulare veniva da noi diluita 1:10 con trypan bleu ed un'aliquota da 10µl veniva posta nella cameretta di Burker.

La camera di Burker consiste in un vetrino per microscopio diviso in 2 camere da una scanalatura orizzontale. Le due camerette mostrano zigrinature visibili al microscopio che delimitano la superficie del vetrino, dividendola in 25 quadratini di area nota.

Contando le cellule presenti sul vetrino secondo uno schema predeterminato, ed essendo il volume contenuto in una singola camera fisso e noto, con le corrette proporzioni si può risalire alla concentrazione di cellule vive contenute nel campione di partenza.

VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE DI CD44 NELLE LINEE CELLULARI UTILIZZATE

Poichè l'ipotesi di partenza della selettività dei bioconiugati con acido ialuronico si basa sul ruolo svolto dal CD44 nella sua internalizzazione cellulare, prima di valutare l'effetto citotossico dei bioconiugati, sono stati valutati i livelli di espressione del CD44 nelle linee tumorali utilizzate.

Sono state preparate provette contenenti 250.000 cellule ciascuna, lavate dal medium di coltura con PBS-EPICS, specifico per la marcatura di anticorpi monoclonali, contenente lo 0,5% di albumina sierica bovina e lo 0,1% di NaN_3 e centrifugate a 300xg per 7 minuti a 4°C.

Eliminato il surnatante sono stati aggiunti gli anticorpi sotto elencati nella quantità di 4µg ogni 10^6 cellule:

- ✚ Anticorpo monoclonale (MoAb) di topo anti-CD44 umano, marcato FITC (fluoresceina tiocianato)(Ansell).
- ✚ Controllo aspecifico: costituito da immunoglobuline IgG aspecifiche antiuomo, sempre marcate FITC (Ansell).

Dopo 30 minuti di incubazione al buio a 4°C le cellule sono state lavate 3 volte con PBS, infine risospese in 500µl di PBS e 50µl di PBS-HCHO al 10%.

L'analisi del campione è stata effettuata mediante citometria a flusso, acquisendo 10.000 eventi. Le letture sono state eseguite con il citometro CYTOMICS FC 5000 (Coulter Instrumentation, San Diego, CA, USA). Gli istogrammi relativi alla fluorescenza sono stati elaborati mediante il programma WinMDI (Dr J. Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA).

INIBIZIONE DELLA CRESCITA CELLULARE - DETERMINAZIONE DELLA IC50

Le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti in condizioni di sterilità a concentrazioni diverse a seconda della linea cellulare in esame, secondo lo schema che segue:

Tabella 3: semina al day 0 per il test dell'MTT effettuato sulle varie linee:

Linea	n° cellule/pozzetto	Volume semina
MIA PaCa2	500	100µl
NB4	500	100µl
P388	500	100µl
MDA-MB-231	1000	100µl

Il giorno seguente (day 1) In ogni pozzetto venivano aggiunti 100µl di terreno di sperimentazione, ovvero di terreno completo (TC) contenente il farmaco in maniera tale da ottenere le concentrazioni riportate nei singoli esperimenti. Nella fila dei controlli venivano aggiunti 100µl di terreno completo (TC). Le cellule sono state trattate per 6 giorni successivi.

Gli esperimenti sono stati condotti per almeno 3 volte ed i campioni sono stati valutati sempre in sestuplicato.

Tabella 4: Schema di trattamento in vitro (concentrazioni riferite al contenuto del/dei principi attivi):

Linea	HABut /NaBu*	HBR7/NaBu-ATRA*
MIA PaCa2	2,59mM-0,025 mM	NaBu: 1,1mM-0,55x10 ⁻⁴ mM ATRA: 2,9x10 ⁻⁵ mM-1,45x10 ⁻⁹ mM

Linea	D1/desametasone	D3/desametasone
NB4 P388 MIA PaCa2 MDA-MB-231	0,415mM-4,15nM -	0,9mM-9nM

Linea	BD1/desametasone-NaBu	BD2/desametasone-NaBu
NB4 P388 MIA PaCa2 MDA-MB-231	Dexa: 0,53mM-5,3 nM NaBu: -	Dexa: 1,9mM-19,5nM NaBu:

Linea	desametasone
NB4 P388 MIA PaCa2 MDA-MB-231	10,2mM-0,51nM -

*nota: per i principi attivi non legati ad HA di questi due bioconiugati il range testato è il medesimo.

Al termine degli esperimenti, l'effetto antiproliferativo è stato valutato mediante il test dell'MTT.

TEST DELL' MTT

Per valutare la vitalità cellulare è stato utilizzato il test dell' MTT (3,4,5-dimetiltiazolo-2,5-difeniltetrazoliobromuro), un saggio colorimetrico che permette di quantificare le cellule vive.

Questo test si basa sulla conversione del sale di tetrazolio solubile, in un composto insolubile di colore violetto, detto sale di formazano: tale reazione avviene per mezzo di enzimi deidrogenasici presenti nei mitocondri metabolicamente attivi, quindi, presenti in cellule vive.

Il prodotto insolubile, che si forma esclusivamente nelle cellule vitali, assorbe luce a 570 nm.

Il saggio dell' MTT veniva effettuato al day 7, dopo 6 giorni di trattamento. Ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 10 μ l di MTT (5 mg/ml in PBS, sterilizzato con filtri da 0,2 μ m e conservato a 4°C, Sigma) per ogni 100 μ l di terreno di coltura e la piastra veniva lasciata in incubatore per quattro ore.

Allo scadere della quarta ora venivano aspirati i 220 μ l per pozzetto e aggiunti 100 μ l di isopropanolo (Sigma); per cellule in sospensione (NB4 e P388) la piastra veniva centrifugata a 400xg per 5 minuti a 4°C ed in seguito venivano eliminati i 220 μ l di terreno di coltura. Il colore veniva reso omogeneo e la piastra letta allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 570 nm (Automated Microplate Reader EL311, BIO-TEK® Instruments, Vermont, USA).

ANALISI DELLA VARIAZIONE DELLA VITALITÀ CELLULARE

L'esperimento condotto ha permesso di valutare visivamente la vitalità cellulare per le linee MIA PaCa2 ed NB4, ed i cambiamenti morfologici nello specifico delle cellule di carcinoma pancreatico MIAPaCa2.

Le cellule in esame sono seminate in piastre multiwells da 6 pozzetti in condizioni di sterilità alla concentrazione di 60.000 cellule in un volume di TC di 2ml per pozzetto.

Il giorno seguente la semina il terreno di coltura è stato aspirato e sostituito con un egual volume di terreno di sperimentazione contenente i farmaci disciolti alle opportune concentrazioni, riportate in tabella 5.

Tabella 5: schemi di trattamento per l'analisi della vitalità cellulare.

Linea	HABut ^a	HBR7 ^a
MIA PaCa2	0,5 mg/ml	1 mg/ml
	5 mg/ml	2 mg/ml

a: concentrazione riferita al peso del bioconiugato

Linea	D3*	BD2*
NB4	350µg/ml	350 µg/ml
	500 µg/ml	500 µg/ml

*: Concentrazione in desametasone

Allo scadere del tempo stabilito, il terreno è stato eliminato da ciascun pozzetto e le cellule sono state fissate in metanolo (1 ml/pozzetto). Quindi, dopo aver fatto asciugare la piastra all'aria, questa è stata fotografata mediante microscopio elettronico (Leica DC 300F) e il relativo software (Leica IM 1000).

Con la stessa metodica, sono state preparate delle piastre sulle quali è stata valutata la vitalità cellulare mediante conta con Trypan Blue.

TRATTAMENTO PREVENTIVO CON ANTICORPO BLOCCANTE IL CD44

Alla precedente metodica è stata apportata una modifica per poter valutare l'effetto dell'anticorpo bloccante il CD44 sull'uptake cellulare del bioconiugato in esame.

Dopo aver seminato le cellule, come già descritto, si è proceduto al trattamento con l'anticorpo (soluzione madre 1 mg/ml, Ancell). Il terreno di coltura è stato aspirato da ogni pozzetto e sostituito con 1 ml di TC contenente l'anticorpo alla concentrazione di 1 mg/ml. La piastra è stata lasciata in incubatore per 30 minuti in modo da favorire il legame dell'anticorpo con i siti cellulari specifici. Allo scadere dei 30 minuti, il terreno è stato eliminato e sostituito con terreno di sperimentazione (2 ml/pozzetto) contenente il farmaco alle concentrazioni riportate in tabella 5.

Le cellule sono state trattate per 24 ore, dopodichè si è proceduto anche in questo caso alla visualizzazione con microscopio elettronico (per MIA PaCa2) e alla conta della vitalità cellulare mediante Trypan Blue.

TEST DELL'NBT

Il test dell'NBT è stato utilizzato per valutare il differenziamento cellulare indotto dal desametasone e dai bioconiugati D3 e BD2 sulla linea di Leucemia Promielocitica Acuta NB4.

I composti sono stati utilizzati nelle concentrazioni riportate in tabella 6:

Tabella 6: schema di trattamento per il test dell'NBT sulla linea NB4:

linea	desametasone	D3	BD2
NB4	39 μ M	21 μ M	9 μ M

Le cellule sono state sospese nel terreno di coltura nel quale sono stati disciolti i farmaci e incubate nelle flask sotto condizioni standard per 72 ore.

Dopo questo intervallo, un milione di cellule è stato prelevato, centrifugato e risospeso in 1.0 ml di RPMI 1640, contenente 1 mg/ml di nitroblue tetrazolio (NBT - Sigma, St.Louis, MO) e 1 μ g/ml di 12-miristato-13-acetato di forbolo (PMA - Sigma, St.Louis, MO).

La sospensione cellulare è stata incubata a 37°C in CO₂ al 5%, per un'ora al buio.

Dopo l'incubazione, la reazione è stata fermata sul ghiaccio, la sospensione centrifugata, il medium eliminato, dopodichè i depositi di formazano sono stati disciolti mediante l'aggiunta di 1 ml di dimetilsolfossido (DMSO - Sigma, St.Louis, MO) e la loro quantità determinata mediante lettura con spettrofotometro a 570nm.

Tutti gli esperimenti sono stati condotti in quintuplicato per due esperimenti ripetuti.

ANGIOKIT: VALUTAZIONE DELLE PROPRIETA' PRO O ANTI - ANGIOGENICHE DI FARMACI

Per valutare l'attività dei composti usati sul processo angiogenico coinvolto nella crescita tumorale è stato usato un modello umano commercializzato con il nome di TCS CellWorks AngioKit.

Nel kit, sono messe in coltura delle cellule endoteliali umane, nello specifico la linea cellulare HeLa, in un terreno appositamente formulato. Le cellule endoteliali inizialmente formano delle piccole isole all'interno della matrice di coltura, quindi iniziano a proliferare ed entrano nella fase migratoria durante la quale si muovono attraverso la matrice per formare delle primitive strutture tubulari. Queste si sviluppano gradualmente, in circa 12-14 giorni, fino a formare una fitta rete di capillari e vasi.

Il kit è stato ideato per conoscere l'attività sull'angiogenesi di inibitori o stimolatori macromolecolari e non, misurando contemporaneamente entrambi gli effetti positivi e negativi. E' quindi strutturato in modo da fornire tutto il necessario per la sperimentazione.

Il kit contiene:

una piastra da 24 pozzetti con le cellule adese nel loro primissimo stadio di formazione dei tubuli.

un coperchio sterile.

5 bottiglie di terreno completo.

promotore dell'angiogenesi (VEGF).

inibitore dell'angiogenesi (suramina).

markers endoteliali per il fissaggio delle cellule (anticorpo primario CD31 affiancato dal rispettivo anticorpo secondario).

markers endoteliali per la visualizzazione dei tubuli (substrati per il saggio Elisa).

Al momento dell'arrivo, che indichiamo per convenzione come day 0, sotto cappa sterile si procede all'apertura della piastra e alla sostituzione del coperchio.

Quindi la stessa viene posta in incubatore a 37°C e mantenuta sotto osservazione fino a quando non siano visibili all'interno della matrice piccole isole di cellule endoteliali. Quando questi aggregati sono visibili, è possibile iniziare il trattamento (figura 1).

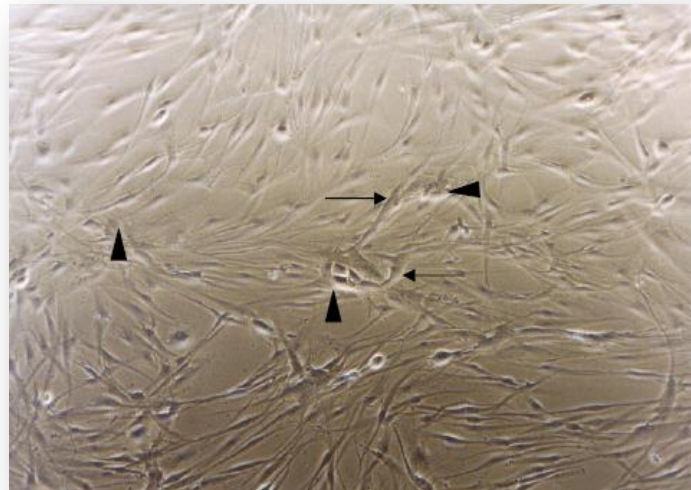


Figura 1. Coltura nel primo stadio dell'angiogenesi (si vedono piccole isole di cellule endoteliali in formazione).

Al day 1 si preparano quindi i vari composti da testare, sciogliendoli direttamente nel terreno di crescita, laddove possibile. In caso contrario, si utilizza DMSO o etanolo.

Tabella 7: schema dei trattamenti effettuati su Angiokit®:

Gruppo	
Controlli	Terreno di coltura
Controlli positivi	VEGF (diluizione 1:1000)
Controlli negativi	Suramina (diluizione 1:50)
Trattati HABut	HABut 1 mg/ml*
Trattati HBR7	HBR7 1 mg/ml*
Trattati D3	D3 1 mg/ml*
Trattati BD2	BD2 1 mg/ml*
HA medio peso molecolare	HA 16 kDa 1 mg/ml
HA alto peso molecolare	HA 150 kDa 1 mg/ml

*: le concentrazioni sono riferite al peso totale del bioconiugato.

Ogni pozzetto deve ricevere 0,5 ml di terreno o terreno con farmaco. Per fare ciò, si procede all'aspirazione del terreno già presente e si sostituisce con quello necessario.

Il trattamento va ripetuto nei giorni successivi, al day 4 - 7 - 9. In questi giorni sono già visibili i tubuli in formazione e quindi è più facile valutare l'attività del composto in esame (figura 2).

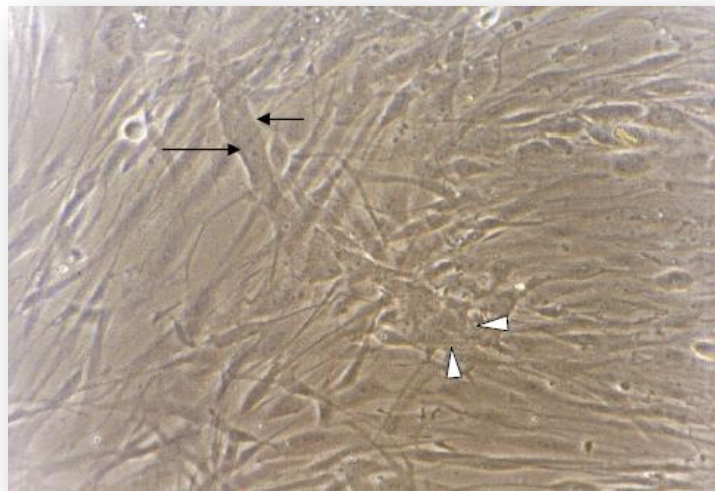


Figura 2. Tubuli in formazione.

Al day 11, si procede al fissaggio e alla visualizzazione. La coltura, a questo punto, si presenta come un fitto reticolo di tubuli (figura 3).

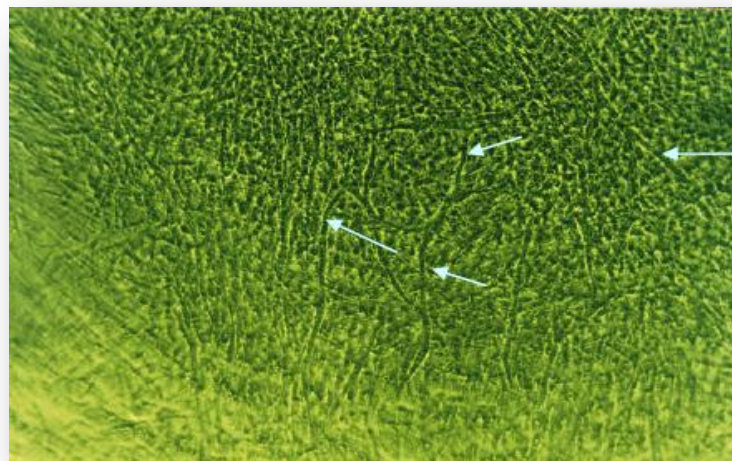


Figura 3. Coltura cellulare al day 11.

TEST DI CONTROLLO SU ANGIOKIT

Prima di iniziare con i vari trattamenti di controllo è necessario fissare le cellule al supporto. Per il fissaggio si aggiunge ad ogni pozzetto 1 ml di etanolo al 70% mantenuto ad una temperatura di -20°C , quindi si lascia a temperatura ambiente per 30 minuti. Si fa decantare, centrifugando la piastra a $300\times g$, 4 minuti, 4°C .

Quindi si procede al lavaggio utilizzando Washing Buffer (WB), ovvero PBS, e Blocking Buffer (BB), ovvero PBS + BSA 1%.

TRATTAMENTO CON MOUSE ANTIHUMAN CD31

L'antigene CD31, conosciuto anche con il nome di molecola di adesione cellulare-endoteliale (PECAM-1) è una glicoproteina a singola catena transmembrana di circa 120–140 kDa. CD31 è presente su tutte le piastrine, i granulociti e i monociti ed è espresso anche sulla superficie di alcuni linfociti

L'anticorpo fornito è da diluire 1: 400 in PBS.

Ad ogni pozzetto si aggiungono 500 μl di tale soluzione e si mantiene la piastra in incubatore per 60 minuti.

Scaduti i 60 minuti, si lavano i pozzetti per tre volte con BB, lasciando la soluzione a contatto con le cellule per 10 minuti prima di aspirarla dai pozzetti.

L'ultimo lavaggio è da decantare centrifugando la piastra a $300\times g$, 4 minuti, 4°C .

TRATTAMENTO CON GOAT ANTIMOUSE IG + AP

L'anticorpo è da diluire immediatamente prima dell'uso in PBS, 1: 500. Come per la soluzione precedente, ad ogni pozzetto vanno aggiunti 500 μl di soluzione così preparata e si lascia la piastra in incubatore per 60 minuti.

Alla fine del tempo stabilito, si lavano i pozzetti per tre volte con acqua distillata, come fatto nel caso precedente, lasciando l'acqua a contatto con le cellule ogni volta per 10 minuti prima di aspirarla. L'ultimo lavaggio viene fatto decantare in centrifuga (300xg, 4 minuti, 4°C).

TEST COLORIMETRICI

Il kit contiene 2 reagenti che permettono un'analisi quantitativa della formazione dei tubuli e la colorazione degli stessi, per renderli visibili e fotografabili al microscopio.

A 20 ml di acqua distillata vanno aggiunte le tavolette di p-nitrofenolo fosfato (p-NPP), blister argentato, e di Tris Buffer, blister dorato (TCS CellWorks Ltd), sciolte fino a completezza e vortexate. La soluzione va utilizzata entro 1 ora.

Di questa soluzione si aggiungono 300 µl ad ogni pozzetto. La piastra va poi mantenuta in incubatore per 20 minuti, trascorsi i quali si prelevano 100 µl di surnatante da ogni pozzetto e si trasferiscono in pozzetti di una piastra da 96. Sulla soluzione prelevata, va effettuata la lettura allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 405 nm. La piastra da 96 viene preparata prima del trasferimento, aggiungendo in 52 pozzetti 25 µl di NaOH 3 M. In 2 pozzetti, che serviranno come riferimento, si aggiunge p-NPP; in altrettanti, che serviranno come bianchi, va aggiunta acqua. La piastra va lavata per tre volte con acqua distillata, sempre lasciando per 10 minuti a contatto con le cellule. Si fa decantare l'ultimo lavaggio.

Si prepara la soluzione di BCIP (5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil-fosfato) e NBT (Nitro Blu Tetrazolio), sciogliendo le due tavolette in 20 ml di acqua distillata e filtrando con filtri da 0,2 µm. Di questa soluzione vanno aggiunti 500 µl in ogni pozzetto. La piastra va poi mantenuta in incubatore fintanto che non si nota lo sviluppo di una colorazione violacea che evidenzia i tubuli presenti nei pozzetti. Indicativamente, la colorazione si sviluppa nel giro di 15 minuti. La piastra viene in seguito lavata, fatta asciugare all'aria ed infine fotografata mediante microscopio elettronico e relativo software.

MATERIALI E METODI IN VIVO

ANIMALI UTILIZZATI

Gli animali utilizzati per gli esperimenti sono stati forniti da una ditta specializzata (Harlan Nossan S.r.l., San Pietro al Natisone) e sono stati allevati ed utilizzati in accordo con la direttiva in vigore in Italia: D.L. 116 del 21/2/92 per la protezione degli animali a scopi scientifici e secondo le regole riportate da "Guide for care and use of laboratory animals".

Nel corso degli esperimenti sono stati utilizzati ceppi di animali "inbred", ottenuti cioè incrociando per più generazioni topi consanguinei, per avere minor variabilità ed un patrimonio genetico uniforme.

La selezione degli animali è stata effettuata prelevandoli in maniera random dall'allevamento principale e, dopo aver trascorso un periodo di assestamento nello stabulario, sono stati suddivisi nelle apposite gabbie: una per i controlli, e due o più, a seconda del tipo di esperimento, per i trattati.

Ogni gabbia è stata identificata con un cartellino sul quale venivano annotati: tipo di tumore inoculato, tipo di ceppo, numero di topi, data di inizio dell'esperimento e tipo di trattamento effettuato. Nei giorni successivi sono stati annotati, con data, gli eventuali decessi.

L'ambiente di stabulazione è stato mantenuto alla temperatura di 20-24°C, l'umidità relativa del 50-70%, l'illuminazione artificiale attiva ogni 12 ore alternate da 12 ore di buio.

Agli animali è stata fornita una dieta alimentare in pellets, priva di antibiotici, disponibile in commercio (ALTROMIN MT, A.Rieper S.p.a., Bolzano, Italia).

Gli animali atimici, utilizzati per lo xenotrapianto di tumore umano, sono soggetti a condizioni di stabulazione particolari, che vengono spiegate più in dettaglio nel paragrafo relativo a quel modello.

CEPPO BD2F1



Figura 4. Topo BD2F1.

Gli esperimenti condotti su questi animali sono stati eseguiti per la valutazione della tossicità subacuta dei composti in esame.

Le femmine di età superiore ai tre mesi (Harlan) presentavano un peso corporeo di circa 20 grammi.(Figura 4)

CEPPO SCID (SEVERE COMBINED IMMUNODEFICIENT)

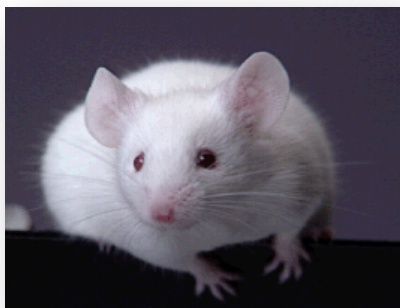


Figura 5. Topo SCID.

Gli esperimenti condotti su topi femmine di ceppo SCID (Harlan) del peso di 20-22 grammi sono serviti a valutare l'effetto antitumorale dei composti in esame su un modello di xenotrapianto di cellule NB4 (Figura 5).

Il modello del topo SCID è affetto da immunodeficienza grave combinata. Gli animali utilizzati, sono infatti atimici e quindi più soggetti a infezioni e/o malattie trasmissibili tra specie diverse, pertanto non possono venire a contatto diretto con altri ceppi di topo ed anche il contatto con l'uomo deve avvenire in maniera opportuna.

Durante tutta la durata dell'esperimento i topi vengono mantenuti in un ambiente controllato isolato da eventuali contaminazioni batteriche e virali tramite un armadio ventilato munito di filtri HEPA ed al carbonio attivo e termostatato ad una temperatura di 24-25 °C, fornito da Tecniplast Spa (Figura 6).



Figura 6: Armadio ventilato.

Le gabbie, il cibo e l'acqua a contatto con gli animali sono state previamente sterilizzate tramite autoclave o raggi UV.

Ogni gabbia è inoltre dotata di un coperchio con apposito filtro per evitare contaminazioni una volta al di fuori dell'armadio ventilato.

La manipolazione degli animali, sia per il trattamento che per i cambi bisettimanali delle gabbie, è sempre avvenuta sotto cappa sterile.

TOSSICITÀ SUBCUTA NEL TOPO TRATTATO PER VIA INTRAPERITONEALE

La prova di tossicità subacuta è stata effettuata sul ceppo BD2F1. Gli animali sono stati divisi in tre gruppi, con cinque femmine per gruppo, del peso di circa 18-19 grammi ciascuna. I trattamenti sono stati ripetuti per cinque giorni consecutivi alla settimana per tre settimane di seguito. I composti sono stati somministrati per via intraperitoneale e gli animali sono stati pesati ogni giorno prima del trattamento.

In tre settimane, si è osservata la variazione del peso dei topi e la morte.

I composti e le dosi utilizzate sono riportate in tabella 8:

Tabella 8: composti utilizzati per la prova di tossicità subacuta.

Composto	
D3	7mg/kg x 5 giorni
D3	15mg/kg x 5 giorni
D3	30mg/kg x 5 giorni
BD2	7mg/kg x 5 giorni
BD2	15mg/kg x 5 giorni
BD2	30mg/kg x 5 giorni

La dose è riferita alla quantità di desametasone presente nel bioconugato.

ATTIVITÀ ANTITUMORALE DEI BIOCONIUGATI D3 E BD2 SU UN MODELLO DI XENOTRAPIANTO DI LEUCEMIA UMANA NB4

32 topi femmine, del ceppo SCID, di peso compreso tra 20-23 grammi sono state utilizzate per valutare l'attività antitumorale in vivo dei due bioconiugati D3 e BD2 a base di desametasone.

Al giorno 0 sono state inoculate 6×10^6 cellule della linea NB4 nel peritoneo dei topi SCID ed i topi sono stati divisi in maniera random per ottenere i 4 gruppi riportati in tabella 9:

Tabella 9: dosi di farmaco utilizzate per la valutazione dell'attività antitumorale su xenotrapianto su topi SCID di NB4 di D3, BD2 e desametasone.

Gruppo	
Controlli	Nessun trattamento
Desametasone	Dexa fiala commerciale 300µg/topo
D3	D3 soluzione madre 400µl/topo
BD2	BD2 soluzione madre 200µg/topo

I trattamenti sono stati ideati in maniera tale da somministrare 300µg di equivalenti di desametasone contenuti nei due bioconiugati; tale dose è equivalente alla dose centrale da 15mg/kg utilizzata nelle prove di tossicità subacuta. Si è inoltre tenuto conto anche del massimo volume somministrabile a topi di tali dimensioni.

I trattamenti con i farmaci sono stati ripetuti per due settimane e mezza, in media di quattro giorni a settimana, per un totale di 13 somministrazioni, a partire dal giorno successivo (day 1).

Gli animali sono stati seguiti quotidianamente nel corso dell'esperimento; sono state osservate le morti e le variazioni di peso corporeo.

Il follow up totale è stato di 90 giorni.

L'esperimento è stato in seguito ripetuto con il medesimo schema di trattamento ma con i composti indicati in tabella 10:

Tabella 10: dosi di farmaco utilizzate per la valutazione dell'attività antitumorale su xenotrapianto su topi SCID di NB4 di D3, BD2 e desametasone.

Gruppo	
Controlli	Nessun trattamento
ATRA (All-Trans Retinoic Acid)	ATRA 15mg/kg* nei gg. 1, 8 e 15
D3	D3 soluzione madre 400µl/topo
BD2	BD2 soluzione madre 200µg/topo

La dose di ATRA di 15mg/kg è la massima dose di tale farmaco sopportata da animali di questo genere (Pisano et al., 2002) ed è stata somministrata una volta per settimana nei giorni 1, 8 e 15.

Anche in questo esperimento si è valutata la sopravvivenza degli animali, con un follow up di 90 giorni.

ANALISI STATISTICA

I dati sperimentali sono stati sottoposti ad analisi statistica computerizzata mediante l'Analisi della Varianza ad una via (ANOVA) utilizzando il programma INSTAT 2.

Dove questa risultava altamente significativa è stato usato il Tukey-Kramer post-test, per le medie, come indicato nelle tabelle. I dati sono stati ritenuti significativi se hanno presentato dei valori di $p < 0.05$.

Le curve di sopravvivenza degli animali sono state invece sottoposte all'analisi con il metodo Kaplan-Meier e successivo Log-Rank-Test.

MATERIALI E METODI WESTERN BLOT

PREPARAZIONE DEI LISATI CELLULARI

Le cellule MCF-7 e MIA PaCa2 a confluenza sono state risciacquate con PBS e poi staccate con PBS ghiacciato dalla flask. Sono state contate e centrifugate a 300xg per 7 minuti a 4°C.

Il pellet, una volta eliminato il surnatante, è stato risospeso in una adeguata quantità di lysis buffer (RIPA buffer, 50-100µl) al quale sono stati aggiunti un cocktail di inibitori di proteasi (Sigma) ed inibitori delle fosfatasi (Sodio Fluoruro e Sodio Ortovanadato, tabella 12).

Il lysis buffer è una soluzione ipotonica che provoca una lisi blanda delle cellule; per la preparazione degli estratti cellulari di MCF-7 e MIA PaCa2 è stato preparato come riportato in tabella 11.

Tabella 11: lysis buffer utilizzato, noto anche come RIPA Buffer.

Tris base	0,24g
NaCl	0,877g

Una volta disciolti i due sali in circa 80 ml di acqua, la soluzione va portata a pH 7,5 con HCl, a questo punto si aggiungono:

Na deoxicholate 10%	5ml
Nonidet P-40 (*)	10ml
EDTA 100mM	1 ml
SDS 10%	1 ml

La soluzione va portata a 100ml. Può essere conservata per lunghi periodi a 2-8°C.

Tabella 12: lysis completo di inibitori delle fosfatasi.

RIPA buffer	935µl
Na ortovanadate - 200mM	5µl
NaF - 30mM	60µl

La soluzione di inibitori di proteasi (104mM AEBSF (4-[2-aminoetil]bensensulfonil fluoruro), 0,08mM aprotinina, 2mM leupeptina, 4mM bestatina, 1,5mM pepststina, 1,4mM E-64)(Sigma-Aldrich, Milano, Italy) veniva aggiunta al momento, al fine di impedire la degradazione enzimatica delle proteine liberate dalle cellule, nella misura di 1 μ l/10⁶ cellule.

Dopo opportuna sospensione, i campioni così ottenuti sono stati sonicati per alcuni secondi in ghiaccio. I lisati sono stati poi centrifugati a 10.000rpm per 10 minuti a temperatura ambiente ed è stato raccolto il surnatante contenente le proteine da analizzare.

Su un'aliquota di surnatante è stato effettuato il dosaggio proteico.

DOSAGGIO PROTEICO

La quantificazione delle proteine presenti nei campioni è stata effettuata utilizzando il kit BioRad®Protein Assay, basato sul metodo di Lawry (Lawry et al.,1951).

Il saggio è stato condotto su una piastra da 96 pozzetti, nella quale sono state distribuite aliquote da 1, 3 e 5µl dei campioni da analizzare. Questi sono stati portati ad un volume finale di 5µl (ove necessario) con RIPA buffer.

Per valutare la concentrazione proteica dei campioni è stata costruita una retta di taratura con dosi note e crescenti di BSA disciolta in Ripa buffer.

Tutte le misurazioni, compresa la retta di taratura, sono sempre state eseguite in duplicato.

Alle soluzioni da testare sono state quindi aggiunti 25µl della soluzione A del kit (una soluzione acida di tartrato di rame) e questa è stata mantenuta in contatto con i campioni per 5 minuti.

Allo scadere dei 5 minuti, in tutti i pozzetti in esame sono stati aggiunti 200µl di soluzione B del kit (il reattivo di Folin, che reagisce con le proteine). La presenza di proteine è indicata dallo sviluppo, dopo 5 minuti di contatto, di colorazione violetto. L'intensità della colorazione è misurabile per via spettrofotometrica, a 630nm, con un lettore per piastre Microplate Reader (bio-Tek Instruments).

Utilizzando la retta di taratura con BSA è stato possibile risalire alle concentrazioni proteiche incognite dei campioni, grazie all'impiego del software Prism GraphPad4 (GraphPad Software, San Diego, CA).

Al volume contenente l'appropriata quantità di partenza è stato aggiunto un egual volume di tampone di caricamento (loading buffer), preparato come descritto in tabella 13.

Tabella 13: Loading Buffer.

TRIS HCl pH 6,8	62,5 μ l
SDS 10%	200 μ l
Glicerolo 10%	100 μ l
0,001% blu bromofenolo	100 μ l di soluzione madre 10X
H ₂ O	487,5 μ l
β -mercaptoetanololo (sotto cappa e al momento dell'uso)	20 μ l

Portato a volume di 1ml con acqua distillata e filtrata.

I campioni così preparati possono essere congelati e conservati a -20°C .

SDS-PAGE

Per separare proteine di diverso peso molecolare si ricorre ad elettroforesi su gel di poliacrilammide contenente SodioDodecilSolfato (SDS).

La presenza di SDS nel gel permette di separare le proteine solo in base ad una differenza di peso molecolare; il sodiododecilsolfato, infatti, è in grado di complessarsi alle proteine conferendone una carica netta negativa costante per unità di massa.

E' così possibile separare le proteine mediante la loro migrazione attraverso le maglie del gel sotto l'azione di un campo elettrico.

Nello specifico, è stata effettuata una separazione proteica mediante elettroforesi verticale su gel di poliacrilammide, secondo il metodo di Laemmli.

La tecnica prevede l'utilizzo di un gel dello spessore di 1 mm costituito da un gradiente discontinuo di due diverse formulazioni di acrilamide.

Si riconoscono infatti due porzioni di gel; la prima costituisce il cosiddetto stacking gel, dove si ha l'impaccamento delle proteine, la seconda, con percentuale maggiore di acrilamide, costituisce il running gel, dove si ha l'effettiva separazione delle proteine.

Tabella 14: composizione del gel per SDS-Page

Stacking gel - 4% acrilamide	
TRIS HCl pH 6,8	750 μ l
Acrilamide 30% (Sigma)	800 μ l
H ₂ O	4,320 ml
SDS 10% (Sigma)	60 μ l
APS (EuroClone)	80 μ l
TEMED (Sigma)	8 μ l

Running gel - 10% acrilamide	
TRIS HCl pH 8,8	4,00 ml
Acrilamide 30% (Sigma)	5,600 ml
H ₂ O	6,82 ml
SDS 10% (Sigma)	163 μ l
APS (EuroClone)	200 μ l
TEMED (Sigma)	20 μ l

Nota: i quantitativi riportati consentono la preparazione di 2 celle elettroforetiche complete.

Lo stacking gel è posto al di sopra del running ed è lungo circa 1 centimetro. In esso vengono formati i pozzetti in cui vengono caricati i campioni. Il suo scopo è quello di concentrare le proteine in una banda sottile prima che queste entrino nel gel di corsa. Il running gel occupa oltre i $\frac{3}{4}$ della cella elettroforetica, in esso la concentrazione di acrilamide è maggiore, ed i pori così formati sono più piccoli se paragonati alle maglie più larghe dello stacking. Ciò permette la separazione delle proteine in base al loro peso molecolare apparente. In entrambi i gel, l'APA (ammonio persolfato) ed il TEMED (N,N,N',N'-tetrametilendiamina) sono utilizzati rispettivamente come iniziatore e come catalizzatore della polimerizzazione del gel.

I campioni dei lisati ottenuti come descritto in precedenza sono stati caricati in quantità comprese tra 50 e 100 μ g di proteine totali per pozzetto, con un limite di carico per singolo pozzetto di 32 μ l. Come marcatore di peso molecolare è stato utilizzato il marker ColorBurst™ Electrophoresis Marker (Sigma-Aldrich, Milano, Italy).

La corsa è stata effettuata utilizzando la camera PAGER™ Minigel Chamber (Lonza Rockland Inc.), che non necessita di serpentina di raffreddamento, riempita con il tampone di corsa (192mM glicina, 25mM Tris Base, 0,1% SDS). Alla camera è stata applicata una corrente di 20mA per ogni gel per tempi compresi tra i 45 ed i 60 minuti, fino al raggiungimento da parte del fronte di corsa della fine del gel.

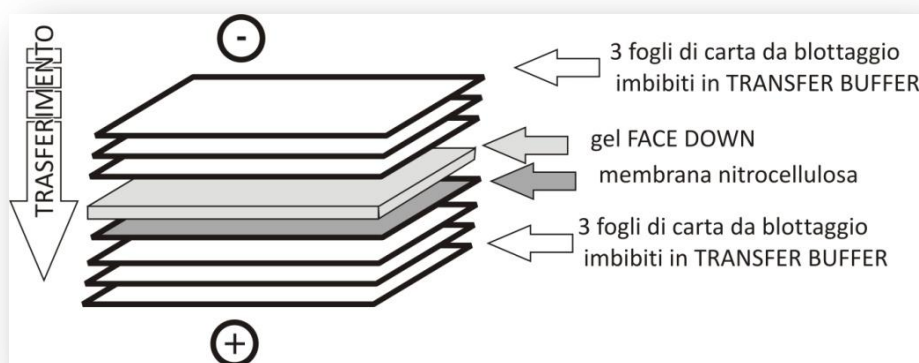
WESTERN BLOT

Il metodo consiste nell'elettrotrasferimento delle proteine dalla matrice del gel di acrilamide ad una membrana di nitrocellulosa, sulla quale è successivamente possibile analizzarle per mezzo di anticorpi specifici.

Il trasferimento delle proteine dal gel alla membrana di nitrocellulosa è stato effettuato mediante un sistema continuo semi-dry assemblato in un apposito blottatore (Yrdimes, Wealech corporation, GA, USA).

E' stato allestito un sandwich come riportato in figura 1.

Figura 7. Schema di allestimento del "sandwich" per il blottaggio.



I fogli di carta da blottaggio sono stati immersi per qualche minuto in tampone di trasferimento (Transfer buffer) la cui composizione è riportata in tabella 15, mentre la membrana di nitrocellulosa è stata imbibita con acqua distillata e filtrata.

Tabella 15: composizione del transfer buffer.

TRANSFER BUFFER (1lt):	
Tris base	6 g
Glicina	28,8 g
MeOH	200 ml
SDS 10%	1 ml
H2O	Fino a volume di 1 l

La procedura di blottaggio è stata eseguita applicando al sandwich una corrente di 300mA per un'ora e mezza. Il trasferimento delle proteine è stato verificato

colorando la membrana di nitrocellulosa con Rosso Ponceau (0,1% Ponceau S (w/v) in 5% acido acetico (v/v), Sigma-Aldrich), in questo modo è possibile verificare la qualità del trasferimento effettuato: le proteine appaiono infatti visibili come bande colorate di rosso. La colorazione è reversibile e scompare dalle proteine non appena la membrana viene immersa nel tampone di bloccaggio.

La membrana veniva ritagliata in base alla corsa delle proteine e mantenuta in soluzione di bloccaggio (BSA 3% e 0,05% Tween-20 in TBS (12,5mM TrisHCl e 125mM NaCl a pH 7,4 in acqua distillata e filtrata)) per 1 ora e mezza a 36°C in agitazione meccanica.

La membrana veniva incubata con gli anticorpi primari riportati in tabella 16.

Tabella 16: schema degli anticorpi e delle diluizioni utilizzate per gli studi di Western Blot

<i>proteina</i>	<i>Akt-1</i>	<i>p-Akt-1 (ser468)</i>	<i>PTEN</i>	<i>B-actina</i>
<i>Anticorpo 1°</i>	<i>(G-5) sc- 55523</i>	<i>(104°2B2) sc- 52940</i>	<i>(A2B1) sc- 7974</i>	<i>ACTB12</i>
<i>Ditta</i>	<i>SantaCruz</i>	<i>SantaCruz</i>	<i>SantaCruz</i>	<i>Alpha Diagnostic</i>
<i>Diluizione</i>	<i>1:500</i>	<i>1:200</i>	<i>1:500</i>	<i>1:5000</i>
<i>Tempo di incubazione</i>	<i>Overnight</i>	<i>Overnight</i>	<i>Overnight</i>	<i>Overnight</i>
<i>Anticorpo 2°</i>	<i>Goat- Antimouse HRP</i>	<i>Goat- Antimouse HRP</i>	<i>Goat- Antimouse HRP</i>	<i>Goat- Antimouse HRP</i>
<i>Ditta</i>	<i>Ancell</i>	<i>Ancell</i>	<i>Ancell</i>	<i>Ancell</i>
<i>diluzione</i>	<i>1:3000</i>	<i>1:3000</i>	<i>1:3000</i>	<i>1:30000</i>

L'incubazione con gli anticorpi primari è stata effettuata overnight a 4°C.

Sono seguiti 3 lavaggi da 10 minuti con Washing Buffer (Candor).

Le membrane sono poi state incubate con l'anticorpo secondario per 1 ora a 36°C sotto agitazione meccanica. A seguire, venivano effettuati altri 3 lavaggi da 10 minuti con Washing Buffer (Candor).

I complessi antigene-anticorpo sono stati quindi analizzati mediante una reazione di chemiluminescenza, utilizzando i reagenti del kit “Western Blot Luminol Reagent” (sc-2048)(Santa Cruz).

I prodotti chemiluminescenti di questa reazione sono stati visualizzati tramite autoradiografia su lastre Kodak® BioMax Light Film.

The page features a decorative design with three overlapping circles in shades of orange and tan, arranged vertically. Two thin orange lines cross the page diagonally, one from the top-left to the bottom-right, and another from the top-right to the bottom-left, intersecting near the center. The text is centered between these lines.

Risultati e Discussione

ANALISI DEI LIVELLI DI ESPRESSIONE DEL RECETTORE CD44 NELLE LINEE UTILIZZATE

L'ipotesi di partenza della selettività dei bioconiugati a base di acido ialuronico si basa sull'attivo interessamento del recettore di membrana CD44 nel processo di internalizzazione di tali farmaci. Pertanto, prima di passare alla valutazione degli effetti citotossici dei composti, si è reso necessario valutare i livelli di espressione di questo recettore nelle linee cellulari utilizzate.

L'analisi è stata effettuata mediante citometria a flusso incubando 250.000 cellule prelevate dalla flask di coltura con un anticorpo Mouse-antihuman-CD44 marcato FITC (FluoresceinaIsoTioCianato).

Le letture al citofluorimetro hanno evidenziato pattern di espressione significativamente differenti per le varie linee, sia in termini di percentuale di positività, sia in termini di canale medio di fluorescenza. I risultati ottenuti sono riportati in tabella 1, mentre i relativi istogrammi sono riportati in figura 1.

Tabella 1: Espressione del recettore di membrana CD44 nelle linee cellulari utilizzate

Linea cellulare	% Cellule positive	Canale medio di fluorescenza
MDA-MB 231	53,8 ± 1,7	24,7 ± 1,9
MCF-7	26,5 ± 2,3	45,6 ± 2,0
MIA PaCa2	95,3 ± 0,2	242,6 ± 24,9
NB4	98,6 ± 0,4	205,4 ± 19,5
P388	29,3 ± 0,2	185,6 ± 21,3

I dati sono espressi come percentuale di cellule positive ± SEM e come valore di canale medio di fluorescenza ± SEM. I dati sono stati ottenuti in quadruplicato.

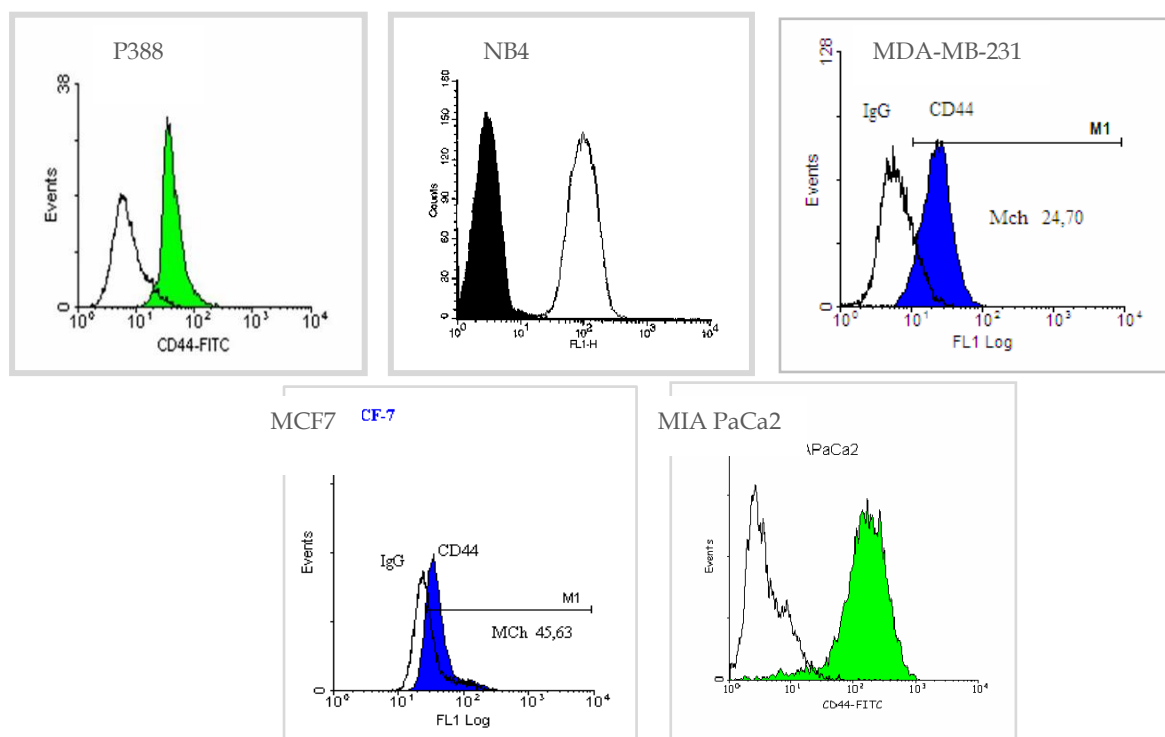
In tabella, la percentuale di cellule positive riporta il conteggio del totale di cellule che presenta almeno un recettore CD44 espresso sulla membrana cellulare riportato al totale di cellule presenti nel campione, mentre il canale medio di fluorescenza dà un'indicazione sulla densità recettoriale di superficie: più elevato risulta il canale medio di fluorescenza, più elevata risulta essere la densità recettoriale.

Livelli molto alti di espressione di CD44 sono stati riscontrati nelle linee NB4 e MIA PaCa2, nelle quali oltre il 95% della popolazione cellulare presenta almeno un recettore espresso sulla superficie; inoltre entrambe le linee mostrano un'altissima densità recettoriale, dato evidenziato dagli alti valori di canale medio di fluorescenza.

Un livello di espressione intermedia è stato osservato per la linea cellulare MDA-MB 231, che presenta un 53,8% di cellule positive, con un basso valore di canale medio di fluorescenza; ovvero sulla superficie di circa metà delle cellule del campione sono espressi pochi recettori CD44 rispetto a quelli visti per NB4 e MIA PaCa2.

Bassi livelli di espressione del recettore sono visibili per le linee MCF-7 (umana) e P388 (murina); la linea MCF-7 inoltre ha evidenziato un basso valore di canale medio di fluorescenza, a significare che le poche cellule positive esprimono sulla superficie un numero limitato di recettori. Nella linea P388, invece, pur essendo analogamente bassa la percentuale di cellule positive, queste mostrano una elevata densità recettoriale sulla singola cellula.

Figura 1: istogrammi relativi all'espressione di CD44 nelle linee utilizzate.



Sebbene con livelli di espressione differenti, tutte le linee cellulari utilizzate presentano sulla loro superficie il recettore CD44, condizione sufficiente e necessaria per procedere alla valutazione dell'efficacia e della selettività dei bioconjugati a base di acido ialuronico, risultano pertanto adatte alle valutazioni successive.

STUDIO *IN VITRO*

HABUT: ESTERE SINGOLO DI ACIDO IALURONICO E SODIO BUTIRRATO

La citotossicità di HABut era già stata valutata in precedenza nel laboratorio da me frequentato, dimostrando di possedere ottime caratteristiche come farmaco antitumorale, particolarmente apprezzabile negli studi in vivo. (Coradini et al, 1999; Coradini et al, 2004)

Ho voluto pertanto proseguire con lo studio di questo promettente bioconiugato utilizzando una linea cellulare che deriva da una patologia ancora oggi orfana di terapie efficaci in clinica: il tumore del pancreas.

Il principio attivo veicolato dal polimero è un inibitore delle istone deacetilasi che induce iperacetilazione degli istoni H3 ed H4. Studi condotti per chiarire il meccanismo d'azione del sodio butirrato hanno messo in luce come questo interferisca con diversi meccanismi cellulari, che si concludono con l'innescò della differenziazione cellulare e nell'induzione dell'apoptosi (Coradini et al., 1999).

Per queste prove è stato usato HABut in soluzione sterile fisiologica già fornito dalla Coimex S.c.r.l. di Reggio Emilia (Italia) alla massima concentrazione possibile di 8 gr/L. Tale limite di solubilità ha ovviamente condizionato le dosi utilizzabili.

Il campione di HABut testato è stato preparato come descritto altrove (Coradini et al., 2004) ed è caratterizzato da un grado di sostituzione di 0,09 come valore medio. Come grado di sostituzione si intende il rapporto tra il numero di gruppi idrossilici sostituiti con i residui di butirrato ed il numero di unità disaccaridiche ripetute nel polisaccaride

Tabella 2. Caratteristiche del bioconiugato HABut.

Nome composto	Concentrazione (mg/ml)	Acido Butirrico
HABut	5	5,18 mM

CITOTOSSICITÀ DI HABUT SULLA LINEA MIA PaCa2

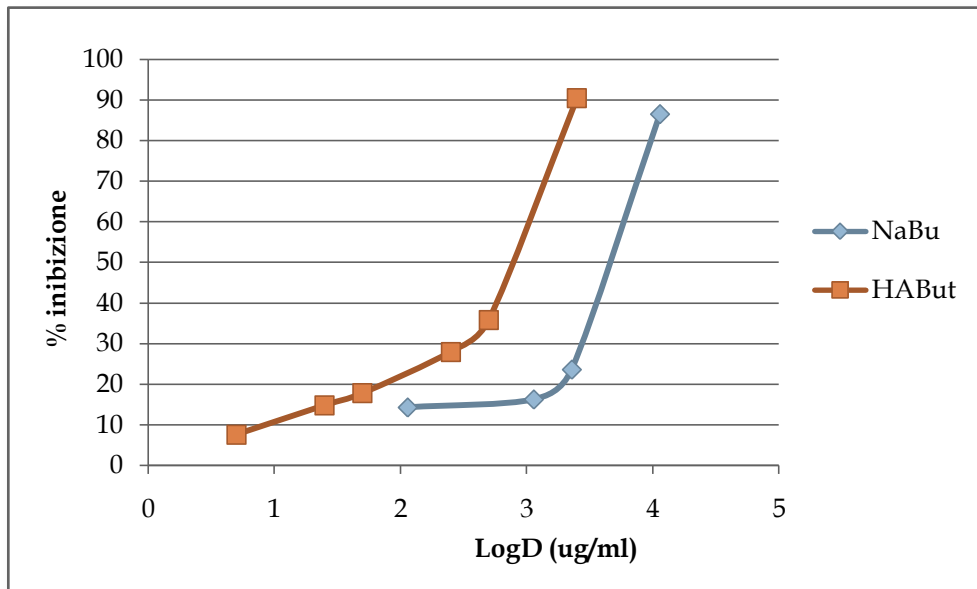
La valutazione dell'effetto citotossico del bioconiugato HABut è stata effettuata mediante il test dell'MTT. Tale test misura indirettamente la vitalità cellulare quantificando l'attività metabolica cellulare mitocondriale: per azione delle deidrogenasi mitocondriali, infatti, il sale di tetrazolio (MTT) viene trasformato in blu di formazano, un sale colorato quantificabile allo spettrofotometro a 570 nm.

Le cellule MIAPaCa2 sono state incubate per 6 giorni consecutivi, in terreno completo, con acido ialuronico (HA), sodio butirrato (NaBu) nella forma libera o con il coniugato HABut. HABut è stato testato a dosi equimolari con NaBu, in un range compreso tra 0,001 e 2,5 mM, mentre HA è stato utilizzato a concentrazioni di 0,01-6 mg/ml, equivalenti alla quantità di HA contenuta nel bioconiugato.

Vengono a seguito riportate le curve di tossicità dose dipendente ottenute sulla linea MIA PaCa2.

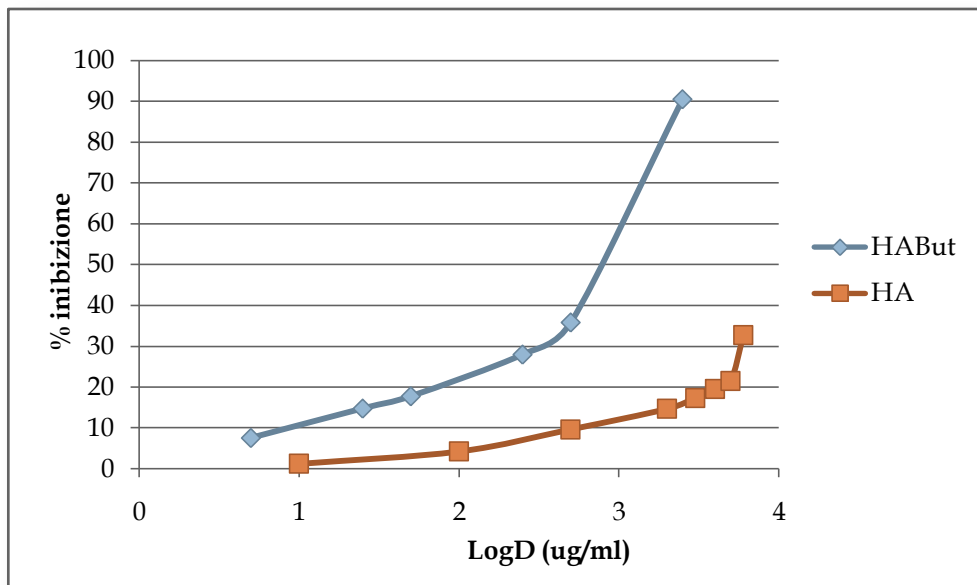
In particolare il grafico 1 riporta il confronto tra l'inibizione della crescita cellulare indotta dal singolo NaBu ed il bioconiugato, mentre nel grafico 2 il confronto è effettuato con HA.

Grafico 1: curve dose-risposta di 6 giorni di trattamento con NaBu o il bioconiugato HABut sulla linea di carcinoma del pancreas MIA PaCa2.



500 cellule sono state seminate 24 ore prima del trattamento in piastre multiwell da 96 pozzetti. A partire dal giorno successivo sono state trattate per 6 giorni in terreno completo con i composti indicati. Alla fine dell'incubazione è stata misurata la citotossicità, espressa come inibizione percentuale della crescita rispetto ai controlli non trattati, mediante il test dell'MTT.

Grafico 2: curve dose-risposta di 6 giorni di trattamento con il bioconiugato HABut o con HA sulla linea di carcinoma del pancreas MIA PaCa2.



500 cellule sono state seminate 24 ore prima del trattamento in piastre multiwell da 96 pozzetti. A partire dal giorno successivo sono state trattate per 6 giorni in terreno completo con i composti indicati. Alla fine dell'incubazione è stata misurata la citotossicità, espressa come inibizione percentuale della crescita rispetto ai controlli non trattati, mediante il test dell'MTT.

Il bioconiuigato HABut ha dimostrato, dopo 6 giorni di trattamento, di esplicare un effetto inibitorio dose dipendente sulla crescita della linea di carcinoma del pancreas MIA PaCa2. Questa porta ad una inibizione completa (90% rispetto ai controlli) alla massima dose utilizzata.

Confrontando l'attività del bioconiuigato a quella del composto libero, si nota come quest'ultimo raggiunga l'inibizione totale di crescita ad una dose 5 volte superiore di quella usata per HABut.

Il singolo acido ialuronico (di peso molecolare uguale a quello presente nel bioconiuigato) non presenta invece alcun effetto significativo sulla crescita cellulare alle dosi da noi utilizzate, arrivando al massimo ad un 39% di inibizione (vedi grafico 2, assenza di plateau), ad una dose superiore (6 mg/ml) rispetto alla massima utilizzata con il bioconiuigato HABut (2,5 mg/ml).

La maggior attività citotossica del bioconiuigato HABut risulta ancora più evidente dal confronto delle IC50 estrapolate dalle curve dose-risposta dei tre composti (Tabella 3):

Tabella 3. Valori di IC50 calcolati sperimentalmente dalle curve riportate nei Grafici 1 e 2, con relativo indice di attività di HABut nei confronti del singolo NaBu.

Composto	IC50	Indice di attività*
NaBu	0,87 mM	1
HA	n.c.	n.c.
HABut	0,15 mM	5,8

*: Indice di attività espresso come rapporto tra IC50 HABut/IC50 NaBu.
n.c.: dato non calcolabile.

Va qui ricordato che il valore di IC50 rappresenta la dose di composto che esplica una inibizione della crescita cellulare pari al 50% rispetto ai controlli non trattati.

Il valore estrapolato dalla curva per HABut risulta circa 6 volte inferiore a quello del composto libero, dato sottolineato dal valore dell'indice di attività pari a 5,8.

Tale indice è infatti calcolato mediante il rapporto tra il valore di IC50 di NaBu e HABut; risulta pertanto implicito che, poichè il valore calcolato è risultato superiore ad 1, la dose necessaria per ottenere uno stesso grado di inibizione con il singolo NaBu è superiore a quella necessaria con il bioconiugato HABut.

Degno di nota risulta lo scarso effetto citotossico del vettore Acido Ialuronico (HA): alla concentrazione corrispondente a quella della IC50 del bioconiugato, infatti, esso esplica un effetto praticamente nullo sulla crescita cellulare (inibizione inferiore al 5%).

TOSSICITÀ DI HABUT SULLA LINEA DI CARCINOMA DEL PANCREAS MIA PaCa2 IN PRESENZA DI UN ANTICORPO CD44 BLOCCANTE

Per verificare se l'effetto citotossico dei bioconiugati utilizzati dipendesse dalla loro capacità di entrare nella cellula sfruttando il trasporto mediato dal recettore di superficie CD44, è stata valutata la vitalità delle cellule in seguito al pretrattamento con un anticorpo specifico anti-CD44.

Infatti poichè l'uptake cellulare tramite CD44 rappresenta l'ipotesi iniziale della selettività di tutti i biocomplessi con acido ialuronico, si è voluto verificare la vitalità delle cellule mettendole a contatto con i bioconiugati in presenza di un anticorpo capace di bloccare il legame tra l'acido ialuronico ed il CD44, condizione necessaria per l'internalizzazione di quest'ultimo.

Per fare questa prova è stato però necessario cercare le condizioni migliori che tenessero conto della velocità di entrata del bioconiugato nella cellula, del metodo di valutazione del suo effetto citotossico e del turnover dei recettori CD44. E' infatti impensabile che un anticorpo riesca a bloccare funzionalmente un recettore di membrana che fisiologicamente è soggetto ad un processo di internalizzazione per tempo più lunghi di 12-24 ore.

Le cellule MIAPaCa2 sono state pertanto seminate su pozzetti da 6 (60.000 in 2 ml) il giorno prima di effettuare i trattamenti e la loro vitalità è stata valutata mediante conta con il trypan blue dopo 24 ore di contatto con HABut previo trattamento con l'anticorpo anti-CD44 (1 µg/ml 30' prima del coniugato). Tutti i dati sono stati ripetuti in quadruplicato.

I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 4, nella quale sono evidenziate le conte delle cellule vitali dei vari gruppi.

Tabella 4. Effetti del trattamento con HABut sulla vitalità cellulare della linea MIA PaCa2 pretrattate o meno con anticorpo bloccante il recettore CD44:

Gruppo	Numero di cellule vive x10 ⁶ (media±S.E.M)	%vitalità (T/C)
Controlli	2,17 ± 0,22	100
HABut 5mg/ml	1,18 ± 0,07***	54,4
HABut 5mg/ml + Anti CD44	1,38 ± 0,04**	63,6
HABut 0,5mg/ml	1,58 ± 0,05*a	72,8
HABut 0,5mg/ml + Anti CD44	2,08 ± 0,20a	95,9

I valori riportati in tabella rappresentano le conte cellulari mediante test del trypan blue dopo 24 ore di trattamento con HABut alle dosi di 5mg/ml e 0,5 mg/ml (1,1 mM e 0,11 mM) in presenza e in assenza di pretrattamento con anticorpo anti-CD44 (1µg/ml) nei 30 minuti precedenti il trattamento. Le medie contrassegnate dagli asterischi risultano significativamente diverse dai controlli e a lettera uguale corrispondono valori medi diversi tra di loro (*:p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,01; a:p>0,05; ANOVA, Tuckey-Kramer post-test).

Entrambe le dosi utilizzate di HABut hanno diminuito significativamente il numero di cellule vitali rispetto ai controlli non trattati; ovviamente, tale inibizione risulta dose dipendente ed infatti i valori di inibizione più marcati si osservano alla dose massima di bioconjugato utilizzata (5 mg/ml inibizione al 54,4% vs controlli, p<0,001; 0,5 mg/ml inibizione al 72,8%, p<0,05).

L'effetto del pretrattamento delle cellule con l'anticorpo bloccante il sito di legame tra acido ialuronico e CD44 ha ridotto significativamente l'attività citotossica del bioconjugato HABut, dato che risulta molto evidente alla dose più bassa utilizzata: si passa infatti da una percentuale di vitalità del 54,4 ad un valore di 63,6 per la dose elevata di 5 mg/ml e addirittura da un 72,8 ad un 95,5 che non risulta significativamente diverso dai controlli nel trattamento alla dose più bassa.

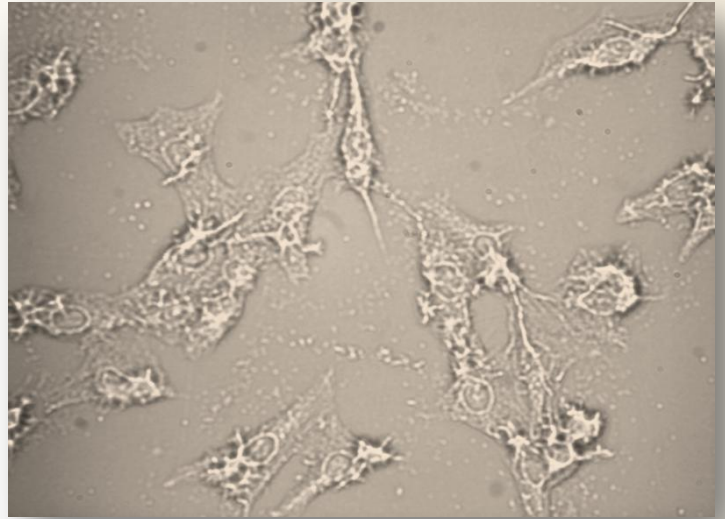
In sintesi, alla dose di 0,5 mg/ml il pretrattamento con l'anticorpo CD44 bloccante annulla completamente l'effetto citotossico del bioconjugato.

Non sorprende invece la minore efficacia del pretrattamento con anticorpo alla dose più alta. Molto probabilmente infatti il pretrattamento effettuato non è sufficiente a bloccare totalmente i recettori presenti per le successive 24 ore in cui il farmaco è presente nel medium di coltura. E' perciò ipotizzabile che in questo lasso di tempo il turnover fisiologico dei recettori CD44 permetta l'entrata di aliquote di HABut che saranno tanto più elevate quanto più alta è la quantità del bioconjugato presente nel mezzo.

Questo dato è confermato anche dalle immagini delle cellule raccolte al microscopio ottico alla fine del trattamento (Figure 2 e 3):

Figura 2. Morfologia delle cellule MIA PaCa2 dopo trattamento di 24 ore con HABut alla dose di 5 mg/ml, con o senza anticorpo bloccante il CD44.

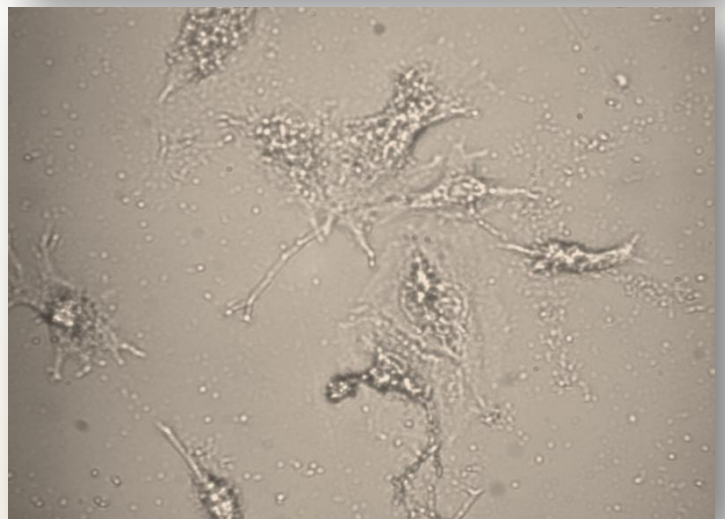
A. Controlli



B. Trattato HABut 5 mg/ml



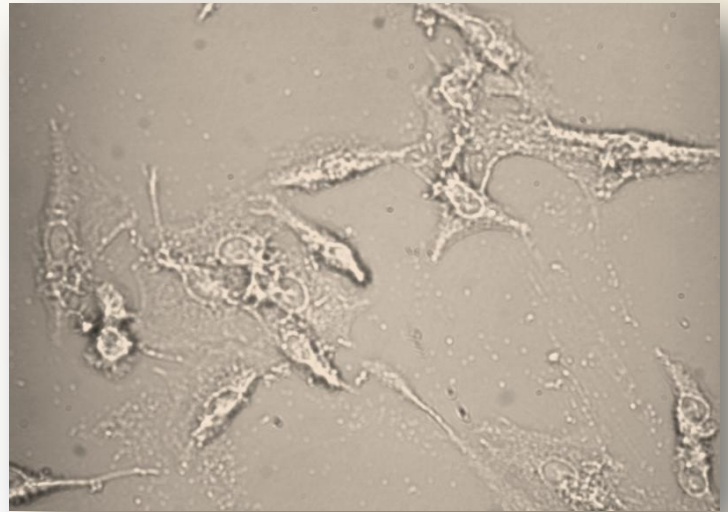
C. Trattato HABut 5 mg/ml + anticorpo anti CD44



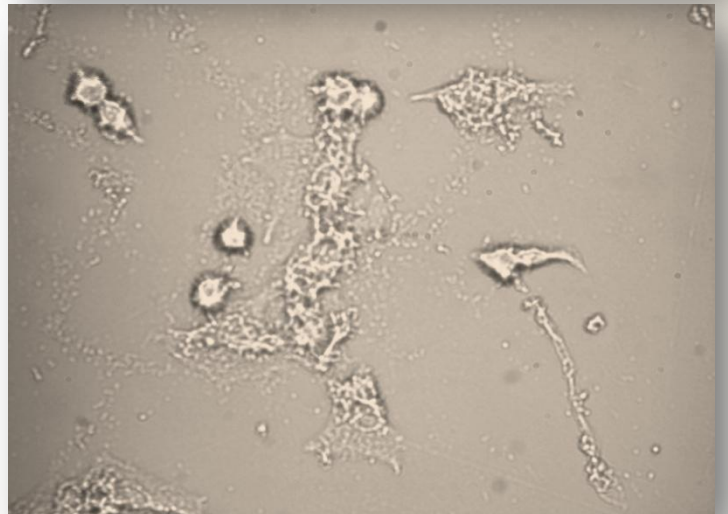
Le immagini sono state acquisite con fotocamera Leica al microscopio ottico (40x) e raffigurano un campione per pozzetto rappresentativo di almeno 10 immagini raccolte in 2 esperimenti condotti in triplicato su campioni trattati come indicato nella didascalia della Tabella 3.

Figura 3. Morfologia delle cellule MIAPaCa2 dopo trattamento di 24 ore con HABut alla dose di 5 mg/ml, con o senza anticorpo bloccante il CD44.

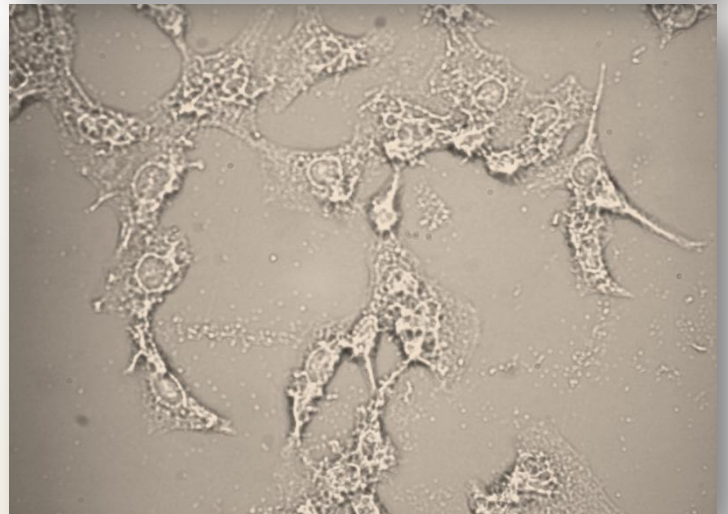
A. Controlli



B. Trattato HABut 0,5 mg/ml



C. Trattato HABut 0,5 mg/ml + anticorpo anti CD44



Le immagini sono state acquisite con fotocamera Leica al microscopio ottico (40x) e raffigurano un campione per pozzetto rappresentativo di almeno 10 immagini raccolte in 2 esperimenti condotti in triplicato su campioni trattati come indicato nella didascalia della Tabella 3.

Dalle immagini si nota chiaramente come in entrambi i pozzetti trattati con il bioconiugato le cellule risultino visibilmente sofferenti se paragonate alle immagini dei controlli. Un parziale recupero di morfologia si osserva nei trattati con 5 mg/ml pretrattati con l'anticorpo bloccante il CD44, mentre le cellule pretrattate con l'anticorpo che sono state a contatto con la dose bassa (0,5 mg/ml) di bioconiugato risultano morfologicamente identiche a quelle visibili nei controlli non trattati.

I dati fin qui ottenuti sulle MIAPaCa2 indicano che la combinazione tra il sodio butirrato ed il vettore biocompatibile acido ialuronico aumenta significativamente la citotossicità del principio attivo, confermando quanto già visto in precedenza su altre linee tumorali in vitro (Coradini et al., 2004).

Questo dato, sebbene atteso, non risulta scontato in quanto in letteratura esistono numerosi studi su altri bioconiugati che indicano sempre un maggior effetto citotossico in vitro del principio attivo originale rispetto al coniugato (Luo et al., 2002).

Inoltre affinché HABut espliciti al massimo il suo effetto citotossico è necessaria la presenza sulla superficie cellulare di recettori CD44 funzionanti, cioè in grado di legare l'acido ialuronico, dato che indirettamente dimostra l'uptake del bioconiugato attraverso questo recettore di membrana.

In seguito sono stati condotti degli studi atti ad indagare il ruolo di HABut e del solo HA su alcuni parametri cellulari fondamentali per la disseminazione metastatica in vivo: quali i mutamenti morfologico-funzionali della cellula adesa e la sua capacità d'invasione in vitro.

In particolare, si è voluto verificare il contributo dell'acido ialuronico presente in HABut su quei processi importanti nella malignità di un tumore che come è noto possono venire influenzati da HA (Itano et al., 2002).

Esistono infatti in letteratura numerose prove che coinvolgono l'acido ialuronico nel processo dell'invasione tumorale, basti pensare che piccoli frammenti di HA inducono il clivaggio del CD44 e promuovono la migrazione delle cellule tumorali (Sugahara et al., 2005).

E' infatti da ricordare che frammenti di piccole dimensioni di HA possono venir generati direttamente nell'ambiente tumorale: le cellule maligne, come mostrato da Sugahara KN e collaboratori (Sugahara et al., 2003) sulle MIAPaCa2, sono ricche di ialuronidasi e sono in grado di secernere tali enzimi nell'ambiente extracellulare.

L'effetto dei diversi trattamenti con HA o HABut è stato pertanto valutato mediante semina delle cellule MIAPaCa2 su un substrato mimante la matrice extracellulare (Matrigel®), mentre l'invasione è stata studiata in vitro su sistemi Transwell con filtri opportunamente ricoperti di Matrigel®.

PROVA DI ADESIONE SU MATRIGEL®.

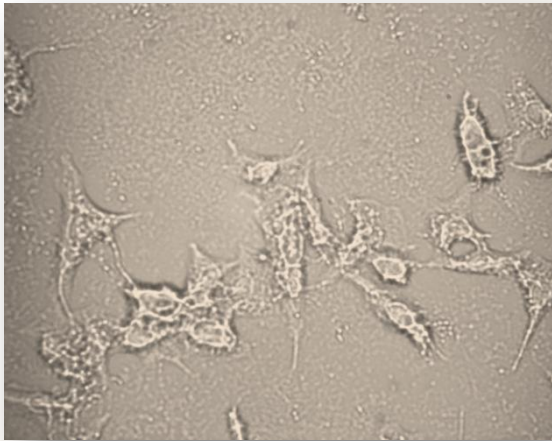
Il Matrigel® (BD Bioscience) è un substrato biologico che mima le caratteristiche ed i componenti biologici essenziali della membrana basale ed è stato utilizzato sia per la valutazione degli effetti morfologici del bioconiugato, sia per il test di invasione in sistemi transwell.

I risultati dei mutamenti morfologici indotti dai trattamenti sulle cellule MIAPaCa2 a 24 ore dalla semina su Matrigel vengono illustrati nella Figura 4.

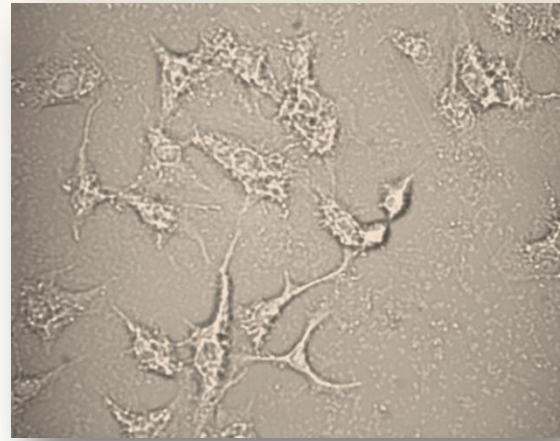
Come si può vedere il trattamento con acido ialuronico ad alto PM (80.000) (1 mg/ml) ha indotto la formazione di numerose estroflessioni (pseudopodi) nelle cellule, che assumono caratteristiche simili a quelle indotte dal forbolo miristato acetato (PMA) un noto agente stimolante il rimodellamento cellulare. La presenza di questi mutamenti con i singoli pseudopodi risulta più chiara nell'immagine di un particolare ingrandito (*Figura 5*) che evidenzia le differenze delle cellule trattate con HA o PMA rispetto a quelle di controllo non trattate.

Le cellule trattate con 0,05 mg/ml di HABut invece non mostrano la comparsa di particolari estroflessioni della membrana e sono simili al controllo; mentre quelle che ricevono una dose 10 volte più alta di HABut risultano sofferenti (*Figura 4*). Tale sofferenza conferma l'effetto citotossico di HABut già riscontrato per le cellule MIAPaCa2 mediante il test dell'MTT e dimostra la presenza di una buona attività antitumorale del bioconiugato anche in situazioni sperimentali biologicamente più simili al vivo.

Figura 4. Morfologia delle cellule MIA PaCa2 seminate su Matrigel dopo trattamento di 24 ore con HA o HABut (0,5 e 0,05 mg/ml).



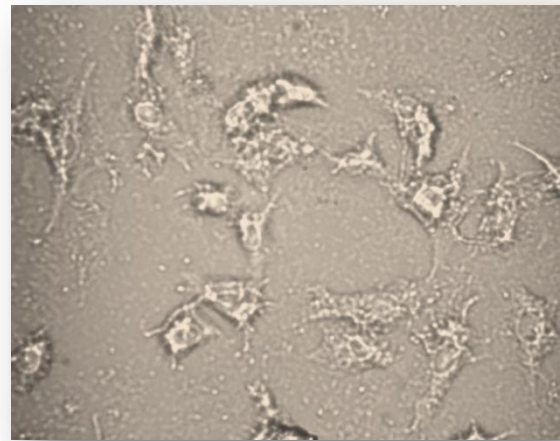
A: Controlli



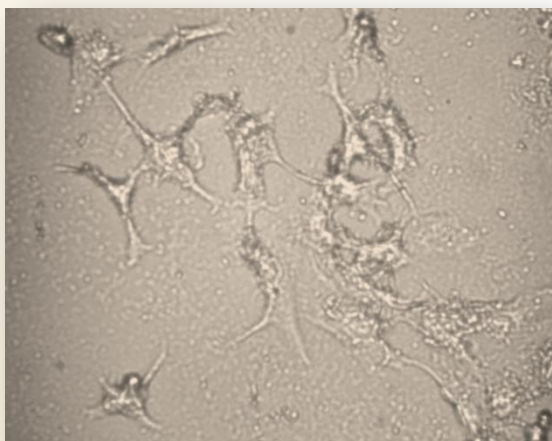
B: Trattato HA 1 mg/ml



C: Trattato HABut (0,5 mg/ml)



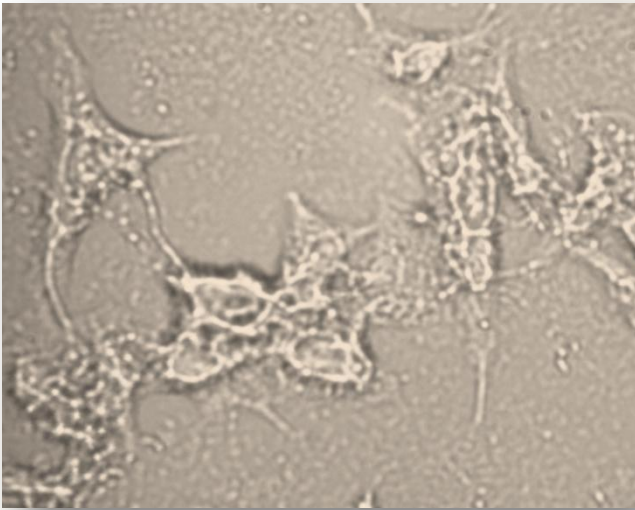
D: Trattato HABut (0,05 mg/ml)



E: Trattato con PMA (100 ng/ml)

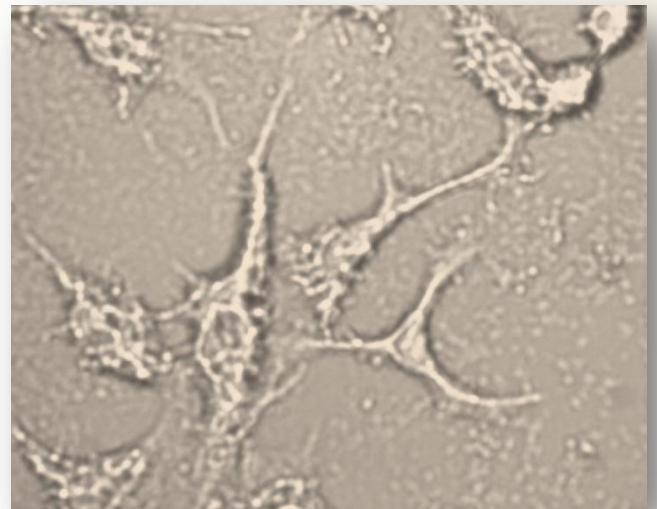
Le immagini sono state acquisite con fotocamera Leica al microscopio ottico (40x) e raffigurano un campione per pozzetto rappresentativo di almeno 10 immagini raccolte in 2 esperimenti diversi, condotti in triplicato, su campioni seminati su Matrigel e trattati con i composti alle dosi indicate per 24 ore. Solo il trattamento con PMA è stato effettuato per 1 ora.

Figura 5. Particolare della morfologia delle cellule MIA PaCa2 seminate su Matrigel dopo trattamento di 24 ore con HA o PMA (100 ng/ml).

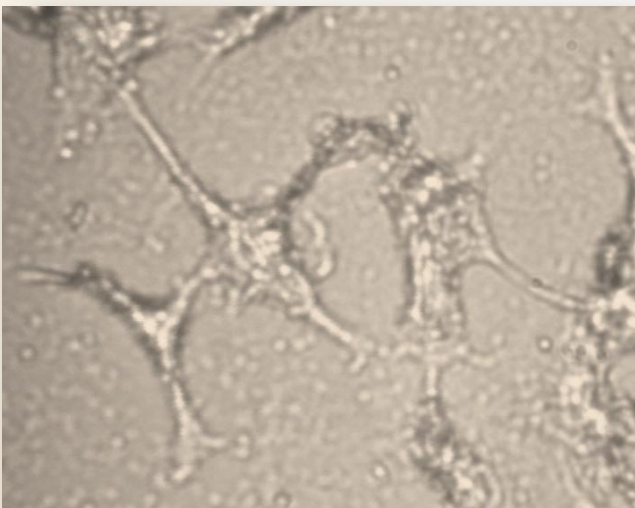


A: Controllo

B: trattato con HA (1 mg/ml)



C: trattato con PMA (100 ng/ml)



Le immagini qui sopra riportate rappresentano un particolare campo delle figure 5A, 5B e 5E opportunamente ingrandite, per far evidenziare gli pseudopodi presenti in entrambi i trattati.

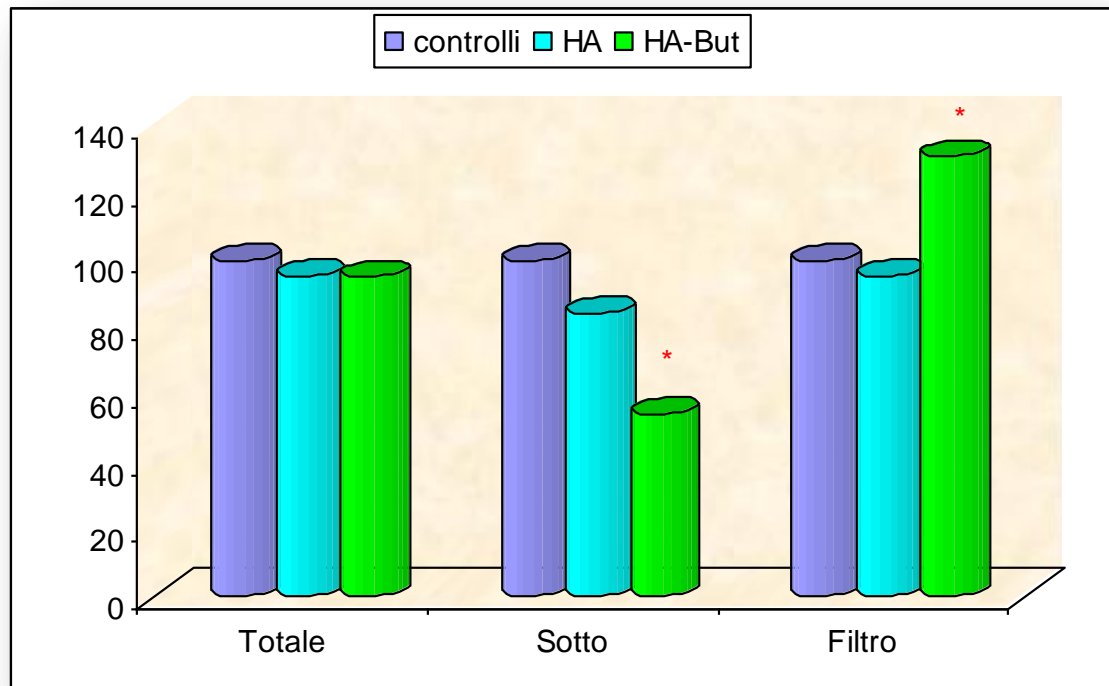
EFFETTO DI HABUT E DI HA SULLA CAPACITÀ DI INVASIONE DELLE CELLULE MIAPaCa2 IN VITRO.

Poiché la capacità delle cellule di aderire al Matrigel e la presenza di pseudopodi sono caratteristiche favorevoli al processo invasivo si è deciso di valutare la capacità invasiva delle cellule MIAPaCa2 dopo trattamento con HA o HABut ad un dosaggio non citotossico, in un opportuno sistema *in vitro*. Questo consiste di camere di Boyden modificate, (Transwell) dotate di un cestello inserito in un pozzetto da coltura, la cui base è costituita da una membrana di policarbonato con pori di 8 μm , opportunamente ricoperta di Matrigel (100 $\mu\text{g}/300 \mu\text{l}$). Le cellule, una volta seminate sul pozzetto, se sono in grado di aderire e degradare lo strato di Matrigel, invadono il filtro e si depositano sul pozzetto sottostante dove è possibile contarle. Inoltre, marcando le cellule con adeguate sonde colorimetriche o fluorimetriche, è possibile quantificare il numero di cellule che sono rimaste sul filtro.

Le cellule MIA PaCa2 sono state pertanto marcate con la sonda fluorescente FAST Dil ed è stata valutata la loro capacità invasiva a 96 ore dalla semina. Questa sonda è un composto fluorescente liposolubile che attraversa facilmente la membrana cellulare e permane all'interno delle cellule per tempi lunghi senza interferire con processi vitali ed altre colorazioni. Ciò ci ha permesso di valutare l'invasività delle cellule sia quantitativamente, mediante lettura al fluorimetro, sia qualitativamente, raccogliendo le immagini dei filtri al microscopio ottico.

Il trattamento con acido ialuronico (1 mg/ml) non altera in modo significativo la capacità invasiva delle MIAPaCa2, in quanto il numero di cellule presenti sul filtro e nel pozzetto sottostante è pressochè uguale a quello dei controlli (100%, colonne azzurre e blu, Grafico 3).

Grafico 3. Invasività in vitro delle cellule MIAPaCa2 trattate con HA o HABut.

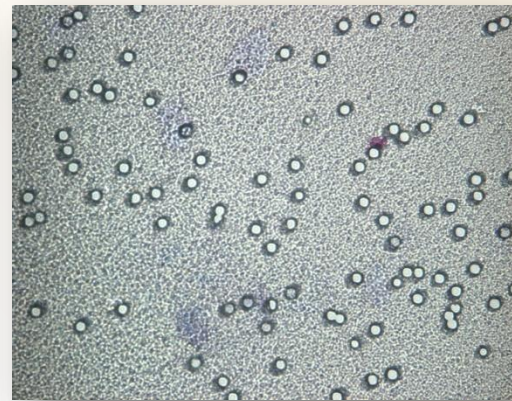
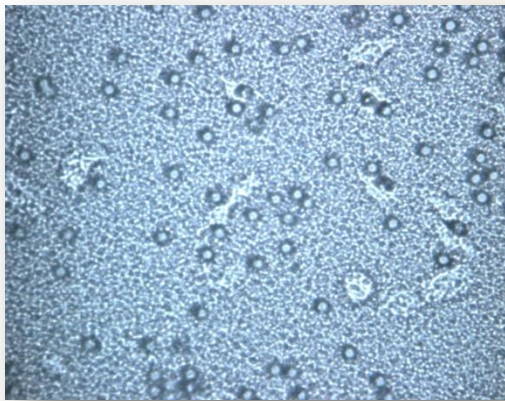


I valori riportati nel grafico rappresentano la capacità invasiva a 96 ore delle cellule MIAPaCa2, valutata mediante l'impiego di transwell ed espressa come media di 2 esperimenti ripetuti in triplicato. Ogni colonna rappresenta il valore medio % rispetto ai controlli non trattati ottenuto mediante lettura al fluorimetro (riportata come unità di fluorescenza RFU) delle cellule marcate con la sonda FAST Dil, presenti nella transwell completa (Totale), nel solo pozzetto sottostante (Sotto) e sul singolo filtro (Filtro). Le medie contrassegnate dall'asterisco risultano significativamente diverse dagli altri gruppi (* $p < 0,001$; ANOVA, Turkey-Kramer post test).

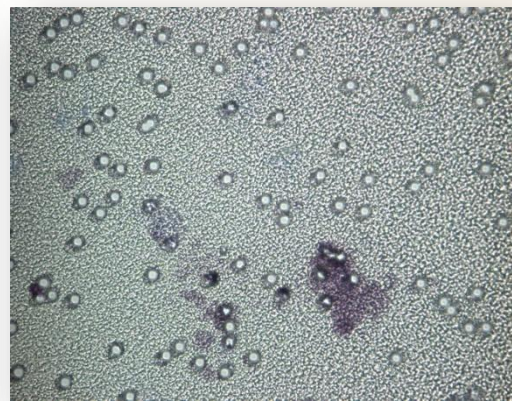
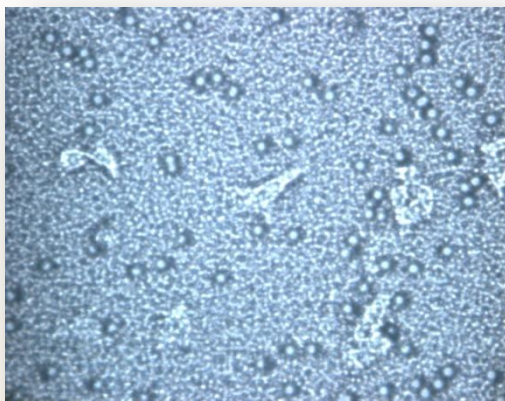
HABut invece, riduce significativamente l'invasività delle MIAPaCa2, infatti la percentuale di cellule presenti nel pozzetto sotto il filtro è circa il 50% dei controlli ($p < 0,05$).

Tale riduzione non è legata ad un effetto citotossico in quanto il numero delle cellule totali trattate con il bioconiugato è sovrapponibile a quello dei controlli (confronto tra colonna blu e verde nelle conte totali, **Grafico 3**), ma sembra dipendere da una vera inibizione della capacità delle cellule di migrare. Queste infatti rimangono intrappolate sopra il filtro. Difatti, le letture delle cellule trattate con 0,05 mg/ml di HABut presenti sul filtro risultano significativamente più alte di quelle dei controlli (140%, $p < 0,05$; Grafico 3).

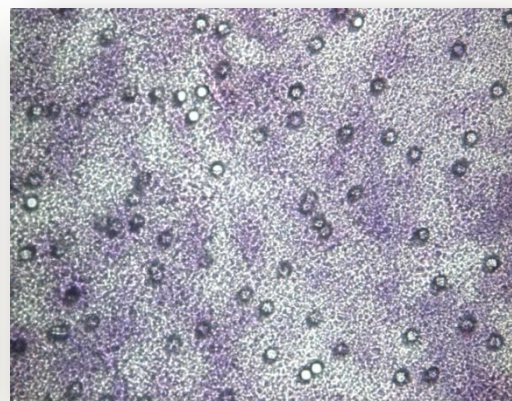
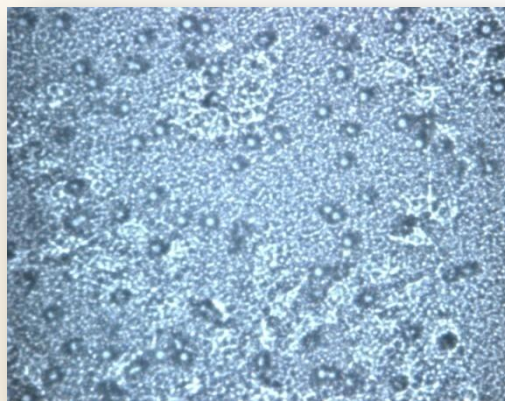
Figura 6. Morfologia delle cellule MIPaCa2 presenti sopra il filtro delle transwell (quelle che non hanno invaso) dopo trattamento con HA e HABut.



A: controllo non trattato non colorato (a sinistra) o colorato (a destra)



B: trattato con HA (1 mg/ml) non colorato (a sinistra) o colorato (a destra)



C: trattato con HABut (0,05 mg/ml) non colorato (a sinistra) o colorato (a destra)

A 96 ore dalla semina su transwell, le cellule che non hanno invaso e che quindi sono ancora presenti sulla superficie superiore del filtro sono state fissate con metanolo. I filtri sono poi stati analizzati al microscopio con ingrandimento 40x, prima e dopo la colorazione May-Grunwald-Giemsa. Le immagini sono state acquisite con fotocamera Leica.

La maggior presenza sul filtro delle cellule trattate con il bioconiugato è anche confermata dalle immagini raccolte con la fotocamera al microscopio ottico e visibili nella *Figura 6*. Le immagini *6-C* mostrano chiaramente che sul filtro raccolto dalla transwell trattata con HABut sono evidenti numerose cellule vitali, mentre sul filtro di controllo e su quello trattato con HA sono visibili solo pochissime (3 o 4) cellule (*Figura 6-A e 6-B*).

Che l'inibizione dell'invasione operata da HABut sulle cellule MIAPaCa2 non sia legata ad un effetto citotossico è confermata anche dal fatto che gli studi di crescita sul Matrigel, precedentemente condotti, non hanno evidenziato alcun segno di sofferenza nelle cellule trattate con questa dose. Inoltre, la dose più alta del bioconiugato, utilizzata in quegli studi (0,5 mg/ml), che già mostrava una certa citotossicità è risultata tossica anche nel sistema di invasione *in vitro* riducendo significativamente il numero di cellule totali (dati non riportati).

Complessivamente i dati ottenuti sulla capacità delle cellule MIAPaCa2 di aderire e di invadere uno strato di Matrigel confermano l'alto grado di malignità di tali cellule (Sugahara KN et al., 2003) e le potenziali attività antimaligne del bioconiugato HABut.

Il biocomplesso infatti, dimostra interessanti capacità antiinvasive a dosi non tossiche per le cellule trattate e tali proprietà sembrano esplicarsi attraverso modificazioni cellulari morfologico-funzionali.

Inoltre l'effetto antiinvasione indotto da HABut non è ascrivibile all'acido ialuronico presente nel coniugato.

Infine è interessante il fatto che questo bioconiugato, a seconda della dose utilizzata, presenti la capacità di uccidere le cellule tumorali o di modificarne la malignità.

HBR7: DOPPIO ESTERE DI ACIDO IALURONICO, SODIO BUTIRRATO ED ACIDO ALL-TRANS RETINOICO

L'acido retinoico è la terapia d'elezione nei pazienti che presentano Leucemia Promielocitica Acuta (APL), ma spesso tali pazienti vanno incontro a resistenza a tale trattamento.

L'associazione di un istone inibitore ad acido retinoico, date le basi molecolari della malattia, potrebbe revertire la resistenza, restituendo l'azione citotossica dell'acido retinoico (Coradini et al., 2006).

CITOTOSSICITÀ DI HBR7 SULLA LINEA MIA PACA2

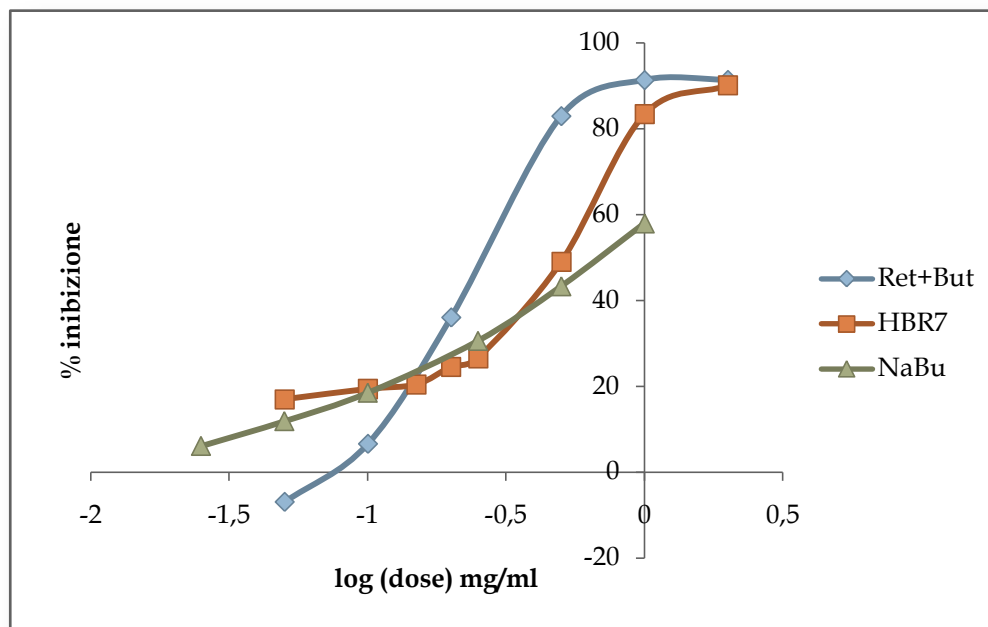
Il bioconiuigato bisostituito con acido all-trans retinoico e sodio butirrato HBR7 aveva dimostrato in studi effettuati precedentemente sulla linea NB4 di avere ottime caratteristiche antitumorali apprezzabili soprattutto negli studi in vivo (Coradini et al., 2004). Si è pertanto voluta studiare la citotossicità di questo bioconiuigato sulla linea di carcinoma del pancreas MIA PaCa2, rappresentativa di una patologia tutt'ora orfana di terapie efficaci in clinica.

Tabella 5. Caratteristiche di HBR7.

Nome composto	Concentrazione (mg/ml)	ATRA	Acido Butirrico
HBR7	4	$5,8 \times 10^{-5}$ mM	2,2 mM

In grafico sono riportate le curve dose-effetto di HBR7, del singolo sodio butirrato (NaBu) e del trattamento associato dei due principi attivi somministrati in proporzione e quantità equimolare a quella presente nel stesso.

Grafico 4. Curve dose-risposta di 5 giorni di trattamento effettuato sulla linea MIA PaCa2 con il bioconiugato HBR7 ed una miscela contenente i due principi attivi NaBu e Ret a concentrazioni equimolari a quelle presenti nel bioconiugato.



La dose è espressa in mg di bioconiugato/ml. 500 cellule sono state seminate in ogni pozzetto di una piastra multiwell da 96; il trattamento è stato effettuato per 5 giorni continuativi a partire da 24 ore successivamente alla semina.

Dopo cinque giorni di trattamento, il bioconiugato HBR7 esplica un effetto inibitorio sulla crescita cellulare, portando ad una inibizione del 91% alla massima dose utilizzata (2 mg/ml). Esso però risulta essere meno attivo dei singoli principi attivi, dato che risulta ancora più evidente se dalle curve si estrapolano i valori di IC50 ed il relativo indice di attività.

Tabella 6. Valori di IC50 calcolati sperimentalmente dalle curve riportate in grafico 4, con relativo indice di attività di HBR7 nei confronti di NaBu+ATRA.

Composto	IC50	Indice di attività*
Ret+But	0,272 mg/ml	1
HBR7	0,427 mg/ml	0,64

*espresso come rapporto tra IC50 Ret+But e IC50 HBR7

Il bioconiugato HBR7 per determinare l'uccisione del 50% delle cellule trattate deve essere somministrato ad una dose doppia rispetto a quella dei due principi attivi dati contemporaneamente.

TOSSICITÀ DI HBR7 SULLA LINEA DI CARCINOMA DEL PANCREAS MIA PaCa2 IN PRESENZA DI UN ANTICORPO CD44 BLOCCANTE

Come effettuato per il bioconiugato HABut, per verificare se l'effetto citotossico di HBR7 dipendesse dalla sua capacità di entrare nella cellula sfruttando il trasporto mediato dal recettore di superficie CD44, è stata valutata la vitalità delle cellule in seguito al pretrattamento con un anticorpo specifico anti-CD44.

Le cellule MIA PaCa2 sono state seminate su pozzetti da 6 (60.000 in 2 ml) e la loro vitalità è stata valutata mediante conta con il trypan blue dopo 24 ore di contatto con il bioconiugato previo trattamento con l'anticorpo anti-CD44 (2 µg/ml 30' prima del coniugato).

I risultati ottenuti sono riportati in tabella 7, nella quale sono evidenziate le percentuali di sopravvivenza cellulare dei vari gruppi. La vitalità cellulare è qui stata quantificata mediante conta vitale con trypan bleu.

Entrambe le dosi di HBR7 utilizzate hanno ridotto significativamente la vitalità cellulare, mentre l'utilizzo di un anticorpo bloccante il CD44 da solo non ha significativamente modificato la crescita della linea cellulare in esame.

L'effetto del pretrattamento delle cellule con l'anticorpo bloccante il sito di legame tra acido ialuronico e CD44 ha ridotto significativamente l'attività citotossica del bioconiugato, dato che risulta molto evidente alla dose più bassa utilizzata.

Tabella 7. Effetti del trattamento con HBR7 sulla vitalità cellulare della linea MIA PaCa2 pretrattate o meno con anticorpo bloccante il recettore CD44.

Gruppo	% vitalità cellulare	
Controlli	100	
Controlli + Ab	88,94	
HBR7 1 mg/ml	45,35	*A
HBR7 1 mg/ml + Ab	96,04	A
HBR7 2mg/ml	41,90	*
HBR7 2mg/ml + Ab	50,32	*

I dati sono espressi come inibizione percentuale della vitalità (T/C%). Le medie contrassegnate dall'asterisco risultano significativamente diverse dai controlli e a lettere uguali corrispondono valori medi diversi tra loro (* p <0,001; A: p <0,01; ANOVA, Tukey-Kramer post test).

Alla dose più bassa del bioconiugato HBR7 utilizzata, infatti, il pretrattamento con anticorpo bloccante il CD44 ha significativamente ridotto l'attività citotossica del farmaco, riportando la vitalità cellulare al 96,04%, non diverso né dai controlli non trattati né dai controlli trattati con il solo anticorpo.

La riduzione che si osserva invece alla dose più alta utilizzata (2mg/ml) seppur intuibile, non è statisticamente significativa.

Ciò non è sorprendente se si considera da un lato che probabilmente il pretrattamento da noi effettuato (30 minuti) è un tempo troppo breve per consentire un blocco totale dei recettori interessati per le successive 24 ore in cui il bioconiugato è presente.

La riduzione della vitalità cellulare osservata dimostra indirettamente che l'uptake del bioconiugato avviene attraverso un meccanismo CD44 mediato. Ovvero, il bioconiugato, per poter esplicare la sua attività citotossica, necessita della presenza di recettori CD44 espressi e funzionanti a livello della membrana citoplasmatica.

Dato che il bioconiugato non ha dimostrato di possedere attività citotossica superiore ad i singoli principi attivi su questa linea, lo studio sulla tossicità di HBR7 è stato interrotto a questo stadio preliminare.

BIOCONIUGATI A BASE DI ACIDO IALURONICO E DESAMETASONE O DESAMETASONE E SODIO BUTIRRATO

Tutti i composti sono stati gentilmente forniti dalla Sintofarm S.P.A. di Roma (Italia) già sciolti in soluzione fisiologica alle massima concentrazione possibile riportata nella tabella sottostante.

In tabella 8 sono riportati i composti utilizzati ed il loro contenuto in principio attivo di desametasone e sodio butirrato:

Tabella 8. Caratteristiche dei bioconiugati contenenti desametasone

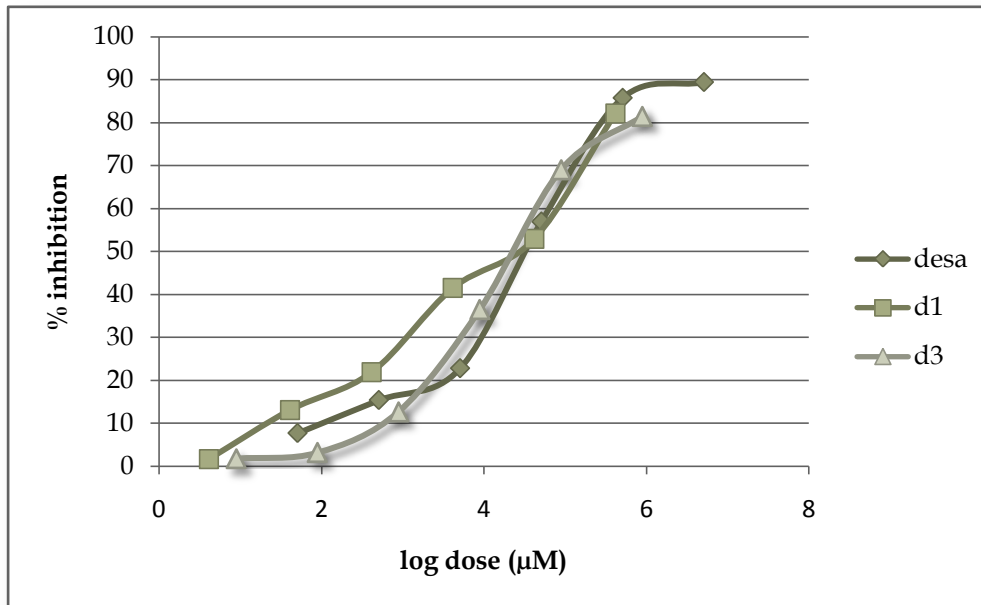
Nome composto	Concentrazione (mg/ml)	Desametasone (mg/ml)	Acido butirrico (mg/ml)
Desametasone (fiala commerciale)	4	/	/
D1	25	3,2	/
D3	10	0,7	/
BD1	20	2,1	0,2
BD2	25	1,5	0,2

CITOTOSSICITÀ DEL DESAMETASONE E DEI SUOI BIOCONIUGATI CON ACIDO IALURONICO SULLE LINEE NB4 E P388.

Entrambe le linee cellulari sono state incubate per 6 giorni consecutivi, in terreno completo con Desametasone o con i bioconiugati. I composti sono stati testati a quantità equimolari di principio attivo, in un range di concentrazioni compreso tra 5,1 nM e 5,1 mM.

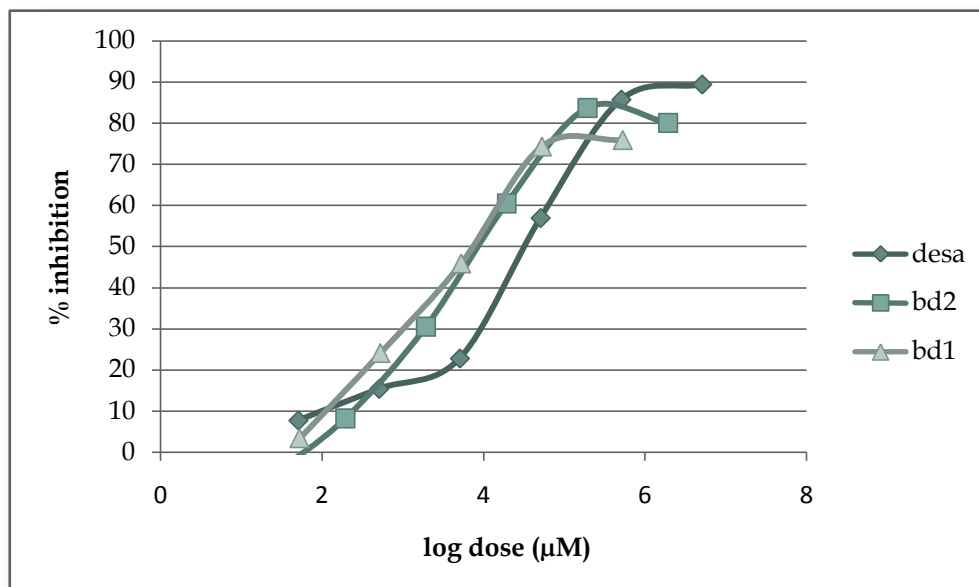
Per entrambe le linee cellulari si è proceduto seminando 500 cellule/pozzetto in piastre multiwell da 96 pozzetti 24 ore prima del trattamento. A partire dal giorno successivo le cellule sono state trattate per 6 giorni con i composti indicati.

Grafico 5. Curve dose effetto dei bioconiugati monosostituiti e desametasone sulla linea NB4



500 cellule sono state seminate 24 ore prima del trattamento in piastre multiwell. A partire dal giorno successivo sono state trattate per 6 giorni in terreno completo con i composti indicati. Alla fine dell'incubazione è stata misurata la citotossicità, qui espressa come inibizione percentuale della crescita, rispetto ai controlli non trattati, mediante il test MTT.

Grafico 6. Curve dose effetto dei bioconiugati bisostituiti e desametasone sulla linea NB4



500 cellule sono state seminate 24 ore prima del trattamento in piastre multiwell. A partire dal giorno successivo sono state trattate per 6 giorni in terreno completo con i composti indicati. Alla fine dell'incubazione è stata misurata la citotossicità, qui espressa come inibizione percentuale della crescita, rispetto ai controlli non trattati, mediante il test MTT.

Dopo 6 giorni di trattamento, tutti i bioconiugati esplicano un effetto inibitorio dose dipendente sulla crescita cellulare che porta mediamente ad una completa inibizione (85-95% rispetto ai controlli) alle massime concentrazioni utilizzate.

Tale inibizione risulta più marcata per i bioconiugati che contengono anche il butirrato, ovvero BD1 e BD2.

Dalle curve precedenti è stato possibile calcolare i valori di IC50 per i vari composti:

Tabella 9. Valori di IC50 calcolati sperimentalmente dalle curve riportate nei Grafici 5 e 6, con relativo indice di attività di HABut nei confronti del singolo NaBu.

IC50 estrapolate per NB4	D1	D3	BD1	BD2	desa
Media	18,42	20,81	6,56	9,22	39,2
Dev. St.	11,73	15,09	4,36	1,66	19,88
Indice di attività*	2,1	1,9	5,9	4,3	1

*=espresso come rapporto tra IC50 composto/IC50 desametasone

La maggior capacità citotossica dei bioconiugati doppiamente esterificati è ancora più evidente se si confrontano tra loro le IC50 estrapolate dalle curve dose-risposta dei singoli composti. Infatti il valore di IC50 di BD2 (6.6 μ M) e di BD1 (9.2 μ M) è rispettivamente circa la metà ed un terzo di quello dei derivati D1 (18.4 μ M) e D3 (20.8 μ M).

Se poi si confronta l'attività dei bioconiugati doppiamente esterificati con il singolo Desametasone si nota che quest'ultimo arriva all'inibizione totale ad una concentrazione molare 5-6 volte più alta. Ricordando infatti che il valore di IC50 rappresenta la dose che da l'effetto del 50%, si nota come tale valore per i derivati HA-BD è inferiore di circa 5 volte a quello del Desametasone, come si può apprezzare meglio dall'indice di attività indicato (5,9-4.3).

Grafico 7. Curve dose effetto dei bioconiugati monosostituiti e desametasone sulla linea P388

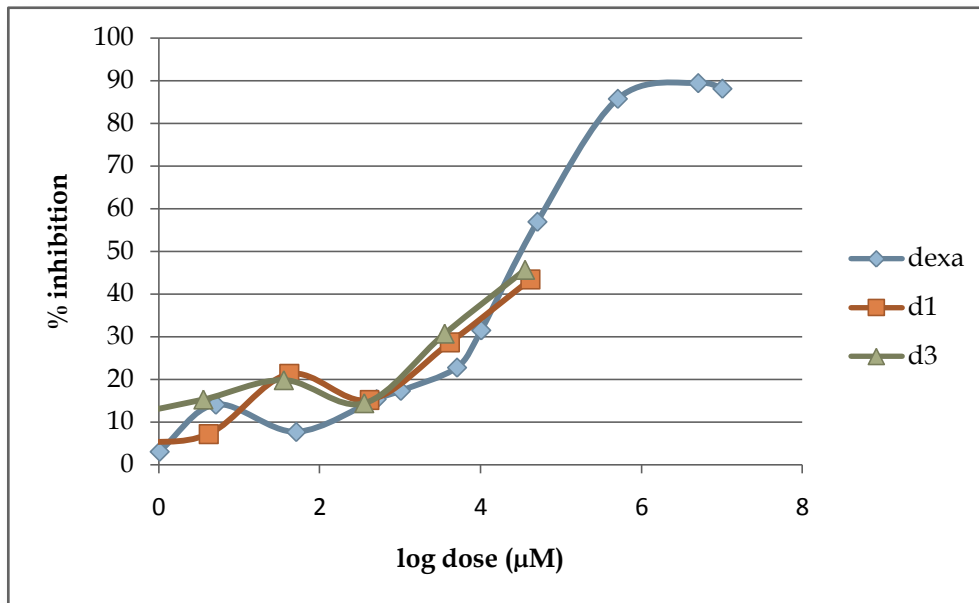
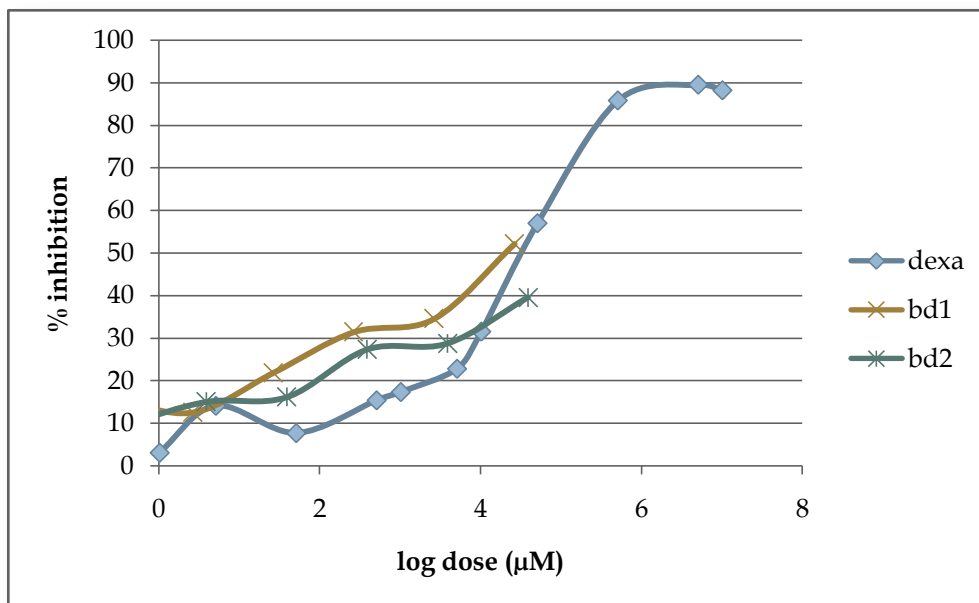


Grafico 8. Curve dose effetto dei bioconiugati bisostituiti e desametasone sulla linea P388.



500 cellule sono state seminate 24 ore prima del trattamento in piastre multiwell. A partire dal giorno successivo sono state trattate per 6 giorni in terreno completo con i composti indicati. Alla fine dell'incubazione è stata misurata la citotossicità, qui espressa come inibizione percentuale della crescita, rispetto ai controlli non trattati, mediante il test MTT.

I grafici 7 e 8 riportano le curve dose effetto ottenute sulla linea cellulare P388.

Dopo 6 giorni di trattamento, tutti i bioconiugati esplicano un effetto inibitorio dose dipendente sulla crescita cellulare ma in nessun caso si raggiunge il 50% di inibizione della crescita nemmeno alla massima dose utilizzabile (i composti sono stati forniti dalla ditta produttrice già disciolti in PBS al loro limite di solubilità).

Per la linea P388, pertanto, non è stato possibile calcolare il valore di IC50 dei vari bioconiugati.

I dati fin qui ottenuti sulla linea leucemica umana NB4 indicano che la combinazione tra il Desametasone ed il vettore biocompatibile acido ialuronico aumenta significativamente la citotossicità del principio attivo, confermando quanto già visto in precedenza su altre linee tumorali in vitro per altri bioconiugati con acido ialuronico (Coradini et al., 2006).

Questo dato, sebbene atteso, non risulta scontato in quanto in letteratura esistono numerosi studi su altri bioconiugati che indicano sempre un maggior effetto citotossico in vitro del principio attivo originale rispetto al coniugato (Luo et al., 2002). Caso che per altro si verifica anche per questi bioconiugati sulla linea leucemica murina P388, che risulta significativamente più sensibile al singolo Desametasone.

La scarsa sensibilità ai bioconiugati di acido ialuronico di queste cellule tumorali murine potrebbe essere ascrivibile al minor livello di espressione sulla loro superficie del recettore CD44. Se infatti vale l'ipotesi di partenza di una internalizzazione selettiva del principio attivo legato all'acido ialuronico che coinvolge tale recettore, è logico aspettarsi un maggior effetto in presenza di un più alto numero dei suddetti recettori.

Poichè la linea leucemica murina P388 risulta poco sensibile ai bioconiugati si è deciso di proseguire gli studi sia in vitro che in vivo sulla linea umana NB4.

CITOTOSSICITÀ DEI BIOCONIUGATI CON DESAMETASONE SULLA LINEA CELLULARE NB4 IN PRESENZA DI UN ANTICORPO BLOCCANTE IL CD44.

Per verificare se l'effetto citotossico dei bioconiugati di Desametasone è dipendente dalla loro capacità di entrare nella cellula sfruttando il trasporto mediato dal recettore di superficie CD44 si è deciso di valutare la vitalità delle NB4 in seguito al pretrattamento con un anticorpo specifico anti-CD44.

Come detto anche per le linee precedenti, anche in questo caso per fare questa prova è stato necessario utilizzare le condizioni migliori che tenessero conto della velocità di entrata del bioconiugato nella cellula, del metodo di valutazione del suo effetto citotossico e del turnover dei recettori CD44. E' infatti impensabile che un anticorpo riesca a bloccare funzionalmente per tempi più lunghi di 12-24 ore un recettore di membrana che fisiologicamente è soggetto ad un processo di internalizzazione.

Le cellule NB4 sono state pertanto seminate su pozzetti da 6 (60.000 in 2 ml) e la loro vitalità è stata valutata mediante conta con il trypan blue dopo 24 ore di contatto con i bioconiugati HA-D3 ed HA-BD2 previo trattamento con l'anticorpo anti-CD44 (2 µg/ml 30' prima del coniugato). I due bioconiugati sono stati scelti sulla base dell'efficacia dimostrata nei precedenti test MTT ed utilizzati a due livelli di concentrazione con un contenuto di Desametasone di 350 e 500 µg/ml.

Tabella 10. Effetti del trattamento con HA-D3 ed HA-BD2 sulla vitalità cellulare delle NB4 pretrattate o non con un anticorpo bloccante il CD44:

Gruppo	Numero di cellule vive x10 ⁶ (media ± S.E.M.)	% vitalità (T/C)
Controlli	1,31 ± 0,08	100
D3 350 mg/ml	0,53 ± 0,20***a	40,6
D3 350 mg/ml + Anti CD44	1,08 ± 0,14 ^a	82,5
D3 500 mg/ml	0,50 ± 0,20***b	38,1
D3 500 mg/ml + Anti CD44	1,00 ± 0,25 ^b	76,2
BD2 350 mg/ml	0,58 ± 0,14***c	44,4
BD2 350 mg/ml + Anti CD44	0,83 ± 0,14**c	63,5
BD2 500 mg/ml	0,43 ± 0,11***	33,0
BD2 500 mg/ml + Anti CD44	0,62 ± 0,12***	47,0

I valori riportati in tabella rappresentano le conte cellulari mediante il test del Trypan Blue eseguite dopo 24 ore di trattamento con HA-D3 e HA-BD2 alle dosi di 350 µg/ml e 500 µg/ml, eventualmente pretrattate con un anticorpo anti-CD44 (1 µg/ml) 30' prima. I dati sono anche espressi come inibizione percentuale della vitalità (T/C%). Le medie contrassegnate dall'asterisco risultano significativamente diverse dai controlli e a lettere uguali corrispondono valori medi diversi tra loro (**: p <0,01; ***: p <0,001; a: p <0,01; b, c: p <0,05; ANOVA, Turkey-Kramer post test).

I risultati ottenuti sono riportati nella Tabella 10 che mostra le conte delle cellule vitali ottenute nei vari gruppi considerati.

Come si può notare entrambe le concentrazioni di D3 utilizzate diminuiscono significativamente il numero di cellule vive rispetto ai controlli non trattati. Inoltre questa inibizione non sembra essere dose-dipendente poichè raggiunge valori ugualmente marcati con entrambe le dosi utilizzate (500 µg/ml inibizione al 38 %, 350 µg/ml inibizione al 41 %, vs controlli, p<0,001).

Degna di nota è però la scomparsa dell'effetto inibitorio indotto dal trattamento con D3 in presenza dell'anticorpo anti-CD44.

Infatti in entrambi i gruppi pretrattati con l'anticorpo che ricevono D3 la vitalità rimane invariata rispetto ai controlli (inibizione al 85 e 76 % non significativa rispetto ai controlli) ma diversa da entrambi i trattamenti con il solo HA-D3 (p<0,01 e p<0,05 rispettivamente per la dose di 350 e 500 µg/ml) (Tabella 10)

L'effetto del pretrattamento con l'anti-CD44 è invece meno marcato per il bioconiugato BD2 e risulta dose-dipendente. Infatti il trattamento con BD2 riduce

significativamente il numero di cellule vive rispetto ai controlli non trattati (500 µg/ml inibizione al 33 %, 350 µg/ml inibizione al 44 %, vs controlli, $p < 0,001$) mentre il pretrattamento con l'anticorpo riporta la vitalità delle cellule ad un valore leggermente più alto (63.5 %) solo quando associato alla dose più bassa di bioconiugato.

Quando invece l'anticorpo viene associato alla dose più alta di HA-BD2 non si nota alcuna variazione significativa dell'inibizione della crescita cellulare rispetto a quella indotta dal solo trattamento con il bioconiugato (33 % vs 47% non significativo, *Tabella 9*).

Ciò non è sorprendente se si considera da un lato che probabilmente il pretrattamento da noi effettuato (30 minuti) è un tempo troppo breve per consentire un blocco totale dei recettori interessati per le successive 24 ore in cui il bioconiugato è presente; e dall'altro se si considera la contemporanea presenza in questo bioconiugato di due principi attivi diversi (Desametasone e Sodio butirrato).

Complessivamente i risultati sulla vitalità delle cellule leucemiche umane NB4 in presenza di un anticorpo capace di bloccare il legame tra CD44 ed acido ialuronico confermano che affinché i bioconiugati di HA-Desametasone esplicino al massimo il loro effetto citotossico è necessaria la presenza sulla superficie cellulare di recettori CD44 funzionanti, cioè in grado di legare l'acido ialuronico,

Questo dato dimostra indirettamente che l'uptake del bioconiugato avviene attraverso questo recettore di membrana.

La situazione non risulta così esplicita per i biocomplessi doppiamente esterificati: per questi bioconiugati l'interpretazione dei dati risulta più complessa e deve probabilmente tener conto del contributo che ogni singolo principio attivo apporta all'effetto biologico che si sta valutando.

EFFETTO DIFFERENZIANTE DEL DESAMETASONE E DEI SUOI BIOCONIUGATI CON ACIDO IALURONICO SULLE CELLULE NB4.

Le cellule NB4, derivando da un paziente con leucemia acuta promielocitica (APL), sono caratterizzate da una specifica traslocazione cromosomiale 15:17 e conservano anche in coltura la loro origine promielocitica, dovuta ad un'espansione clonale di precursori ematopoietici bloccati proprio allo stadio promielocitico (Melnick et al., 1999).

Per questo motivo, molti autori riportano che tali cellule, quando sono esposte all'acido retinoico (ATRA) subiscono la differenziazione in monociti/granulociti (Park H.Y. et al 2004). Non va inoltre dimenticato che il trattamento dei pazienti con APL viene fatto di norma con ATRA proprio sfruttando le sue capacità differenzianti.

Studi precedenti avevano dimostrato che il bio coniugato HBR7 manteneva su tale linea l'effetto differenziante noto del principio attivo (Coradini et al., 2006).

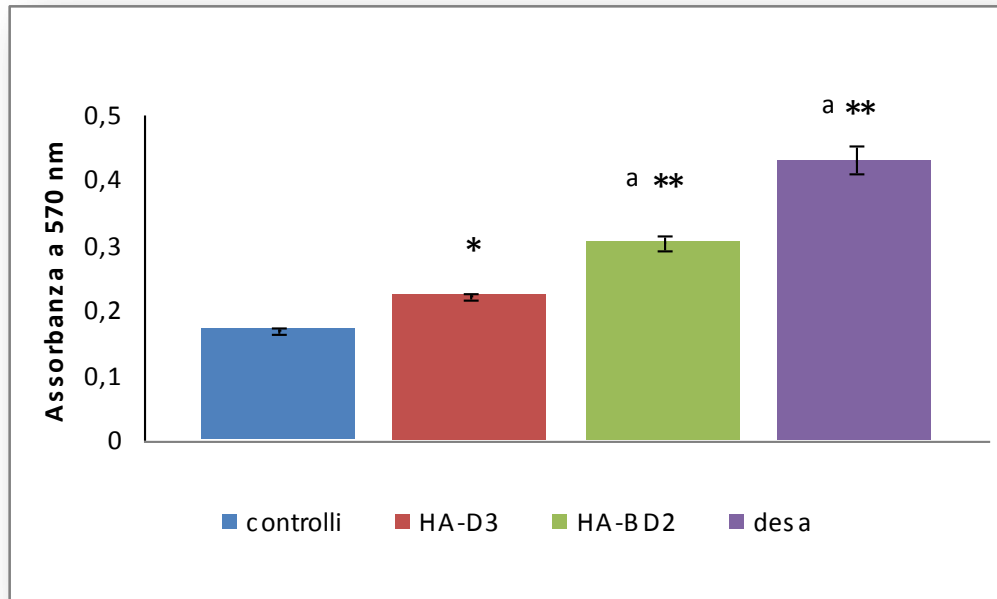
Si è perciò deciso di verificare se anche i bioconiugati HA-Desametasone presentano attività differenziante su tale linea.

La prova è stata eseguita mediante il test di riduzione dell'NBT, poichè Teufelhor e colleghi (2003) riportano che la riduzione da parte dell'enzima succinato deidrogenasi, del sale NBT, può essere correlata proprio con l'inizio del processo di differenziamento cellulare sulla linea NB4.

Per fare ciò le cellule sono state trattate per 72 ore con Desametasone 39 μM , HA-D3 9 μM ed HA-BD2 alla dose di 21 μM e poi processate per il test NBT.

Le dosi sono state estrapolate dalle curve dose-risposta ottenute nei precedenti test di citotossicità per 6 di trattamento e corrispondono a specifici valori di IC50. I valori ottenuti sono riportati nel Grafico 9 come medie delle letture di densità ottica (assorbanza) a 570 nm di 6 campioni per gruppo.

Grafico 9. Effetto differenziante del trattamento con Desametasone ed i bioconiugati HA-D3 ed HA-BD2 sulle cellule umane NB4 determinato mediante test NBT.



I valori riportati nel grafico rappresentano la densità ottica letta a 570 nm dei vari gruppi. I valori sono la media \pm SEM di 2 esperimenti ripetuti in quintuplicato. Le dosi dei composti usati sono Desametasone 39 μ M, HA-BD2 21 μ M, HA-D3 9 μ M;

Le medie contrassegnate dall'asterisco risultano significativamente diverse dai controlli e a lettere uguali corrispondono valori medi diversi tra loro (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; a: $p < 0,05$; ANOVA, Turkey-Kramer post test).

Come si può notare tutti i trattamenti eseguiti aumentano in modo significativo il valore di assorbanza rispetto ai controlli; tale effetto è più marcato per il Desametasone ed il bioconiugato HA-BD2 ($p < 0,01$ vs controlli) e meno evidente per HA-D3 ($p < 0,05$ vs controlli). L'incremento indotto dal Desametasone è anche significativamente più alto di quello di HA-BD2 ($p < 0,05$). Ciò potrebbe essere dovuto in parte alla maggiore velocità di entrata del Desametasone che riesce pertanto ad esplicare anche un effetto citotossico dopo solo 72 ore di trattamento. Cosa molto improbabile per i bioconiugati che invece entrano nella cellula più lentamente essendo il loro uptake condizionato dal numero di recettori CD44 presenti. Questa spiegazione è peraltro supportata dall'osservazione al microscopio ottico delle piastre a 72 ore dal trattamento che indicano una vistosa presenza di cellule morfologicamente disgregate (dati non riportati).

Sia il Desametasone che i bioconiugati D3 ed BD2 sono in grado di indurre il differenziamento cellulare sulle cellule NB4, sebbene in modo quantitativamente diverso.

Interessante è l'effetto di differenziamento che si ottiene con il bioconiugato doppiamente esterificato, che risulta significativamente superiore a quello del coniugato che contiene solo Desametasone

Ciò non è sorprendente ma conferma quanto già visto per HBR7, l'altro bioconiugato di acido ialuronico e sodio butirrato.

L'effetto differenziante di BD2 sulle NB4 risulta ancora più stimolante se si considera anche la sua attività citotossica su questa linea cellulare. Infatti confrontando complessivamente l'effetto di HA-BD2 sulle cellule NB4 con quello del Desametasone, risulta evidente il potenziale vantaggio terapeutico del bioconiugato che unisce una buona attività differenziante ad un elevato effetto citotossico, notevolmente superiore a quello del farmaco cortisonico.

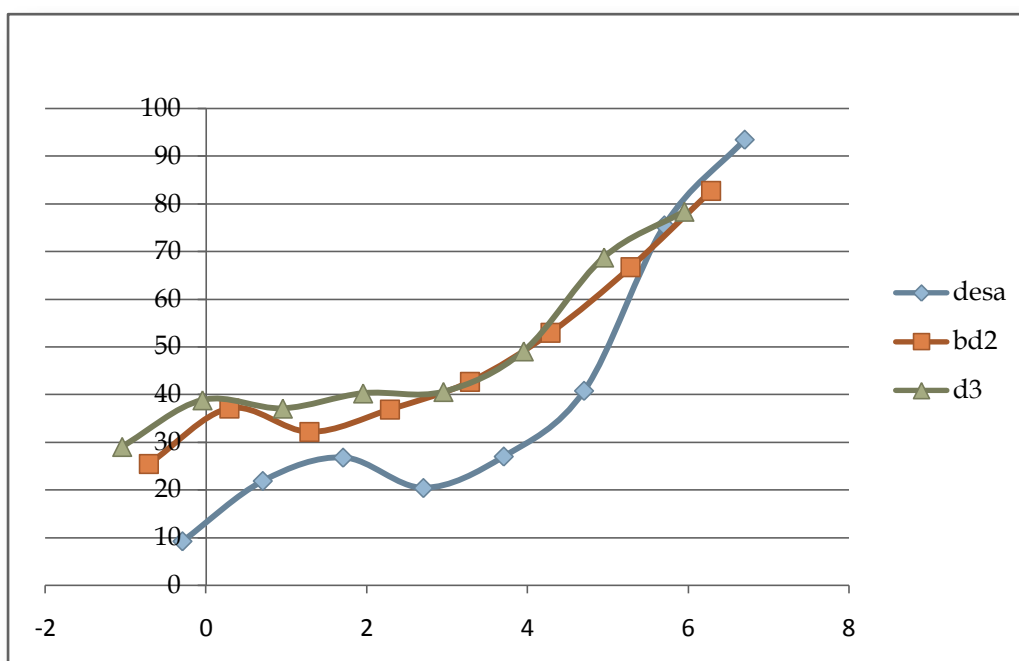
CITOTOSSICITÀ DEI BIOCONIUGATI D3 E BD2 SULLE LINEE CELLULARI MIA PaCa2 E MDA-MB-231

La citotossicità è stata valutata mediante il test MTT, il quale misura indirettamente la vitalità cellulare esprimendola come capacità metabolica della cellula di trasformare, per azione delle deidrogenasi mitocondriali, il sale di tetrazolio in blu di formazano, prodotto colorato, leggibile allo spettrofotometro a 570 nm.

Entrambe le linee cellulari sono state incubate per 6 giorni consecutivi, in terreno completo con Desametasone o con i bioconiugati. I composti sono stati testati a quantità equimolari di principio attivo, in un range di concentrazioni compreso tra 5,1 nM e 5,1 mM.

Per la linea cellulare MIA PaCa2 si è proceduto seminando 500 cellule/pozzetto in piastre multiwell da 96 pozzetti 24 ore prima del trattamento. A partire dal giorno successivo le cellule sono state trattate per 6 giorni con i composti indicati.

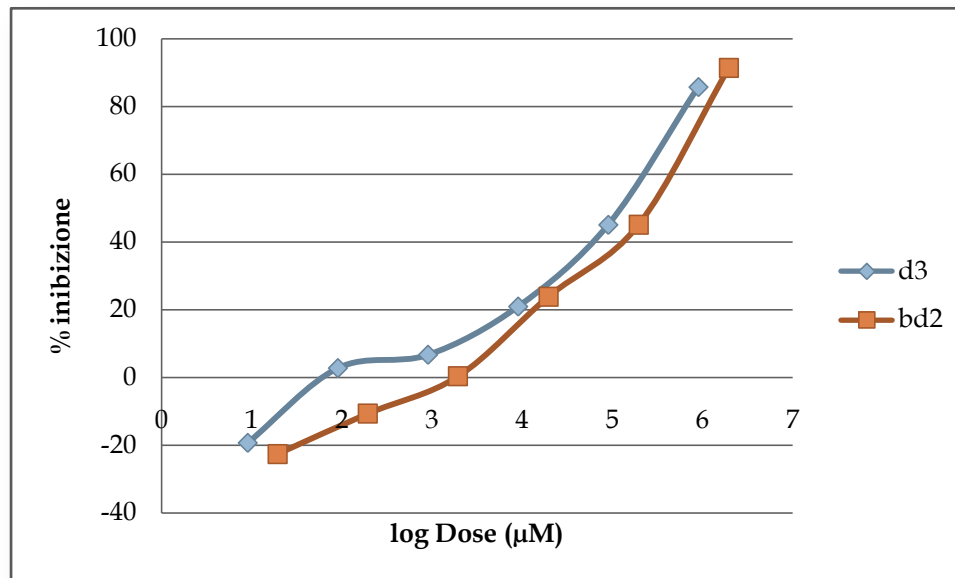
Grafico 10.: curve dose effetto dei bioconiugati D3 e BD2 e desametasone sulla linea MIA PaCa2



500 cellule sono state seminate 24 ore prima del trattamento in piastre multiwell. A partire dal giorno successivo sono state trattate per 6 giorni in terreno completo con i composti indicati. Alla fine dell'incubazione è stata misurata la citotossicità, qui espressa come inibizione percentuale della crescita, rispetto ai controlli non trattati, mediante il test MTT.

Per la linea cellulare MDA-MB-231 si è proceduto seminando 1500 cellule/pozzetto in piastre multiwell da 96 pozzetti 24 ore prima del trattamento. A partire dal giorno successivo le cellule sono state trattate per 6 giorni con i composti indicati.

Grafico 11. Curve dose effetto dei bioconiugati D3 e BD2 e desametasone sulla linea MDA MB-231.



1500 cellule sono state seminate 24 ore prima del trattamento in piastre multiwell. A partire dal giorno successivo sono state trattate per 6 giorni in terreno completo con i composti indicati. Alla fine dell'incubazione è stata misurata la citotossicità, qui espressa come inibizione percentuale della crescita, rispetto ai controlli non trattati, mediante il test MTT.

Dalle curve è stato possibile calcolare i valori di IC50:

Tabella 11. Valori di IC50 estrapolati dalle curve precedenti per MIA PaCa2 e MDA-MB-231:

MIA PaCa2	IC50 estrapolata	St. dev	Indice di attività *
D3	19,4μM	3,5	1,70
BD2	18,6μM	2,3	1,75
Desametasone	32,6μM	5,6	-

MDA-MB231	IC50 estrapolata	St. dev	Indice di attività *
D3	68,5μM	11,5	n.c.
BD2	114,0μM	15,6	n.c.

*espresso come IC50trattati/IC50 controlli

Su entrambe le linee i bioconiugati hanno evocato risposta citotossica in maniera dose-dipendente.

L'attività di entrambi i bioconiugati è risultata notevolmente marcata sulla linea di carcinoma del pancreas MIA PaCa2, con valori di IC50 simili come ordine di grandezza a quelli visti per la linea di leucemia NB4.

Dato ancora più interessante risulta dal confronto dell'attività dei bioconiugati con quella del singolo desametasone: entrambi i composti infatti hanno mostrato indici di attività di 1,7; risultano cioè entrambi più efficaci del principio attivo non legato al vettore acido ialuronico.

ATTIVITÀ DEI BIOCONIUGATI SUL PROCESSO ANGIOGENETICO *IN VITRO*

Infine si è voluto valutare l'effetto dei bioconiugati e del singolo acido ialuronico sul processo che porta alla formazione di nuovi vasi (neoangiogenesi). Tale processo, come già precedentemente esposto, è di cruciale importanza per lo sviluppo e la crescita tumorale, al punto che la terapia antiangiogenica, che utilizza composti inibitori dell'angiogenesi, attualmente fa parte dei protocolli antineoplastici.

La curiosità di studiare questo aspetto dei bioconiugati nasce da diversi lavori scientifici che indicano l'acido ialuronico endogeno coinvolto nella regolazione del processo angiogenico. In particolare l'attività angiogenica di HA sembra dipendere dalle sue dimensioni: l'acido ialuronico con un alto PM è antiangiogenico (Slevin M et al., 2004), mentre suoi oligosaccaridi di piccole dimensioni (PM 1.350-12.000 Dalton) risultano proangiogenici (Slevin M et al., 2004, Simpson MA et al., 2002).

Poiché diversi HA di piccole dimensioni possono facilmente venir generati nell'ambiente tumorale, ricco di ialuronidasi (Pham HT et al., 1997), si è deciso di verificare l'effetto dei bioconiugati sul processo angiogenico, confrontandolo con quello di due HA a diverso PM (alto: 150.000 Da e basso: 16.000 Da).

E' stato usato un modello commercializzato di origine umana noto con il nome di AngioKit® (TCS CellWorks), costituito da cellule endoteliali umane di origine embrionale (HUVEC), estratte da cordone ombelicale e seminate in un terreno appositamente formulato (matrice).

Le cellule endoteliali inizialmente formano delle piccole isole all'interno della matrice di coltura, poi cominciano a proliferare ed entrano nella fase migratoria durante la quale formano delle primitive strutture tubulari. Queste si sviluppano gradualmente, in circa 12-14 giorni, fino a formare una fitta rete di capillari e vasi.

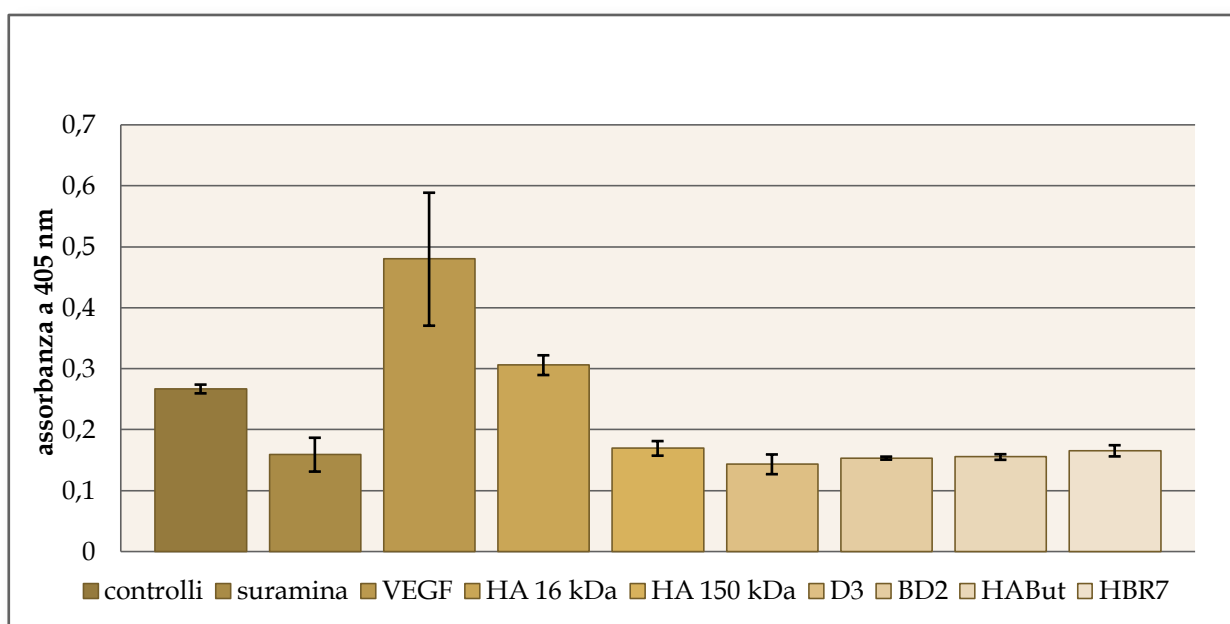
Il kit è stato ideato per confrontare l'attività sull'angiogenesi delle sostanze da testare con quella di noti inibitori (Suramina) o stimolatori macromolecolari (VEGF), e permette contemporaneamente una valutazione sia qualitativa che quantitativa dello sviluppo dei nuovi vasi sanguigni.

Infatti, sfruttando un anticorpo primario specificatamente rivolto verso l'antigene umano CD31, conosciuto anche con il nome di molecola di adesione cellulare-endoteliale (PECAM-1), ed un anticorpo secondario coniugato con fosfatasi alcalina (AP), rende leggibile la quantità dello sviluppo angiogenico mediante lettura allo spettrofotometro del surnatante di coltura e la visualizzazione dei vasi nello stesso pozzetto.

I risultati ottenuti sono rappresentati nel Grafico 12 e nelle Figura 7, 8 e 9 raccolte in due esperimenti separati a 12 giorni dall'inizio del trattamento che è stato eseguito, secondo protocollo con tutti i composti, compresi gli standard di riferimento, nei giorni 4, 7 e 9.

Come si può notare il trattamento con il VEGF (500 μ l di soluzione 2 ng/ml), noto stimolatore dell'angiogenesi, aumenta significativamente ($p < 0,001$) lo sviluppo dei vasi rispetto a tutti gli altri gruppi, trattati o no. Viceversa, i pozzetti trattati con Suramina (500 μ l di soluzione 20 μ M), utilizzato come composto inibitore di riferimento, presentano quantitativamente meno vasi dei controlli non trattati ($p < 0,05$).

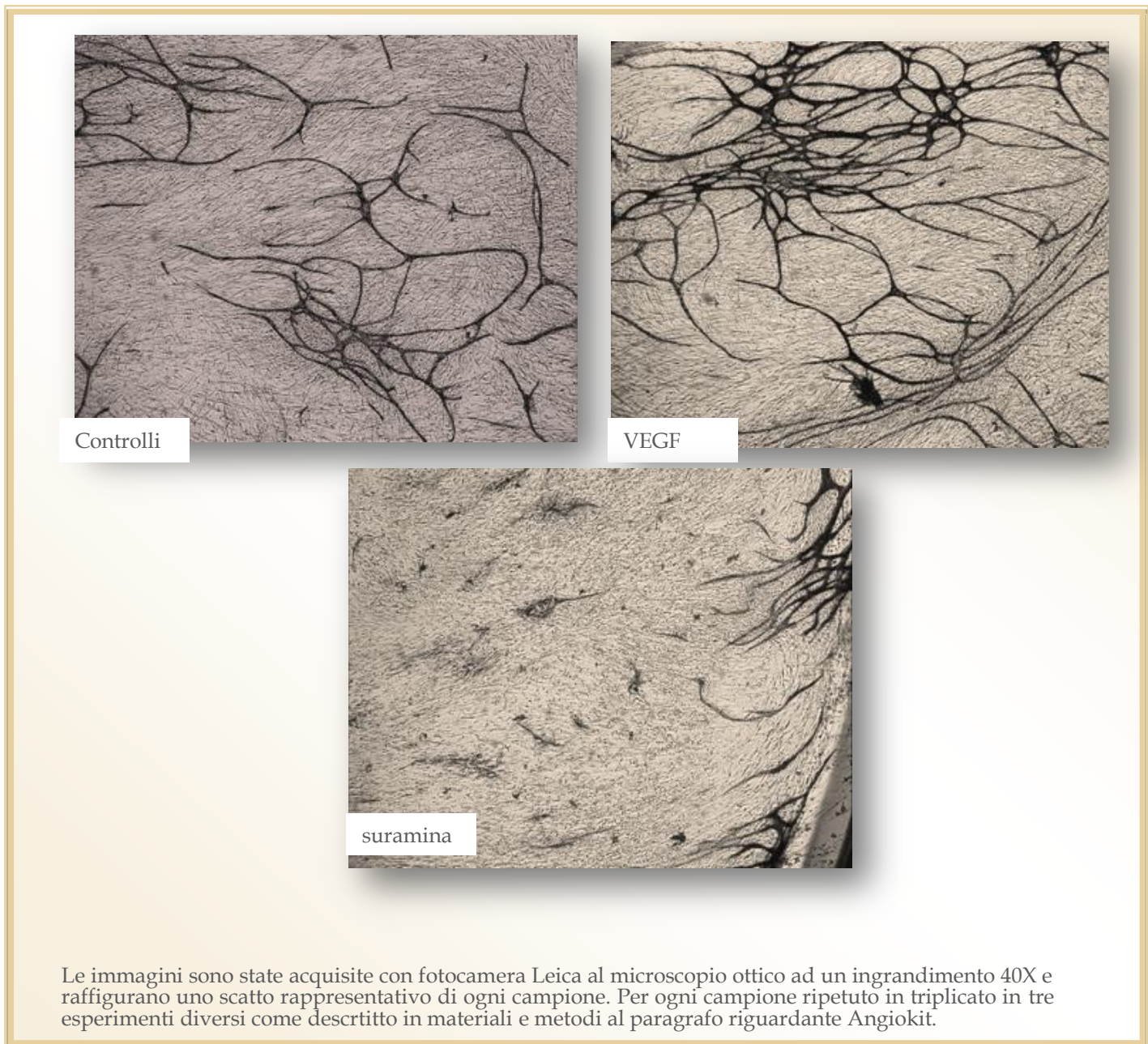
Grafico 12. Valutazione quantitativa dell'effetto antiangiogenico dei bioconiugati e dell'acido ialuronico di diverso peso molecolare:



I dati esposti nel grafico esprimono la valutazione quantitativa dello sviluppo di nuovi vasi determinata, mediante l'impiego di un Angiokit commerciale e rappresentano la densità ottica letta a 405 nm nel surnatante dei vari gruppi. I valori riportati rappresentano la media \pm SEM di 2 esperimenti ripetuti in triplicato. Le medie contrassegnate dall'asterisco risultano significativamente diverse dal gruppo di controllo (* $p < 0,05$) mentre il simbolo § indica un valore medio diverso da tutti gli altri ($p < 0,001$; ANOVA, Tukey-Kramer post test).

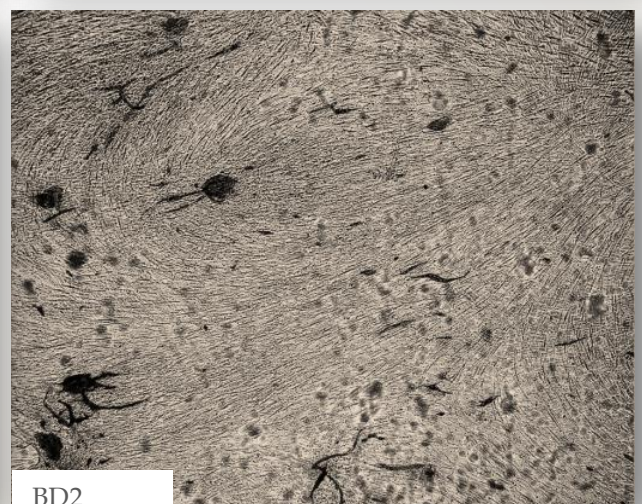
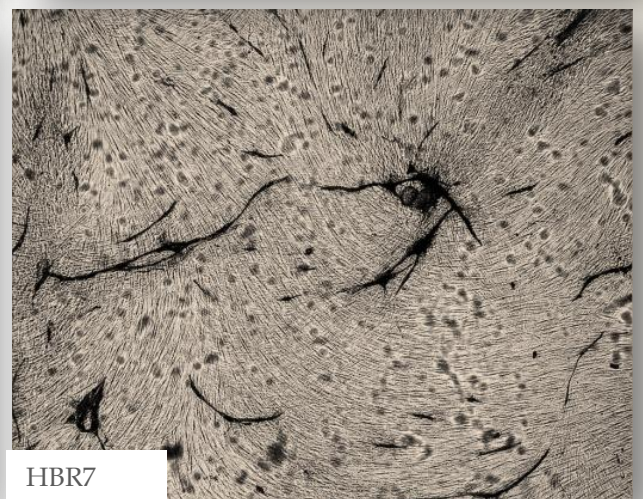
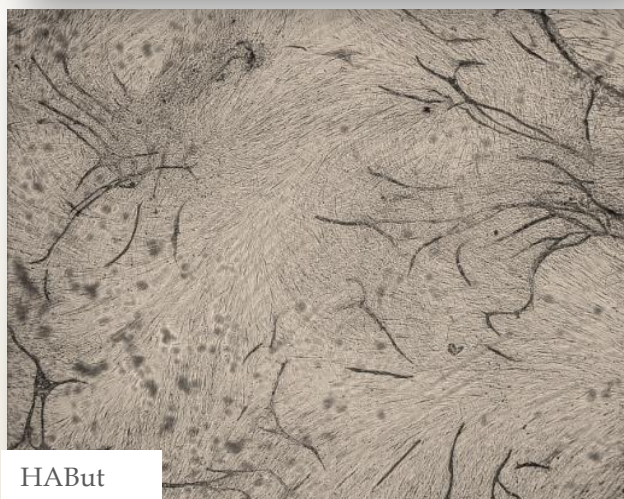
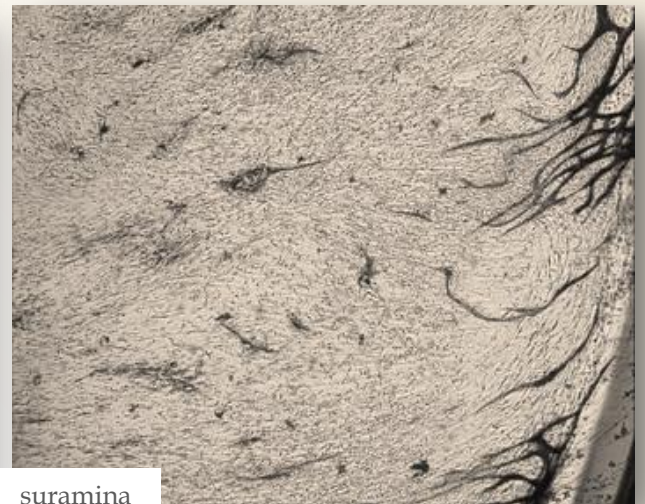
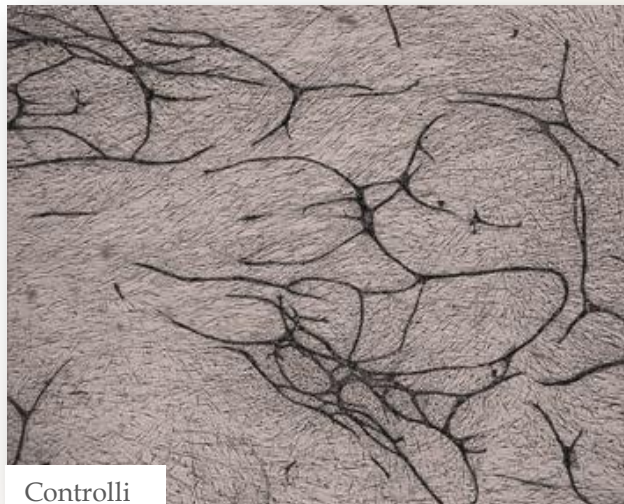
Le immagini raccolte con la fotocamera al microscopio ottico confermano la valutazione quantitativa: si può notare infatti come nel pozzetto del controllo positivo (trattato con VEGF, figura 7) sia presente una vistosa rete di vasi, ben delimitati e ramificati, molto più numerosa di quella visibile nel controllo non trattato.

Figura 7. Foto al microscopio ottico dei campioni di controllo di Angiokit:



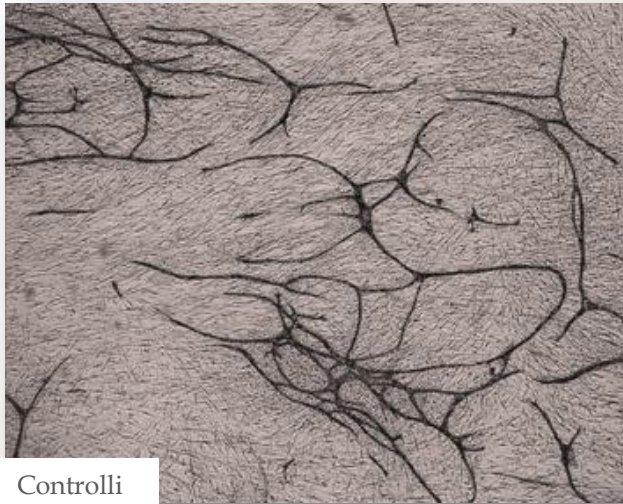
Molto evidente, sia in grafico che nelle immagini a seguito riportate, è l'inibizione della neoangiogenesi provocata da tutti i bioconiugati. Tutti i composti utilizzati infatti hanno significativamente ridotto la formazione di vasi nei pozzetti.

Figura 8. Foto al microscopio ottico dei campioni trattati con i vari bioconiugati:

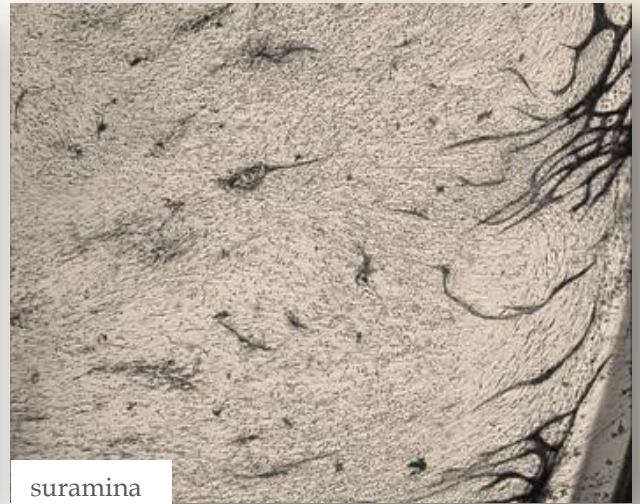


Le immagini sono state acquisite con fotocamera Leica al microscopio ottico ad un ingrandimento 40X e raffigurano uno scatto rappresentativo di ogni campione. Per ogni campione ripetuto in triplicato in tre esperimenti diversi come descritto in materiali e metodi al paragrafo riguardante Angiokit.

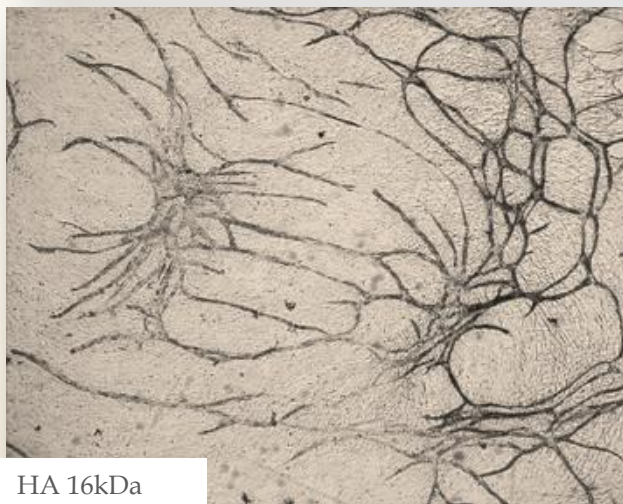
Figura 9. Foto al microscopio ottico dei campioni trattati con acido ialuronico:



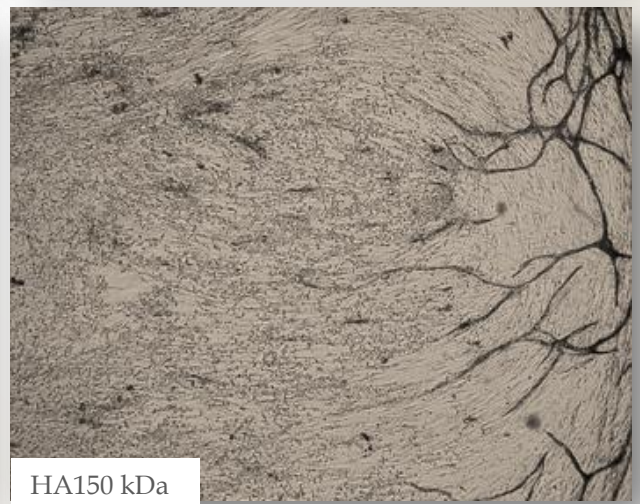
Controlli



suramina



HA 16kDa



HA150 kDa

Le immagini sono state acquisite con fotocamera Leica al microscopio ottico ad un ingrandimento 40X e raffigurano uno scatto rappresentativo di ogni campione. Per ogni campione ripetuto in triplicato in tre esperimenti diversi come descritto in materiali e metodi al paragrafo riguardante Angiokit.

L'acido ialuronico utilizzato negli esperimenti ha confermato le indicazioni presenti in letteratura, evocando due risposte differenti a seconda del peso molecolare del composto presente nel pozzetto:

- ✚ l'acido ialuronico ad alto peso molecolare ha significativamente ridotto la neoangiogenesi in vitro con potenza sovrapponibile a quella dei bioconiugati;
- ✚ l'acido ialuronico con peso molecolare pari a 16 kDa (peso molecolare definito "medio" in letteratura) non ha evidenziato di possedere alcun effetto sulla formazione dei nuovi vasi nell'ambiente sperimentale.

Quest'ultimo dato risulta particolarmente importante poiché l'acido ialuronico presente nei bioconiugati studiati ha dimensioni dell'ordine di 16-20 kDa. Pertanto si può concludere che l'attività antiangiogenica dei bioconiugati non risulta ascrivibile all'acido ialuronico in essi contenuto.

Complessivamente i risultati sull'angiogenesi indicano per i bioconiugati HA-D3 ed HA-BD2 delle significative proprietà inibitorie su questo processo così importante nello sviluppo di un tumore.

Ed indicano contemporaneamente che tale effetto non risulta dipendere dall'acido ialuronico presente nel coniugato in quanto, quando questo viene impiegato da solo, non modifica in alcun modo lo sviluppo angiogenico.

L'effetto antiangiogenico dei due bioconiugati si somma ai loro effetti citotossici e differenzianti precedentemente dimostrati sulle cellule NB4 e indica pertanto un'attività antitumorale ascrivibile a diversi meccanismi d'azione.

STUDIO *IN VIVO*

Sulla base dei risultati degli esperimenti in vitro si è deciso di proseguire lo studio in vivo nell'animale da laboratorio. La sperimentazione in vivo è stata eseguita su due composti: il bioconiugato indicato con la sigla D3, contenente 0,7 mg/ml di desametasone ed il doppio estere BD2 con 1,5 mg/ml di desametasone ma avente anche acido butirrico ad una concentrazione di 0,2 mg/ml.

Tutte le valutazioni sono state eseguite confrontando i bioconiugati con il solo desametasone ed i confronti sono stati eseguiti su equivalente contenuto di tale principio attivo.

TOSSICITÀ SUBACUTA DEI BIOCONIUGATI NEL TOPO.

Per definizione un trattamento antitumorale nell'uomo è costituito da una serie di somministrazioni ripetute ciclicamente ed è quindi impensabile poter ottenere informazioni adeguate dagli studi sugli animali utilizzando solo un trattamento acuto. E' infatti buona prassi determinare l'efficacia antitumorale di un composto nei modelli sperimentali sia dopo singola somministrazione, sia dopo trattamenti ripetuti. La lunghezza del trattamento dipende dai tempi di crescita del modello tumorale impiegato.

In questo caso specifico, si è scelto un trattamento adeguato ai tempi di sopravvivenza dell'animale e coerente con i trattamenti standard utilizzati nel modello sperimentale da noi utilizzato.

In particolare, poichè la maggior parte degli studi condotti sulle cellule NB4 impiantate nel peritoneo del topo SCID utilizza trattamenti di 5 giorni ripetuti almeno 2 volte (Pisano et al., 2002), la tossicità subacuta è stata valutata per la via di somministrazione intraperitoneale secondo lo schema che poi è stato usato negli studi farmacologici. La scelta delle dosi è stata condizionata anche dal confronto diretto su base equimolare con desametasone la cui dose è stata estrapolata dalla letteratura corrente (Pisano et al., 2002) dove viene normalmente utilizzato a dosi di 15mg/kg o superiori.

Tabella 12. Tossicità di D3 ed BD2 somministrati in dose ripetuta per 5 giorni consecutivi nel topo per via intraperitoneale.

composto	Dose Mg/kg desametasone	Mortalità n°morti/n° totale	Variazioni di peso corporeo (g) ▲
D3	7 mg/kg x 5 days	0/5	-0,10
D3	15 mg/kg x 5 days	0/5	-0,10
D3	30 mg/kg x 5 days	0/5	-0,10
BD2	7 mg/kg x 5 days	0/5	-0,10
BD2	15 mg/kg x 5 days	0/5	-0,10
BD2	30 mg/kg x 5 days	1/5	0,30

Gruppi di 5 topi maschi BD2F1 del peso di 20-22 g. erano trattati per via intraperitoneale per 5 giorni consecutivi con HA-D3 o HA-BD2 alle dosi giornaliere indicate, considerate come mg/kg di desametasone presente nel composto. La variazione media del peso corporeo (▲) è espressa come variazione del peso tra la misura presa 24 ore prima e 4 giorni dopo la fine del trattamento. Dopo il trattamento, gli animali sono stati osservati per un periodo di 90 giorni.

I risultati ottenuti sono riportati nella Tabella 12 e come si può vedere il bioconiugato D3 risulta ben tollerato a tutte le dosi utilizzate. La mancanza di tossicità è infatti confermata sia dalla sopravvivenza a lungo termine degli animali (90 giorni), sia dalle minime variazioni del loro peso.

Il bioconiugato BD2 risulta invece tossico alla massima dose utilizzata (30 mg/kg di desametasone) come dimostrato dalla morte a breve termine del 20% degli animali trattati, mentre alle dosi più basse, rispettivamente di 7 e 15 mg/kg, risulta ben tollerato non dimostrando evidenti segni di tossicità negli animali trattati (Tabella 12).

Complessivamente i dati sulla tossicità indicano per D3 la stessa tollerabilità del solo principio attivo (desametasone) quando somministrato per la stessa via con lo stesso schema. Infatti, dati di letteratura confermano la buona tollerabilità del desametasone anche alla dose di 30 mg/kg. Invece, il coniugato doppiamente esterificato BD2 risulta leggermente più tossico quando somministrato ripetutamente per 5 giorni consecutivi. Questa maggior tossicità è presumibilmente legata alla contemporanea presenza nella stessa molecola del desametasone e del sodio butirrato, la cui interferenza a livello farmacocinetico non è ancora nota. Per confermare questa ipotesi necessitano ulteriori studi di tossicità, farmacocinetica e farmacodistribuzione sui bioconiugati doppiamente esterificati.

Le differenze di tossicità riscontrate in topi sani hanno condizionato ovviamente le dosi e gli schemi di trattamento che sono stati di seguito utilizzati negli animali portatori di tumore. Si è infatti deciso di utilizzare tutti i composti a dosi ugualmente ben tollerate ed equimolari come contenuto di desametasone. Di conseguenza la scelta è caduta sulla dose di 15 mg/kg/die somministrata per 5 giorni consecutivi; tale trattamento è stato poi ripetuto 2,5 volte, per un totale di 13 giorni.

ATTIVITÀ ANTITUMORALE DI DESAMETASONE, D3 E BD2 SULLO XENOTRAPIANTO DI LEUCEMIA UMANA NB4 NEL TOPO SCID.

Attualmente la valutazione dell'efficacia *in vivo* di nuovi farmaci antitumorali viene condotta principalmente su neoplasie umane impiantate in topi geneticamente immunodepressi. La necessità di ampliare la sperimentazione ai tumori umani nasce dalle nuove conoscenze nel campo della biologia neoplastica che indicano notevoli differenze tra le varie specie animali. Infatti è ormai noto che il tumore generato da alcune alterazioni genetiche a carico di una cellula dell'organismo, mantiene durante la trasformazione maligna diverse caratteristiche (per es. cinetiche e antigeniche) della stessa.

In base a queste considerazioni si è pertanto deciso di proseguire la sperimentazione con i bioconiugati su un modello di tumore umano xenotrapiantato nel topo SCID. La scelta è caduta sulla linea leucemica NB4 già saggiata *in vitro* con i bioconiugati, che da dati di letteratura risulta capace di crescere, una volta impiantata nel peritoneo, nel topo SCID, dando origine ad una massa tumorale localizzata prevalentemente nel peritoneo ma diffusa nell'organismo in toto che può portare a morte l'animale entro 30-35 giorni dall'inoculo (Ponzanelli et al., 2000).

In questo esperimento topi femmine del ceppo SCID sono stati inoculati con 6×10^6 cellule di NB4 somministrate nel peritoneo in un volume finale di 100 μ l.

Il trattamento con Desametasone ed i due bioconiugati è stato effettuato mediante somministrazione intraperitoneale a partire dal 1° giorno dopo l'impianto del tumore ed è stato continuato, con 5 somministrazioni consecutive alla settimana, per 2 settimane e mezza (giorni 1-5, 8-12, e 15-17). Lo schema di trattamento è stato estrapolato dai dati presenti in letteratura per questo modello tumorale con altri bioconiugati con HA (Coradini et al., 1997).

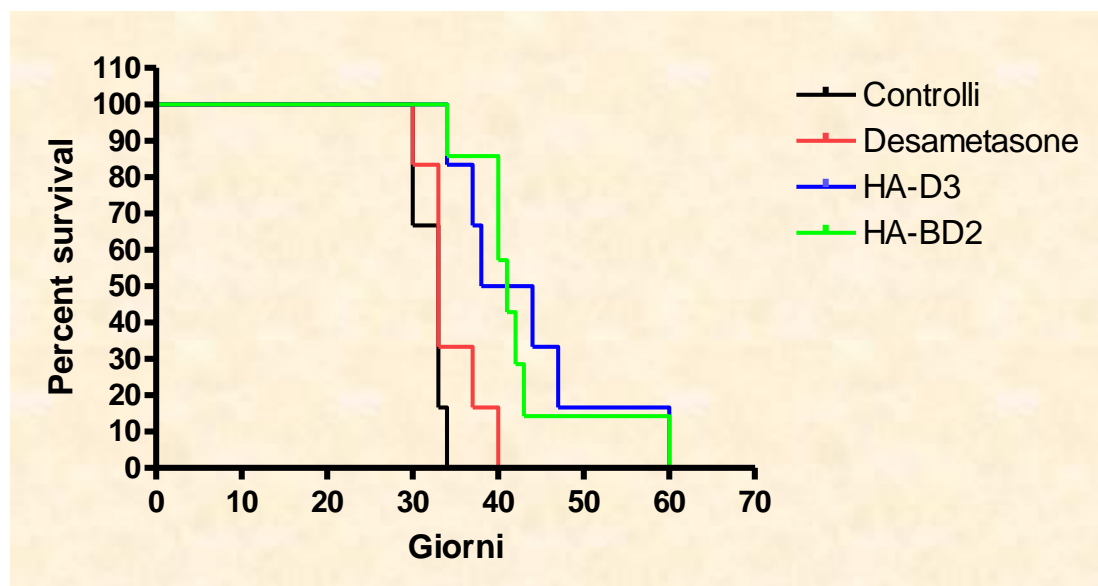
La dose utilizzata, come già detto precedentemente, è stata quella di 15 mg/kg/die di Desametasone, che si è ottenuta somministrando 200 e 400 μ l/topo

rispettivamente per BD2 e D3. Il singolo Desametasone è stato invece somministrato in un volume di 200 μ l/topo.

Gli animali, alla fine del trattamento sono stati osservati giornalmente e le morti spontanee sono state registrate singolarmente all'interno dei gruppi per poi poterle confrontare statisticamente.

Il Grafico 13 riporta i risultati ottenuti, espressi come curve di sopravvivenza, degli animali trattati e dei relativi controlli. Come si può notare, il trattamento ripetuto con Desametasone non aumenta in modo apprezzabile il tempo di sopravvivenza degli animali rispetto ai controlli non trattati; infatti la curva di colore rosso, che corrisponde al trattamento con Desametasone è praticamente sovrapponibile a quella di colore nero dei controlli:

Grafico 13. Curve di sopravvivenza dei topi xenotrapiantati con la leucemia promielocitica umana NB4 trattati con i due bioconiugati o con Desametasone.



Gruppi di 10 topi femmine del ceppo SCID, inoculati intraperitoneo con 6×10^6 cellule della leucemia promielocitica umana NB4 il giorno 0, venivano trattati per via intraperitoneale nei giorni 1-5, 8-12 e 15-17 dopo l'impianto tumorale con i composti indicati alla dose giornaliera equivalente a 15 mg/kg di Desametasone.

Le curve sono state analizzate mediante il test di Kaplan-Meier ed i trattati con D3 e BD2 risultano significativamente diverse sia dai controlli che dai trattati con il solo Desametasone ($p < 0.001$, log-rank, test)

Entrambi i trattamenti con i due bioconiugati aumentano significativamente il tempo di vita degli animali in confronto ai controlli come dimostrato dall'analisi delle curve eseguita mediante il test di Kaplan-Meier. Tale aumento di sopravvivenza

risulta ugualmente significativo se il confronto viene fatto con il solo Desametasone ($p < 0.001$, log-rank test).

Degna di nota è inoltre la presenza, all'interno di ognuno dei gruppi trattati con i due bioconiugati di un animale su 10 che sopravvive. La percentuale di animali che nel grafico risulta morire al 60° giorno, corrisponde infatti non ad una morte spontanea ma ad un sacrificio programmato definito dalle norme internazionali di buona sperimentazione animale, recepite anche dalla legge italiana, che impongono la soppressione senza dolore di tutti gli animali coinvolti in un esperimento alla fine dello stesso (DDL 116, 21/12/92). Pertanto tali animali risultano curati dal trattamento, in quanto non muoiono per tumore entro i termini previsti.

ATTIVITÀ ANTITUMORALE DI ATRA, D3 E BD2 SULLO XENOTRAPIANTO DI LEUCEMIA UMANA NB4 NEL TOPO SCID.

Visto il notevole effetto antitumorale del trattamento con i due bioconiugati sulla sopravvivenza dei topi SCID portatori intraperitoneo della leucemia promielocitica umana NB4 si è deciso di proseguire gli studi *in vivo* sullo stesso modello confrontando tale trattamento con quello standard di riferimento.

Per tale motivo è stato scelto il trattamento con acido all-trans retinoico (ATRA) che viene normalmente utilizzato in clinica sui pazienti con APL (Douer et al., 2001).

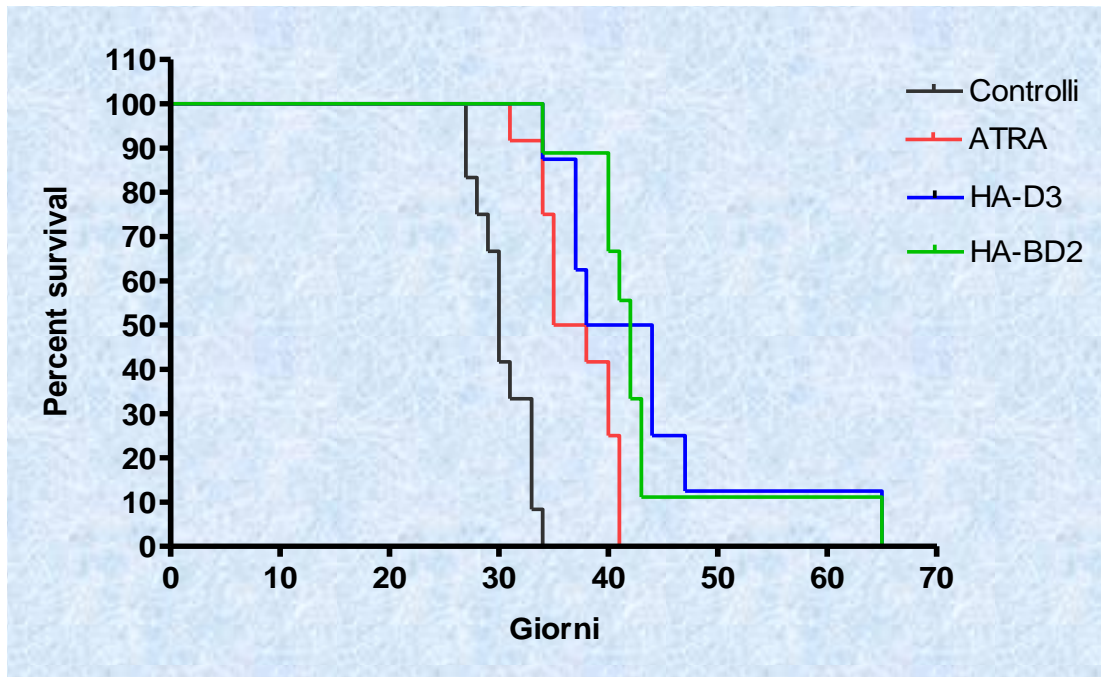
L'ATRA è stato pertanto utilizzato alla massima dose utilizzabile sul topo SCID che è anche quella maggiormente efficace nel modello da noi utilizzato (Coradiniet al., 1997).

Il Grafico 14 riporta i risultati ottenuti, espressi come curve di sopravvivenza, degli animali trattati e dei relativi controlli. Come si può notare, il trattamento ripetuto con ATRA aumenta significativamente il tempo di sopravvivenza degli animali rispetto ai controlli non trattati ($p < 0.001$, log-rank test), confermando quanto già esistente in letteratura (Parella et al., 2004).

Anche il trattamento con il bioconiugato D3 aumenta significativamente la sopravvivenza degli animali in confronto al gruppo di controllo ($p < 0.001$, log-rank test) e l'effetto è comparabile a quello che si ottiene con il solo ATRA ($p < 0.001$, log-rank test).

Il trattamento con BD2 risulta invece addirittura superiore poichè, pur essendo ugualmente significativo se confrontato rispetto ai controlli ($p < 0.001$, log-rank test) è nel contempo statisticamente diverso da quello del gruppo trattato con ATRA come evidenziato dall'analisi Kaplan-Meier delle curve e successivo confronto interno (ATRA vs HA-BD2 $p < 0.05$, log-rank test) (*Grafico 14*).

Grafico 14. Curve di sopravvivenza dei topi xenotrapiantati con la leucemia promielocitica umana NB4 trattati con i due bioconiugati o con ATRA.



Gruppi di 10 topi femmine del ceppo SCID, inoculati intraperitoneo con 6×10^6 cellule della leucemia promielocitica umana NB4 il giorno 0, venivano trattati per via intraperitoneale nei giorni 1-5, 8-12 e 15-17 dopo l'impianto tumorale con i bioconiugati indicati alla dose giornaliera equivalente a 15 mg/kg di Desametasone. Il trattamento con acido retinoico (ATRA) è stato invece fatto alla dose massima utilizzabile di 15mg/kg nei giorni 1, 8 e 15.

Le curve sono state analizzate mediante il test di Kaplan-Meier e tutti i gruppi trattati risultano significativamente diversi dai controlli ($p < 0.001$, log-rank, test). Diversi risultano anche i trattati con HA-BD2 rispetto al gruppo trattato con ATRA ($p < 0.05$, log-rank, test).

I risultati ottenuti in vivo sullo xenotrapianto indicano per i biocomplessi di acido ialuronico con Desametasone un marcato effetto antitumorale che manca totalmente per il singolo Desametasone. Da notare che, il confronto tra i bioconiugati ed il farmaco antitumorale di riferimento è stato fatto tra dosi equivalenti in contenuto di principio attivo ugualmente ben tollerate.

Va ricordato infatti che di solito il Desametasone viene utilizzato nei modelli animali alla dose di 10 mg/kg/die pur essendo tollerato anche a dosi più alte (massimo 20 mg/kg/die).

Il marcato effetto antitumorale dei due bioconiugati su questo modello è risultato particolarmente interessante se si considera che è confrontabile e talvolta anche superiore (nel caso del bioconiugato BD2) a quello che si ottiene con la massima dose somministrabile del composto standard di riferimento ATRA.

Il dato è ancora più promettente se si considera che è possibile migliorare l'effetto terapeutico dei bioconiugati ottimizzando le dosi e gli schemi. Non va infatti dimenticato che la dose utilizzata per il bioconiugato HA-D3 non è la massima somministrabile, in quanto i dati di tossicità illustrati in questa tesi, indicano che può essere tranquillamente raddoppiata.

WESTERN BLOT

CD44 E SEGNALI INTRACELLULARI

L'effettivo coinvolgimento del legame tra CD44 e la catena di acido ialuronico presente nel bioconiugato, dimostrato dagli esperimenti effettuati in presenza di un anticorpo bloccante il sito di legame recettoriale, ha spinto il mio interesse verso la comprensione dei meccanismi che tale evento potrebbe provocare nelle cellule tumorali, fermo restando la presenza di farmaci legati all'acido ialuronico stesso.

Numerosi studi in letteratura hanno messo in luce la connessione tra CD44, acido ialuronico ed il sistema PI3K-Akt, la cui stimolazione porta alla fosforilazione di Akt (nota anche come PkB); p-Akt è coinvolta positivamente nei processi di sopravvivenza cellulare (Bourguignon et al, 2003), nonché nello sviluppo di resistenza ai chemioterapici (Misra et al, 2003; Misra et al, 2005).

Ho voluto pertanto verificare se anche in presenza di farmaci legati ad acido ialuronico l'interessamento del recettore CD44 producesse variazioni a carico del sistema Akt/p-Akt e sull'espressione dell'inibitore PTEN, ed allo stesso tempo se il desametasone presente nei bioconiugati mantenesse l'attività potenziante l'espressione di tale inibitore riscontrata in letteratura (Krasil'nikov et al, 2003).

L'espressione delle proteine Akt-1, P-Akt-1 (ser 468) e PTEN, pertanto, è stata valutata tramite la tecnica del western blot.

Le linee cellulari MCF7 e MIA PaCa 2 sono state trattate con una dose di bioconiugato corrispondente alla IC30 estrapolata dai test di MTT precedentemente

effettuati. Il trattamento veniva effettuato in flask da 75cm² su colture sub confluenti e continuato per 5 minuti, 1 ora e 24 ore.

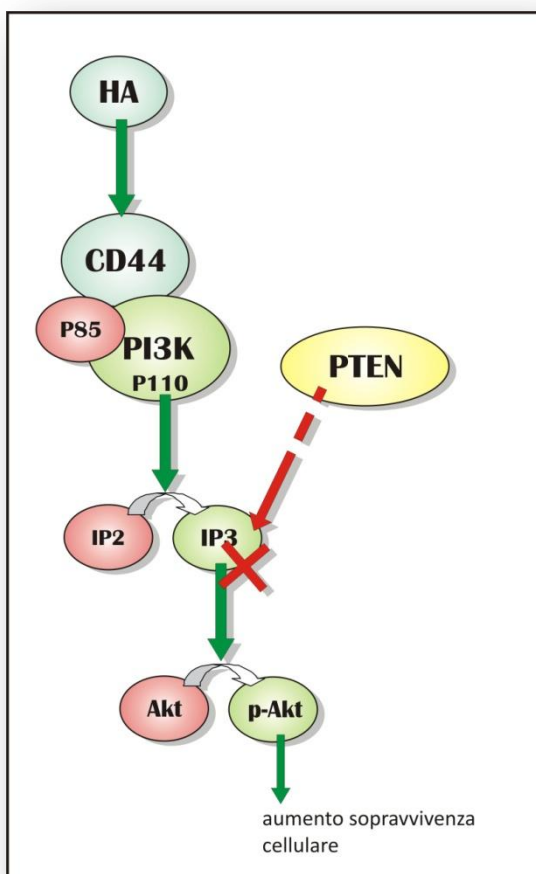


Figura 10. Tappe fondamentali del sistema PI3K/Akt.

Le cellule venivano quindi risciacquate con PBS e staccate con PBS ghiacciato, aiutandosi con l'uso di uno scraper. Al pellet ottenuto dopo centrifugazione veniva aggiunta un'appropriata quantità di RIPA buffer (c/a 50-100µl), completa di inibitore di proteasi e fosfatasi. La quantità di proteine totali veniva saggiata con il test di Lawry, in modo da poter caricare 60µg di proteine in ogni pozzetto.

Esperimenti preliminari (dati non riportati) mi hanno portato a concentrare lo studio al trattamento di 1 ora con i bioconiugati.

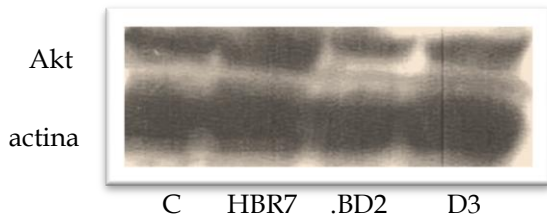
Il tempo di contatto di 5 minuti infatti non mostrava apprezzabili cambiamenti nell'espressione delle proteine studiate, probabilmente perché il tempo non era sufficiente al rilascio dei farmaci contenuti nel bioconiugato. Anche a 24 ore i cambiamenti non risultavano apprezzabili, soprattutto nei livelli di p-Akt, probabilmente, perché dopo 24 ore l'effetto di attivazione della fosforilazione della proteina andava già scemando.

Il trattamento a 1 ora di contatto con il bioconiugato sembra essere una buona mediazione tra l'effetto dell'attivazione del recettore CD44, rapido, ed il rilascio intracellulare dei principi attivi contenuti nei bioconiugati, molto più lento.

MCF-7, TRATTAMENTI PER UN'ORA.

Dopo un'ora di trattamento, i livelli di p-Akt osservati nella linea cellulare MCF-7 sono riportati in figura 11.

Figura 11 Autoradiografia dei lisati di MCF-7

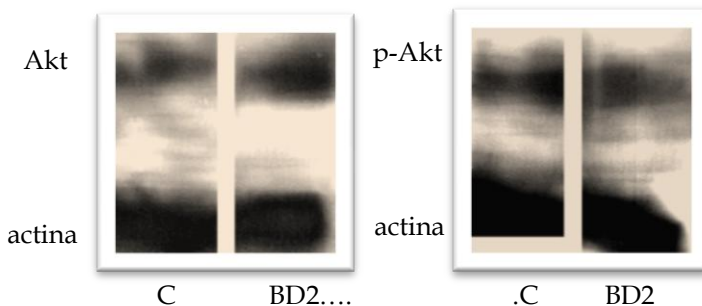


HBR7 si è dimostrato efficace nell'aumentare la fosforilazione di Akt, confermando pertanto l'attività riportata in letteratura per l'acido retinoico libero.

Una netta diminuzione nella fosforilazione della stessa proteina è stata osservata mantenendo le cellule a contatto con il doppio estere BD2; scarsa attività è invece da riportare sul livello di p-Akt con l'uso dell'estere monosostituito D3.

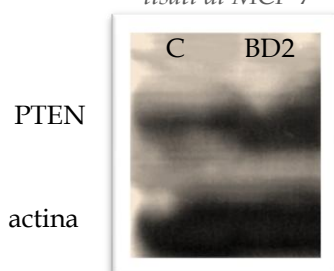
Nello specifico, in seguito al trattamento con il doppio estere BD2 sono state osservate variazioni nell'espressione sia di Akt e p-Akt, sia nell'espressione dell'inibitore del sistema enzimatico PI3K, ovvero PTEN.

Figura 12 Autoradiografia dei lisati di MCF-7



A lato si può osservare infatti un'aumento del livello di Akt che viene accompagnato dalla simultanea diminuzione di fosforilazione della stessa proteina.

Figura 13 Autoradiografia dei lisati di MCF-7



Dato ancora più evidente è riportato nella figura 13 nella quale è riportata la variazione dell'espressione di PTEN.

A seguito del trattamento con BD2 per un'ora, infatti, si riscontra un significativo aumento di espressione dell'inibitore.

MIA PaCa2, TRATTAMENTI PER UN'ORA.

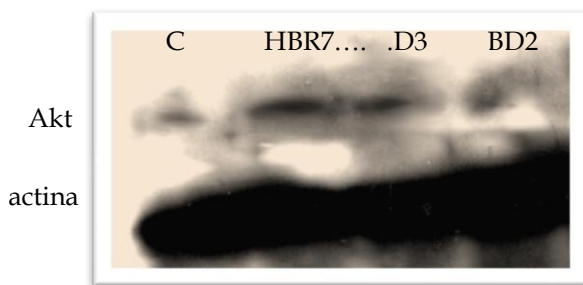
L'espressione delle stesse proteine è stata saggiata anche nella linea cellulare MIA PaCa2.

In questa linea i livelli basali di espressione osservati sono stati molto più bassi, il che ha reso la visualizzazione delle bande più difficile di quanto visto per la linea MCF7; tale dato concorda con quanto riscontrato in letteratura.

Si è pertanto proceduto aumentando il carico di proteine totali a 80µg/pozzetto.

Analogamente a quanto visto nella linea MCF7, anche in MIA PaCa2 è visibile un aumento della fosforilazione di Akt-1 in seguito al trattamento di un'ora con il bioconiugato HBR7.

Figura 14. Autoradiografia dei lisati di MIA PaCa2



Un leggero aumento è stato osservato anche con l'uso del bioconiugato D3, ma tale dato necessita al momento di ulteriori conferme.

In linea con quanto osservato nel caso della linea MCF7 è risultata evidente la scarsa fosforilazione a carico di Akt-1 nel trattamento con BD2.

Figura 14. Autoradiografia dei lisati di MIA PaCa2

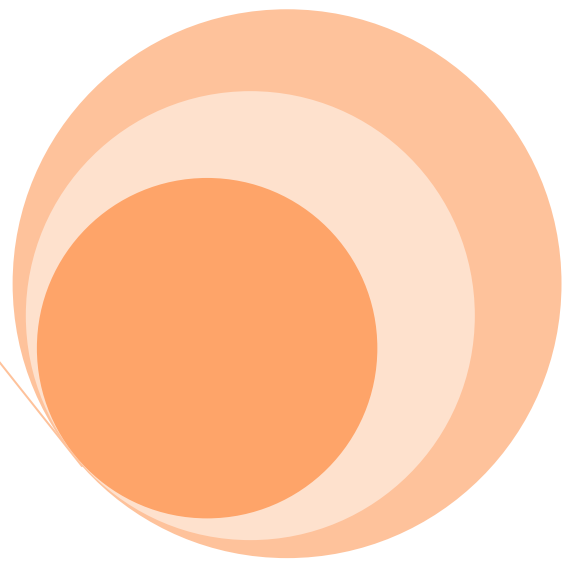


Inoltre, il trattamento di un ora con il doppio estere BD2, inoltre, ha confermato anche nella linea MIA PaCa2 la capacità di aumentare l'espressione di PTEN (figura 14).

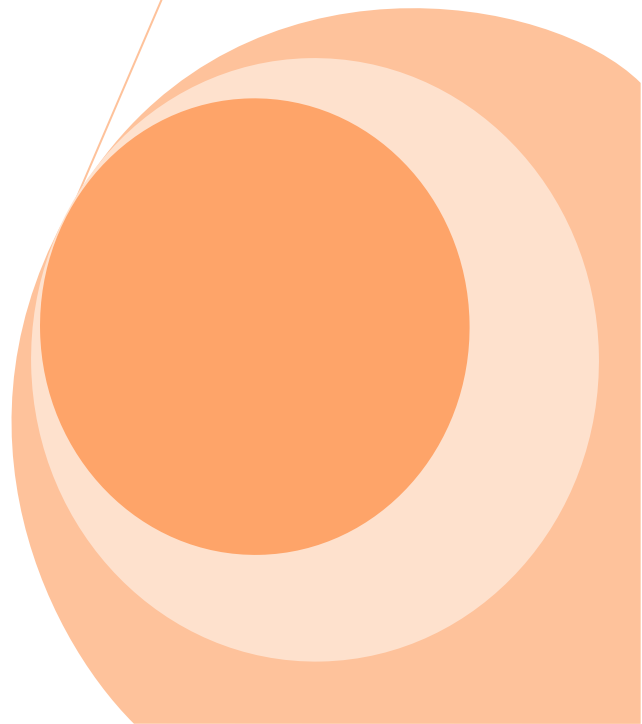
I tre bioconiugati si sono dimostrati attivi sul sistema enzimatico PI3K/Akt-1 in entrambe le linee cellulari; il tempo di trattamento di un ora con i vari composti a base di acido ialuronico si è dimostrato un buon compromesso tra gli effetti rapidi del legame con CD44 e quelli più lenti dati dall'azione dei singoli farmaci presenti nei bioconuigati.

L'acido retinoico presente in HBR7 ha mantenuto le sue caratteristiche di attivatore della fosforilazione di Akt-1, note in letteratura, su entrambe le linee cellulari.

L'estere doppio di desametasone e acido butirrico BD2 ha dimostrato di possedere una buona attività nell'inibire la fosforilazione di Akt-1 e di aumentare l'espressione dell'inibitore del sistema PI3K PTEN, sistema che è coinvolto attivamente sia nel controllo (positivo) della sopravvivenza cellulare, sia nella comparsa di resistenze MDR mediate.



Conclusioni



In generale, tutti i bioconiugati esaminati hanno mostrato interessanti proprietà antitumorali nei modelli *in vitro* utilizzati nel corso dello svolgimento di questi tre anni di dottorato.

Nello specifico, il bioconiugato HABut ha mostrato di possedere un'attività citotossica superiore a quella del composto libero sulla linea tumorale MIA PaCa2. Questo effetto risulta particolarmente degno di nota, dato che spesso a seguito di coniugazione di un farmaco si verifica una perdita di attività dello stesso *in vitro*.

Una perdita di attività scaturita dalla coniugazione con il vettore acido ialuronico è stata invece osservata sulla stessa linea MIA PaCa2 con il bioconiugato HBR7.

Molto promettenti si sono dimostrati i bioconiugati a base di acido ialuronico e desametasone ed acido ialuronico, desametasone e sodio butirrato. Essi infatti sono risultati citotossici sia sulla linea leuemica NB4 (che non esprime la mutazione sulla quale è classicamente attivo il desametasone) e sulla linea di carcinoma del pancreas MIA PaCa2, dimostrando anche su queste linee di possedere potenza superiore se paragonata al principio attivo non legato.

HABut si è inoltre dimostrato efficace nel limitare la capacità invasiva della linea MIA PaCa2.

Tutti i bioconiugati utilizzati hanno mostrato la necessità della presenza sulla membrana cellulare di recettori CD44 funzionanti per poter esplicare un effetto citotossico. Tale dato conferma (indirettamente) l'interessamento di questo recettore nell'internalizzazione dei bioconiugati di acido ialuronico. Non è possibile al momento attuale escludere la presenza di altri sistemi di internalizzazione, in quanto alle dosi più alte da noi utilizzate o nel caso del doppio estere BD2, il pretrattamento con l'anticorpo CD44 bloccante non è stato in grado di bloccare totalmente l'attività citotossica dei bioconiugati.

La coniugazione con acido ialuronico ha mantenuto l'attività differenziante del desametasone, seppure l'effetto è stato di potenza inferiore a quella del principio attivo libero. Tale fatto potrebbe essere correlato alla velocità di ingresso del bioconiugato nella cellula. In ogni caso, infatti, la coniugazione con HA ed il passaggio di internalizzazione via CD44 ne rallentano inevitabilmente l'upake.

Tutti i bioconiugati si sono anche dimostrati efficaci nel ridurre l'angiogenesi *in vitro*; inoltre è stato verificato che tale attività non sia da ascrivere all'acido ialuronico contenuto nei composti testati: l'analogo da 16kDa infatti non ha mostrato alcuna attività sui vasi in formazione. E' stata confermata inoltre l'attività antiangiogenica dell'acido ialuronico ad alto peso molecolare (150kDa).

I risultati ottenuti nello studio *in vivo* sullo xenotrapianto di leucemia umana NB4 sono stati particolarmente promettenti. I bioconiugati utilizzati a base di desametasone hanno infatti mostrato di possedere un ottimo effetto terapeutico, che invece risulta essere del tutto assente per il singolo principio attivo in forma libera.

Dato ancora più interessante deriva dal confronto dell'attività *in vivo* dei bioconiugati con quella dell'acido all-trans retinoico (ATRA) sullo stesso modello di xenotrapianto.

ATRA è infatti al momento la terapia d'elezione nel trattamento di questo tipo di leucemie (APL). Entrambi i bioconiugati D3 e BD2 si sono dimostrati efficaci tanto quanto ATRA nel trattamento di questa patologia sul topo SCID. Nel caso di BD2 l'effetto antitumorale è risultato addirittura superiore a quello dell'acido all-trans retinoico. Il dato risulta ancora più significativo se si considera che, a differenza di ATRA, che è stato utilizzato alla dose massima somministrabile agli animali, il bioconiugato BD2 ha esplicato un così potente effetto terapeutico ad una dose inferiore alla dose massima tollerata.

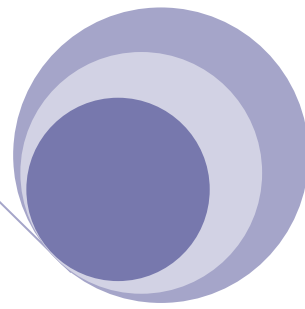
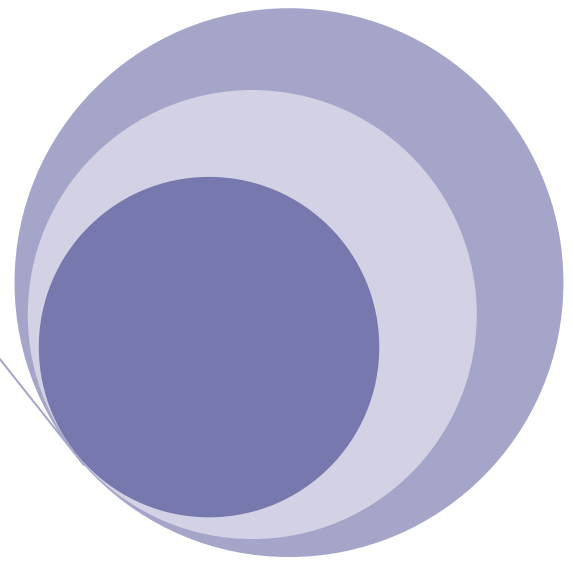
Le potenzialità cliniche di questa ultima considerazione sono notevoli. Basta infatti considerare che, sebbene nell'85% dei casi il trattamento con ATRA della leucemia sia risolutivo, molti pazienti presentano ricadute. Inoltre, spesso quando la patologia si ripresenta, il clone sopravvissuto risulta insensibile al trattamento con ATRA.

E' perciò molto importante per questi pazienti avere a disposizione composti diversi dall'ATRA, ma con uguale o maggiore efficacia.

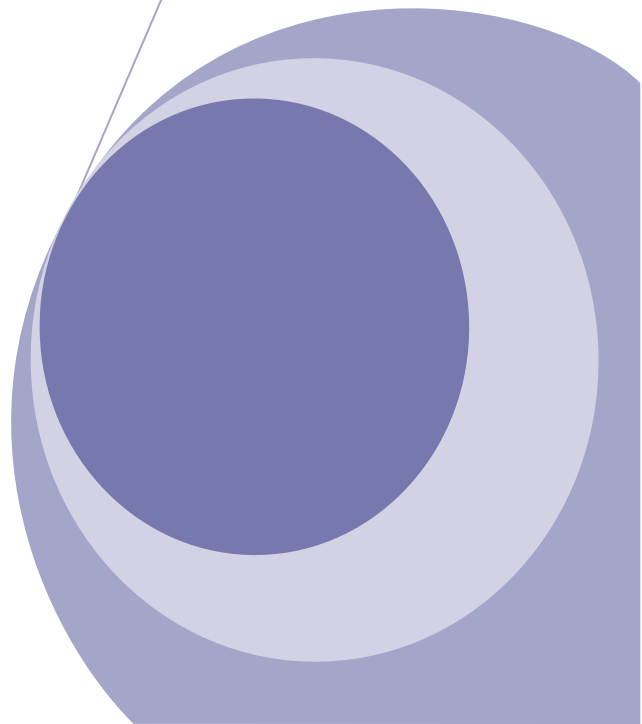
I bioconiugati HBR7, D3 e BD2 hanno inoltre dimostrato di mantenere la capacità dei principi attivi in essi contenuti di interferire con il sistema di signalling intracellulare PI3K/Akt.

Nello specifico, HBR7 ha aumentato i livelli di fosforilazione della proteina di segnale Akt-1, mentre è risultata apprezzabile soprattutto con il trattamento con BD2 una netta diminuzione dei livelli di p-Akt-1, dovuta non ad una diminuzione dell'espressione della proteina, bensì ad un aumento di sintesi dell'inibitore PTEN.

Entrambi i risultati confermano i dati riportati in letteratura per i principi attivi contenuti nei bioconiugati. Seppur indirettamente, questo sembra confermare che l'acido ialuronico presente nei bioconiugati non interferisce su tale processo.



Bibliografia



- Agnantis NJ, Goussia AC, Batistatou A, Stefanou D. "Tumor markers in patients: an update of their prognostic significance. Part 2." *In Vivo.*; 18 (4): 481-8, 2004.
- Aguayo A, Kantarjian H and Manshour T, "Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes". *Blood* 96 (2000), pp. 2240-2245.
- Ahamad A, Jhingran A. "New radiation techniques in gynecological cancer." *Int J Gynecol Cancer.*; 14 (4): 569-79, 2004.
- Alaniz L, García MG, Gallo-Rodriguez C, Agusti R, Sterín-Speziale N, Hajos SE, Alvarez E. "Hyaluronan oligosaccharides induce cell death through PI3-K/Akt pathway independently of NF-kappaB transcription factor" *Glycobiology.* 2006 May;16(5):359-67 2006
- Ameller T, Marsaud V, Legrand P, Gref R, Barratt G, Renoir JM. "Polyester-poly(ethylene glycol) nanoparticles loaded with the pure antiestrogen RU 58668: physicochemical and opsonization properties." *Pharm. Res.*; 20 (7): 1063-70, 2003.
- Andreau K, Lemaire C, Souvannavong V, Adam A. "Induction of apoptosis by dexamethasone in the B cell lineage". *Immunopharmacology* 40: 67-76, 1998.
- Antwerp DJV, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma IM, 'Suppression of TNF α -induced apoptosis by NFkB'; *Nature* 274:787, 1996.
- Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B. 'CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate'. *Cell.*; 61: 1303-1313, 1990.
- Attawia MA, Herbert KM, Laurencin CT. "Osteoblast-like cell adherence and migration through 3-dimensional porous polymer matrices." *Biochem Biophys Res Commun.*; 213 (2): 639-44, 1995.
- Auvinen P, Tammi R, Parkkinen J, Tammi M, Agren U, Johansson R, Hirvikoski P, Eskelinen M, Kosma VM. "Hyaluronan in peritumoral stroma and malignant cells associates with breast cancer spreading and predicts survival." *Am J Pathol.*;156 (2): 529-36, 2000.
- Ayroldi E, Cannarile L, Migliorati G, Bartoli A, Nicoletti I, Riccardi C, 'CD44 (Pgp-1) Inhibits CD3 and Dexamethasone-Induced Apoptosis' *Blood*, Vol.86, No 7: 2672-2678, 1995.
- Bachmann P, Gorman R, MacKenzie K, Mann LL, Lock RB, 'Dexamethasone resistance in B-cell precursor childhood acute lymphoblastic leukemia occurs downstream of ligand-induced nuclear translocation of the glucocorticoid receptor' *Blood*, Vol. 105, No. 6, pp. 2519-2526, 2005.
- Bae YH, Huh KM, Kim Y, Park KH. "Biodegradable amphiphilic multiblock copolymers and their implications for biomedical applications." *J Control Rel*; 64 (1-3): 3-13, 2000.
- Bajorath J. "Molecular organization, structural features, and ligand binding characteristics of CD44, a highly variable cell surface glycoprotein with multiple functions." *Proteins*; 39 (2): 103-11, 2000.
- Ballah K, List A. "Histone deacetylase inhibitors in myelodysplastic syndrome". *Best Pract Res Clin Haematol.*; 17 (4): 595-611, 2004
- Beamish H, Warrenner R, Gabrielli BG. "Analysis of checkpoint responses to histone deacetylase inhibitors." *Methods Mol Biol.*; 281: 245-59, 2004.

- Bodwell JE, Webster JC, Jewell CM, Cidlowski JA, Hu JM, Munck A. Glucocorticoid receptor phosphorylation: overview, function and cell cycle-dependence. *J STEROID BIOCHEM MOL BIOL* 1998;65:91-99.
- Boehm T, Folkman J, Browder T and O'Reilly MS. "Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance." *Nature*; 390 (6658): 404-7, 1997.
- Bolhuis RL, Lamers CH, Goey SH, Eggermont AM, Trimbos JB, Stoter G, Lanzavecchia A, Di Re E, Miotti S, Raspagliesi F. "Adoptive immunotherapy of ovarian carcinoma with bs-MAb-targeted lymphocytes: a multi center study". *Int J of Cancer*; 78-81,1992.
- Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. "A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins." *J Natl Cancer Inst*; 92 (16): 1295-302, 2000.
- Bourguignon LYW, Singleton PA, Zhu H, Diedrich F. "Hyaluronan-mediated CD44 interaction with RhoGEF and Rho Kinase promotes Grb2-associated Binder-1 phosphorylation and Phosphatidylinositol 3 Kinase signalling leading to cytokine (Macrophage-Colony Stimulating Factor) production and breast tumor progression. *The J. Of Biol Chem.* 278 (32): 29420-29434, 2003.
- Bradshaw DM, Arceci RJ. "Clinical relevance of transmembrane drug efflux as a mechanism of multidrug resistance." *J Clin Oncol*; 16 (11): 3674-90, 1998.
- Burke PA, DeNardo SJ. "Antiangiogenic agents and their promising potential in combined therapy." *Crit Rev Oncol Hematol.*; 39 (1-2): 155-71, 2001.
- Cantley LC. "The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway" . *Science* 31 May 2002 Vol. 296. no. 5573, pp. 1655 - 1657
- Cato, A.C.B., Wade E, 'Molecular mechanisms of anti-inflammatory action of glucocorticoids', *BioEssays* 18:371-378, 1996.
- Chapman AP. "PEGylated antibodies and antibody fragments for improved therapy: a review." *Adv Drug Deliv Rev.*; 54 (4): 531-45, 2002.
- Chaubal M. "Polylactides/glycolides-excipients for injectable drug delivery and beyond." *Drug Delivery Technology*; 2: 34-36, 2002.
- Cole S, Bhardwaj G, Gerlach J. "Overexpression of a transporter gene in a multidrug resistant human lung cancer cell line." *Science*; 258 (5088): 1650-4, 1992.
- Coradini D, Biffi A, Costa A, Pellizzaro C, Pirronello E, Di Fronzo G. "Effect of sodium butyrate on human breast cancer cell lines." *Cell Prolif.*; 30 (3-4): 149-59, 1997.
- Coradini D, Pellizzaro C, Miglierini G, Daidone MG, Perbellini A. "Hyaluronic acid as drug delivery for sodium butyrate: improvement of the anti proliferative activity on a breast cancer cell line." *Int. J Cancer*; 81 (3): 411-6, 1999.

- Coradini D, Pellizzaro C, Abolafio G, Bosco M, Scarlata I, Cantoni S, Stucchi L, Zorzet S, Turrin C, Sava G, Perbellini A, Daidone MG. "Hyaluronic-acid butyric esters as promising antineoplastic agents in human lung carcinoma: A preclinical study." *Investigational New drugs*; 22 (3): 207-17, 2004.
- Coradini D, Zorzet S, Rossin R, Scarlata I, Pellizzaro C, Turrin C, Bello M, Cantoni S, Speranza A, Sava G, Mazzi U, Perbellini A. "Inhibition of hepatocellular carcinomas in vitro and hepatic metastases in vivo in mice by the histone deacetylase inhibitor HA-But." *Clin Cancer Res.*; 10 (14): 4822-30, 2004.
- Culine S, Iborra F, Mottet N, Avances C, de Graeve B, Volpe P, Vignoud J, Bringer JP, Marroncle M, Le Pellec L, Ayuso D, Jansen E, Faix A, Rebillard X. "Subcutaneous interleukin-2 and interferon-alpha in metastatic renal cell carcinoma: results of a French regional experience in Languedoc." *Am J Clin Oncol.*; 29 (2): 148-52, 2006.
- D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J. "Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis." *Proc Natl Acad Sci*; 91 (9): 4082-5, 1994.
- De Ridder MC, Van Der Plas AJ, Erpelinck-Verschueren CA, Lowenberg B, Jansen JH. 'Dexamethasone does not counteract the response of acute promyelocytic leukaemia cells to all-trans retinoi acid', *British Journal of Haematology*, 106(1):107-110, 1999.
- De Rosa G, Larobina D, Immacolata La Rotonda M, Musto P, Quaglia F, Ungaro F. "How cyclodextrin incorporation affects the properties of protein-loaded PLGA-based microspheres: the case of insulin/hydroxypropyl-beta-cyclodextrin system." *J Control Release.*; 102 (1): 71-83, 2005.
- De Rosa G, Maiuri MC, Ungaro F, De Stefano D, Quaglia F, La Rotonda MI, Carnuccio R. "Enhanced intracellular uptake and inhibition of NF-kappaB activation by decoy oligonucleotide released from PLGA microspheres." *J Gene Med.*; 7 (6): 771-81, 2005.
- Del Favero A, Roila F, Tonato M. "Reducing chemotherapy-induced nausea and vomiting. Current perspectives and future possibilities." *Drug Saf.*; 9 (6): 410-428, 1993.
- Distelhorst CW, Benutto BM, Bergamini RA. 'Effects of Cell Cycle Position on Dexamethasone Binding by Mouse and Human Lymphoid Cell Lines: Correlation Between an Increase in Dexamethasone Binding During S Phase and Dexamethasone Sensitivity', *Blood*, Vol. 63,1(105-113),1984.
- Dixon K, Koprass E. "Genetic alterations and DNA repair in human carcinogenesis." *Semin Cancer Biol.*; 14 (6): 441-8, 2004.
- Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, Ross DD. "A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells." *Proc Natl Acad Sci USA*; 95 (26): 15665-70, 1998.
- Emanuele S, D'Anneo A, Bellavia G, Vassallo B, Lauricella M, De Blasio A, Vento R, Tesoriere G. "Sodium butyrate induces apoptosis in human hepatoma cells by a mitochondria/caspase pathway, associated with degradation of beta-catenin, pRb and Bcl-XL." *Eur J Cancer*; 40 (9): 1441-52, 2004.

- Eyal S, Yagen B, Sobol E, Altschuler Y, Shmuel M, Bialer M. "The activity of antiepileptic drugs as histone deacetylase inhibitors." *Epilepsia*; 45 (7): 737-44, 2004.
- Ezekowitz RA, Mulliken JB, Folkman J. "Interferon alfa-2 therapy for life-threatening hemangiomas of infancy." *New Engl J Med*; 326 (22): 1456-63, 1992.
- Folkman J, Klagsbrun M. "Angiogenic factors." *Science.*; 235 (4787) : 442-7, 1987.
- Folkman J. "Angiogenesis inhibitors: a new class of drugs." *Cancer Biol Ther.*; 2 (4 Suppl 1): 127-33, 2003.
- Fronsdal K, Saatcioglu F. "Histone deacetylase inhibitors differentially mediate apoptosis in prostate cancer cells." *Prostate*; 62 (3): 299-306, 2004.
- Fujisaki T, Tanaka Y, Fujii K, Mine S, Saito K, Yamada S, Yamashita U, Irimura T, Eto S. "CD44 stimulation induces integrin-mediated adhesion of colon cancer cell lines to endothelial cells by up-regulation of integrins and c-Met and activation of integrins." *Cancer Res.*; 59 (17): 4427-34, 1999.
- Fujita Y, Kitagawa M, Nakamura S, Azuma K, Ishii G, Higashi M, Kishi H, Hiwasa T, Koda K, Nakajima N, Harigaya K. "CD44 signalling through focal adhesion kinase and its anti-apoptotic effect". *FEBS Letters*, 528: 101-108, 2002.
- Fushimi T, Okayama H, Seki T, Shimura S, Shirato K, 'Dexamethasone suppressed gene expression and production of interleuchin-10 by human peripheal blood mononuclear cells and monocytes', *INT. Arch. Allergy Immunol.*, 112:13-18, 1997.
- Gadhoum Z, Leibovitch MP, Qi L, Dumenil D, Durand L, Leibovitch S, Smadja-Joffe F, 'CD44: a new means to inhibit acute myeloid leukemia cell proliferation via p27Kip 1', *Blood*, Vol.103(3), 2004.
- Gasparini G, Harris AL. "Does improved control of tumor growth require an anti-cancer therapy targeting both neoplastic and intratumoral endothelial cells?" *Eur J Cancer*; 30A (2): 201-6, 1994.
- Gatenby RA, Frieden BR. "Information dynamics in carcinogenesis and tumor growth." *Mutat. Res.*; 568 (2): 259-73, 2004.
- Getting SJ, Flower RJ, Perretti M, 'Inhibition of neutrophil and monocyte recruitment by endogenous and exogenous lipocortin', *Br.J.Pharmacol.* 120:1075-1082, 1997.
- Ghatak S, Misra S, Toole BP. 'Hyaluronan oligosaccharides inhibit anchorage-independent growth of tumor cells by suppressing the phosphoinositide 3-kinase/Akt cell survival pathway'. *J Biol Chem.*; 277: 38013-38020, 2002.
- Gille J. "Antiangiogenic cancer therapies get their act together: current developments and future prospects of growth factor- and growth factor receptor-targeted approaches." *Exp Dermatol.*; 15 (3): 175-86, 2006.
- Greenstein S, Ghias K, Krett NL, Rosen ST. "Mechanisms of Glucocorticoid-mediated Apoptosis in Hematological Malignancies". *Clinical Cancer Research* Vol. 8, 1681-1694, June 2002.

- Guo LX, Zou K, Ju JH, Xie H. 'Hyaluronan promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth in xenografts'. *Acta Biochim Biophys.*; 37: 601-606, 2005.
- Hanahan D, Folkman J. "Patterns of emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis." *Cell*; 86 (3): 353-64, 1996.
- Harris KA, Harney E, Small EJ. "Liposomal doxorubicin for the treatment of hormone-refractory prostate cancer." *Clin. Prostate. Cancer*; 1 (1): 37-41, 2002.
- Herr I, Ucur E, Herzer K, Okouoyo S, Ridder R, Krammer PH, Doeberitz M, Debatin KM, 'Glucocorticoid Cotreatment Induces Apoptosis Resistance toward Cancer Therapy in Carcinomas', *Cancer Research* 63: 3112-3120, 2003.
- Hicsonmez G. 'The effects of steroids on myeloid leukaemia cells: The potential of short-course high-dose methylprednisolone treatment in inducing differentiation, apoptosis and in stimulating myelopoiesis', *Leukemia Research* 30:60-68, 2005.
- Hinds KD, Campbell KM, Holland KM, Lewis DH, Piche CA, Schmidt PG. "PEGylated insulin in PLGA microparticles. In vivo and in vitro analysis." *J Control Release.*; 104 (3): 447-60, 2005.
- Hua Q, Knudson CB and Knudson W. "Internalization of hyaluronan by chondrocytes occurs via receptor-mediated endocytosis". *Journal of Cell Science*, Vol 106, Issue 1 365-375, 1993
- Huet S, Groux H, Caillou B, Valentin H, Prieur AM, Bernard A. "CD44 contributes to T cell activation." *J Immunol.*; 143 (3): 798-801, 1989.
- Hu wKavanagh JJ. "Anticancer therapy targeting the apoptotic pathway". *Lancet Oncol.* 4: 721-729, 2003
- H-Y. Lei, M-J. Tang and N.Tsao 'Intracellular alkalinization in dexamethasone-induced thymocyte apoptosis' *Apoptosis*; 2:304-312, 1997.
- Ibrahim MA, Ismail A, Fetouh MI, Gopferich A "Stability of insulin during the erosion of poly(lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres." *J Control Release.*; 106 (3): 241-52, 2005.
- Immordino ML, Brusa P, Arpicco S, Stella B, Dosio F, Cattel L. "Preparation, characterization, cytotoxicity and pharmacokinetics of liposomes containing docetaxel." *J Control Release.*; 91 (3): 417-29, 2003.
- Ismaili N, Garabedian MJ. Modulation of glucocorticoid receptor function via phosphorylation. *ANN N Y ACAD SCI* 2004;1024:86-101.
- Itano N, Atsumi F, Sawai T, Yamada Y, Miyaishi O, Senga T, Hamaguchi M, Kimata K. "Abnormal accumulation of hyaluronan matrix diminishes contact inhibition of cell growth and promotes cell migration." *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 99 (6): 3609-14, 2002.
- Ito K, Barnes PJ, Adcock IM. Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits IL-1 β -induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12. *MOL CELL BIOL* 2000;20:6891-6903.

- Ito K, Jazrawi E, Cosio B, Barnes PJ, Adcock IM. p65-activated histone acetyltransferase activity is repressed by glucocorticoids: mifepristone fails to recruit HDAC2 to the p65/HAT complex. *J BIOL CHEM* 2001;276:30208-30215.
- Ito Y, Tokudome N. "Chemotherapy for metastatic breast cancer." *Gan To Kagaku Ryoho*; 33 (6): 742-6, 2006.
- Joseph J, Mudduluru G, Antony S, Vashistha S, Ajitkumar P, Somasundaram K. "Expression profiling of sodium butyrate (NaB)-treated cells: identification of regulation of genes related to cytokine signaling and cancer metastasis by NaB." *Oncogene*; 23 (37): 6304-15, 2004.
- Kang Moo Huh; Yong Woo Cho Kinam Park. "PLGA-PEG Block Copolymers for Drug Formulations." *Drug Delivery Technology*; 3; 2003.
- Karp DD, Atkins MB. "Adoptive immunotherapy for nonsmall cell lung carcinoma, a fourth treatment modality, complicated radiation sensitizer, or none of the above". *Cancer*; 78: 244-251, 1996.
- Kaplan JM. "Adenovirus-based cancer gene therapy." *Curr Gene Ther.*; 5 (6): 595-605, 2005.
- Kasselmann LJ, Kintner J, Sideris A, Pasnikowski E, Krellman JW, Shah S, Rudge JS, Yancopoulos GD, Wiegand SJ, Croll SD. 'Dexamethasone Treatment and ICAM-1 Deficiency Impair VEGF-Induced Angiogenesis in Adult Brain', *Vascular Research* Vol.40, No.4, 2007.
- Kaya G, Rodriguez I, Jorcano JL, Stamenkovic I. "Selective suppression of CD44 in keratinocytes of mice bearing an antisense CD44 transgene driven by a tissue-specific promoter disrupts hyaluronate metabolism in the skin and impairs keratinocyte proliferation" *Genes & Dev.* 1997. 11: 996-100. 1997.
- Kazi A, Dou QP. "Cell cycle and drug selectivity". *Methods Mol Med.*; 111: 33-42, 2005.
- Kiani C, Chen L, Wu YJ, Yee AJ, Yang BB. "Structure and function of aggrecan." *Cell Res.*; 12 (1): 19-32, 2002.
- Kim RB, Leake BF, Choo EF, Dresser GK, Kubba SV, Schwarz UI, Taylor A, Xie HG, McKinsey J, Zhou S, Lan LB, Schuetz JD, Schuetz EG, Wilkinson GR. "Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans." *Clin Pharmacol Ther.*; 70 (2): 189-99, 2001.
- Kippel, A., Reinhard, C., Kavanaugh, W. M., Apell, G., Escobedo, M.-A. Williams, L. T. (1996) Membrane localization of phosphatidylinositol 3-kinase is sufficient to activated multiple signal-transducing kinase pathway, *Mol. Cell. Biol.* 16, 4117-4127.
- Knudson AG. "Two genetic hits (more or less) to cancer." *Nat Rev Cancer.*; 1 (2): 157-62, 2001.
- Krasil'nikov MA, Luzai EV, Sherbakov AM, Shatskaya VA, Shtil AA, Gerstein ES. "Role of phosphatidylinositol-3 kinase in regulation of differential sensitivity of melanoma cells to antitumor agents. A model for Hormone resistance development in tumor cells". *Biochemistry (Moscow)* vol 69 n°3: 322-330, 2003.

- Kruch GD, Zeng H, Rea PA, Liu G, Chen ZS, Lee K, Belisky MG. "MRP subfamily transporters and resistance to anticancer agents". *J Bioenerg Biomembr.*; 33: 493-501, 2001.
- Laemmli UK. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature* 227 (5259): 680-685, 1970.
- Laurent TC, Fraser JR. "Hyaluronan." *FASEB J.*; 6 (7): 2397-404, 1992.
- Lawry OH, Rosenburg NJ, Farr AL, Randall RJ. "Protein measurement with the folin phenol reagent". *J Biol Chem.* 193 (1): 265-275, 1951.
- Lehrmann H, Pritchard LL, Harel-Bellan A. "Histone acetyltransferases and deacetylases in the control of cell proliferation and differentiation." *Adv Cancer Res.*; 86: 41-65, 2002.
- Lesley J, Hyman R, Ishihara K, Kincade PW. "Molecular isoforms of murine CD44 and evidence that the membrane proximal domain is not critical for hyaluronate recognition." *J Cell Biol.*; 119 (6): 1711-9, 1992.
- Lesley J, Hyman R, Kincade PW. "CD44 and its interaction with extracellular matrix." *Adv Immunol.*; 54: 271-335, 1993.
- Li YP, Pei YY, Zhang XY, Gu ZH, Zhou ZH, Yuan WF, Zhou JJ, Zhu JH, Gao XJ. "PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: synthesis, preparation and biodistribution in rats." *J Control Rel.*; 71: 203-11, 2001.
- Liggins RT, Burt HM. "Polyether-polyester diblock copolymers for the preparation of paclitaxel loaded polymeric micelle formulations." *Adv Drug Delivery Rev.*; 54 (2): 191-202; 2002.
- Liu S, Riley J, Rosenberg S, Parkhurst M. "Comparison of common gamma-chain cytokines, interleukin-2, interleukin-7, and interleukin-15 for the in vitro generation of human tumor-reactive T lymphocytes for adoptive cell transfer therapy." *J Immunother.*; 29 (3): 284-93, 2006.
- Lobert S, Correia JJ. "Antimicrobics in cancer chemotherapy". *Cancer Nurs.*; 15: 22-33, 1992.
- Lokeshwar VB, Obek C, Soloway MS, Block NL. "Tumor-associated hyaluronic acid: a new sensitive and specific urine marker for bladder cancer." *Cancer Res.*; 57 (4): 773-7, 1997.
- Louis M, Rosato RR, Brault L, Osbild S, Battaglia E, Yang XH, Grant S, Bagrel D. "The histone deacetylase inhibitor sodium butyrate induces breast cancer cell apoptosis through diverse cytotoxic actions including glutathione depletion and oxidative stress." *Int J Oncol.*; 25 (6): 1701-11, 2004.
- Luo Y, Ziebell MR, Prestwich GD. "A hyaluronic acid-taxol antitumor bioconjugate targeted to cancer cells". *Biomacromolecules.* Summer;1(2): 208-18, 2002.
- Luqmani YA. "Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy." *Med Princ Pract.*;14 (Supp.1): 35-48, 2005.
- Maher Albitar, 'Angiogenesis in Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndrome', *Acta Haematologica* 106:170-176, 2001.

- Ma L, Gauvillè C, Berthois Y, Degeorges A, Millot G, Martin PM, Calvo F. "Role of epidermal-growth-factor receptor in tumor progression in transformed human mammary epithelial cells". *Int J Cancer.*; 78: 112-119, 1998.
- Makinen TJ, Veiranto M, Lankinen P, Moritz N, Jalava J, Tormala P, Aro HT. "In vitro and in vivo release of ciprofloxacin from osteoconductive bone defect filler." *J Antimicrob Chemother.*; 56 (6): 1063-8, 2005.
- Manosroi A, Podjanasoonthon K, Manosroi J. "Development of novel topical tranexamic acid liposome formulations." *Int J Pharm.*; 235 (1-2): 61-70, 2002.
- Marchini S, D'Incalci M, Brogginini M. "New molecules and strategies in the field of anticancer agents." *Pub Med*, 4 (3): 247-62, 2004.
- Margueron R, Duong V, Castet A, Cavailles V. "Histone deacetylase inhibition and estrogen signalling in human breast cancer cells." *Biochem Pharmacol.*; 68 (6): 1239-46, 2004.
- Marhaba R, Zoller M. "CD44 in cancer progression: adhesion, migration and growth regulation." *J Mol Histol.*; 35 (3): 211-31, 2004.
- Marks PA, Richon VM, Miller T, Kelly WK "Histone deacetylase inhibitors." *Adv Cancer Res.*; 91: 137-68, 2001.
- Matkovic K, Brugnoli F, Bertagnolo V, Banfic H, Visnjic D. "The role of the nuclear Akt activation and Akt inhibitors in all-trans retinoic acid-differentiated HL-60 cells". *Leukemia*, 20: 941-951, 2006.
- Melnick A, Licht JD. "deconstructing disease: RAR- α , its fusion partners and their role in the pathogenesis of acute promyelocytic leukaemia". *Blood*, 93: 3167-3215, 1999.
- Mills JK, Needham D. "The materials engineering of temperature-sensitive liposomes." *Methods Enzymol.*; 387: 82-113, 2004.
- Misra S Ghatak S, Zoltan-Jones A, and B. P. Toole. "Regulation of Multidrug Resistance in Cancer Cells by Hyaluronan". *J. Biol. Chem.*, July 3, 2003; 278(28): 25285 - 25288.
- Misra S, Ghatak S, Toole BP. "Regulation of MDR1 Expression and Drug Resistance by a Positive Feedback Loop Involving Hyaluronan, Phosphoinositide 3-Kinase, and ErbB2". *J. Biol. Chem.*, Vol. 280, Issue 21, 20310-20315, May 27, 2005
- Miyamoto H, Ogura Y, Hashizoe M, Kunou N, Honda Y, Ikada Y. "Biodegradable scleral implant for intravitreal controlled release of fluconazole." *Curr Eye Res.*; 16 (9): 930-5, 1997.
- Montesano R, Kumar S, Orci L, Pepper MS. 'Synergistic effect of hyaluronan oligosaccharides and vascular endothelial growth factor on angiogenesis in vitro'. *Lab Invest.*; 75: 249-262, 1996.
- Murai T, Miyazaki Y, Nishinakamura H, Sugahara KN, Miyauchi T, Sako Y, Yamagida T, Miyasaka M. "engagement of CD44 promotes Rac activation and CD44 cleavage during tumor cell migration". *J Biol Chem* 279: 4541-4550, 2004.
- Nagano O, Saya H. "Mechanism and biological significance of CD44 cleavage." *Cancer Sci.*; 95 (12): 930-5, 2004.

- Nair KS, Naidoo R, Chetty R. "Expression of cell adhesion molecules in oesophageal carcinoma and its prognostic value." *J Clin Pathol.*; 58 (4): 343-51, 2005.
- Naor D, Nedvetzki S, Golan I, Melnik L, Faitelson Y. "CD44 in cancer." *Crit Rev Clin Lab Sci*; 39 (6): 527-79, 2002.
- Naor D, Sionov RV, Ish-Shalom D. "CD44: structure, function, and association with malignant process." *Adv Cancer Res.*; 71: 241-319, 1997
- Ning M, Guo Y, Pan H, Zong S, Gu Z. "Preparation and characterization of EP-liposomes and Span 40-niosomes." *Pharmazie.*; 61 (3): 208-12, 2006.
- Nishida Y, Knudson CB, Knudson W. "Extracellular matrix recovery by human articular chondrocytes after treatment with hyaluronan hexasaccharides or Streptomyces hyaluronidase " *Modern Rheum.* 13 (1): 62-68, 2003.
- Obata, T., Yaffe, M. B., Leparac, G. G., Piro, E. T., Maegawa, H., Kashiwagi, A., Kikkawa, R. and Cantley, L. C. (2000). Peptide and protein library screening defines optimal substrate motifs for AKT/PKB. *J. Biol. Chem.* 275,36108 -36115
- Okamoto, I. (2002) Dying my own way: a study of terminal cancer patients in Japan. In, *Anthropology and the Health of Populations: Global trends and local contexts*, The 3rd Annual International Social Anthropology Conference, Brunel University, UK, 20-22 Jun 2002
- Osaki M, Oshimura M, Ito H. "PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis*". *Nov*;9(6):667-76. Review, 2004
- O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J. "Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth." *Cell*; 88 (2): 277-285, 1997.
- O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J. "Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma." *Cell*; 79 (2): 315-328, 1994.
- Padró T, Ruiz S, Bieker R, Bürger H, Steins M, Kienast J, Büchner T, Berdel WE, Mesters RM, ' Increased angiogenesis in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia *Blood*, Vol. 95 No. 8:2637-2644, 2000.
- Panet R, Markus M, Atlan H. "Bumetanide and furosemide inhibited vascular endothelial cell proliferation." *J Cell Physiol.*; 158 (1): 121-7, 1994.
- Parella E, Gianni M, Cecconi V, Nigro E, Barzago MM, Rambaldi A. "Phosphodiesterase IV inhibition by Piclamilist potentiates the cytodifferentiating action of retinoids in myeloid leukemia cells". *J Biol Chem*, 279, 2004.
- Park YS. "Tumor-directed targeting of liposomes." *Biosci. Rep.*; 22 (2): 267-81, 2002.
- Pedder SC. "Pegylation of interferon alfa: structural and pharmacokinetic properties." *Semin Liver Dis.*; 23 (Suppl1): 19-22, 2003.

- Peterson RM, Yu Q, Stamenkovic I, Toole BP. « Perturbation of Hyaluronan Interactions by Soluble CD44 Inhibits Growth of Murine Mammary Carcinoma Cells in Ascites”. *Am J Path.* 156: 2159-2167, 2000.
- Pham HT, Block NL, Lokeshwar VB. “Tumor-derived hyaluronidase: a diagnostic urine marker for high-grade bladder cancer.” *Cancer Res.*; 57 (4): 778-83, 1997.
- Pisano C, Kollar P, Gianni M, Ferrara FF. “Bis-indols: a novel class of molecules enhancing the cytodifferentiation properties of retinoids in myeloid leukemia cells”. *Blood*, 2002.
- Ponta H, Wainwright D, Herrlich P. “The CD44 protein family.” *Int J Biochem Cell Biol.*; 30 (3): 299-305, 1998.
- Qiao M, Chen D, Ma X, Hu H. “Sustained release of bee venom peptide from biodegradable thermosensitive PLGA-PEG-PLGA triblock copolymer-based hydrogels in vitro.” *Pharmazie.*; 61 (3): 199-202, 2006.
- Reichardt HM, Tuckermann JP, Gottlicher M, et al. Repression of inflammatory responses in the absence of DNA binding by the glucocorticoid receptor. *EMBO J* 2001;20:7168–7173.
- Roberts MJ, Bentley MD, Harris JM. “Chemistry for peptide and protein PEGylation.” *Adv. Drug Deliv. Rev.*; 54 (4): 459-76, 2002.
- Roh MS, Kim CW, Park BS, Kim GC, Jeong JH, Kwon HC. “Mechanism of histone deacetylase inhibitor Trichostatin A induced apoptosis in human osteosarcoma cells.” *Apoptosis*; 9 (5): 583-9, 2004.
- Ropponen K, Tammi M, Parkkinen J, Eskelinen M, Tammi R, Lipponen P, Agren U, Alhava E, Kosma VM. ‘Tumor cell-associated hyaluronan as an unfavorable prognostic factor in colorectal cancer’. *Cancer Res.*; 58: 342-347, 1998.
- Ross JS, Gray K, Gray GS, Worland OJ, Rolfe M. “Anticancer antibodies.” *Am. J. Clin. Pathol.*; 119 (4): 472-85, 2003.
- Russo RI, Garcia MG, Alaniz L, Blanco G, Alvarez A, Hajos SE. “Hyaluronan oligosaccharides sensitize lymphoma resistant cells to vincristine by modulating P-glycoprotein activity and PI3K/Akt pathway”. *Int J. Cancer*: 122: 1012-1018, 2008.
- Samati Y, Yuksel N, Tarimci N. “Preparation and characterization of poly(D,L-lactic-co-glycolic Acid) microspheres containing flurbiprofen sodium.” *Drug Deliv.*; 13 (2): 105-11, 2006.
- Samuelsson C, Gustafson S. “Studies on the interaction between hyaluronan and a rat colon cancer cell line.” *Glycoconj J.*; 15 (2): 169-75, 1998.
- Sarasin A. “An overview of the mechanisms of mutagenesis and carcinogenesis.” *Mutat Res*; 544 (2-3): 99-106, 2003.
- Sarcev T, Secen N, Povazan Dj, Sabo A, Popovic , Bursac D, Kakas M, Zaric B, Milovancev A ‘The influence of dexamethasone in the decrease of chemotherapy-induced nausea and vomiting’ *J B.U.O.N.*,12(2):245-52,2007.

- Schenk-Braat EA, Bangma CH. "Immunotherapy for superficial bladder cancer." *Cancer Immunol Immunother.*; 54 (5): 414-23; 2005.
- Schnieders J, Gbureck U, Thull R, Kissel T. "Controlled release of gentamicin from calcium phosphate-poly(lactic acid-co-glycolic acid) composite bone cement." *Biomaterials.*; 27 (23): 4239-49, 2006.
- Schultze-Mosgau A, Griesinger G, Altgassen C, von Otte S, Hornung D, Diedrich K. "New developments in the use of peptide gonadotropin-releasing hormone antagonists versus agonists." *Expert Opin Investig Drugs.*; 14 (9): 1085-97, 2005.
- Schumacher R, Adamina M, Zurbriggen R, Bolli M, Padovan E, Zajac P, Heberer M, Spagnoli GC. "Influenza virosomes enhance class I restricted CTL induction through CD4+ T cell activation." *Vaccine.*; 22 (5-6): 714-23, 2004.
- Seo SA, Khang G, Rhee JM, Kim J, Lee HB. "Study on in vitro release patterns of fentanyl-loaded PLGA microspheres." *J Microencapsul.*; 20 (5): 569-79, 2003.
- Shaw RJ, Cantley LC. "Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth". *Nature*, 2006, vol. 441, no7092, pp. 424-430.
- Sholley MM, Ferguson GP, Seibel HR, Montour JL, Wilson JD. "Mechanisms of neovascularization. Vascular sprouting can occur without proliferation of endothelial cells." *Lab Invest.*; 51 (6): 624-34, 1984.
- Siemann DW, Horsman MR. "Enhancement of radiation therapy by vascular targeting agents." *Curr Opin Investig Drugs*; 3 (11): 1660-5, 2002.
- Simpson MA, Wilson CM, McCarthy JB. "Inhibition of prostate tumor cell hyaluronan synthesis impairs subcutaneous growth and vascularization in immunocompromised mice." *Am J Pathol.*; 161 (3): 849-57, 2002.
- Slevin M, Kumar S, Gaffney J "Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan induce multiple signaling pathways affecting vascular endothelial cell mitogenic and wound healing responses." *J Biol Chem.*; 277 (43): 41046-59, 2002.
- Slevin M, West D, Kumar P, Rooney P, Kumar S. "Hyaluronan, angiogenesis and malignant disease" *Int J Cancer.*; 109 (5): 793-4, 2004.
- Smallbone K, Gavaghan DJ, Gatenby RA, Maini PK. "The role of acidity in solid tumour growth and invasion." *J Theor Biol.*; 235 (4): 476-84, 2005.
- Sugahara KN, Hirata T, Hayasaka H, Stern R, Murai T, Miyasaka M. "Tumor cells enhance their own CD44 cleavage and motility by generating hyaluronan fragments." *J Biol Chem.*; 281 (9): 5861-8, 2005.
- Sugahara KN, Murai T, Nishinakamura H, Kawashima H, Saya H, Miyasaka M. "Hyaluronan oligosaccharides induce CD44 cleavage and promote cell migration in CD44-expressing tumor cells." *J Biol Chem.*; 278 (34): 32259-65, 2003.

- Takai N, Kawamata N, Gui D, Said JW, Miyakawa I, Koeffler HP. "Human ovarian carcinoma cells: Histone deacetylase inhibitors exhibit antiproliferative activity and potently induce apoptosis." *Cancer*; 101 (12): 2760-70; 2004.
- Takakura Y, Mahato RI, Hashida M. "Extravasation of macromolecules." *Adv Drug Deliv Rev.*; 34 (1): 93-108, 1998.
- Tanabe M, Ieiri I, Nagata N, Inoue K, Ito S, Kanamori Y, Takahashi M, Kurata Y, Kigawa J, Higuchi S, Terakawa N, Otsubo K. "Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene." *J Pharmacol Exp Ther.*; 297 (3): 1137-43, 2001.
- Termeer CC, Hennies J, Voith U, Ahrens T, Weiss JM, Prehm P, Simon JC. "Oligosaccharides of hyaluronan are potent activators of dendritic cells." *J Immunol.*; 165 (4): 1863-70, 2000.
- Teufelhofer O, Weiss RM, Parzefall W, Schulte-Hermann R, Micksche M, Berger W, Elbling L, Promyelocytic HL60 cells express NADPH oxidase and are excellent targets in a rapid spectrophotometric microplate assay for extracellular superoxide, *Toxicol.Sci.* 76(2):376-83,2003.
- Thelen P, Schweyer S, Hemmerlein B, Wuttke W, Seseke F, Ringert RH. "Expressional changes after histone deacetylase inhibition by valproic acid in LNCaP human prostate cancer cells." *Int J Oncol.*; 24 (1): 25-31, 2004.
- Toole BP. 'Hyaluronan in morphogenesis'. *J Intern Med.*; 242: 35-40, 1997.
- Toole BP. 'Hyaluronan promotes the malignant phenotype', *Glycobiology.*; 12: 37-42, 2002.
- Toyama-Sorimachi N, Miyasaka M. "A novel ligand for CD44 is sulfated proteoglycan." *Int Immunol.*; 6 (4): 655-60, 1994.
- Trochon V, Mabilat-Pragnon C, Bertrand P, Legrand Y, Soria J, Soria C, Delpech B, Lu H. "Hyaluronectin blocks the stimulatory effect of hyaluronan-derived fragments on endothelial cells during angiogenesis in vitro." *FEBS Lett.*; 418 (1-2): 6-10; 1997.
- Turley EA, Belch AJ, Poppema S, Pilarski LM. "Expression and function of a receptor for hyaluronan-mediated motility on normal and malignant B lymphocytes." *Blood.*; 81 (2): 446-53,1993.
- Tzircotis G, Thorne RF, Isacke CM. "Chemotaxis towards hyaluronan is dependent on CD44 expression and modulated by cell type variation in CD44-hyaluronan binding." *J Cell Sci.*; 118 (21): 5119-28, 2005.
- Uchegbu IF, Double JA, Kelland LR, Turton JA, Florence AT. "The activity of doxorubicin niosomes against an ovarian cancer cell line and three in vivo mouse tumour models." *J Drug Target.*; 3 (5): 399-409, 1996.
- Veronese FM, Morpurgo M. "Bioconjugation in pharmaceutical chemistry." *Farmaco.*; 54 (8): 497-516, 1999.

- Veronese FM, Schiavon O, Pasut G, Mendichi R, Andersson L, Tsirk A, Ford J, Wu G, Kneller S, Davies J, Duncan R. "PEG-doxorubicin conjugates: influence of polymer structure on drug release, in vitro cytotoxicity, biodistribution, and antitumor activity." *Bioconjug Chem.*; 16 (4): 775-84, 2005.
- Villar-Garea A, Esteller M. "Histone deacetylase inhibitors: understanding a new wave of anticancer agents." *Int J Cancer*; 112 (2): 171-8, 2004.
- Voest EE, Kenyon BM, O'Reilly MS, et al. "Inhibition of angiogenesis in vivo by interleukin-12." *J Natl Cancer Inst*; 87 (8): 581-6, 1995.
- Volpert OV, Ward WF, Lingen MW, et al. "Captopril inhibits angiogenesis and slows the growth of experimental tumors in rats." *J Clin Invest*; 98 (3): 671-9, 1996.
- Vyas SP, Singh RP, Jain S, Mishra V, Mahor S, Singh P, Gupta PN, Rawat A, Dubey P. "Non-ionic surfactant based vesicles (niosomes) for non-invasive topical genetic immunization against hepatitis B." *Int J Pharm.*; 296 (1-2): 80-6, 2005.
- Weiss JM, Renkl AC, Ahrens T, Moll J, Mai BH, Denfeld RW, Schopf E, Ponta H, Herrlich P, Simon JC. 'Activation-dependent modulation of hyaluronate-receptor expression and of hyaluronate-avidity by human monocytes'. *J Invest Dermatol.*; 111: 227-232, 1998.
- Wu B, Li P, Liu Y, et al. 3D structure of human FK506-binding protein 52: implications for the assembly of the glucocorticoid receptor/Hsp90/immunophilin heterocomplex. *PROC NATL ACAD SCI USA* 2004;101:8348-8353.
- Yamamoto H, Fujimoto J, Okamoto E, Furuyama J, Tamaoki T, Hashimoto-Tamaoki T. "Suppression of growth of hepatocellular carcinoma by sodium butyrate in vitro and in vivo." *Int J Cancer*; 76 (6): 897-902, 1998.
- Yan M, Kuang X, Qiang W, Shen J, Claypool K, S.Lynn W, Wong PKY, 'Prevention of Thymic Lymphoma Development in Atm-/- Mice by Dexamethasone', *Cancer Research*, 62:5153-5157, 2002
- Young LS, Searle PF, Onion D, Mautner V. "Viral gene therapy strategies: from basic science to clinical application." *J Pathol.*; 208 (2): 299-318, 2006.
- Yunis AA et al. "MIA PaCa-2 in continuous culture: sensitivity to asparaginase". *Int. J. Cancer* 19: 128-135, 1977
- Zeng C, Toole BP, Kinney SD, Kuo JW, Stamenkovic I. "Inhibition of tumor growth in vivo by hyaluronan oligomers." *Int J Cancer.*; 77 (3): 396-401, 1998.
- Zhang L, Underhill CB, Chen L. "Hyaluronan on the surface of tumor cells is correlated with metastatic behaviour." *Cancer Res.*; 55 (2): 428-33, 1995.
- Zhao XB, Lee RJ. "Tumor-selective targeted delivery of genes and antisense oligodeoxyribonucleotides via the folate receptor." *Adv Drug Deliv Rev.*; 56 (8): 1193-204, 2004.
- Zhu G, Mallery SR, Schwendeman SP. "Stabilization of proteins encapsulated in injectable poly (lactide-co-glycolide)." *Nature Biotechnol.*; 18 (1): 52-7, 2000.